



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-NOCICEPTIVO E ANTI-
INFLAMATÓRIO DO ÁCIDO PIPÉRICO**

POLIANA DE ARAUJO OLIVEIRA

Sob a orientação do Professor

Bruno Guimarães Marinho

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, área de concentração em fisiologia.

Seropédica, RJ
Julho de 2016

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

d48a

de Araujo Oliveira, Poliana, 1991-
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-NOCICEPTIVO E ANTI
INFLAMATÓRIO DO ÁCIDO PIPÉRICO / Poliana de Araujo
Oliveira. - 2016.
88 f.: il.

Orientador: Bruno Guimarães Marinho.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO
MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS, 2016.

1. Piperina. 2. Ácido pipérico. 3. Nocicepção. I.
Guimarães Marinho, Bruno, 1978-, orient. II
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS
FISIOLOGICAS III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS

POLIANA DE ARAUJO OLIVEIRA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Fisiológicas**, no Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, área de concentração em fisiologia.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 25/07/2016

Prof. Dr. Bruno Guimarães Marinho. UFRRJ
(Orientador)

Prof. Dr. Wellington da Silva Cortes. UFRRJ

Prof. Dr. Carlos Giovani de Oliveira Nascimento. UNIFAL

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho á Deus por me capacitar para chegar até aqui. E á minha Mãe, que sempre fez tudo por mim para que eu conseguisse conquistar todos os meus sonhos e nunca deixou de estar ao meu lado em nenhum momento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador e amigo que é uma das pessoas mais humanas que já conheci professor Bruno, obrigado por ter confiado e acreditado em mim desde o início, e sempre ser um incentivador, mesmo nos momentos mais difíceis não me deixou desanimar. Obrigada por tudo, principalmente pela paciência!

A minha mãe, por aturar minha ansiedade descontrolada e sempre cuidar de mim. Por me alimentar com tanto carinho e tirar o computador de cima de mim quando eu dormia. Agradeço por enxugar minhas lágrimas em momentos de desespero. A toda minha família por continuarem me incentivando.

Agradeço ao Adriano, meu amor! Por estar ao meu lado e ter tanta paciência, obrigada por me fazer tão feliz!

Á Rural e á todos os professores do DCFIS que são pessoas sensacionais, sempre dispostas a trocar conhecimentos. Muito obrigada, meus dias não seriam os mesmos se eu não pudesse contar com vocês!

As minhas irmãs de orientação, Gabi e Lilian, que permaneceram comigo até o fim, e nunca me deixaram desistir! Agradeço aos mestres Raoni, Livia e Roberto por me incentivarem incessantemente nessa reta final! Ao mestre Cláudio por compartilhar do meu desespero e também pelas caronas, nós conseguimos! Obrigada a todos os mestres que compartilharam de momentos de estudo, mas também muita risada. Meus dias com toda certeza não seriam os mesmo sem vocês.

Agradeço a UFRJ pelo imenso e continuo aprendizado. Agradeço também ao Fernando e ao Eduardo que fizeram meus dias no fundão menos solitários. Á agência de fomento CAPES

Agradeço a parceria com a Universidade Federal da Paraíba.

Ao PMPGCF pelo crescimento em todas as áreas da minha vida!

Aos membros da banca que aceitaram o convite.

E á todos aqueles que acreditaram em mim quando nem mais eu acreditava que me incentivaram e não saíram do meu lado, mesmo nos dias que eu só queria chorar. Considero essa conquista uma vitória, e tenho a honra de poder dividir com todos vocês.

RESUMO

OLIVEIRA, Poliana de Araujo. **Avaliação do potencial anti-nociceptivo e anti-inflamatório do ácido pipérico** 2016. 88p. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

Os fármacos atualmente utilizados em dor e inflamação são responsáveis por um grande número de efeitos adversos, e devido ao uso crônico, fazem com que o paciente tenha uma diminuição dos sintomas, mas não uma total melhoria da qualidade de vida, sendo assim é de extrema importância a busca por novos fármacos. A piperina é o principal composto ativo da pimenta preta (*Piper nigrum*), mais conhecida no Brasil como pimenta do reino, popularmente utilizada por diversos efeitos benéficos. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram que a piperina tem envolvimento funcional como antidepressivo, hepatoprotetor, antiparasitário antimetastático, antitiroídiano, imunomodulador, anti-inflamatório e analgésico. A fim de produzir melhora em sua seletividade e potência, alterações moleculares foram realizadas na piperina, obtendo-se então o Ácido pipérico. O objetivo deste trabalho foi avaliar, através da execução de modelos experimentais de dor aguda, crônica e inflamação, o potencial farmacológico antinociceptivo e anti-inflamatório do composto. No modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético foi verificada um percentual de inibição das contorções de 77,9% comparado ao controle, na maior dose testada (10mg/kg). No modelo da formalina o composto inibiu ambas as fases do modelo, com a dose de 10mg/kg o efeito inibitório chegou a 30% na 1ª fase e 67% na 2ª fase. O aumento do tempo de latência no modelo de retirada de cauda com o composto foi alcançado mais precocemente do que a morfina, o ACP aumentou o tempo de latência em 58% no tempo de 80 min comparado a linha de base na maior dose testada. Investigamos as possíveis vias envolvidas no mecanismo de ação do composto através da administração prévia de antagonistas, no modelo de retirada de cauda. Verificamos que o antagonista de receptores muscarínicos, atropina, foi capaz de inibir completamente o efeito do composto, demonstrando a participação da via colinérgica no mecanismo de ação. As vias opioide, nitrérgica e o canal de potássio dependente de ATP parecem não estar envolvidas no mecanismo de ação, visto que os antagonistas destas vias não inibiram o efeito do composto. O composto inibiu a nocicepção induzida pela capsaicina, que é agonista de receptores TRPV1 em 45,34%, demonstrando envolvimento de TRPV1. No modelo de Von Frey avaliamos a alodinia após a constrição crônica do nervo ciático. Neste modelo, o composto não demonstrou atividade antinociceptiva nas doses testadas. O modelo de campo aberto foi usado para verificar a influência do composto sobre a mobilidade do animal, e observamos que o mesmo não interfere no desempenho motor do animal. A atividade anti-inflamatória foi avaliada em modelos de inflamação induzido por carragenina. No modelo de edema de pata, o composto reduziu o edema em 75% na dose de 10mg/kg. No modelo da bolsa de ar subcutânea verificamos que a migração leucocitária foi reduzida assim como a produção de TNF- α e IL-1 β . O ácido pipérico demonstrou ser seletivo para COX-1, na avaliação da atividade enzimática de COX-1 e COX-2. Podemos sugerir que os efeitos da piperina podem ser mediados através da porção da molécula referente ao ácido pipérico.

Palavras chave: piperina, ácido pipérico, nocicepção.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Poliana de Araujo. 2016. 88p. **Evaluation of the potential nociceptive and anti-inflammatory of piperic acid.** Dissertation (Master of Physiological Sciences). Institute of Biological Sciences and Health, Department of Physiological Sciences, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

Drugs currently used in pain and inflammation are responsible for a large number of adverse effects, due to chronic use, producing in the patients a decrease of symptoms, but not an overall improvement in quality of life, therefore it is of extreme importance to search for new drugs. Piperine is the main active compound of black pepper (*Piper nigrum*), known in Brazil as black pepper, popularly used by several beneficial effects. Studies in vitro and in vivo show that piperine has functional involvement in antidepressant, hepatoprotective, anti-metastatic antiparasitic, antithyroid, immunomodulatory, anti-inflammatory and analgesic effects. To improve the selectivity and potency, molecular changes were made in the piperine, obtaining the piperic acid. The objective of this study was to evaluate, through of models of acute and chronic pain, and inflammation; a potential nociceptive and anti-inflammatory compound. In the model of writhing induced by acetic acid was observed a percentage inhibition of writhes of 77,9% compared to the control, in the highest dose tested (10mg / kg). In the formalin test, the compound inhibited both phases of the test, with the dose of 10mg/kg The inhibitory effect was 30% in stage 1 and stage 2 at 67%. The increase in the latency time in tail flick test had an earlier action compared to morphine and the piperic acid increased the latency time in 58% in 80min time in relation to baseline. We investigated the possible pathways involved in the mechanism of action of the compound by prior administration of antagonists in the tail flick test. We found that the muscarinic antagonist, atropine, was able to completely inhibit the effect of the compound, demonstrating the involvement of the cholinergic pathway in the mechanism of action. The opioid and nitrenergic pathways and the potassium channel ATP-dependent are not involved in the mechanism of action, since these antagonists do not inhibit the effect of the compound. The compound was able to inhibit capsaicin-induced nociception, capsaicina is agonist TRPV1, in 45,34% demonstrating the involvement of TRPV1. The von Frey test evaluate allodynia after chronic constriction of the sciatic nerve. In this test, the compound did not show antinociceptive activity with the doses tested. The open field test was used to determine the influence of the compound on the animal's mobility, and we observe that the action of the compound did not interfere on animal's motor performance. The anti-inflammatory activity was evaluated in models of inflammation induced by carrageenan. In the paw oedema test, the compound significantly reduced the oedema at doses of 5 and 10 mg/kg. In the air pouch test, we found that the leukocyte migration was reduced, as well as the production of TNF- α and IL-1 β . The piperic acid was shown to be selective for COX-1 in the assessment of enzymatic activity of COX-1 and COX-2. We suggest that the effects of piperine can be mediated primarily through the portion of the molecule related to piperic acid.

Keywords: piperine, piperic acid, nociception.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Principais classes de dor em relação ao estímulo. (A) A dor nociceptiva representa a sensação associada com a detecção de estímulos nocivos potencialmente prejudiciais dos tecidos, possui caráter protetor. (B) A dor inflamatória é associada a danos nos tecidos e a ação de mediadores inflamatórios podem promover a reparação e causar hipersensibilidade a dor até que ocorra a cura. (C) A dor patológica é um estado de doença causada por danos no sistema nervoso, sendo a principal a dor neuropática (FONTE: adaptado de WOOLF 2010)....
..... pág 4
- Figura 2** - Mecanismo nociceptivo da dor. A1 e A2) Estímulo nocivo ativa nociceptores no local (como por exemplo através da liberação de substâncias da inflamação como prostaglandinas, histamina, substância P e serotonina,) que geram um potencial de ação (transdução), o qual é B) conduzido pelas fibras aferentes para a C) raiz dorsal da medula espinhal onde fazem sinapse com o neurônio de segunda ordem que transmitem o estímulo (transmissão) para áreas mais superiores do D) sistema nervoso central (trato espinotalâmico, hipotálamo, tálamo e córtex cerebral), onde os estímulos são interpretados e as reações/sensações ocorrem. (fonte: adaptado de TOLEDO 2014) 6
- Figura 3** – Os canais e receptores envolvidos na transdução de sinal do nociceptor. (FEIN 2011) pág 7
- Figura 4**– Canais TRP, termoreceptores e seus ativadores..... pág 12
- Figura 5** – Ação da capsaicina em TRPV1 - Capsaicina provoca dor aguda e inflamação neurogênica por ativar seletivamente TRPV1, promovendo a liberação de neurotransmissores e peptídeos (CGRP e SP) através da ativação de canais de íons e nociceptores. (JULIUS, 2013) pág 13
- Figura 6** – *Piper nigrum* e seu principal alcalóide ativo, piperina – a) frutos da pimenta do reino em bagas; b) estrutura química da piperina, compreende as subunidades A, B e C; c) parte acil da molécula da piperina é denominada ácido pipérico e é composta pelas subunidades A e B. (Fonte: adaptado de FERREIRA, 2012) pág 15
- Figura 7** – Esquema ilustrativo: Protocolo experimental do modelo de contorções induzidas por ácido acético..... pág 19

Figura 8 – Esquema ilustrativo: Protocolo experimental do Modelo da Formalina.....	pág 19
Figura 9 – Esquema ilustrativo: Modelo de retirada da cauda. a) Protocolo experimental; b) Fórmula utilizada para quantificação da antinocicepção.	pág 20
Figura 10 – Esquema ilustrativo: Protocolo experimental do modelo de nocicepção induzida por capsaicina	pág 21
Figura 11 – Esquema ilustrativo: Constrição crônica do nervo ciático. São realizadas quatro ligaduras no nervo ciático do animal, induzindo dor neuropática. (fonte: adaptado de AUSTIN E MOALEM, 2012)	pág 22
Figura 12: Esquema ilustrativo: Protocolo experimental do modelo de Von Frey. CCC= constrição crônica do nervo ciático; 1*=início da administração das substâncias (ACP 10 mg/kg v.o., Morfina 1 mg/kg i.p e água destilada) Tratamento realizado durante 14 dias. ...	pág 23
Figura 13 – Esquema ilustrativo: Protocolo experimental do modelo de campo aberto. .	pág 24
Figura 14 – Esquema ilustrativo: Protocolo experimental do modelo de edema de pata.	pág 24
Figura 15 – Esquema ilustrativo: Protocolo experimental do modelo da bolsa de ar subcutânea estéril	pág 25
Figura 16 – Efeito antinociceptivo do ACP (1, 5 e 10mg/kg), veículo, controle (água destilada) e morfina (3 mg/kg) no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Os tratamentos foram realizados por via oral. Os resultados são expressos como média ± E.P.M. (n = 6) do número de contorções. A significância estatística (* p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, morfina e doses crescentes do composto, por One-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.	pág 27
Figura 17 – Efeito antinociceptivo do ACP (1, 5 e 10mg/kg), veículo, controle (água destilada), AAS e morfina (3 mg/kg) no modelo de formalina. a) 1ª fase e b) 2ª fase. Os tratamentos foram realizados por via oral. Os resultados são expressos como média ± E.P.M. (n = 6) do tempo de lambertura. A significância estatística (* p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, morfina, AAS e	

doses crescentes do composto, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.
.....pág 29

Figura 18 – Efeito antinociceptivo do ACP (1, 5, 10mg/kg), veículo, controle (água destilada) e morfina (3 mg/kg) no modelo de retirada da cauda. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. do % de aumento em relação à linha de base (n = 6). A significância estatística (* p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, morfina e doses crescentes do composto, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni..... pág 31

Figura 19 – Influência da administração prévia de Glibenclamida sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo ACP na dose de 10mg/kg no modelo de retirada da cauda. Os animais foram pré-tratados por via i.p. com Glibenclamida (G -1, 3 e 5 mg/kg) 15 minutos antes da administração do composto. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. (n = 7-10) do % de aumento em relação à linha de base. A significância estatística (* p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com o composto isoladamente e combinado a doses crescentes de Glibenclamida, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. pág 32

Figura 20 – Influência da administração prévia de N -nitro-arginina-L-metil éster - L-NAME sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo ACP no modelo de retirada da cauda. Os animais foram pré-tratados por via i.p. com N -nitro-arginina-L-metil éster (L-NAME -1, 3 e 5mg/kg) 15 minutos antes da administração do composto. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. (n = 7-10) do % de aumento em relação à linha de base. A significância estatística (* p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com o composto isoladamente e combinado a doses crescentes de L-NAME, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. pág 33

Figura 21 – Influência da administração do antagonista dos receptores opióides não seletivo, naloxona, sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo ACP no modelo de retirada da cauda. Os animais foram pré-tratados por via i.p. com Naloxona (N -1, 3 e 5mg/kg) 15 minutos antes da administração do composto. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. (n = 7-10) do % de aumento em relação à linha de base. A significância estatística (* p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com o composto isoladamente e combinado a doses crescentes de naloxona, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. pág 34

Figura 22 - Avaliação da participação da via colinérgica através da administração prévia de Atropina, um antagonista de receptores muscarínicos (Atro 1, 3 e 5mg/kg i.p.), sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo ACP no modelo de retirada da cauda. Os animais foram pré-tratados 15 minutos antes da administração do composto. Os resultados são expressos como média ± E.P.M. (n = 6) do % de aumento em relação à linha de base. A significância estatística (* p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com o composto isoladamente e combinado a doses crescentes de atropina, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. pág 35

Figura 23 – Avaliação da atividade antinociceptiva do ACP no modelo de nocicepção induzida por capsaicina. Os tratamentos com o controle e ACP (1, 5 e 10 mg/kg), foram realizados por via oral. Os resultados são expressos como média ± E.P.M. (n = 6) do tempo de lambertura. A significância estatística (* p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com ACP, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni..... pág 36

Figura 24 – Avaliação da atividade antinociceptiva aguda no modelo de constrição crônica do nervo ciático através do modelo de von frey. Foram realizadas 3 estimulações com intervalo de 5 a 10 seg em cada animal. Os resultados são expressos como média ± E.P.M. (n = 6) do limiar mecânico em gramas. A significância estatística (* p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados morfina (1mg/kg i.p.), ACP (10mg/kg v.o.) e grupo sham (falso operado), por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni pág 37

Figura 25 - Avaliação da atividade antinociceptiva crônica no modelo de constrição crônica do nervo ciático através do modelo de von frey. Os animais foram tratados por 14 dias. Os resultados são expressos como média ± E.P.M. (n = 6) do limiar mecânico em gramas. A significância estatística (* p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados morfina (1mg/kg i.p.), ACP (10mg/kg v.o.) e o grupo sham (falso operado), por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. pág 38

Figura 26 – Avaliação do ACP no modelo de campo aberto. Os tratamentos com água destilada, veículo, ACP (10 mg/kg) e morfina (3 mg/kg) foram realizados por via oral. Os resultados são expressos como média ± E.P.M. (n = 6) do número de quadrados percorridos pelos animais. A significância estatística (* p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001) foi calculada

entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, morfina e ACP, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. pág 39

Figura 27 - Efeito do ACP no modelo de edema de pata. Os animais foram pré-tratados com água destilada, veículo, dexametasona (2,25 mg/kg; S.C.) e ACP (1, 5 e 10 mg/kg). A carragenina foi aplicada na pata esquerda dos animais em todos os grupos e a diferença entre o volume foi feita em comparação com a pata direita, injetada com PBS. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. (n = 6) do volume de edema da pata. A significância estatística (* p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, dexametasona e doses crescentes do composto, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. pág 40

Figura 28 - Efeito do ACP na migração de leucócitos totais a partir do modelo da bolsa de ar subcutâneo. Os animais foram pré-tratados com água destilada, veículo, dexametasona (2,25 mg/kg; S.C.) e ACP (1, 5 e 10 mg/kg). Na bolsa de ar subcutâneo foram aplicadas PBS e carragenina. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. (n = 6) do número de leucócitos totais. A significância estatística (* p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, dexametasona e doses crescentes do composto e a significância estatística (# p < 0,05, ##p < 0,01 e ###p < 0,001) foi calculada entre o grupo que recebeu solução salina e o que recebeu carragenina no espaço subcutâneo, por One-Way ANOVA, seguida pelo teste de Bonferroni. pág 41

Figura 29 - Efeito do ACP na quantificação de TNF- α a partir do modelo da bolsa de ar subcutâneo. Os animais foram pré-tratados com água destilada, dexametasona (2,25 mg/kg; s.c) e o composto (1, 5 e 10 mg/kg; v.o). Na bolsa de ar subcutâneo foram aplicadas solução PBS e carragenina. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. (n = 7-10) da concentração de TNF- α . A significância estatística (* p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com dexametasona e doses crescentes do composto e a significância estatística (# p < 0,05, ##p < 0,01 e ###p < 0,001) foi calculada entre o grupo que recebeu solução salina e o que recebeu carragenina, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. pág 43

Figura 30 - Efeito do ACP na quantificação de IL-1 β a partir do modelo da bolsa de ar subcutâneo. Os animais foram pré-tratados com água destilada, dexametasona (2,25 mg/kg; s.c) e o composto (1, 5 e 10 mg/kg; v.o). Na bolsa de ar subcutâneo foram aplicadas solução PBS e carragenina. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. (n = 7-10) da

concentração de IL-1 β . A significância estatística (* p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com a dexametasona e doses crescentes do composto e a significância estatística (# p < 0,05, ##p < 0,01 e ###p < 0,001) foi calculada entre o grupo que recebeu solução salina e o que recebeu carragenina, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. pág 45

Figura 31 - Efeito de concentrações crescentes do ACP sobre a atividade enzimática de COX-1. Os resultados são expressos como percentuais de inibição enzimática. Foi utilizado o método de regressão não-linear para o cálculo de CI₅₀. O índice de seletividade (IS) obtido para o composto foi de 0,06; sendo que IS>1 – seletividade para COX-2, IS<1 – seletividade para COX-1..... pág 47

Figura 32 - Efeito de concentrações crescentes do ACP sobre a atividade enzimática de COX-2. Os resultados são expressos como percentuais de inibição enzimática. Foi utilizado o método de regressão não-linear para o cálculo de CI₅₀. O índice de seletividade (IS) obtido para o composto foi de 0,06; sendo que IS>1 – seletividade para COX-2, IS<1 – seletividade para COX-1..... pág 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais mediadores inflamatórios, suas fontes e ações. (adaptado de KUMAR, 2013)	9
Tabela 2 - Grupos experimentais com seus respectivos tratamentos e procedimentos realizados.	22
Tabela 3 – Modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético	27
Tabela 4 – Tempos de lambedura, em segundos, no modelo de formalina	30
Tabela 5 – Tempos de latência, em segundos, no modelo de retirada de cauda.	31
Tabela 6 – Avaliação da influência da administração prévia de glibenclamida sobre os tempos de latência induzidos pelo ACP no modelo de retirada de cauda.	32
Tabela 7 - Avaliação da influência da administração prévia de L-NAME sobre os tempos de latência induzidos pelo ACP no modelo de retirada de cauda.	33
Tabela 8 – Avaliação da influência da administração prévia de Naloxona sobre os tempos de latência induzidos pelo ACP no modelo de retirada de cauda.	34
Tabela 9 - Avaliação da influência da administração prévia de Atropina sobre os tempos de latência induzidos pelo ACP no modelo de retirada de cauda.	35
Tabela 10 – Avaliação da atividade antinociceptiva de ACP no modelo da capsaicina.	36
Tabela 11 – Avaliação da atividade antinociceptiva aguda pelo modelo de Von Frey.	37
Tabela 12 - Avaliação da atividade antinociceptiva crônica pelo modelo de Von Frey.	38
Tabela 13 – Número de quadrados percorridos a partir do modelo de campo aberto.	39
Tabela 14 – Avaliação do efeito anti-edematogênico de ACP no modelo de edema de pata.	40
Tabela 15 – Avaliação do efeito do ACP sobre a migração leucocitária no modelo de bolsa de ar subcutânea.	42
Tabela 16 – Quantificação de TNF- α no modelo de bolsa de ar subcutânea.	44

Tabela 17 - Quantificação de IL-1 β no modelo de bolsa de ar subcutânea.	46
Tabela 18 - Influência de concentrações crescentes do composto sobre a atividade das enzimas COX-1 e COX-2, através do método de imunoenensaio enzimático.	47
Tabela 19 - Avaliação toxicológica aguda e sub crônica com análise do peso corporal e consumo de ração:	48
Tabela 20 - Análise macroscópica e peso relativo dos órgãos:	49

LISTA DE ABREVIACÃO E SÍMBOLOS

A δ	Fibra nervosa do tipo A-delta
5HT	Hidroxitriptamina (serotonina)
AA	Ácido araquidônico
AAS	Ácido acetilsalicílico
ACh	Acetilcolina
ACP	Ácido pipérico
AINES	Anti-inflamatório não esteroideal
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato
ANOVA	Análise de Variância
ASC	Área sob a curva
ATP	Adenosina trifosfato
ATROP	Atropina
B1	Receptores de bradicinina tipo 1
B2	Receptores de bradicinina tipo 2
C	Fibra nervosa do tipo C
Ca ⁺⁺	Cálcio
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
cm	Centímetro
COX	Cicloxigenase
COX-1	Cicloxigenase 1
COX-2	Cicloxigenase 2
DL ₅₀	Dose letal mediana
EPM	Erro padrão da média
G	Glibenclamida
g	Gramas
GABA	Ácido gama-aminobutírico
Gi	Proteína G inibitória
GMPc	Guanosina mono-fosfato cíclico
GTP	Guanosina trifosfato
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
IL-1	Interleucina 1
IL-1 β	Interleucina 1-beta

INCA	Instituto Nacional do Câncer
i-NOS	Óxido nítrico sintase induzível
i.p.	Intraperitoneal
K ⁺	Potássio
K ^{ATP}	Canais de potássio dependente de ATP
LB	Linha de base
L-NAME	N ω -nitro- L-arginina metil Ester
LT	Leucotrienos
LTB4	Leucotrieno B4
LTC4	Leucotrieno C4
LTD4	Leucotrieno D4
M	Morfina
m/s	Metros por segundo
mg/kg	Miligrama por quilo
mg	Miligrama
min	Minuto(s)
mL/kg	Mililitro por quilo
mL	Mililitro
mM	Milimol
MS	Ministério da Saúde
N	Naloxona
n=	número de animais por grupo
NA	Noradrenalina
Na ₂ PO ₄	Fosfato dissódico
NaCl	Cloreto de sódio
NK	Células natural killer
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
OMS	Organização mundial de saúde
p. ex	Por exemplo
PA	Pressão arterial
PAF	Fator de ativação plaquetária
PD	Pata direita

PE	Pata esquerda
pg/mL	Picograma por mililitro
PGD2	Prostaglandina D2
PGE2	Prostaglandina E2
PGI2	Prostaciclina
PKG	Proteína quinase G
PLA2	Fosfolipase A2
PLC	Fosfolipase C
s.c.	Subcutâneo
SBED	Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor
SN	Sistema Nervoso
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TL	Tempos de latência
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TR	Tempo de reação
TRP	Receptor de potencial transitório
TRPA1	Receptor de potencial transitório anquirina membro 1
TRPV1	Receptor de potencial transitório membro 1
TXA2	Tromboxano
UI	Unidade Internacional
V	Veículo
v/v	Volume por volume
v.o.	Via oral
VR1	Receptor vaniloide tipo 1
μ L	Microlitros
μ g	Microgramas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Dor e nocicepção	2
2.2 Classificação da dor	2
2.3 Fisiopatologia da dor	4
2.4 Inflamação	8
2.5 Sistema colinérgico na dor e inflamação	11
2.6 Receptor de potencial transitório (TRP)	11
2.7 Ácido pipérico	13
2.7.1 <i>Piper nigrum</i> L.	13
2.7.2 Piperina	14
3 OBJETIVOS	16
3.1 Objetivos Gerais	16
3.2 Objetivos Específicos	16
4 MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1 Animais	17
4.2 Drogas e Reagentes	17
4.3 Tratamentos, administração e preparo das substâncias	17
4.4 Modelos de avaliação da atividade antinociceptiva	18
4.4.1 Modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético	18
4.4.2 Modelo da Formalina.....	19

4.4.3 Modelo de retirada da cauda	20
4.4.4 Modelo de nociceção induzida por capsaicina	20
4.4.5 Modelo da Constrição Crônica do Nervo Ciático (CCC)	21
4.4.6 Modelo de Von Frey	22
4.4.7 Modelo de campo aberto	23
4.5 Modelos de avaliação da atividade anti-inflamatória	24
4.5.1 Modelo de edema de pata	24
4.5.2 Modelo da bolsa de ar subcutâneo (air pouch)	24
4.5.3 Quantificação de citocinas	25
4.6 Avaliação toxicológica	26
4.6.1 Toxicidade Aguda e subcrônica	26
4.7 Análise Estatística.....	26
5 RESULTADOS	27
5.1 Modelos de avaliação da atividade antinociceptiva	27
5.1.1 Modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético	27
5.1.2 Modelo da formalina	28
5.1.3 Modelo de retirada da cauda	30
5.1.4 Nociceção induzida por capsaicina.....	35
5.1.5 Modelo de Von Frey	36
5.1.6 Modelo do campo aberto	38
5.2 Modelos de avaliação da atividade anti-inflamatória	39
5.2.1 Modelo de edema de pata	40

5.2.2 Modelo da bolsa de ar subcutânea estéril	41
5.2.3 Quantificação de citocinas	42
5.3 Avaliação toxicológica Aguda e subcrônica	48
6 DISCUSSÃO	50
7 CONCLUSÕES	56
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1 INTRODUÇÃO

A dor é um fenômeno multidimensional, envolvendo aspectos físico-sensoriais e aspectos emocionais, na maioria das vezes é relatada como um desconforto, uma "sensação ruim", algo que incomoda, que o paciente não consegue nem descrever muito bem, gerando imensa dificuldade em diagnosticar sua etiologia ou mesmo em classificá-la. Os mediadores envolvidos na dor, que podem ser produzidos por irritantes exógenos (formalina e ácido acético, por exemplo) são responsáveis pela multiplicidade de eventos que ocorrem durante a transmissão da dor, em ambos os sistemas nervosos periférico e central.

