

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO
TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS
UFPB/UFRN/UFC/UFRPE

ALINE KELY FELÍCIO DE SOUSA SANTOS

AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E
MECANISMO DE AÇÃO DECORRENTE DA ADMINISTRAÇÃO DE 3,4,5-
TRIMETOXICINAMATO DE METILA (M-TMCA) E 3,4,5-
TRIMETOXICINAMATO DE BUTILA (B-TMCA) EM CAMUNDONGOS

JOÃO PESSOA - PB

2021

ALINE KELY FELÍCIO DE SOUSA SANTOS

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E
MECANISMO DE AÇÃO DECORRENTE DA ADMINISTRAÇÃO DE 3,4,5-
TRIMETOXICINAMATO DE METILA (M-TMCA) E 3,4,5-
TRIMETOXICINAMATO DE BUTILA (B-TMCA) EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba para a obtenção do título de DOUTORA EM DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS - Área de concentração: PSICOFARMACOLOGIA

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida

Co-Orientador: Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa

JOÃO PESSOA - PB

2021

**Catálogo na publicação Seção de
Catálogo e Classificação**

S237a Santos, Aline Kely Felício de Sousa.

Avaliação comparativa da atividade antinociceptiva e mecanismo de ação decorrente da administração de 3,4,5-trimetoxicinamato de metila (M-TMCA) e 3,4,5-trimetoxicinamato de butila (B-TMCA) em camundongos / Aline Kely Felício de Sousa Santos. - João Pessoa, 2021.

76 f. : il.

Orientação: Reinaldo Nóbrega de Almeida.

Coorientação: Damião Pergentino de Sousa.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Farmacologia. 2. Produtos naturais. 3. Atividade antinociceptiva. 4. 3,4,5-trimetoxicinamato de metila. 5. 3,4,5-trimetoxicinamato de butila. I. Almeida, Reinaldo Nóbrega de. II. Sousa, Damião Pergentino de. III. Título.

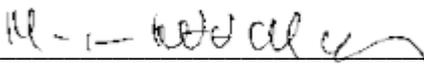
ALINE KELY FELÍCIO DE SOUSA SANTOS

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E
MECANISMO DE AÇÃO DECORRENTE DA ADMINISTRAÇÃO DE 3,4,5-
TRIMETOXICINAMATO DE METILA (M-TMCA) E 3,4,5-
TRIMETOXICINAMATO DE BUTILA (B-TMCA) EM CAMUNDONGOS**

BANCA EXAMINADORA:



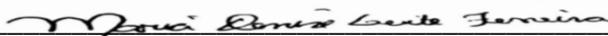
Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida
Orientador - UFPB



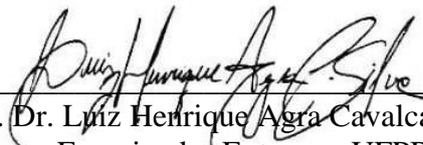
Profª Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz
Examinador Interno - UFPB



Prof. Dr. João Euclides Fernandes Braga
Examinador Interno - UFPB



Profª Dra. Maria Denise Leite Ferreira
Examinador Externo - UFPB



Prof. Dr. Luiz Henrique Agra Cavalcante Silva
Examinador Externo - UFPB

JOÃO PESSOA - PB

2021

*Aos meus pais **Hailton e Lindalva**,
aos meus irmãos **Adailton e Aldair**, a
minha cunhada **Mirian** e aos meus
queridos e amados sobrinhos **Kaio e
Kamily**, vocês são a minha vida.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, dono de toda a ciência e sabedoria, por se fazer presente em minha vida e não me deixar esmorecer, mas sim, suportar todos os momentos difíceis no decorrer desta caminhada.

Aos meus pais, **Hailton** e **Lindalva**, aos meus irmãos, **Adailton** e **Aldair**, à minha cunhada, **Mirian**, e aos meus sobrinhos, **Kaio** e **Kamily**, por nunca terem me deixado faltar nada, principalmente amor, e por ficarem felizes com as minhas conquistas.

Ao meu mestre, **Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida**, por todos os ensinamentos repassados nesses quase dez anos de convivência e por ser, a todo momento, um exemplo de integridade e caráter.

Ao **Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa**, por todos os ensinamentos e também pela parceria instaurada no decorrer desta pós-graduação como co-orientador.

Ao **Prof. Dr. Marcus Tullius Scotti** e sua aluna **Mayara dos Santos Maia**, pela contribuição com os testes *in silico*.

Aos **professores** desta Pós-graduação pelos ensinamentos repassados ao longo deste curso, em especial à **Profª Dra. Maria de Fátima Vanderley de Souza** por todo apoio.

Aos componentes da banca examinadora, **Profª Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz**, **Prof. Dr. João Euclides Fernandes Braga**, **Profª Dra. Maria Denise Leite Ferreira**, **Prof. Dr. Luiz Henrique Agra Cavalcante Silva**, **Profª Dra. Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori** e **Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho**, pela disponibilidade e por todas as contribuições a fim de enriquecer este trabalho.

Aos queridos colegas do **Laboratório de Psicofarmacologia**, por todo auxílio no decorrer dos experimentos e pela amizade construída, em especial à **Álefe**, **Humberto Hugo**, **Ana Paula**, **Poliane** e **Thallita**.

Aos meus amigos **Bruna Laísa**, **Ana Karine**, **Ovídio**, **Hyago**, **Anaís**, **Clebinho**, **Luara**, **Sara**, **Nayr** e **Fran** por todo o incentivo.

Em especial aos meus amigos/irmãos **Richard**, **Lucas**, **Fábio**, por estarem diariamente comigo compartilhando as alegrias e tristezas, por me incentivarem e me ajudarem a reerguer a cabeça a cada novo dia.

A **José Crispim** e **Seu Josué**, pela disponibilidade e apoio técnico imprescindível na execução deste trabalho.

À secretária desta Pós-graduação **Adriana Tiyoko Ura**, pelos serviços prestados.

À **Unidade de Produção Animal** pelo fornecimento dos animais.

A **todos** que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

*Confie no **Senhor** de todos o coração e não se apoie na sua própria inteligência. Lembre de **Deus** em tudo o que fizer, e **Ele** lhe mostrará o caminho certo.*

Provérbios 3:5-6

SANTOS, A. K. F. S. **Avaliação comparativa da atividade antinociceptiva e mecanismo de ação decorrente da administração de 3,4,5-trimetoxicinamato de metila (M-TMCA) e 3,4,5-trimetoxicinamato de butila (B-TMCA) em camundongos.** 2021. 77. Tese (Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos) - UFPB/CCS/João Pessoa - PB.

RESUMO

Os produtos naturais tem sido foco de grandes estudos farmacológicos nas últimas décadas. Os fenilpropanoides, abundantes nas plantas aromáticas vem ganhado destaque por suas diversas atividades farmacológicas, com destaque para os derivados do ácido cinâmico. O ácido 3,4,5-trimetóxi-cinâmico (TMCA), um derivado cinâmico com propriedades farmacológicas bem definidas na literatura, como sedativas, anticonvulsivantes e imunomoduladoras. 3,4,5-trimetoxicinamato de metila (M-TMCA) e 3,4,5-trimetoxicinamato de butila (B-TMCA) são dois análogos do TMCA. Diante da escassez de pesquisas sobre a atividade farmacológica desses dois análogos, surgiu o interesse em pesquisar a atividade antinociceptiva que incentivou à realização deste trabalho. Sendo assim, o objetivo do presente foi avaliar os efeitos centrais decorrentes da administração intraperitoneal de M-TMCA e B-TMCA em modelos de nocicepção utilizando camundongo machos (*Mus musculus* – Swiss), bem como propor o mecanismo pelo qual eles atuam como drogas antinociceptivas utilizando estudos *in vivo* e *in silico*. Os experimentos iniciaram, a partir da determinação da DL₅₀, na qual esta foi estimada em 500 mg/kg. Em seguida, a triagem farmacológica foi realizada, na qual foi observado um perfil depressor para ambas as drogas testadas, devido a ambulacção diminuída, analgesia, reflexo do endireitamento e resposta ao toque diminuídos apresentados pelos animais tratados. O pré-tratamento com M-TMCA e B-TMCA, nas doses de 50, 75 e 100 mg/kg, não alterou a coordenação motora no teste de rota-rod, excluindo um efeito miorelaxantes. Em seguida foram utilizadas metodologia para determinar a atividade antinociceptiva do M-TMCA e B-TMCA. No teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, M-TMCA e B-TMCA reduziram o número de contorções, quando comparados ao grupo controle, contudo quando as doses foram comparadas entre si, o B-TMCA na dose de 75 mg/kg foi mais efetivo. O teste da formalina foi realizado, utilizando as mesmas doses, e foi observado que apenas o B-TMCA conseguiu reduzir o tempo de lambida na fase neurogênica (0-5 min) do teste, contudo, ambas as substâncias foram efetivas na fase inflamatória (15-30 min). Sendo assim, o B-TMCA, na dose de 75 mg/kg foi escolhido para dar prosseguimento aos estudos. Na tentativa de propor os possíveis mecanismos de ação pelo qual o B-TMCA exerce sua atividade antinociceptiva foram realizadas análises *in silico*, feitas através do *docking consenso* e simulações de dinâmica molecular, que demonstraram que o B-TMCA atua através de interações com a enzima COX-2 e receptores A₁ e NMDA. Na tentativa de comprovar se o B-TMCA atua sobre o receptor adenosinérgico, administrou-se a cafeína (antagonista não seletivo) na dose de 10 mg/kg i.p., 15 minutos antes da administração de B-TMCA, e deu-se prosseguimento ao teste da formalina. A cafeína foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo do B-TMCA, indicando um possível envolvimento na modulação da transmissão nociceptiva através do sistema adenosinérgico. O sistema glutamatérgico também foi estudado através da administração de MK-801 (0,15 mg/kg i.p.), antagonista não-competitivo dos receptores NMDA, seguindo o protocolo do teste do glutamato, no qual após a administração de 20 µL de uma solução de glutamato (30 µmol/pata) via intraplantar o tempo foi contabilizado por 15 minutos. O B-TMCA foi capaz de reduzir o tempo de lambida da pata bem como o MK-801, sugerindo assim uma possível interação com o sistema glutamatérgico na redução da nocicepção.

Palavras-chaves: 3,4,5-trimetoxicinamato de metila, 3,4,5-trimetoxicinamato de butila, fenilpropanoides, atividade antinociceptiva, mecanismo de ação, *docking*.

SANTOS, A. K. F. S. **Comparative evaluation of the antinociceptive activity and mechanism of action resulting from the administration of methyl 3,4,5-trimethoxycinnamate (M-TMCA) and butyl 3,4,5-trimethoxycinnamate (B-TMCA) in mice.** 2021. 77. Tese (Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos) - UFPB/CCS/João Pessoa - PB.

ABSTRACT

Natural products have been the focus of large pharmacological studies in recent decades. Phenylpropanoids, abundant in aromatic plants, have gained prominence for their various pharmacological activities, with emphasis on derivatives of cinnamic acid. 3,4,5-Trimethoxycinnamic acid (TMCA), a cinnamic derivative with well-defined pharmacological properties in the literature, such as sedatives, anticonvulsants and immunomodulators. Methyl 3,4,5-trimethoxycinnamate (M-TMCA) and butyl 3,4,5-trimethoxycinnamate (B-TMCA) are two TMCA analogues. Given the scarcity of research on the pharmacological activity of these two analogues, interest in researching the antinociceptive activity that encouraged this work arose. Therefore, the aim of the present was to evaluate the central effects resulting from the intraperitoneal administration of M-TMCA and B-TMCA in nociception models using male mice (*Mus musculus* – Swiss), as well as to propose the mechanism by which they act as antinociceptive drugs using *in vivo* and *in silico* studies. The experiments started with the determination of the LD50, in which it was estimated at 500 mg/kg. Then, pharmacological screening was performed, in which a depressive profile was observed for both drugs tested, due to decreased ambulation, analgesia, decreased righting reflex and decreased response to touch presented by the treated animals. Pre-treatment with M-TMCA and B-TMCA, at doses of 50, 75 and 100 mg/kg, did not change motor coordination in the rota-rod test, excluding a myorelaxant effect. Then, methodology was used to determine the antinociceptive activity of M-TMCA and B-TMCA. In the test of abdominal writhing induced by acetic acid, M-TMCA and B-TMCA reduced the number of writhes when compared to the control group, however when the doses were compared to each other, the B-TMCA at a dose of 75 mg/kg was more effective. The formalin test was performed, using the same doses, and it was observed that only B-TMCA was able to reduce the licking time in the neurogenic phase (0-5 min) of the test, however, both substances were effective in the inflammatory phase (15-30 min). Thus, B-TMCA, at a dose of 75 mg/kg was chosen to continue the studies. In an attempt to propose the possible mechanisms of action by which B-TMCA exerts its antinociceptive activity, *in silico* analyzes were carried out through *consensus docking* and molecular dynamics simulations, which demonstrated that B-TMCA acts through interactions with the enzyme COX-2 and A₁ and NMDA receptors. In an attempt to prove whether B-TMCA acts on the adenosinergic receptor, caffeine (non-selective antagonist) was administered at a dose of 10 mg/kg i.p., 15 minutes before administration of B-TMCA, and the formalin test. Caffeine was able to reverse the antinociceptive effect of B-TMCA, indicating a possible involvement in the modulation of nociceptive transmission through the adenosinergic system. The glutamatergic system was also studied through the administration of MK-801 (0.15 mg/kg i.p.), a non-competitive antagonist of NMDA receptors, following the protocol of the glutamate test, in which after the administration of 20 µL of a solution of glutamate (30 µmol/paw) via intraplantar time was counted for 15 minutes. B-TMCA was able to reduce paw licking time as well as MK-801, thus suggesting a possible interaction with the glutamatergic system in reducing nociception.

Keywords: Methyl 3,4,5-trimethoxycinnamate, butyl 3,4,5-trimethoxycinnamate, phenylpropanoids, antinociceptive activity, mechanism of action, *docking*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Componentes fundamentais da via da dor nociceptiva.....	23
Figura 2 - Nociceptor aferente primário ou neurônio pseudounipolar.....	24
Figura 3 - Representação da medula espinhal cervical mostrando fibra A α e A β à direita e fibras A δ e C à esquerda.....	24
Figura 4 - A dor rápida e a dor lenta são realizadas por duas diferentes fibras aferentes primárias.....	25
Figura 5 - 3,4,5-trimetoxicinamato de metila (A) e 3,4,5-trimetoxicinamato de butila (B).....	33
Figura 6 - Efeito do 3,4,5-trimetoxicinamato de metila (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.) e diazepam (4 mg/kg, i.p.) no teste de rota-rod.....	43
Figura 7 - Efeito do 3,4,5-trimetoxicinamato de butila (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.) e diazepam (4 mg/kg, i.p.) no teste de rota-rod.....	43
Figura 8 - Efeito do 3,4,5-trimetoxicinamato de metila (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.), 3,4,5-trimetoxicinamato de butila (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.) e morfina (10 mg/kg, i.p.) no teste do ácido acético.....	44
Figura 9 - O efeito do 3,4,5-trimetoxicinamato de metila (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.), 3,4,5-trimetoxicinamato de butila (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.) e morfina (10 mg/kg, i.p.) na primeira fase do teste da formalina.....	45
Figura 10 - O efeito do 3,4,5-trimetoxicinamato de metila (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.), 3,4,5-trimetoxicinamato de butila (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.) e morfina (10 mg/kg, i.p.) na segunda fase do teste da formalina.....	45
Figura 11 - Visualização das interações 2D e 3D entre os ligantes (B-TMCA e 8K8) e o alvo A ₁ . A – Complexo A ₁ -ligantes. B e C – Interações 3D e 2D entre o ligante B-TMCA e aminoácidos do A ₁ . D e E – Interações 3D e 2D entre o ligante ADN e aminoácidos do A ₁ . Em verde, estão representadas as interações de hidrogênios e em rosa, as interações hidrofóbicas..	50
Figura 12 - Visualização das interações 2D e 3D entre os ligantes (B-TMCA e ID8) e o alvo COX-2. A – Complexo COX-2-ligantes. B e C – Interações 3D e 2D entre o ligante B-TMCA e aminoácidos do COX-2. D e E – Interações 3D e 2D entre o ligante ID8 e aminoácidos do COX-2. Em verde, estão representadas as interações de hidrogênios e em rosa, as interações hidrofóbicas.....	51

Figura 13 - Simulações de dinâmica molecular durante 1000ps. A – Estrutura do complexo COX-2-B-TMCA e seu sítio ativo, B – estrutura inicial, C – 200ps, D – 400ps, E – 600ps e F – 800ps e G – 1000ps.....	56
Figura 14 - O efeito do 3,4,5-trimetoxicinamato de butila (75 mg/kg, i.p.) e cafeína (10 mg/kg, s.c.) na primeira fase do teste da formalina.....	59
Figura 15 - O efeito do 3,4,5-trimetoxicinamato de butila (75 mg/kg, i.p.) e cafeína (10 mg/kg, s.c.) na segunda fase do teste da formalina.....	60
Figura 16 - O efeito do 3,4,5-trimetoxicinamato de butila (75 mg/kg, i.p.) e MK-801 (0,15 mg/kg, i.p.) no teste do glutamato.....	60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Enzimas complexadas aos seus respectivos ligantes (azul e vermelho), sobreposições da melhor pose no redocking (azul) e ligante cristalográfico (verde) e valores de RMSD.....	46
--	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - RMSD dos átomos de C α das proteínas. A - COX-2 complexado aos compostos B-TMCA e inibidor. B – A ₁ complexado aos compostos B-TMCA e o antagonista. C – NMDA complexado aos compostos B-TMCA e agonista.....	52
Gráfico 2 - RMSD dos átomos de C α dos ligantes. A - COX-2 complexado aos compostos B-TMCA e inibidor. B – A ₁ complexado aos compostos B-TMCA e o antagonista. C – NMDA complexado aos compostos B-TMCA e agonista.....	54
Gráfico 3 - RMSF dos átomos de C α dos aminoácidos de cada proteína analisada. A - COX-2 complexado aos compostos B-TMCA e inibidor. B – A ₁ complexado aos compostos B-TMCA e o antagonista. C – NMDA complexado aos compostos B-TMCA e agonista.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Informações das enzimas selecionadas depositadas no banco de dados PDB e utilizadas para o <i>docking</i>	37
Tabela 2 - Resultados dos valores de energia de ligação calculados no MVD. Em negrito, estão destacados os valores de energia superior ao ligante PDB.....	48
Tabela 3 - Resultados dos valores de energia de ligação em cinco diferentes funções de pontuação. Em negrito, estão destacados os valores energia superior ao ligante PDB.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	- Por cento
±	- Mais ou menos
+	- Mais
>	- Maior
<	- Menor
Å	- Angstrom
°C	- Graus Celsius
5HT _{2B}	- Receptor de serotonina 2B
α	- Alfa
β	- Beta
δ	- Delta
δOR	- Receptor opioide delta
κOR	- Receptor opioide kappa
μ	- Mu
μmol	- Milimol
μL	- Microlitro
μOR	- Receptor opioide mu
A ₁ /A _{2A} /A _{2B} /A ₃	- Receptores de adenosina
AINES	- Anti-inflamatórios não esteroidais
AMPA	- α-amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol propiônico
AMPc	- 3'5'-adenosina-monofosfato-cíclico
ANOVA	- Análise de variância
atm	- Atmosférico
ATP	- Trifosfato de adenosina
B-TMCA	- 3,4,5-trimetoxicinamato de butila
Ca ²⁺	- Íon cálcio
CCS	- Centro de Ciências da Saúde
CEUA	- Comissão de Ética no Uso de Animais
CGRP	- Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
Cl ⁻	- Íon cloreto
COVID-19	- Doença do coronavírus 2019
COX	- Ciclooxygenase
COX-2	- Ciclooxygenase 2
CEUA	- Comissão de Ética no Uso de Animais
D ₂	- Receptor de dopamina
DL ₅₀	- Dose letal mediana
E.P.M.	- Erro padrão da média
<i>et al</i>	- E colaboradores
E.U.A.	- Estados Unidos da América
g	- Grama
GABA	- Ácido gama-aminobutírico
H1N1	- <u>Influenzavirus A</u>
i.p.	- Intraperitoneal
IASP -	- International Association for the Study of Pain
IPeFarM	- Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
kcal	- Quilocalorias
kg	- Quilograma

m	- Metro
mg	- Miligrama
MK-801	- Antagonista não-competitivo do receptor NMDA
min.	- Minuto
mL	- Mililitro
mol	- Mol
M-TMCA	- 3,4,5-trimetoxicinamato de metila
n°	- Número
n	- Número de animais
Na ⁺	- Íon sódio
NK-1	- Receptor de neurocinina tipo 1
NMDA	- N-metil-D-aspartato
OECD	- Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico
<i>p</i>	- Grau de significância
p	- Para
pH	- Potencial hidrogeniônico
Prof.	- Professor
RMSD	- Desvio médio da raiz quadrada
RMSF	- Flutuação média quadrática
s	- Segundo
s.c.	- Subcutâneo
SNA	- Sistema nervoso autônomo
SNC	- Sistema nervoso central
Tween 80	- Polioxetileno Sorbitano Monoleato
UFC	- Universidade Federal do Ceará
UFPB	- Universidade Federal da Paraíba
UFRN	- Universidade Federal do Rio Grande do Norte
UFRPE	- Universidade Federal Rural de Pernambuco
UPA	- Unidade de Produção Animal

SUMÁRIO

1. Introdução.....	17
2. Fundamentação Teórica	20
2.1. Dor - Considerações gerais.....	20
2.2. Classificação da dor	21
2.3. Vias de transmissão e modulação da nocicepção	22
2.4. Atividades farmacológicas dos fenilpropanoides	26
2.5. M-TMCA e B-TMCA	27
2.6. Sistema adenosinérgico e antinocicepção.....	28
2.7. Sistema glutamatérgico e antinocicepção	28
2.8. Tratamento farmacológico da dor	29
3. Objetivos	31
3.1. Objetivo geral	31
3.2. Objetivos específicos	31
4. Material.....	32
4.1. Animais	32
4.2. Local de pesquisa e condições experimentais	32
4.3. Substâncias utilizadas	33
4.4. Preparação da amostra do M-TMCA e B-TMCA	33
5. Métodos	34
5.1. Ensaio farmacológicos utilizados	34
5.1.1. Estudos da toxicidade aguda para determinação da DL_{50}	34
5.1.2. Efeitos do M-TMCA e B-TMCA na triagem farmacológica	34
5.1.3. Teste do da barra giratória	34
5.1.4. Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético	35
5.1.5. Teste da formalina.....	35
5.2. Docking consenso.....	36
5.2.1. Molegro Virtual Docker 6.0 (MVD)	38
5.2.2. Gold 5.6.2	38
5.2.3. AutoDock Vina (Vina)	39
5.2.4. AutoDock 4.2.6. (AD4).....	39
5.2.5. Plants	39
5.3. Simulações de dinâmica molecular.....	40
5.4. Investigação do mecanismo de ação da propriedade antinociceptiva do B-TMCA	40
5.4.1. Estudo do envolvimento do sistema adenosinérgico	41

5.4.2. <i>Estudo do envolvimento do sistema glutamatérgico</i>	41
5.5. <i>Análise estatística</i>	41
6. <i>Resultados</i>	42
6.1. <i>Toxicidade aguda e avaliação geral do M-TMCA e B-TMCA no sistema nervoso central</i>	42
6.1.1. <i>Toxicidade aguda e triagem farmacológica</i>	42
6.1.2. <i>Avaliação do efeito miorrelaxante do M-TMCA e B-TMCA</i>	42
6.2. <i>Estudo da atividade antinociceptiva do M-TMCA e B-TMCA</i>	43
6.2.1. <i>Efeito do M-TMCA e B-TMCA no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético</i>	43
6.2.2. <i>Efeito do M-TMCA e B-TMCA no teste da nocicepção induzida pela formalina</i>	44
6.3. <i>Docking consenso</i>	46
6.4. <i>Simulações de dinâmica molecular</i>	52
6.5. <i>Investigação do mecanismo de ação da propriedade antinociceptiva do B-TMCA</i>	59
6.5.1. <i>Envolvimento do sistema adenosinérgico na atividade antinociceptiva do B-TMCA</i>	59
6.5.2. <i>Envolvimento do sistema glutamatérgico na atividade antinociceptiva do B-TMCA</i>	60
7. <i>Discussão</i>	61
8. <i>Conclusão</i>	66
REFERÊNCIAS	67

1. Introdução

A dor e as tentativas de aliviá-la sempre fizeram parte da experiência humana. Apesar dos avanços tecnológicos, as teorias biológicas não conseguiram explicar as diferenças individuais no comportamento da dor, descrevendo-a como uma experiência idiossincrática que não pode ser compartilhada (VLAEYEN; CROMBEZ, 2020).

