



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-
INFLAMATÓRIA DO EXTRATO DICLOROMETANO DAS RAÍZES
DE *Arrabidaea brachypoda* (DC.) BUREAU EM CAMUNDONGOS



VINÍCIUS PEIXOTO RODRIGUES
PROF. ADJ. CLÉLIA AKIKO HIRUMA-LIMA

BOTUCATU – SP
2017



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-
INFLAMATÓRIA DO EXTRATO DICLOROMETANO DAS RAÍZES
DE *Arrabidaea brachypoda* (DC.) BUREAU EM CAMUNDONGOS

VINÍCIUS PEIXOTO RODRIGUES

PROF. ADJ. CLÉLIA AKIKO HIRUMA-LIMA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título
de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia
Geral e Aplicada, Área de concentração *Biomoléculas:
estrutura e função*.

Prof. Adj. Clélia Akiko Hiruma-Lima

BOTUCATU – SP
2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Rodrigues, Vinícius Peixoto.

Avaliação das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato diclorometano das raízes de *Arrabidaea brachypoda* (DC.) bureau em camundongos / Vinícius Peixoto Rodrigues. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Clélia Akiko Hiruma-Lima

Capes: 21006008

1. Dor. 2. Inflamação. 3. Agentes anti-inflamatórios. 4. Nociceptividade. 5. Antioxidantes. 6. Plantas medicinais - Raízes.

Palavras-chave: *Arrabidaea brachypoda*; Dor; Inflamação; Nocicepção.

Banca Examinadora

1ª Titular/Presidente

Profª Adjª Clélia Akiko Hiruma-Lima (UNESP/Botucatu)

2ª Titular

Profª Drª Raquel de Cássia dos Santos (Universidade São Francisco/ Bragança Paulista)

3ª Titular

Profª Adjª Alexandrina Sartori (UNESP/Botucatu)

Auxílio Financeiro:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
(CAPES)

BIOTA- FAPESP/SP



Agradecimentos

Agradeço à minha família, D. Cristina, Sr. Luís Gonzaga, Natália e Tamires pelo apoio, compreensão, e conselhos cada um a sua diferente maneira, mas todos igualmente importantes na minha caminhada.

À Clélia pela oportunidade, confiança, paciência, pelos ensinamentos e também pelas cobranças e broncas. Um exemplo de líder, profissional e de pessoa. Mais que uma docente, uma professora.

À Lúcia Rocha pelas correções, pelos *insights*, incentivo e discussões. Outro grande exemplo e extraordinária professora.

À Silvinha (Little Silvia) que apesar de ter um contato menor também me ensinou muito.

Lari, que já perdeu a patente de sargenta há muito tempo e foi promovida a patente de amiga, mas continua sendo a ordem do lab (imagina se fosse só eu).

Muito obrigado aos meus amigos Só o Pó e Pintassilgo, o Passarinho. Os irmãos que eu nunca tive.

Muito obrigado Rei, Nega, Ximbosa, Marcelinho e Thiago, sem os quais esse trabalho não estaria aqui.

Não posso me esquecer da Paulinha, Carolzinha, Little Jhessica, Rodrigo e Giovana (a famosa Janaína) que me acolhiam em seus laboratórios quando eu fugia na hora de escrever.

Obrigado a todos do departamento de Fisiologia alunos, técnicos e docentes que de alguma forma ajudaram na minha formação.

Obrigado a CAPES pelo apoio financeiro.

E por fim a todos os que melhoraram a minha formação e pessoa, mas eu não mencionei aqui por falta de espaço ou de memória, muito obrigado.

“Posso não ter ido onde pretendia ir, mas acho que cheguei onde eu precisava estar.”

-Douglas Adams

Prólogo

O desenvolvimento do projeto de mestrado possibilitou a formação com estudos direcionados para a caracterização de atividade farmacológica de produtos naturais no tratamento da dor e inflamação. Durante a execução do projeto de mestrado, foram realizadas outras atividades, no intuito de enriquecer a formação profissional e científica do aluno.

Trabalhos apresentados em forma de painel em eventos científicos

- **Rodrigues, V. P.**; Ohara, R.; Beserra, F. P.; Périco, L. L.; Dias, M. J.; Vilegas, W.; Rocha, L. R. M.; Hiruma-Lima, C. A., Anti-inflammatory effect of the hydroalcoholic extract of *Mimosa caesalpinifolia* Benth (Mimosidaceae) in animal model In IV International Symposium on Drug Discovery. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2015, Araraquara – SP, Brasil.
- Beserra, F. P.; **Rodrigues, V. P.**; Périco, L. L.; Santos, R. C.; Ohara, R.; Saldanha, L. L.; Dokkedal, A. L.; Rocha, L. R. M.; Hiruma-Lima, C. A., Role of prostaglandins in the antiulcerogenic and antidiarrheal effect of *Cissus sicyoides* Linneu (Vitaceae) in rodents In IV International Symposium on Drug Discovery. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2015, Araraquara – SP, Brasil.
- Périco, L. L.; Santos, R. C.; **Rodrigues, V. P.**; Ohara, R.; Vilegas, W.; Rocha, L. R. M.; Santos, C.; Hiruma-Lima, C. A., In IV International Symposium on Drug Discovery. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2015, Araraquara – SP, Brasil.
- Romano, K. S. F.; Périco, L. L.; Rodrigues, V. P.; Hiruma-Lima, C. A.; Gambero, A.; Santos, R. C., Avaliação da atividade farmacológica do extrato das folhas de *Byrsonima intermedia* A. Juss. (Malpighiaceae) em modelo experimental de doença inflamatória intestinal em ratos In XXII Encontro de Iniciação Científica. Universidade São Francisco, 2016, Bragança Paulista – SP, Brasil.
- **Rodrigues, V. P.**; Périco, L. L.; Ohara, R.; Rocha, C. Q.; Vilegas, W.; Rocha, L. R. M.; Hiruma-Lima, C. A., Anti-edematogenic activity of dichloromethane extract from the roots of *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureal In 6th International Congresso of Aromatic and Medicinal Plants. Vila Galé Hotel, 2016, Coimbra, Portugal.
- Périco, L. L.; **Rodrigues, V. P.**; Ohara, R.; Santos, R. C.; Vilegas, W.; Rocha, L. R. M.; Santos, C.; Hiruma-Lima, C. A., Healing activity from the hydroalcoholic extract (leaves) of *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC. (Myrtaceae) in gastric ulcer In 6th International Congresso of Aromatic and Medicinal Plants. Vila Galé Hotel, 2016, Coimbra, Portugal.
- **Rodrigues, V. P.**; Périco, L. L.; Ohara, R.; Vilegas, W.; Rocha, C. Q.; Rocha, L. R. M.; Hiruma-Lima, C. A. Antinociceptive activity of dichloromethane extract from the roots of *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureal In VIII Simpósio Ibero-americano de Plantas Mdicinais e III Simpósio Ibero-americano de Investigação em Câncer, Universidade do Vale do Itajaí, 2016, Itajaí – SC, Brasil.
- Périco, L. L.; **Rodrigues, V. P.**; Ohara, R.; Santos, R. C.; Vilegas, W.; Rocha, L. R. M.; Santos, C.; Hiruma-Lima, C. A., Hydroalcoholic extract from the leaves of *Eugenia*

pinicifolia (Kunth) DC. Improvement injury induced by intestinal ischemia-reperfusion In VIII Simpósio Ibero-americano de Plantas Mdiciniais e III Simpósio Ibero-americano de Investigação em Câncer, Universidade do Vale do Itajaí, 2016, Itajaí – SC, Brasil.