A inflamação consiste em um complexo processo, na maioria das vezes associado a dor. É uma resposta natural do organismo contra infecções ou agentes agressores. Envolve alterações vasculares, células responsáveis pelo combate ao agente agressor e eliminação de componentes teciduais alterados. O tempo de duração e a intensidade, tanto da dor quanto da inflamação, determinam diferentes graus e fases, por exemplo, dor aguda ou crônica.

Os fármacos atualmente disponíveis para o tratamento de ambos, produzem diversos efeitos adversos levando a busca por novos fármacos, pela necessidade de tratamentos mais eficazes. Logo, o desenvolvimento de novos fármacos é de fundamental importância para o tratamento de condições algéscas e inflamatórias incapacitantes.

Temos vários exemplos de fármacos que determinaram grandes avanços para ciência, e em sua maioria de origem natural. Podemos citar o ácido acetil salicílico (AAS) como um desses. O AAS foi o primeiro fármaco da história a ser sintetizado em laboratório, com base na estrutura química de uma substância natural isolada do Salgueiro Branco

O ácido pipérico é a parte acil da molécula da piperina, que está presente em diferentes espécies do gênero *Piper*, sendo mais abundante nos frutos de *Piper nigrum* (popularmente conhecida no Brasil como pimenta do reino). A piperina, *in vitro* e *in vivo*, têm envolvimento funcional como antidepressivo, hepatoprotetor, antiparasitário anti-metastático, antitiroidiano, imunomodulador, e composto antitumoral. Estudos ainda demonstram que a piperina inibe o óxido nítrico (NO), Fator de necrose tumoral - α (TNF- α), e a expressão do gene pró-inflamatório *in vitro*, bem como *in vivo*. Através de alterações na síntese da piperina o Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal da Universidade Federal da Paraíba obteve o ácido pipérico. A principal proposta deste estudo foi avaliar a o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório do ácido pipérico em modelos de dor aguda e inflamação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Dor e nocicepção

Dor é uma palavra da língua portuguesa, originária do latim *dolore*, que significa sofrimento, na língua inglesa denomina-se *pain*, original do grego “*pena*” (FEIN, 2011)

A dor é uma experiência complexa, como definido por Julius e Basbaum. Envolve além da transdução do estímulo nocivo ambiental, o processamento cognitivo e emocional do encéfalo. (JULIUS E BASBAUM, 2001). Em 2008 foi definido pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como “*uma experiência emocional e sensorial desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial ou descrito em termos de tais danos*”. (LOESER E TREEDE, 2008).

Williams e colaboradores, em 2016, propuseram através de um artigo publicado no jornal da IASP uma nova definição para dor. Onde a definem como “*uma experiência angustiante associada a uma lesão real ou potencial dos tecidos com componentes sensoriais, emocionais, cognitivos e sociais*”. A proposta, segundo os autores é para abranger de forma mais fidedigna do que se entende por dor hoje em dia, atentando ainda àqueles que não conseguem descrever verbalmente.

Outra definição importante fornecida pela IASP em 2008 é a de nocicepção, definida como “*o processo neural de decodificação e processamento do estímulo nocivo*”. (LOESER E TREEDE, 2008). É muito importante a diferenciação dos termos dor e nocicepção, pois a dor não pode ser mensurada experimentalmente, pois envolve componente emocional. Já a nocicepção pode ser mensurada através de modelos experimentais. Esses estudos experimentais tornam-se extremamente úteis no avanço da compreensão da base fisiológica da nocicepção e ajudam no entendimento do que é a dor clínica, através da identificação dos neurotransmissores, receptores, mensageiros intracelulares, e genes envolvidos em comportamentos de dor; e uma melhor compreensão dos tratamentos farmacológicos e não-farmacológicos existentes ou em desenvolvimento. (GREGORY *et al*, 2013)

2.2 Classificação da dor

A dor pode ser definida do ponto de vista temporal, de acordo com sua origem neurofisiológica, localidade e em relação à sua natureza.

Do ponto de vista temporal a dor pode ser classificada em aguda e crônica. A dor aguda tem início súbito relacionado a afecções traumáticas, infecciosas ou inflamatórias. Espera-se que desapareça após intervenção na causa, ou seja, cura da lesão, imobilização ou em resposta a fármacos. Este tipo de dor responde rapidamente às intervenções na causa e não costumam ser recorrentes. A dor aguda está associada as respostas neurovegetativas como aumento da pressão arterial (PA), taquicardia, taquipnéia, agitação psicomotora e ansiedade. Relato de intensidade forte ou incapacitante de alto impacto na qualidade de vida. Observa-se vocalização, expressões faciais e posturas de proteção. Um exemplo de dor aguda é a que sentimos após um traumatismo ou dor de dente, por exemplo. Possui caráter protetor. (BRASIL, 2001).

Segundo a Organização mundial de Saúde (OMS), entende-se por dor crônica a dor persistente por mais de três a seis meses, independentemente de qual seja a sua causa.

Passa a ser considerada doença quando interfere na qualidade de vida do indivíduo necessitando, por este motivo, de tratamentos eficazes para evitar o desenvolvimento de sequelas físicas (atrofia muscular, redução de força muscular, encurtamento e redução da elasticidade dos tendões e ligamentos), e psíquicas (alterações do sono, ansiedade e depressão). Um exemplo de dor crônica é a dor neuropática, como tem-se na neuralgia trigemial. Possui caráter incapacitante. (BRASIL, 2012)

Ainda, segundo a Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor (SBED), a dor pode ser dita também recorrente, quando apresenta curtos períodos de duração porém que retornam com frequência, a exemplo da enxaqueca, e esta pode ocorrer por toda a vida do indivíduo mesmo sem um processo definido. Considerando a origem do estímulo, a dor pode ser classificada da seguinte forma:

Dor nociceptiva: A dor nociceptiva ocorre por ativação fisiológica de receptores e da via de condução da dor e está relacionada à lesão de tecidos ósseos, musculares ou ligamentares, ou seja, é dependente de estímulos mecânicos, térmicos ou químicos que ativam os nociceptores. (figura 1A). (WOOLF 2010; SCHESTATSKY, 2008)

Dor inflamatória: É a dor ocasionada pela hipersensibilidade sensorial após dano tecidual, essa dor auxilia na cicatrização já que apresenta um caráter protetor com o intuito de diminuir o contato físico e movimento. Em um processo inflamatório ocasionado, por exemplo, após uma ferida cirúrgica, os estímulos, normalmente inócuos, agora provocam dor. Esta dor é causada pela ativação do sistema imunológico por lesão ou infecção de tecido, sendo então, chamado de dor inflamatória (figura 1B).

Dor neuropática: A Dor neuropática é uma dor provocada por uma lesão ou uma doença no sistema nervoso, sendo melhor compreendida como resultado da ativação anormal da via nociceptiva (fibras de pequeno calibre e trato espinotalâmico). Normalmente são descritas como sensações agudas, de queimadura ou de choque elétrico, ou ainda como sensações de formigamento. É de difícil tratamento e frequentemente torna-se crônica. É muitas vezes incapacitante. A dor neuropática (DN) é um tipo de dor crônica que foi definida em 1994, pela IASP (International Association for the Study of Pain), como uma “dor iniciada ou causada por uma lesão primária ou disfunção ou perturbação transitória no sistema nervoso central ou periférico”. Após vários anos, em 2008, o Grupo de Interesse em Dor Neuropática da IASP propôs uma nova definição, “dor que ocorre como uma consequência direta de uma doença ou lesão que afete o sistema somatossensorial”, como por exemplo, a dor talâmica. Pode ser do tipo periférica, quando resultante de lesão em nervos periféricos, que modifica o padrão de condução dos impulsos, induzindo sensibilidade periférica ou central, ou pode ser central, que resultada da alteração da via espino-talâmo-cortical ou da modulação inibitória exercida por vias descendentes (figura 1 C). (BARON, 2010; SBED, 2010).

Dor psicológica ou psicogênica: é a dor de origem emocional, e é rara, podendo, no entanto ser muito incapacitante e de difícil tratamento. O paciente sente dor a partir de pequenos estímulos, que são amplificados pelo seu estado emocional de medo, ansiedade, angústia ou até mesmo depressão. A figura 1 demonstra de forma simplificada as três principais classificações da dor em relação ao estímulo, que são alvos de intensos estudos (WOOLF 2010).

Em relação a sua localização a dor pode ser somática quando proveniente da pele ou musculoesquelética, ou pode ser dita visceral quando a dor é proveniente de órgãos viscerais. (WOOLF 2010)

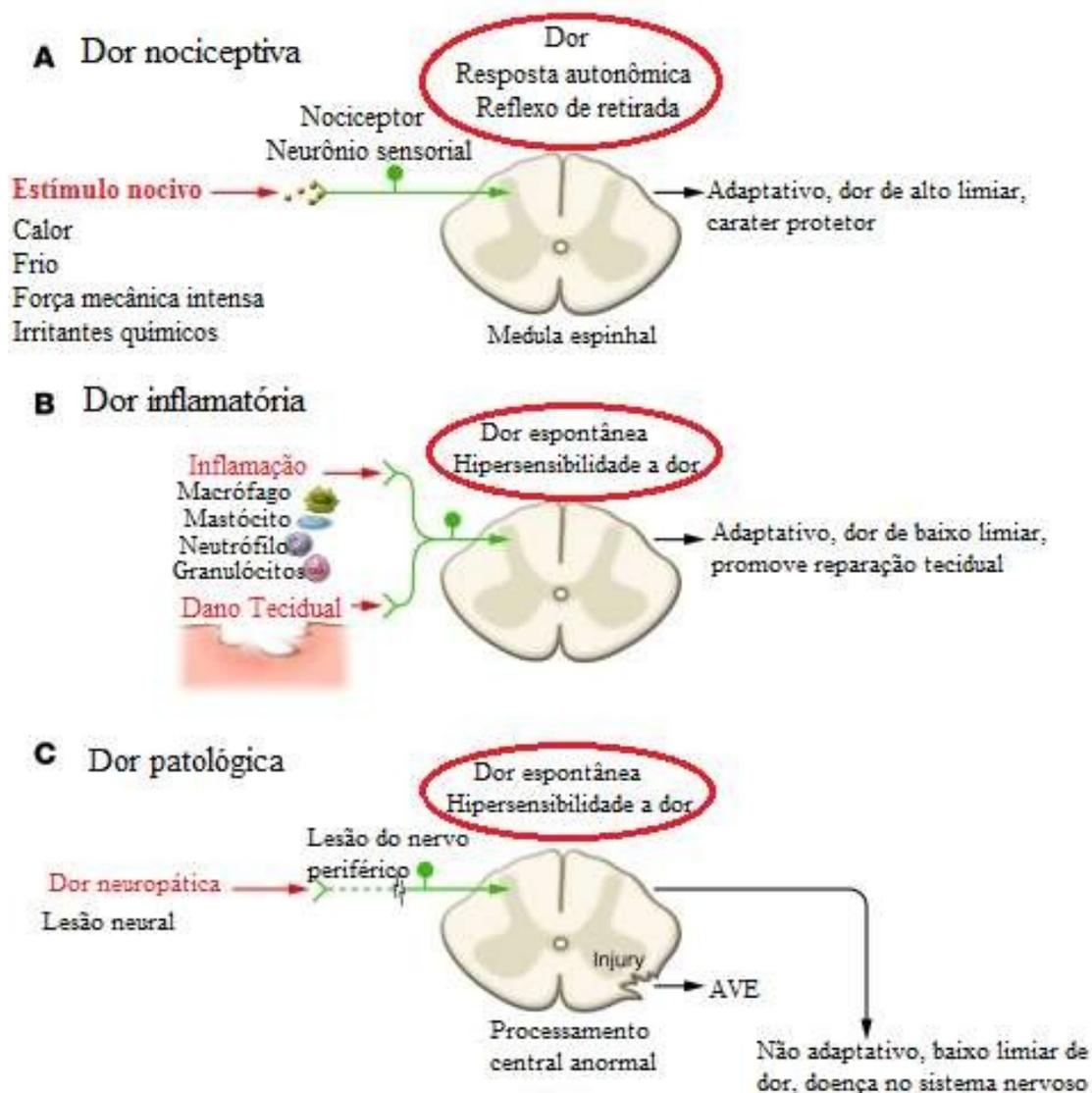


Figura 1 – Principais classes de dor em relação ao estímulo. (A) A dor nociceptiva representa a sensação associada com a detecção de estímulos nocivos potencialmente prejudiciais dos tecidos, possui caráter protetor. (B) A dor inflamatória é associada a danos nos tecidos e a ação de mediadores inflamatórios podem promover a reparação e causar hipersensibilidade a dor até que ocorra a cura. (C) A dor patológica é um estado de doença causada por danos no sistema nervoso, sendo a principal a dor neuropática (FONTE: adaptado de WOOLF 2010)

2.3 Fisiopatologia da dor

É de extrema importância o estudo da fisiopatologia da dor, visto que nos leva ao conhecimento da via envolvida, facilitando a pesquisa de novos fármacos e o entendimento desse processo, que é tão complexo e envolve estruturas que estão presentes desde a pele até as regiões mais especializadas do sistema nervoso central (SNC). Na figura 2 podemos ver as principais estruturas envolvidas na via de condução da dor.

Os nociceptores (receptores de estímulo nocivo) estão localizados nas terminações das fibras nervosas A δ e C e são capazes de traduzir um estímulo nocivo em estímulo elétrico, que por sua vez será transmitido até o sistema nervoso central e interpretado no córtex cerebral como nocicepção. Diversas substâncias químicas como: acetilcolina, bradicinina, histamina, serotonina, substância P, prostaglandinas, interleucinas e fator de crescimento do nervo (NGF); podem levar a ativação periférica dos nociceptores. A liberação dessas substâncias ocorre a partir de uma lesão, por exemplo, (ROCHA e cols., 2007).

A ativação de neurônios sensoriais primários, pelos nociceptores, dá partida ao início da sensação dolorosa. Os neurônios sensoriais primários conduzem informações sensitivas nociceptivas ou não nociceptivas da pele, órgãos e tecidos internos para medula espinhal. Os corpos celulares desses neurônios estão localizados nos gânglios da raiz dorsal, que são gânglios paravertebrais situados aos pares ao longo da medula espinhal. Os neurônios do gânglio da raiz dorsal emitem projeções axonais em duas direções, à periferia e ao corno dorsal da medula espinhal (figura 2C). Essas projeções, por sua vez, encontram-se organizadas em fibras, as fibras aferentes primárias, que são classificadas dentro de três grupos de acordo com o diâmetro e estrutura da fibra e com a velocidade de condução do impulso: 1) fibras do tipo C que são delgadas (0,4 a 1,2 μ m de diâmetro), não-mielinizadas e de baixa velocidade de condução (0,5 a 2 m/s); 2) fibras A δ que são de médio diâmetro (2 a 6 μ m), pouco mielinizadas e possuem velocidade de condução intermediária (12 a 30 m/s); e 3) fibras do tipo A β que são de grande diâmetro (mais de 10 μ m), mielinizadas e de rápida condução (30 a 100 m/s) (figura 2 B). (ALMEIDA *et al.*, 2004).

A transmissão do estímulo nociceptivo a partir do local de lesão tecidual constitui uma resposta biológica importante, que visa proteger o organismo de lesão adicional. Os neurônios sensitivos primários detectam e convertem estímulos mecânicos, químicos e térmicos indentificados pelos nociceptores, em atividade elétrica. A transdução, que é a decodificação de estímulos químicos, térmicos e mecânicos em estímulos elétricos, ocorre por meio de receptores ou canais iônicos específicos, como o receptor vaniloide tipo 1 (VR1), como o receptor vaniloide homólogo tipo 1 (VRL1) e receptores de potencial transitório (TRPs) (WOOLF 2007; MCCLESKEY 1999). A atividade elétrica gerada é propagada pelos axônios nos nervos periféricos para as raízes dorsais e depois para o corno dorsal da medula espinhal. Os axônios não mielinizados (C) ou finamente mielinizados (A δ), através dos nociceptores, transmitem os estímulos dolorosos. A informação é, em seguida, transmitida por neurônios da medula espinhal que projetam para o tálamo somatossensorial, medial e núcleos do tronco cerebral. A transmissão ocorre por meio de sinapses excitatórias mediadas pela ação de glutamato em receptores de N-metil D-aspartato (NMDA) e de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico (AMPA) e em canais iônicos kainato (LI *et al* 1999). A informação referente a intensidade, qualidade e localização da dor é transmitida do tálamo somatossensorial para o córtex sensitivo primário (figura 2D). O SNC utiliza vias descendentes inibitórias ou facilitatórias, pelo fascículo dorso lateral da medula espinhal e massa cinzenta periaqueductal com liberação de várias substâncias neuromoduladoras (NA - noradrenalina, 5-HT - serotonina, opióides, GABA) para modular a transmissão dos estímulos excitatórios nociceptivos e manter o impulso elétrico focalizado. (GALLUZZI, 2007)

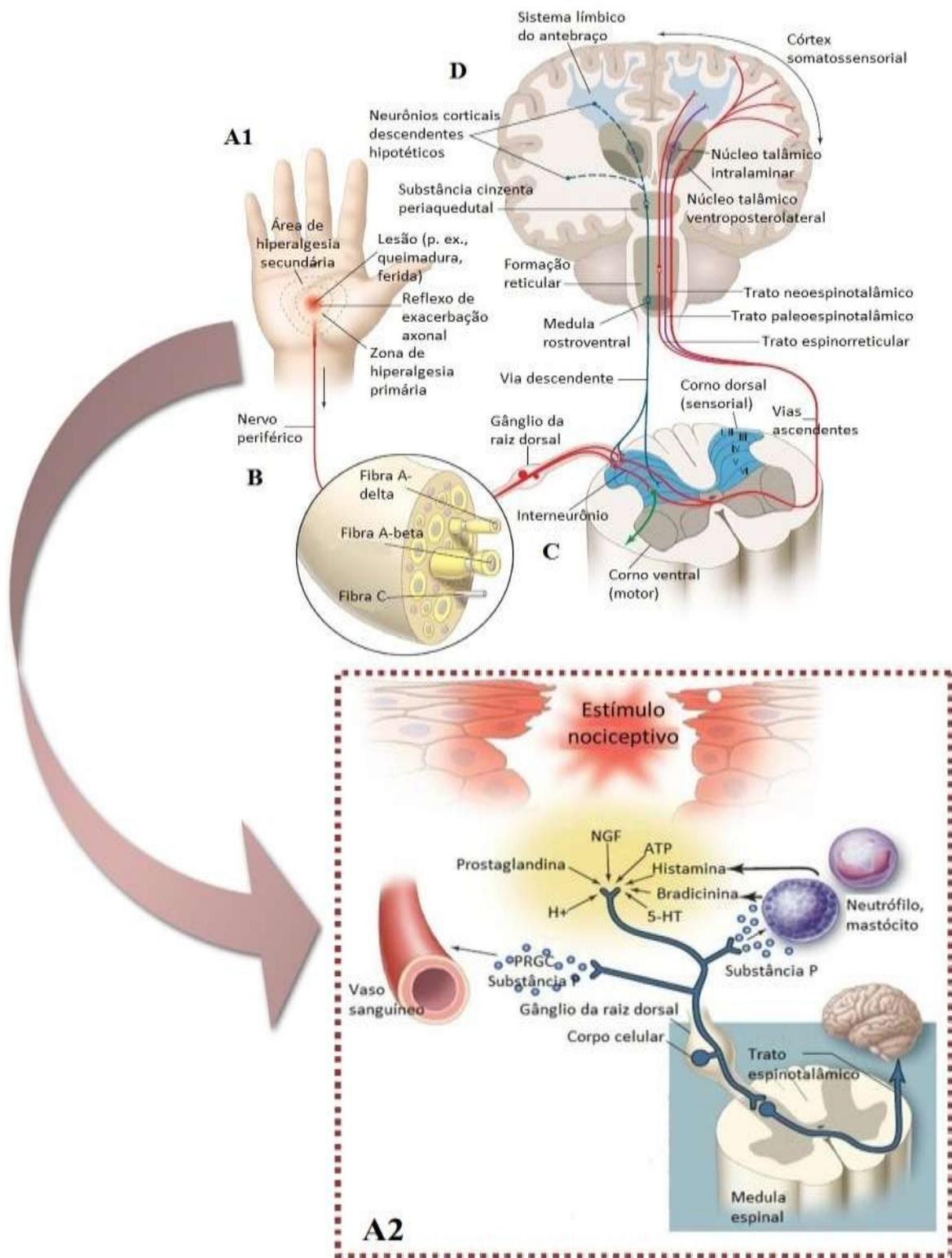
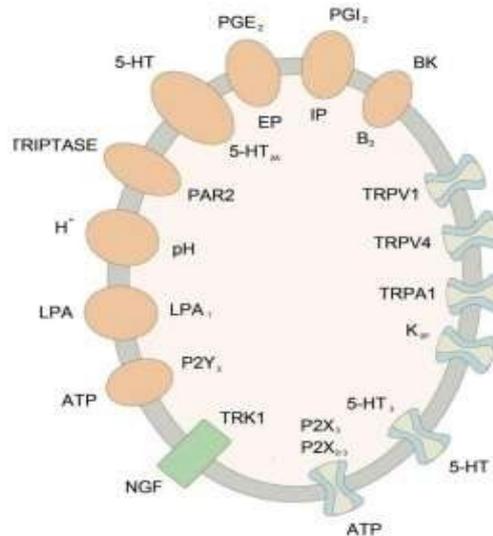


Figura 2 - Mecanismo nociceptivo da dor. A1 e A2) Estímulo nocivo ativa nociceptores no local (como por exemplo através da liberação de substâncias da inflamação como prostaglandinas, histamina, substância P e serotonina,) que geram um potencial de ação (transdução), o qual é B) conduzido pelas fibras aferentes para a C) raiz dorsal da medula espinal onde fazem sinapse com o neurônio de segunda ordem que transmitem o estímulo (transmissão) para áreas mais superiores do D) sistema nervoso central (trato

espinotalâmico, hipotálamo, tálamo e córtex cerebral), onde os estímulos são interpretados e as reações/sensações ocorrem. (fonte: adaptado de TOLEDO 2014)

Diversos mediadores químicos desempenham um papel importante no nociceptor. Na figura 3 podemos ver a diversidade de canais e receptores que estão envolvidos na execução de ações dos mediadores químicos.



LGICs	Canais de Íons Controlados por Ligantes		Mediadores Químicos
	5-HT ₃	receptor da serotonina do tipo três	5-HT serotonina
	P2X ₃	purinoceptore de íons controlado por ligante três.	ATP trifosfato de adenosina
	P2X _{2/3}	purinoceptores heteroméricos	ATP trifosfato de adenosina
RTK	Receptor da Tirosina Quinase		Mediador Químico
	TRK1	receptor da tirosina quinase neurotrófica tipo um	NGF fator de crescimento neural
GPCRs	Receptores Acoplados à Proteína G		Mediadores Químicos
	5-HT _{2A}	receptor da serotonina do tipo dois subtipo A	5-HT serotonina
	B ₂	receptor dois de bradicinina	BK bradicinina
	EP	receptor de prostanoide E	PGE ₂ prostaglandina E ₂
	IP	receptor de prostaciclina	PGI ₂ prostaciclina
	P2Y ₂	purinoceptor acoplado à proteína G dois	ATP trifosfato de adenosina
	PAR2	receptor ativado por proteases dois	triptase
	pH	potencial hidrogeniônico	H ⁺ próton
	LPA ₁	receptor do ácido lisofosfatídico um	LPA ácido lisofosfatídico
	TRPV1	receptor de potencial transitório vaniloide membro um	
	TRPV4	receptor de potencial transitório vaniloide membro quatro	
	TRPA1	receptor de potencial transitório anquirina membro um	
VGICs	Canais de Íons Controlados por Voltagem		
	K _{2P}	canais de potássio de dois poros	

Figura 3 – Os canais e receptores envolvidos na transdução de sinal do nociceptor. (FEIN 2011)

2.4 Inflamação

A inflamação consiste em um complexo processo, na maioria das vezes associado a dor, como vimos anteriormente. É uma resposta natural do organismo contra infecções ou agentes agressores. Envolve alterações vasculares, células responsáveis pelo combate ao agente agressor e eliminação de componentes teciduais alterados (MALEKI *et al*, 2001). O processo inflamatório é caracterizado por sinais cardinais descritos por Celsus (25 a.C. - 50 d.C.): rubor e tumor com calor e dor, podendo ainda apresentar um quinto sinal, a perda de função, acrescentado por Virchow (ROCHA E SILVA, 1978). A inflamação consiste em basicamente 5 etapas: (1) reconhecimento do agente nocivo, (2) recrutamento dos leucócitos, (3) remoção do agente, (4) controle da resposta e (5) Reparo tecidual

Em relação a duração do processo inflamatório, a inflamação pode ser classificada como aguda e crônica. Na inflamação aguda após a injúria tecidual ocorre vasodilatação por mediadores químicos como a serotonina e histamina, que são aminas vasoativas liberadas por mastócitos, monócitos e plaquetas (no caso da serotonina), e essa vasodilatação é a causa de eritema e estase do fluxo sanguíneo. O aumento da permeabilidade vascular também é induzido pela histamina, além de cininas e outros mediadores, mas pode também ocorrer por lesão endotelial direta ou induzida por leucócitos e pelo aumento da passagem de líquidos através do endotélio. Esse aumento de permeabilidade irá permitir a entrada de leucócitos (inicialmente neutrófilos), e também proteínas plasmáticas para o local da injúria tecidual. O extravasamento de líquido dos vasos sanguíneos leva ao quadro de edema. Várias etapas estão envolvidas no recrutamento dos leucócitos: aderência transitória e rolagem no endotélio (mediadas por selectinas, que são glicoproteínas pertencentes a uma família de moléculas de adesão celular); aderência firme ao endotélio (mediada por integrinas, que são proteínas de adesão presentes na membrana celular) e migração pelos espaços interendoteliais. Deixando então a microcirculação e migrando para o local da lesão sob influência de agentes quimiotáticos. (KUMAR, 2013)

Após a predominância de neutrófilos no infiltrado inflamatório são substituídos por macrófagos que liberam citocinas inflamatórias como IL-1 e TNF- α , e também quimiocinas. No local da lesão os patógenos e/ou as células mortas são fagocitados e em seguida ocorre a destruição nos fagolisossomos, permitindo o reparo da lesão (ROBBINS e COTRAN, 2010). Essa destruição é causada por radicais livres, como espécies reativas de oxigênio e NO (óxido nítrico) por exemplo, que são gerados nos leucócitos e enzimas lisossômicas. A lesão persistente irá levar a cronificação da inflamação. A resolução da inflamação aguda pode ser a remoção do exsudato, com reparação tecidual, transição para inflamação crônica ou extensa destruição do tecido, resultando em cicatrização. Na resposta crônica, o tecido apresenta um infiltrado constituído por células mononucleares (monócitos, macrófagos e linfócitos), sinais de angiogênese e fibrose (CRUVINEL, 2010).

Os mediadores inflamatórios podem ser divididos em duas classes, os gerados a partir de células ou derivados do plasma. Os mediadores derivados de células são normalmente sequestrados em grânulos intracelulares e podem ser rapidamente secretados por exocitose do grânulo (p. ex., histamina nos grânulos dos mastócitos) ou são sintetizados de novo (como as prostaglandinas, citocinas) em resposta a estímulos. Os mediadores derivados do plasma (como as proteínas do complemento, cininas) são produzidos principalmente no fígado e estão presentes na circulação como precursores inativos que precisam ser ativados, usualmente por uma série de clivagens proteolíticas, para exercer suas ações. (KUMAR, 2013)

Do ponto de vista bioquímico, os mediadores inflamatórios podem ser divididos em: aminas vasoativas (histamina e serotonina); peptídeos vasoativos (substância P, trombina, bradicinina); fragmentos do sistema complemento (C3a, C4a e C5a, também conhecido como anafilatoxina); mediadores lipídicos (eicosanóides, PAF), citocinas (TNF- α , IL-1, IL-6 e várias outras); quimiocinas (p. ex. IL-8) e as enzimas proteolíticas como a elastina, catepsina e metaloproteinases. A fonte de cada um deles e suas principais ações estão resumidas na tabela 1, e algumas delas são exploradas a seguir.