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) define a dor como uma experiência sensitiva e emocional desagradável, associada, ou semelhante àquela associada, a uma lesão tecidual real ou potencial (RAJA *et al.*, 2020). Normalmente a dor afeta a qualidade de vida dos indivíduos, interrompendo suas atividades diárias o que pode gerar desconforto para os mesmos e para a família. Contudo, a dor faz parte de um sistema motivacional impulsionador que alarma e direciona o comportamento para defender a integridade do corpo quando o organismo se encontra em perigo (VLAEYEN; CROMBEZ, 2020).

A palavra dor significa doença e sofrimento; já no campo científico, a dor tem o sentido mais amplo e ocorre a partir da ativação de nociceptores, bem como do envolvimento das vias de condução, terminando no córtex cerebral. Está bem estabelecido que dor é uma definição complexa e que envolve tanto processos cognitivos e emocionais pelo encéfalo, como também a transdução de estímulos nocivos ao organismo. Portanto tem-se dois componentes no processo doloroso: o sensorial e o motivacional (CHAPMAN; GAVRIN, 1999; JULIUS; BASBAUM, 2001; ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUKIF, 2004).

O termo nocicepção é definido como um processo neural de codificação de estímulos que danificam ou ameaçam danificar o tecido (MERSKEY; BOGDUK, 1994). Os estímulos nociceptivos podem estabelecer uma resposta autonômica como parte de uma resposta defensiva coordenada, independente da experiência de dor consciente (MISCHKOWSKI *et al.*, 2018). Isso se deve porque as vias nociceptivas se cruzam funcionalmente com o sistema nervoso autônomo em vários níveis espinhais e subcorticais (BENARROCH, 2001). Portanto, drogas que são capazes de bloquear tais vias vêm sendo tratadas como importantes ferramentas no tratamento da dor (MEOTTI *et al.*, 2007).

Embora a estimulação nociceptiva geralmente leve à dor, pesquisas farmacológicas e de lesões cerebrais mostram que uma pode existir sem a outra (KLIT; FINNERUP; JENSEN, 2009; LEE; NECKA; ATLAS, 2020; OLESEN *et al.*, 2012).

Grande parte da população que faz uso de terapias medicamentosas não obtêm respostas positivas aos tratamentos existentes no mercado, devido às reações adversas a medicamentos que contribuem para a descontinuação do tratamento. Dessa forma, se faz necessário a pesquisa

constante por novos medicamentos ou procedimentos que diminuam ou cessem os estímulos dolorosos além de serem mais eficazes e seguros.

Apesar dos avanços tecnológicos, o tratamento analgésico adequado ainda é um desafio terapêutico para a redução da dor (BISTA; IMLACH, 2019; MACIEL *et al.*, 2019; THOMPSON-BRAZILL, 2019). No decorrer dos anos, apesar da disponibilidade de muitos analgésicos, os produtos naturais têm sido essenciais para o desenvolvimento de nova drogas com um alto potencial terapêutico utilizados na medicina (QUIÑONEZ-BASTIDAS; ANDRÉS, 2021).

A prática de utilizar produtos de origem vegetal como fonte de compostos químicos biologicamente ativos é conhecida desde a antiguidade (AZAB; NASSAR; AZAB, 2016). Os terpenos e fenilpropanoides são as duas principais classes presentes nos óleos essenciais obtidos das plantas aromáticas, com maior número de estudos das suas atividades biológicas (DA SILVA CALIXTO *et al.*, 2021; MONTEIRO *et al.*, 2021). O ácido cinâmico é um dos fenilpropanoides comumente encontrado em muitas espécies vegetais, bem como os seus derivados hidroxil e metoxil, como o ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido *p*-metoxicinâmico e ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico (RYCHLICKA; ROT; GLISZCZYŃSKA, 2021).

Os ácidos metoxicinâmicos e hidroxicinâmicos são sintetizados pela via do ácido chiquímico, uma rota metabólica presentes em plantas, fungos e algas tendo como precursores a fenilalanina e tirosina (CONTARDI *et al.*, 2021). Diversas propriedades farmacológicas, têm sido relatadas: como anti-inflamatória, antifúngica, antibacteriana, antitumoral e como inibidor enzimático (BURHENNE; KRISTENSEN; RASMUSSEN, 2003; FIXON-OWOO *et al.*, 2003; HENRY *et al.*, 2007; KRISTENSEN; BURHENNE; RASMUSSEN, 2004; NORTHOVER, 1964; RUSSELL; SCOBIE; CHESSON, 2005; YE; ZHANG, 2007; YINGYONGNARONGKUL *et al.*, 2006).

O ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico (TMCA) é um ácido cinâmico substituído por grupos multi-metoxil, análogo sintético da piplartina, amplamente distribuído em produtos naturais, como a *Polygala tenuifolia*, utilizada na medicina chinesa por seus efeitos tranquilizantes, sedativos, anticonvulsivantes e imunomoduladores (CHEN, WEI, CHEN, 2016; KAWASHIMA *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2013; YU, *et al.*, 2014). As modificações no grupo carboxila desse ácido produzem diversos análogos atraentes sob o ponto de vista farmacológico (ZHAO *et al.*, 2019). 3,4,5-trimetoxicinamato de metila (M-TMCA) e 3,4,5-trimetoxicinamato de butila (B-TMCA) são análogos do TMCA (NÓBREGA *et al.*, 2019).

Dessa forma, a obtenção de novas drogas capazes de modular a dor, que possuam efeitos terapêuticos mais eficazes e com reações adversas reduzidas se faz necessário. Destarte, o

objetivo principal do estudo foi avaliar comparativamente a atividade antinociceptiva do M-TMCA e B-TMCA em camundongos, através de métodos *in vivo* e *in silico*, visto que os estudos sobre as atividades farmacológicas desses compostos no sistema nervoso ainda são escassos.

2. Fundamentação Teórica

2.1. Dor - Considerações gerais

A dor é um problema de saúde que afeta pelo menos 20% de todos os indivíduos nos Estados Unidos, Europa e em outros países do mundo (BREIVIK *et al.*, 2006; DAHLHAMER *et al.*, 2018; GOLDBERG; MCGEE, 2011). Além disso, ela afeta mais de um quinto dos adultos e um terço dos jovens, interferindo com as funções diárias desta população (WILLIAMS *et al.*, 2020).

O modelo biopsicossocial de dor esclarece que a dor e seus impactos envolvem interações complexas entre os fatores biológicos, psicológicos e sociais e que seu manejo adequado requer uma abordagem multidisciplinar (BROEKMANS *et al.*, 2010; EDWARDS *et al.*, 2016; GATCHEL *et al.*, 2007, SOLÉ *et al.*, 2020).

A dor é uma resposta sensorial necessária a sobrevivência, contudo, tornando-se uma patologia crônica, acaba sendo prejudicial a qualidade de vida dos seres humanos que experimentam por reduções significativas de suas atividades e contribuem para taxas aumentadas de transtornos psiquiátricos (DA SILVA; RIBEIRO-FILHO, 2011; WILLIAMS *et al.*, 2020). Sendo uma das sensações mais íntimas e exclusivas que o ser humano já experimentou, a dor não só envolve componentes sensoriais; mas também envolve componentes afetivos, cognitivos, sociais e comportamentais (ARAÚJO, 2014).

Desta maneira, é importante que haja a distinção entre dor e nocicepção. A primeira se caracteriza como experiência subjetiva, multidimensional e amplamente abstrata, que é influenciada pelos fatores que estão ao redor do indivíduo. Já o termo nocicepção refere-se à detecção da lesão tecidual por transdutores especializados ligados às fibras nervosas que tem a função de transmitir sinais ao Sistema Nervoso Central (SNC), influenciados por estímulos ambientais físicos, químicos ou térmicos e por processos inflamatórios que venham a surgir no organismo (DUBIN *et al.*, 2010; LOESER; MELZACK, 1999).

O termo “dor” é de exclusividade dos seres humanos, pois, além de envolver o componente nociceptivo, há o envolvimento do componente emocional no qual, através das experiências de vida, as pessoas aprendem o conceito de dor (COUTAUX *et al.*, 2005; RAJA *et al.*, 2020). Deste modo, em estudos com animais, o termo dor, se torna errôneo, já que os mesmos não são capazes de demonstrar, através da comunicação, quais os componentes emocionais envolvidos; sendo assim, o termo nocicepção é mais adotado e mais apropriado em estudos com animais (HELLYER *et al.*, 2007).

A dor também pode se manifestar de forma exacerbada em indivíduos que tenham contraído alguma doença viral, como observado nas pandemias do H1N1 de 2009 e na recente COVID-19. Durante a infecção aguda, a presença e gravidade dos sintomas somáticos estão intrinsecamente relacionados com o desenvolvimento posteriormente da fadiga crônica e dor (CLAUW *et al.*, 2020).

2.2. Classificação da dor

A dor pode ser classificada de acordo com a dimensão e baseada nos mecanismos biológicos.

Sob o ponto de vista temporal, a dor é classificada como aguda e crônica. A dor aguda representa um mecanismo vital e protetor no qual o organismo reage contra estímulos perigosos. Contudo, a dor aguda não é um sinal de aviso, mas sim uma incapacidade do organismo em evitá-la, ou seja, a nocicepção subconsciente acaba se tornando uma sensação desagradável consciente (BALIKI; APKARIN, 2015). Ela é caracterizada por ser pontual, delimitada, de início súbito, com curta duração, desaparecendo com a resolução do processo patológico envolvido (ALMEIDA *et al.*, 2004; ANAND *et al.*, 2017).

A dor crônica é definida como uma dor que dura mais de três que se caracteriza por ser persistente e debilitante, afetando a saúde e a qualidade de vida dos indivíduos, podendo ter efeitos devastadores no funcionamento social, físico, psicológico e ocupacional (EDWARDS *et al.*, 2020). É um funcionamento patológico e não adaptativo do sistema nervoso presente em várias doenças como depressão, câncer e artrite reumatoide, e está associada a mudanças no padrão de transmissão neuronal, ocorrendo uma estimulação persistente dos nervos periféricos no SNC, podendo persistir após a recuperação da doença ou lesão (RUSSO; BROSE, 1998; SCHAIBLE, 2005). Na maioria das vezes ela não está bem localizada, e tende a ser contínua ou recorrente. A dor crônica pode ser dividida em nociceptiva, neuropática e psicogênica (MERSKEY; BOGDUK, 1994; WHO, 2012; HELMS; BARONE, 2008).

A dor nociceptiva resulta de situações em que ocorre a estimulação persistente dos nociceptores por estímulos potencialmente prejudiciais (SOUZA MONTEIRO DE ARAUJO *et al.*, 2020). Essa excitabilidade resulta em alterações do sistema nervoso que, periféricamente, reduz o limiar de ativação dos nociceptores e, centralmente, um aumento da responsividade na medula espinhal aos estímulos sensoriais (SCHAIBLE; RICHTER, 2004). A dor nociceptiva pode ser dividida em duas categorias: a somática e a visceral. A dor somática surge da ativação de terminações nervosas periféricas que respondem à estimulação nociva e pode ser descrita

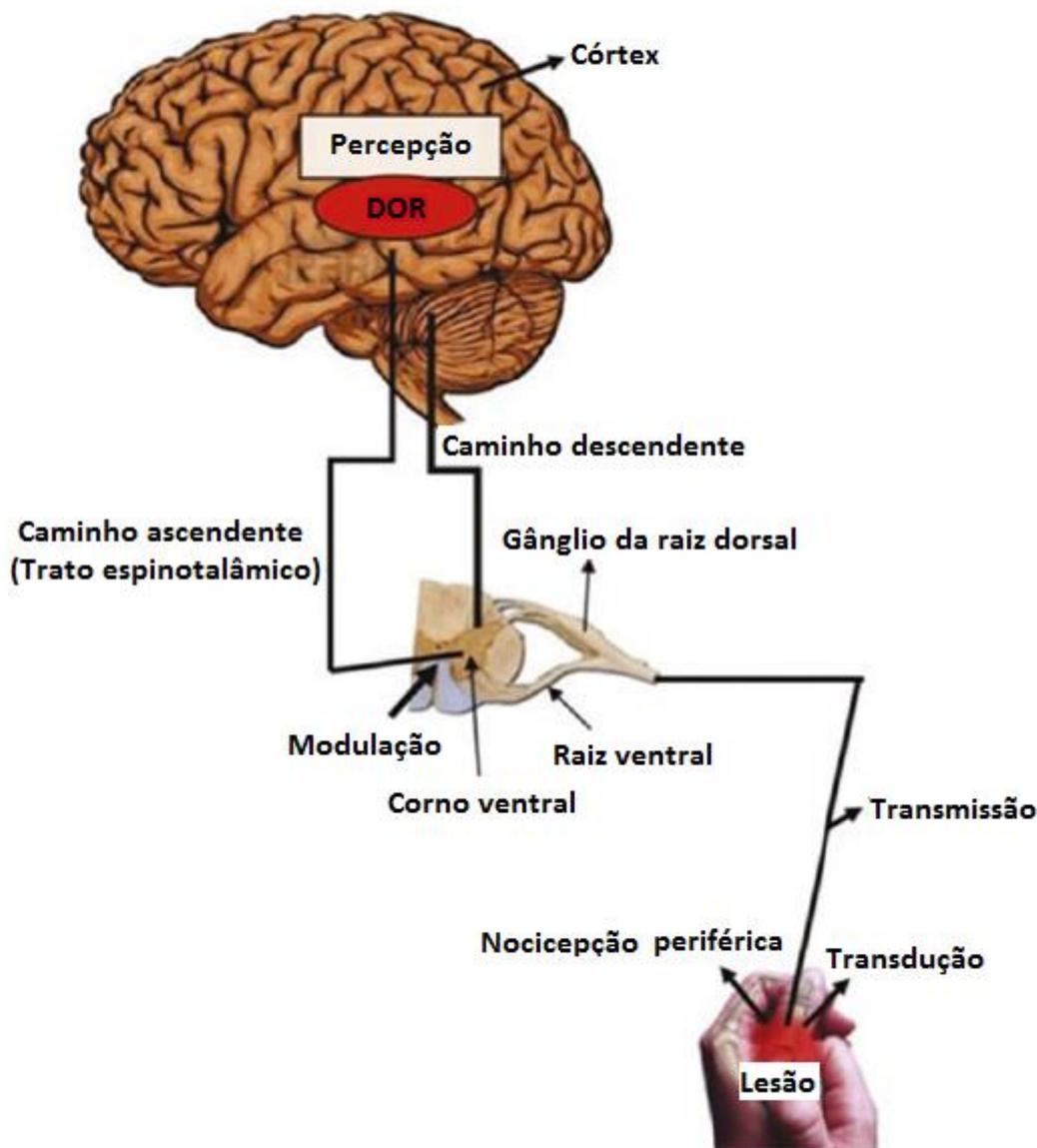
como localizada, aguda, comprimindo, esfaqueando ou latejando. A dor visceral resulta da ativação de nociceptores das vísceras torácicas, pélvicas ou abdominais, tem localização indefinida, irradia de forma difusa e profunda e é percebida como constrictiva ou em cólica, podendo ter sua origem em diversos processos patológicos que ocorrem em órgãos internos (FRIEDRICHSDORF; GOUBERT, 2020; RAMOS, 2014; RODRIGUES, 2013).

A dor neuropática está relacionada com a existência de lesão ou doença que afete o sistema somatossensorial. Ela pode ter origem periférica, através de uma lesão nervosa ou doença, ou central, após um acidente vascular cerebral ou lesão da medula espinhal. É descrita pelo doente como sensações desagradáveis de queimadura, dormência e formigamento, e tem duração contínua e raramente intermitentes. Além disso, apresenta uma elevada prevalência e impacto em todo mundo, sendo necessário abordagens para sua prevenção e cuidado (SMITH; HÉBERT; VELUCHAMY, 2020; RAMOS, 2014).

Há, também, a dor psicogênica, que surge em resposta a ansiedade, stress ou outros distúrbios psíquicos, sendo um termo utilizado para definir dores que são determinadas por fatores psicológicos (WHO, 2012). Assim, ela é definida como a interação de fatores somáticos e neurológicos com fatores psicológicos (DANILOV; ISAGILYAN; MACKASCHOVA, 2018).

2.3. Vias de transmissão e modulação da nocicepção

O sistema nervoso é capaz de detectar uma vasta gama de estímulos que acontecem ao nosso redor, porém a habilidade de detectar estímulos nocivos tem sido essencial para a sobrevivência e bem-estar do organismo, bem como seu entendimento é necessário para o melhor tratamento das condições dolorosas (CARR; ZACHARIOU, 2014). Os componentes fundamentais da via da dor incluem a transdução de estímulos nocivos em um sinal neuronal, a transmissão do sinal nociceptivo para o SNC, a percepção e integração desses sinais em estruturas corticais de superiores e a modulação descendente (Figura 1) (GRUBB; PASVANKAS, 2019).

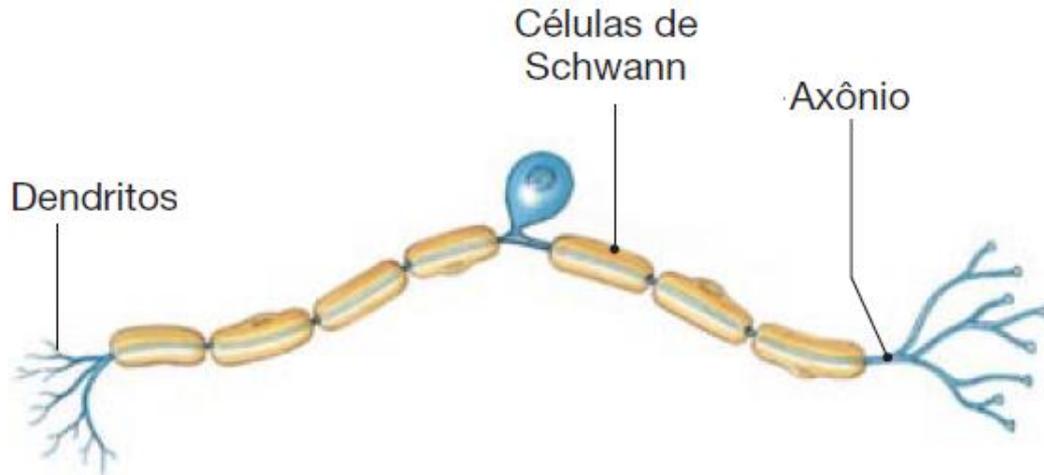
Figura 1 – Componentes fundamentais da via da dor nociceptiva.

FONTE: Adaptado de GRUBB; PASVANKAS (2019).

A nociceção pode ser provocada por estímulos químicos, térmicos ou mecânicos, que são detectados por um feixe de fibras nervosas periféricas chamadas nociceptores aferentes (BASBAUM *et al.*, 2009; FEIN, 2011; FREEDMAN *et al.*, 2017; PRICE; VERNE; SCHWARTZ, 2006). Nociceptores são neurônios aferentes primários que possuem terminações nervosas livres com um alto limiar de ativação encontradas nos corpos celulares localizados nos gânglios da raiz dorsal da medula espinhal (CARPENTER; DICKENSON, 2002; OSSIPOV, 2009). Eles têm a função de conduzir informações sobre lesões periféricas para centros integrativos centrais que geram comportamento de proteção (FEIN, 2011; GRUBB; PASVANKAS, 2019; RUSSO; BROSE, 1998). As fibras aferentes primárias têm uma morfologia única, denominada pseudounipolar (Figura 2), possuindo ramificações axonais

periféricas e centrais, que inervam órgãos e medula espinhal respectivamente. Isto significa que os nociceptores tanto podem enviar como receber mensagens de ambos os terminais (BASBAUM *et al.*, 2009).

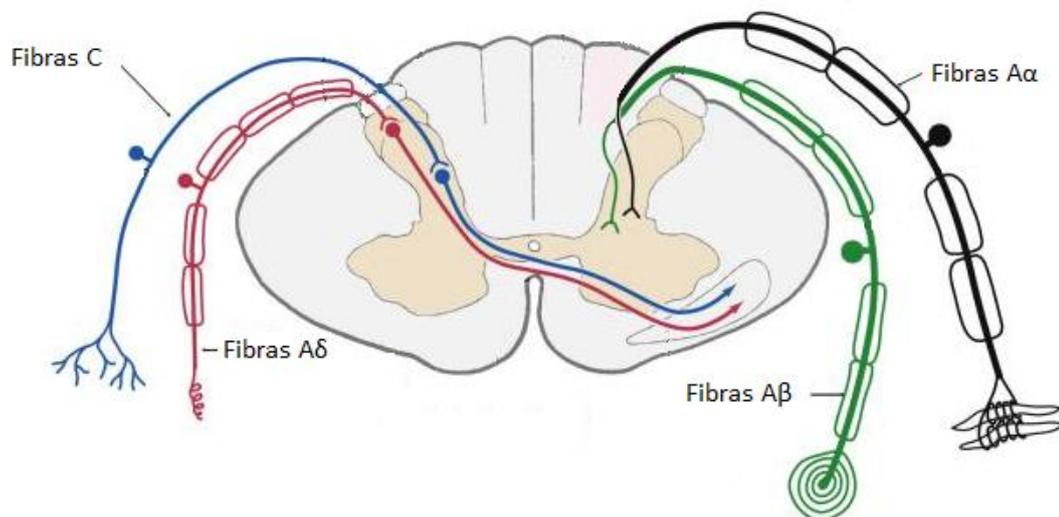
Figura 2 – Nociceptor aferente primário ou neurônio pseudounipolar.



FONTE: Adaptado de Silverthorn *et al.*, (2017).

De acordo com a velocidade de condução e calibre os nociceptores podem ser divididos em 3 grupos principais (Figura 3) que apresentam padrões distintos de terminações centrais. O primeiro grupo, fibras $A\alpha$ e $A\beta$, inclui fibras mielinizadas de maior diâmetro, que conduzem com velocidade rápida (8-120 m/s para a $A\alpha$ e 30-70 m/s para a $A\beta$), respondendo a estímulos mecânicos inócuos com baixo limiar de ativação, como tato, vibração e pressão (GOLAN *et al.*, 2009; GRUBB; PASVANKAS, 2019; KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008).

Figura 3 – Representação da medula espinhal cervical mostrando fibra $A\alpha$ e $A\beta$ à direita e fibras $A\delta$ e C à esquerda.

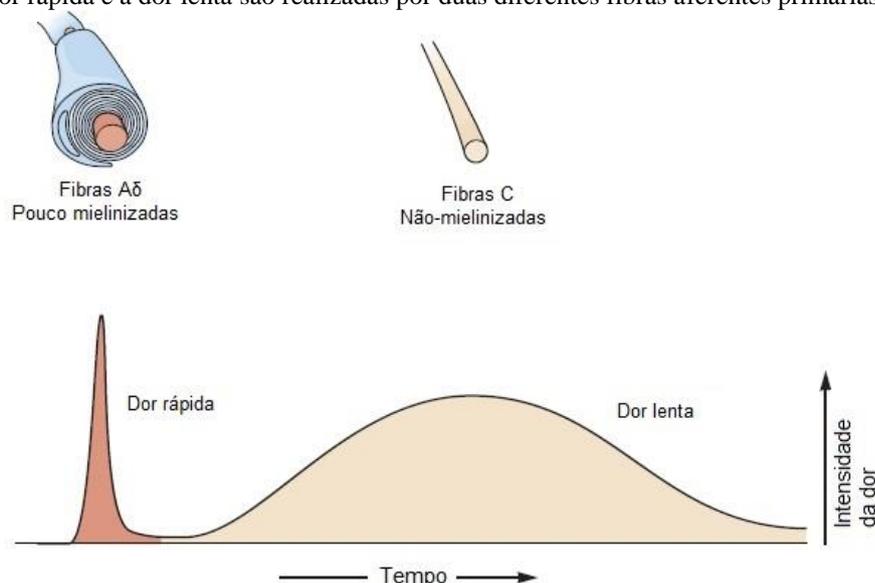


FONTE: Adaptado de HAINES; MIHAILOFF, (2017).

A segunda população, fibras A δ , consiste em fibras pouco mielinizadas de diâmetro intermediário e velocidades de condução de 4-30 m/s, que respondem a estímulos de calor, frio e mecânicos de alto limiar, estas fibras medeiam a dor aguda ou “rápida” (Figura 4). Tais fibras são subdivididas em fibras Tipo I e Tipo II. As do tipo I são mecanorreceptores de alto limiar que respondem a estímulos térmicos (> 50°C) e químicos, porém no tecido lesionado o limiar dessas fibras tende a ser um pouco mais baixo. As fibras do tipo II possuem limiar menor que as do tipo I e são sensíveis a temperaturas em torno de 43°C (GOLAN *et al.*, 2009; ALMEIDA *et al.*, 2004).