- Ohara, R.; Périco, L. L.; **Rodrigues, V. P.**; Santos, R. C.; Vilegas, W.; Rocha, L. R. M.; Santos, L. C.; Hiruma-Lima, C. A., Curative role of the *Terminalia catappa* L. in a rat model of intestinal ischemia-reperfusion injury In VIII Simpósio Ibero-americano de Plantas Mdiciniais e III Simpósio Ibero-americano de Investigação em Câncer, Universidade do Vale do Itajaí, 2016, Itajaí – SC, Brasil.
- Ohara, R.; Périco, L. L.; **Rodrigues, V. P.**; Mazzolin, L. P.; Severi, J. A.; Hiruma-Lima, C. A., Mechanisms involved in the gastroprotective effect of *Guapira noxia* (Netto) Lundell leaves In VIII Simpósio Ibero-americano de Plantas Mdiciniais e III Simpósio Ibero-americano de Investigação em Câncer, Universidade do Vale do Itajaí, 2016, Itajaí – SC, Brasil.

Trabalhos apresentado de forma oral em eventos científicos

- **Rodrigues, V. P.**; Périco, L. L.; Rico, S. L. C; Cunha, J. C.; Souza, L. P; Vilegas, W.; Hiruma-Lima, C. A., Avaliação da atividade cicatrizante gástrica do extrato hidroalcoólico das folhas de *Astronium urundeuva* (Allemão) Engl. In XIV Workshop da Pós-Graduação, UNESP, 2015, Botucatu – SP, Brasil.
- Périco, L. L.; Santos, R. C.; Beserra, F. P.; **Rodrigues, V. P.**; Heredia-Vieira, S. C.; Vilegas, W.; Rocha, L. R. M.; Hiruma-Lima, C. A., Avaliação do efeito protetor do extrato hidroalcoólico das folhas de *Serjania marginata* Casar. (Sapindaceae) através de bioquímicos da mucosa gástrica de ratos In XIV Workshop da Pós-Graduação, UNESP, 2015, Botucatu – SP, Brasil.

Participação em eventos científicos

- XIV Workshop da Pós-Graduação – UNESP, 06/2015, Botucatu – SP, Brasil
- IV International Symposium on Drug Discovery – UNESP, 07/2015, Araraquara – SP, Brasil
- 6th International Congress of Aromatic and Medicinal Plants – Vila Galé Hotel, 05/2016, Coimbra, Portugal
- VIII Simpósio Ibero-americano de Plantas Mdiciniais e III Simpósio Ibero-americano de Investigação em Câncer, Universidade do Vale do Itajaí, 10/2016, Itajaí – SC, Brasil.

Cursos realizados

- Workshop: “Boas Práticas de Pipetagem” Metler Toledo – UNESP, 04/2015, Botucatu – SP, duração de 3 horas.
- Minicurso: “Redação científica internacional” durante XIV Workshop da Pós-Graduação - UNESP, 06/2015, Botucatu – SP, duração de 8 horas.

- Treinamento técnico: “Magpix Instrument Training” Merck – UNESP, 03/2016, Botucatu – SP, duração de 4 horas
- Minicurso: “Aplicações da Citometria de Fluxo na Pesquisa Farmacológica de Plantas Medicinais” durante VIII Simpósio Ibero-americano de Plantas Mdicinais e III Simpósio Ibero-americano de Investigação em Câncer, Universidade do Vale do Itajaí, 10/2016, Itajaí – SC, duração de 3 horas.

Extensão universitária

- Monitor do curso “Reprodução de A a Z”, como parte das atividades do Programas de Extensão Universitária “Difundindo e Popularizando a Ciência na UNESP: Interação entre a Pós-Graduação e o Ensino Básico”, realizado no Instituto de Biociências, UNESP – Botucatu, 01/2015, Botucatu – SP, duração de 48 horas.
- Monitor do curso “Reprodução de A a Z”, como parte das atividades do Programas de Extensão Universitária “Difundindo e Popularizando a Ciência na UNESP: Interação entre a Pós-Graduação e o Ensino Básico”, realizado no Instituto de Biociências, UNESP – Botucatu, 01/2016, Botucatu – SP, duração de 48 horas.
- Monitor do curso “Reprodução de A a Z”, como parte das atividades do Programas de Extensão Universitária “Difundindo e Popularizando a Ciência na UNESP: Interação entre a Pós-Graduação e o Ensino Básico”, realizado no Instituto de Biociências, UNESP – Botucatu, 01/2017, Botucatu – SP, duração de 48 horas.
- Expositor das atividades do Projeto de Extensão Universitária “Difundindo e Popularizando a Ciência na UNESP: Interação entre a Pós-Graduação e o Ensino Básico” do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu, durante o evento de extensão universitária “Venha conhecer o IB”, 04/2016, Botucatu – SP, durante 2 horas.

Estágio realizado

- Estágio de Docência na Disciplina “Fisiologia Humana” do curso de Graduação em Nutrição do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu sob supervisão da Profa. Dra. Lúcia Regina Machado da Rocha. 08/2016, duração de 36 horas.

Disciplinas cursadas

- Métodos de Estudo em Biologia Celular e Estrutural (4 créditos)
- Tópicos Especiais em Biologia Geral e Aplicada (2 créditos)
- Cultura Celular Animal (3 créditos)
- Fundamentos sobre Ética e Prática na Experimentação Animal (3 créditos)
- Interação entre a Pós-Graduação e o Ensino Básico de Ciências e Biologia (6 créditos)
- Bioestatística (4 créditos)

Capítulos de livro enviados para publicação

- Périco, L. L.; **Rodrigues, V. P.**; Almeida, L. F. R.; Furtado, A. P. P.; Vilegas, W.; Hiruma-Lima, C. A. *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek. Medicinal and Aromatic Plants of the World: South America. Springer. 2017.
- Santos, R. C.; Périco, L. L.; **Rodrigues, V.P.**; Sannomiya, M.; Rocha, L.R.M.; Hiruma-Lima, C.A. *Byrsonima intermedia* A. Juss. Medicinal and Aromatic Plants of the World: South America. Springer. 2017.