As aminas vasoativas, histamina e a Serotonina são os mediadores inflamatórios armazenados em grânulos citoplasmáticos. Como demonstrado na tabela 1 a Histamina está presente principalmente em mastócitos e a serotonina em plaquetas. A liberação desses mediadores pode ser induzida por diversos fatores, incluindo trauma, frio, reações imunes, anafilatoxinas, substância P, citocinas (promovem liberação de histamina) e agregação plaquetária após contato com colágeno, trombina, adenosina difosfato, complexos imunes, PAF (promovem liberação de serotonina das plaquetas). A histamina atua nos receptores H₁ promovendo vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, além de promover a síntese de prostaciclina e induzir a liberação de NO pelo endotélio. A serotonina promove vasodilatação dependente de NO e aumento da permeabilidade vascular. (KUMAR, 2013; JUTEL *et al.*, 2009).

Tabela 1 – Principais mediadores inflamatórios, suas fontes e ações. (adaptado de KUMAR, 2013)

Mediador	Fonte(s)	Principais Ações
Derivados de células		
Histamina	Mastócitos, basófilos, plaquetas	Vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, ativação endotelial
Serotonina	Plaquetas	Vasoconstrição
Prostaglandinas	Mastócitos, leucócitos	Vasodilatação, dor, febre
Leucotrienos	Mastócitos, leucócitos	Aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia, adesão e ativação de leucócitos
Fator ativador plaquetário	Leucócitos, mastócitos	Vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, aderência de leucócitos, quimiotaxia, desgranulação, explosão oxidativa
Espécies reativas do oxigênio	Leucócitos	Destruição de micróbios, lesão tecidual
Óxido nítrico	Endotélio, macrófagos	Relaxamento do músculo liso vascular, morte de micróbios
Citocinas (TNF, IL-1, IL-6)	Macrófagos, mastócitos, células endoteliais,	<i>Local:</i> Ativação endotelial (expressão de moléculas de adesão) <i>Sistêmica:</i> febre, anormalidades metabólicas, hipotensão (choque)
Quimiocinas	Leucócitos, macrófagos ativados	Quimiotaxia, ativação de leucócitos
Derivados de proteínas plasmáticas		
Complemento	Plasma (produzido no fígado)	Ativação e quimiotaxia de leucócito, opsonização (MAC), vasodilatação (estimulação de mastócito)
Cininas	Plasma (produzido no fígado)	Aumento da permeabilidade vascular, contração do músculo liso, vasodilatação, dor
Proteases ativadas durante a coagulação	Plasma (produzido no fígado)	Ativação endotelial, recrutamento de leucócitos

IL-1, IL-6, interleucinas 1 e 6; MAC, complexo de ataque à membrana; TNF, fator de necrose tumoral.

A histamina também pode ser liberada através da estimulação da substância P, que é um peptídeo vasoativo liberado por neurônios sensoriais, que podem levar a degranulação de mastócitos, e pode também levar ao aumento da permeabilidade diretamente. Os peptídeos vasoativos podem estar armazenados em vesículas secretórias ou podem ser gerados a partir de precursores inativos presentes no plasma por processos proteolíticos como a bradicinina. A bradicinina afeta a vasculatura promovendo dilatação de vasos sanguíneos e

aumento da permeabilidade vascular, e é um protagonista importante na dor, que é um dos sinais cardinais da inflamação. (KUMAR, 2013; KUHR *et al.*, 2010). O sistema complemento consiste em mais de 20 proteínas, algumas das quais são numeradas de C1 até C9. Os fragmentos C3a, C4a e principalmente o fragmento C5a (que são as chamadas anafilatoxinas porque suas ações mimetizam as dos mastócitos) gerados pela ativação do sistema complemento, promovem degranulação dos mastócitos atuando de forma similar a histamina e também são quimiotáticos, participando na migração dos granulócitos (neutrófilos, eosinófilos) e monócitos durante a inflamação, além de atuar na via da lipoxigenase e AA (ácido araquidônico) estimulando assim a liberação de mais mediadores inflamatórios. (KUMAR, 2013; HAAS E VAN STRIJP, 2007; KUHR *et al.*, 2010).

Os eicosanóides são mediadores lipídicos derivados do metabolismo do ácido araquidônico (AA). A cascata do AA, que é um ácido graxo esterificado nos fosfolípidos de membrana, é liberado através, principalmente, da ação da enzima fosfolipase A2 (PLA2), que pode ser ativada por exemplo por C5a (que faz parte do sistema complemento. Após a liberação o AA é metabolizado em duas vias enzimáticas denominadas cicloxigenases, que estimula a síntese dos prostanóides (PGE₂, PGD₂, PGF₂ α , PGI₂ e TXA₄) e lipoxigenase, responsável pela produção de leucotrienos (LTA₄, LTB₄, LTC₄, LTD₄) e lipoxinas (THEOHARIDES, 2012). Os prostanóides podem ser gerados por duas isoformas enzimáticas a COX-1, expressa constitutivamente e COX-2, que tem sua expressão altamente induzida em resposta a estímulos pró-inflamatórios, apesar de ser expressa constitutivamente em algumas regiões cerebrais e também no aparato justa glomerular renal e endotélio vascular. Esses mediadores são de extrema importância no processo inflamatório e podem mediar cada etapa da inflamação, destacando as prostaglandinas, PGE₂, PGD₂, PGI₂ (prostaciclina) que causam vasodilatação. Além disso a PGE₂ está intimamente relacionada a dor, através de sua ação em neurônios sensoriais periféricos e em sítios centrais no interior da medula espinhal e do cérebro. TXA₂ (tromboxano), sintetizado ao nível das plaquetas, causa forte vasoconstrição e induz fortemente à agregação plaquetária, é também um forte quimiotático para os neutrófilos e promove a ativação e a adesão dos mesmos ao endotélio. O LTC₄ e seus metabólitos, LTD₄ e LTE₄, que são produzidos principalmente nos mastócitos, causam vasoconstrição, broncoespasmo e aumento da permeabilidade vascular. (ROBBINS, 2013; FITZGERALD e RICCIOTTI, 2011; FRANCISCHETTI, 2010; HARIZI *et al.*, 2008).

As citocinas e as quimiocinas (ditas citocinas especializadas) possuem um papel importante na inflamação. A quimiocina é a chamada citocina quimiotática, pois diferente das outras citocinas ela é capaz de estimular o movimento dos leucócitos e regular a migração destes do sangue para os tecidos. Produzidos principalmente por macrófagos e linfócitos ativados, as citocinas são capazes de modular a infiltração de várias células. Dentre as principais citocinas estão o TNF α , IL-1 β e IL-6. Suas principais ações são ativação das células endoteliais, dos leucócitos e indução de reações sistêmicas de fase aguda. No endotélio vascular, ocorre um aumento na expressão e síntese de selectinas e integrinas, aumentando a aderência dos leucócitos circulantes às células endoteliais, e também a síntese e liberação de outras citocinas, fatores de crescimento, eicosanóides e óxido nítrico. Essas citocinas também estão relacionadas as respostas de fase aguda como febre e perda do apetite. As quimiocinas constituem uma família de proteínas que atuam como quimioatraente para diferentes tipos de linfócitos. São classificadas em 4 grupos, denominados de acordo com o arranjo dos resíduos de cisteína (C, C-C, C-X-C e CX3C). Elas atuam através da ligação a receptores acoplados a proteína G. Uma das principais quimiocinas é a IL-8, sua ação causa ativação e quimiotaxia dos neutrófilos, porém é limitada a monócitos e eosinófilos. Seus

indutores mais importantes são os produtos microbianos e outras citocinas, principalmente a IL-1 e o TNF- α . As duas principais funções das quimiocinas são o recrutamento dos leucócitos na inflamação e na organização anatômica normal das células nos tecidos linfóides e outros tecidos. (ROBBINS e COTRAN, 2010).

2.5 Sistema colinérgico na dor e inflamação

A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor de sinapses no SNC, no SNP (Sistema Nervoso Periférico) e também na junção neuromuscular, e juntamente com seus receptores (muscarínicos e nicotínicos) e o aparato enzimático responsável por sua síntese e degradação, constituem o sistema de neurotransmissão colinérgica (BRUNEAU e AKAABOUNE, 2006).

Millan em 2002 revisou diversos estudos que indicavam um papel de inibição da nocicepção por parte do sistema colinérgico, de forma direta por vias descendentes inibitórias colinérgicas e a própria liberação de acetilcolina (ACh) a partir de interneurônios localizados no corno dorsal ou indiretamente através da ativação de outras vias descendentes inibitórias. A modulação da nocicepção a partir da ACh envolve um entendimento complexo de efeitos, mediando múltiplas classes de receptores, incluindo receptores muscarínicos e nicotínicos. Os receptores muscarínicos M_1 , M_3 e M_5 estão positivamente acoplados à proteína Gq/11, e sua ativação aumenta a atividade da fosfolipase C (PLC), enquanto que os receptores M_2 e M_4 são acoplados a proteína Gi/0, refletindo na supressão da atividade da enzima adenilato ciclase (AC) e das correntes de Ca^{2+} , e ainda, os receptores M_2 ativam os canais de K^+ (MILLAN, 2002). Em contrapartida, os receptores nicotínicos são canais ionotrópicos pentaméricos, permeáveis a cátions, que se dividem em 17 subtipos diferentes, mas parecem que não são os protagonistas da atividade inibitória do sistema colinérgico na dor. A atividade antinociceptiva da ACh no corno dorsal predominantemente envolve mecanismos muscarínicos. Tem sido descrito na literatura que os receptores M_2 e M_4 são os principais responsáveis por estes efeitos (WESS *et al.*, 2003).

2.6 Receptor de potencial transitório (TRP)

Os canais de cátions do receptor de potencial transitório (TRP) da família de canais iônicos incluem mais de 30 canais de cátions, a maioria dos quais são permeáveis para o Ca^{2+} , e alguns também para Mg^{2+} . Com base na homologia de sequências, a família TRP em mamíferos pode ser dividida em seis subfamílias principais (PEDERSEN 2005; FEIN 2011): TRPC canônico; TRPV vaniloide; TRPA anquirina; TRPM melastatina; TRPP policistina; TRPML mucolipina;

Os canais TRP são assim denominados, pois permitem influxo de cargas positivas para as células quando ativados, gerando despolarização. Essa despolarização no entanto é caracterizada por um receptor de potencial transitório que pode ou não gerar um potencial de ação. (CLAPHAM, 2003). Esses canais são capazes de detectar uma ampla gama de temperaturas. Muitos destes canais também são ativados por derivados de plantas, alguns dos quais fornecem sensações distintas de temperatura. Estudos *in vitro* conseguiram demonstrar quais as zonas térmicas que esses canais medeiam. Exemplos de alguns desses derivados e canais ativados podemos ver na figura 4. (STEPHEN, 2014)

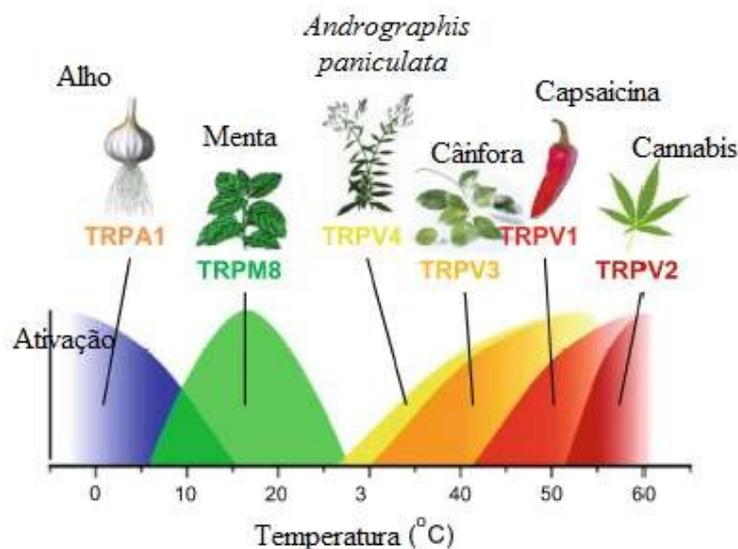


Figura 4– Canais TRP, termoreceptores e seus ativadores.

Entre esses canais, o TRPV1, é um canal de cátion ativado por calor que pode ser estimulado por fatores inflamatórios e leva a sintomas de dor. A identificação e a clonagem desse receptor foi realizada no final da década de 1990. TRPV1 é um canal catiônico não-seletivo, isto é, por ele passam diferentes íons, mas com uma certa seletividade pelo ^{+}Ca (SZALLASI *et al.*, 2007). É expresso exclusivamente em fibras nociceptivas, principalmente fibras não-mielinizadas, o que aumenta sua importância no que se refere à dor

O receptor TRPV1 é conhecido também como receptor da capsaicina. A capsaicina é um alcaloide derivado do *Capsicum* sp, conhecido no Brasil como pimenta malagueta. É o princípio ativo responsável pelo sabor pungente da pimenta, que confere a sensação de queimação. A capsaicina possui suas ações excitatórias e dessensibilizantes em nociceptores polimodais (que respondem a mais de um estímulo). As propriedades excitatórias e neurotóxicas da capsaicina foram utilizadas para definir e estudar neurónios nociceptivos. TRPV1 é o único membro da subfamília vaniloide que é ativado pela capsaicina. Estudos com animal knockout (animal modificado com gene específico desabilitado), para TRPV1, em humanos e camundongos, resultaram em insensibilidade à capsaicina. (CATERINA *et al*, 2000; PARK *et al*, 2007) A capsaicina estimula fibras aferentes do tipo C contendo canais TRPV1 e a sua ação leva a liberação de substância P e CGRP (Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina), como simplificado na figura 5. As exposições dos nociceptores, contendo canais de cátion do TRPV1, às altas doses de capsaicina estão associadas com a perda de capacidade da sua resposta, bem como a outros estímulos mecânicos nocivos, químicos ou térmicos.

A capsazepina é um antagonista TRPV1, e tem sido utilizado em modelos de dor crônica e inflamatória para reverter o aumento da resposta a estímulos dolorosos (hiperalgesia) (WALKER *et al*, 2003). A administração deste fármaco reduz a expressão de neuropeptídeos inflamatórios que são induzidos pela capsaicina (KWAK *et al* 1998). O uso clínico de antagonistas TRPV1 é baseado no conceito de que os agonistas endógenos que atuam sobre TRPV1 podem proporcionar uma contribuição importante para certas condições de dor. Mediante a este dado, um certo número de antagonistas de TRPV1 de pequenas moléculas já estão na Fase I / II de ensaios clínicos para os sinais de dor inflamatória crônica e enxaqueca. Além disso, os modelos animais sugerem um valor terapêutico para os

antagonistas do TRPV1 no tratamento de outros tipos de dor, incluindo a dor oncológica. Szallasi em uma revisão de 2007, argumenta que os antagonistas de TRPV1, isoladamente ou em conjunto com outros analgésicos podem melhorar a qualidade de vida das pessoas com enxaqueca, dor intratável crônica secundária ao câncer, Aids ou diabetes.

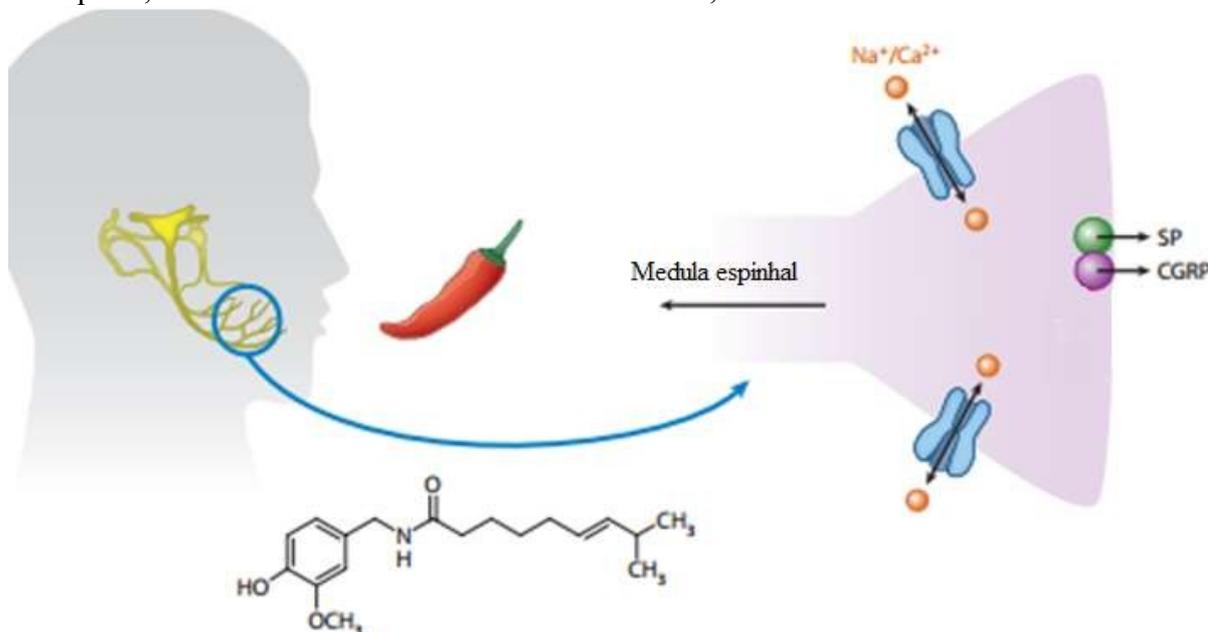


Figura 5 – Ação da capsaicina em TRPV1 - Capsaicina provoca dor aguda e inflamação neurogênica por ativar seletivamente TRPV1, promovendo a liberação de neurotransmissores e peptídeos (CGRP e SP) através da ativação de canais de íons e nociceptores. (JULIUS, 2013)

2.7 Ácido pipérico

2.7.1 *Piper nigrum* L.

Não é só a pimenta malagueta que possui metabólitos ativos que atuam na dor. Originária da Índia a pimenta do reino (*Piper nigrum* L.) ou também chamada pimenta preta, é uma das mais importantes especiarias comercializadas mundialmente. Trata-se de uma planta trepadeira pertencente à família Piperaceae que origina frutos do tipo baga com uma única semente (figura 6a). O Brasil é um dos maiores produtores de pimenta-do-reino, está entre a segunda e terceira posição no mercado mundial. (FERREIRA, 2006; FILGUEIRAS, *et al.*, 2001). É usada em larga escala como condimento, e também em indústrias de carnes e conservas. Além do seu uso como condimento, também é utilizada na medicina natural por conter propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e cicatrizantes no caso de úlceras. Atuando também na prevenção do câncer, combate a depressão, a obesidade, hipertensão, asma, bronquite, diarreia, insônia, gonorreia, cólica menstrual, tuberculose e artrite. (GERNOT KATZER, 2015; PIRES, 2004; RASTOGI & MEHROTRA, 1991; SINGH, 1992; KIRTEKAR & BASU, 1994).

Ao longo das duas últimas décadas, o fruto da pimenta preta tem sido objeto de estudo do ponto de vista fitoquímico e farmacológico. Esses estudos revelaram uma ampla variedade de metabólitos especiais presentes nesta espécie, dentre eles destacam-se: alcaloides/amidas, propenilfenóis, lignanas, neolignanas, terpenos, esteroides, cavapironas, piperolidas, chalconas, diidrochalconas, flavonas, flavononas e outros compostos, os quais são encontrados somente nesta espécie (PARMAR *et al.*, 1997). Diversos fatores são

importantes para determinar a eficiência e a atividade destes metabólitos que vão desde sua estrutura e concentração, que são influenciadas por condições ambientais, variedade da planta, grau de maturação e fatores genéticos. O principal componente metabólico da pimenta do reino é a piperina, dito como alcaloide majoritário. Segundo Cardoso em 2005, a piperina promove ação no sistema imunológico, como antitumoral por exemplo, e é uma molécula de grande importância para o combate de doenças autoimunes.

2.7.2 Piperina

A piperina (piperidinil do ácido 5-(3,4-metilenodioxifenil)-2E-4E-pentadienóico) (figura 6b) é um alcaloide ativo, foi a primeira amida isolada do gênero Piper, sendo o principal metabólico secundário da pimenta do reino, encontrado principalmente em seus frutos, e responsável pelo sabor pungente e intenso aroma (SCHAAB, 2008). Como a piperina é a piperamida que ocorre em maior proporção na planta, esta se tornou o principal alvo de avaliações biológicas.

Um dos principais efeitos desse alcalóide é a de prolongar a ação de certos fármacos no organismo, por inibição do metabolismo das mesmas a nível hepático. A piperina atua inibindo diferentes isoformas do citocromo P-450 e outras enzimas envolvidas no metabolismo de xenobiótico, como UDP-glicorunil transferase e arilhidrocarbono hidroxilase hepática. Esse efeito faz com que o uso concomitante da piperina com outros fármacos, a fim de prolongar seus efeitos, seja de grande interesse (ATAL, *et al.*, 1985; BADMAEV *et al.*, 1999). ATAL e colaboradores sugerem ainda que a piperina prejudica a biotransformação de pró-carcinógenos e, portanto, a geração de seus intermediários reativos. Vários estudos já demonstraram outros e diversos efeitos da piperina. Alguns deles demonstraram *in vitro* e *in vivo*, o envolvimento funcional da piperina como antidepressivo, hepatoprotetor, antiparasitário anti-metastático, antitireoidiano, imunomodulador, e composto antitumoral (PAMAR 1997; SRINIVASAN, 2007; FERREIRA, 2012). Estudos ainda demonstram que a piperina inibe o óxido nítrico (NO), Fator de necrose tumoral - α (TNF- α), e a expressão de genes pró-inflamatórios *in vitro*, bem como *in vivo*, porém o mecanismo pelo qual esse alcaloide exerce seus efeitos não é muito bem compreendido. (KUTTAN e PRADEEP, 2003; KUMAR *et al.*, 2007; PRADEEP e KUTTAN, 2004).

Em 2007 uma publicação descreveu que de um total de 1184 novos fármacos introduzidos no mercado entre 1981 e 2006, 974 são de micromoléculas de origem natural, sintética ou semissintética. (NEWMAN e CRAGG, 2007). Temos vários exemplos de fármacos que determinaram grandes avanços para ciência, e em sua maioria de origem natural. Podemos citar o ácido acetil salicílico (AAS) como um desses. O AAS foi o primeiro fármaco da história a ser sintetizado em laboratório, com base na estrutura química de uma substância natural isolada do Salgueiro Branco (*Salix alba*). A proeza foi conquistada pelo químico alemão Felix Hoffmann em 1897 (MALLMANN, 2014).

Um composto promissor, geralmente sofre alterações em sua estrutura química a fim de aperfeiçoar a sua seletividade, potência e eficácia terapêutica. Esse conjunto de fatores pode resultar em um fármaco mais seguro. Sendo assim foram propostas alterações moleculares a piperina, a fim de demonstrar melhoria nesses efeitos, obtendo-se então o ácido pipérico. A piperina é formada por 3 subunidades (A, B e C) (figura 6b). O ácido pipérico é a parte acil da molécula da piperina (figura 6c), que compreende as subunidades A e B.

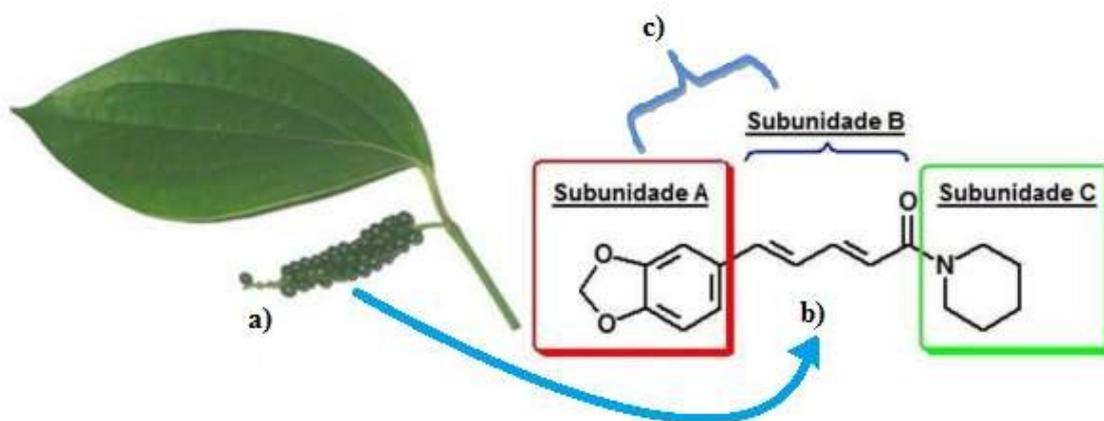


Figura 6 – *Piper nigrum* e seu principal alcalóide ativo, piperina – a) frutos da pimenta do reino em bagas; b) estrutura química da piperina, compreende as subunidades A, B e C; c) parte acil da molécula da piperina é denominada ácido pipérico e é composta pelas subunidades A e B. (Fonte: adaptado de FERREIRA, 2012)

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Avaliação Farmacológica do Potencial anti-inflamatório e antinociceptivo do ácido Pipérico

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade antinociceptiva do ácido pipérico sobre a dor aguda através dos modelos algésimétricos de formalina, contorções abdominais induzidas por ácido acético e de retirada da cauda;
- Avaliar a atividade antinociceptiva do ácido pipérico sobre a dor crônica induzida pelo modelo de constrição crônica do nervo ciático através do modelo de Von Frey;
- Avaliar a atividade do ácido pipérico sobre a performance motora, através do modelo de campo aberto;
- Avaliar a participação das vias opioide, colinérgica e nitrérgica, além dos canais de K^+ regulados por ATP, sobre o efeito antinociceptivo do ácido pipérico, no modelo de retirada da cauda;
- Avaliar a participação dos canais TRPV1 sobre a atividade antinociceptiva do ácido pipérico através do modelo da capsaicina;
- Avaliar a atividade antiedematogênica do ácido pipérico no modelo de edema de pata induzido por carragenina;
- Avaliar a migração de leucócitos e a quantificação de citocinas ($TNF\ \alpha$ e $IL-1\beta$) a partir do modelo de bolsa de ar subcutâneo (air pouch);
- Avaliar a ação do ácido pipérico sobre a atividade enzimática das enzimas cicloxigenases 1 e 2;
- Avaliar a toxicidade aguda e subcrônica do ácido pipérico.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos, com peso de 30-55g, oriundos do Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas. Os protocolos experimentais de utilização de animais de estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (CEUA/ICBS – UFRRJ) sob número 004/2015. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ \text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12h. Água e alimentação foram mantidas à disposição dos animais, sendo a ração retirada 8h antes da administração oral dos fármacos, a fim de evitar interferência.

4.2 Drogas e Reagentes

As seguintes drogas e reagentes foram utilizadas: ácido acético (Vetec), Formaldeído (Merck), Carragenina, Atropina (pureza > 99%), Ácido acetilsalicílico (pureza – 99%), L-NAME (pureza > 98%), Glibenclamida (pureza > 99%), Capsaicina (pureza > 97%), e Dimetilsulfóxido (DMSO - pureza > 99,5%) (Sigma-aldrich), Sulfato de Morfina (Dimorf[®], Cristália), Naloxona (pureza - 99%, Cristália), Dexametasona (Decadron[®], Aché Lab. Farm). O ácido pipérico (pureza 99%) foi sintetizado e fornecido pelo Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) sob a coordenação do Prof. Dr. Mário Luiz Araujo de Almeida Vasconcellos.

4.3 Tratamentos, administração e preparo das substâncias

- Controle: Grupo tratado com água destilada.
- Veículo: Água destilada com dimetilsulfóxido, na concentração de 5% (v/v), para a solubilização do composto. O veículo foi utilizado para avaliar se este não seria o responsável total ou parcial pela atividade antinociceptiva e/ou anti-inflamatória.
- Ácido acético: Foi preparado na concentração de 1,2% (v/v) em água destilada e injetado por via intraperitoneal (i.p.), 60 minutos após a administração oral do ácido pipérico, morfina e veículo no modelo de contorções abdominais.
- Formalina: Foi preparada na concentração de 2,5% (v/v) em água destilada e injetada 0,02mL na pata traseira direita do camundongo, 60 minutos após a administração oral de água destilada, ácido pipérico, morfina, ácido acetilsalicílico ou veículo no modelo de formalina.
- Carragenina: Agente flogístico responsável pela indução de processo inflamatório nos modelos de edema de pata e bolsa de ar subcutânea. A carragenina foi preparada a 1% (10 mg/mL). Administrada em volume de 0,1 ml na bolsa de ar subcutânea estéril e 0,02 mL por via intraplantar na pata traseira direita, no modelo de edema de pata. A carragenina foi administrada 60 minutos após a administração oral de água destilada, ácido pipérico ou veículo e administração subcutânea (s.c.) de dexametasona nos modelos da bolsa de ar subcutânea estéril e de edema de pata.

