

AÇÃO ANELGÉSICA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE *Tabernaemontana catharinensis* em CAMUNDONGOS: ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR TRPA1

Evelyne S. Brum^{1*}, Gabriela Becker², Sara M. Oliveira³

1. Estudante de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica da UFSM
2. Estudante de IC do Laboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia da UFSM
3. Professora do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFSM/ Orientadora

Resumo:

A dor é um dos sintomas clínicos mais comuns que levam os pacientes a procurar cuidados médicos e ao uso de medicamentos. O receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1) está relacionado ao desenvolvimento de diferentes tipos de dor inflamatória. *Tabernaemontana catharinensis* é uma árvore popularmente conhecida como cobrina e a diversidade de ações biológicas encontradas na fração acetato de etila (Eta) de suas folhas é atribuída a presença de polifenóis e flavonoides. Entretanto, até o momento, não há estudos suportando a atividade antagonista desta fração sobre receptores TRPA1 em camundongos. Os agonistas TRPA1 H₂O₂, cinamaldeído ou isotiocianato de alila foram administrados após o tratamento oral de Eta ou veículo, na superfície da pata direita traseira de camundongos. Os animais foram avaliados sobre diferentes testes nociceptivos (nocicepção espontânea, alodínia mecânica e ao frio) e quanto ao desenvolvimento de edema. Estudos pré-clínicos utilizando modelos de roedores mostram que antagonistas do TRPA1 inibem a nocicepção e inflamação. Deste modo, sugerimos que a ação antinociceptiva periférica de Eta seja mediada por receptores TRPA1.

Autorização legal: A utilização dos animais foi aprovada pelo CEUA/UFMS (3440141016/2016).

Palavras-chave: cobrina; antinocicepção; dor inflamatória.

Apoio financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul — FAPERGS (processo 16/2551-0000281-9).

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: UFSM.

Introdução:

A dor é uma das condições mais prevalentes que limita a produtividade e diminui a qualidade de vida dos pacientes. Embora exista um grande arsenal de analgésicos efetivos e altamente utilizados, há também uma grande preocupação relacionada com sua segurança e efeitos adversos, tornando seu uso clínico problemático (Cazacu et al., 2015) e favorecendo a escolha por tratamentos baseados na medicina alternativa pelos pacientes. A *Tabernaemontana catharinensis* é uma árvore (família Apocinaceae) popularmente conhecida como cobrina. Estudos anteriores já demonstraram que a fração acetato de etila de suas folhas possui efeito analgésico e anti-inflamatório em modelos animais (Brum et al., 2016). Além disso, uma diversidade de ações biológicas desencadeadas pelos constituintes desta fração (polifenóis e flavonoides) foi atribuída por Boligon et al. (2014).

As fibras aferentes sensoriais expressam diversos tipos de canais iônicos essenciais para a detecção e transmissão de estímulos dolorosos, como o receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1) (Andrade et al., 2012). Este canal é um dos principais sensores para diversas substâncias oxidantes endógenas, como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), e exógenas provenientes de produtos naturais como cinamaldeído e isotiocianato de alila (AITC) (Trevisan et al., 2014a) derivados da canela e do óleo de mostarda, respectivamente (Andrade et al., 2012). O receptor TRPA1 foi identificado como um provável alvo para o desenvolvimento de analgésicos para o tratamento de diversas condições inflamatórias dolorosas, visto que é um relevante mediador de alodínia mecânica e ao frio observada em modelos experimentais de dor (Andrade et al., 2012). Sabe-se também que a estimulação de nociceptores periféricos contendo TRPA1 gera uma série de respostas proinflamatórias, as quais compreendem fatores vasculares como a formação de edema (Geppetti et al., 2008).

Produtos naturais têm sido avaliados biologicamente quanto a ação antagonista de

receptores TRPA1 (Trevisan et al., 2014b). Entretanto, até o momento, não há estudos pré-clínicos suportando a atividade analgésica da fração acetato de etila de *T. catharinensis* (Eta) sobre receptores TRPA1. Desta forma, hipotetizamos que a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de Eta em diferentes modelos de dor é mediada pelo receptor TRPA1.