As fibras pertencentes ao terceiro grupo, fibras C (Figura 4), são pequenos nervos amielínicos, com pequeno diâmetro e que conduzem o sinal com velocidades inferiores a 2,5 m/s, sendo responsáveis pela “dor lenta”, conhecida como sensação de queimação. Essas fibras, também chamadas de polimodais, respondem a estímulos mecânicos intensos, térmicos e químicos (PERL, 2007). As fibras C são mais numerosas nas raízes dorsais do que as fibras A δ (GRUBB; PASVANKAS, 2019). Nociceptores silenciosos são fibras C sensíveis ao calor, e que apenas apresentam sensibilidade mecânica na presença de lesão tecidual. Estudos de caracterização neuroanatômicas e molecular das fibras C mostram a existência de nociceptores C peptidérgicos e não-peptidérgicos. Os primeiros produzem e liberam neuropeptídeos, como a substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e expressam o receptor neurocinina 1. Já as fibras C não-peptidérgicas apresentam ligação para a isolectina B₄ e expressam o receptor purinérgico P2X₃ (JULIUS; BASBAUM, 2001; BASBAUM *et al.*, 2009; GOLAN *et al.*, 2009).

Figura 4 - A dor rápida e a dor lenta são realizadas por duas diferentes fibras aferentes primárias.



FONTE: Modificado de KANDEL *et al.*, (2013).

O processamento neural de estímulos nocivos que originam o fenômeno doloroso se dá através uma sequência de mecanismos: transdução, transmissão, modulação e percepção. A lesão do tecido resulta na liberação de substâncias químicas que incluem globulina e proteínas quinases, ácido araquidônico, histamina, fator de crescimento do nervo, substância P, CGRP, potássio, serotonina, acetilcolina, soluções de baixo pH, ATP, e ácido láctico (KENDROUD *et al.*, 2020). Estes, por sua vez, promovem a ativação direta de nociceptores que transmitem o estímulo periférico à medula espinhal através de potenciais de ação gerados na fibra. A modulação da dor na periferia envolve o recrutamento de células inflamatórias para o local da lesão e também a liberação de opioides endógenos para a atenuação da dor em resposta ao dano tecidual. A percepção exige a interação complexa de várias estruturas corticais para localizar o estímulo lesivo, reconhece-lo como doloroso e responder de forma apropriada, além disso, isso envolve respostas emocionais, memória e aprendizagem (GRUBB; PASVANKAS, 2019; SCHLISSBACH; MAURER, 2017).

Interneurônios GABAérgicos têm um papel importante no controle da dor nociceptiva através da liberação de neurotransmissores inibitórios, como a glicina, o ácido gama-aminobutírico (GABA) e a dinorfina (GRUBB; PASVANKAS, 2019; MELZACK *et al.*, 1965).

2.4. Atividades farmacológicas dos fenilpropanoides

Os fenilpropanoides, junto com os terpenos, são os principais componentes ativos dos óleos essenciais presentes nas plantas aromáticas medicinais (MONTEIRO *et al.*, 2021). Eles são sintetizados a partir do ácido chiquímico. Esse grupo de metabólitos secundários são produzidos pelas plantas em resposta a estresses bióticos ou abióticos, como infecções, exposição ao ozônio e poluentes, irradiação ultravioleta e outras condições que sejam agressivas às plantas. Levando em consideração as inúmeras funções defensivas dos fenilpropanoides, esses compostos são de grande interesse para desenvolvimento de novas drogas e apresentam potencial atividade anti-inflamatória, antitumoral, antioxidante, antiviral, antibacteriana, cicatrizantes e para proteção contra os raios ultravioletas (CUNHA *et al.*, 2019; KORKINA, 2007; ANDRADE *et al.*, 2014; SCOTTI *et al.*, 2020).

O gênero *Piper* pertencente à família Piperaceae, conhecida como família da pimenta, e o gênero *Polygala* pertencente à família Polygalaceae, amplamente utilizada na Medicina Tradicional Chinesa, ricos em fenilpropanoides, exibem diversas atividades biológicas incluindo atividade antitumoral, neuroprotetora, anti-isquêmicas, antidepressivas, sedativas, analgésicas, antiateroscleróticas, antileishmania, tripanocida, antituberculose, antimicrobiana,

imunomoduladora e antioxidante (DA NÓBREGA *et al.*, 2018;; ISLAM *et al.*, 2020; LACAILLE-DUBOIS; DELAUDE; MITAINE-OFFER, 2020; NÓBREGA *et al.*, 2019; PISKA *et al.*, 2018).

Plantas ricas em fenilpropanoides como as do gênero *Arctium*, *Duguetia*, *Syringa*, *Herba*, *Eugenia*, *Cinnamomum*, *Illicium*, *Pimpinella*, *Verbena*, *Poincianella*, são bem conhecidas na literatura por apresentarem atividade antinociceptiva (CONEA *et al.*, 2017; KARTBAEVA *et al.*, 2017; LIMA *et al.*, 2017; SALDANHA *et al.*, 2021; SOARES *et al.*, 2020; VARGA *et al.*, 2019). Além disso, fenilpropanoides sintéticos, estruturalmente relacionados aos de origem natural, também demonstram um perfil farmacológico antinociceptivo (ABDOU *et al.*, 2021; ARAGÃO NETO *et al.*, 2019)

A piplartina, também conhecida como piperlongumina, uma alcaloide encontrada principalmente em *Piper longum* L. (pimenta longa), mas também em outras espécies, que possui diversas atividades farmacológicas relatadas, no qual a antitumoral ganha destaque (BEZERRA *et al.*, 2013; DA NÓBREGA *et al.*, 2018; HAQ *et al.*, 2021; NÓBREGA *et al.*, 2019). Estudos recente mostram uma série de análogos sintéticos da piplartina como moléculas úteis para o planejamento de novos fármacos (DA NÓBREGA *et al.*, 2018; NÓBREGA *et al.*, 2019; ZHAO *et al.*, 2019).

2.5. M-TMCA e B-TMCA

O TMCA, é um ácido cinâmico com três metoxilas no anel aromático, comumente encontrado em raízes de *Polygala tenuifolia* Wild, uma planta amplamente utilizada na Medicina Tradicional Chinesa como sedativo e para o tratamento da epilepsia, insônia e dor de cabeça (KLEIN JÚNIOR; FALONI DE ANDRADE; FILHO, 2012; MAY *et al.*, 2013). Modificações estruturais no TMCA dão origem ao M-TMCA e B-TMCA (NÓBREGA *et al.*, 2019).

M-TMCA é um éster fenilpropanoide, também encontrado na natureza em plantas do gênero *Piper* e *Polygalae*, possuindo várias atividades farmacológicas como ações imunomoduladoras, efeito sedativo, antiarrítmico e efeito antinarcótico (JUNG *et al.*, 2013; KAWASHIMA *et al.*, 2004; TSAI *et al.*, 2005; YU *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2013). B-TMCA é descrito na literatura com atividade contra as formas promastigotas de *L. amazonensis* (NÓBREGA *et al.*, 2019).

2.6. Sistema adenosinérgico e antinociceção

A adenosina está presente em todo o corpo por ser um metabólito intermediário encontrado em muitas vias metabólicas. Tem sido demonstrado que a adenosina possui importantes funções, como por exemplo, vasodilatação, inibição da agregação plaquetária, angiogênese, ativação de mastócitos, inibição da lipólise, diminuição do fluxo sanguíneo renal (FREDHOLM, 2010).

Quatro subtipos de receptor de adenosina foram identificados: A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃. Os receptores do subtipo A₂, são acoplados a proteína G_s, enquanto os A₁ e A₃ estão acoplados com a G_i (SAWYNOK; BURNSTOCK, 2010).

A adenosina demonstra um importante papel na transmissão da dor, tanto central como periférica e suas propriedades antinociceptivas são, em grande parte, atribuídas sobre sistemas de receptores que se localizam na medula espinhal, onde os receptores A₁ e A₂ foram identificados na substância gelatinosa. Embora existam evidências do envolvimento de receptores A₂ na antinociceção, o receptor A₁ desempenha um papel principal na inibição da nociceção na medula espinhal antinociceptivos em modelos experimentais de dor aguda nociceptiva, inflamatória e neuropática. (DICKENSON; SUZUKI; REEVE, 2000).

Composto que afetam o sistema adenosinérgico se mostram como uma importante ferramenta farmacológica no controle da dor.

2.7. Sistema glutamatérgico e antinociceção

O glutamato é um neurotransmissor excitatório que é liberado pelos nociceptores aferentes primários, portanto, irregularidades no transporte e liberação de glutamato têm sido implicado no desenvolvimento de estados dolorosos (TAO; GU; STEPHENS JR, 2005). Em estados de dor patológica, moléculas de e citocinas inflamatórias podem aumentar a liberação de glutamato e, conseqüentemente, um aumento da nociceção, reforçando assim o desenvolvimento da sensibilização central (GRUBB; PASVANKAS, 2019).

O sistema glutamatérgico está associado à nociceção pelo fato deste neurotransmissor ativar os receptores α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA) e N-metil-D-aspartato (NMDA), permitindo a passagem de Na⁺ e Ca²⁺, promovendo a geração de um potencial de ação e, a partir daí, uma resposta nociceptiva (SCHUMACHER; BASBAUM; WAY, 2012).

2.8. Tratamento farmacológico da dor

A terapia farmacológica continua sendo a base para o tratamento dos pacientes com dor, apesar de existirem outros métodos inovadores como as intervenções psicológicas que incluem a terapia cognitivo-comportamental, hipnose, terapia de aceitação e compromisso, dentre outras (DRISCOLL *et al.*, 2021; TIMMERMAN *et al.*, 2016). A não adesão ao tratamento farmacológico resulta em aumento dos custos de saúde, bem como da morbidade e mortalidade (DIMATEO *et al.*, 2002). Apesar de as pessoas que sofrem de dor usarem medicamentos para mitigá-la, tal terapia não é tão eficaz quanto desejado (ANDERSSON *et al.*, 1999).

O tratamento farmacológico atual consiste na utilização de analgésicos periféricos, opioides e fármacos adjuvantes (FRIEDRICHSDORF; GOUBERT, 2020).

Os analgésicos periféricos, comumente conhecidos como analgésicos não-opioides, são representados pelo acetaminofeno (paracetamol) e anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs). O mecanismo de ação desta classe de fármacos se baseia na inibição da enzima ciclooxigenase (COX), evitando a produção de mediadores da dor e inflamação no sistema nervoso periférico. Embora não causem dependência física, reações adversas como sangramentos e efeitos colaterais gastrointestinais, hepáticos e renais, podem ser observados após o seu uso (NISSEN *et al.*, 2016).

Os opioides são frequentemente indicados na dor aguda média a intensa. A morfina continua sendo o principal representante da classe, mas outros opioides, também eficazes no tratamento analgésico, são bem utilizados na prática clínica como os alcaloides naturais (codeína, papaverina e tebaína), opioides semi-sintéticos (diamorfina, di-hidrocodeína, buprenorfina, nalbufina e oxicodona) e opioides sintéticos (levorfanol, butorfanol, metadona, propoxifeno, pentazocina, fenazocina, petidina, alfentanil, fentanil, sufentanil e remifentanil) (FRIEDRICHSDORF; GOUBERT, 2020). Eles inibem a nocicepção através da ligação a receptores opioidérgicos localizados no SNC e periférico, o que provoca, através de uma cascata de sinalização, o fechamento de canais de cálcio voltagem-dependente no neurônio pré-sináptico, reduzindo a liberação de neurotransmissores excitatórios, além de uma hiperpolarização pós-sináptica feita através da abertura de canais de potássio (PATHAN; WILLIAMS, 2012).

Os analgésicos adjuvantes podem melhorar o controle da dor especialmente no tratamento da dor neuropática e visceral (FINNERUP *et al.*, 2015; FRIEDRICHSDORF; NUGENT, 2013). Nesta classe estão os antiepilépticos (gabapentina, pregabalina e

carbamazepina), agonistas α -2 adrenérgicos (clonidina e dexmedetomidina), antidepressivos tricíclicos (amitriptilina e nortriptilina), bloqueadores do receptor NMDA (cetamina) e bloqueadores do canal de sódio (lidocaína) (FRIEDRICHSDORF; GOUBERT, 2020).

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

- Avaliar comparativamente a atividade antinociceptiva e os possíveis mecanismos de ação decorrentes da administração de 3,4,5-trimetoxicinamato de metila (M-TMCA) e 3,4,5-trimetoxicinamato de butila (B-TMCA) em camundongos.

3.2. Objetivos específicos

- Investigar a toxicidade aguda de M-TMCA e B-TMCA em camundongos;
- Caracterizar os efeitos sobre o SNC de M-TMCA e B-TMCA;
- Avaliar a coordenação motora e possíveis sinais de relaxamento muscular em animais administrados com M-TMCA e B-TMCA;
- Avaliar a atividade antinociceptiva de M-TMCA e B-TMCA em modelos de nocicepção química;
- Realizar estudo computacional de predição (*docking consenso*) para predeterminar possíveis mecanismos de ação;
- Escolher a molécula com melhor atividade antinociceptiva para pesquisar, por técnicas farmacológicas *in vivo*, possíveis mecanismos de ação envolvidos na antinocicepção.

4. Material

4.1. Animais

No presente estudo, foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) Swiss, machos com três meses de vida, pesando entre 25-35 g, provenientes da Unidade de Produção Animal (UPA), do Instituto de Pesquisa de Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Os animais foram mantidos no biotério em gaiolas de polipropileno, contendo 20 camundongos, sob condições monitoradas de temperatura de $21 \pm 1^\circ \text{C}$, tiveram livre acesso a uma dieta controlada a base de ração e água. Os animais também foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo a fase clara das 6:00 às 18:00 horas.

Os procedimentos adotados estavam de acordo com: a) Decreto nº 24.645 de 10 de julho de 1934 que asseguram os direitos dos animais, estabelecendo medidas de proteção aos mesmos; b) Lei nº 6.638 de 8 de maio de 1979, que normatiza as práticas didático-científicas da vivisseção de animais (Brasil, 1934; Brasil, 1979) e c) Lei 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais. No presente estudo, todos os animais foram eutanasiados de acordo com os procedimentos estabelecidos na Resolução Normativa nº 37 seção I, de 15 de fevereiro de 2018, que se trata da Diretriz da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Todos os procedimentos desde o início do estudo até o momento de eutanásia foram realizados para evitar o sofrimento, reduzir o desconforto e dor dos animais.

Todos os procedimentos experimentais foram analisados e previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB), sob a certidão N° 322-5203080318.

4.2. Local de pesquisa e condições experimentais

As atividades de pesquisa foram desenvolvidas no Laboratório de Psicofarmacologia Elisaldo Carlini e no Laboratório de Quimioinformática, localizados no IPeFarM, no período compreendido entre as 12:00 e as 17:00 horas. Os animais foram pesados e separados em grupos de no máximo 4 animais por gaiola com antecedência de no mínimo 1 hora para o início dos testes experimentais, com a finalidade de promover uma adaptação ao novo ambiente, e assim

evitar possíveis alterações fisiológicas e comportamentais que podem decorrer do estresse causado pelo seu manuseio.

As bancadas e os aparelhos utilizados foram higienizados com álcool 70%, entretanto, durante os testes, foi utilizado etanol com baixa graduação (10%), na tentativa de diminuir possíveis odores que pudessem interferir no comportamento dos animais.

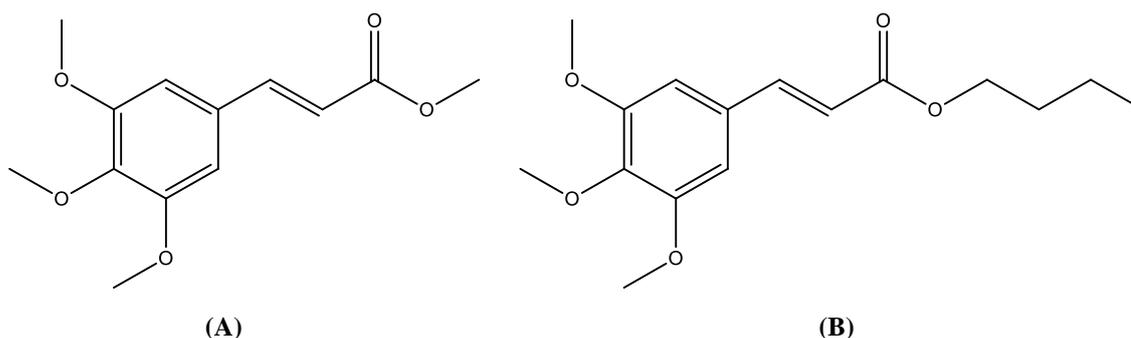
4.3. Substâncias utilizadas

- Ácido acético glacial (Reagen - Brasil)
- Ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico (Sigma Chemical Co. - E.U.A)
- Água destilada (UFPB - Brasil)
- B-TMCA (Laboratório de Química Farmacêutica/CCS/UFPB - Brasil)
- Cafeína (Merck – E.U.A.)
- Cloridrato de morfina (Sigma Chemical Co. - E.U.A)
- Diazepam (Cristália Produtos Químicos - Brasil)
- Etanol (UFPB - Brasil)
- Formaldeído 37% (Vetec - Brasil)
- M-TMCA (Laboratório de Química Farmacêutica/CCS/UFPB - Brasil)
- Tween 80 (Vetec - Brasil)

4.4. Preparação da amostra do M-TMCA e B-TMCA

M-TMCA e B-TMCA (Figura 5) foram dissolvidos em Tween 80 a 5% e em água destilada, utilizando-se concentrações decimais de forma a possibilitar a injeção intraperitoneal (i.p.) de 0,1 mL/10g de peso do animal.

Figura 5 - 3,4,5-trimetoxicinamato de metila (A) e 3,4,5-trimetoxicinamato de butila (B).



FONTE: Autores.

5. Métodos

5.1. Ensaios farmacológicos utilizados

5.1.1. Estudos da toxicidade aguda para determinação da DL_{50}

O estudo da toxicidade aguda para determinação da dose letal 50% (DL_{50}) permite avaliar a toxicidade aguda de drogas, partindo-se do princípio de que a descoberta de uma dose que é capaz de provocar o óbito em 50% dos animais pode gerar uma margem de segurança para o estudo farmacológico (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006).

A DL_{50} foi realizada de acordo com a diretriz internacional da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 2002), no qual 9 animais fêmeas divididos em três grupos (solução salina 0,9%, M-TMCA e B-TMCA) foram usadas em cada etapa. A dose inicial selecionada foi a de 300 mg/kg, administrada intraperitonealmente, seguindo o protocolo de acordo sobrevivência dos animais. A DL_{50} foi utilizada como parâmetro para seleção das doses, utilizadas nos testes comportamentais.

5.1.2. Efeitos do M-TMCA e B-TMCA na triagem farmacológica

A triagem farmacológica comportamental é um dos primeiros procedimentos para a caracterização de uma droga no SNC e Sistema Nervoso Autônomo (SNA), sendo avaliada por meio de um protocolo experimental, proposto por Almeida e Oliveira (2006). Tal metodologia permite que o estudo farmacológico seja direcionado para testes mais específicos.

Os camundongos foram colocados em gaiolas de polietileno, divididos em grupos compostos por seis animais ($n=6$), pré-tratados com veículo (solução salina 0,9%, i.p.), M-TMCA (50, 75, 100 mg/kg, i.p.), B-TMCA (50, 75, 100 mg/kg, i.p.). As anotações dos parâmetros comportamentais foram feitas em intervalos compreendidos entre 0-30; 31-60; 61-120 e 121-240 minutos após o tratamento, sendo estas comparadas ao grupo que recebeu apenas o veículo, possibilitando inferir uma atuação no SNC e/ou SNA.

5.1.3. Teste da barra giratória

Inicialmente descrito por Dunham e Miya (1957), o teste da barra giratória (rota-rod) avalia a coordenação motora por meio da capacidade do animal em permanecer sobre uma barra

giratória em intervalos de tempo pré-estabelecidos. Esse teste é amplamente aceito como método de triagem para avaliar alterações neurológicas associadas a modificações cerebelares produzidas por drogas como os antiepiléticos e antipsicóticos (LUSZCZKI *et al.*, 2005).

Os animais foram pré-selecionados para uma sessão de treinamento, 24 horas antes do teste, sem a administração de qualquer substância, com base na capacidade de permanência na barra giratória (7 rotações por minuto), sendo excluídos aqueles que não conseguiram permanecer sobre a barra por pelo menos 1 minuto em três tentativas.

Grupos de animais (n=6) foram tratados (i.p.) com veículo (solução salina 0,9%) ou diazepam (4 mg/kg) ou M-TMCA (50, 75, 100 mg/kg) ou B-TMCA (50, 75, 100 mg/kg). Após 30, 60 e 120 minutos, os animais foram colocados na barra giratória para avaliação do tempo de permanência que foi registrado durante 1 minuto.

5.1.4. Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético

O teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético é um teste utilizado na triagem de drogas com potencial efeito antinociceptivo (COLLIER *et al.*, 1968). Os animais foram divididos em grupos (n=6) e alocados para receber o veículo, M-TMCA (50, 75, 100 mg/kg, i.p.) ou B-TMCA (50, 75, 100 mg/kg, i.p.) ou morfina (10 mg/kg, i.p.) como controle positivo. Trinta minutos após o tratamento, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de solução de ácido acético 1% (10µL/g de peso) que provocou contorções abdominais. Cada animal foi colocado em uma caixa de observação individual e o número de contorções foi registrado por um período de 10 minutos para cada animal. Uma contorção é caracterizada por uma contração do músculo abdominal e alongamento das patas traseiras.

5.1.5. Teste da formalina

O teste da formalina foi realizado em camundongos como descrito por Hunskaar e Hole (1987), com algumas modificações. Este teste é considerado um modelo de dor persistente e em sua metodologia uma solução de formalina 2,5% é injetada na região intraplantar do camundongo o que causa a estimulação de nociceptores e provoca o comportamento de lambida ou mordida da pata como resposta nociceptiva (SOUZA *et al.*, 2000).

O experimento é considerado um modelo bifásico de comportamentos de dor. A primeira fase (fase neurogênica) contabilizada de 0 a 5 minutos, em seguida, há um período de “descanso” (interfase) que dura aproximadamente 10 minutos, na sequência, ocorre uma

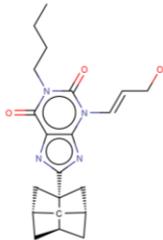
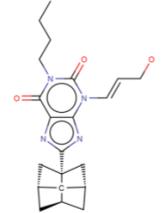
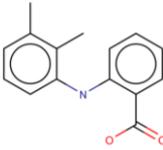
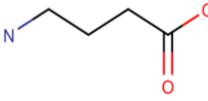
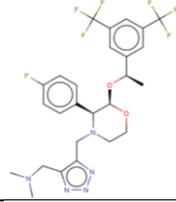
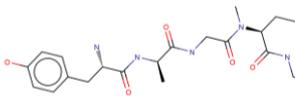
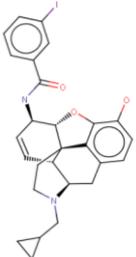
segunda fase (fase inflamatória) que é contabilizada no tempo de 15 a 30 minutos (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

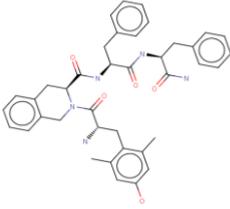
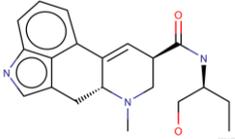
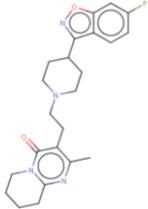
Trinta minutos após o tratamento com o veículo, M-TMCA (50, 75, 100 mg/kg, i.p.) ou B-TMCA (50, 75, 100 mg/kg, i.p.) ou morfina (10 mg/kg, i.p.), formalina (20 µL, 2,5%) foi administrada na região intraplantar do animal pata traseira direita. A quantidade total de tempo de lambida da pata foi registrada em duas fases: a fase neurogênica e a fase inflamatória. Os animais foram colocados individualmente em um aparato espelhado para observação do comportamento nociceptivo.

5.2. *Docking consenso*

O *docking* foi executado no programa Molegro Virtual Docker v6.0 (MVD) (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006) e selecionados onze alvos para os estudos de *docking* (Tabela 1). Inicialmente, foram removidas todas as moléculas de água da estrutura cristalina e calculado o desvio médio da raiz quadrada (do inglês “*Root Mean Square Deviation*” – RMSD) das poses que indica o grau de confiabilidade do *docking*. O RMSD prediz o modo de ligação próximo à estrutura experimental e é considerado bem sucedido se o valor estiver abaixo de 2,0 Å. Uma estratégia *consenso* utilizando cinco diferentes funções de pontuação foi a metodologia usada para confirmar os melhores resultados obtidos pelo MVD. Para isso, os valores de predição de afinidade de ligação maior que os ligantes cristalográficos em pelo menos três programas de *docking* foi considerado como resultados positivos para prosseguir com os testes experimentais. Esse tipo de metodologia *consenso* contribui para aumentar a confiabilidade do *docking* e aumentar o número de compostos verdadeiros positivos. Os resultados foram visualizados através do software MVD e a Discovery Studio 2019 (<https://www.3dsbiovia.com/products/collaborative-science/biovia-discovery-studio/visualization-download.php>). Os compostos que obtiveram valor de afinidade de ligação superior ao ligante cristalográfico em pelo menos três programas para cada alvo foram considerados como resultado ideal para prosseguir com os testes experimentais.

Tabela 1. Informações das enzimas selecionadas depositadas no banco de dados PDB e utilizadas para o *docking*.