- Capsaicina: Agonista TRPV1. Administrado 0,02 mL de solução de capsaicina (1,6 µg/pata) na pata direita traseira do camundongo no modelo de nociceção induzida por capsaicina.
- Ácido Pipérico: Composto em estudo. O ácido pipérico (ACP) foi testado nas doses de 1, 5 e 10 mg/Kg (nos modelos algesimétricos e inflamatórios) e também na dose de 300 mg/Kg (para teste de toxicidade aguda única). A administração do ACP foi feita por via oral (v.o.) em todos os modelos.
- Sulfato de Morfina: Agonista não-seletivo de receptores opioides, com atividade antinociceptiva reconhecida, utilizado como controle positivo nos modelos algesimétricos. Administrado por v.o., na dose de 3 mg/kg nos modelos de dor aguda e i.p. na dose de 1 mg/kg no modelo de Von Frey.
- Ácido acetilsalicílico: Anti-inflamatório não-esteroidal (AINE) com atividade anti-inflamatória reconhecida. Utilizado como controle positivo no modelo da formalina. Administrado por v.o na dose de 100 mg/kg.
- Dexametasona: Anti-inflamatório esteroide com reconhecida atividade anti-inflamatória. Utilizado como controle positivo no modelo de edema de pata e bolsa de ar subcutânea. Administrado por via s.c. na dose de 2,25 mg/kg.
- Glibenclâmida: Bloqueador de canal de potássio sensível a ATP. Administrado 15 minutos antes do ácido pipérico por via intraperitoneal (i.p.) nas doses de 1, 3 e 5 mg/kg no modelo de retirada da cauda.
- Naloxona: Antagonista não-seletivo opioide. Administrado 15 minutos antes do ácido pipérico, por via intraperitoneal (i.p.) nas doses de 1, 3 e 5 mg/kg no modelo de retirada da cauda.
- Atropina: Antagonista não-seletivo de receptores muscarínicos. Administrado 15 minutos antes do ácido pipérico, por via intraperitoneal (i.p.) nas doses de 1, 3 e 5 mg/kg no modelo de retirada da cauda.
- N ω -nitro- L-arginina metil éster (L-NAME): Inibidor da óxido nítrico sintase, reduzindo assim a produção de óxido nítrico (NO). Administrado 15 minutos antes do ácido pipérico por via i.p. nas doses de 1, 3 e 5 mg/kg no modelo de retirada da cauda.

4.4 Modelos de avaliação da atividade antinociceptiva

4.4.1 Modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético

Modelo comumente utilizado como triagem da atividade antinociceptiva (KOSTER *et al*, 1959). Este modelo baseia-se na contagem das contrações da parede abdominal seguida de torção do tronco e extensão dos membros posteriores e contato do abdômen com o assoalho do recipiente em que o animal se encontra. Foi realizada a administração intraperitoneal de 0,01 mL/g de ácido acético (1,2%) 60 minutos após a administração de água destilada, veículo, morfina (3 mg/kg) e ácido pipérico (nas doses de 1, 5 e 10 mg/kg) v.o. A contagem do número de contorções foi iniciada imediatamente após a injeção e permanecendo por um período de 30 minutos. Na figura 7 podemos verificar o protocolo estabelecido para este modelo.

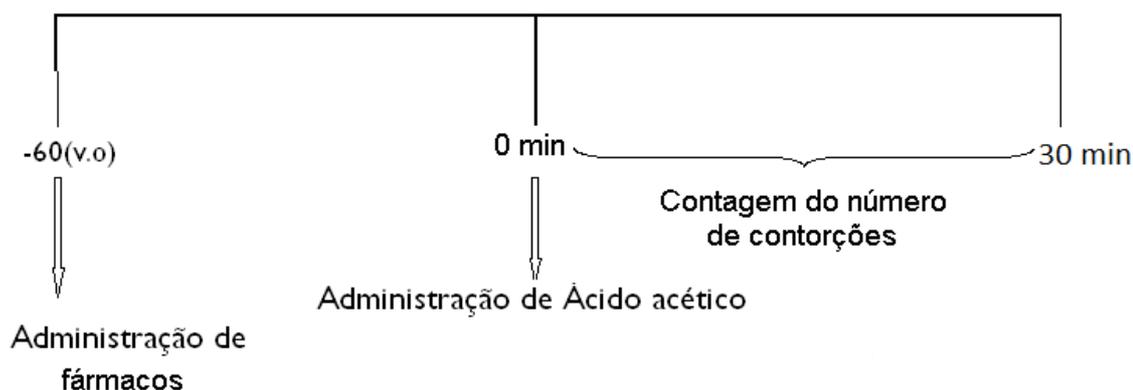


Figura 7 – Protocolo experimental do modelo de contorções induzidas por ácido acético.

4.4.2 Modelo da Formalina

Modelo utilizado para avaliação da dor inflamatória e não-inflamatória (HUNSKAAR e HOLE, 1987). Neste modelo, 60 min após a administração oral de água destilada, veículo, morfina (3 mg/kg), ácido acetilsalicílico (100 mg/kg) ou ácido pipérico (ACP) (1, 5 e 10 mg/kg) foi injetado 0,02 mL de uma solução de formalina à 2,5% na pata direita traseira. Posteriormente os animais foram colocados individualmente em caixas de vidro espelhadas para melhor visualização do animal. O tempo que o animal permaneceu lambendo a pata foi então medido (em segundos). A medida do tempo foi feita em duas fases: a primeira chamada neurogênica, entre 0 e 5 minutos após a injeção da formalina e a segunda fase chamada inflamatória, entre 15 e 30 minutos após a injeção, conforme protocolo experimental demonstrado na figura 8. A primeira fase ocorre devido ao efeito direto da formalina e de mediadores inflamatórios pré-formados sobre o nociceptor, já a segunda fase é decorrente da liberação de mediadores inflamatórios pós-formados, que irão atuar nas terminações nervosas livres.

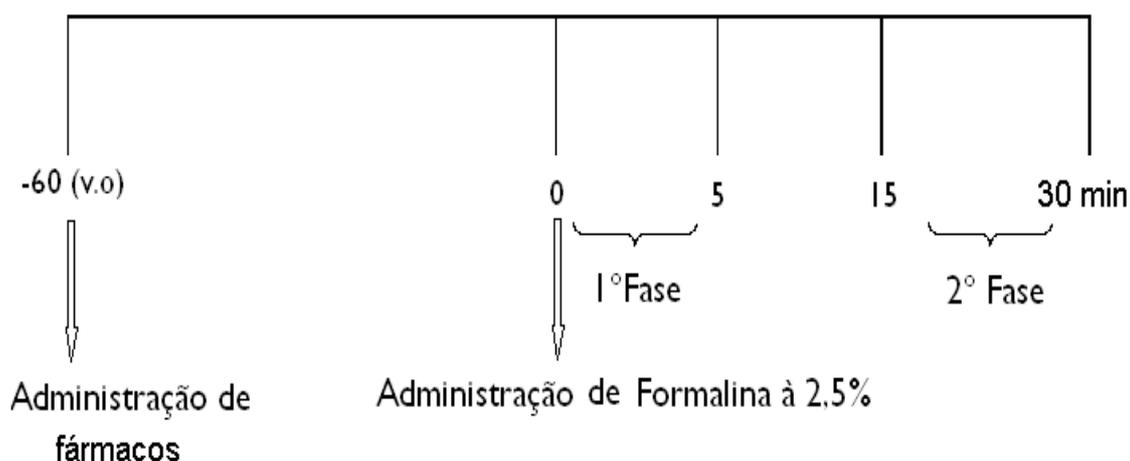


Figura 8 – Protocolo experimental do Modelo da Formalina.

4.4.3 Modelo de retirada da cauda

Este modelo é utilizado para avaliação da atividade antinociceptiva a nível espinhal (BEN-BASSAT *et al*, 1959). O modelo foi realizado como previamente descrito (MONCADA *et al*, 2003; ROBLES *et al*, 1996). Após 60 min da administração oral de água destilada, veículo, morfina (3 mg/kg), e ACP (1, 5 e 10 mg/kg). Os animais foram colocados em um tubo de acrílico, e posicionados no aparelho de retirada de cauda denominado “analgesímetro tail flick”. Neste aparelho um Feixe de luz nocivo foi focado a aproximadamente 2 cm da ponta da cauda, e a latência de retirada da cauda foi registrada automaticamente através do cronômetro eletrônico contido no equipamento. A intensidade da fonte de luz radiante foi ajustada para valores de linha de base entre 2 e 5 segundos; esta intensidade não foi alterada e os animais que apresentaram valores de linha de base fora destes limites foram excluídos do experimento. Foram feitas várias medidas dos tempos de latência com intervalos de 20 minutos entre cada uma delas, totalizando 8 medidas. As primeiras duas medidas foram realizadas antes da administração do composto (e são chamadas de medidas controle). A média das medidas controle é denominada “linha de base”. Para se evitar danos teciduais causados pela temperatura na cauda dos animais, calculamos um “cut-off” de 3 vezes o valor da linha de base. A antinociceção foi quantificada pelo cálculo do percentual de aumento em relação à linha de base, dado pela fórmula representada na figura 9b, a partir do protocolo experimental (figura 9a)

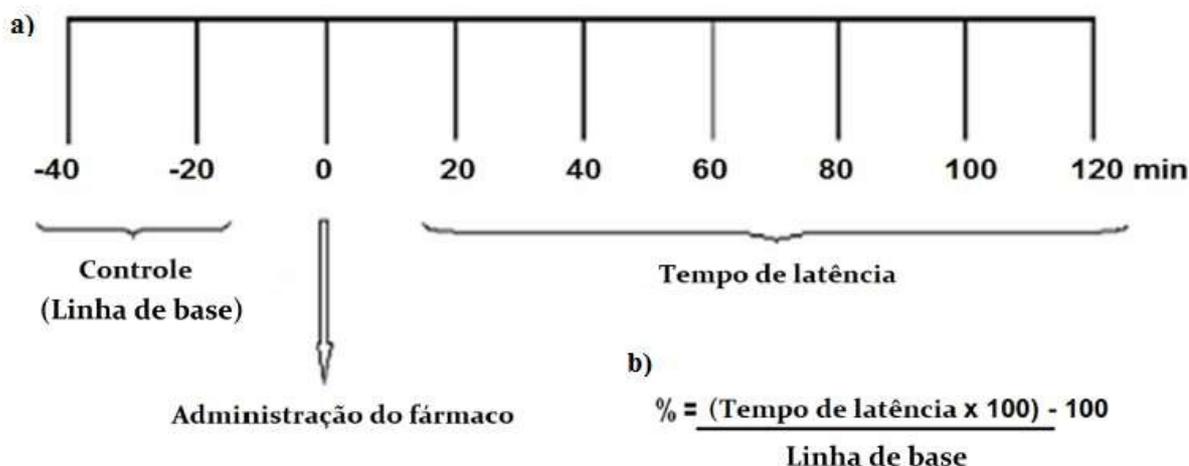


Figura 9 – Modelo de retirada da cauda. a) Protocolo experimental; b) Fórmula utilizada para quantificação da antinociceção.

Para investigação do mecanismo de ação do ACP na dose de 10mg/kg foram administrados antagonistas aos animais via i.p. 15 min antes da administração do ACP. Naloxona, atropina, L-NAME e Glibenclamida foram administrados nas doses de 1, 3 e 5 mg/kg com a finalidade de se observar a participação dos sistemas opioide, muscarínico, nitrérgico e a participação do canal de potássio sensível a ATP sobre a atividade antinociceptiva do ACP, respectivamente.

4.4.4 Modelo de nociceção induzida por capsaicina

Este modelo foi realizado como descrito por Sakurada *et al.* (1998). Um volume de 0,02 mL de solução de capsaicina (1,6 µg/ pata) foi administrada por via intraplantar, na pata traseira direita do animal. Imediatamente após a injeção de capsaicina, os animais foram colocados individualmente em uma caixa de vidro espelhada e o tempo de lambedura da pata injetada com capsaicina foi cronometrado e registrado (em segundos), durante um período de 5 min (figura 10). A ação de lambedura foi considerado como reação ao estímulo nocivo, devido a ação da capsaicina sobre os receptores TRPV1.

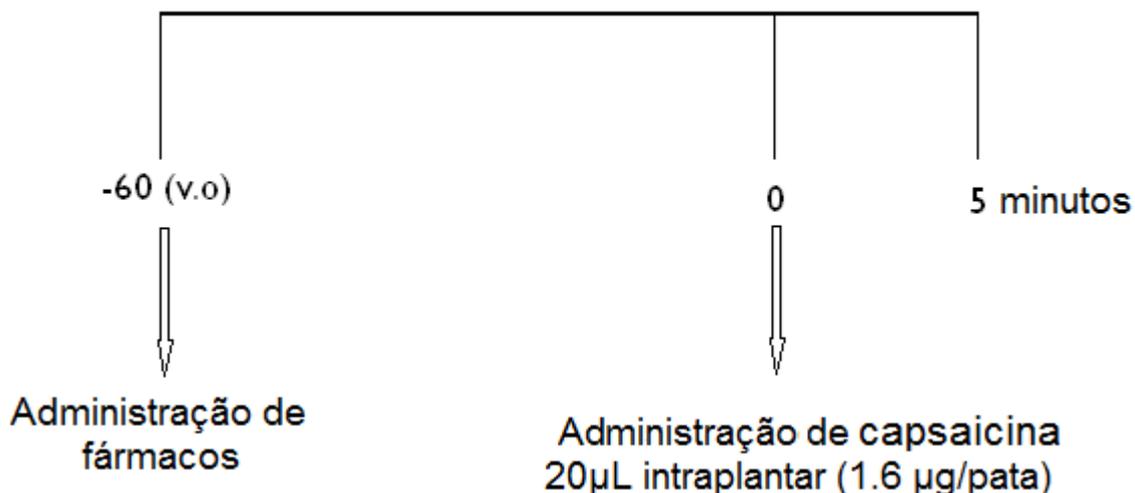


Figura 10 – Protocolo experimental do modelo de nociceção induzida por capsaicina

4.4.5 Modelo da Constrição Crônica do Nervo Ciático (CCC)

Este modelo é utilizado para indução de lesão em nervo periférico com consequente indução de dor neuropática (SEITZER *et al.*, 1990). Neste modelo, os camundongos foram anestesiados com quetamina (160 mg/kg; i.p.) e xilazina (32 mg/kg; i.p.), e submetidos à cirurgia, onde realizamos uma incisão na parte lateral da coxa direita e o nervo ciático foi exposto. Foram realizadas 4 ligaduras (com fio mononylon 6.0) ao longo do nervo e realizada sutura da ferida cirúrgica (figura 11). Uma resposta imune a sutura leva a inflamação do nervo. Uma falsa cirurgia (sham) foi realizada em um grupo de animais, onde o nervo foi exposto, mas não foi feita a ligadura. Três semanas após a cirurgia os animais desenvolvem alodinia. Na tabela 1 está representado os grupos experimentais e na figura 11 está representada o procedimento cirúrgico. Os animais foram tratados por 14 dias e submetidos ao modelo de Von Frey, conforme descrito na seção correspondente.

Tabela 2 - Grupos experimentais com seus respectivos tratamentos e procedimentos realizados.

GRUPOS n=6	Tratamento	Condições experimentais
Controle	Água destilada	Ligadura do NC e tratamento com Água destilada
SHAM	Água destilada	Sem ligadura no NC e tratamento com Água destilada
Morfina	Morfina 1mg/kg s.c.	Submetido a Constrição do NC e tratamento com Morfina
ACP	ACP 10mg/kg v.o	Submetido a Constrição do NC e tratamento com ACP

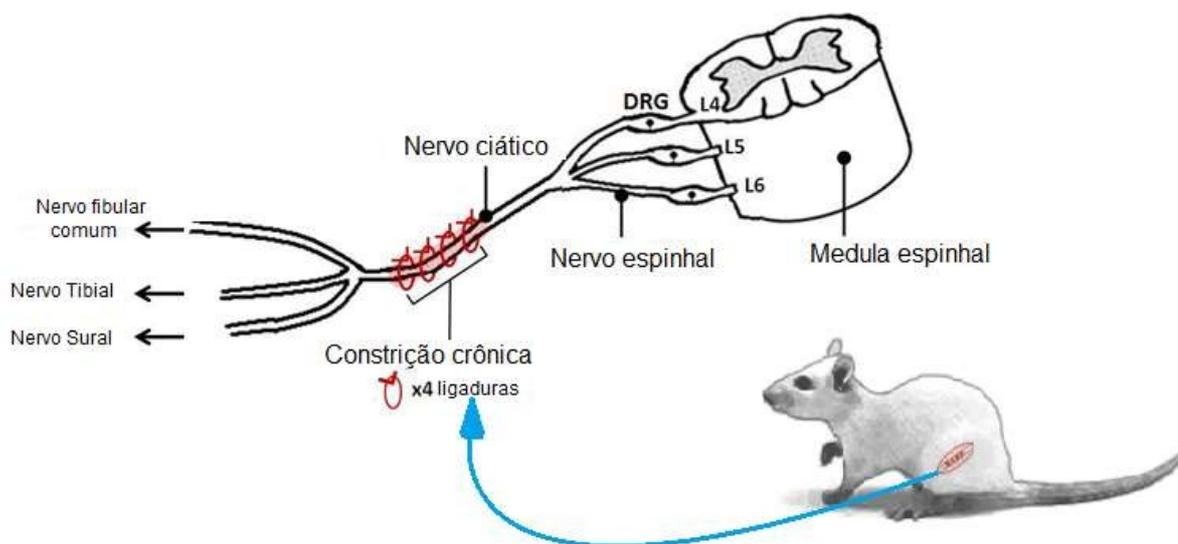


Figura 11 – Constrição crônica do nervo ciático. São realizadas 4 ligadura no nervo ciático do animal, induzindo dor neuropática. (fonte: adaptado de AUSTIN E MOALEM, 2012)

4.4.6 Modelo de Von Frey

A fim de avaliar a alodinia causada pela constrição crônica do nervo ciático utilizamos o modelo de Von Frey. Este método avalia a sensibilidade tecidual ao estímulo mecânico através de um estesiômetro eletrônico composto de um transdutor de pressão ligado por um cabo a um detector digital de força, a qual é expressa em gramas (CUNHA *et al.*, 2004; JENSEN *et al.*, 1986). Ao transdutor foi adaptada uma ponteira descartável de 0,5 mm² com ponta abaulada para estimular diretamente a pata do animal com um estímulo não nocivo. Os animais foram colocados em caixas de acrílico, cujo assoalho é uma rede de malha igual a 5 mm² constituída de arame de 1 mm de espessura, durante 15 minutos antes do experimento para adaptação ao ambiente. Espelhos foram posicionados 25 cm abaixo das caixas de experimentação para facilitar a visualização das plantas das patas dos animais. A pressão foi exercida no meio da área plantar posterior da pata traseira operada até que o animal realizasse o movimento de retirada da pata (AUSTIN E MOALEM, 2012). O estímulo foi então interrompido e a força exercida para promover a resposta característica, foi registrada pelo aparelho. A área de a região plantar estimulada foi desafiada 3 vezes consecutivas em intervalos de 5-10 segundos. Após 21 dias da cirurgia de CCC foram realizadas administrações diárias de ACP 10 mg/kg v.o., Morfina 1 mg/kg i.p. (ZULAZMI ,

2015) e água destilada durante 14 dias. No primeiro dia iniciamos a administração das substâncias e submetemos os animais ao modelo de Von Frey nos tempos de 1, 2, 3 e 4h após a administração das substâncias. Nos dias 3, 6, 9, 12 e 14 submetemos os animais ao modelo com a estimulação da pata antes da administração das substâncias, a fim de verificar a atividade antinociceptiva crônica. Na figura 12 está representado o protocolo experimental.

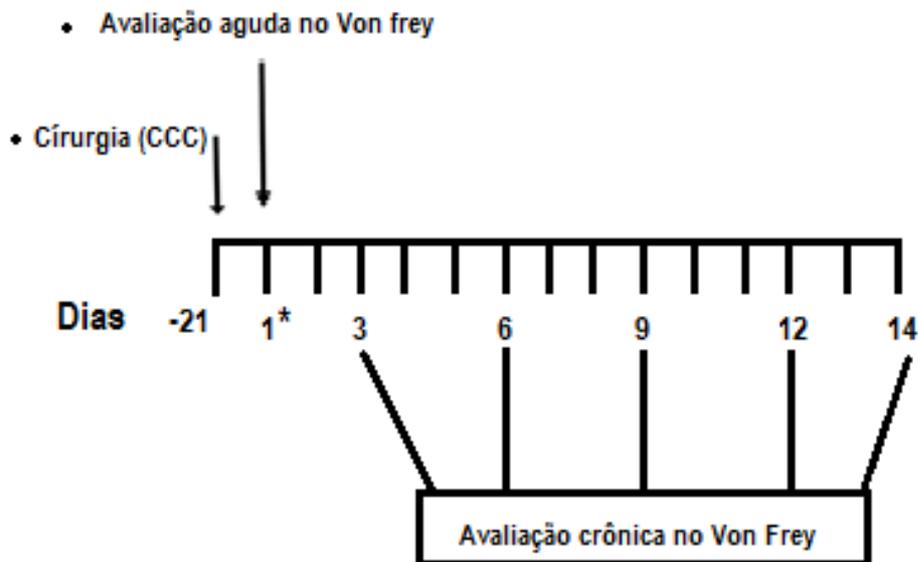


Figura 12: Protocolo experimental do modelo de Von Frey. CCC= constrição crônica do nervo ciático; 1*=início da administração das substâncias (ACP 10 mg/kg v.o., Morfina 1 mg/kg i.p. e água destilada) Tratamento realizado durante 14 dias.

4.4.7 Modelo de campo aberto

Para avaliar a interferência sobre a mobilidade dos animais após o tratamento com o composto, os animais foram submetidos ao modelo do campo aberto. Neste modelo, 5 dias antes do início do experimento os animais foram treinados na arena em que é realizada o experimento. O procedimento foi similar ao descrito por BARROS *et al*, 1991. Os camundongos receberam ACP nas doses de 1, 5 e 10mg/kg, morfina (3 mg/kg) e água destilada por via oral e foram colocados individualmente em uma câmara de observação (60 minutos após administração oral) cujo assoalho foi dividido em quadrados (5 x 5 cm). A atividade espontânea foi quantificada pelo número de quadrados percorridos durante o intervalo de 5 minutos (figura 13).

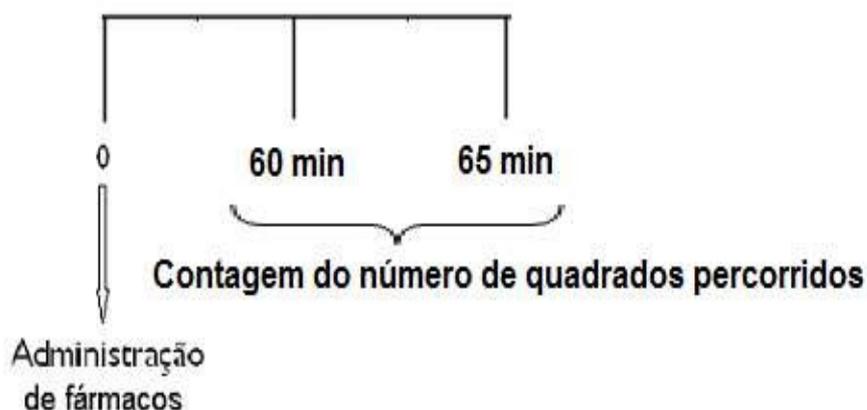


Figura 13 – Protocolo experimental do modelo de campo aberto.

4.5 Modelos de avaliação da atividade anti-inflamatória

4.5.1 Modelo de edema de pata

Este modelo de avaliação edematogênica utiliza a técnica de pletismografia (FERREIRA, 1979), que consiste na utilização do pletismômetro, um equipamento capaz de registrar pequenas variações no volume de líquido deslocado pela inserção da pata, até a articulação tíbio-társica. O edema foi induzido pela injeção intraplantar de 0,02 mL de carragenina (1%, p/v) na pata traseira esquerda do camundongo. Na pata direita foi injetado o mesmo volume de TFS (tampão fosfato salina – PBS, sigla em inglês). Uma hora antes da injeção intraplantar de carragenina, foram administrados os compostos ACP nas dose de 1, 5 e 10mg/kg v.o., Dexametasona 2,25mg/kg s.c., água destilada e veículo O edema foi avaliado nos tempos de 1, 2, 3 e 4 horas após a injeção da carragenina, conforme esquema na figura 14.

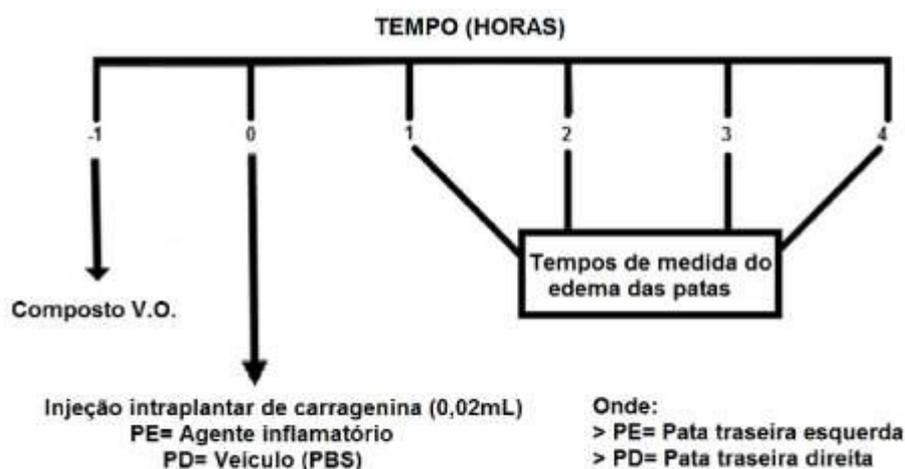


Figura 14 – Protocolo experimental do Modelo de edema de pata.

4.5.2 Modelo da bolsa de ar subcutâneo (air pouch)

com a utilização do kit, foi construído uma curva padrão através do percentual da razão entre a taxa de ligação de uma amostra e a taxa de ligação máxima (%B/B₀) e do log da concentração de prostaglandina em pg/mL. Este gráfico permitiu a obtenção de valores referentes à concentração de prostaglandina (pg/mL) obtida pela ação das enzimas COX-1 e COX-2 e também a porcentagem de inibição de ambas as enzimas frente à utilização de doses crescentes do ácido pipérico.

4.6 Avaliação toxicológica

4.6.1 Toxicidade Aguda e subcrônica

Foi realizado modelo de toxicidade aguda, ou chamado também de dose fixa de acordo com o modelo experimental descrito por Lorke (1983) a fim de determinar os valores de DL₅₀. Uma única dose oral de ácido pipérico (300 mg/kg) foi administrado a um grupo de 6 animais. Foi considerada a dose de acordo com os critérios de classificação da comunidade Europeia (OGA, 2003). Os animais foram colocados posteriormente em uma câmara de observação.

A avaliação da toxicidade subcrônica foi realizada através da exposição repetida ao ácido pipérico na dose de 10mg/kg por 14 dias v.o. (adaptado de OGA 2003) a fim de verificar se o tratamento subcrônico produziria algum efeito tóxico não observado no modelo agudo. Um grupo controle foi administrado com água destilada e foi exposto ao mesmo protocolo.

Parâmetros comportamentais foram avaliados por um período de 14 dias e incluíram a observação de convulsão, hiperatividade, perda do reflexo, alteração da frequência respiratória e sedação. O peso dos animais e o consumo de ração foram avaliados. No 15º dia, todos os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e os órgãos: pulmões, baço, fígado e coração, foram avaliados macroscopicamente, retirados e pesados. O peso relativo dos órgãos foi calculado dividindo-se o peso do órgão pelo peso do animal e multiplicando-se por 100.