Metodologia:

Foram utilizados camundongos Swiss albinos machos (25 - 30 g) obtidos do Biotério Central da UFSM e mantidos sob condições ideais de experimentação animal. Eta foi obtida como descrito previamente (Brum et al., 2016) e dissolvida em tween 80 5% e NaCl 0.9% para o tratamento de camundongos. O protocolo de tratamento consistiu na administração por via oral de Eta (0.01 - 100 mg/kg, v.o.) ou veículo (10 mL/kg, v.o.) em uma única dose. Em diferentes tempos (0.33 - 24 h) após os tratamentos os animais receberam uma injeção de 20 µL de agonistas do TRPA1: H₂O₂ (2 µmol/pata), cinamaldeído (10 µmol/pata) ou AITC (10 µmol/pata) intraplantarmente (i.pl.) na pata direita traseira. Em seguida, os camundongos foram testados frente à diferentes parâmetros de nocicepção e inflamação.

Nocicepção espontânea: O receptor TRPA1 é estimulado por agentes químicos irritantes. Estas substâncias são utilizadas como teste de triagem para novos analgésicos, uma vez que são capazes de induzir nocicepção espontânea em modelos animais (Andrade et al., 2012). Em 1 h após a administração de Eta, o tempo gasto pelos animais lambendo e/ou mordendo a pata injetada com agonistas do TRPA1 foi cronometrado durante 5 min e considerado como tempo de nocicepção (Brum et al., 2016).

Alodínia mecânica: O envolvimento do receptor TRPA1 no desenvolvimento de hipersensibilidade a estímulos mecânicos tem sido bastante relatado na literatura (Trevisan et al., 2014a). Primeiramente foi determinado o limiar basal de resposta ao estímulo mecânico da pata direita traseira de cada animal utilizando filamentos de von Frey. Posteriormente foi calculado o limiar de retirada de pata (LRP) através do método de "up and down" (Dixon, 1980; Oliveira et al., 2011). Após a medida basal, os animais foram tratados e o desenvolvimento de alodínia mecânica foi verificado entre 0.33 e 24 h.

Alodínia ao frio: Foi também avaliado o efeito de Eta frente à alodínia ao frio induzida pela aplicação tópica de acetona (Trevisan et al., 2014b). Para tal, os animais receberam 3

aplicações de 20 µL cada de acetona na pata direita traseira e a resposta nociceptiva aguda foi observada e avaliada através de um escore de 4 pontos (Zheng et al., 2012).

Desenvolvimento de edema: Tendo em vista que a estimulação de nociceptores periféricos contendo TRPA1 gera uma série de respostas proinflamatórias e formação de edema (Geppetti et al., 2008), a espessura da pata direita traseira dos animais foi medida utilizando um paquímetro digital (Amatools, 150 mm/6") antes (medida basal) e após os tratamentos (0.33 - 24 h). Um aumento na espessura da pata dos animais comparado à medida basal foi considerado como edema. Os valores foram expressos como a variação (Δ) da espessura da pata em relação aos valores basais.

Resultados e Discussão:

Nós investigamos a contribuição do TRPA1 sobre o efeito analgésico de Eta em diferentes testes nociceptivos e inflamatórios. As injeções intraplantares dos agonistas TRPA1 (H₂O₂, cinamaldeído ou AITC) causaram nocicepção espontânea, a qual foi demonstrada pela lambida da pata injetada durante 5 min imediatamente após suas administrações. Eta (0.1 - 100 mg/kg) preveniu a nocicepção espontânea quando administrada 1 h antes do tratamento com os agonistas. A inibição máxima ($I_{m\acute{a}x}$) causada por Eta (100 mg/kg) foi 56.3±2.3%, 31.3±7.2% e 49.8±3.8% para H₂O₂ (Fig. 1A), cinamaldeído (Fig. 2A) e AITC (Fig. 3A) induzindo nocicepção espontânea, respectivamente. O valor DI_{50} (dose que reduz a resposta nociceptiva em 50% em relação ao valor controle) encontrado para o efeito antinociceptivo de Eta sobre a nocicepção espontânea induzida por H₂O₂ foi 0.043 (0.002 - 0.723) mg/kg.