PDB ID	Enzima	Classe	Ligante PDB	Resolução
5N2S	Adenosina 1 (A ₁)	Proteína de sinalização		3.6 Å
5N2R	Adenosina 2 (A ₂)	Proteína de membrana		2.8 Å
5IKR	Ciclo-oxigenase 2 (COX-2)	Oxidoredutase		2.3 Å
6HUJ	Ácido gama-aminobutírico (GABA)	Proteína de membrana		3.0 Å
6E59	NK ₁	Proteína de sinalização		3.4 Å
5I2N	N-metil-D-aspartato (NMDA)	Proteína transportadora		2.6 Å
6DDE	Receptor μ opióide (μOR)	Proteína de membrana		3.5 Å
6B73	Receptor kappa opióide (KOR)	Proteína de membrana		3.1 Å

4RWA	Receptor delta opióide (δ OR)	Proteína de membrana		3.2 Å
6DRY	Receptor de serotonina 2B ($5HT_{2B}$)	Proteína de membrana		2.9 Å
6CM4	Receptor Dopamina (D_2)	Proteína de membrana		2.8 Å

5.2.1. Molegro Virtual Docker 6.0 (MVD)

Foi utilizado o software MVD com os parâmetros predefinidos no mesmo software. Para o procedimento de acoplamento (ligante – enzima) foi utilizada um GRID de 15 Å de raio e 0,30 de resolução que cobre o local do sítio de ligação, definido através de um ligante conhecido para cada enzima. Foi gerado o modelo para realizar o encaixe com características esperadas entre o ligante e a enzima, utilizando o algoritmo de busca heurística que combina evolução diferencial e o ligante cristalográfico como molde. O algoritmo de previsão de cavidades (Moldock) e a função de pontuação Moldock score foram selecionados para obter os resultados (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006).

5.2.2. Gold 5.6.2

O software GOLD 5.6.2 foi usado com os parâmetros padronizados pelo programa. Foi usado um GRID de 10 Å e o algoritmo genético, que faz busca aleatória do espaço conformacional diminuindo a probabilidade de o ligante ficar preso em locais mínimos. A função de pontuação selecionada foi o Goldscore. Essa função é semelhante à mecânica molecular com quatro termos:

$$\text{Goldscore} = S_{hb_ext} + S_{vdw_ext} + S_{hb_int} + S_{vdw_int}$$

onde, S_{hb_ext} é o escore de ligação hidrogênio-proteína-ligante, S_{vdw_ext} é o escore de proteína-ligante de van der Waals, S_{hb_int} é a contribuição das ligações intramoleculares e de hidrogênio do ligante; e S_{vdw_int} é a contribuição da tensão intramolecular do ligante (VERDONK *et al.*, 2003).

5.2.3. *AutoDock Vina (Vina)*

Foi utilizado o AutoDock Vina sob a interface gráfica do programa PyRx Virtual Screening tool mantendo os parâmetros estabelecido pelo software. Esse programa é baseado no algoritmo genético e energia de ligação empírica por campo de força. Arquivos de proteínas e ligantes foram convertidos para o formato pdbqt e o GRID gerado foi conduzido à região do sítio ativo. O AutoDock Vina gerou 10 conformações para cada ligante e os mesmos foram utilizados no presente estudo para análise. A função de pontuação *Binding affinity* (Kcal/mol) corresponde ao somatório das contribuições intermolecular e intramolecular e os potenciais são baseados no conhecimento e pontuação empírica (DALLAKYAN; OLSON, 2015).

5.2.4. *AutoDock 4.2.6. (AD4)*

Arquivos de proteínas e ligantes foram convertidos para o formato pdbqt usando a interface gráfica do programa PyRx Virtual Screening Tool. O AutoDock emprega Algoritmo Genético Lamarckiano (AGL) e função de pontuação de energia livre empírica para gerar conformações dos ligantes dentro do sítio ativo da proteína. O tamanho da população e o número de gerações foram mantidos conforme parâmetros pré-definidos pelo programa. O número de acoplamentos foi definido como 10 (MORRIS *et al.*, 2009).

5.2.5. *Plants*

A função empírica ChemPLP foi utilizada, que é uma mistura das funções de pontuação PLP (Função de pontuação linear) do Plants e o Chemscore do Gold. O ChemPLP introduz termos dependentes de ângulo para ligação de hidrogênio e ligação a metais que é baseado na otimização de colônias de formigas (ACO). O *docking* foi executado no Gold 5.6.2 usando os parâmetros pré-definidos pelo programa (KORB *et al.*, 2009).

5.3. Simulações de dinâmica molecular

As simulações de dinâmica molecular foram realizadas para estimar a flexibilidade das interações entre proteínas e ligantes usando o software GROMACS 5.0 (ABRAHAM *et al*, 2015; BERENDSEN; VAN DER SPOEL; VAN DRUNEN, 1995). A topologia dos ligantes foi preparada usando o gerador de topologia ATB (<https://atb.uq.edu.au/>) (MALDE *et al.* 2011) aplicando o campo de força GROMOS96 54a7. A topologia da proteína também foi preparada usando o campo de força GROMOS96 54a7 no GROMACS.

A simulação da dinâmica molecular foi realizada usando o modelo de água SPC de carga pontual estendida em uma caixa cúbica (BONDI, 1964). O sistema foi neutralizado pela adição de íons (Cl^- e Na^+) e minimizado para remover maus contatos entre moléculas complexas e solvente. O sistema também foi balanceado em 300K usando o algoritmo V-rescale em 100ps representado por NVT (número constante de partículas, volume e temperatura), seguido por equilíbrio a 1 atm de pressão usando o algoritmo Parrinello-Rahman como NPT (partículas numéricas constantes pressão e temperatura) até 100ps. As simulações de dinâmica molecular foram realizadas em 5.000.000 etapas a 10ns. Para determinar a flexibilidade da estrutura e se o complexo é estável perto da estrutura experimental, o deslocamento médio da raiz quadrada (RMSD) de todos os átomos de $\text{C}\alpha$ foi calculado em relação às estruturas de partida. Flutuações residuais (RMSF) também foram analisadas para entender o papel dos resíduos próximos ao local de ligação do receptor. Os gráficos de RMSD e RMSF foram gerados no software Grace (<http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/>) e a proteína e os ligantes foram visualizados no UCSF Chimera (PETTERSEN *et al*, 2004).

5.4. Investigação do mecanismo de ação da propriedade antinociceptiva do B-TMCA

Com base nos resultados obtidos pelos testes comportamentais e pelo *docking consenso* foram avaliados os possíveis mecanismos de ação da atividade antinociceptiva do B-TMCA, no qual foi escolhida a dose de 75 mg/kg (i.p.), dose que apresentou melhor efeito antinociceptivo. A reversão da propriedade antinociceptiva do composto por um antagonista específico de neurotransmissores de várias vias que modulam o processo doloroso foi o critério adotado para a determinação do mecanismo de ação do mesmo.

As vias de neuromodulação estudadas foram a adenosinérgica e a glutamatérgica.

5.4.1. Estudo do envolvimento do sistema adenosinérgico

A participação do sistema adenosinérgico no mecanismo de ação do B-TMCA foi estudada utilizando a cafeína (antagonista não seletivo dos receptores de adenosina). Os animais foram divididos em grupos (n=6) e alocados para receber o veículo, B-TMCA (75 mg/kg, i.p.), cafeína (10 mg/kg, subcutâneo) ou cafeína + B-TMCA (a cafeína foi administrada 15 minutos antes da administração do B-TMCA). Trinta minutos após os tratamentos, os animais foram submetidos ao teste de formalina.

5.4.2. Estudo do envolvimento do sistema glutamatérgico

Os grupos de camundongos (n=6) foram pré-tratados com veículo, B-TMCA (75 mg/kg, i.p.) ou MK-801 (0,15 mg/kg, i.p.). Após trinta minutos da administração, os animais receberam uma injeção intraplantar de 20 µL de uma solução de glutamato (30 µmol/pata) na pata posterior direita e o tempo de lambida ou mordida da pata foi registrado por 15 minutos (BEIRITH; SANTOS; CALIXTO, 2002).

5.5. Análise estatística

Os resultados são apresentados como médias \pm erro padrão da média (EPM) obtidos em cada experimento individual em relação aos valores de controle. Para a análise estatística dos dados foi realizado a Análise de Variância (ANOVA) “one-way” seguida pelo teste de Dunnett para os resultados que obedeceram a uma distribuição paramétrica. O teste ‘t’ *post hoc* foi utilizado para comparar dois grupos independentes que obedeceram a uma distribuição paramétrica. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

6. Resultados

6.1. Toxicidade aguda e avaliação geral do M-TMCA e B-TMCA no sistema nervoso central

6.1.1. Toxicidade aguda e triagem farmacológica

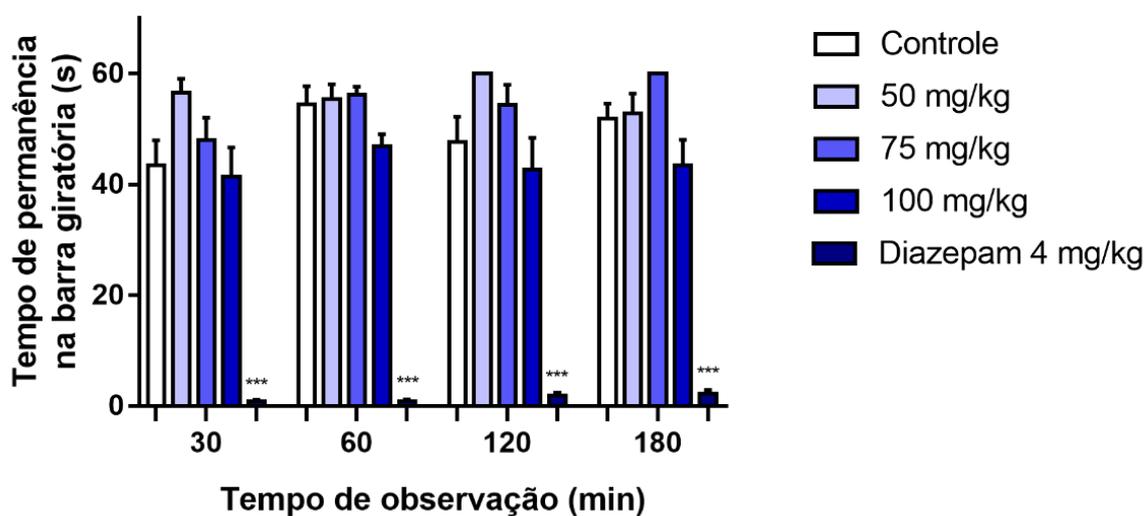
Os estudos foram iniciados com a determinação da toxicidade aguda, no qual a DL_{50} foi estimada em 500 mg/kg para ambas as drogas (M-TMCA e B-TMCA, via i.p.) conforme preconiza a OECD 423, sugerindo que doses maiores ou iguais a esta apresentam efeitos tóxicos potenciais. Quanto a análise comportamental avaliada através da triagem farmacológica, os camundongos tratados com o M-TMCA e B-TMCA na dose de 300 mg/kg apresentaram ambulação diminuída, analgesia, reflexo do endireitamento e resposta ao toque diminuídos. Observou-se que na dose de 2000 mg/kg os animais apresentaram abdução das patas posteriores, ambulação e força para agarrar diminuída, analgesia, sedação, ataxia, perda do reflexo auricular e corneal, ptose palpebral, constipação, cianose, reflexo do endireitamento, resposta ao toque diminuídos e morte.

A partir disso, as doses escolhidas para os testes posteriores corresponderão à 1/3, 1/4 e 1/5 da dose de 300 mg/kg, o equivalente a 100, 75 e 50 mg/kg, respectivamente.

6.1.2. Avaliação do efeito miorrelaxante do M-TMCA e B-TMCA

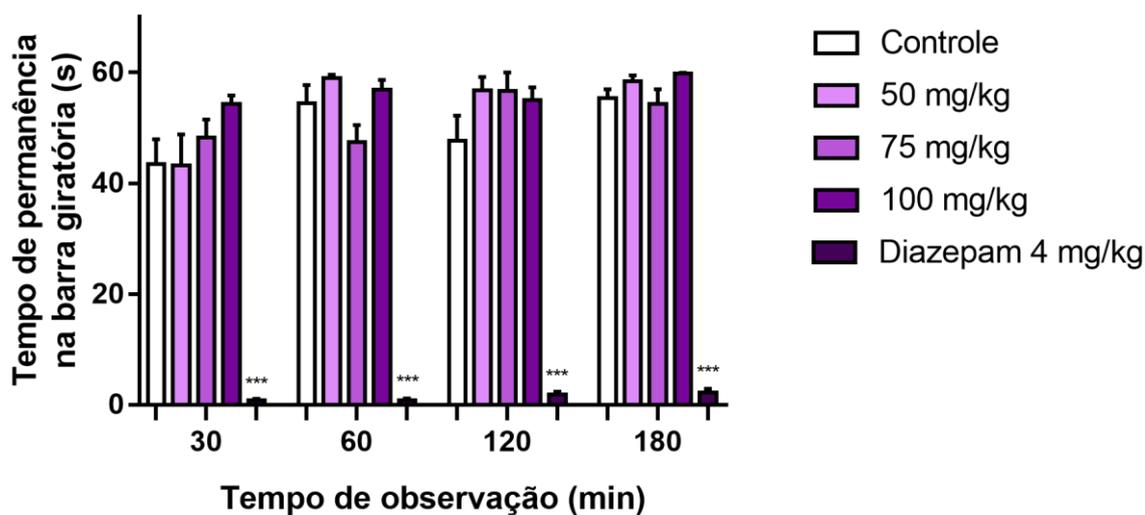
No teste da barra giratória (rota-rod), o tratamento dos animais com M-TMCA (Figura 6) ou B-TMCA (Figura 7) nas doses de 50, 75, 100 mg/kg (i.p.) não alterou a coordenação motora significativamente, em nenhum dos momentos avaliados. O diazepam (4 mg/kg, i.p.), droga padrão, reduziu a coordenação motora em todos os tempos avaliados.

Figura 6. Efeito do 3,4,5-trimetoxicinamato de metila (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.) e diazepam (4 mg/kg, i.p.) no teste de rota-rod.



Cada barra representa a média \pm EPM de seis animais. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle (ANOVA seguida pelo teste de Dunnett).

Figura 7. Efeito do 3,4,5-trimetoxicinamato de butila (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.) e diazepam (4 mg/kg, i.p.) no teste de rota-rod.



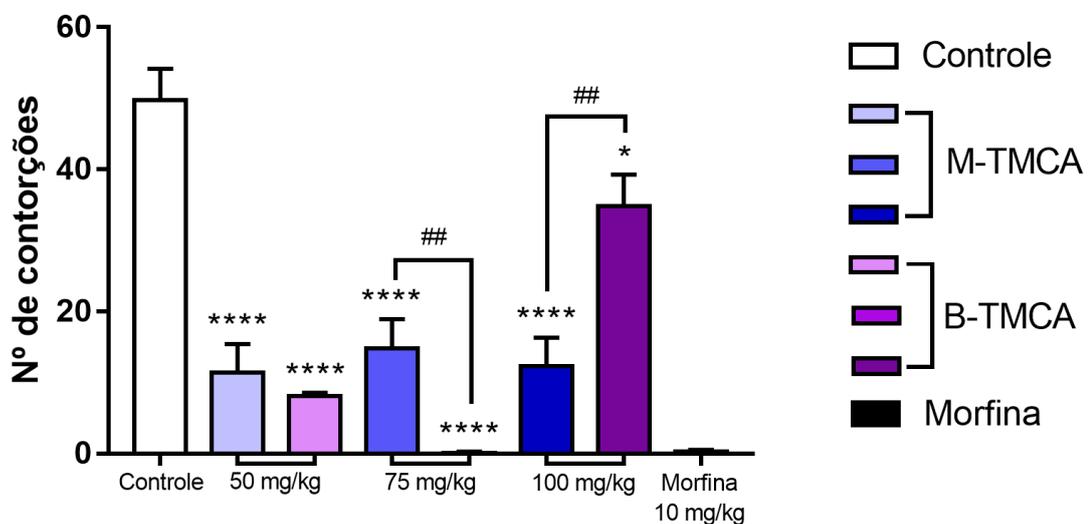
Cada barra representa a média \pm EPM de seis animais. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle (ANOVA seguida pelo teste de Dunnett).

6.2. Estudo da atividade antinociceptiva do M-TMCA e B-TMCA

6.2.1. Efeito do M-TMCA e B-TMCA no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético

Nas doses de 50, 75 e 100 mg/kg, o M-TMCA reduziu significativamente o número de contorções ($11,4 \pm 4,1$; $14,7 \pm 4,1$ e $12,2 \pm 4,1$, respectivamente) em comparação ao grupo controle ($49,7 \pm 4,4$). O B-TMCA, nas doses de 50, 75 e 100 mg/kg também reduziu, significativamente, o número de contorções ($8,1 \pm 0,4$; $0,1 \pm 0,1$ e $34,9 \pm 4,4$ respectivamente) em comparação ao grupo controle. No grupo de morfina (10 mg/kg, i.p.), não houve contorções ($0,0 \pm 0,0$). Houveram também alterações significativas quando foi comparado entre si os grupos M-TMCA e B-TMCA, nas doses de 75 e 100 mg/kg (Figura 8).

Figura 8. Efeito do 3,4,5-trimetoxicinamato de metila (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.), 3,4,5-trimetoxicinamato de butila (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.) e morfina (10 mg/kg, i.p.) no teste do ácido acético.



Cada barra representa a média \pm EPM de seis animais. ****p<0,0001 quando comparado ao grupo controle (ANOVA seguida pelo teste de Dunnett) e ##p<0,01 quando comparados entre os grupos (teste 't' *post hoc*).

6.2.2. Efeito do M-TMCA e B-TMCA no teste da nociceção induzida pela formalina

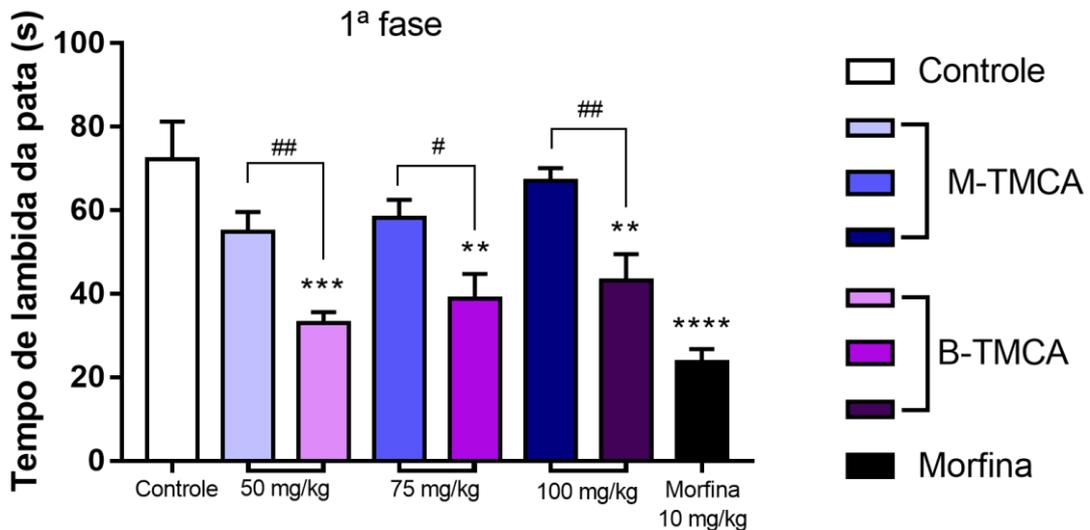
Verificou-se que o pré-tratamento com B-TMCA em todas as doses (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.) reduziu significativamente o tempo que os animais passaram lambendo as patas na primeira fase ($33,0 \pm 2,6$; $38,9 \pm 5,9$ e $43,1 \pm 6,4$ s, respectivamente); entretanto, a administração com M-TMCA não foi capaz de reduzir significativamente o tempo de lambida na primeira fase, quando comparados com o grupo controle ($72,3 \pm 9,0$ s). Além disso, em todas as doses observam-se diferenças significativas quando comparados os grupos entre si (Figura 9).

Na segunda fase do teste foi possível observar um efeito inibitório em todas as doses administradas de ambas as drogas quando comparadas ao grupo controle ($175,1 \pm 14,4$ s). Para o M-TMCA houve redução do tempo de lambida de $94,0 \pm 9,0$; $95,4 \pm 13,1$ e $81,0 \pm 9,9$ s nas

doses de 50, 75 e 100 mg/kg, respectivamente. Já no B-TMCA a redução do tempo de lambida foi de $65,1 \pm 10,7$; $60,3 \pm 14,6$ e $34,7 \pm 12,1$ s nas doses de 50, 75 e 100 mg/kg, respectivamente (Figura 10).

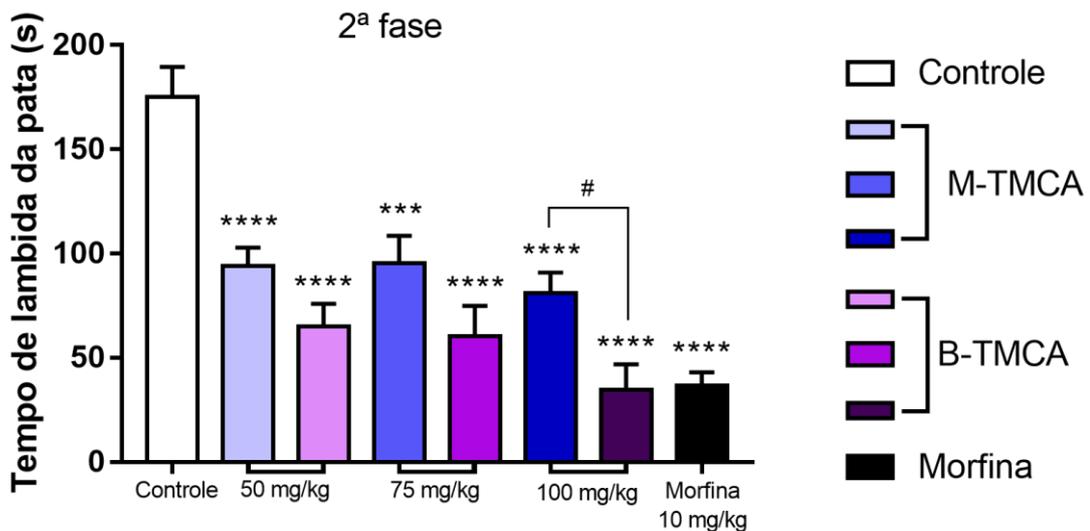
Como esperado, no grupo tratado com morfina (10 mg/kg, i.p.), a nocicepção foi significativamente inibida em ambas as fases em relação ao grupo controle negativo (Figura 9 e 10).

Figura 9. O efeito do 3,4,5-trimetoxicinamato de metila (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.), 3,4,5-trimetoxicinamato de butila (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.) e morfina (10 mg/kg, i.p.) na primeira fase do teste da formalina.



Cada barra representa a média \pm EPM de seis animais. **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle (ANOVA seguida pelo teste de Dunnett) e ## $p < 0,01$; # $p < 0,1$ quando comparados entre os grupos (teste 't' *post hoc*).

Figura 10. O efeito do 3,4,5-trimetoxicinamato de metila (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.), 3,4,5-trimetoxicinamato de butila (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.) e morfina (10 mg/kg, i.p.) na segunda fase do teste da formalina.