Artigo completo publicado em periódicos

- Beserra, F. P.; Santos, R. C.; Périco, L. L.; **Rodrigues, V. P.**; Kiguti, L. R. A.; Saldanha, L. L.; Pupo, A. S.; Rocha, L. R. M.; Dokkedal, A. L.; Vilegas, W.; Hiruma-Lima, C. A. Pharmacological mechanisms involved in the anti-inflammatory and antidiarrheal activities of hydroalcoholic extract from the leaves of *Cissus sicyoides*. International Journal of Molecular Science. 2016.

Resumo

A dor é um dos principais indicadores de enfermidade. Ela é uma sensação desagradável, complexa e extremamente subjetiva, relacionada a algum estímulo lesivo ou potencialmente lesivo ao organismo. Quando esses estímulos danificam tecidos do organismo a resposta inflamatória é iniciada. Essa resposta é necessária para a resolução de diversos danos e essencial para a defesa do organismo. A inflamação é uma resposta vascular realizada por mediadores inflamatórios. Se houver falha neste processo pode haver a perda da função tecidual. A abordagem mais comum para reduzir a dor e a inflamação é através do uso de medicamentos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs). Entretanto, o uso destes fármacos sem as devidas orientações, ou por longos períodos, pode levar ao aparecimento de sérias reações adversas como as úlceras pépticas. Uma alternativa para o tratamento da dor e inflamação é o uso de espécies vegetais com propriedades medicinais. Nesse contexto, a espécie *Arrabidaea brachypoda* é uma espécie medicinal comumente utilizada nas regiões sudeste e nordeste brasileira para o tratamento de cálculo renal e dores nas articulações. Considerando a utilização popular da planta, o objetivo do projeto foi avaliar a ação antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato diclorometano das raízes de *A. brachypoda* (DEAB) em modelos experimentais *in vivo* e seus mecanismos de ação. Neste trabalho avaliamos a toxicidade aguda do DEAB e também o efeito desse extrato sobre a performance motora dos animais. A avaliação da atividade nociceptiva do DEAB foi realizada através do teste da formalina. A caracterização dos mecanismos de ação antinociceptivo do DEAB foram realizados através de testes caracterizaram o envolvimento de receptores TRPV1, TRPA1, TRPM8 e ASICs, além da participação dos sistemas opioidérgico, glutamatérgico e o envolvimento supraespinal na antinociceção do extrato. Avaliamos também a ação antiedematogênica e anti-inflamatória do extrato pelo modelo de edema de orelha induzido por xilol e ácido araquidônico. Os resultados obtidos demonstram a ausência de toxicidade aguda por via oral do DEAB, caracteriza o envolvimento dos receptores TRPM8, ASIC e do sistema opioidérgico na sua atividade antinociceptiva, além do seu efeito antiedematogênico ao combater o efeito do xilol na indução do edema. Os resultados obtidos até o presente indicam o grande potencial do extrato de *A. brachypoda* como recurso terapêutico para o tratamento da dor e inflamação.

Palavras chave: Dor, nociceção, inflamação, *Arrabidaea brachypoda*.

Abstract

Pain is one of the main indicators of illness. It is an unpleasant, complex, and extremely subjective sensation related to a harmful or potentially harmful stimulus to the body. When these stimuli damage any body's tissues the inflammatory response is initiated, this reaction is necessary for the resolution of several damages and essential for the defense of the organism. Inflammation is a vascular response performed by inflammatory mediators. If this process fails, there may be loss of tissue function. The most common approach to reducing pain and inflammation is through the use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). However, the use of these drugs without proper guidelines, or for long periods, can lead to the appearance of serious adverse reactions such as peptic ulcers. An alternative for the treatment of pain and inflammation is the use of plant species with medicinal properties. In this context, the species *Arrabidaea brachypoda* is a medicinal species commonly used in the southeastern and northeastern Brazilian regions for the treatment of kidney stones and joint pain. Considering the popular use of the plant, the objective of this project was to evaluate the antinociceptive and anti-inflammatory action of the dichloromethane extract of the roots of *A. brachypoda* (DEAB) in *in vivo* experimental models and its action mechanisms. In this work we evaluate the acute toxicity of DEAB and also the effect of this extract on the motor performance of the animals. The evaluation of the nociceptive activity of the DEAB was performed through the formalin test. The characterization of the mechanisms of antinociceptive action of DEAB were performed through tests characterized the involvement of TRPV1, TRPA1, TRPM8 and ASICs receptors, as well as the participation of the opioidergic, glutamatergic and supraspinal systems in antinociception of the extract. We also evaluated the anti-edematogenic and anti-inflammatory actions of the extract through the models of ear edema induced by xylene or arachidonic acid. The results demonstrate the absence of acute oral toxicity of DEAB, characterized the involvement of TRPM8, ASIC receptors and the opioidergic system in its antinociceptive activity, as well as its anti-edematogenic effect in combating the effect of xylene on the induction of edema. The results obtained to date indicate the great potential of the extract of *A. brachypoda* as a therapeutic resource for the treatment of pain and inflammation.

Key-words: pain, nociception, inflammation, *Arrabidaea brachypoda*.

Lista de figuras

Figura 1 – Neurotransmissão no corno dorsal da medula espinhal.....	20
Figura 2 – Modulação inibitória da neurotransmissão.....	21
Figura 3 – <i>A.brachypoda</i> , popularmente conhecida como Cipó-uma ou Cervejinha-do-campo.	24
Figura 4 – Representação esquemática do modelo experimental de toxicidade aguda e <i>screening</i> hipocrático.....	26
Figura 5 – Representação esquemática do modelo experimental do teste de performance motora.	26
Figura 6 – Representação esquemática do modelo da placa quente.	28
Figura 7 – Representação esquemática do modelo do teste da formalina.....	27
Figura 8 – Representação esquemática dos modelos utilizados na avaliação do envolvimento dos receptores TRPs e ASIC na nocicepção do DEAB	28
Figura 9 – Representação esquemática do modelo utilizado na avaliação do envolvimento do sistema glutamatérgico na nocicepção do DEAB	29
Figura 10 – Representação esquemática do modelo utilizado na avaliação do envolvimento do sistema opioidérgico na nocicepção do DEAB.	29
Figura 11 – Representação esquemática dos modelos de edema de orelha induzido por xilol e AA.	30
Figura 12 – Evolução da massa corporal dos camundongos machos nos 14 dias subsequentes à administração do extrato diclorometano obtido das raízes de <i>Arrabidaea brachypoda</i> (DEAB) no modelo de toxicidade aguda.....	32
Figura 13 – Evolução da massa corporal dos camundongos fêmeas nos 14 dias subsequentes à administração do extrato diclorometano obtido das raízes de <i>Arrabidaea brachypoda</i> (DEAB) no modelo de toxicidade aguda.....	33
Figura 14 – Composição fitoquímica do extrato diclorometânico das raízes de <i>Arrabidaea brachypoda</i> determinada por HPLC-PDA.	31
Figura 15 – Efeito do tratamento agudo com extrato diclorometano obtido das raízes de <i>Arrabidaea brachypoda</i> (DEAB) e diazepam sobre o número de quedas dos animais no modelo <i>rota-rod</i>	34
Figura 16 – Efeito do tratamento com extrato diclorometano obtido das raízes de <i>Arrabidaea brachypoda</i> (DEAB) sob o tempo de nocicepção (lambida de pata) na <u>fase neurogênica</u> do modelo de formalina.....	35