Em seguida, nós demonstramos que a administração dos agonistas TRPA1 promoveu alodínia mecânica e desenvolvimento de edema a partir de 0.33 até 24 h de suas administrações. Eta (0.1 - 100 mg/kg) preveniu a alodínia mecânica (Fig. 1B) de 0.33 à 1 h após a administração de H₂O₂ ($I_{m\acute{a}x}$ de Eta 30 mg/kg = 98.7±12.3% em 0.33 h), com DI_{50} de 7.42 (1.43 - 38.57) mg/kg. Eta (1 - 100 mg/kg) também preveniu o desenvolvimento de edema (Fig. 1D) a partir de 0.33 à 1 h após a injeção de H₂O₂ ($I_{m\acute{a}x}$ de Eta 100 mg/kg = 96.0±29.8% em 1 h). Quando Eta (100 mg/kg) foi administrada oralmente antes da injeção de cinamaldeído ou AITC, ela reduziu a alodínia mecânica a partir de 2 até 6 h (Fig. 2B) ($I_{m\acute{a}x}$ = 69.1±5.8% em 6 h) e a partir de 0.33 até 2 h (Fig. 3B) ($I_{m\acute{a}x}$ = 69.2±13.3% em 1 h),

respectivamente. Eta demonstrou efeito sobre o edema de pata induzido por cinamaldeído (Fig. 2D) apenas em 2 h após seu tratamento (Fig. 2D) apenas em 2 h após seu tratamento ($I_{\text{máx}} = 86.8 \pm 15.0\%$). Com relação ao edema de pata induzido por AITC, Eta reduziu este parâmetro a partir de 0.33 até 4 h após seu tratamento, com $I_{\text{máx}}$ de 100% em 2 h (Fig. 3D).

Nós também avaliamos o efeito de Eta sobre a alodínia ao frio induzida pelos agonistas TRPA1. Eta (100 mg/kg) preveniu parcialmente o desenvolvimento de alodínia ao frio com efeito dependente do agonista. Quando H_2O_2 (Fig. 1C) foi administrado intraplantarmente, Eta preveniu a nocicepção somente no tempo de 2 h ($I_{\text{máx}} = 66.6 \pm 10.4\%$). Similarmemente, Eta também preveniu a nocicepção causada por cinamaldeído (Fig. 2C) somente em 2 h ($I_{\text{máx}} = 51.6 \pm 13.6\%$). Por fim, o efeito antinociceptivo de Eta sobre a alodínia ao frio induzida por AITC (Fig. 3C) ocorreu somente em 1 h após a injeção de AITC com $I_{\text{máx}}$ de $58.6 \pm 20.2\%$.

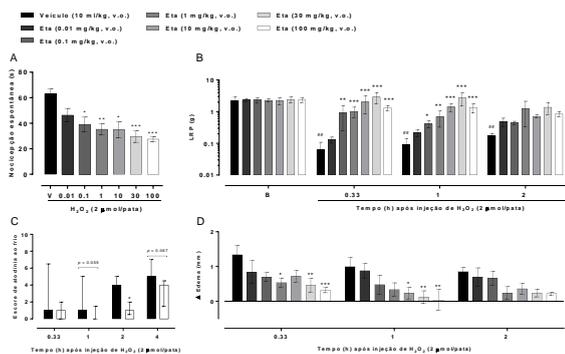


Figura 1 – Eta previne a nocicepção espontânea, alodínia mecânica e ao frio e desenvolvimento de edema induzidos por H_2O_2 . Os camundongos foram tratados com veículo (10 mL/kg, v.o.) ou Eta (0.01 - 100 mg/kg, v.o.) 1 h antes da injeção de H_2O_2 (2 $\mu\text{mol/pata}$). A nocicepção espontânea (A), alodínia mecânica (B) e ao frio (C) e desenvolvimento de edema (D) foram avaliados de 0.33 à 4 h após a administração de H_2O_2 . ANOVA de uma ou duas vias seguida de teste post hoc de Bonferroni. Teste Mann–Whitney não paramétrico foi utilizado para as análises dos escores de alodínia ao frio. Os resultados são expressos como média \pm SEM (n=6/grupo). ###p<0.01 e ####p<0.001 vs. valores basais (B). *p<0.05, **p<0.01 e ***p<0.001 vs. grupo veículo.