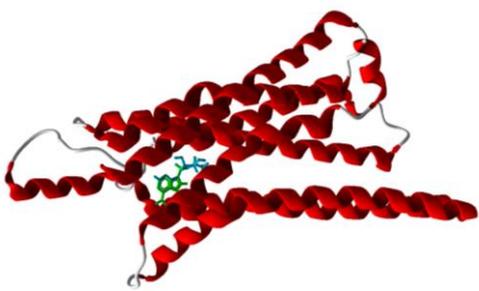
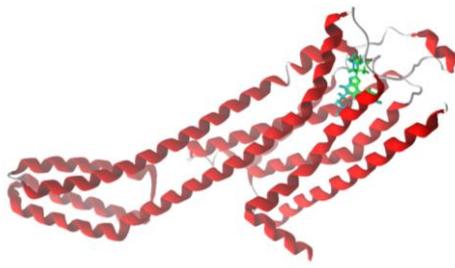
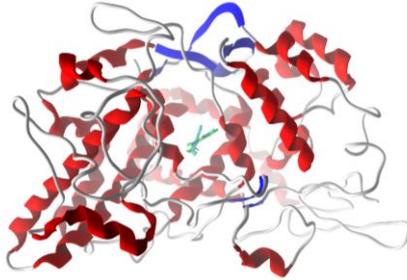


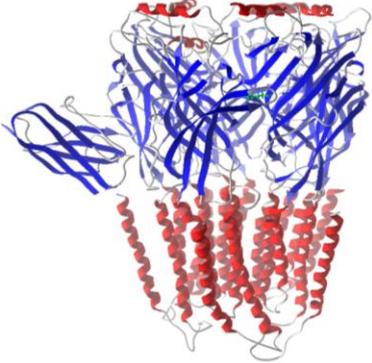
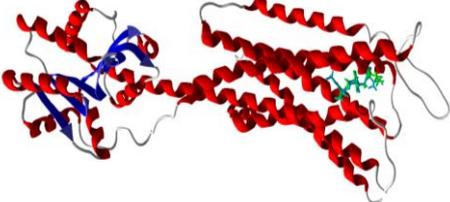
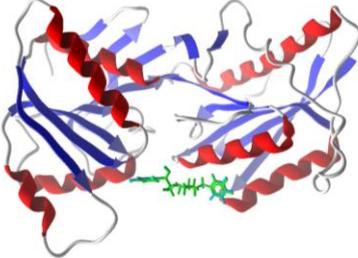
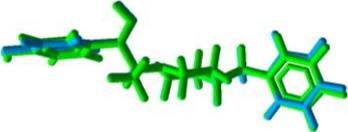
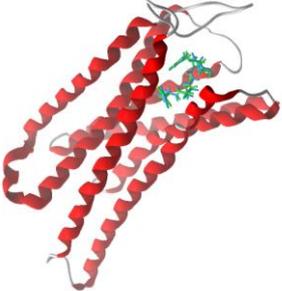
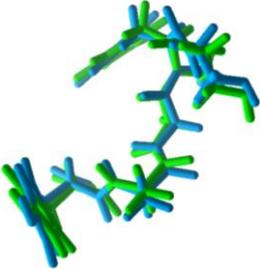
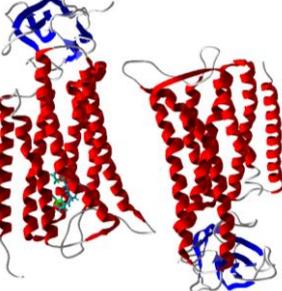
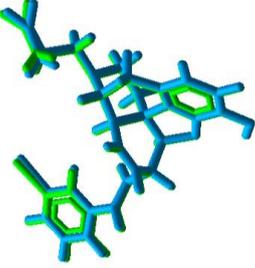
Cada barra representa a média \pm EPM de seis animais. **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle (ANOVA seguida pelo teste de Dunnett) e ## $p < 0,01$; # $p < 0,1$ quando comparados entre os grupos (teste 't' *post hoc*).

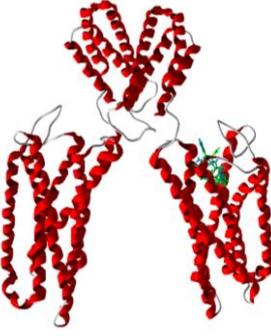
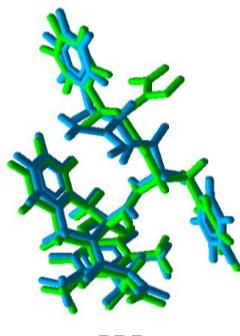
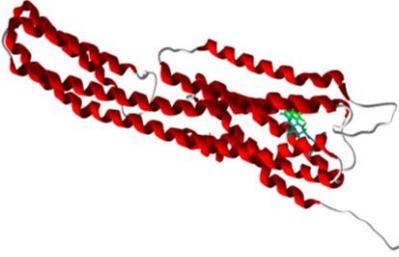
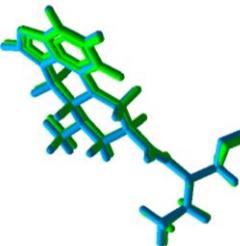
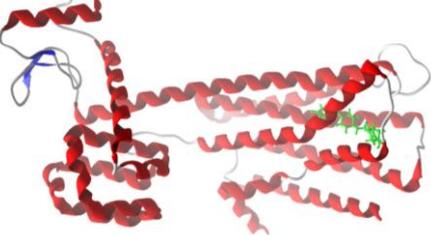
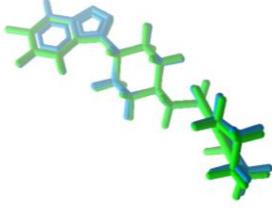
6.3. Docking consenso

Os resultados de *docking* gerados pelas cinco funções de pontuação usadas, foram validados por *redocking* do ligante cristalográfico e calculado o RMSD das poses obtidas. Os resultados mostraram que todos os programas conseguiram posicionar bem o ligante no sítio ativo, com valores de RMSD abaixo de 2.0Å, exceto o Gold para os alvos NK₁ (3.99Å), μ OR (3.93Å), δ OR (2.55Å), 5HT_{2B} (2.60Å) e o Plants para os alvos μ OR (4.76Å) e D₂ (2.17Å) (Quadro 1). Apenas o programa AD4 não foi possível calcular o RMSD das poses, devido à indisponibilidade de acesso dos mesmos.

Quadro 1. Enzimas complexadas aos seus respectivos ligantes (azul e vermelho), sobreposições da melhor pose no *redocking* (azul) e ligante cristalográfico (verde) e valores de RMSD.

Complexo proteína-ligante	<i>Redocking</i>	RMSD
 <p>A₁</p>	 <p>8K8</p>	<p>MVD = 0.11 Gold = 0.25 Vina = 0.16 Plants = 1.17</p>
 <p>A₂</p>	 <p>8JN</p>	<p>MVD = 0.35 Gold = 0.77 Vina = 0.96 Plants = 0.11</p>
 <p>COX-2</p>	 <p>Ácido Mefenâmico (ID8)</p>	<p>MVD = 0.15 Gold = 0.52 Vina = 0.71 Plants = 0.70</p>

 <p style="text-align: center;">GABA_A</p>	 <p style="text-align: center;">Ácido α-aminobutírico (ABU)</p>	<p>MVD = 0.10 Gold = 0.73 Vina = 1.04 Plants = 0.06</p>
 <p style="text-align: center;">NK₁</p>	 <p style="text-align: center;">L76</p>	<p>MVD = 0.42 Gold = 3.99 Vina = 0.39 Plants = 1.69</p>
 <p style="text-align: center;">NMDA</p>	 <p style="text-align: center;">GLY (Glicina)</p>	<p>MVD = 0.20 Gold = 0.71 Vina = 1.91 Plants = 0.34</p>
 <p style="text-align: center;">μOR</p>	 <p style="text-align: center;">DAMGO (PRD)</p>	<p>MVD = 0.45 Gold = 3.93 Vina = 1.53 Plants = 4.76</p>
 <p style="text-align: center;">KOR</p>	 <p style="text-align: center;">CVV</p>	<p>MVD = 0.14 Gold = 0.30 Vina = 0.50 Plants = 0.21</p>

 <p style="text-align: center;">δOR</p>	 <p style="text-align: center;">PRD</p>	<p>MVD = 1.40 Gold = 2.55 Vina = 2.04 Plants = 1.54</p>
 <p style="text-align: center;">5HT_{2B}</p>	 <p style="text-align: center;">Metilergometrina (H8D)</p>	<p>MVD = 0.19 Gold = 2.60 Vina = 1.24 Plants = 1.37</p>
 <p style="text-align: center;">Receptor Dopamina (D₂)</p>	 <p style="text-align: center;">8NU</p>	<p>MVD = 0.16 Gold = 1.69 Vina = 1.37 Plants = 2.17</p>

Os resultados de *docking* no MVD mostraram que o composto M-TMCA obteve valores de predição de energia de ligação próxima ou superior ao ligante cristalográfico para o alvo COX-2. Enquanto que o composto B-TMCA obteve valores de predição de energia de ligação superior ao ligante cristalográfico para os alvos A₁, COX-2 e NMDA (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados dos valores de energia de ligação calculados no MVD. Em negrito, estão destacados os valores de energia superior ao ligante PDB.

ID	A ₁	A ₂	COX-2	GABA	NK ₁	NMDA	μOR	KOR	δOR	5HT _{2B}	D ₂
M-TMCA	-84.92	-77.13	-108.01	-19.61	-76.77	-48.77	-68.07	-78.92	-75.09	-83.34	-103.99
B-TMCA	-101.53	-87.56	-116.73	15.53	-86.35	-63.83	-82.10	-100.74	-76.40	-92.62	-109.60
PDB	-109.03	-132.6	-93.45	-88.65	-163.24	-74.45	-112.64	-135.82	-108.98	-113.50	-146.23

Os compostos foram submetidos ao *docking consenso* usando outras quatro diferentes funções de pontuação (Goldscore, Binding energy do Vina e AD4, e a função ChemPLP) para seus respectivos alvos onde foi possível observar a energia ligação ao ligante PDB (Tabela 3). Após os cálculos, consideramos como resultados confiáveis, os compostos que alcançaram valores de energia de ligação próxima ou superior ao ligante PDB em pelo menos três funções

de pontuação diferentes. Observamos, com os resultados, que o composto M-TMCA só é melhor que o ligante PDB no receptor NMDA. Foi confirmado a afinidade de ligação do composto B-TMCA nos alvos A₁, COX-2 e NMDA. Portanto, sugerimos a partir do *docking consenso* que o mecanismo de ação do composto M-TMCA seja através do receptor NMDA, e que para o composto B-TMCA, sugerimos que este atue na A₁, COX-2 e NMDA.

Tabela 3. Resultados dos valores de energia de ligação em cinco diferentes funções de pontuação. Em negrito, estão destacados os valores energia superior ao ligante PDB.

Molécula	Moldock (MVD)	Goldscore (GOLD)	Binding energy (Autodock Vina)	Binding energy (Autodock)	ChemPLP (PLANTS)
Adenosina 1 (A₁)					
M-TMCA	-84.92	32.08	-6.3	-4.74	30.33
B-TMCA	-101.53	45.68	-6.9	-5.50	35.51
PDB 8K8	-109.03	48.78	-6.8	-5.60	54.73
Ciclo-oxigenase 2 (COX-2)					
M-TMCA	-108.01	47.27	-6.6	-5.99	42.62
B-TMCA	-116.73	56.54	-7.1	-6.16	52.50
PDB ID8	-93.45	55.02	-8.8	-7.15	50.98
N-metil-D-aspartato (NMDA)					
M-TMCA	-48.77	37.51	-5.1	-6.10	46.48
B-TMCA	-63.83	43.94	-5.1	-5.64	37.02
PDB GLY	-74.45	21.96	-3.1	-5.60	26.42

A figura 11 mostra que o ligante B-TMCA conseguiu formar mais interações com o alvo A₁ do que o ligante PDB. Foram observadas interações de hidrogênio com os resíduos Leu88, Thr91, Glu172 e Ans284 na região do sítio ativo e interações hidrofóbicas com os aminoácidos Ile95, Val189, Leu250 e Ile274. Enquanto que o ligante PDB ADN formou apenas duas interações de hidrogênio (Glu172 e Asn254) e quatro interações hidrofóbicas (Phe171, Met180, Leu250 e Ile27).

Interações de hidrogênio também foram observadas entre os resíduos Ser353, Tyr355, Gly526 e Ser530 do alvo COX-2 e o ligante B-TMCA (Figura 12). Além disso, interações hidrofóbicas também puderam ser observadas com os aminoácidos Val349, Leu352, Ala527 e Leu531. Interações similares também foram observadas para o ligante ID8 e a COX-2.

Figura 11. Visualização das interações 2D e 3D entre os ligantes (B-TMCA e 8K8) e o alvo A₁. A – Complexo A₁-ligantes. B e C – Interações 3D e 2D entre o ligante B-TMCA e aminoácidos do A₁. D e E – Interações 3D e 2D entre o ligante ADN e aminoácidos do A₁. Em verde, estão representadas as interações de hidrogênios e em rosa, as interações hidrofóbicas.

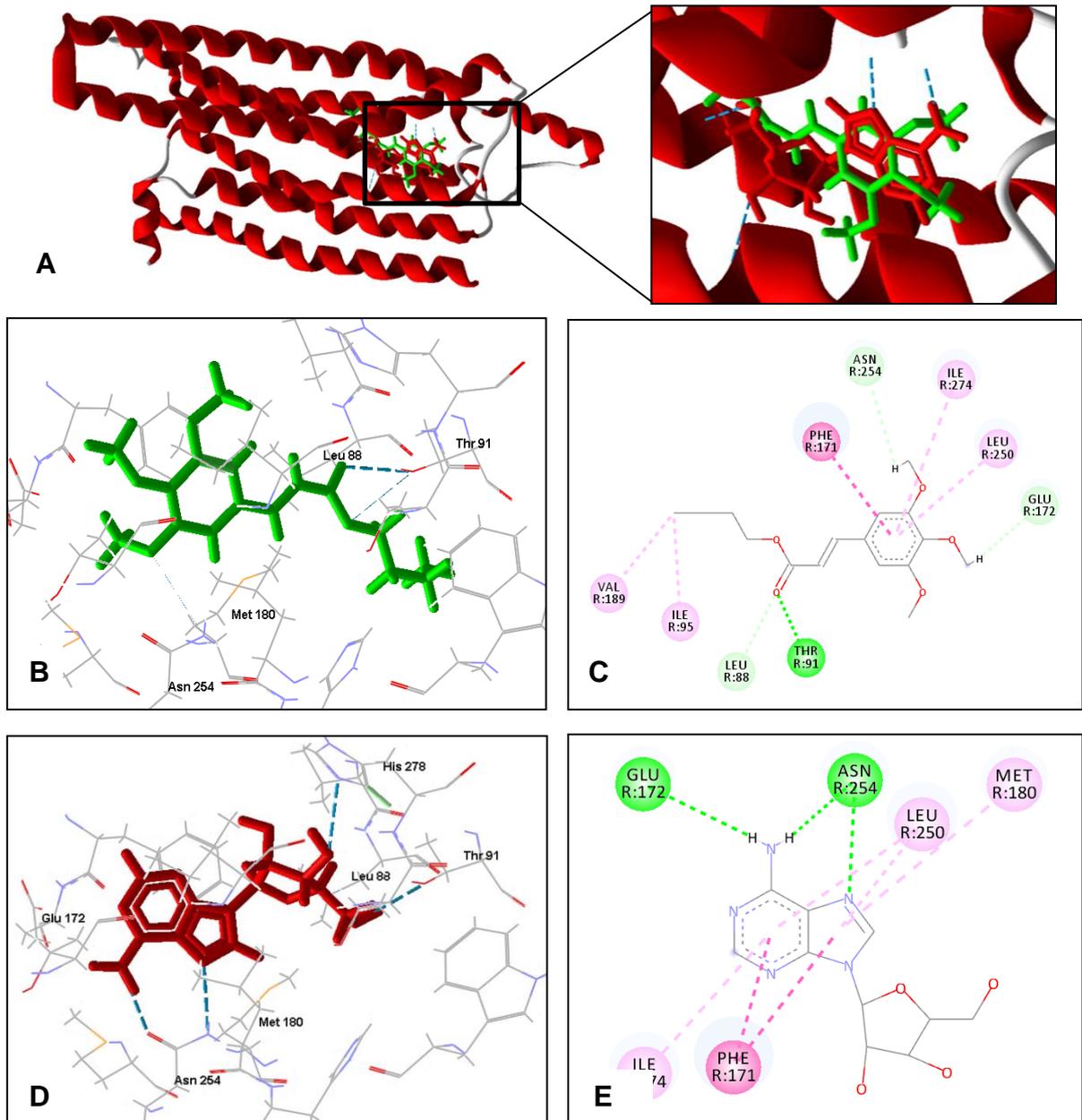
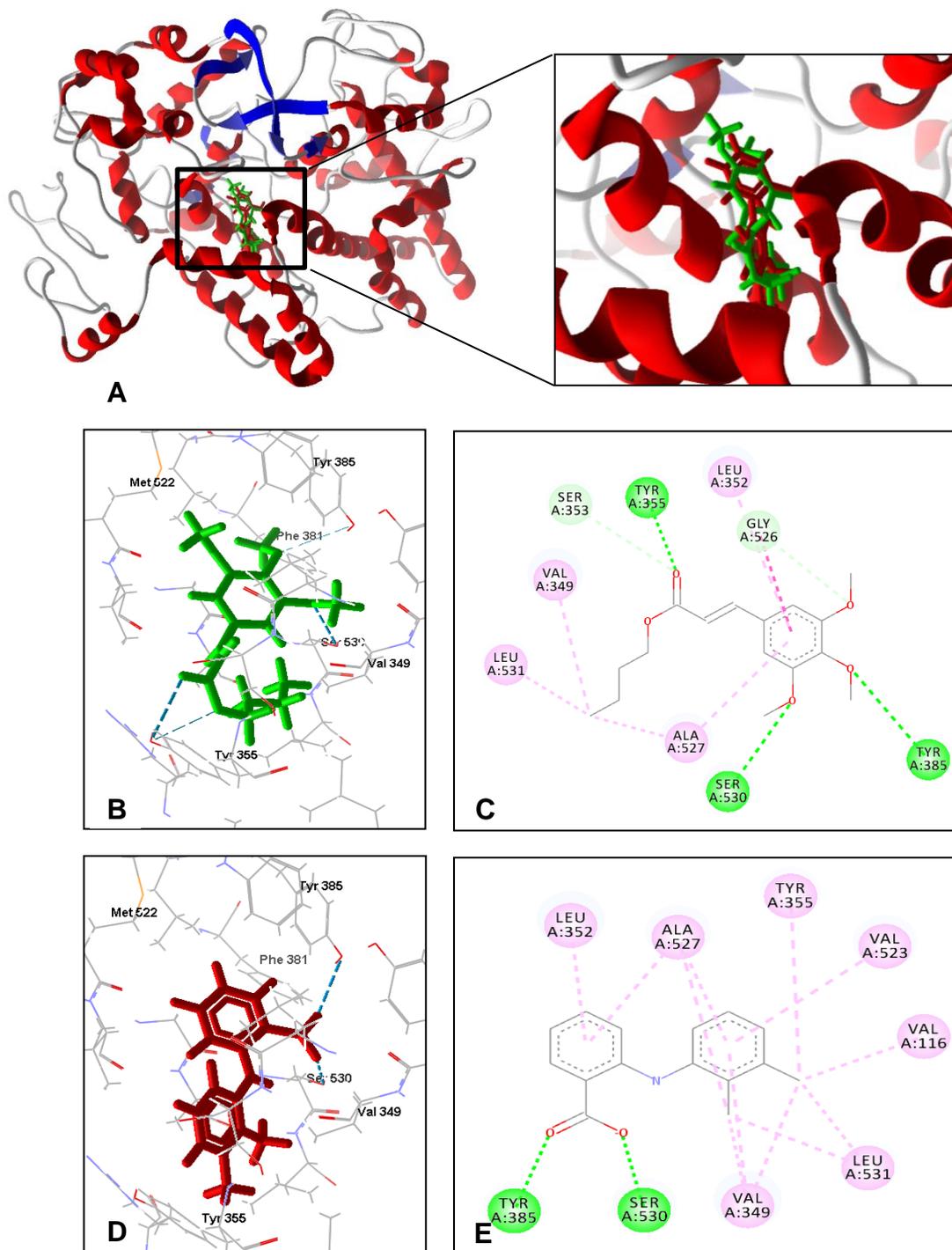


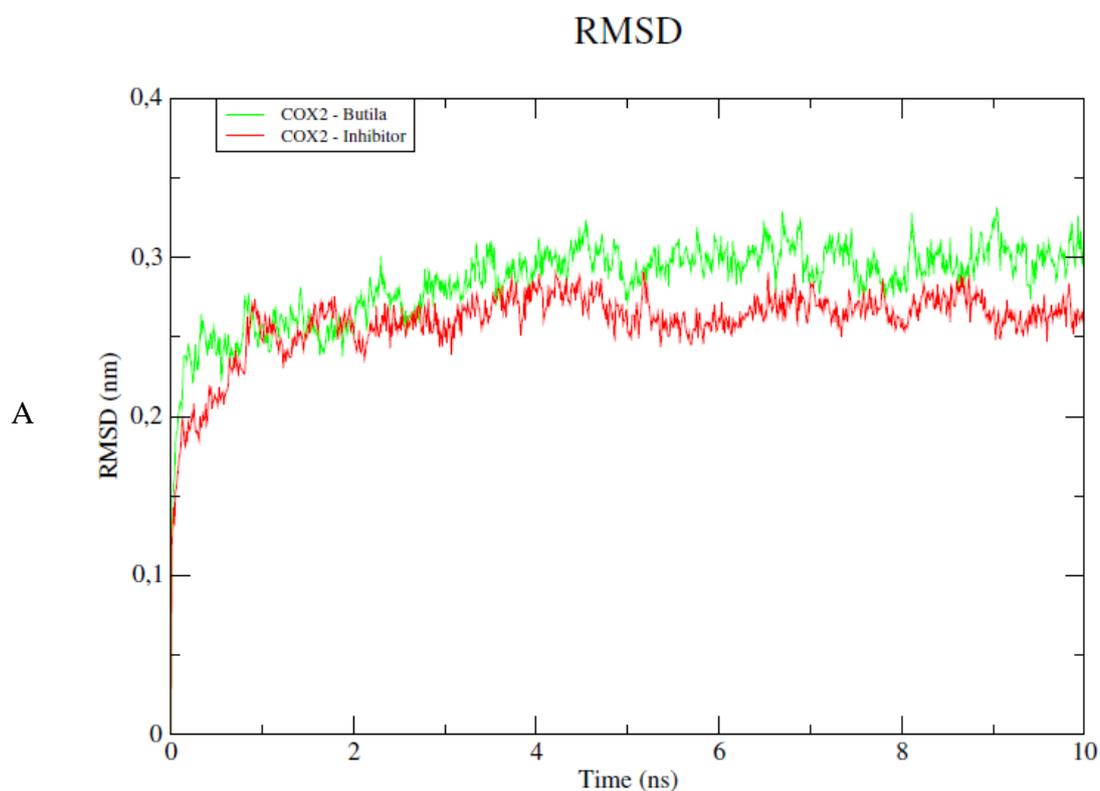
Figura 12. Visualização das interações 2D e 3D entre os ligantes (B-TMCA e ID8) e o alvo COX-2. A – Complexo COX-2-ligantes. B e C – Interações 3D e 2D entre o ligante B-TMCA e aminoácidos do COX-2. D e E – Interações 3D e 2D entre o ligante ID8 e aminoácidos do COX-2. Em verde, estão representadas as interações de hidrogênio e em rosa, as interações hidrofóbicas.

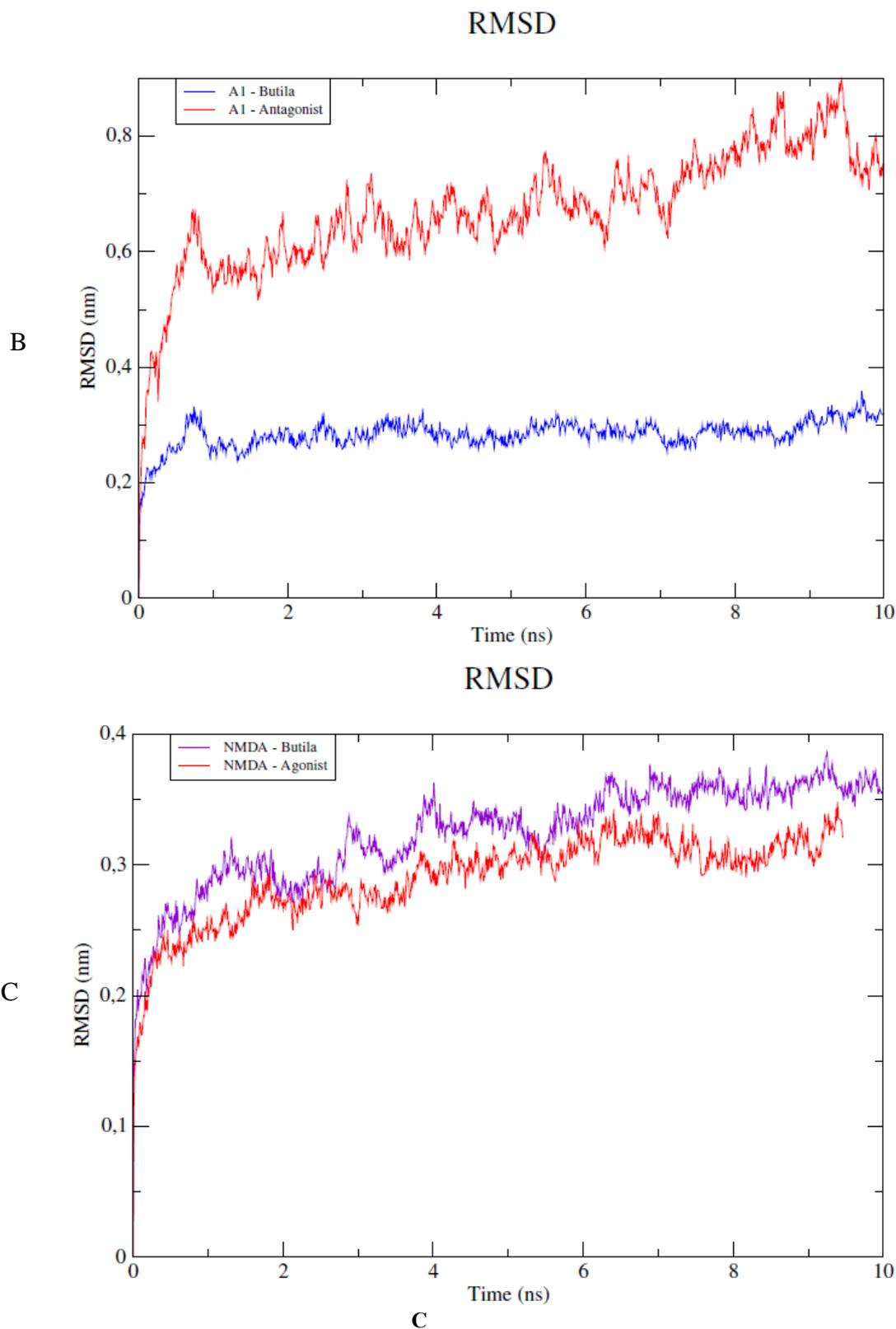


6.4. Simulações de dinâmica molecular

As simulações de dinâmica molecular foram realizadas com os melhores resultados no *docking*. Portanto, as interações entre as enzimas COX-2, receptor A₁ e NMDA, o composto B-TMCA e os ligantes cristalográficos complexados, foram usados para estudar a flexibilidade e mudanças conformacionais dos complexos durante a simulação de dinâmica molecular. A análise de RMSD da COX-2 mostrou que a proteína atingiu conformações variando de 0,2 a 0,35 nm de tamanho em 10 ns. Os resultados mostraram que a proteína é estável (Gráfico 1A), sem alterações relevantes. Além disso, quando comparamos a flexibilidade da proteína complexada aos ligantes, verificamos que complexado a COX-2 à B-TMCA se mantém estável em quase toda a simulação similar ao RMSD da proteína não complexada, enquanto a COX-2 complexada ao inibidor também apresentou estabilidade, com menor RMSD. (Gráfico 1A). Para o receptor A₁, é possível observar estabilidade e baixa flutuação quando complexada com a B-TMCA (Gráfico 1B). Enquanto que o RMSD do receptor NMDA complexado a B-TMCA e ao inibidor possuem flutuações similares, com flutuações entre 0,2 e 0,35 nm (Gráfico 1C). Essa flutuação confere estabilidade aos dois complexos. Em geral, para as três proteínas, os resultados foram satisfatórios e sugerimos que essas proteínas são estáveis.