Figura 17 – Efeito do tratamento com extrato diclorometano obtido das raízes de <i>Arrabidaea brachypoda</i> (DEAB) sob o tempo de nocicepção (lambida de pata) na fase inflamatória do modelo de formalina.....	36
Figura 18 – Efeito do tratamento com extrato diclorometano obtido das raízes de <i>Arrabidaea brachypoda</i> (DEAB) sob o tempo de latência de resposta (lambida da pata traseira) ao estímulo nocivo no modelo de placa quente	37
Figura 19 – Efeito do tratamento com extrato diclorometano obtido das raízes de <i>Arrabidaea brachypoda</i> (DEAB) sob o tempo de nocicepção (lambida de pata) no modelo de nocicepção induzida por capsaicina (agonista TRPV1)	38
Figura 20 – Efeito do tratamento com extrato diclorometano obtido das raízes de <i>Arrabidaea brachypoda</i> (DEAB) sob o tempo de nocicepção (lambida de pata) no modelo de nocicepção induzida por cinamaldeído (agonista TRPA1)	39
Figura 21 – Efeito do tratamento com extrato diclorometano obtido das raízes de <i>Arrabidaea brachypoda</i> (DEAB) sob o tempo de nocicepção (lambida de pata) no modelo de nocicepção induzida por mentol (agonista TRPM8).....	40
Figura 22 – Efeito do tratamento com extrato diclorometano obtido das raízes de <i>Arrabidaea brachypoda</i> (DEAB) sob o tempo de nocicepção (lambida de pata) no modelo de nocicepção induzida por salina acidificada (receptores ASIC).....	40
Figura 23 – Efeito do tratamento com extrato diclorometano obtido das raízes de <i>Arrabidaea brachypoda</i> (DEAB) sob o tempo de nocicepção (lambida de pata) no modelo de nocicepção induzida por ácido glutâmico para avaliar o envolvimento do sistema glutamatérgico	41
Figura 24 – Efeito do tratamento com extrato diclorometano obtido das raízes de <i>Arrabidaea brachypoda</i> (DEAB) sob o tempo de nocicepção (lambida de pata) no envolvimento do sistema opióide do modelo de formalina (fase neurogênica).....	43
Figura 25 – Efeito do tratamento com extrato diclorometano obtido das raízes de <i>Arrabidaea brachypoda</i> (DEAB) sob o edema de orelha induzido por xilol.....	44
Figura 26 – Efeito do tratamento com extrato diclorometano obtido das raízes de <i>Arrabidaea brachypoda</i> (DEAB) sob o edema de orelha induzido por ácido araquidônico.....	45

Lista de tabelas

Tabela 1 – Efeito do tratamento agudo com extrato diclorometano obtido das raízes de *Arrabidaea brachypoda* (DEAB) sobre os órgãos de camundongos machos no modelo de toxicidade aguda..... 33

Tabela 2 – Efeito do tratamento agudo com extrato diclorometano obtido das raízes de *Arrabidaea brachypoda* (DEAB) sobre os órgãos de camundongos fêmeas no modelo de toxicidade aguda..... 33

Sumário

Introdução	18
Justificativa	22
Objetivo	23
Material e Métodos	24
Animais	24
Dose	25
Modelos Experimentais	25
Toxicidade Aguda e <i>Screening</i> Hipocrático	25
Avaliação da Performance Motora	26
Teste da Placa Quente	27
Teste da Formalina	26
Avaliação da Participação de Receptores Associados à Canais Iônicos (TRPV1; TRPA1; TRPM8 e ASIC) na Antinociceção do DEAB	28
Edema de Orelha induzido por Ácido Araquidônico	30
Análise Estatística	30
Resultados e Discussão	31
Conclusão	45
Referências	46

Introdução

A dor é um dos principais indicadores de enfermidade, sendo o sintoma mais compartilhado entre as doenças e devido a ela parte das pessoas busca ajuda médica (Ropper *et al.*, 2014). A dor é uma sensação desagradável, complexa e extremamente subjetiva, relacionada a algum estímulo lesivo ou potencialmente lesivo ao organismo. Por envolver componentes emocionais e comportamentais nenhuma dor é igual à outra, a dor causada pela mesma doença varia de indivíduo para indivíduo (Dubin *et al.*, 2010; Ali & Lewis, 2015).

Quando analisamos a dor através da perspectiva neurobiológica, ela pode ser classificada de três maneiras: a dor nociceptiva, a dor inflamatória e a dor neuropática (Woolf, 2010).

A dor nociceptiva é desencadeada por estímulos térmicos ou mecânicos danosos ou potencialmente danosos aos tecidos; por si só ela não é patológica já que é responsável por minimizar o contato do organismo com esses estímulos, diminuindo assim, o dano iminente (Woolf, 2010; IASP, 2012).

Assim como a dor nociceptiva, a dor inflamatória também tem a sua função benéfica ao organismo. Ela ocorre em locais de injúria tecidual onde há liberação de diversos mediadores inflamatórios que irão modificar as características químicas do ambiente no qual a fibra nervosa se encontra, levando a uma hipersensibilidade do neurônio (Ellis & Bennett, 2013). Essa hiperalgesia auxilia na recuperação do dano sofrido, por aumentar a atenção e o cuidado em relação à área lesada (Woolf, 2010).

Em contrapartida, a dor neuropática não tem um papel protetor ou adaptativo, pois é causada por algum dano ao tecido nervoso ou doença relacionada a ele (Woolf, 2010; Ropper *et al.*, 2014).

A propagação da dor se dá a partir da ativação de neurônios sensoriais, denominados nociceptores, de alto limiar de ativação, altamente especializados em transduzir e transmitir estímulos nocivos (IASP, 2012).

Os nociceptores podem ser classificados em duas grandes classes de acordo com as suas funções e características de seus axônios, as fibras A δ , mielinizadas de calibre intermediário (2-5 μ m de diâmetro) e velocidade de condução levemente maior que as fibras C que não apresentam mielina, são estreitas (0,3-1,1 μ m de diâmetro) e têm baixa velocidade de condução (Ropper *et al.*, 2014).

Os nociceptores mielinizados ainda podem ser divididos em duas classes, as fibras A δ tipo I, que são as principais responsáveis pela resposta primária a estímulos mecânicos e químicos, porém seu limiar a estímulos ao calor é relativamente alto, em contraste, as fibras A δ

do tipo II respondem prontamente a estímulos lesivos provocados pelo calor, tendo um alto limiar aos estímulos mecânicos (Basbaum *et al.*, 2009).