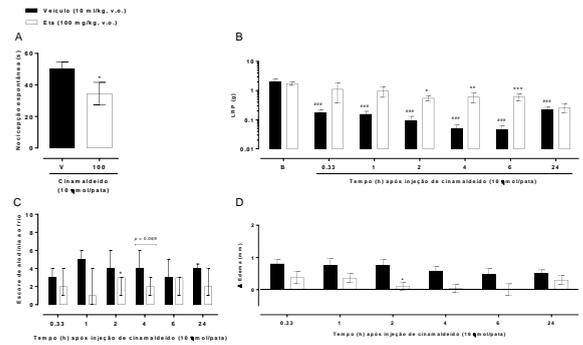


Figura 2 – Eta previne a nocicepção espontânea, alodínia mecânica e ao frio e desenvolvimento de edema induzidos por cinamaldeído. Os camundongos foram tratados com veículo (10 mL/kg, v.o.) ou Eta (100 mg/kg, v.o.) 1 h antes da injeção de cinamaldeído (10 $\eta\text{mol/pata}$). A nocicepção espontânea (A), alodínia mecânica (B) e ao frio (C) e desenvolvimento de edema (D) foram avaliados de 0.33 à 24 h após a administração de cinamaldeído. Teste t Student e ANOVA de uma ou duas vias seguida de teste post hoc de Bonferroni. Teste Mann–Whitney não paramétrico foi utilizado para as análises dos escores de alodínia ao frio. Os resultados são expressos como média \pm SEM (n=6/grupo). #p<0.05, ##p<0.01 e ###p<0.001 vs. valores basais (B). *p<0.05, **p<0.01 e ***p<0.001 vs. grupo veículo.

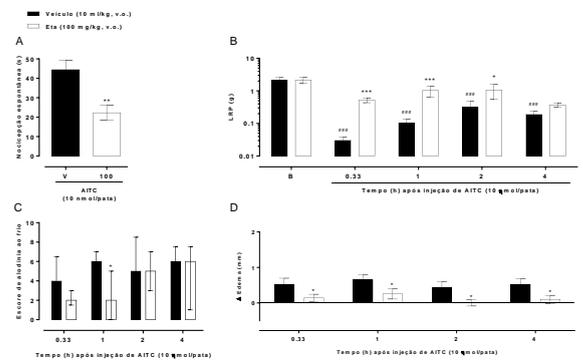


Figura 3 – Eta previne a nocicepção espontânea, alodínia mecânica e ao frio e desenvolvimento de edema induzidos por AITC. Os camundongos foram tratados com veículo (10 mL/kg, v.o.) ou Eta (100 mg/kg, v.o.) 1 h antes da injeção de AITC (10 $\eta\text{mol/pata}$). A nocicepção espontânea (A), alodínia mecânica (B) e ao frio (C) e desenvolvimento de edema (D) foram avaliados de 0.33 à 4 h após a administração de AITC. Teste t Student e ANOVA de uma ou duas vias seguida de teste post hoc de Bonferroni. Teste Mann–Whitney não paramétrico foi utilizado para as análises dos escores de alodínia ao frio. Os resultados são expressos como média \pm SEM (n=6/grupo). #p<0.05, ##p<0.01 e ###p<0.001 vs. valores basais (B). *p<0.05, **p<0.01 e ***p<0.001 vs.

grupo veículo.

A injeção dos agonistas H₂O₂, cinamaldeído e AITC na superfície plantar de camundongos é conhecida por produzir nocicepção espontânea em ambos roedores e humanos. Além disso, o envolvimento do receptor TRPA1 no desenvolvimento de hipersensibilidade a estímulos mecânicos e ao frio, bem como desenvolvimento de edema, tem sido bastante relatado na literatura (Trevisan et al., 2014a). O uso de antagonistas TRPA1 ou de camundongos knockout para TRPA1 tem sido reportado por diminuir estes parâmetros em modelos animais (Andrade et al., 2012; Trevisan et al., 2014b). É destacado na literatura que o TRPA1 é ativado por substâncias irritantes exógenas (cinamaldeído e AITC), bem como oxidantes produzidos endogenamente como o H₂O₂ (Andrade et al., 2012; Julius, 2013). Aqui, nós observamos que Eta efetivamente reduziu a nocicepção espontânea mediada pelos agonistas TRPA1 de maneira dependente de dose. Além disso, foi efetiva em diminuir a alodínia mecânica e ao frio, assim como o desenvolvimento de edema. Um polifenol presente em grande quantidade no extrato de Eta é o ácido gálico (Brum et al., 2016), o qual tem sido relatado por ser efetivo nas respostas nociceptivas desencadeadas por agonistas TRPA1 (Trevisan et al., 2014b). Estes achados confirmam os efeitos de Eta sobre as respostas mediadas pelo TRPA1.