Gráfico 1. RMSD dos átomos de Ca das proteínas. A - COX-2 complexado aos compostos B-TMCA e inibidor. B – A₁ complexado aos compostos B-TMCA e o antagonista. C – NMDA complexado aos compostos B-TMCA e agonista.

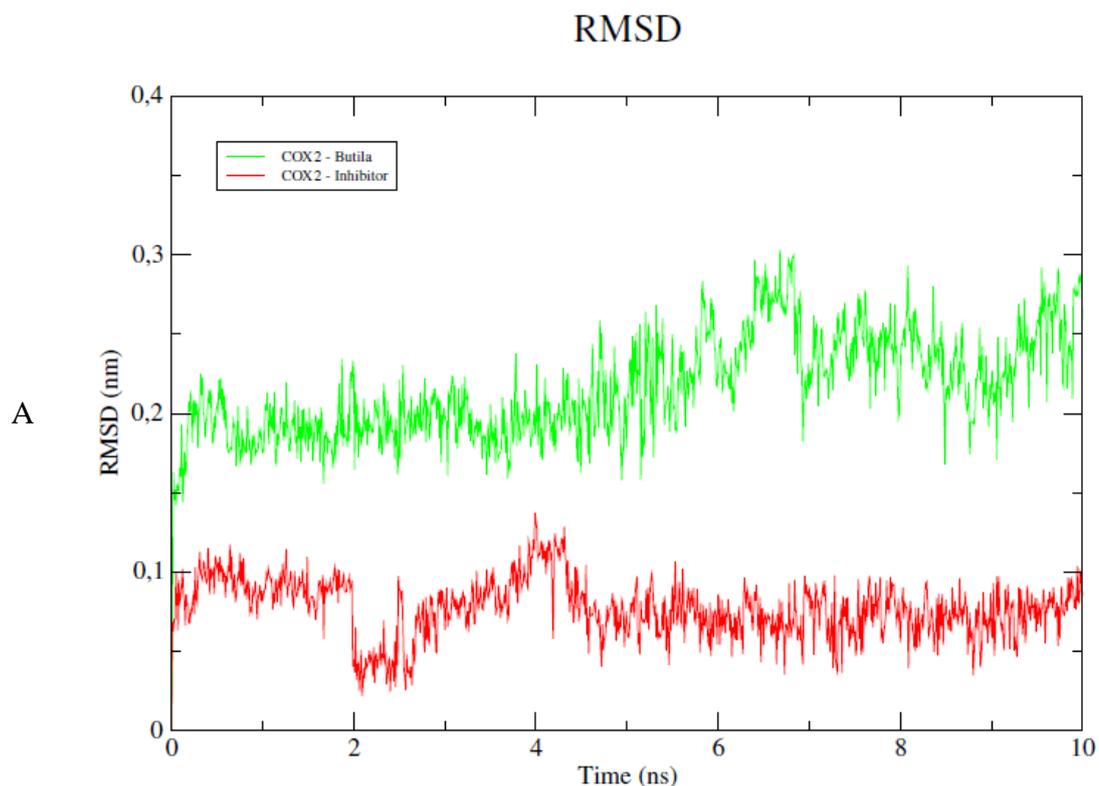


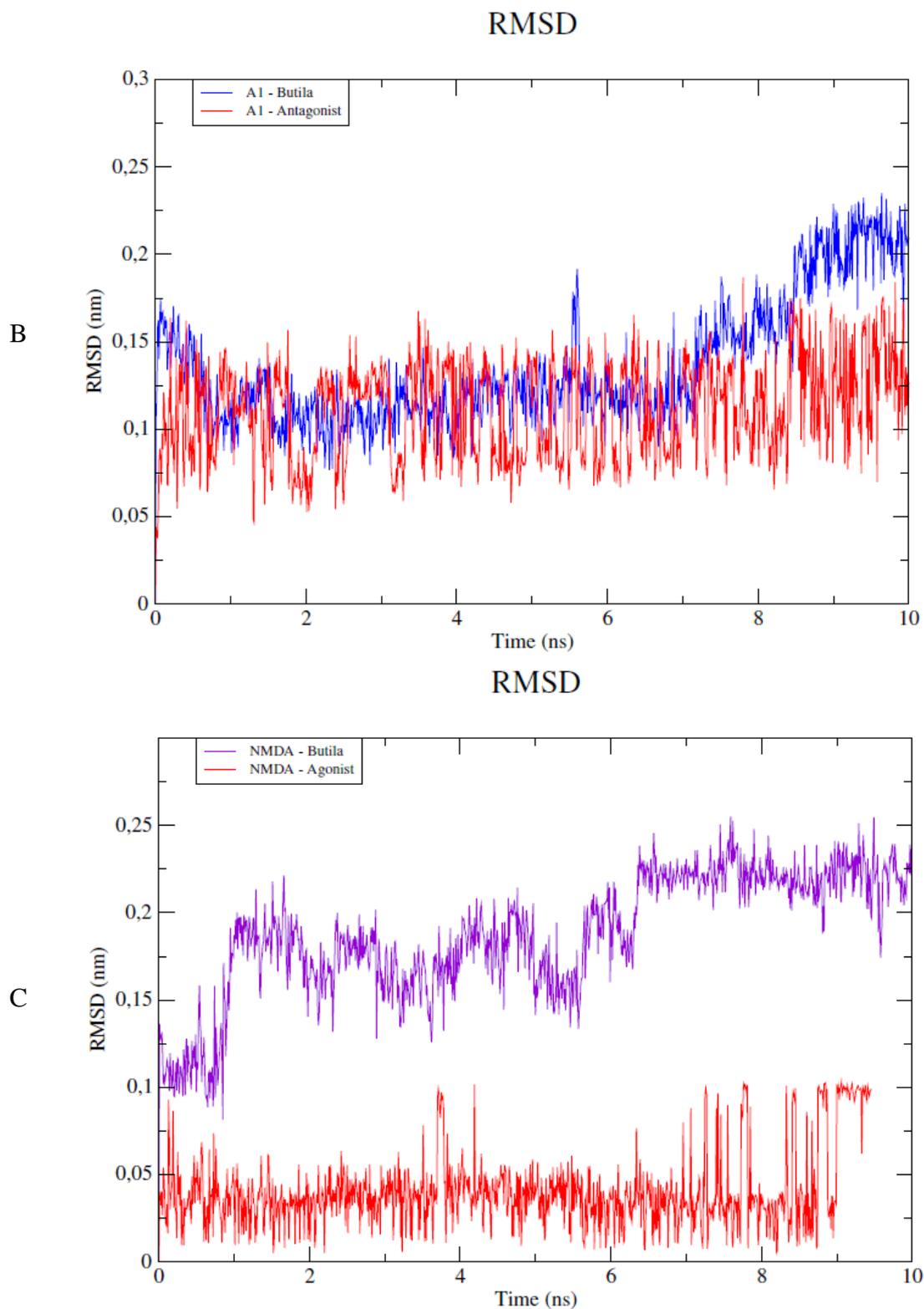


A análise de RMSD dos ligantes complexada à COX-2, mostrou que a B-TMCA é mais estável até os 5 ns, apresentando picos de instabilidade a partir de 6 ns. O ligante cristalográfico, apresentou estabilidade a partir dos 4 ns com RMSD abaixo de 1 nm (Gráfico 2A). Enquanto

que a B-TMCA e o antagonista complexados ao receptor A₁ apresentaram estabilidade em quase toda a simulação de dinâmica molecular (Gráfico 2B). Já a B-TMCA complexada ao NMDA não apresentou estabilidade, diferentemente do agonista que apresentou estabilidade até 7 ns (Gráfico 2C).

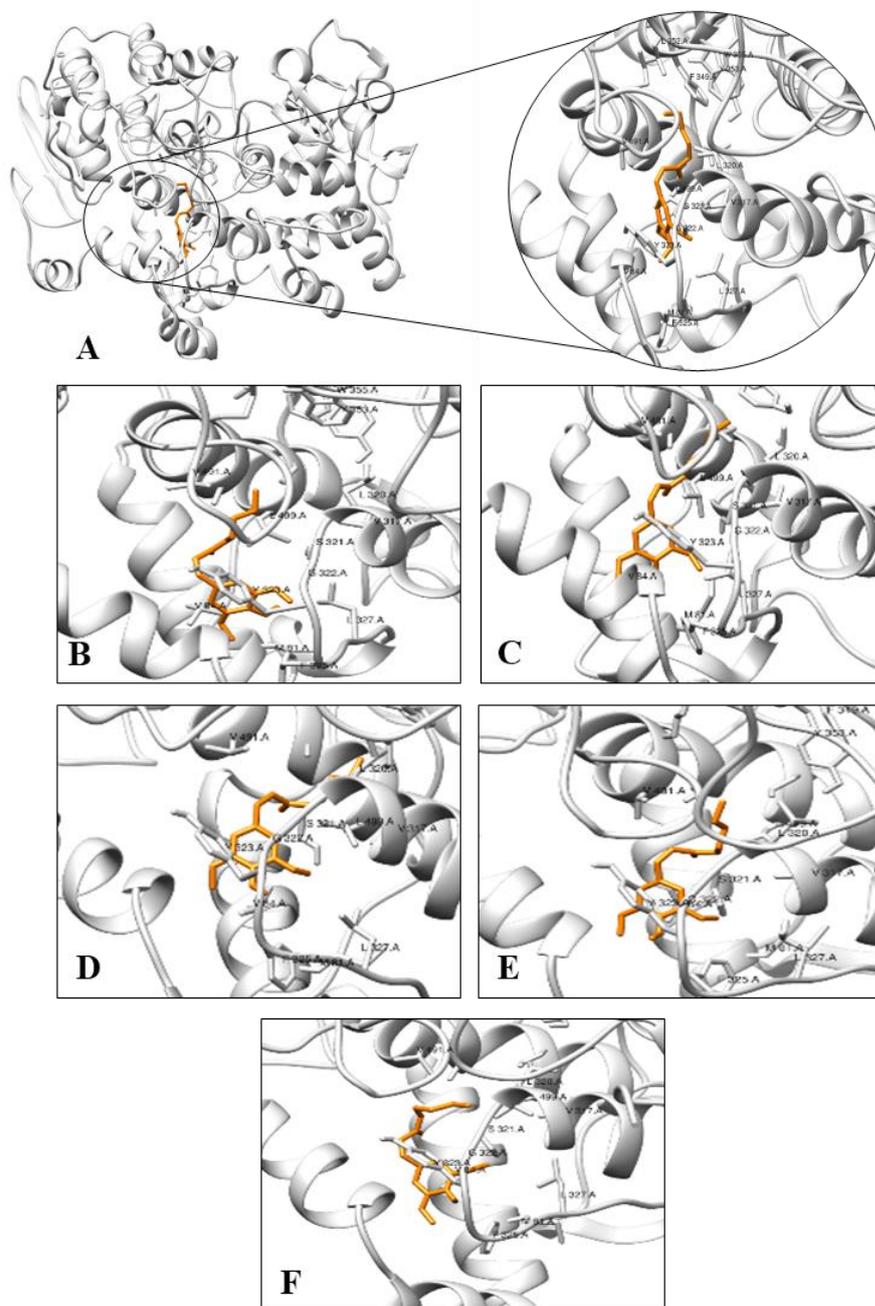
Gráfico 2. RMSD dos átomos de C α dos ligantes. A - COX-2 complexado aos compostos B-TMCA e inibidor. B – A₁ complexado aos compostos B-TMCA e o antagonista. C – NMDA complexado aos compostos B-TMCA e agonista.





Analisamos através de programas gráficos, os complexos com melhores resultados no *docking* molecular, como a B-TMCA complexada à COX-2 (Figura 13).

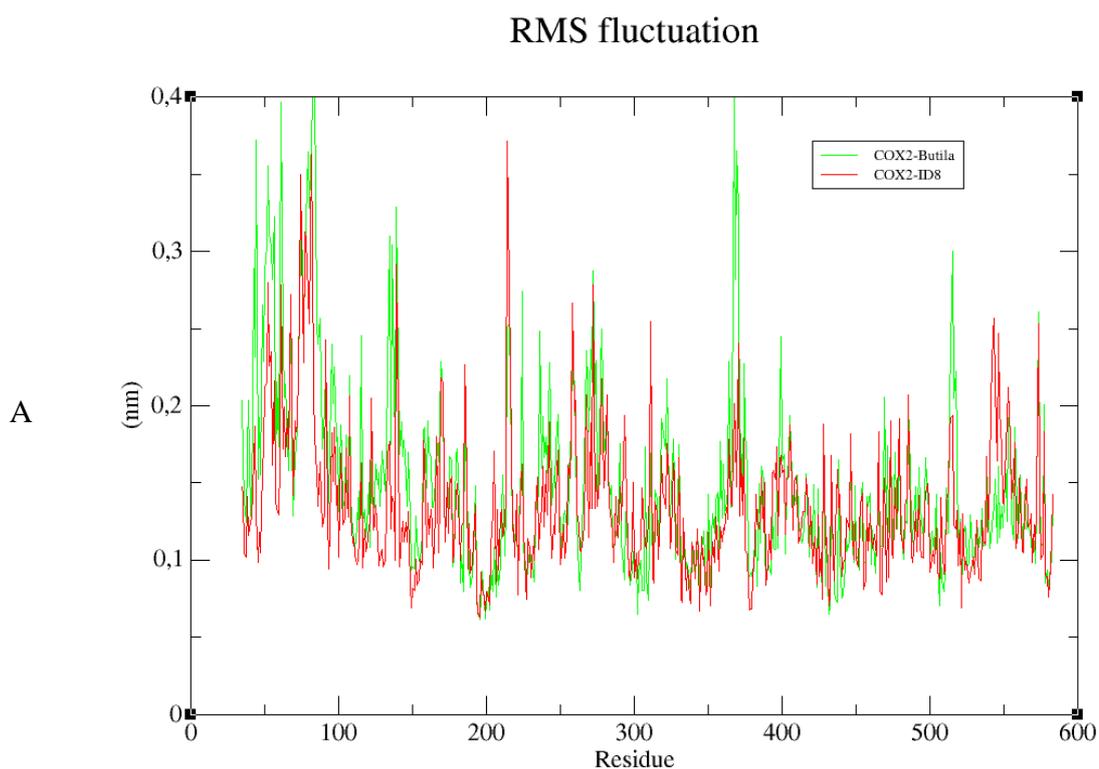
Figura 13. Simulações de dinâmica molecular durante 1000ps. A – Estrutura do complexo COX-2-B-TMCA e seu sítio ativo, B – estrutura inicial, C – 200ps, D – 400ps, E – 600ps e F – 800ps e G – 1000ps.



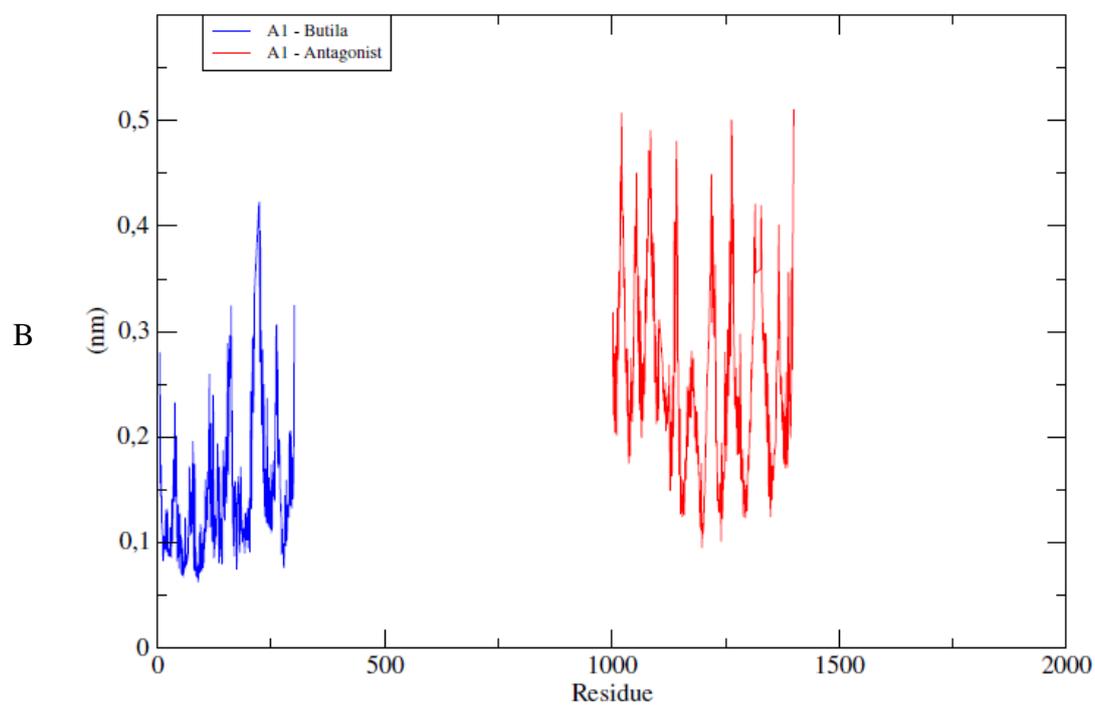
Para compreender a flexibilidade dos resíduos e os aminoácidos que contribuem para a mudança conformacional da COX-2, foram calculadas as flutuações médias da raiz quadrada (RMSF) de cada aminoácido da enzima. Considerando que os aminoácidos com flutuações acima 0,3 nm contribuem para a flexibilidade da estrutura proteica, constatamos que dentre os quase 600 aminoácidos presentes na proteína, nenhum contribui para a mudança conformacional. Os aminoácidos que foram identificados como responsáveis pela mudança estrutural da COX-2 foram: 44, 51-54, 56, 61, 74-84, 134, 136, 139, 369, 371 e 515 (Gráfico

3A). Portanto, nenhum dos aminoácidos responsáveis mudança conformacional da COX-2 faz parte do sítio ativo. Enquanto que para a enzima A₁, os resíduos que contribuem para a mudança estrutural da proteica estão nas posições: 213-224, 226, 228, 261, 262 e 301 (Gráfico 3B). Enquanto que para o NMDA são as posições: 3, 4, 24, 25, 33, 35-37, 57, 98-104 (Gráfico 3C).

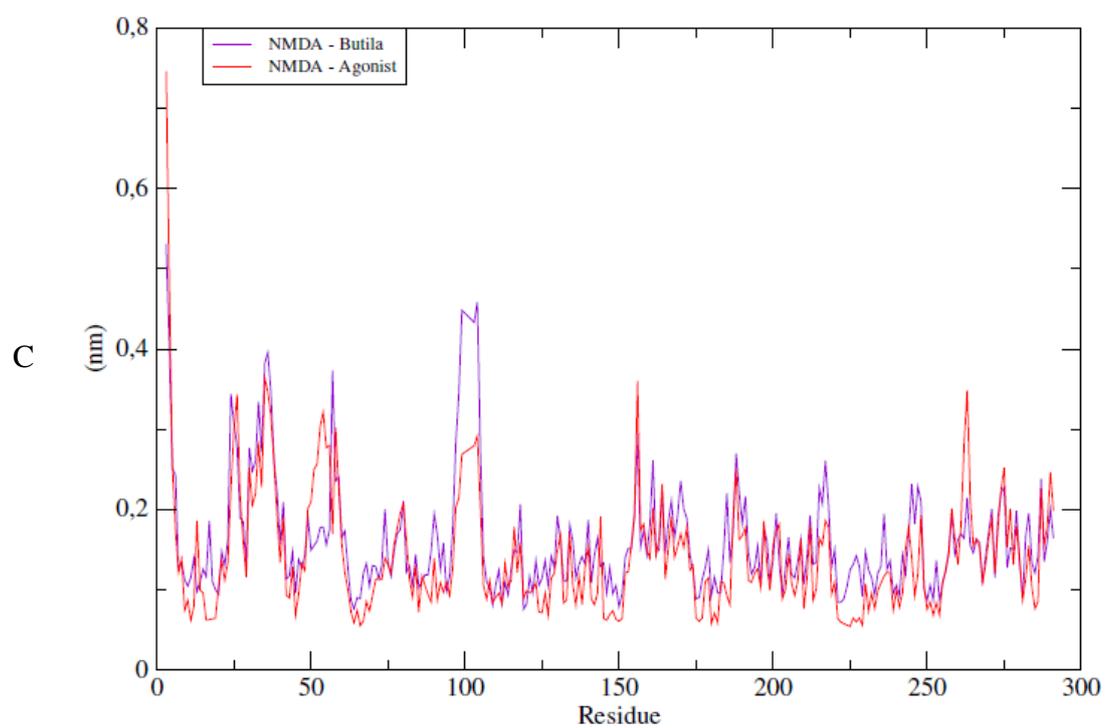
Gráfico 3. RMSF dos átomos de C α dos aminoácidos de cada proteína analisada. A - COX-2 complexado aos compostos B-TMCA e inibidor. B - A₁ complexado aos compostos B-TMCA e o antagonista. C - NMDA complexado aos compostos B-TMCA e agonista.



RMS fluctuation



RMS fluctuation



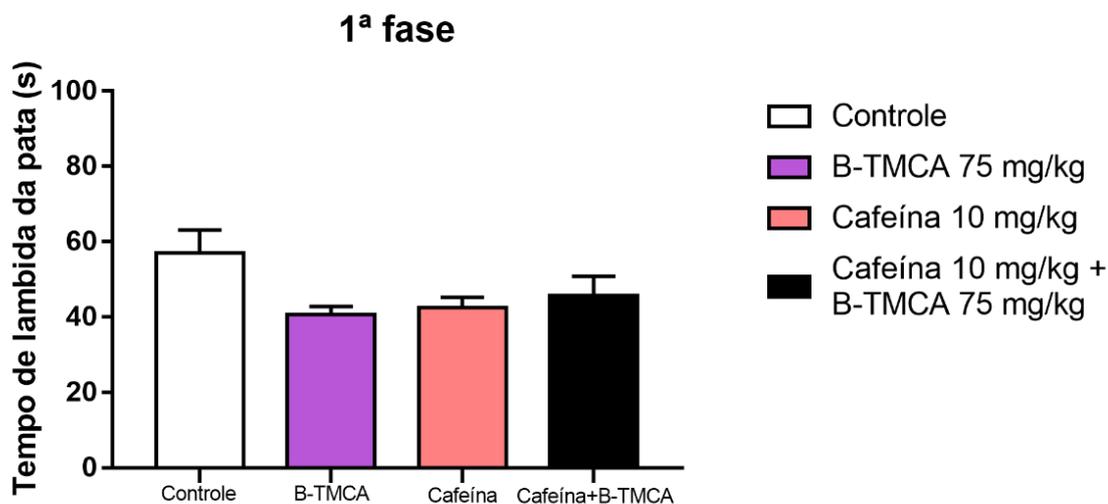
6.5. Investigação do mecanismo de ação da propriedade antinociceptiva do B-TMCA

6.5.1. Envolvimento do sistema adenosinérgico na atividade antinociceptiva do B-TMCA

Na primeira fase do teste da formalina não foi possível observar qualquer efeito inibitório significativo em todos os grupos tratados quando comparados ao grupo controle ($57,0 \pm 6,1$ s) (Figura 14).