A maior parte das fibras C, assim como as fibras A δ , são polimodais, isto é, são fibras sensíveis a estímulos térmicos e mecânicos; uma população interessante dessas fibras são os nociceptores silenciosos que quando em homeostasia não respondem a nenhum estímulo mecânico, porém após serem expostas a um ambiente inflamatório as mesmas passam a responder a esse tipo de estímulo. Isso se deve ao fato dessas células serem sensíveis aos fatores químicos, que alteraram suas propriedades tornando-as responsivas aos estímulos mecânicos (Schmidt, *et al.*, 1995; Perl, 2007; Basbaum *et al.*, 2009).

Para que a dor seja sentida os estímulos nocivos precisam ser detectados, transduzidos e transportados até regiões superiores do cérebro como o córtex e sistema límbico. O transporte dessas informações é feito através de potenciais de ação cuja formação depende da expressão de receptores nas terminações livres dos nociceptores (Millan, 1999; Almeida *et al.*, 2004; Dai, 2015).

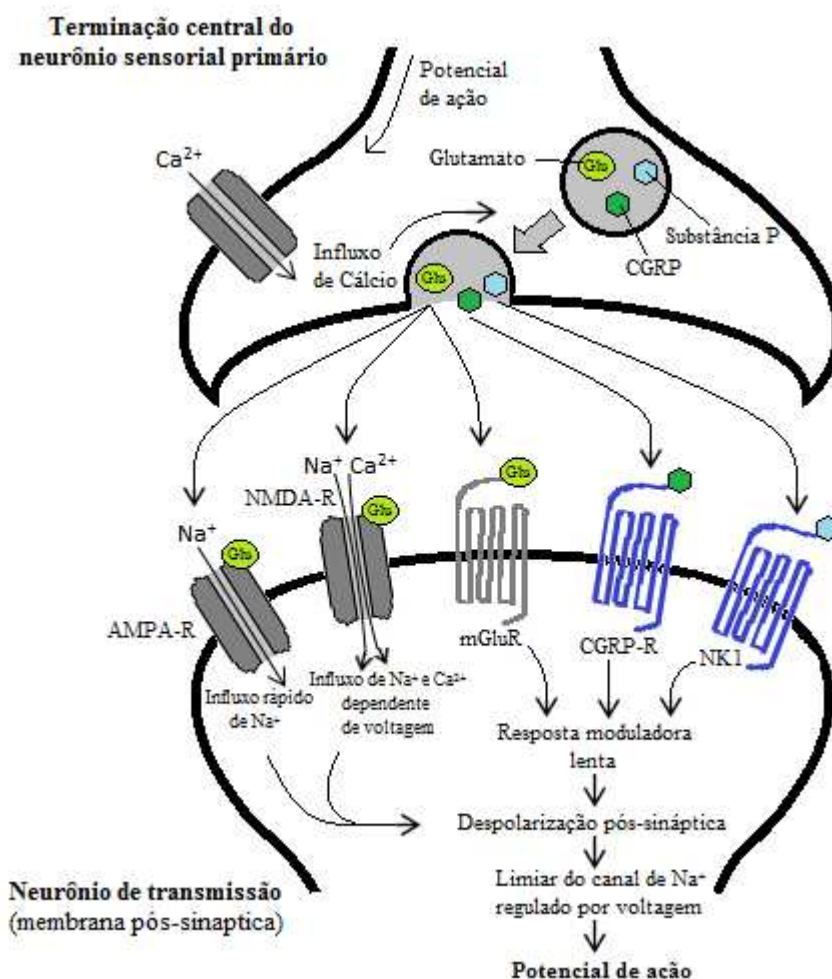
Os canais iônicos que incluem os receptores de potencial transitório (TRP) e os canais iônicos sensíveis a ácido (ASIC) vêm sendo relacionados como participantes importantes no processo doloroso (Dai, 2015).

Os canais TRP são divididos em sete subfamílias das quais quatro apresentam membros envolvidos na nocicepção. Apesar de serem, inicialmente, identificados como receptores termossensíveis os canais TRP respondem a diversas mudanças no ambiente celular, como alterações térmicas, de pressão, químicas e de pH (Linius & Owsianik, 2011; Laing & Dhaka, 2016).

Os ASIC são canais catiônicos pertencentes à família dos canais degenerina/canal epitelial de sódio, (DEG/ENaC). Esses receptores são sensíveis à elevação da concentração extracelular dos íons H⁺ (Deval *et al.*, 2010).

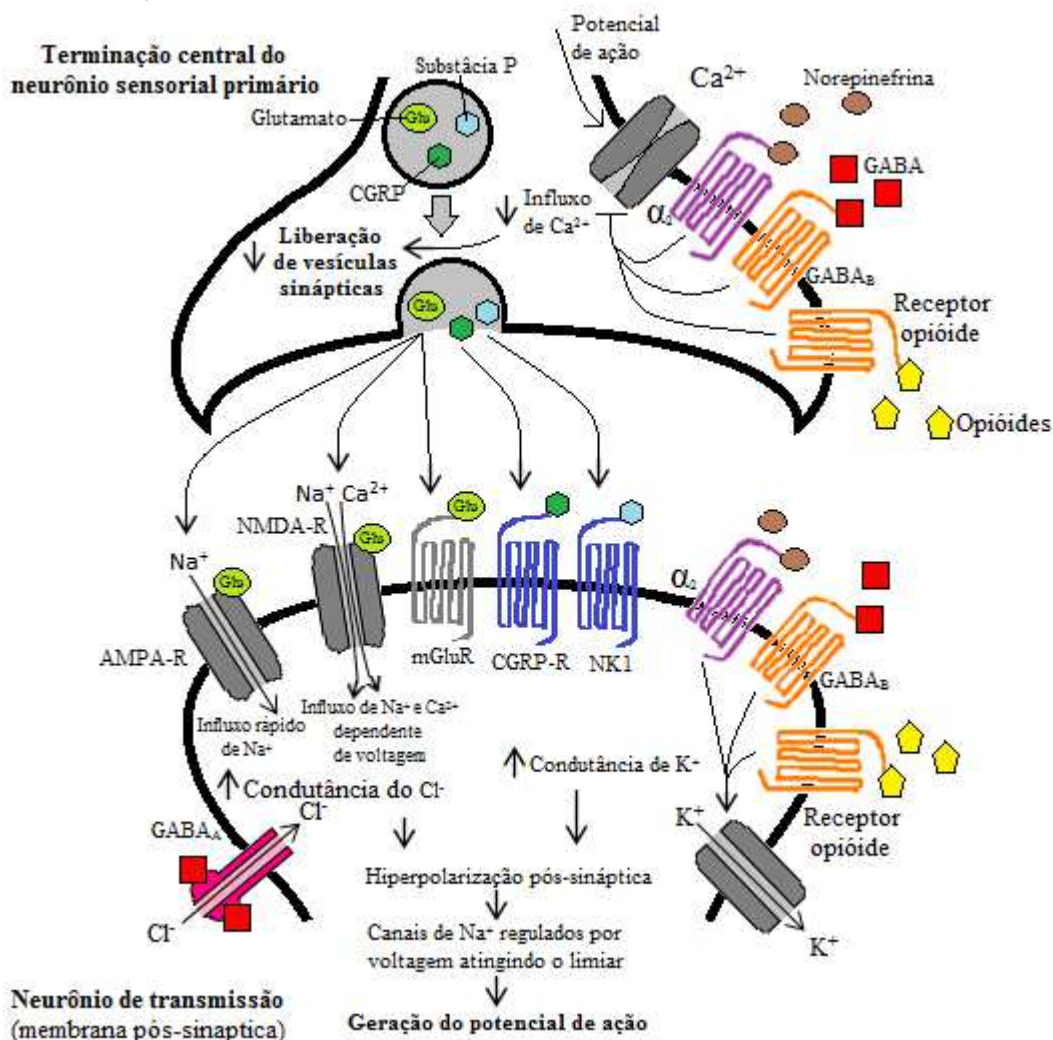
O potencial de ação gerado por esses receptores nas fibras aferentes primária são transmitidos até o corno dorsal da medula espinhal onde farão sinapse com os neurônios de projeção (figura 1), estimulando-os a transportar a informação nociceptiva até centros supraespinhais (Millan, 2002; Almeida *et al.*, 2004). A transmissão sináptica entre os neurônios primários e os de projeção é mediada pela liberação de vesículas contendo glutamato e neuropeptídeos como a substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e modulada por mecanismos locais e supraespinhais (Griffin & Woolf, 2011).