4.7 Análise Estatística

A significância estatística entre os grupos foi realizada pela aplicação de análise de variância (One-Way ANOVA) acompanhada pelo teste de Bonferroni para os modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético, formalina, capsaicina, campo aberto, atividade de COX e quantificação de leucócitos e citocinas. E foi realizada pela aplicação de análise de variância (Two-Way ANOVA) acompanhada pelo teste de Bonferroni para os modelos de retirada da cauda, Von Frey e edema de pata. Os valores de *p* menor que 0,05; 0,01 e 0,001 foram usados como nível de significância.

5 RESULTADOS

5.1 Modelos de avaliação da atividade antinociceptiva

5.1.1 Modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético

A administração intraperitoneal (i.p.) de ácido acético (1,2%) produziu em um intervalo de 30 minutos $54,2 \pm 6,1$ contorções (no grupo controle). A administração oral do ACP nas doses de 1, 5 e 10 mg/kg e morfina (3 mg/kg) foi capaz de inibir o número de contorções abdominais em relação ao grupo experimental controle, indicando atividade antinociceptiva deste composto, como pode ser observado na figura 16. Os percentuais de inibição do número de contorções abdominais obtidos foram: 54,4%, 51,7% e 77,9%, respectivamente para as doses de 1, 5 e 10mg/kg. A administração oral de morfina inibiu o número de contorções abdominais em aproximadamente 50% quando comparada ao grupo controle.

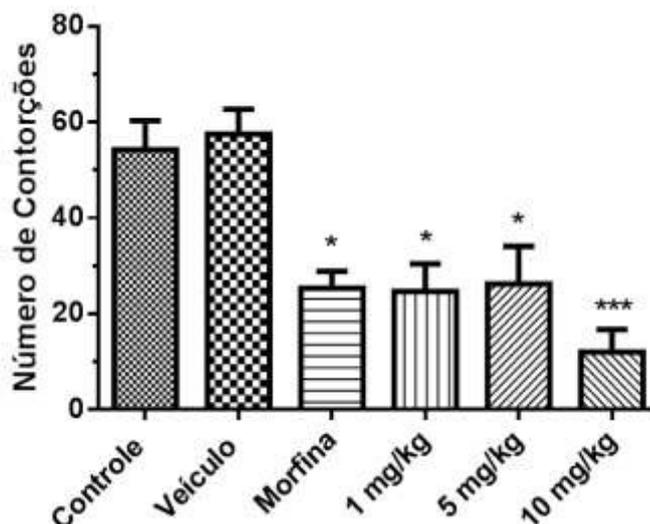


Figura 16 – Efeito antinociceptivo do ACP (1, 5 e 10mg/kg), veículo, controle (água destilada) e morfina (3 mg/kg) no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Os tratamentos foram realizados por via oral. Os resultados são expressos como média + E.P.M. (n = 6) do número de contorções. A significância estatística (* p < 0,05 e ***p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, morfina e doses crescentes do composto, por One-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.

Tratamentos	Número de contorções	Percentual de inibição
Controle	54,2 + 6,1	---
Veículo	57,5 + 5,2	---
Morfina	25,4 + 3,5*	53,1%
ACP 1 mg/kg	24,7 + 5,7*	54,4%
ACP 5 mg/kg	26,2 + 7,9*	51,7%
ACP 10 mg/kg	12,0 + 4,8***	77,9%

* $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, morfina e doses crescentes do composto, por One-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.

5.1.2 Modelo da formalina

Os animais foram tratados com ACP nas dose 1, 5 e 10 mg/kg. Como controle positivo foi utilizado a morfina (3 mg/kg) e AAS (100 mg/kg). O grupo controle apresentou na 1° fase o tempo de lambedura de 53,2 + 6,3 segundos e na 2° fase foi de 173,9 + 7,8 segundos. A morfina apresentou percentual de inibição de 37% em relação ao tempo de lambedura na 1° fase e de 51,2% na 2° fase. Já o AAS apresentou uma inibição de 54,6%, somente na segunda fase. O tratamento com ACP reduziu significativamente o tempo que os animais permaneceram lambendo as patas após a injeção de formalina nas duas fases. Na 1ª fase, o efeito inibitório somente foi observado com a dose de 10mg/kg (30,3%). Na 2° fase todas as doses testadas inibiram significativamente o tempo de lambedura. Os percentuais foram de aproximadamente 40,5% na dose de 1mg/kg, 62,9% na dose de 5mg/kg e 67,8% na dose de 10 mg/kg. Os resultados estão apresentados nas figuras 17a e 17b e na tabela 4.

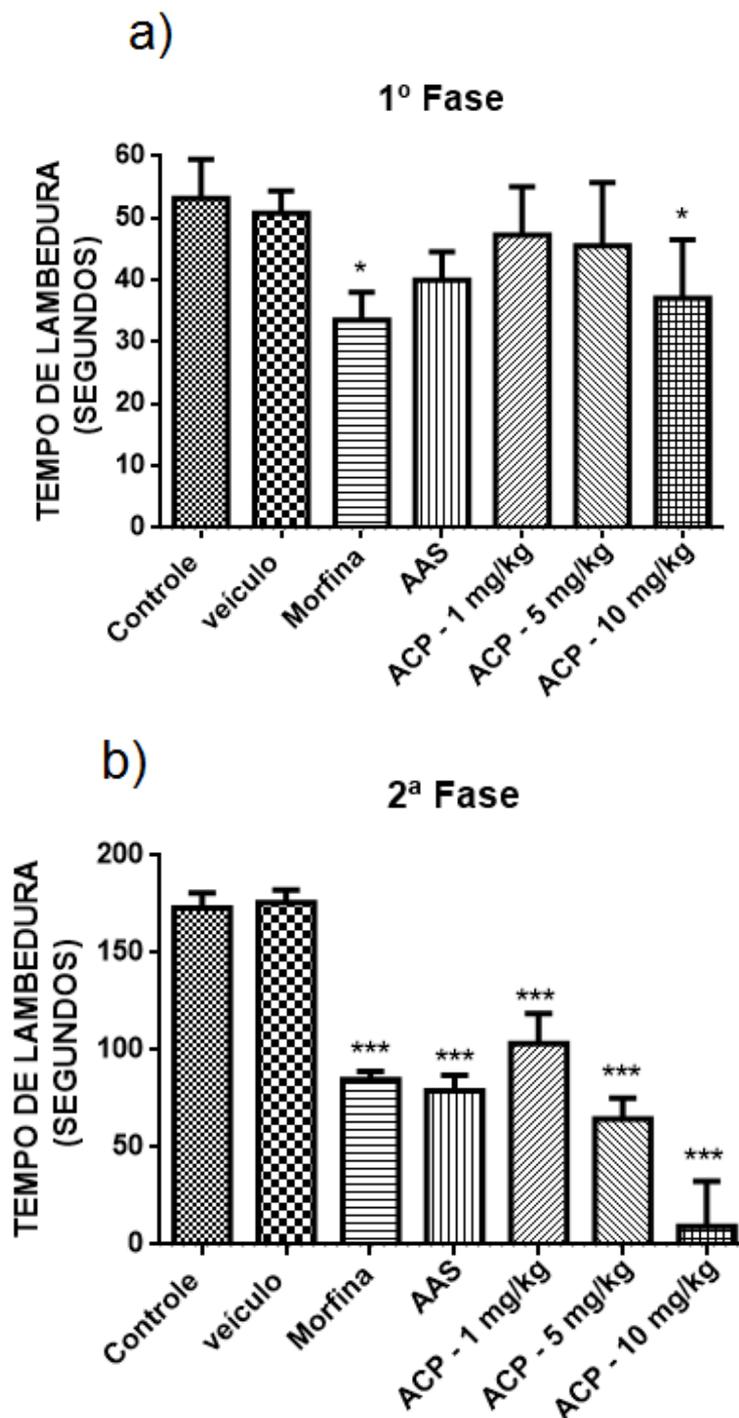


Figura 17 – Efeito antinociceptivo do ACP (1, 5 e 10mg/kg), veículo, controle (água destilada), AAS e morfina (3 mg/kg) no modelo de formalina. a) 1ª fase e b) 2ª fase. Os tratamentos foram realizados por via oral. Os resultados são expressos como média + E.P.M. (n = 6) do tempo de lambedura. A significância estatística (* p < 0,05 e ***p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, morfina, AAS e doses crescentes do composto, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

Tabela 4 – Tempos de lambedura, em segundos, no modelo de formalina

Tratamentos	Tempo de lambedura (segundos)	
	1ª Fase	2ª Fase
Controle	53,2 + 6,3	173,9 + 7,8
Veículo	50,8 + 3,6	175,8 + 6,6
Morfina	33,5 + 4,6*	84,8 + 4,2***
AAS	40,0 + 4,6	79,0 + 8,0***
ACP 1 mg/kg	47,3 + 7,8	103,4 + 15,5***
ACP 5 mg/kg	45,6 + 10,2	64,5 + 10,9***
ACP 10 mg/kg	37,1 + 9,4*	9,4+ 23,2***

* $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, morfina, AAS e doses crescentes do composto, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

5.1.3 Modelo de retirada da cauda

A fim de confirmar o efeito antinociceptivo central demonstrado através do resultado no modelo de formalina, executamos este modelo. Neste modelo, os animais foram tratados com ACP nas doses 1, 5 e 10 mg/kg v.o. Como controle positivo foi utilizado a morfina (3 mg/kg). As doses de 1, 5 e 10 mg/kg do ACP apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle, como observado na figura 18, confirmando assim o seu efeito antinociceptivo central e dose-dependente.

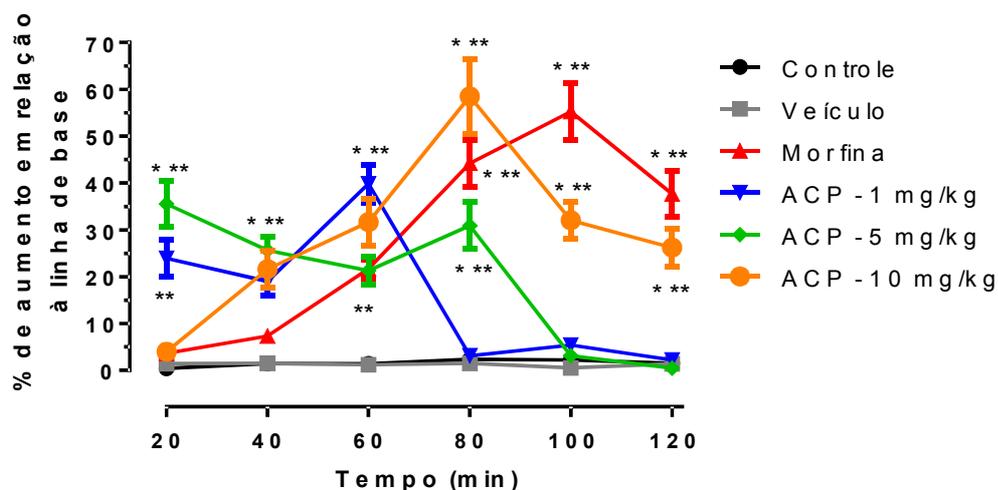


Figura 18 – Efeito antinociceptivo do ACP (1, 5, 10mg/kg), veículo, controle (água destilada) e morfina (3 mg/kg) no modelo de retirada da cauda. Os resultados são expressos como média + E.P.M. do % de aumento em relação à linha de base (n = 6). A significância estatística (* p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, morfina e doses crescentes do composto, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

Tabela 5 – Tempos de latência, em segundos, no modelo de retirada de cauda.

Tratamentos	Tempo de Latência (segundos)						
	Linha de Base	20 min	40 min	60 min	80 min	100 min	120 min
Controle	3,48 + 0,6	2,94 + 0,9	3,25 + 0,9	3,24 + 0,6	2,95 + 0,8	3,22 + 0,6	3,44 + 0,3
Veículo	2,95 + 0,6	3,04 + 1,1	3,05 + 0,4	3,04 + 0,7	3,05 + 0,6	3,02 + 0,9	3,04 + 0,5
Morfina	2,89 + 0,4	3,11 + 0,6	3,52 + 0,8	5,05 + 0,7**	5,33 + 0,8***	4,96 + 0,2***	5,13 + 0,8***
ACP 1 mg/kg	4,42 + 0,6	5,48 + 0,8**	5,26 + 0,6***	6,18 + 0,9***	4,56 + 0,3	4,66 + 0,6	4,52 + 0,5
ACP 5 mg/kg	5,04 + 0,6	6,83 + 1,2***	6,33 + 0,6***	6,12 + 0,8**	6,60 + 0,9***	5,20 + 0,5	5,07 + 0,4
ACP 10 mg/kg	3,98 + 0,5	4,13 + 0,2	4,83 + 0,7***	5,23 + 0,5***	6,30 + 0,6***	5,25 + 0,8***	5,02 + 1,0***

p < 0,01 e *p < 0,001 foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, morfina e doses crescentes do composto, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

O mesmo modelo também foi utilizado para investigar a participação das vias opioide, colinérgica, nitrérgica e sobre canais de K⁺ regulados por ATP. Para tanto, foi realizado administração prévia de naloxona, atropina, L-NAME e glibenclamida, respectivamente. A fim de avaliar o envolvimento de canais de potássio regulados por ATP no mecanismo de ação do ACP, administramos Glibenclamida (1, 3 e 5mg/kg) 15 minutos antes da administração do composto, na dose de ACP que obteve o melhor resultado no modelo de retirada da cauda (10mg/kg). A Glibenclamida não foi capaz de inibir o efeito do composto

em estudo em nenhuma das doses testadas, como observado na figura 19, demonstrando assim a ausência de participação destes canais sobre o efeito do composto.

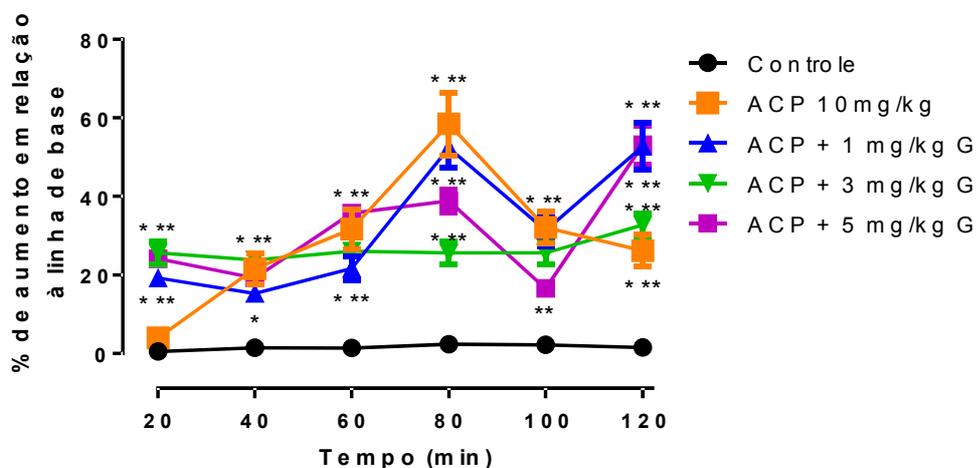


Figura 19 – Influência da administração prévia de Glibenclamida sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo ACP na dose de 10mg/kg no modelo de retirada da cauda. Os animais foram pré-tratados por via i.p. com Glibenclamida (G -1, 3 e 5 mg/kg) 15 minutos antes da administração do composto. Os resultados são expressos como média + E.P.M. (n = 7-10) do % de aumento em relação à linha de base. A significância estatística (* p < 0,05, **p < 0,01 e *p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com o composto isoladamente e combinado a doses crescentes de Glibenclamida, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.**

Tabela 6 – Avaliação da influência da administração prévia de glibenclamida sobre os tempos de latência induzidos pelo ACP no modelo de retirada de cauda.

Tratamentos	Tempo de Latência (segundos)						
	Linha de Base	20 min	40 min	60 min	80 min	100 min	120 min
Controle	3,48 + 0,6	2,94 + 0,9	3,25 + 0,9	3,24 + 0,6	2,95 + 0,8	3,22 + 0,6	3,44 + 0,3
ACP 10mg/kg	3,98 + 0,5	4,13 + 0,2	4,83 + 0,7***	5,23 + 0,5***	6,30 + 0,6***	5,25 + 0,8***	5,02 + 1,0***
ACP + 1 mg/kg G	4,11 + 0,4	4,90 + 0,7***	4,74 + 0,8*	5,00 + 0,9***	6,26 + 0,4***	5,40 + 0,3***	6,28 + 0,8***
ACP + 3 mg/kg G	3,74 + 0,8	4,70 + 0,6***	4,63 + 0,9***	4,72 + 1,1***	4,70 + 0,2***	4,70 + 0,8***	4,97 + 0,7***
ACP + 5 mg/kg G	3,73 + 0,4	4,63 + 1,0***	4,45 + 0,7***	5,07 + 0,9***	5,18 + 1,0***	4,35 + 0,6**	5,72 + 0,5***

***p < 0,001 foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com o composto isoladamente e combinado a doses crescentes de Glibenclamida, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

Para avaliar a participação da via nitrérgica, os animais foram pré-tratados com N - nitro-arginina-L-metil éster (L-NAME - 1, 3 e 5 mg/kg, i.p.; inibidor da óxido nítrico sintase), como demonstrado na figura 20. Os resultados demonstram que a inibição na síntese de óxido nítrico não foi capaz de interferir na atividade do composto, visto que nenhuma das doses de L-NAME testadas inibiu de forma significativa o efeito obtido no modelo com a dose de 10mg/kg de ACP.

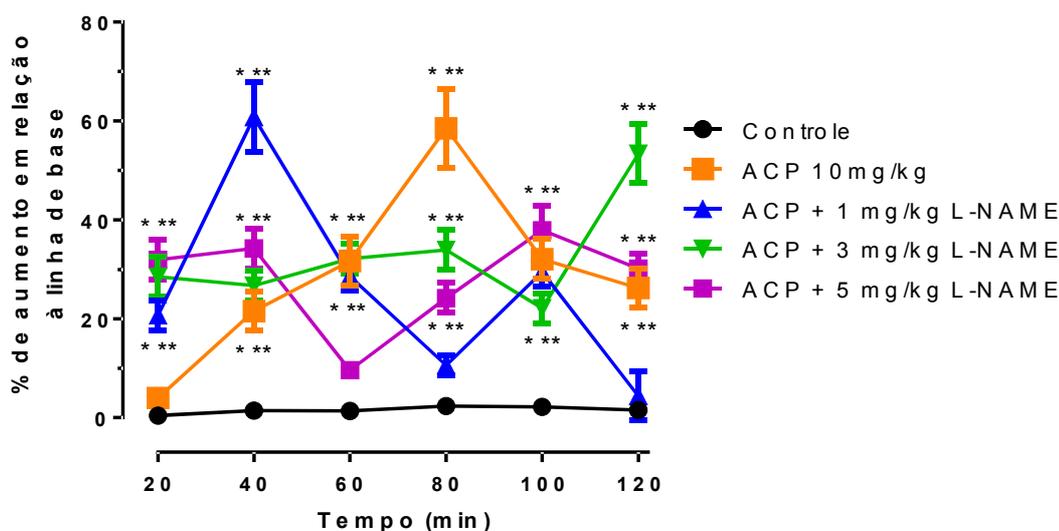


Figura 20 – Influência da administração prévia de N -nitro-arginina-L-metil éster - L-NAME sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo ACP no modelo de retirada da cauda. Os animais foram pré-tratados por via i.p. com N -nitro-arginina-L-metil éster (L-NAME -1, 3 e 5mg/kg) 15 minutos antes da administração do composto. Os resultados são expressos como média + E.P.M. (n = 7-10) do % de aumento em relação à linha de base. A significância estatística (* p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com o composto isoladamente e combinado a doses crescentes de L-NAME, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

Tabela 7 - Avaliação da influência da administração prévia de L-NAME sobre os tempos de latência induzidos pelo ACP no modelo de retirada de cauda.

Tratamentos	Tempo de Latência (segundos)						
	Linha de Base	20 min	40 min	60 min	80 min	100 min	120 min
Controle	3,48 + 0,6	2,94 + 0,9	3,25 + 0,9	3,24 + 0,6	2,95 + 0,8	3,22 + 0,6	3,44 + 0,3
ACP 10mg/kg	3,98 + 0,5	4,13 + 0,2	4,83 + 0,7***	5,23 + 0,5***	6,30 + 0,6***	5,25 + 0,8***	5,02 + 1,0***
ACP + 1 mg/kg L-NAME	3,78 + 0,2	4,57 + 0,9***	6,08 + 0,3***	4,87 + 0,5***	4,18 + 0,6	4,90 + 0,6***	3,95 + 0,4
ACP + 3 mg/kg L-NAME	3,68 + 0,6	4,73 + 0,8***	4,67 + 0,4***	4,87 + 1,2***	4,93 + 0,9***	4,50 + 0,2***	5,65 + 1,0***
ACP + 5 mg/kg L-NAME	3,65 + 0,6	4,82 + 0,7***	4,90 + 0,5***	4,00 + 0,6	4,53 + 0,4***	5,03 + 1,0***	4,75 + 0,4***

* p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001 foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com o composto isoladamente e combinado a doses crescentes de L-NAME, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

Para avaliar a participação do sistema opioide sobre o efeito do composto, foi administrado naloxona (N - 1; 3 e 5 mg/kg, i.p.; antagonista não-seletivo de receptor opioide) previamente a administração de ACP na dose de 10mg/kg. Como podemos observar na figura

21, nenhuma das doses de Naloxona foi capaz de inibir o efeito do composto, demonstrando ausência de participação da via opioide no mecanismo do composto.

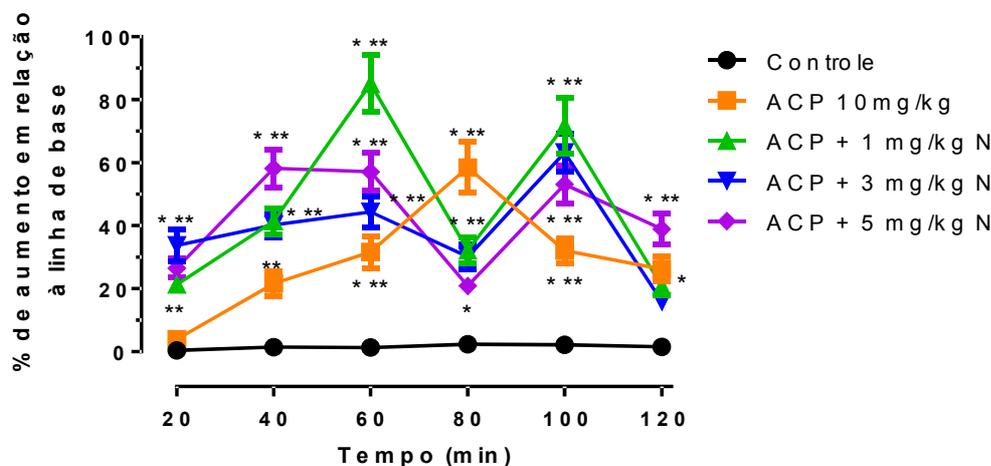


Figura 21 – Influência da administração do antagonista dos receptores opióides não seletivo, naloxona, sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo ACP no modelo de retirada da cauda. Os animais foram pré-tratados por via i.p. com Naloxona (N –1, 3 e 5mg/kg) 15 minutos antes da administração do composto. Os resultados são expressos como média + E.P.M. (n = 7-10) do % de aumento em relação à linha de base. A significância estatística (* p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com o composto isoladamente e combinado a doses crescentes de naloxona, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

Tabela 8 – Avaliação da influência da administração prévia de Naloxona sobre os tempos de latência induzidos pelo ACP no modelo de retirada de cauda.

Tratamentos	Tempo de Latência (segundos)						
	Linha de Base	20 min	40 min	60 min	80 min	100 min	120 min
Controle	3,48 + 0,6	2,94 + 0,9	3,25 + 0,9	3,24 + 0,6	2,95 + 0,8	3,22 + 0,6	3,44 + 0,3
ACP	3,98 + 0,5	4,13 + 0,2	4,83 + 0,7**	5,23 + 0,5***	6,30 + 0,6***	5,25 + 0,8***	5,02 + 1,0**
ACP + 1 mg/kg N	3,24 + 0,6	3,93 + 0,8**	4,58 + 0,5***	6,00 + 0,6***	4,28 + 0,3***	5,57 + 0,7***	3,92 + 0,3*
ACP + 3 mg/kg N	3,63 + 0,8	4,85 + 0,2***	5,08 + 0,6***	5,23 + 0,9***	4,72 + 0,5***	5,92 + 0,6***	4,20 + 1,2*
ACP + 5 mg/kg N	2,95 + 0,2	3,73 + 0,3**	4,67 + 0,8***	4,63 + 1,2***	3,57 + 0,5*	4,52 + 0,8***	4,10 + 0,6***

* p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com o composto isoladamente e combinado a doses crescentes de naloxona, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

O antagonista de receptores muscarínicos, Atropina, foi administrado previamente ao composto a fim de investigar a participação do sistema colinérgico no mecanismo de ação do ACP. Como podemos observar na figura 22, todas as doses testadas de atropina (1, 3 e 5 mg/kg, i.p.) foram capazes de inibir completamente os efeitos do composto, demonstrando então o envolvimento dos receptores muscarínicos no mecanismo do ACP.

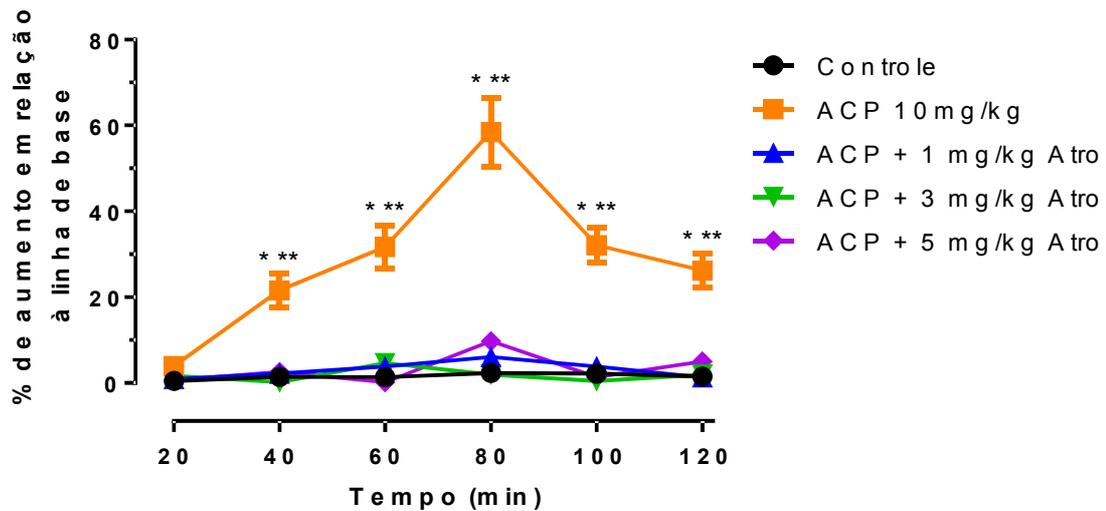


Figura 22 - Avaliação da participação da via colinérgica através da administração prévia de Atropina, um antagonista de receptores muscarínicos (Atro 1, 3 e 5mg/kg i.p.), sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo ACP no modelo de retirada da cauda. Os animais foram pré-tratados 15 minutos antes da administração do composto. Os resultados são expressos como média + E.P.M. (n = 6) do % de aumento em relação à linha de base. A significância estatística (* p < 0,05, **p < 0,01 e *p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com o composto isoladamente e combinado a doses crescentes de atropina, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.**

Tabela 9 - Avaliação da influência da administração prévia de Atropina sobre os tempos de latência induzidos pelo ACP no modelo de retirada de cauda.