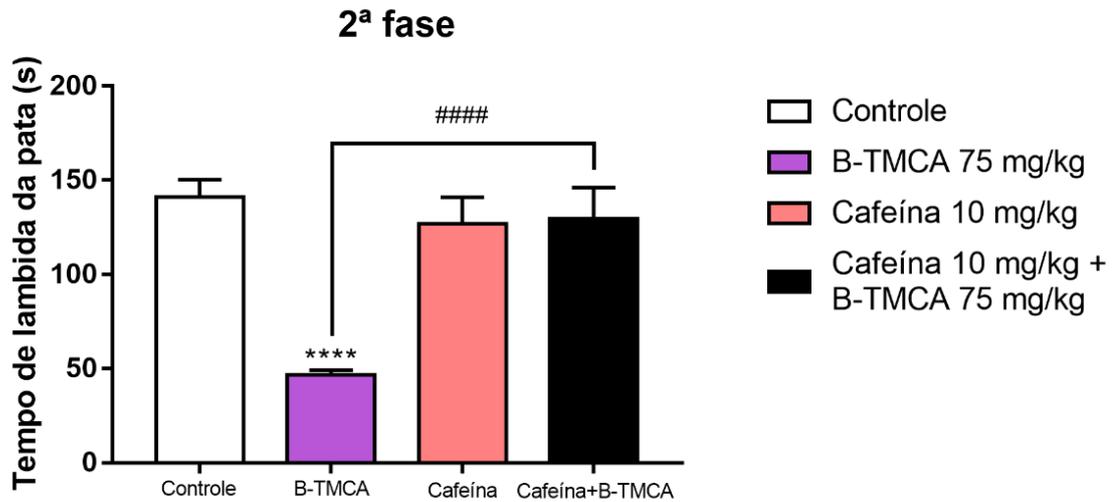
No entanto, na segunda fase verificou-se que o pré-tratamento com B-TMCA na dose de 75 mg/kg (i.p.) reduziu, significativamente, o tempo que os animais passaram lambendo a pata ($46,5 \pm 2,6$ s). Também nesta fase, a administração de cafeína + B-TMCA ($129,6 \pm 16,4$ s) não foi capaz de reduzir significativamente o tempo de lambida, quando comparados com o grupo controle ($141,3 \pm 9,0$ s). Contudo, ao comparar o grupo cafeína + B-TMCA com o grupo B-TMCA é possível notar a reversão do efeito inibitório (Figura 15).

Figura 14. O efeito do 3,4,5-trimetoxicinamato de butila (75 mg/kg, i.p.) e cafeína (10 mg/kg, s.c.) na primeira fase do teste da formalina.



Cada barra representa a média \pm EPM de seis animais. **** $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo controle (ANOVA seguida pelo teste de Dunnett) e ### $p < 0,001$ quando comparados entre os grupos (teste 't' *post hoc*).

Figura 15. O efeito do 3,4,5-trimetoxicinamato de butila (75 mg/kg, i.p.) e cafeína (10 mg/kg, s.c.) na segunda fase do teste da formalina.

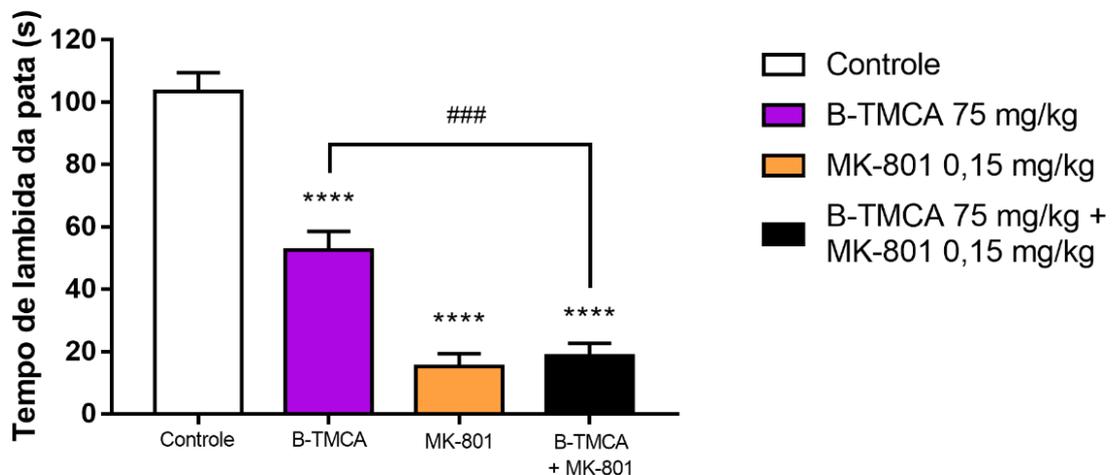


Cada barra representa a média \pm EPM de seis animais. **** $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo controle (ANOVA seguida pelo teste de Dunnett) e #### $p < 0,001$ quando comparados entre os grupos (teste 't' *post hoc*).

6.5.2. Envolvimento do sistema glutamatérgico na atividade antinociceptiva do B-TMCA

No teste do glutamato o B-TMCA (75 mg/kg, i.p.) ($52,6 \pm 6,0$ s), MK-801 (0,15 mg/kg, i.p.) ($15,1 \pm 4,2$ s) e MK-801 + B-TMCA ($18,5 \pm 4,1$ s) inibiram a resposta antinociceptiva induzida pela administração intraplantar de glutamato (20 μ mol/pata) quando comparados ao grupo controle ($103,4 \pm 6,0$ s). Ao realizarmos a comparação entre os grupos B-TMCA e MK-801 + B-TMCA houve diferença estatística significativa, demonstrando que o B-TMCA não tem efeito semelhante ao antagonista do receptor glutamatérgico subtipo NMDA (Figura 16).

Figura 16. O efeito do 3,4,5-trimetoxicinamato de butila (75 mg/kg, i.p.) e MK-801 (0,15 mg/kg, i.p.) no teste do glutamato.



Cada barra representa a média \pm EPM de seis animais. **** $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo controle (ANOVA seguida pelo teste de Dunnett) e #### $p < 0,001$ quando comparados entre os grupos (teste 't' *post hoc*).

7. Discussão

A dor, como condição fisiopatológica tem sido amplamente estudada, visto que, apesar dos tratamentos convencionais, as drogas existentes exibem reações adversas indesejáveis. Sendo assim, a busca por terapias que minimizem esses efeitos é promissora. As plantas e seus derivados orgânicos têm demonstrado vários efeitos biológicos animadores, no qual o uso de fitoterápicos vem crescendo cada vez mais. Sendo assim, a exploração de novos compostos químicos, análogos às moléculas produzidas pelas plantas, representam uma perspectiva para novos fármacos, pois podem apresentar uma atividade farmacológica melhorada, menor toxicidade e maior potencial terapêutico, quando comparados aos fármacos convencionais (LIM *et al.*, 2021).

Os fenilpropanoides, constituintes dos óleos essenciais, são bem conhecidos pelo seu alto potencial terapêutico para o tratamento de diversas doenças, principalmente as que abrangem a dor. (DA NÓBREGA *et al.*, 2018; ARAGÃO NETO *et al.*, 2019; FONSECA *et al.*, 2016; MONTEIRO *et al.*, 2021; SCOTTI *et al.*, 2020).

Nesse contexto, dois derivados do TMCA, um fenilpropanoide de origem natural, foram sintetizados, no qual modificações da cadeia lateral do grupo carboxila produziram M-TMCA e B-TMCA. M-TMCA é uma substância que é conhecida na literatura por seus vários efeitos farmacológicos (JUNG *et al.*, 2013; KAWASHIMA *et al.*, 2004; YU *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2013), e o B-TMCA é descrito apenas uma vez na literatura (NÓBREGA *et al.*, 2019). Sendo assim, a pesquisa sobre a atividade antinociceptiva dessas moléculas é importante, pois não foram encontrados quaisquer relatos na literatura científica a respeito dessa propriedade farmacológica.

Os estudos do M-TMCA e B-TMCA se iniciaram de forma a avaliar um possível efeito tóxico e determinar as doses seguras que seriam utilizadas no decorrer dessa pesquisa. O primeiro passo foi obter a DL₅₀. Utilizando as diretrizes da OECD, esta foi estimada em 500 mg/kg (i.p.), demonstrando que esse composto é de baixa toxicidade. Sendo assim, as doses utilizadas foram fixadas em 50, 75 e 100 mg/kg, visto que a literatura também apresenta estudos de derivados do ácido cinâmico com doses próximas das estabelecidas (GUNIA *et al.*, 2012).

Outro teste feito simultaneamente com a DL₅₀ foi a triagem farmacológica, com o objetivo de traçar o perfil do M-TMCA e B-TMCA no sistema nervoso central e autônomo, no qual os parâmetros comportamentais observados caracterizaram as duas drogas como possíveis depressoras do sistema nervoso central, pois apresentaram os efeitos de ambulação diminuída, analgesia, reflexo do endireitamento e resposta ao toque diminuídos, e de acordo Almeida e

Oliveira (2006) drogas que apresentam essas características possuem um perfil depressor, indicando que testes para avaliar a atividade antinociceptiva forneceriam resultados promissores. Tal atividade farmacológica também pode ser observada em diversos fenilpropanoides, como o álcool cinâmico e orto-eugenol (FONSECA *et al.*, 2016; MONTEIRO *et al.*, 2021).

A resposta nociceptiva pode ser alterada por compostos que alteram a atividade locomotora (VILLALBA *et al.*, 2014). Diante disso, para detectar algum comprometimento do tônus muscular ou coordenação motora o teste da barra giratória (rota-rod) foi utilizado demonstrando que em nenhuma das doses testadas, para ambas as substâncias, a coordenação motora dos animais tratados foi afetada, excluindo um efeito miorrelaxante e uma resposta falso-positiva no comportamento antinociceptivo (PAULA-FREIRE *et al.*, 2013). O álcool cinâmico nas doses de 6.25, 12.5 e 25 mg/kg i.p., não alterou a coordenação motora em camundongos submetidos ao mesmo teste (MONTEIRO *et al.*, 2021). Contudo, o α -asarone, um fenilpropanoide, na dose de 100 mg/kg i.p., promoveu comprometimento do tônus muscular no teste do rota-rod (PAGES *et al.*, 2010). Isso demonstra que drogas da mesma classe farmacológica podem apresentar perfis farmacológicos distintos.

A atividade antinociceptiva do M-TMCA e B-TMCA foi avaliada usando modelos químicos de nocicepção. O primeiro teste a ser realizado foi o de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. Esse teste é caracterizado como um modelo de dor visceral clássico, no qual a injeção de ácido acético estimula a liberação de vários mediadores inflamatórios como bradicinina, serotonina, substância P, histamina e eicosanoides, além de ativar nociceptores somáticos e viscerais que inervam o peritônio, causando irritação que é caracterizada por contrações abdominais e por estiramento das patas traseiras (SATYANARAYANA *et al.*, 2004).

Nossos dados mostram que o M-TMCA e B-TMCA reduziram o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em comparação ao grupo controle. Além disso, é possível observar que há uma diferença significativa ao comparar os grupos entre si que receberam as doses de 75 e 100 mg/kg i.p., demonstrando que a dose de 75 mg/kg do B-TMCA é tanto a mais efetiva. Observa-se também que, ao se comparar o grupo tratado com a dose de 75 mg/kg do B-TMCA com o grupo tratado com a dose de 10 mg/kg de morfina (no qual houve inibição completa das contorções abdominais), não há diferença estatística significativa. Portanto, o mecanismo de ação pode estar relacionado à redução na liberação de mediadores inflamatórios ou bloqueio direto dos receptores que causam a nocicepção. Os dados são semelhantes a outros estudos realizados com fenilpropanoides que demonstram redução no

número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético quando essas drogas são administradas (ARAGÃO NETO *et al.*, 2019; FONSECA *et al.*, 2016).

O teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético por si só não é capaz de caracterizar se uma droga atua a nível central ou periférico, por isso, a atividade central ou periférica deve ser confirmada por outros testes mais específicos (KAWAURA *et al.*, 2011).

O teste de formalina foi escolhido para caracterizar se a droga possui uma atividade periférica, além da central. Tal teste possui uma abordagem metodológica que envolve duas fases distintas, sendo considerado um modelo bifásico de comportamento da dor, no qual o tempo de lambida da pata que recebe um estímulo nocivo (formalina) é avaliado. A fase neurogênica, contabilizada de 0 a 5 minutos, é resultante da estimulação direta dos nociceptores periféricos como o TRPA1 presentes nas fibras aferentes primárias, principalmente as do tipo C; a inibição desta fase é indicativa de drogas analgésicas que atuam a nível central. Em seguida, há um período interfase que dura aproximadamente 10 minutos e resulta de uma ativação de mecanismos inibitórios da dor. Na sequência, ocorre a fase inflamatória, contabilizada no tempo de 15 a 30 minutos, que é gerada tanto pela estimulação dos nociceptores como pela liberação de mediadores inflamatórios como bradicinina, serotonina, substância P, óxido nítrico e prostaglandina E2, induzida pela fase neurogênica. (HUNSKAAR; HOLE, 1987; TJØLSEN *et al.*, 1992; PARADA *et al.*, 2001; FISCHER *et al.*, 2014).

Nossos resultados demonstram que, na primeira fase do teste de formalina, apenas o B-TMCA foi capaz de reduzir, significativamente, o tempo de lambida da pata. Enquanto que na segunda fase do teste, tanto o M-TMCA quanto o B-TMCA foram capazes de reduzir, de forma significativa, o tempo de lambida. Esse achado sugere um efeito anti-inflamatório pronunciado e corroboram com estudos de derivados cinâmicos no qual a atividade anti-inflamatória foi avaliada (MONTEIRO *et al.*, 2021; OLAJIDE *et al.*, 2020).

A partir destes resultados obtidos nos testes comportamentais é possível inferir que o M-TMCA e B-TMCA são dotados de uma possível atividade antinociceptiva inédita sem alterar a coordenação motora do animal, pelos modelos experimentais propostos neste trabalho. É ainda sugerido que os efeitos antinociceptivos do B-TMCA superem os do M-TMCA, mostrando que uma mudança estrutural na molécula pela adição de uma cadeia carbônica maior pode melhorar a atividade farmacológica da mesma. A literatura nos traz exemplos de que modificações químicas em moléculas com efeitos farmacológicos definidos podem melhorar a atividade antinociceptiva (DE SOUSA *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2018; ZHENG *et al.*, 2019).

Baseado nos testes comportamentais realizados, buscou-se realizar as análises *in silico* que nos permitissem propor um mecanismo de ação pelo qual é sugerido o efeito

antinociceptivo. O *docking* é um método capaz de prever a conformação mais estável entre um ligante e uma proteína contribuindo para a descoberta de drogas eficazes. Neste estudo, os resultados do *docking* foram validados pelo *redocking*, que consiste em posicionar e prever a afinidade de ligação do ligante cristalográfico na região do sítio ativo da enzima. O RMSD compara e calcula o desvio da raiz quadrada média das poses obtidas pelo *redocking* e a estrutura do ligante obtida experimentalmente. Para que o *docking* seja considerado confiável, é necessário que o valor de RMSD seja igual ou inferior a 2.0Å. O *docking consenso*, é um método de pontuação comumente usados com *docking* molecular para a triagem virtual de ligantes potenciais para uma proteína alvo, que consiste em combinam resultados de diferentes programas de *docking*, calculando a média da pontuação ou classificação de cada molécula obtida de programas individuais (PALACIO-RODRÍGUEZ *et al.*, 2019). Estas metodologias foram utilizadas em nosso estudo atestando que os resultados do *docking consenso* mostraram que o composto M-TMCA obteve valores de predição de energia de ligação superior ao ligante cristalográfico apenas para o alvo COX-2, enquanto que o composto B-TMCA obteve valores de predição de energia de ligação superior ao ligante cristalográfico apenas para os alvos A₁, COX-2 e NMDA.

A partir disso, as simulações de dinâmica molecular foram realizadas com os melhores resultados obtidos no *docking consenso*, ou seja, entre o B-TMCA e os alvos COX-2, A₁ e NMDA. Para isso, o desvio médio quadrático (RMSD) foi calculado para os átomos de Ca da enzima e das estruturas de cada ligante separadamente. O composto B-TMCA, se mantiveram estáveis e com baixas flutuações em quase toda a simulação quando complexadas aos três alvos. Isso demonstra vantagem na afinidade da ligação, diminuindo a possibilidade de rompimento de importantes ligações. Já na análise de RMSD dos ligantes complexados à COX-2 mostrou que, embora a proteína sofra pequenas alterações estruturais e o B-TMCA tenha picos de instabilidade, a molécula tende a permanecer no sítio ativo. O mesmo ocorre para os ligantes complexados aos receptores A₁ e NMDA. Dessa maneira, a afinidade de ligação não é perdida mesmo na presença de diferentes fatores como temperatura, pressão solvente e íons. Nesse contexto, o B-TMCA complexado à COX-2, A₁ e NMDA foram analisados através de programas gráficos, no qual foi observado que estes permanecem no sítio ativo interagindo com diferentes aminoácidos. Resíduos com altos valores de RMSF sugerem mais flexibilidade e valores baixos de RMSF refletem menor flexibilidade. Segundo Orlando e Malkowski (2016), os principais resíduos envolvidos na ligação com inibidores são R120, Y355, Y385, W387, E524, S530 e L531. Nenhum dos aminoácidos responsáveis pela mudança conformacional da COX-2, A₁ e NMDA faz parte do sítio ativo.

De acordo com essas análises, sugere-se que o B-TMCA apresente atividade biológica atuando através de sua ligação com a enzima COX-2, e receptores A₁ e NMDA. Logo, buscamos verificar o mecanismo de ação do B-TMCA através de testes *in vivo*, utilizando antagonistas dos receptores A₁ e NMDA.

A participação do sistema adenosinérgico no mecanismo de ação do B-TMCA foi então investigada. A adenosina atua sobre os seus receptores (A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃) acoplados a proteína G (WU *et al.*, 2005). Os receptores A₁, presentes nas regiões periféricas, estão acoplados a proteína Gi, portanto o mecanismo de ação antinociceptiva inclui a inibição da enzima adenilato ciclase e, conseqüentemente, diminuição dos níveis intracelulares de AMPc, provocando a abertura dos canais de potássio, o que promove hiperpolarização celular e inibição da abertura dos canais de cálcio voltagem-dependente, reduzindo assim a liberação de neurotransmissores e, portanto, o estímulo doloroso (BORGHI *et al.*, 2002; PATEL, PINNOCK, LEE, 2001). A cafeína atua no sistema nervoso central antagonizando não seletivamente os receptores de adenosina A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃, promovendo o aumento do AMPc por meio da inibição da fosfodiesterase e liberação intracelular de cálcio (CARRILLO; BENITEZ, 2000; SHI; PADGETT; DALY, 2003).

O pré-tratamento com a cafeína foi capaz de inibir o efeito antinociceptivo do B-TMCA na fase inflamatória do teste de formalina, indicando o possível envolvimento dos receptores A₁ na antinocicepção promovida pelo B-TMCA.

O glutamato é um neurotransmissor excitatório liberado pelo SNC e SNP em repostas a um estímulo nociceptivo (YASHPAL *et al.*, 2001). Além disso, ele está envolvido em vários processos fisiológicos, como aprendizagem e memória (BEIRITH *et al.*, 2002; WILHELM *et al.*, 2009). Quando ele é administrado há uma ativação direta das fibras aferentes primárias, o que resulta na liberação de mediadores inflamatórios, bem como ativação dos receptores glutamatérgicos (AMPA e NMDA), que se abrem permitindo o influxo de íons Na⁺ e Ca²⁺, promovendo a propagação do potencial de ação pelo neurônio e, conseqüentemente, uma resposta nociceptiva (BORDI; UGOLINI, 1999, SCHUMACHER; BASBAUM; WAY, 2012).

Nossos resultados mostram que o B-TMCA teve efeito antinociceptivo no teste do glutamato, sugerindo uma possível interação com o sistema glutamatérgico. Contudo o MK-801 teve um melhor resultado na diminuição da lambida da pata do animal. Sendo assim, mais estudos são necessários para esclarecer a ação do B-TMCA sobre os receptores NMDA.

8. Conclusão

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, foi possível concluir que:

- ✓ O M-TMCA e B-TMCA apresentam um bom limite de segurança para sua utilização, apresentando uma DL_{50} estimada em 500 mg/kg;
- ✓ M-TMCA e B-TMCA possuem um perfil de drogas depressoras do SNC;
- ✓ A administração de M-TMCA e B-TMCA em camundongos não altera a coordenação motora;
- ✓ O M-TMCA e B-TMCA apresentam importante inédita atividade antinociceptiva nos modelos de nocicepção química (testes de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético e no teste de formalina);
- ✓ O B-TMCA apresenta uma melhor atividade antinociceptiva quando comparado ao M-TMCA;
- ✓ O *docking consenso* demonstrou interações entre o M-TMCA e a enzima COX-2, enquanto o B-TMCA interage com a enzima COX-2 e receptores A_1 e NMDA;
- ✓ O B-TMCA apresentou envolvimento na transmissão do estímulo doloroso pelas vias adenosinérgicas e glutamatérgicas, atuando, possivelmente, sobre os receptores A_1 e NMDA.

REFERÊNCIAS

ABDOU, A. *et al.* Recent advances in chemical reactivity and biological activities of eugenol derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, p. 1-20, 2021.

ABRAHAM, M. J. *et al.* GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, v. 1, p. 19-25, 2015.

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

ALMEIDA, R. N.; OLIVEIRA, T. M. L. Triagem farmacológica comportamental. In: ALMEIDA, R. N. Psicofarmacologia: fundamentos práticos, 1º Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. cap. 11, p 131-137.

ANAND, K. J. S. *et al.* Assessment of continuous pain in newborns admitted to NICU s in 18 European countries. **Acta paediatrica**, v. 106, n. 8, p. 1248-1259, 2017.

ANDERSSON, H. I. *et al.* Impact of chronic pain on health care seeking, self care, and medication. Results from a population-based Swedish study. **Journal of Epidemiology & Community Health**, v. 53, n. 8, p. 503-509, 1999.

ANDRADE, L. N. *et al.* A review on anti-inflammatory activity of phenylpropanoids found in essential oils. **Molecules**, v. 19, n. 2, p. 1459-1480, 2014.

ARAGÃO NETO, H. C. *et al.* 2-Allylphenol reduces IL-1 β and TNF- α , promoting antinociception through adenosinergic, anti-inflammatory, and antioxidant mechanisms. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2019, 2019.

ARAÚJO, C. A. C. **Um Contributo Para O Desenvolvimento De Arquétipos – Revisão Integrativa Da Literatura Sobre A ‘Dor’**, 2014. p. 15. Dissertação (Curso de Mestrado em Enfermagem Médico-Cirúrgica), Escola Superior de Enfermagem do Porto, Porto, 2014.

AZAB, A.; NASSAR, A.; AZAB, A. N. Anti-inflammatory activity of natural products. **Molecules**, v. 21, n. 10, p. 1321, 2016.

BALIKI, M. N.; APKARIAN, A. V. Nociception, pain, negative moods, and behavior selection. **Neuron**, v.87, n.3, p474-491, 2015.

BASBAUM, A. I. *et al.* Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v.139, p.267-284, 2009.

BEIRITH, A. I.; SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the nociception and paw o edema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Research**, v.924, n.2, p.219-228, 2002.

BENARROCH, E. E. Pain-autonomic interactions: a selective review. **Clinical Autonomic Research**, v. 11, n. 6, p. 343-349, 2001.

BERENDSEN, H. J. C.; VAN DER SPOEL, D.; VAN DRUNEN, R. GROMACS: a message-passing parallel molecular dynamics implementation. **Computer physics communications**, v. 91, n. 1-3, p. 43-56, 1995.

BEZERRA, D. P. *et al.* Overview of the therapeutic potential of piplartine (piperlongumine). **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 3, p. 453-463, 2013.

BISTA, P.; IMLACH, W. L. Pathological mechanisms and therapeutic targets for trigeminal neuropathic pain. **Medicines**, v. 6, n. 3, p. 91, 2019.

BONDI, A. van. van der Waals volumes and radii. **The Journal of physical chemistry**, v. 68, n. 3, p. 441-451, 1964.

BORDI, F. UGOLINI, A. Group I metabotropic glutamate receptors: implications for brain diseases. **Progress in Neurobiology**, v.59, n.1, p.55-79, 1999.

BORGHI, V. *et al.* Formalin-induced pain and μ -opioid receptor density in brain and spinal cord are modulated by A1 and A2a adenosine agonists in mice. **Brain research**, v. 956, n. 2, p. 339-348, 2002.