Figura 1 – Neurotransmissão no corno dorsal da medula espinhal. Um potencial de ação iniciado na periferia ativa os canais de cálcio pré-sinápticos sensíveis à voltagem. Ocorre influxo de cálcio resultando na liberação de vesículas contendo neurotransmissores (glutamato, substância P e CGRP) que atuam na membrana pós-sináptica. O glutamato estimula receptores inotrópicos (responsáveis pela transmissão rápida da informação nociceptiva) e receptores metabotrópicos que em conjunto com os receptores de CGRP e substância P medeia uma resposta mais lenta (Griffin & Woolf, 2011).



A modulação inibitória da nociceção (figura 2) ocorre através de peptídeos opióides, norepinefrina, serotonina, glicina e GABA (ácido gama-aminobutírico) cuja liberação é controlada por interneurônios inibitórios locais e circuitos descendentes originados em regiões como o hipotálamo e a amígdala (Ossipov *et al.*, 2010; Griffin & Wolf, 2011).

Figura 2 – Modulação inibitória da neurotransmissão. Neurônios inibitórios descendentes ou locais liberam norepinefrina, GABA e peptídeos opióides que atuam tanto no terminal pré-sináptico como no terminal pós-sináptico. No neurônio sensorial primário ocorre a inibição do influxo de cálcio pelos canais sensível à voltagem e que resulta em uma menor liberação de neurotransmissores. A inibição pós-sináptica se dá principalmente pela hiperpolarização da membrana gerada a partir de um aumento no influxo de íons cloreto e efluxo de potássio (Griffin & Woolf, 2011).



Quando algum estímulo nocivo seja ele uma substância química, temperaturas extremas, traumas mecânicos, agentes biológicos ou até radiação ionizante que danifica os tecidos do organismo, a resposta inflamatória pode ser desencadeada (Rote *et al.*, 2014).

A inflamação é uma resposta necessária para a resolução de diversos danos, sendo essencial para a defesa do organismo; normalmente essa resposta inicia-se sozinha, se autopropaga, e também termina por si só, porém em muitos casos há uma exacerbação da resposta o que leva a um ciclo vicioso de lesão e inflamação (Waite, 2013).

A inflamação é caracterizada por quatro sinais clássicos, o rubor, calor, edema e dor, em consequência das alterações vasculares do local afetado pela resposta inflamatória (Tabas & Glass, 2013). Essas modificações são realizadas por mediadores inflamatórios gerados durante a resposta imune. Duas principais classes de mediadores são as prostaglandinas (PG) e os

leucotrienos (LT); ambas são geradas a partir do ácido araquidônico (AA) pela ação das enzimas ciclooxigenase e lipooxigenase, respectivamente (Kishiyama, 2014). Esses produtos do AA vão agir na vasodilatação, permeabilidade vascular e ainda auxiliar na quimiotaxia de neutrófilos e eosinófilos para o local da lesão (Kishiyama, 2014; Rote *et al.*, 2014).

Justificativa

A classe dos analgésicos opióides ainda é bastante prescrita para tratamento clínico em casos de dor severa aguda, dor pós-operatória e crônica, apesar dos conhecidos efeitos adversos, como náusea, constipação, depressão respiratória, tolerância, vício e, em longo prazo hipogonadismo, osteoporose, imunossupressão e hiperalgesia (Mao, 2002; Yunes, 2005; Cunha *et al.*, 2010; Raghavan *et al.*, 2011).

A abordagem terapêutica mais comum para reduzir a dor e a inflamação envolve o uso de fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), como aspirina ou ibuprofeno (Kummer & Coelho, 2002; Basbaum *et al.*, 2009; McGettigan & Henry, 2013).

Os AINEs apresentam atividade analgésica, antipirética e anti-inflamatória, e são capazes de reduzir a dor inflamatória e a hiperalgesia principalmente pela inibição das ciclooxigenases (COX) -1 e COX-2, envolvidas na síntese de prostaglandinas, produzindo alívio da dor por um período significativamente longo (Teixeira, 2001; Basbaum *et al.*, 2009). Os AINEs ainda possuem mecanismos adicionais de ação, incluindo a inibição da quimiotaxia e da produção de citocinas inflamatórias (Rhind *et al.*, 2002).

Entretanto as reações adversas provocadas pelos AINEs já são bem compreendidas, estando amplamente relacionadas com o seu mecanismo de ação (Grosser *et al.*, 2006). A inibição das COXs pode levar ao aparecimento de efeitos gastrointestinais que podem variar desde dispepsia, sangramentos do estômago e duodeno, ativação de doenças inflamatórias intestinais quiescentes e dano tecidual no trato gastrointestinal (Akiko *et al.*, 2001; Wallace, 2008). A inibição da COX também promove comprometimentos cardiovasculares importantes que inclui a redução da produção de prostaciclina (PGI₂) que possui ação antitrombótica no endotélio (Fitzgerald, 2003; Saraiva, 2007).

Os produtos naturais, principalmente os de origem vegetal, tem sido desde a antiguidade uma importante fonte de ativos terapêuticos. As plantas são uma fonte importante de biomoléculas ativas, muitas das quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos, podendo contribuir para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas (Coutinho *et al.*, 2009; Simões *et al.*, 2010).