Tratamentos	Tempo de Latência (segundos)						
	Linha de Base	20 min	40 min	60 min	80 min	100 min	120 min
Controle	3,48 + 0,6	2,94 + 0,9	3,25 + 0,9	3,24 + 0,6	2,95 + 0,8	3,22 + 0,6	3,44 + 0,3
ACP	3,98 + 0,5	4,13 + 0,2	4,83 + 0,7***	5,23 + 0,5***	6,30 + 0,6***	5,25 + 0,8***	5,02 + 1,0***
ACP + 1 mg/kg Atro	4,27 + 0,7	4,31 + 0,8	4,36 + 0,5	4,43 + 0,6	4,53 + 0,3	4,43 + 0,7	4,32 + 0,3
ACP + 3 mg/kg Atro	4,59 + 0,8	4,67 + 0,2	4,60 + 0,6	4,80 + 0,9	4,68 + 0,5	4,61 + 0,6	4,67 + 1,2
ACP + 5 mg/kg Atro	4,19 + 0,3	4,22 + 0,6	4,30 + 0,9	4,20 + 0,6	4,60 + 0,7	4,25 + 0,6	4,40 + 0,4

* p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001 foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com o composto isoladamente e combinado a doses crescentes de atropina, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

5.1.4 Nociceção induzida por capsaicina

Os efeitos do ACP sobre a nocicepção induzida por capsaicina é mostrado na figura 23. A injeção intraplantar de capsaicina provocou uma reação de lambedura de $71,9 \pm 5,3$ segundos no grupo controle, somente a dose de 10mg/kg de ACP foi capaz de inibir significativamente o tempo de lambedura ($39,3 \pm 5,0s$), levando a uma redução de aproximadamente 45% comparado ao controle. Demonstrando então um possível envolvimento de TRPV1 no mecanismo de ACP.

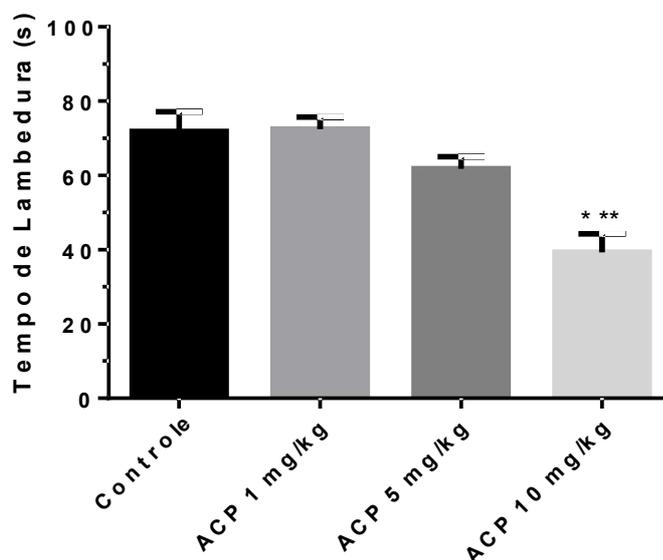


Figura 23 – Avaliação da atividade antinociceptiva do ACP no modelo de nocicepção induzida por capsaicina. Os tratamentos com o controle e ACP (1, 5 e 10 mg/kg), foram realizados por via oral. Os resultados são expressos como média + E.P.M. (n = 6) do tempo de lambedura. A significância estatística (* p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com ACP, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

Tabela 10 – Avaliação da atividade antinociceptiva de ACP no modelo da capsaicina.

Tratamentos	Tempo de Lambedura (segundos)	Percentual de inibição
Controle	71,9 + 5,3	---
ACP 1 mg/kg	72,5 + 3,3	---
ACP 5 mg/kg	61,8 + 3,2	---
ACP 10 mg/kg	39,3 + 5,0***	45,34%

* p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001 foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com ACP, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

5.1.5 Modelo de Von Frey

Este modelo foi realizado com o objetivo de verificar a atividade antinociceptiva do composto em um modelo de dor neuropática. Como podemos observar na figura 24, somente a morfina foi capaz de inibir a alodinia significativamente nos tempos de 1, 2 e 3h após sua administração comparado ao controle. O ACP não inibiu a alodinia em nenhum dos tempos com a dose de 10 mg/kg.

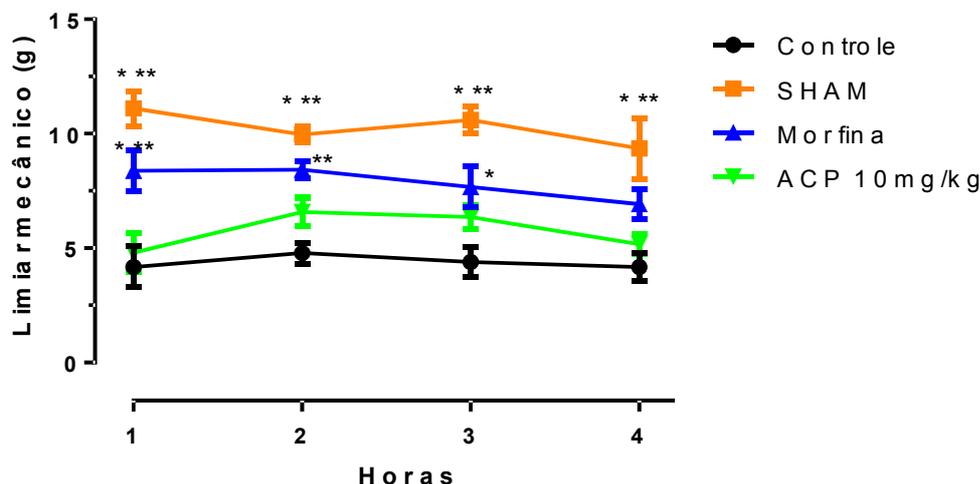


Figura 24 – Avaliação da atividade antinociceptiva aguda no modelo de constrição crônica do nervo ciático através do modelo de von frey. Foram realizadas 3 estimulações com intervalo de 5 a 10 segundos em cada animal. Os resultados são expressos como média + E.P.M. (n = 6) do limiar mecânico em gramas. A significância estatística (* p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados morfina (1mg/kg i.p.), ACP (10mg/kg v.o.) e grupo sham (falso operado), por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni

Tabela 11 – Avaliação da atividade antinociceptiva aguda pelo modelo de Von Frey.

Tratamentos	Limiar Mecânico (g)			
	1 H	2 H	3 H	4 H
Controle	4,18 + 0,9	4,78 + 0,45	4,40 + 0,65	4,17 + 0,62
SHAM	11,1 + 0,77***	9,97 + 0,34***	10,6 + 0,59***	9,35 + 1,34***
Morfina	8,38 + 0,9***	8,43 + 0,37**	7,67 + 0,89*	6,93 + 0,66
ACP – 10 mg/kg	4,8 + 0,85	6,58 + 0,62	6,35 + 0,52	5,18 + 0,42

* p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001 foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados morfina (1mg/kg i.p.), ACP (10mg/kg v.o.) e grupo sham (falso operado), por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni

Na avaliação do uso do ACP de forma crônica neste modelo de dor neuropática, foi observado que nenhum dos fármacos testados foi capaz de diminuir a alodinia, como

podemos observar na figura 25, demonstrando que ambas (ACP e morfina) não possuem atividade antinociceptiva crônica neste modelo, com as doses testadas.

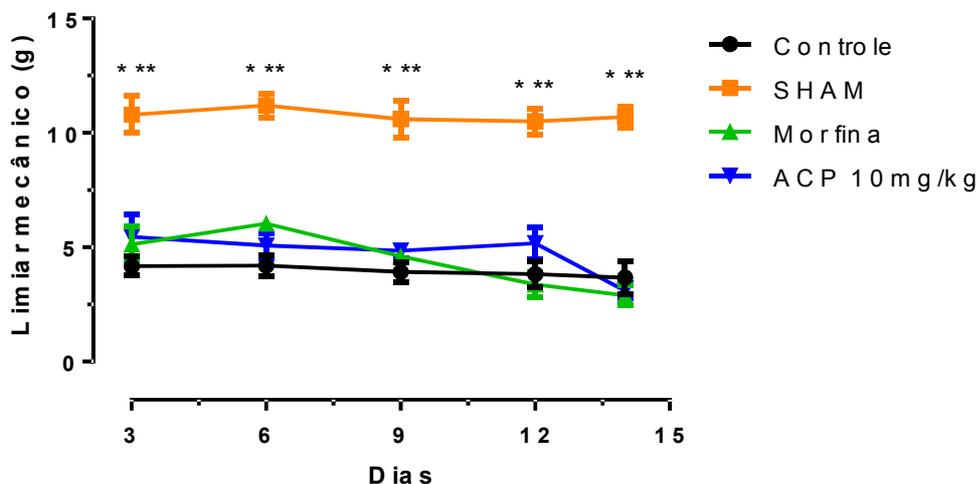


Figura 25 - Avaliação da atividade antinociceptiva crônica no modelo de constrição crônica do nervo ciático através do modelo de von frey. Os animais foram tratados por 14 dias. Os resultados são expressos como média + E.P.M. (n = 6) do limiar mecânico em gramas. A significância estatística (* p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados morfina (1mg/kg i.p.), ACP (10mg/kg v.o.) e o grupo sham (falso operado), por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

Tabela 12- Avaliação da atividade antinociceptiva crônica pelo modelo de Von Frey.

Tratamentos	Limiar Mecânico (g)				
	Dia 3	Dia 6	Dia 9	Dia 12	Dia 14
Controle	4,18 + 0,42	4,2 + 0,45	3,92 + 0,43	3,83 + 0,56	3,68 + 0,71
SHAM	10,8 + 0,8***	11,2 + 0,52***	10,6 + 0,8***	10,5 + 0,56***	10,7 + 0,5***
Morfina	5,13 + 0,78	6,03 + 0,32	4,6 + 0,29	3,38 + 0,55	2,9 + 0,42
ACP – 10 mg/kg	5,45 + 0,99	5,08 + 0,55	4,85 + 0,33	5,18 + 0,7	3,1 + 0,35

***p < 0,001 foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados morfina (1mg/kg i.p.), ACP (10mg/kg v.o.) e o grupo sham (falso operado), por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

5.1.6 Modelo do campo aberto

Neste modelo, os animais foram tratados por via oral com ACP na dose de 10mg/kg, água destilada, veículo e morfina (3 mg/kg) Como podemos observar na figura 26,

o composto não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle, confirmando que o ACP não induz déficit motor, e que o efeito antinociceptivo demonstrado não é influenciado por nenhum comprometimento motor. A morfina apresentou uma redução da atividade motora espontânea do animal, com diferença significativa em relação ao grupo controle, devido a sua comprovada atividade hipnótica.

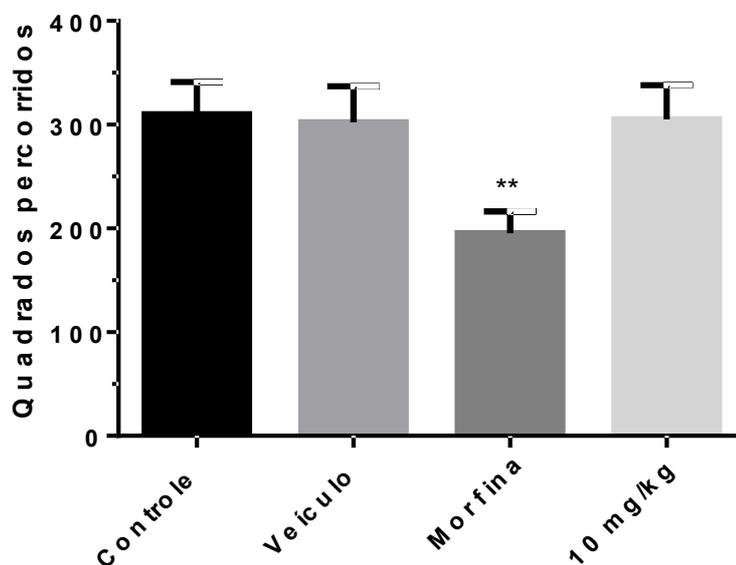


Figura 26 – Avaliação do ACP no modelo de campo aberto. Os tratamentos com água destilada, veículo, ACP (10 mg/kg) e morfina (3 mg/kg) foram realizados por via oral. Os resultados são expressos como média + E.P.M. (n = 6) do número de quadrados percorridos pelos animais. A significância estatística (* p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, morfina e ACP, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

Tabela 13 – Número de quadrados percorridos a partir do modelo de campo aberto.

Tratamentos	Número de quadrados percorridos	Percentual de inibição
Controle	310,2 + 31,1	---
Veículo	302,6 + 34,5	2,5%
Morfina	195,4 + 21,0**	37,0%
ACP 10 mg/kg	305,2 + 33,8	1,61%

* p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001 foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, morfina e ACP, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

5.2 Modelos de avaliação da atividade anti-inflamatória

5.2.1 Modelo de edema de pata

Na figura 27, podemos observar que a dose 10mg do composto foi capaz de reduzir em 75,8% o volume do edema em relação ao controle na 4ª hora, assim como a dexametasona.

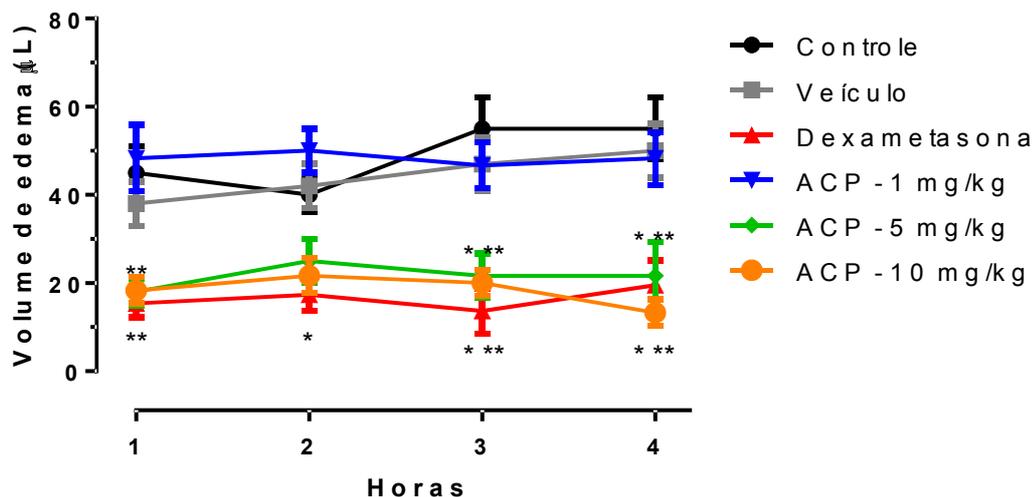


Figura 27 - Efeito do ACP no modelo de edema de pata. Os animais foram pré-tratados com água destilada, veículo, dexametasona (2,25 mg/kg; S.C.) e ACP (1, 5 e 10 mg/kg). A carragenina foi aplicada na pata esquerda dos animais em todos os grupos e a diferença entre o volume foi feita em comparação com a pata direita, injetada com PBS. Os resultados são expressos como média + E.P.M. (n = 6) do volume de edema da pata. A significância estatística (* p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, dexametasona e doses crescentes do composto, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

Tabela 14 – Avaliação do efeito antiedematogênico de ACP no modelo de edema de pata.

Tratamentos	Volume de Edema (µL)			
	1 H	2 H	3 H	4 H

Controle	45,0 + 6,6	40,0 + 4,9	55,0 + 7,9	55,0 + 7,6
Veículo	38,0 + 5,5	42,0 + 5,2	47,0 + 5,7	50,0 + 5,5
Dexametasona	15,4 + 3,1**	17,4 + 3,6 *	13,7 + 5,1***	19,5 + 5,5***
ACP – 1 mg/kg	48,3 + 7,5	50,0 + 5,0	46,7 + 5,2	48,4 + 6,0
ACP – 5 mg/kg	18,0 + 3,3**	25,0 + 5,6	21,7 + 5,9***	21,7 + 7,5***
ACP – 10 mg/kg	18,3 + 3,3**	21,7 + 4,6	20,0 + 3,9***	13,3 + 3,6***

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, dexametasona e doses crescentes do composto, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

5.2.2 Modelo da bolsa de ar subcutânea estéril

Na figura 28 podemos observar que somente a dose de 10 mg/kg reduziu significativamente, 56,46%, a quantidade de leucócitos totais comparado ao grupo controle. Demonstrando então, que assim como a dexametasona, o composto foi capaz de reduzir a migração leucocitária neste modelo.

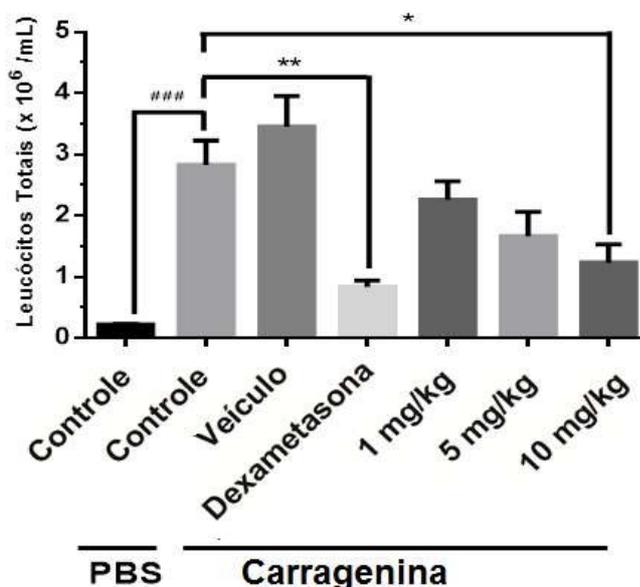


Figura 28 - Efeito do ACP na migração de leucócitos totais a partir do modelo da bolsa de ar subcutâneo. Os animais foram pré-tratados com água destilada, veículo, dexametasona (2,25 mg/kg; S.C.) e ACP (1, 5 e 10 mg/kg). Na bolsa de ar subcutâneo foram aplicadas PBS e carragenina. Os resultados são expressos

como média + E.P.M. (n = 6) do número de leucócitos totais. A significância estatística (* p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, dexametasona e doses crescentes do composto e a significância estatística (# p < 0,05, ##p < 0,01 e ###p < 0,001) foi calculada entre o grupo que recebeu solução salina e o que recebeu carragenina no espaço subcutâneo, por One-Way ANOVA, seguida pelo teste de Bonferroni.

Tabela 15 – Avaliação do efeito do ACP sobre a migração leucocitária no modelo de bolsa de ar subcutânea.

Tratamentos	Número de Leucócitos Totais (x 10 ⁶ /mL)	Percentual de inibição
Controle - PBS	0,225 + 0,002	---
Controle - Carragenina	2,825 + 0,4 ^{###}	---
Veículo	3,425 + 0,5	---
Dexametasona	0,838 + 0,1 ^{**}	70,34%
ACP 1 mg/kg	2,26 + 0,3	---
ACP 5 mg/kg	1,66 + 0,4	---
ACP 10 mg/kg	1,23 + 0,3 [*]	56,46%

* p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001 foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, dexametasona e doses crescentes do composto e a significância estatística (# p < 0,05, ##p < 0,01 e ###p < 0,001) foi calculada entre o grupo que recebeu solução salina e o que recebeu carragenina no espaço subcutâneo, por One-Way ANOVA, seguida pelo teste de Bonferroni.

5.2.3 Quantificação de citocinas

Na determinação da produção de TNF- α , observamos que a administração do ACP foi capaz de inibir a produção/liberação desta citocina somente com a dose de 10 mg/kg (Figura 29); enquanto o composto também inibiu a produção/liberação de IL-1 β no exsudato inflamatório nas doses de 5 e 10 mg/kg (Figura 30). A administração subcutânea de dexametasona reduziu a concentração de ambas as citocinas.

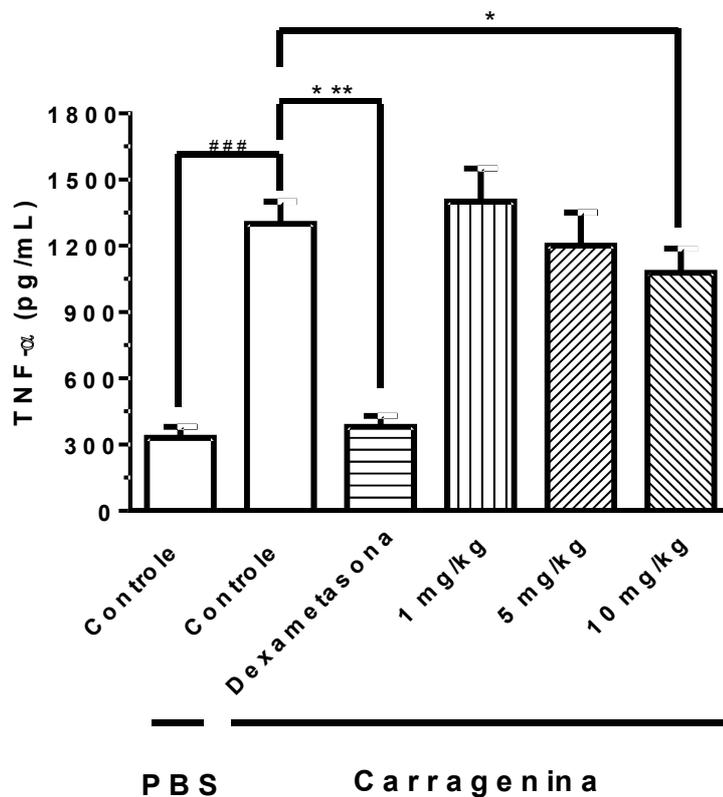


Figura 29 - Efeito do ACP na quantificação de TNF- α a partir do modelo da bolsa de ar subcutâneo. Os animais foram pré-tratados com água destilada, dexametasona (2,25 mg/kg; s.c.) e o composto (1, 5 e 10 mg/kg; v.o). Na bolsa de ar subcutâneo foram aplicadas solução PBS e carragenina. Os resultados são expressos como média + E.P.M. (n = 7-10) da concentração de TNF- α . A significância estatística (* p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com dexametasona e doses crescentes do composto e a significância estatística (# p < 0,05, ## p < 0,01 e ### p < 0,001) foi calculada entre o grupo que recebeu solução salina e o que recebeu carragenina, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

Tabela 16 – Quantificação de TNF- α no modelo de bolsa de ar subcutânea.

Tratamentos (oral-subcutânea)	Quantificação de TNF- α (pg/mL)	Percentual de inibição
Controle - PBS	330,0 + 50,2	---
Controle - Carragenina	1300,0 + 100,6 ^{###}	---
Dexametasona- Carragenina	382,0 + 50,3 ^{***}	70,62%
ACP 1 mg/kg- Carragenina	1404,0 + 150,3	---
ACP 5 mg/kg- Carragenina	1205,0 + 150,4	---
ACP 10 mg/kg- Carragenina	1007,7 + 110,3 [*]	22,54%

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com dexametasona e doses crescentes do composto e a significância estatística (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$) foi calculada entre o grupo que recebeu solução salina e o que recebeu carragenina, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

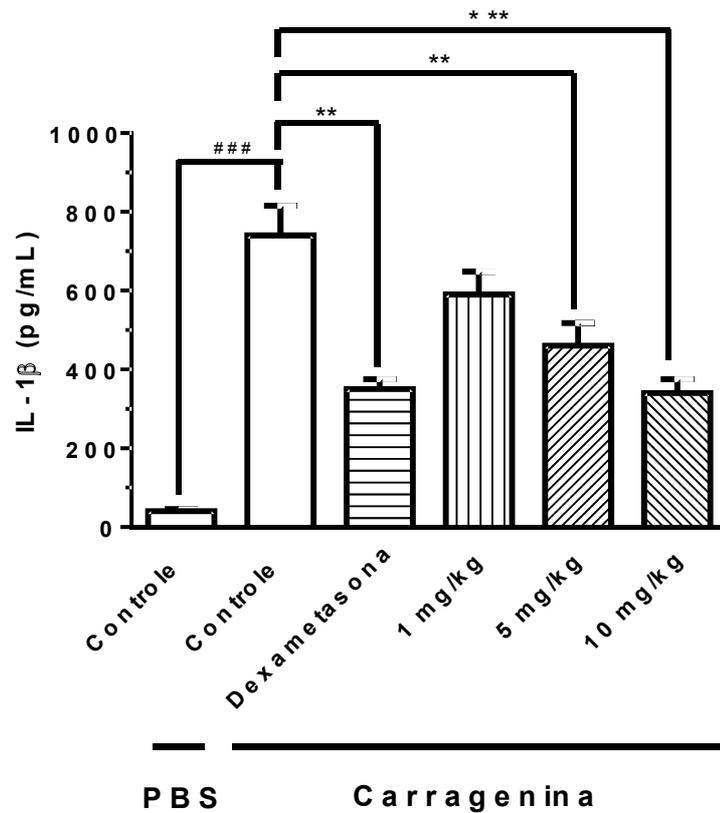


Figura 30 - Efeito do ACP na quantificação de IL-1 β a partir do modelo da bolsa de ar subcutâneo. Os animais foram pré-tratados com água destilada, dexametasona (2,25 mg/kg; s.c.) e o composto (1, 5 e 10 mg/kg; v.o). Na bolsa de ar subcutâneo foram aplicadas solução PBS e carragenina. Os resultados são expressos como média + E.P.M. (n = 7-10) da concentração de IL-1 β . A significância estatística (* p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com a dexametasona e doses crescentes do composto e a significância estatística (# p < 0,05, ##p < 0,01 e ###p < 0,001) foi calculada entre o grupo que recebeu solução salina e o que recebeu carragenina, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

Tabela 17 - Quantificação de IL-1 β no modelo de bolsa de ar subcutânea.

Tratamentos (oral-subcutânea)	Quantificação de IL-1 β (pg/mL)	Percentual de inibição
Controle - PBS	40,5 + 5,2	---
Controle - Carragenina	740,2 + 75,6 ^{###}	---
Dexametasona- Carragenina	350,4 + 25,4 ^{**}	52,66%
ACP 1 mg/kg- Carragenina	590,5 + 59,3	---
ACP 5 mg/kg- Carragenina	460,2 + 58,6 ^{**}	37,83%
ACP 10 mg/kg- Carragenina	340,7 + 35,7 ^{***}	53,97%

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com a dexametasona e doses crescentes do composto e a significância estatística (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$) foi calculada entre o grupo que recebeu solução salina e o que recebeu carragenina, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

5.2.4 Avaliação da atividade enzimática de COX-1 e COX-2

A tabela 18 foi construída com o auxílio da curva padrão de prostaglandina (não demonstrada). Observamos a capacidade do composto em diretamente inibir a enzima Cicloxigenase (COX), tendo como consequência uma redução na síntese de prostaglandina. A partir do cálculo dos percentuais de inibição enzimática, obtidos a partir da concentração de prostaglandina sintetizada, construiu-se os gráficos para determinação do CI_{50} (concentração inibitória de 50%). A CI_{50} do composto ACP frente à COX-1 foi de 175,6 $\mu\text{g/mL}$, já a CI_{50} do composto frente à COX-2 foi de 2912 $\mu\text{g/mL}$. Esta inibição enzimática promovida pelo composto se dá de forma seletiva para a isoforma COX-1, pois apresenta um CI_{50} inferior para a COX-1, ou seja, o composto consegue inibir 50% da atividade enzimática de COX-1 com a utilização de uma concentração mais baixa do composto (Figuras 31 e 32). O índice de seletividade (IS) obtido para o composto foi de 0,06; sendo que $IS = CI_{50}COX-1/CI_{50}COX-2$; $IS > 1$ – seletividade para COX-2, $IS < 1$ – seletividade para COX-1.

Tabela 18 - Influência de concentrações crescentes do composto sobre a atividade das enzimas COX-1 e COX-2, através do método de imunensaio enzimático.