BREIVIK, H. *et al.* Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. **European journal of pain**, v. 10, n. 4, p. 287-333, 2006.

BROEKMANS, S. *et al.* Pharmacologic pain treatment in a multidisciplinary pain center: Do patients adhere to the prescription of the physician?. **The Clinical journal of pain**, v. 26, n. 2, p. 81-86, 2010.

BURHENNE, K.; KRISTENSEN, B. K.; RASMUSSEN, S. K. A new class of N-hydroxycinnamoyltransferases: purification, cloning, and expression of a barley agmatine coumaroyltransferase (EC 2.3. 1.64). **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 16, p. 13919-13927, 2003.

CARPENTER, K. J.; DICKENSON, A. H. Molecular aspects of pain research. **The pharmacogenomics journal**, v. 2, n. 2, p. 87-95, 2002.

CARR, F. B.; ZACHARIOU, V. Nociception and pain: lessons from optogenetics. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v8, n.69, p. 1-9, 2014.

CARRILLO, J. A.; BENITEZ, J. Clinically significant pharmacokinetic interactions between dietary caffeine and medications. **Clinical pharmacokinetics**, v. 39, n. 2, p. 127-153, 2000.

CHAPMAN, C.R.; GAVRIN, J. Suffering: the contributions of persistent pain. **The Lancet**, v.353, n.9171, p. 2233-2237, 1999.

CHEN, CY.; WEI, XD.; CHEN, CR. 3, 4, 5-Trimethoxycinnamic acid, one of the constituents of *Polygalae Radix* exerts anti-seizure effects by modulating GABAergic systems in mice. **Journal of pharmacological sciences**, v. 131, n. 1, p. 1-5, 2016.

- CLAUW, D. J. *et al.* Considering the potential for an increase in chronic pain after the COVID-19 pandemic. **Pain**, v. 161, n. 8, p. 1694, 2020.
- COLLIER, H. O. J. *et al.* The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British Journal of Pharmacological Chemistry**, v.32, p.295-310, 1968.
- CONEA, S. *et al.* Polyphenolic profile, anti-inflammatory and antinociceptive activity of an extract from *Arctium lappa* L. roots. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 45, n. 1, p. 59-64, 2017.
- CONTARDI, M. *et al.* Hydroxycinnamic acids and derivatives formulations for skin damages and disorders: A review. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 7, p. 999, 2021.
- COUTAUX, A. *et al.* Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, v.72, p.359-371, 2005.
- CUNHA, F. V. M. *et al.* Systematic review and technological prospecting: ethyl ferulate, a phenylpropanoid with antioxidant and neuroprotective actions. **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 29, n. 2, p. 73-83, 2019.
- DA NÓBREGA, F. R. *et al.* Piplartine analogues and cytotoxic evaluation against glioblastoma. **Molecules**, v. 23, n. 6, p. 1382, 2018.
- DA SILVA, J. A.; RIBEIRO-FILHO, N. P. Pain as a psychophysical problem. 2011.
- DA SILVA CALIXTO, P. *et al.* *In Silico* Study Examining New Phenylpropanoids Targets with Antidepressant Activity. **Current Drug Targets**, v. 22, n. 5, p. 539-554, 2021.
- DAHLHAMER, J. *et al.* Prevalence of chronic pain and high-impact chronic pain among adults—United States, 2016. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 67, n. 36, p. 1001, 2018.
- DALLAKYAN, S., AND OLSON, A. J. Small-molecule library screening by docking with PyRx. **Methods Mol Biol**. 1263, p243-250, 2015.
- DANILOV, A. B.; ISAGILYAN, E. D.; MACKASCHOVA, E. S. Psychogenic pain. **Zhurnal neurologii i psikiatrii imeni SS Korsakova**, v. 118, n. 11, p. 103-108, 2018.
- DE SOUSA, D. P. *et al.* Antinociceptive activity of structural analogues of rotundifolone: structure-activity relationship. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 62, n. 1-2, p. 39-42, 2007.
- DICKENSON, A. H.; SUZUKI, R.; REEVE, A.J. Adenosine as a potential analgesic target in inflammatory and neuropathic pains. **CNS Drugs**, v. 13, p. 77-85, 2000.
- DIMATTEO, M. R. *et al.* Patient adherence and medical treatment outcomes a meta-analysis. **Medical care**, p. 794-811, 2002.
- DRISCOLL, M. A. *et al.* Psychological interventions for the treatment of chronic pain in adults. **Psychological Science in the Public Interest**, v. 22, n. 2, p. 52-95, 2021.

- DUBIN, A. E. *et al.* Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **The Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 11, p. 3760-3772, 2010.
- DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, v.46, n.3, p.208-209, 1957.
- EDWARDS, S. *et al.* Alcohol and pain: A translational review of preclinical and clinical findings to inform future treatment strategies. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 44, n. 2, p. 368-383, 2020.
- EDWARDS, R. R. *et al.* The role of psychosocial processes in the development and maintenance of chronic pain. **The Journal of Pain**, v. 17, n. 9, p. T70-T92, 2016.
- FEIN, A. *et al.* Nociceptores: as células que sentem dor. **Ribeirão Preto-SP: Dor On Line**, 2011.
- FINNERUP, N. B. *et al.* Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Neurology**, v. 14, n. 2, p. 162-173, 2015.
- FISCHER, M. *et al.* The interphase of the formalin test. **Pain**, v. 155, n. 3, p. 511-521, 2014.
- FIXON-OWOO, S. *et al.* Preparation and biological assessment of hydroxycinnamic acid amides of polyamines. **Phytochemistry**, v. 63, n. 3, p. 315-334, 2003.
- FONSECA, D. V. *et al.* Ortho-eugenol exhibits anti-nociceptive and anti-inflammatory activities. **International immunopharmacology**, v. 38, p. 402-408, 2016.
- FREDHOLM, B. B. Adenosine receptors as drug targets. **Exp Cell Res.** v. 8, p. 1284-1288, 2010.
- FREEDMAN, M. *et al.* Challenging Neuropathic Pain Syndromes: Evaluation and Evidence-Based Treatment. **Elsevier Health Sciences**, 2017.
- FRIEDRICHSDORF, S. J.; GOUBERT, L. Pediatric pain treatment and prevention for hospitalized children. **Pain reports**, v. 5, n. 1, 2020.
- FRIEDRICHSDORF, S. J.; NUGENT, A. P. Management of neuropathic pain in children with cancer. **Current opinion in supportive and palliative care**, v. 7, n. 2, p. 131-138, 2013.
- GATCHEL, R. J. *et al.* The biopsychosocial approach to chronic pain: scientific advances and future directions. **Psychological bulletin**, v. 133, n. 4, p. 581, 2007.
- GOLAN, D.E. *et al.* **Princípios de Farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia.** 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.
- GOLDBERG, D. S.; MCGEE, S. J. Pain as a global public health priority. **BMC public health**, v. 11, n. 1, p. 1-5, 2011.

- GRUBB, S.; PASVANKAS, G. W. Anatomy and Physiology: Mechanisms of Nociceptive Transmission. In: **Academic Pain Medicine**. Springer, Cham, 2019.
- GUNIA, A. *et al.* Preliminary evaluation of anticonvulsant activity of some aminoalkanol and amino acid cinnamic acid derivatives. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 9, n. 1, p. 37-43, 2012.
- HAINES, D. E.; MIHAILOFF, G. A. **Fundamental neuroscience for basic and clinical applications E-book**. Elsevier Health Sciences, 2017.
- HAQ, IU. *et al.* Piperine: a review of its biological effects. **Phytotherapy Research**, v. 35, n. 2, p. 680-700, 2021.
- HELLYER, P. W. *et al.* Pain and its management. In: TRANQUILLI, W. J.; HURMON, J. C.; GRIMM, K. A. **Lumb & Jones' Veterinary Anesthesia and Analgesia**, 4th ed. Iowa: Blackwell Publishing, cap. 3, p. 31-35, 2007.
- HELMS, J. E.; BARONE, C. P. Physiology and treatment of pain. **Critical Care Nurse**, v.28, p.38-49, 2008.
- HENRY, B. L. *et al.* A novel allosteric pathway of thrombin inhibition: Exosite II mediated potent inhibition of thrombin by chemo-enzymatic, sulfated dehydropolymers of 4-hydroxycinnamic acids. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 44, p. 31891-31899, 2007.
- HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v.30, p.103-114, 1987.
- ISLAM, M. T. *et al.* Chemical profile, traditional uses, and biological activities of *Piper chaba* Hunter: A review. **Journal of ethnopharmacology**, v. 257, p. 112853, 2020.
- JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v.413, n.6852, p. 203-210, 2001.
- JUNG, J. C. *et al.* Synthesis and Evaluation of a Series of 3, 4, 5-Trimethoxycinnamic Acid Derivatives as Potential Antinarcotic Agents. **Chemical biology & drug design**, v. 81, n. 3, p. 389-398, 2013.
- KANDEL, E.R. *et al.* **Principles of neural science**. 5^a ed. New York: Mc-Graw-Hill, 2013.
- KARTBAEVA, E. B. *et al.* Antinociceptive activity of Cistanche salsa stolons, growing in the Republic of Kazakhstan. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, p. 587-591, 2017.
- KAWASHIMA, K. *et al.* Anti-stress effects of 3, 4, 5-trimethoxycinnamic acid, an active constituent of roots of *Polygala tenuifolia* (Onji). **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 8, p. 1317-1319, 2004.
- KAWAURA, K. *et al.* Tipegidine enhances the antinociceptive-like action of carbamazepine in the acetic acid writhing test. **European Journal of Pharmacology**, v. 651, n. 1-3, p. 106-108, 2011.

- KENDROUD, Sarah et al. Physiology, nociceptive pathways. **StatPearls [Internet]**, 2020.
- KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Pathophysiology of Pain. **Archives of Veterinary Science**, v.13, p. 1-12, 2008.
- KLEIN JÚNIOR, L. C.; FALONI DE ANDRADE, S.; FILHO, V. C. A pharmacognostic approach to the *Polygala* genus: phytochemical and pharmacological aspects. **Chemistry & biodiversity**, v. 9, n. 2, p. 181-209, 2012.
- KLIT, H.; FINNERUP, N. B.; JENSEN, T. S. Central post-stroke pain: clinical characteristics, pathophysiology, and management. **The Lancet Neurology**, v. 8, n. 9, p. 857-868, 2009.
- KORB, O.; STUTZLE, T.; EXNER, T. E. Empirical scoring functions for advanced protein–ligand docking with PLANTS. **Journal of chemical information and modeling**, v. 49, n. 1, p. 84-96, 2009.
- KORKINA, L. G. Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health. **Cellular and molecular biology**, v. 53, n. 1, p. 15-25, 2007.
- KRISTENSEN, B. K.; BURHENNE, K.; RASMUSSEN, S. K. Peroxidases and the metabolism of hydroxycinnamic acid amides in Poaceae. **Phytochemistry Reviews**, v. 3, n. 1, p. 127-140, 2004.
- LACAILLE-DUBOIS, MA.; DELAUDE, C.; MITAINE-OFFER, AC. A review on the phytopharmacological studies of the genus *Polygala*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 249, p. 112417, 2020.
- LEE, CI. *et al.* 3, 4, 5-Trimethoxycinnamic acid (TMCA), one of the constituents of *Polygalae Radix* enhances pentobarbital-induced sleeping behaviors via GABAergic systems in mice. **Archives of pharmacal research**, v. 36, n. 10, p. 1244-1251, 2013.
- LEE, IS.; NECKA, E. A.; ATLAS, L. Y. Distinguishing pain from nociception, salience, and arousal: How autonomic nervous system activity can improve neuroimaging tests of specificity. **NeuroImage**, v. 204, p. 116254, 2020.
- LIM, K. J. H. *et al.* Biosynthesis of Nature-Inspired Unnatural Cannabinoids. **Molecules**, v. 26, n. 10, p. 2914, 2021.
- LIMA, T. C. *et al.* Analgesic-like activity of essential oil constituents: an update. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 12, p. 2392, 2017.
- LOESER, J.D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **Lancet**, v.353, p.1607-1609, 1999.
- LUSZCZKI, J. J. *et al.* Levetiracetan, selectively potentiates the acute neurotoxic effects of topiramate and carbamazepine in the rota-rod test in mice. **European Neuropsychopharmacology**, v.15, n.6, p.609-616, 2005.

- MACIEL, H. I. A. *et al.* Pharmacological and nonpharmacological measures of pain management and treatment among neonates. **Revista Brasileira de terapia intensiva**, v. 31, p. 21-26, 2019.
- MALDE, A. K. *et al.* An automated force field topology builder (ATB) and repository: version 1.0. **Journal of chemical theory and computation**, v. 7, n. 12, p. 4026-4037, 2011.
- MAY, B. H. *et al.* Chinese herbs for memory disorders: a review and systematic analysis of classical herbal literature. **Journal of acupuncture and meridian studies**, v. 6, n. 1, p. 2-11, 2013.
- MELZACK, R. *et al.* Pain mechanisms: a new theory. **Science**, v. 150, n. 3699, p. 971-979, 1965.
- MEOTTI, F. C. *et al.* Antinociceptive action of myricitrin: Involvement of the K⁺ and Ca²⁺ channels. **European journal of pharmacology**, v.567, p.198-205, 2007.
- MERSKEY, H.; BOGDUK, N. Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. **Seattle, Wash: IASP Press**, 2^a ed. 1994.
- MISCHKOWSKI, D. *et al.* Pain or nociception? Subjective experience mediates the effects of acute noxious heat on autonomic responses. **Pain**, v. 159, n. 4, p. 699, 2018.
- MONTEIRO, A. B. *et al.* Pharmacological studies on cinnamic alcohol and its derivatives. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. 1-8, 2021.
- MORRIS, Garrett M. *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of computational chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785-2791, 2009.
- NISSEN, S. E. *et al.* Cardiovascular safety of celecoxib, naproxen, or ibuprofen for arthritis. **New England Journal of Medicine**, v. 375, p. 2519-2529, 2016.
- NÓBREGA, Flávio R. *et al.* Design, antileishmanial activity, and QSAR studies of a series of piplartine analogues. **Journal of Chemistry**, v. 2019, 2019.
- NORTHOVER, B. J. The action of anti-inflammatory compounds in mice with peritonitis. **The Journal of pathology and bacteriology**, v. 87, n. 2, p. 395-403, 1964.
- OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD 423. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001.
- OLAJIDE, O. A. *et al.* Methyl 3, 4, 5-trimethoxycinnamate suppresses inflammation in RAW264. 7 macrophages and blocks macrophage-adipocyte interaction. **Inflammopharmacology**, v. 28, p. 1315-1326, 2020.
- OLESEN, A. E. *et al.* Human experimental pain models for assessing the therapeutic efficacy of analgesic drugs. **Pharmacological reviews**, v. 64, n. 3, p. 722-779, 2012.

ORLANDO, B. J.; MALKOWSKI, M. G. Substrate-selective inhibition of cyclooxygenase-2 by fenamic acid derivatives is dependent on peroxide tone. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 29, p. 15069-15081, 2016.

OSSIPOV M. Pain pathways: descending modulation. 2009.

PAGES, N. *et al.* Activities of α -asarone in various animal seizure models and in biochemical assays might be essentially accounted for by antioxidant properties. **Neuroscience research**, v. 68, n. 4, p. 337-344, 2010.

PALACIO-RODRÍGUEZ, K. *et al.* Exponential consensus ranking improves the outcome in docking and receptor ensemble docking. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2019.

PARADA, C. A. *et al.* The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. **Neuroscience**, v.102, n.4, p937-944, 2001.

PATEL, M. K.; PINNOCK, R. D.; LEE, K. Adenosine exerts multiple effects in dorsal horn neurones of the adult rat spinal cord. **Brain research**, v. 920, n. 1-2, p. 19-26, 2001.

PATHAN, H.; WILLIAMS, J. Basic opioid pharmacology: an update. **British journal of pain**, v. 6, n. 1, p. 11-16, 2012.

PAULA-FREIRE, L. I. G. *et al.* Evaluation of the antinociceptive activity of *Ocimum gratissimum* L.(Lamiaceae) essential oil and its isolated active principles in mice. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 8, p. 1220-1224, 2013.

PERL, E. R. Ideas about pain, a historical view. **Nat Rev Neurosci**, v. 8, p. 71–80, 2007.

PETTERSEN, E. F. *et al.* UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of computational chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.

PISKA, K. *et al.* Piperlongumine (piplartine) as a lead compound for anticancer agents—Synthesis and properties of analogues: A mini-review. **European journal of medicinal chemistry**, v. 156, p. 13-20, 2018.

PRICE, D. D.; VERNE, G. N.; SCHWARTZ, J. M. Plasticity in brain processing and modulation of pain. **Progress in brain research**, v. 157, p. 333-405, 2006.

QUIÑONEZ-BASTIDAS, G. N.; NAVARRETE, A. Mexican Plants and Derivates Compounds as Alternative for Inflammatory and Neuropathic Pain Treatment—A Review. **Plants**, v. 10, n. 5, p. 865, 2021

RAJA, S. N. *et al.* The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. **Pain**, v. 161, n. 9, p. 1976-1982, 2020.

RAMOS, M.L.M. **Relatório de Prática Clínica em Cuidados Paliativos Avaliação e Alívio da Dor**, 2014. p. 36. Relatório de Prática Clínica (Curso de Mestrado em Cuidados Paliativos), Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias, Instituto Politécnico de Castelo Branco, Porto, 2014.

RODRIGUES, A.J.S.S. **Avaliação Da Dor Ao Doente Oncológico Em Cuidados Paliativos Incapaz De Comunicar**, 2013. p. 32-34. Dissertação (Curso de Mestrado em Enfermagem Médico-Cirúrgica), Escola Superior de Enfermagem de Coimbra, Porto, 2013.

RUSSELL, W. R.; SCOBIE, L.; CHESSON, A. Structural modification of phenylpropanoid-derived compounds and the effects on their participation in redox processes. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 13, n. 7, p. 2537-2546, 2005

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

RYCHLICKA, M.; ROT, A.; GLISZCZYŃSKA, A. Biological Properties, Health Benefits and Enzymatic Modifications of Dietary Methoxylated Derivatives of Cinnamic Acid. **Foods**, v. 10, n. 6, p. 1417, 2021.

SALDANHA, A. A. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive activities of a phenylpropanoid-enriched fraction of *Duguetia furfuracea*. **Inflammopharmacology**, v. 29, n. 2, p. 409-422, 2021.

SATYANARAYANA, P. S. V. *et al.* Isobolographic analysis of interaction between cyclooxygenase inhibitors and tramadol in acetic acid-induced writhing in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 28, n. 4, p. 641-649, 2004.

SAWYNOK, J.; BURNSTOCK, G. Adenosine Triphosphate and Adenosine Receptors and Pain. IN: BEAULIEU, P.; LUSSIER, D.; PORRECA, F.; DICKENSON, A.H. (Eds.) **Pharmacology of pain**, p. 303-326 Seattle: IASP Press, 2010

SCHAIBLE, H. G. Basic mechanisms of deep somatic tissue. In: McMahon SB, Koltzenburg M (eds) Textbook of pain. **Elsevier**, London, p 621-633, 2005.

SCHAIBLE, HG.; RICHTER, F. Pathophysiology of pain. **Langenbeck's archives of surgery**, v. 389, n. 4, p. 237-243, 2004.

SCHLISSBACH, J.; MAURER, K. Pharmacology of pain transmission and modulation. In: **Pain Medicine**. Springer, Cham, p. 7-9, 2017.

SCHUMACHER, M. A.; BASBAUM, A. I.; WAY, W. L. Opioid Analgesics and Antagonists; Katzung, B.G., Masters, S.B., Trevor, A.J., Eds.; McGraw-Hill Education publisher: San Francisco, CA, USA, 2012.

SCOTTI, L. *et al.* In silico study examining new phenylpropanoids targets with antidepressant activity. **Current Drug Targets**, 2020.

SHI, D.; PADGETT, W. L.; DALY, J. W. Caffeine analogs: effects on ryanodine-sensitive calcium-release channels and GABA A receptors. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 23, n. 3, p. 331-347, 2003.

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia humana: uma abordagem integrada**. Artmed editora, 2010.

SMITH, B. H.; HÉBERT, H. L.; VELUCHAMY, A. Neuropathic pain in the community: prevalence, impact, and risk factors. **Pain**, v. 161, p. S127-S137, 2020.

SOARES, K. C. N. *et al.* Levels of phenylpropanoids and iridoids in extracts and infusions of *Verbena minutiflora*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 92, 2020.

SOLÉ, E. *et al.* Social factors, disability, and depressive symptoms in adults with chronic pain. **The Clinical journal of pain**, v. 36, n. 5, p. 371-378, 2020.

SOUZA, M. M.; *et al.* Antinociceptive properties of the methanolic extract obtained from *Ipomoea pescaprae* (L.) **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, p. 85-90, 2000.

SOUZA MONTEIRO DE ARAUJO, D. *et al.* TRPA1 as a therapeutic target for nociceptive pain. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 24, n. 10, p. 997-1008, 2020.

TAO, YX.; GU, J.; STEPHENS JR, R. L. Role of spinal cord glutamate transporter during normal sensory transmission and pathological pain states. **Molecular Pain**, v. 1, p. 1744-8069-1-30, 2005.

TIMMERMAN, L. *et al.* Prevalence and determinants of medication non-adherence in chronic pain patients: a systematic review. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v. 60, n. 4, p. 416-431, 2016.

TJØLSEN, A. *et al.* The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v.51, p.5-17, 1992.

TSAI, IL *et al.* New cytotoxic cyclobutanoid amides, a new furanoid lignan and anti-platelet aggregation constituents from *Piper arborescens*. **Planta medica**, v. 71, n. 06, p. 535-542, 2005.

THOMPSON-BRAZILL, K. A. Pain control in the cardiothoracic surgery patient. **Critical Care Nursing Clinics**, v. 31, n. 3, p. 389-405, 2019.

THOMSEN, René; CHRISTENSEN, Mikael H. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. **Journal of medicinal chemistry**, v. 49, n. 11, p. 3315-3321, 2006.

VARGA, E. *et al.* Phenolic composition, antioxidant and antinociceptive activities of *Syringa vulgaris* L. bark and leaf extracts. **Natural product research**, v. 33, n. 11, p. 1664-1669, 2019.

VILLALBA, B. T. *et al.* Meloxicam-loaded nanocapsules have antinociceptive and antiedematogenic effects in acute models of nociception. **Life sciences**, v. 115, n. 1-2, p. 36-43, 2014.

VLAEYEN, J. W. S.; CROMBEZ, G. Behavioral conceptualization and treatment of chronic pain. **Annual review of clinical psychology**, v. 16, p. 187-212, 2020.

WHO. Guidelines on the pharmacological treatment of persisting pain in children with medical illnesses. **World Health Organization**, p. 1-167. 2012.

WILHELM, E. A. *et al.* Antinociceptive and anti-allodynic effects of 3-alkynyl selenophene on different models of nociception in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 93, n. 4, p. 419-425, 2009.

WILLIAMS, S. E. *et al.* The impact of spatial distribution of pain on long-term trajectories for chronic pain outcomes after intensive interdisciplinary pain treatment. **The Clinical journal of pain**, v. 36, n. 3, p. 181-188, 2020.

WU, WP. *et al.* Increased nociceptive response in mice lacking the adenosine A1 receptor. **Pain**, v. 113, n. 3, p. 395-404, 2005.

YASHPAL, K. *et al.* Differential effects of NMDA and group I mGluR antagonists on both nociception and spinal cord protein kinase C translocation in the formalina test and a model of neuropathic pain in rats. **Pain**, v.94, n.1, p.17-29, 2001.

YE, L.; ZHANG, W. Synthesis and biological activity of 3-(2, 8, 9-trioxa-aza-1-germatricyclo [3. 3. 3. 0] undecane-1-yl)-hydroxycinnamic acids. **Medicinal Chemistry (Sharjah (United Arab Emirates))**, v. 3, n. 5, p. 466-468, 2007.

YINGYONGNARONGKUL, B. *et al.* Solid-phase synthesis and antibacterial activity of hydroxycinnamic acid amides and analogues against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *S. aureus*. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 16, n. 22, p. 5870-5873, 2006.

YU, XB. *et al.* In vitro immunocompetence of two compounds isolated from *Polygala tenuifolia* and development of resistance against grass carp reovirus (GCRV) and *Dactylogyrus intermedius* in respective host. **Fish & shellfish immunology**, v. 41, n. 2, p. 541-548, 2014.

ZHANG, Y. *et al.* Structure activity relationships and antinociceptive activity of two novel dammarane-type sapogenins with notable anticancer effect. **Phytochemistry Letters**, v. 27, p. 49-54, 2018.

ZHAO, Z. *et al.* Research progress in the biological activities of 3, 4, 5-trimethoxycinnamic acid (TMCA) derivatives. **European journal of medicinal chemistry**, v. 173, p. 213-227, 2019.

ZHENG, G. *et al.* Antinociceptive grayanane diterpenoids from the leaves of *Pieris japonica*. **Journal of natural products**, v. 82, n. 12, p. 3330-3339, 2019.