A Etnobotânica e a Etnofarmacologia são campos interdisciplinares de pesquisa que buscam substâncias medicinais derivadas de vegetais baseando-se em conhecimento popular (Gurib-Fakim, 2006).

Diversos compostos que se tornaram importantes para a medicina moderna surgiram de estudos etnobotânicos ou etnofarmacológicos. Produtos naturais e seus derivados representam mais de 50% de todos os fármacos em uso atualmente, sendo que plantas superiores representam cerca de um quarto desses medicamentos (Gurib-Fakim, 2006; Rishton, 2008).

O gênero *Arrabidaea*, pertencente a família Bignoniaceae, possui mais de 170 espécies e ocorre desde o México até a Argentina, incluindo o Cerrado brasileiro. As diversas espécies que compõe esse gênero são utilizadas na medicina tradicional como adstringente, antioxidante, anti-inflamatório, antimicrobiano, antitumoral e cicatrizante (Zorn *et al.*, 2001; Bolzani *et al.*, 2003; Leite *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2008). As raízes da *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau, popularmente conhecida como Cipó-uma ou Cervejinha-do-campo, são comumente utilizadas para o tratamento de cálculo renal e dores nas articulações (Alcerito *et al.*, 2002; Rodrigues *et al.*, 2006).

Rocha e colaboradores (2011) demonstraram que o extrato etanólico das raízes de *A. brachypoda* possui efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivo em modelos experimentais sem apresentar toxicidade. Apesar da efetividade das ações, os mecanismos de ação envolvidos com esse extrato polar não foram investigados, porém os autores caracterizaram fitoquimicamente o extrato etanólico, que possui em sua constituição predominantemente compostos polares como: flavonóides, saponinas, coumarinas, taninos, glicosídeos cardiotônicos, esteróides e compostos fenólicos (Rocha *et al.*, 2011). Apesar da efetividade do extrato polar na analgesia e inflamação, nosso trabalho propôs a caracterização da atividade farmacológica do extrato diclorometano das raízes de *Arrabidaea brachypoda* (DEAB) um extrato de solvente apolar.

Objetivo

Avaliar o efeito anti-inflamatório e antinociceptivo do extrato diclorometano obtido das raízes de *Arrabidaea brachypoda* (DEAB) e investigar seus mecanismos de ação em modelos experimentais in vivo.

Material e Métodos

Coleta e Preparo do Material Vegetal

Amostras de *Arrabidaea brachypoda* foram coletadas no Brasil em abril de 2010, na fazenda Sant'Ana da Serra em João Pinheiro, Minas Gerais. A planta foi identificada no Herbário José Badine da Universidade Federal de Ouro Preto pela botânica Dra. Maria Cristina Teixeira Braga Messias. Um voucher (n° 17.935) foi depositado no Herbário da Universidade Federal de Ouro Preto em Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.

Cascas das raízes (400 g) de *Arrabidaea brachypoda* foram separadas, secas e extraídas, sucessivamente, por percolação, à temperatura ambiente com CH₂Cl₂ (1 L). O extrato diclorometânico obtido foi filtrado e evaporou-se até à secura sob vácuo à temperatura de cerca de 40 °C para ser obtido 37.7% (4.44g) de extrato seco. A extração foi executada pela Prof^a Dr^a Cláudia Quintino da Rocha (UFMA).

Estudo fitoquímico das cascas das raízes *Arrabidaea brachypoda*

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fotodiodo (HPLC-PDA) revelou que apenas três substâncias majoritários foram extraídos com o solvente diclorometano (DCM) da partição líquido/líquido. A fração diclorometânica das cascas das raízes foi primeiro fracionada utilizando cromatografia líquida de média pressão (MPLC) com Zeoprep ® C18 como fase estacionária e MeOH e H₂O contendo 0,002% de ácido fórmico com um gradiente linear de 5% a 100% de MeOH em 50 horas. A taxa de fluxo foi de 3,5 mL por minuto, e a absorvância de ultravioleta foi detectada aos 254 nm. Essa separação por MPLC rendeu 235 frações. Todas as frações foram analisadas por HPLC-PDA e agrupadas de acordo com a semelhança nos perfis cromatográficos.

Animais

Camundongos Swiss, machos e fêmeas (20-35g) provenientes do biotério Anilab – Paulínia/SP foram utilizados em todos os modelos experimentais utilizados nesse estudo. Eles foram aclimatados às condições do biotério setorial (Departamento de Fisiologia, UNESP-

Figura 3 – *A.brachypoda*, popularmente conhecida como Cipó-uma ou Cervejinha-do-campo



Botucatu) por pelo menos sete dias antes da manipulação experimental, sob temperatura (22 ± 2 °C) e ciclo claro-escuro de 12 horas controladas. Os animais foram mantidos em caixas de fundo sólido forradas com maravalha e alimentados com ração Presence[®] e água *ad libitum*. Todos os modelos experimentais deste projeto foram submetidos, analisados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNESP – campus de Botucatu sob o protocolo n° 728-CEUA, estando de acordo com a legislação vigente (Lei 11.794/2008 e Decreto 6.899/2009).

Dose

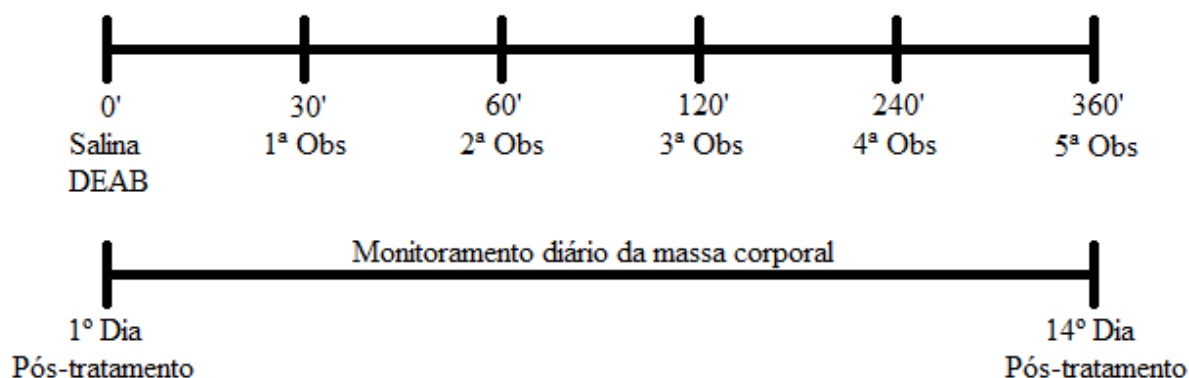
Nos modelos de edema de orelha e formalina três doses de DEAB foram utilizadas (10, 30 e 100 mg/kg). O trabalho de Rocha e colaboradores (2011) foi utilizado como base para a seleção da dose do DEAB. A partir dos resultados obtidos, uma curva dose-resposta do DEAB foi realizada para a determinação da menor dose efetiva utilizada nos demais experimentos.