Concentração do composto (µg/mL)	Concentração de prostaglandina (pg/mL) obtida pela COX-1	Concentração de prostaglandina (pg/mL) obtida pela COX-2	Inibição enzimática da COX-1(%)	Inibição enzimática da COX-2(%)
0	228,55	210,21	0	0
12,5	199,65	199,47	12,65	5,11
25	196,38	197,25	14,08	6,17
50	178,98	190,11	21,69	9,57
100	152,36	183,57	33,34	12,67
200	100,00	171,14	56,25	18,59

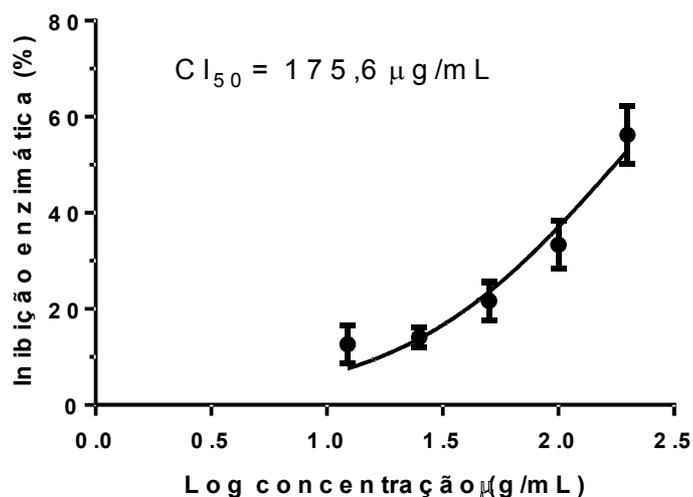


Figura 31 - Efeito de concentrações crescentes do ACP sobre a atividade enzimática de COX-1. Os resultados são expressos como percentuais de inibição enzimática. Foi utilizado o método de regressão não-linear para o cálculo de CI₅₀. O índice de seletividade (IS) obtido para o composto foi de 0,06; sendo que IS>1 – seletividade para COX-2, IS<1 – seletividade para COX-1.

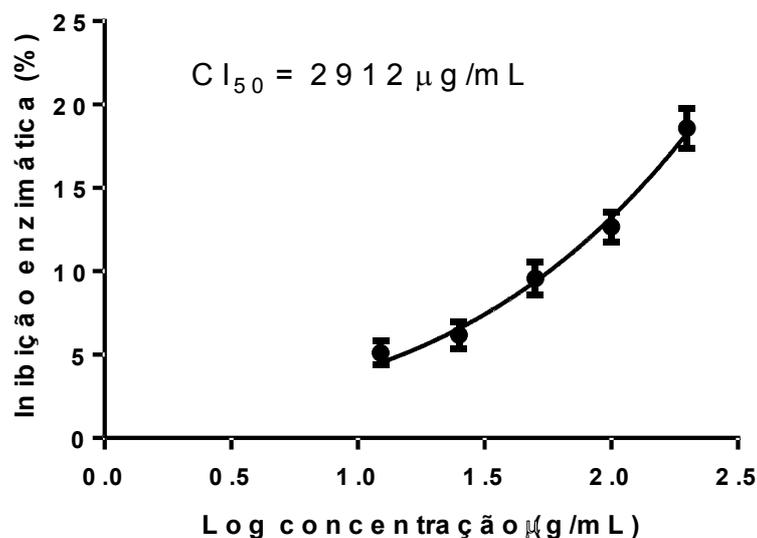


Figura 32 - Efeito de concentrações crescentes do ACP sobre a atividade enzimática de COX-2. Os resultados são expressos como percentuais de inibição enzimática. Foi utilizado o método de regressão não-linear para o cálculo de CI₅₀. O índice de seletividade (IS) obtido para o composto foi de 0,06; sendo que IS>1 – seletividade para COX-2, IS<1 – seletividade para COX-1.

5.3 Avaliação toxicológica Aguda e subcrônica

Todos os animais foram observados por 14 dias e nenhum sintoma de intoxicação (convulsão, hiperatividade, perda de reflexo, alteração da frequência respiratória e sedação) foi apresentado em nenhum dos grupos. O ACP não produziu toxicidade após administração oral aguda nem subcrônica, demonstrando que a DI_{50} é maior que 300mg/kg ($DI_{50} > 300$ mg/kg). Foram observados também ganho de peso e consumo de ração, e não houve diferença significativa entre o grupo controle e tratado como podemos ver na Tabela 19.

Tabela 19 - Avaliação toxicológica aguda e sub crônica com análise do peso corporal e consumo de ração:

Grupos N=6	Média de massa corporal inicial ±EPM / final ±EPM (g)	Ganho ponderal de peso em 14 dias (g) ± EPM	Média do consumo diário de ração/animal ±EPM (g)	Alterações comportamentais	Morte natural
Controle	36±0,8/37±1,4	1,0±0,55	6,5±0,32	Ausentes	0
ACP 300mg/kg*	33±1,12/35±1,42	2±0,26	5,29±0,23	Ausentes	0
ACP 10mg/kg**	35±1,12/36±0,6946	1±0,42	6,12±0,32	Ausentes	0

*administração aguda/ ** administração diária por 14 dias

A análise macroscópica dos órgãos (baço, fígado, rim, pulmões e coração) não apresentou alterações em nenhum dos grupos. O peso relativo dos órgãos não obteve diferença significativa em nenhum dos grupos testados como representado na tabela 20.

Tabela 20 - Análise macroscópica e peso relativo dos órgãos:

ÓRGÃOS	GRUPOS (N=6) /Pesos relativo dos órgãos % ± EPM		
	Controle	ACP 300mg*	ACP 10mg**
Pulmões	0,75±0,08	0,62±0,02	0,58±0,006
Fígado	5,36±0,11	4,69±0,03	4,72±0,05
Coração	0,63±0,02	0,49±0,005	0,56±0,02
Rim (D)	0,95±0,02	0,78±0,02	0,78±0,01
Baço	0,32±0,01	0,33±0,003	0,36±0,01
Alterações Macroscópicas	Ausente	Ausente	Um animal com baço aumentado

*administração aguda/ ** administração subcrônica diária por 14 dias

6 DISCUSSÃO

A fim de alcançar os objetivos propostos por esse estudo, vários modelos de nociceção e inflamação foram utilizados. Os modelos propostos se diferenciam através de suas características específicas, como sensibilidade e especificidade. Desta forma demonstramos o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório do ácido pipérico.

Em 2013, Bukhari e colaboradores demonstraram que a piperina foi capaz de, significativamente, e dose dependente, reduzir o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético e aumentar o tempo de reação no modelo de retirada da cauda, sugerindo a atividade antinociceptiva da molécula. A fim de avaliar se o efeito demonstrado neste estudo era graças ao ácido pipérico, submetemos os animais a modelos de dor para avaliar se os efeitos se mantinham mesmo após alteração na molécula.

O primeiro modelo realizado foi o de contorção abdominal induzida por ácido acético que é um modelo sensível ao uso de medicamentos antinociceptivos e anti-inflamatórios. O ácido pipérico foi capaz de inibir o número de contorções abdominais, assim como a morfina (utilizada como fármaco padrão), comparados ao grupo controle, demonstrando então uma atividade antinociceptiva. E esta ação ocorreu com todas as doses testadas (1, 5 e 10mg/kg). Podemos observar que, além disso, o efeito do composto é dose dependente, visto que quanto maior a dose melhor a resposta. Estes resultados sugerem também que a ação antinociceptiva da piperina pode ser devido as subunidades A e B que representam o ácido pipérico. Porém a atividade demonstrada neste modelo é inespecífica, pois a contorção abdominal induzida por ácido acético é comumente utilizado como um modelo de triagem, por não ser seletivo para estudos antinociceptivos (COLLIER *et al*, 1968). A injeção intraperitoneal (i.p.) do ácido acético induz, indiretamente, a liberação de mediadores endógenos, tais como a substância P, bradicininas, prostaglandinas, bem como das citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α , estimulando assim nociceptores periféricos e neurônios sensíveis a AINE'S, opioides e outras drogas de ação central. Desta forma fez-se necessário a realização de outros modelos para esclarecer a ação periférica ou central do ácido pipérico. (DICKENSON E BESSON, 1997; PINHEIRO *et al*, 2011. BUKHARI *et al*, 2013).

Para um esclarecimento melhor da atividade do composto em estudo, executamos o modelo de nociceção induzida por formalina, ou chamado modelo da formalina. A vantagem deste modelo sobre os outros é a de poder discriminar a ação de compostos sobre dois tipos de dor, a dor neurogênica e a inflamatória, devido a ser um modelo bifásico. A fase neurogênica é a primeira fase do modelo que se inicia logo após a injeção da formalina, e se estende por 5 minutos. É caracterizada pela estimulação direta dos nociceptores aferentes do tipo C, mediada por TRPA1, envolvendo em parte as fibras do tipo A δ e associado também a liberação de NO e substância P. (FISCHER *et al*, 2014; SILVA *et al*, 2013). O período de 05 a 15 minutos é chamado de quiescência (período de repouso), onde ocorre inibição da transmissão nociceptiva através de circuitos supraespinhais e espinhais (HUNSKAAR e HOLE, 1987).

A segunda fase do modelo da formalina é denominada inflamatória, e ocorre durante o tempo de 15 a 30 min. Está relacionada à liberação de diversos mediadores pró-inflamatórios como a bradicinina, histamina, substância P, serotonina e prostaglandinas, que interagem com seus respectivos receptores para manifestação da dor inflamatória. Fármacos de ação central, como a morfina que é um fármaco analgésico opioide de ação central

conhecida, reduzem o tempo de lambadura nas duas fases, demonstrando então que o resultado da inibição em ambas as fases caracteriza uma ação antinociceptiva central. Anti-inflamatórios, como o AAS que é um AINE'S, inibem somente a segunda fase, sugerindo atividade antinociceptiva periférica inflamatória (FISCHER *et al*, 2008). O ácido pipérico, na dose de 10mg/Kg foi capaz de reduzir significativamente o tempo de lambadura nas duas fases, assim como a morfina, sugerindo então atividade antinociceptiva central. Já as doses de 1 e 5 mg/kg inibiram de forma significativa apenas a segunda fase, semelhante ao AAS, sugerindo também atividade sobre a dor inflamatória.

O modelo de retirada da cauda foi utilizado para confirmar o efeito antinociceptivo central demonstrado no modelo da formalina. Neste modelo ocorre a aplicação de um estímulo nociceptivo térmico, através de uma fonte de calor radiante na cauda. Os neurônios espinhais respondem ao estímulo térmico nocivo, sendo possível a avaliação de mecanismos espinhais envolvidas na antinocicepção (OLIVEIRA *et al*, 2009). A reação a esse modelo também pode envolver estruturas neurais superiores, sendo assim os fármacos que atuam a nível central, como os opioides, são capazes de aumentar o tempo de latência de retirada da cauda. (LE BARS *et al*, 2001; FISCHER *et al*, 2008).

O ácido pipérico foi capaz de aumentar significativamente (***) $p < 0,001$) o tempo de latência no modelo de retirada de cauda já nas primeiras medidas, após a administração do composto em todas as doses testadas (1, 5 e 10mg/kg) e até 120 minutos depois da administração v.o., na dose de 10mg/kg. Comparado ao ACP, a morfina apresentou uma ação mais tardia, com diferença significativa somente 60min após a administração do composto. Este efeito tardio se deve ao metabolismo hepático de primeira passagem, ou chamado efeito de primeira passagem hepático que diminui em aproximadamente 75% a biodisponibilidade de preparações orais de morfina (BRUNTON, 2012). Esse resultado demonstrou que o efeito do ácido pipérico envolve mecanismos espinhais. Na tentativa de investigar por quais vias o ácido pipérico está exercendo seus efeitos, realizamos o uso de antagonistas ainda no modelo de retirada da cauda.

Para verificar o envolvimento dos canais de potássio dependentes de ATP (K_{ATP}) foi administrado previamente glibenclamida, um bloqueador dos canais K_{ATP} . Diversos estudos demonstram o envolvimento desses canais nos processos de dor. Sabe-se que a ativação dos mesmos diminuem os níveis de Ca^{2+} intracelular, por hiperpolarização da célula, reduzindo a liberação de neurotransmissores contribuindo para a diminuição da transmissão sináptica do impulso e resultando em antinocicepção. De acordo com a localização, esses canais podem agir de forma direta ou indireta na via de sinalização dolorosa. (OCANA *et al*, 2004; ASANO *et al*, 2000; LOHMANN e WELCH, 1999). No sistema nervoso central, a abertura dos canais de ATP sensíveis ao K^+ parece desempenhar um papel na antinocicepção induzida por morfina e encefalinas (opioides endógenos) uma vez que o efeito antinociceptivo destes opioides é antagonizado por antagonistas dos canais de K_{ATP} , como a Glibenclamida (REIS, 2006). Em nosso experimento, a glibenclamida não foi capaz de bloquear o efeito do ácido pipérico no modelo de retirada da cauda em nenhuma das doses testadas. Demonstrando que os canais de potássio dependentes de ATP não estão envolvidos no mecanismo de ação do composto.

Investigou-se também a participação da via do óxido nítrico (via nitrérgica) na antinocicepção induzida pelo ACP na dose de 10mg/kg no modelo de retirada da cauda. Essa via exerce um papel importante na modulação da nocicepção e vários estudos farmacológicos, sugerem a participação do óxido nítrico no processo de nocicepção. (HALEY *et al*, 1992). O NO é responsável pela ativação da guanilato ciclase solúvel e consequente aumento do GMP c.

intracelular, que atua como segundo mensageiro em muitas células. O envolvimento do NO na dor é complexo, sabe-se que a administração de doadores de NO inibe a hipernocicepção induzida por PGE₂ e esse efeito é revertido com a utilização de L-NAME, que é um inibidor da enzima óxido nítrico sintase, responsável pela produção de óxido nítrico. Além disso vários estudos já demonstraram a participação dessa via no efeito analgésico de opioides. (FERREIRA, 1991; DICKENSON, 1995). Em nosso experimento, nenhuma das doses testadas foi capazes de inibir o efeito do composto no modelo. Sugerindo que essa via não interfere no mecanismo de ação do ácido pipérico.

Através do mesmo modelo, de retirada da cauda, procuramos avaliar a participação direta de receptores opioides, através da administração de naloxona. A naloxona é um antagonista não seletivo de receptores opioides. A via descendente da dor pode ser controlado por vários sistemas que modulam a nocicepção, tanto de forma inibitória quanto estimulatória. No processo de transmissão, a estimulação de áreas cerebrais como a periaqueductal e periventricular, leva a liberação de substâncias neuromoduladoras, como os peptídeos opióides que possuem ação analgésica, atuando através de seus respectivos receptores (μ , δ e κ). Porém esta via demonstrou não ter influência na ação do ácido pipérico pois a naloxona não foi capaz de inibir os efeitos do composto no modelo utilizado

Ainda na busca do mecanismo de ação do ácido pipérico, investigamos a participação da via colinérgica no efeito do composto, através da administração prévia de atropina, um antagonista de receptores muscarínicos. A atropina foi capaz de inibir completamente os efeitos do ácido pipérico no modelo de retirada da cauda, em todas as doses testadas. Sugerindo a participação de receptores muscarínicos no mecanismo de ação do composto.

A via colinérgica possui um papel que não está bem esclarecido na antinocicepção. Segundo Millan (2002), a acetilcolina (ACh) pode atuar na dor das seguintes maneiras: na ativação de vias descendentes não-colinérgicas como mediador da via inibitória; na mediação dessa via de forma direta, ou sua própria liberação a partir de interneurônios localizados no corno dorsal da medula espinhal. A ACh modula a nocicepção também, através de efeitos complexos mediados através de várias classes de receptores muscarínicos e nicotínicos. Além disso, os inibidores da acetilcolinesterase (enzima responsável pela inibição da acetilcolina) tem tido um papel de potencializar a antinocicepção (MILLAN, 2002). Os efeitos de inibição da nocicepção da ACh no corno dorsal da medula espinhal, se dá predominantemente através de mecanismos envolvendo receptores muscarínicos. O modelo de retirada da cauda é um modelo de estímulo térmico capaz de ativar neurônios de limiar alto, que são considerados nociceptores aferentes primários, e estudos já demonstraram a presença de receptores muscarínicos do tipo 2 e 3 (M2 e M3) e possivelmente M4, em ambos os lados das fibras aferentes primárias e também receptores M2 e M4 sobre os neurônios do corno dorsal, em roedores. (COGGESHALL E CARLTON, 1997; HÖGLUND e BAGHDOYAN, 1997; YUNG e LO, 1997; HABERBERGER *et al.*, 2000).

Um estudo em 2010, demonstrou ainda que a piperina é capaz inibir a atividade da enzima acetilcolinesterase em hipocampo isolado de ratos, aumentando assim a concentração de acetilcolina (CHONPATHOMPIKUNLERT, *et al.*, 2010). Esses dados contribuem com o resultado obtido através do antagonismo da atropina sobre os efeitos do ácido pipérico, sugerindo ainda que o mecanismo de inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase pode estar relacionado ao ácido pipérico.

Sabemos que o receptor TRPV1 está diretamente relacionado a ação de derivados alcaloides de pimenta. A nocicepção induzida por capsaicina permite avaliar se o composto

em estudo atua de alguma forma via TRPV1. O papel dos receptores TRPV1 na nocicepção aguda e crônica tem sido estabelecido pelo uso de antagonistas TRPV1 (p.ex capsazepina) e por camundongos TRPV1 knockout. (WALKER *et al*, 2003). Diversos estudos demonstram que a antinocicepção pode ser atribuída a dessensibilização induzida por agonistas dos receptores TRPV1, mais intimamente relacionado na inibição da dor crônica, enquanto os antagonistas desse receptor atuam inibindo sua ativação e consequentemente a liberação de mediadores químicos algésicos como, por exemplo, a substância P. Os antagonistas TRPV1 são apontados como agentes poderosos no tratamento da dor pós operatória, inflamatória e também na artrite. (LOPEZ *et al*, 2003; EL KOUHEN *et al*, 2005).

No modelo de nocicepção induzida por capsaicina o ácido pipérico foi capaz de inibir significativamente o tempo de lambadura comparado ao controle ($p < 0,001$). Esse resultado demonstra que de alguma forma os receptores TRPV1 estão envolvidos no mecanismo do composto.

Com o intuito de avaliar a antinocicepção do ácido pipérico em modelo de dor crônica, submetemos os animais a constrição crônica do nervo ciático. Este modelo mimetiza a lesão mecânica traumática nos nervos periféricos de seres humanos e é um dos modelos mais comuns de dor neuropática. Os sinais clássicos de dor neuropática incluem anormalidades sensoriais tais como sensação desagradável, anormal (disestesia), aumento da resposta a estímulos dolorosos (hiperalgesia) e dor em resposta a um estímulo que normalmente não provoca dor (alodinia) (WOOLF E MANNION, 1999). A partir disto realizamos o modelo de von frey, para avaliar a alodinia desenvolvida 21 dias após a cirurgia. A dose testada de 10mg/kg não foi capaz de diminuir a alodinia, apenas a morfina aumentou o limiar mecânico necessário para produzir nocicepção, no modelo agudo. No modelo crônico nenhuma dos fármacos testados foram capazes de inibir a alodinia desenvolvida pela constrição crônica do nervo ciático, demonstrando assim que não possuem um efeito de manutenção sobre a dor neuropática nas doses testadas.

A fim de eliminar a interferência de comprometimento motor nos resultados obtidos, realizamos o modelo de campo aberto. Estudos sugerem que a sedação do SNC e efeito miorrelaxante não específico podem reduzir a coordenação motora como, por exemplo, a lambadura da pata no modelo da formalina ou a movimentação de retirada da cauda no modelo de retirada da cauda. (SOJA *et al*, 2002

No modelo de campo aberto não houve alteração significativa na atividade locomotora dos animais pelo uso do ACP, demonstrando então que os efeitos antinociceptivos observados não sofreram interferência da função motora.

Mediante o resultado do modelo da formalina na 2ª fase com as doses de 1 e 5mg/kg de ácido pipérico, revelando uma possível atividade anti-inflamatória e a ação sobre os receptores TRPV1 que estão intimamente relacionados a dor inflamatória, avaliamos a atividade anti-inflamatória do ácido pipérico. O modelo de edema de pata é um modelo de inflamação agudo utilizado para avaliar drogas anti-inflamatórias. A carragenina quando injetada por via intraplantar promove intensa vasodilatação e extravasamento plasmático pela liberação de mediadores que contribuem também para a intensa migração celular ao sítio inflamatório. Desta forma se constitui como um modelo interessante para triagem de novas drogas anti-inflamatórias (CRUNKHORN E MEACOCK, 1971, HENRIQUES *et al*, 1987). A inflamação induzida pela carragenina é dita como bifásica, pois é descrito que na primeira fase (1h após a injeção) ocorre a liberação de mediadores inflamatórios como a serotonina e a histamina. Já na segunda fase, que se dá após 1h, é mediada por produtos da COX 1 e 2 como prostaglandinas, seguida pela ação de cininas. (CHYAD *et al*, 2016)

O composto em estudo foi capaz de inibir significativamente o edema de pata comparado ao controle nas doses de 5 e 10mg/kg a partir de 1h após a injeção da carragenina intraplantar. Esse efeito permaneceu, e de forma mais intensificada, até a 4^h ($p < 0,001$), assim como a dexametasona. A fim de melhor caracterizar o efeito anti-inflamatório demonstrando no modelo de edema de pata, realizamos o modelo da bolsa de ar subcutâneo.

A bolsa de ar subcutânea é um modelo utilizado para estudar a inflamação aguda e crônica, e é formada pela injeção subcutânea de ar estéril no dorso do animal. Após a injeção de carragenina na bolsa de ar, ocorre um processo inflamatório. Esse processo é caracterizado pela produção intensa de mediadores inflamatórios como, por exemplo, prostaglandinas, leucotrienos e citocinas, além de migração leucocitária. Todos esses parâmetros podem ser quantificados, contribuindo assim para avaliação de drogas anti-inflamatórias. (DUARTE *et al*, 2012; JAIN *et al*, 2011).

A migração leucocitária induzida pela carragenina foi reduzida pela administração prévia do ácido pipérico apenas na dose de 10mg/kg comparado ao controle. O exsudato inflamatório foi coletado para quantificação de citocinas inflamatórias. O composto foi capaz de reduzir significativamente (inibição de 53,97%; $***p < 0,001$) a produção/liberação de IL-1 β e também de TNF- α (Inibição de 22,54%; $*p < 0,05$).

As citocinas TNF- α e IL-1 β estão entre as principais citocinas envolvidas na fase aguda da inflamação e na dor inflamatória. Suas principais ações são ativação das células endoteliais, dos leucócitos e indução de reações sistêmicas de fase aguda. O TNF- α está no topo da cascata inflamatória, e é responsável pela ativação de linfócitos, estimulação da liberação de enzimas proteolíticas pelos macrófagos e produção de outras citocinas inflamatórias. Além dessas, o TNF- α exerce outras ações como: ativar a coagulação, estimular a expressão ou liberação de moléculas de adesão, PGE₂, fator ativador de plaquetas, glicocorticoides e eicosanóides, e influenciar a apoptose celular. (CRUVINEL, 2008). A IL-1 β atua na inflamação sistêmica através da ativação da COX-2, com a formação de PGE₂ no hipotálamo anterior, causando febre. Também leva ao aumento de substância-P (SP), NO (pela ativação da enzima óxido nítrico sintetase) e moléculas de adesão endotelial. Tem importante função no desenvolvimento e na manutenção da dor. (ZHANG, 2007)

Na avaliação da atividade enzimática de COX-1 e COX-2, o ácido pipérico demonstrou ser seletivo para COX-1, pois o índice de seletividade foi < 1 . A COX é responsável pela conversão do AA, em prostaglandinas e tromboxanos, importantes mediadores da inflamação (KIM; GIORGI, 2013). As duas isoformas, COX-1 e COX-2, em termos de estrutura, são quase idênticas, mas apresentam importantes diferenças funcionais e de localização intracelular. Enquanto a COX-1 é dita constitutiva ou fisiológica a COX-2 tem sua expressão altamente induzida em resposta a estímulos pró-inflamatórios. (BERGH E BUDSBERG, 2005; TASAKA, 2011). A síntese das PGs inicia-se com a COX catalisando a adição de oxigênio molecular ao ácido araquidônico, formando-se um produto intermediário, o PGG₂ ou prostaglandina G₂. No outro lado da membrana, a COX cumpre sua função como peroxidase, reduzindo a PGG₂ a PGH₂. Estas PGs primárias têm pouca atividade, mas são substratos para formação das diversas PGs com atividade, como PGD₂, PGE₂, PGF_{2 α} , prostaciclina (PGI₂) e também dos tromboxanos (TXA₂). Esses mediadores são de extrema importância no processo inflamatório e podem mediar cada etapa da inflamação. Na dor e inflamação as PGs participam principalmente na vasodilatação ou vasoconstrição, hiperalgesia, e regulação de atividade quimiotática. A PGE₂ está relacionada a dor inflamatória, através de sua ação em neurônios sensoriais periféricos e em sítios centrais no interior da medula

espinhal e do cérebro, e pode ser convertida pelas duas isoformas de COX (NUGTEREN e HAZELHOF, 1973; ROBBINS, 2013).

A principal classe de anti-inflamatórios, os AINE'S, atua, em sua maioria, através da inibição não seletiva de COX, e a maior parte de seus efeitos benéficos é creditada a inibição da COX-2, e efeitos adversos, como distúrbios gastrointestinais, relacionados a COX-1. (BANSAL *et al*, 2014). Mas essa atribuição não é uma verdade absoluta. Em um estudo em 1995, Langenbach e colaboradores demonstraram que a ausência de COX-1 não causa ulceração gástrica espontânea, sugerindo então que sua inibição não seria a principal causa para distúrbios gastrointestinais. Nesse e em outros estudos, foi visto ainda que, em camundongos geneticamente modificados sem COX-1 ou sem COX-2, a COX-1 tem alguma função no processo da inflamação, e que, por outro lado, existe resposta inflamatória sem haver envolvimento da COX-2. (LANGENBACH, 1995; WALLACE, 1998). Alguns estudos já demonstraram a relação da inflamação crônica com o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular, e viram que injeções de PGE₂ aumentam a progressão tumoral. Em 2006, Lampiasi e colaboradores verificaram que a utilização de um inibidor seletivo para COX-1 (SC-560) foi eficaz em reduzir um carcinoma hepatocelular, sendo observado um aumento significativo de apoptose celular.

Segundo Tracey (2002), a acetilcolina tem um papel de inibição sobre as citocinas pró-inflamatórias, desta forma os inibidores da acetilcolinesterase poderiam acentuar essa ação. Considerando que o ácido pipérico teve sua ação inibida pela atropina, podemos sugerir que o ácido pipérico esteja atuando por essa via inibindo a acetilcolinesterase e reduzindo os níveis de citocinas e como consequência a migração leucocitária e a formação de edema. Além disso, diversos estudos têm demonstrado a redução dessas citocinas pela piperina em modelos com roedores, podendo-se sugerir também que essa ação se deva a porção acil da molécula, composta pelo ácido pipérico (SHRIVASTAVA, 2013).

Os resultados apresentados nesta dissertação mostram um potencial antinociceptivo e anti-inflamatório promissor do ácido pipérico, além disso esses efeitos são desprovidos de toxicidade aguda e subcrônica. De acordo com os resultados obtidos no modelo de toxicidade, o ACP demonstrou ter uma DL50 >300mg/kg (dose 30x superior a maior dose usada nos modelos experimentais *in vivo*), com ausência de alterações comportamentais. Além disso, a análise macroscópica dos órgãos também não apresentou alterações, podendo sugerir o uso seguro do composto. Novos estudos são necessários para esclarecer os mecanismos moleculares envolvidos na ação do composto.

7 CONCLUSÕES

Mediante aos resultados obtidos, pontuamos as seguintes conclusões:

- O ácido pipérico possui atividade antinociceptiva na nocicepção aguda, demonstrado através do modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético.
- O composto demonstrou atividade sobre a dor neurogênica e inflamatória, diminuindo o tempo de lambadura em ambas as fases do modelo da formalina na dose de 10mg/kg e somente na segunda fase com as doses de 1 e 5mg/kg. A atividade antinociceptiva central foi confirmada através do aumento do tempo de latência no modelo de retirada da cauda.
- A atividade antinociceptiva é dose dependente, conforme observado nos modelos de contorção, formalina e retirada da cauda.
- Os receptores muscarínicos estão envolvidos no mecanismo de ação, devido a inibição do efeito do composto com a administração prévia de atropina. Mas esse efeito parece não estar envolvido com as vias opioide, nitrérgica e ao canal de potássio dependente de ATP, visto que os antagonistas dessas vias não foram capazes de inibir o efeito do ácido pipérico no modelo de retirada da cauda.
- O composto demonstrou efeito antinociceptivo na nocicepção induzida por capsaicina, evidenciando um possível envolvimento de receptores TRPV1 no mecanismo do ácido pipérico.
- O composto não demonstrou atividade antinociceptiva significativa, na dose testada, sobre a alodinia induzida por constrição crônica do nervo ciático, no modelo de dor crônica avaliada no von frey. Sendo necessários modelos com doses maiores ou através de outras vias de administração.
- As doses testadas de ácido pipérico não alterou a locomoção dos animais no campo aberto, demonstrando que a atividade antinociceptiva não resulta de um efeito miorrelaxante.
- O edema de pata induzido por carragenina foi reduzido com a administração prévia do ácido pipérico, demonstrando um efeito antiedematogênico para o composto.
- A atividade anti-inflamatória do composto foi confirmada através da capacidade de reduzir a migração leucocitária e reduzir os níveis das citocinas inflamatórias TNF- α e IL-1 β no exsudato inflamatório do modelo da bolsa de ar subcutânea. Essa ação pode estar relacionada com a atuação do sistema colinérgico via receptor muscarínico.
- O ácido pipérico demonstrou atividade inibitória seletiva sobre a isoforma COX-1.
- O ácido pipérico demonstrou ser um composto seguro para os camundongos, haja vista seu DL₅₀>300 mg/kg com a administração de uma única dose, e não mostrou alterações comportamentais, de ganho de peso, na ingestão alimentar e no peso relativo de órgãos, com as administrações aguda e subcrônica por 14 dias seguidos.