Conclusões:

Os produtos naturais das plantas medicinais estão entre as ferramentas mais importantes para identificar e manipular elementos-chaves da via da dor. Nosso estudo foi desenvolvido na tentativa de avaliar a participação do TRPA1 na analgesia desencadeada pela Eta, com base na sua composição enriquecida com polifenóis e flavonoides, sua atividade antinociceptiva previamente relatada e seu uso popular como agente analgésico. Como esperado, nossos resultados demonstram que Eta apresenta efeito antinociceptivo em diferentes modelos de dor induzidos por agonistas TRPA1. Mais estudos são necessários para corroborar com a hipótese de que sua ação analgésica seja mediada por TRPA1.

Referências bibliográficas

Andrade, E.L., Meotti, F.C., Calixto, J.B., 2012. TRPA1 antagonists as potential analgesic drugs. *Pharmacol. Ther.* 133, 189–204. doi:10.1016/j.pharmthera.2011.10.008

Boligon, A.A., Piana, M., Kubiça, T.F., Mario, D.N., Dalmolin, T.V., Bonez, P.C.,

Weiblen, R., Lovato, L., Alves, S.H., Campos, M.M. a., Athayde, M.L., 2014. HPLC analysis and antimicrobial, antimycobacterial and antiviral activities of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. *J. Appl. Biomed.* 13, 1–12. doi:10.1016/j.jab.2014.01.004

Brum, E. da S., Moreira, L. da R., da Silva, A.R.H., Boligon, A.A., Carvalho, F.B., Athayde, M.L., Brandão, R., Oliveira, S.M., 2016. *Tabernaemontana catharinensis* ethyl acetate fraction presents antinociceptive activity without causing toxicological effects in mice. *J. Ethnopharmacol.* 191, 115–124. doi:10.1016/j.jep.2016.06.036

Cazacu, I., Mogosan, C., Loghin, F., 2015. Safety issues of current analgesics: an update. *Clujul Med.* 88, 128. doi:10.15386/cjmed-413

Dixon, W.J., 1980. Efficient analysis of experimental observations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 20, 441–462.

Geppetti, P., Nassini, R., Materazzi, S., Benemei, S., 2008. The concept of neurogenic inflammation. *BJU Int.* 101 Suppl, 2–6. doi:10.1111/j.1464-410X.2008.07493.x

Julius, D., 2013. TRP channels and pain, *Annu Rev Cell Dev Biol.* doi:10.1146/annurev-cellbio-101011-155833

Oliveira, S.M., Drewes, C.C., Silva, C.R., Trevisan, G., Boschen, S.L., Moreira, C.G., de Almeida Cabrini, D., Da Cunha, C., Ferreira, J., 2011. Involvement of mast cells in a mouse model of postoperative pain. *Eur. J. Pharmacol.* 672, 88–95. doi:10.1016/j.ejphar.2011.10.001

Trevisan, G., Hoffmeister, C., Rossato, M.F., Oliveira, S.M., Silva, M.A., Silva, C.R., Fusi, C., Tonello, R., Minocci, D., Guerra, G.P., Materazzi, S., Nassini, R., Geppetti, P., Ferreira, J., 2014a. TRPA1 receptor stimulation by hydrogen peroxide is critical to trigger hyperalgesia and inflammation in a model of acute gout. *Free Radic. Biol. Med.* 72, 200–209. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.021

Trevisan, G., Rossato, M.F., Tonello, R., Hoffmeister, C., Klafke, J.Z., Rosa, F., Pinheiro, K. V, Pinheiro, F. V, Boligon, A.A., Athayde, M.L., Ferreira, J., 2014b. Gallic acid functions as a TRPA1 antagonist with relevant antinociceptive and antiedematogenic effects in mice. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 387, 679–689. doi:10.1007/s00210-014-0978-0

Zheng, H., Xiao, W.H., Bennett, G.J., 2012. Mitotoxicity and bortezomib-induced chronic painful peripheral neuropathy. *Exp. Neurol.* 238, 225–234. doi:10.1016/j.expneurol.2012.08.023