- Os dados obtidos no presente estudo, adicionado aos dados da literatura, sugerem que o ácido pipérico contribui para maior parte dos efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios descritos para a piperina.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAM M.B., RAHMAN M.S., HASAN M., KHAN M.M., NAHAR K., SULTANA S. **Anti-nociceptive and antioxidant activities of the Dillenia indica Bark.** Int. J. Pharmacol., 8 (4): 243–251. 2012.

ALBUQUERQUE, REGINALDO; NETTO, AUGUSTO PIMAZONI. **Diabetes ebook – diabetes na prática clínica.** Mod 4 cap 14, Sociedade Brasileira De Diabetes, 2007

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

ASANNO, T.; DOHI, S.; LIDA, H. **Antinociceptive action of epidural K⁺ATP channel openers via interaction with morphine and NA α 2-adrenergic agonist in rats.** Anesthesiology, v. 90, p. 1146-1151, 2000.

ASANO.T.; DOHI S.; IIDA H. **Antinociceptive action of epidural KATP+channel openers via interaction with morphine and α 2-adrenergic agonists in rats.** Anesth. Analg., 90 pp. 1146–1151. 2000

Austin, P. J., Wu, A., Moalem-Taylor, G. **Chronic Constriction of the Sciatic Nerve and Pain Hypersensitivity Testing in Rats.** J. Vis. Exp. (61), e3393, doi:10.3791/3393 (2012).

BACK, S.K., KIMA, M.A., KIMB, H.J., LEE, J., SUNG, B., YOON, Y., NA, H.S. **Developmental characteristics of neuropathic pain induced by peripheral nerve injury of rats during neonatal period.** Neuroscience research. 61: 412-419. 2008.

BANSAL, S; BALA, M; SUTHAR, S.K; CHOUDHARY, S; BHATTACHARYA, S; BHARDWAJ, V; SINGLA, S; JOSEPH, A. **Design and synthesis of novel 2-phenyl-5-(1, 3-diphenyl-1 H-pyrazol-4-yl)-1,3,4-oxadiazoles as selective COX-2inhibitors with potent anti-inflammatory activity.** Eur. J. Med. Chem. 80:167- 174. 2014.

BARON R, BINDER A, WASNER G. **Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment.** Lancet Neurol;9:807–19. 2010.

BARROS, H.M; TANNHAUSER, M.A; TANNHAUSER, S.L; TANNHAUSER, M. **Enhanced detection of hyperactivity after drug withdrawal with a simple modification of the open-field apparatus.** J Pharmacol Methods. 26(4):269-275, 1991

BEN-BASSAT, J; PERETZ, E; SULMAN, F. G. **Analgesimetry and ranking of analgesic drugs by the receptacle method.** Archs. Int. Pharmacodyn. Ther. 122: 434-447. 1959.

BERGH, M.S.; BUDSBERG, S.C. **The Coxib NSAIDs: Potential Clinical and Pharmacologic Importance in Veterinary Medicine.** Journal of Veterinary Internal Medicine, v.19, p. 633–643, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Cuidados paliativos oncológicos: controle da dor.** - Rio de Janeiro: INCA, 2001. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/publicacoes/manual_dor.pdf>. Acesso em: 13/03/2016

BRASIL. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas de dor crônica.** Edição revisada 2012. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/pt_sas_1083_dor_cronica_2012.pdf>. Acesso em 17/06/2015.

BRUNEAU EG, AKAABOUNE M. **Running to stand still: ionotropic receptor dynamics at central and peripheral synapses.** Mol Neurobiol.;34(2):137-51 2006.

BRUNTON, L.L. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica.** 12ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012

BUKHARI IA, PIVAC N, ALHUMAYYD MS, MAHESAR AL, GILANI AH. **The analgesic and anticonvulsant effects of piperine in mice.** J Physiol Pharmacol. Dec;64(6):789-94. 2013.

CATERINA MJ, LEFFLER A, MALMBERG AB, *et al.* **Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor.** Science;288(5464):306-13. 2000.

CHONPATHOMPIKUNLERT P, WATTANATHORN J, MUCHIMAPURA S. **Piperine, the main alkaloid of Thai black pepper, protects against neurodegeneration and cognitive impairment in animal model of cognitive deficit like condition of Alzheimer's disease.** Food and Chemical Toxicology. Elsevier. Volume 48, Issue 3, Pages 798–802. 2010.

CHYAD A H; OMAR S I; AHMMED H; **Study The Analgesic And Anti-Inflammatory Activity Of Zingiber Officinale Rhizome Extract Comparison With Ibuprofen In Male Mice.** Kufa Journal For Veterinary Medical Sciences Vol. (7) No. (1) 2016

CLAPHAM D.E. **TRP channels as cellular sensors** Nature. 4;426(6966):517-24. 2003.

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

COLLIER, H.O.J.; L.C. DINNEEN; C.A. JOHNSON & C. SCHNEIDER. **The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse.** Brit. J. Pharmacol. 32(2): 295-310. 1968.

CRUNKHORN, R.; MEACOCK, S.C.R. **Mediators of the inflammation induced in therat paw by carrageenin.** Br. J. Pharmacol., v.42, p. 392-402, 1971

CRUVINEL, W.M *et al.* **Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória.** Rev. Bras. Reumatol., São Paulo , v. 50, n. 4, p. 434-447, Aug. 2010

CRUVINEL; W. M.; MESQUITA JUNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P. **Aspectos celulares e moleculares da inflamação.** Revista Sinopse, São Paulo, v. 10, n. 3, p. 66-81, ago. 2008.

CUNHA TM, VERRI WA, VIVANCOS GG, MOREIRA IF, REIS S, PARADA CA, CUNHA FQ, FERREIRA SH. **An electronic pressure-meter nociception paw test for mice.** Braz J Med Biol Res 37(3): 401 – 407, 2004.

DICKENSON, A. **Mechanisms of central hypersensitivity: excitatory amino acids mechanisms and their control.** The pharmacology of pain. (ed M. J. D. Besson, A.), pp. 21-41. Springer-Verlag, Berlim, 1997.

DICKENSON, A H. **Spinal cord pharmacology of pain.** British Journal of Anaesthesia, v. 75, n. 2, p. 193-200, 1995.

DUARTE, D.B.; VASKO, M.R.; FEHRENBACHER, J.C. **Models of inflammation: carrageenan air pouch.** Current protocols in pharmacology. v. 56, p. 561-568, 2012.

EL KOUHEN, R., SUROWY, C.S., BIANCHI, B.R, NEELANDS, TR.; MCDONALD HA NIFORATOS, w GOMTSYAN, Ai LEE, C.H., HONORE, P., SULLIVAN, J.P JARVIS, M F., FALTYNEK, C.R. **A 425619[1-soquinolin 5-yl-3(4 trifluoromethyl-benzyl ureal, a novel and selective transient receptor potential type v1 receptor antagonist, blocks channel activation by vanilloids, heat, and acid.** The Journal pharmacology and Experimental Therapeutics, v. 314, n. 1, p. 400-409, 2005.

FEIN, A. **Nociceptores: As células que sentem dor.** Petrov P, Francischi JN, Ferreira SH, *et al.* tradutores. Ribeirão Preto – SP: Dor On Line; 106 p. 2011.. Disponível em: <<http://www.dol.inf.br/nociceptores>>. Acesso em 27/03/2016

FERREIRA SH.. **Oedema and increased vascular permeability.** In: Vane JR, Van Arman CG, editors. Handbook of experimental pharmacology. New York 7 Springer-Verlag; p. 75-91. 1979.

FERREIRA, W. S. **Utilização da piperina como protótipo na síntese de novos antichagásicos da classe das 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilaminas.** Dissertação de Mestrado apresentado ao Instituto de Ciências Exatas- UFRRJ, p. 1- 197, 2006.

FERREIRA, W. S.; FRANKLIM, T. N.; LOPES, N. D.; DE LIMA, M. E. F. **Piperina, seus Análogos e Derivados: Potencial como Antiparasitários.** Rev. Virtual Quim., , 4 (3), 208-224. 2012.

FERREIRA, S. H., DUARTE, I.D., LORENZETTI, B.B. **The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release.** Eur. J. Pharmacol., v. 201, p. 121-129, 1991

FILGUEIRAS, G. C.; SANTOS, M. A. S.; SANTANA, A. C.; HOMMA, A. K. O. **Fontes de crescimento da produção de pimenta-do-reino no Estado do Pará no período de 1979 a 2001.** Disponível em < <http://www.sober.org.br/palestra/12/01O001.pdf>> página 3. Acesso em 21/01/2016.

FISCHER, L.G.; SANTOS, D.; SERAFIN, C.; MALHEIROS, A.; MONACHE, F.D.; MONACHE, G.D.; FILHO, V.C.; SOUZA, M.M. **Further Antinociceptive Properties of Extracts and Phenolic Compounds from *Plinia glomerata* (Myrtaceae) Leaves.** Biol. Pharm. Bull. 31(2) 235—239, 2008.

FISCHER, M., CARLI, G., RABOISSON, P., AND REEH, P. **The interphase of the formalin test.** Pain 155, 511–521. (2014).

FITZGERALD, G.A; RICCIOTTI, E. **Prostaglandins and Inflammation.** Arterioscler Thromb Vasc Biol.; 31(5): 986–1000, 2011.

GALLUZZI KE. **Managing neuropathic pain.** J Am Osteopath Assoc;107:ES39-48. 2007.

G.P. AHERN, **Activation of TRPV1 by the satiety factor oleylethanolamide,** J. Biol. Chem. 278 30429–30434. 2003.

GERNOT KATZER **Pepper (*Piper nigrum* L.).** Disponível em: http://gernot-katzers-spice-pages.com/engl/Pipe_nig.html, 2015. Acesso em 21/01/2016

GREGORY, N.S; HARRIS, A.L; ROBINSON, C.R; DOUGHERTY, P.M, FUCHS, P.N, SLUKA, K.A. **An overview of animal models of pain: disease models and outcome measures.** J Pain.14(11), 2013.

HAAS, P. J.; VAN STRIJP, J. **Anaphylatoxins: their role in bacterial infection and inflammation.** Immunologic Research, v. 37, n. 3, p. 161-75, 2007.

HABERBERGER, R., SCHOLZ, A., KUMMER, W., KRESS, M., **M2-receptor subtype does not mediate muscarine-induced increases in [Ca²⁺]_i in nociceptive neurons of rat dorsal root ganglia.** J. Neurophysiol. 84, 1934–1941. Hagihira, S., Senb. 2000.

HALEY JE, DICKENSON AH, SCHACHTER M. **Electrophysiological evidence for a role of nitric oxide in prolonged chemical nociception in the rat.** *Neuropharmacology.* ;31:251–258. 1992.

HARIZI, H. *et al.* **Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology.** *Trends in molecular medicine*, v. 14, n. 10, p. 461-9, 2008.

HENRIQUES, M.G.; SILVA, P.M.; MARTINS, M.A.; FLORES, C.A.; CUNHA, F.Q.; ASSUREY-FILHO, J.; CORDEIRO, R.S. **Mouse paw edema. A new model for inflammation?** *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.20, n.2, p.243-249, 1987

HÖGLUND, A.U., BAGHDOYAN, H.A.,. **M2-, M3- and M4- but not M1-muscarinic receptor subtypes are present in rat spinal cord.** *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 281, 470–477. 1997.

HUNSKAAR S, HOLE K.. **The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain.** *Pain* 30: 103–14. 1987.

JAIN, M.; PARMAR, H.S. **Evaluation of antioxidative and anti-inflammatory potential of hesperidin and naringin on the rat air pouch model of inflammation.** *Inflammation research.* v.60, p. 483-491, 2011.

JENSEN K, ANDERSEN HO, OLESEN J, LINDBLOM U. **Pressurepain threshold in human temporal region. Evaluation of a new pressure algometer.** *Pain* 25(3): 313 – 323, 1986.

JONES BJ, ROBERTS DJ. **The quantitative measurement of motor inco-ordination in naive mice using an accelerating rotarod.** *J Pharm Pharmacol.* 20(4): 302-304. 1968.

JULIUS D, BASBAUM AI. **Molecular mechanisms of nociception.** *Nature.* ;413:203–210. 2001.

JULIUS, D. **TRP Channels and Pain** *Annu Rev Cell Dev Biol.* v. 29, p. 355-84, 2013.

JUTEL, M. *et al.* **Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology.** *Clinical & Experimental Allergy*, v. 39, n. 12, p. 1786-800, 2009.

KIRTEKAR, K.R.; BASU, B.D. **Indian Medical Plants. 2nd. ed.,** Halit Mohan Basu Publicashions, Allahabad, India: p. 28- 2130, 1994.

KOSTER R, ANDERSON M, DE BEER EJ. **Acetic acid for analgesic screening.** *Federation Proceedings.* v. 18, p. 412. 1959.

KUHR, F. *et al.* **Differential regulation of inducible and endothelial nitric oxide synthase by kinin B1 and B2 receptors.** *Neuropeptides*, v. 44, n. 2, p. 145-54, 2010.

KUMAR, S., SINGHAL, V., ROSHAN, R., SHARMA, A., REMBHOTKAR, G.W., HOSH, B., **Piperine inhibits TNF-alpha induced adhesion of neutrophils to endothelial monolayer through suppression of NF-kappaB and IkappaB kinase activation.** *Eur. J. Pharmacol.* 575, 177–186. 2007.

KUMAR, VINAY *et al.* **Robbins, patologia básica.** Rio de Janeiro : Elsevier,. 928 p. 2013.

KWAK, J.Y.; JUNG, J.Y.; HWANG, S.W.; LEE, W.T. **A capsaicina-receptor antagonista capsazepine, reduces inflammation-induced hyperalgesic responses in the rat: evidence for na endogenous capsaicina-loke substance.** *Neuroscience*. V86, n.2, p. 619-626, 1998

LAMPIASI N1; FODERÀ D; D'ALESSANDRO N; CUSIMANO A; AZZOLINA A; TRIPODO C;; FLORENA AM; MINERVINI MI; NOTARBARTOLO M; MONTALTO G; CERVELLO M. **The selective cyclooxygenase-1 inhibitor SC-560 suppresses cell proliferation and induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells.** *Int J Mol Med*;17(2):245-52. 2006.

LANGENBACH, R; MORHAM, SG; TIANO, HF: **Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration.** *Cell*; 83: 483-492, 1995.

LE BARS, D., GOZARIU, M., CADDEN, S. **Animal models of nociception.** *Pharmacological Reviews*, v. 53, p. 628-651, 2001.

LI P, WILDING TJ, KIM SJ, CALEJESAN AA, HUETTNER JE, ZHUO M. **Kainate-receptor mediated sensory synaptic transmission in mammalian spinal cord.** *Nature*;397(6715):161-4. 1999.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. **The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology.** *Pain*, v. 137, n. 3, p. 473-477, Jul 31 2008.

LOHMANN AB; WELCH SP. **ATP-gated K+ channel openers enhance opioid antinociception: indirect evidence for the release of endogenous opioid peptides.** *Eur J Pharmacol* 385:119–127. 1999.

LOPEZ RODRIGUEZ, ML; VISO, A, ORTEGA-GUTIERREZ, S. VR1 receptor modulators as potential drugs for neuropathic pain. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 3, n. 7, p. 729-748, 2003.

MALEKI N., GARJANI A., NAZEMIYAH H., NILFOUROUSHAN N., EFTEKHAR SADAT A. T., ALLAMEH Z., AND HASANNIA N. **Potent anti-inflammatory activities**

of hydroalcoholic extract from aerial parts of *Stachys inflata* on rats. J. Ethnopharm. 75, 213-218. 2001.

MALLMANN, ANTONIO PAULO - **Aliados poderosos: natureza e ciência.** Disponível em: <http://www.icnews.com.br/2014.05.16/colunistas/opiniaodo-leitor/aliados-poderosos-natureza-e-ciencia/>. Acesso em: 16/11/2014

MAYORAL R; FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ A, BOSCA L, MARTÍN-SANZ P. **Prostaglandin E2 promotes migration and adhesion in hepatocellular carcinoma cells.** Carcinogenesis. 26: 753-761. 2005.

MCCLESKEY EW, GOLD MS. **Ion channels of nociception.** Annu Rev Physiol 1999;61:835-56.

MILLAN MJ. **Descending control of pain.** Prog Neurobiol;66:355 – 474. 2002.

MING-TATT LI, KHALIVULLA SI, AKHTAR MN, LAJIS N, PERIMAL EK, AKIRA A, ALI DI, SULAIMAN MR **Anti-hyperalgesic effect of a benzylidene cyclohexanone analogue on a mouse model of chronic constriction injury-induced neuropathic pain participation of the kappa-opioid receptor and KATP.** Pharmacol Biochem BehavDec;114-115:58-63. 2013.

MONCADA, A., CENDAN, C.M., BAEYENS, J.M, DEL POZO, E. **Effects of serine/threonine protein phosphatase inhibitors on morphine-induced antinociception in the tail flick test in mice.** Eur J Pharmacol; 465: 53–60. 2003.

NEWMANN, D. J.; CRAGG, G. M. **Natural products as sources of new drugs over the last 25 years.** J. Nat. Prod., 70, 461. 2007.

NUGTEREN, D.H; HAZELHOF, E. **Isolation and properties of intermediates in prostaglandin biosynthesis.** Biochim. Biophys. Acta. 326: 448-461. 1973.

OCANA, M; CENDRAN, C.M; COBOS, E.J; ENTRENA, J.M; BAEYENS, J.M. **Potassium channels and pain: present realities and future opportunities.** Eur J Pharmacol; 500: 203–19. 2004.

OGA, SEIZI, *et al.* **Fundamentos de Toxicologia.** 2ª edição – São Paulo: Atheneu Editora, 2003.

OLIVEIRA RRB, GÓIS RMO, SIQUEIRA JS, ALMEIDA JRGS, LIMA JT, NUNES XP, OLIVEIRA VR, SIQUEIRA JS, QUINTANS-JUNIOR LJ. **Antinociceptive effect of the ethanolic extract of *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Sm., Fabaceae, in rodents.** Braz J Pharmacogn 19(3): 672 – 676, 2009..

PARK JJ, LEE J, KIM MA, *et al.* **Induction of total insensitivity to capsaicin and hypersensitivity to garlic extract in human by decreased expression of TRPV1.** Neuroscience Letters 411(2):87-91 · January 2007

PARMAR, V, S; JAIN, S, C; BISHT, K, S; JAIN, R; TANEJA, P; JHA, A; TYAGI, O, M; PRASAD, A, K; WENGEL, J; OLSEN, C, E; BOLL, P, M. **Phytochemistry of the genus Piper.** Phytochemistry, v. 46, n. 4, p.597-673, 1997.

PEDERSEN SF1, OWSIANIK G, NILIUS B. **TRP channels: an overview.** Cell Calcium. ;38(3-4):233-52. 2005.

PINHEIRO B, SILVA A, SOUZA G, FIGUEIREDO J, CUNHA F, LAHLOU S, DA SILVA JK, MAIA JG, SOUSA PJ. **Chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory effects in rodents of the essential oil of Peperomia serpens (Sw.) Loud.** J Ethnopharmacol 188: 479–486, 2011.

PIRES, O. C.; TAQUEMASA, A. V.C.; AKISUE, G.; OLIVEIRA, F.; ARAUJO, C. E. P. **Análise preliminar da toxicidade aguda e dose letal mediana (DL50) comparativa entre os frutos de Pimenta-do-Reino do Brasil (Schinus terebinthifolius Raddi) e Pimenta do Reino (Piper nigrum L.).** Rev. Farmacêutica bonaerense, v. 23 n.2, p.176-82, 51. 2004.

PRADEEP, C.R., KUTTAN, G., **Effect of piperine on the inhibition of nitric oxide (NO) and TNF- α production.** Immunopharmacol. Immunotoxicol. 25, 337–346. 2003.

PRADEEP, C.R., KUTTAN, G., **Piperine is a potent inhibitor of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB), c-Fos, CREB, ATF-2 and proinflammatory cytokine gene expression in B16F-10 melanoma cells.** Int. Immunopharmacol. 4, 1795–1803. 2004.

RAMANA KV, TAMMALI R, REDDY ABM, BHATNAGAR A, SRIVASTAVA SK.. **Aldose Reductase-Regulated Tumor Necrosis Factor- α Production Is Essential for High Glucose-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Growth.** Endocrinology. 148, n. 9, 4371-4384. 2007.

RASTOGI, R.P.; MEHROTA, B.N. **Piperine.** In: **Compendium of Indian Medicinal Plants.** New Delhi: Publication and Information Directorate, Council of Scientific and Industrial Research, India, p. 59, 1991.

REIS, G M L, AND I D G DUARTE. **Baclofen, an Agonist at Peripheral GABA_BReceptors, Induces Antinociception via Activation of TEA-Sensitive Potassium Channels.** British Journal of Pharmacology 149.6: 733–739. 2006

ROBBINS & COTRAN. **Patologia: Bases patológicas das doenças.** 8ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 1458 p.

ROBLES, L.I., BARRIOS, M., DEL POZO E., DORDAL, A., BAEYENS, J.M. **Effects of KC channel blockers and openers on antinociception induced by agonists of 5-HT1A receptors.** Eur J Pharmacol. 295:181–8. 1996.

ROCHA E SILVA, M. O. **Brief history of inflammation.** Handbook of Experimental Pharmacology (eds J. R. Vane & S. H. Ferreira), pp. 6-25. Springer-Verlag, New York, 1978.

SAKURADA, T., WAKO, K., SUGIYAMA, A., SAKURADA, C., TAN-NO, K., KISARA, K., **Involvement of spinal NMDA receptors in capsaicin-induced nociception.** Pharmacol. Biochem. Behav. 59, 339–345. 1998.

SBED - Sociedade Brasileira de estudo da Dor. GARCIA, JOÃO BATISTA SANTOS. **Dor Neuropática - Fascículo 2.** 2010. Disponível em <http://www.sbed.org.br/sites/arquivos/downloads/fasc_dor_neuropatica.pdf> Acesso em 12/02/2016.

SCHESTATSKY, PEDRO. **Definição, diagnóstico e tratamento da dor neuropática.** Rev. HCPA & Fac. Med. Univ. Fed. Rio Gd. do Sul;28(3):177-187, 2008

SEITZER Z, DUBNER R, SHIR YA. **A novel behavioral model of neurophatic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury.** Pain. 43: 205-210. 1990.

SHRIVASTAVA P, VAIBHAV K, TABASSUM R, KHAN A, ISHRAT T, KHAN MM, AHMAD A, ISLAM F, SAFHI MM, ISLAM F. **Anti-apoptotic and anti-inflammatory effect of Piperine on 6-OHDA induced Parkinson's rat model.** Nutr Biochem. 24(4):680-7. 2013.

SILVA, C. S.; SARAIVA, S. R. G. L.; JÚNIOR, R. G. O; ALMEIDA, J. R. G. S.; **Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão.** Rev. Bras. Farm. 94 (1): 18-23, 2013

SINGH, Y.N. **Kava an overview.** J. Ethanopharmacol., v. 37, p. 18-45,1992.

SOJA, P. J.; TAEPALARAPRUK, N.; PANG, W.; CAIRNS, B. E.; MCERLANE, S. A.; FRAGOSO, M. C. **Transmission through the dorsal spinocerebellar and spinoreticular tracts: wakefulness versus thiopental anesthesia.** Anesthesiology, v. 97, n. 5, p. 1178-88, 2002.

SRINIVASAN, K. CRITIC. **Black Pepper and its Pungent Principle-Piperine: A Review of Diverse Physiological Effects.** Rev. Food Sci., 47, 735. 2007.

STEPHEN D. ROPER **TRPs in Taste and Chemesthesis** Handb Exp Pharmacol.; 23: 827–871. 2014.

SZALLASI A, CORTRIGHT DN, BLUM CA, EID SR. **The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept.** Nat Rev Drug Discov. ;6(5):357-72. 2007.

TASAKA, A.C. **Anti-inflamatórios Não Esteroidais.** In: SPINOSA, H.S. et al. Farmacologia Veterinária, 5. ed. São Paulo: Guanabara Koogan,. cap. 21, p. 245-259. 2011.

THEOHARIDES, T.C; ALYSANDRATOS, K.D; ANGELIDOU, A; DELIVANIS, D.A; SISMANOPOULOS, N; ZHANG, B; ASADI, S; VASIADI, M; WENG, Z; MINIATI, A; KALOGEROMITROS, D. **Mast cells and inflammation.** Biochimica et Biophysica Acta 1822, 21–33, 2012.

TOLEDO, ITALO CORDEIRO - **Síndrome da ardência bucal (SAB): avaliação de alterações nervosas periféricas em língua.** Universidade Federal De Goiás - Programa de pós-graduação em odontologia. Dissertação de mestrado, 71f. 2014.

TONUSSI CR, FERREIRA SH. **Rat knee-joint carrageenin incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics.** Pain; 48: 421-427. 1992.

TRACEY KJ. **The inflammatory reflex.** Nature;.420(19/26):853-859. 2002.

VIGIL SVG, DE LIZ R, MEDEIROS YS, FRÖDETS. **Efficacy of tacrolimus in inhibiting inflammation caused by carrageenan in a murine model of air pouch.** Transpl Immunol; 19:25-29. 2008.

WALKER, K.M.; URBAN, L; MEDHURST, S.J; PATEL, S; PANESAR, M.; FOX, A.J.; MCINTYRE, P. **The VR1 antagonist capsazepine reverses mechanical hyperalgesia in models of inflammatory and neuropathic pain.** J. Pharmacol. Exp. Therap., v. 304, n 1, p. 56-62, 2003

WALLACE, JL; BAK, A; MCKNIGHT, W; ASFAHA, S; SHARKEY, KA; MACNAUGHTON, WK. **Cyclooxygenase 1 contributes to inflammatory responses in rats and mice: implications for gastrointestinal toxicity.** Gastroenterology; 115:101-109, 1998

WESS, J.; DUTTARROY, A.; GOMEZA, J.; ZHANG, W.; YAMADA, M.; FELDER, C.C.; BERNARDINI, N.; REEH, P.W. **Muscarinic receptor subtypes mediating central and peripheral antinociception studied with muscarinic receptor knockout mice: a review.** Life Sci. 72: 2047-2054, 2003.

WILLIAMS AC, CRAIG KD. **Updating the definition of pain.**Pain. 2016 May 18. [Epub ahead of print]

WOOLF CJ, MA Q. **Nociceptors--noxious stimulus detectors.** Neuron;55(3):353- 64. 2007.

WOOLF CJ, MANNION RJ. **Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management.** Lancet;353:1959–64. 1999.

WOOLF CJ. **What is this thing called pain?** J Clin Invest.; 120(11): 3742-4. 2010.

YUNG, K.K.L., LO, Y.L.,. **Immunocytochemical localization of muscarinic m2 receptor in the rat spinal cord.** Neurosci. Lett. 229, 81–84. 1997.

ZHANG JM; AN J. **Cytokines, inflammation, and pain.** Int Anesthesiol Clin ;45:27-37. 2007.

ZULAZMI NA; GOPALSAMY B; FAROUK AA; SULAIMAN MR; BHARATHAM BH; PERIMAL EK. **Antiallodynic and antihyperalgesic effects of zerumbone on a mouse model of chronic constriction injury-induced neuropathic pain.** Fitoterapia;105:215-21. 2015