Modelos Experimentais

Toxicidade Aguda e *Screening* Hipocrático

Os camundongos, fêmeas e machos (n=10) foram submetidos a jejum de 12 horas e, posteriormente, receberam o extrato de *A. brachypoda* (2000 mg/kg) ou veículo (salina 10 mL/kg) oralmente. A dose do extrato utilizada para esse experimento segue as diretrizes para testes de substâncias químicas da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 2002). Após as administrações orais do extrato e veículo, um *screening* hipocrático foi realizado nos animais submetidos aos diferentes tratamentos. Para tanto, diversos parâmetros foram analisados nos diferentes grupos de animais tais como: aparência, agressividade, reflexos auriculares e palpebrais, capacidade locomotora, analgesia, micção, defecação dentre outros sinais clínicos evidentes de efeitos depressores ou estimulantes centrais, miorelaxante e sedativo. Essas avaliações foram realizadas aos 30, 60, 120, 240 e 360 minutos após as administrações orais do extrato e veículo. Os animais retornaram ao biotério com ração e água à vontade, após o último período de observação, e tiveram seus pesos aferidos, diariamente, nos 14 dias subsequentes. Ao final do período de observação, os animais foram eutanasiados e tiveram os seguintes órgãos retirados e pesados: coração, pulmão, fígado, baço, rins, ovários, útero e testículos para realizar uma determinação analítica e comparativa em relação aos animais submetidos ao tratamento com o veículo indicando ou não efeito tóxico agudo do extrato vegetal (figura 4) (Malone & Robichaud, 1962; Souza Brito, 1994).

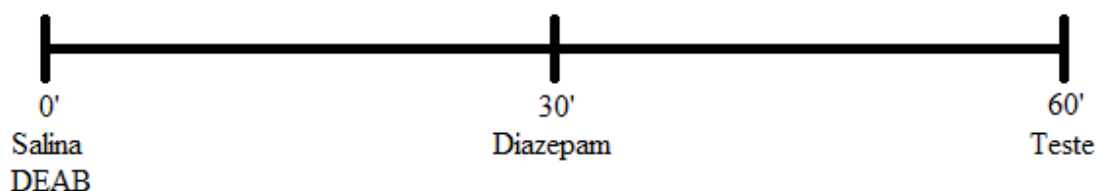
Figura 4 – Representação esquemática do modelo experimental de toxicidade aguda e *screening* hipocrático. A primeira barra representa a ordem de eventos ao longo do *screening* hipocrático enquanto a segunda barra representa o período de monitoramento da massa corporal dos animais.



Avaliação da Performance Motora: Teste *Rota-rod*

O teste *rota-rod* (Ugo Basile, Itália) consiste em uma barra giratória com o diâmetro de 2,5 cm subdividida em compartimentos, a rotação da barra tem velocidade constante de seis revoluções por minuto (Dunham & Miya, 1957). Os animais, camundongos machos (n=8), foram pré-selecionados 24 horas antes do experimento, eliminando os camundongos que não permaneceram na barra por três períodos consecutivos de 60 segundos. Os animais foram tratados com DEAB (300 mg/kg) ou veículo (salina 10 mL/kg) por via oral uma hora antes do teste. O controle positivo utilizado foi o diazepam (2 mg/kg) administrado por via intraperitoneal 30 minutos antes da avaliação de performance motora. Foi analisado o número de quedas de cada animal durante os três minutos de observação (figura 5).

Figura 5 – Representação esquemática do modelo experimental do teste de performance motora. A barra representa a ordem de eventos ao longo do teste *rota-rod*.

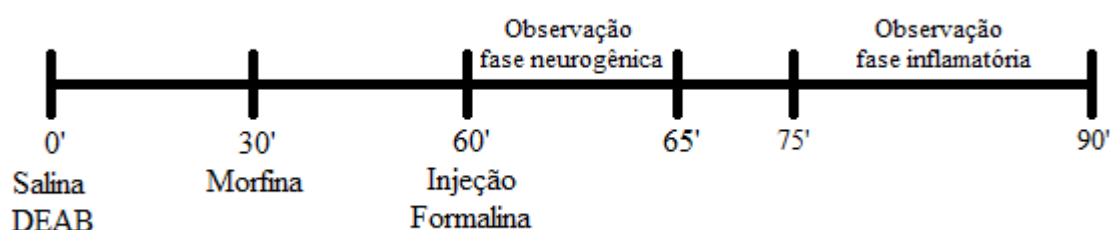


Avaliação da Ação Nociceptiva: Teste da Formalina

Os camundongos machos (n=8-10) foram tratados oralmente (p.o.) com veículo (salina 10 mL/kg) ou DEAB (10, 30, 100 mg/kg). Na primeira fase de observação o controle positivo utilizado foi morfina (2,5 mg/kg) aplicada por via subcutânea (s.c.) e na segunda fase de observação foi piroxicam (30 mg/kg; p.o.). Cada camundongo foi colocado na câmara de

observação, que consiste em um funil com 20 cm de diâmetro, por 30 minutos antes da injeção intraplantar de formalina para permitir aclimação com o novo ambiente. Após uma hora dos tratamentos orais (30 minutos após administração da morfina) 20 µL de solução de formalina 1% em salina foi injetada intraplantarmente (i.pl.) na pata traseira direita de cada camundongo. Os animais foram observados em dois momentos, nos cinco primeiros minutos após a injeção de formalina e posteriormente durante 15 a 30 minutos após a injeção. O tempo, em segundos, que o camundongo lambeu sua pata foi registrado e considerado como indicativo de nocicepção (figura 7) (Hunskaar & Hole, 1987; Tjolsen, 1992 com modificações).

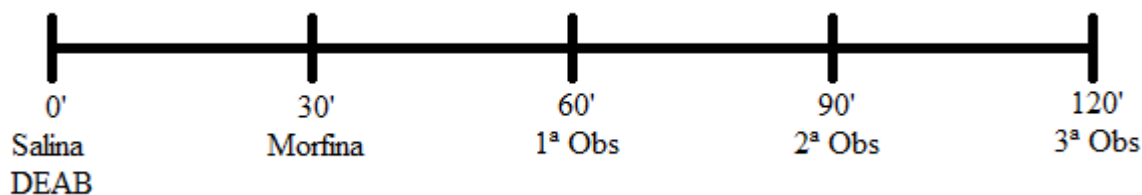
Figura 6 – Representação esquemática do modelo do teste da formalina. A barra representa a ordem de eventos ao longo do experimento.



Avaliação da Participação das Vias Descendentes na Antinocicepção do DEAB: Teste da Placa Quente

Esse modelo (Eddy & Leimbach, 1953) foi utilizado para avaliar o efeito do DEAB na dor neurogênica. Para isso, a placa (Insight[®], Brasil) foi aquecida e mantida a temperatura de 56 ± 1 °C. Os camundongos machos foram previamente selecionados e colocados sobre a placa aquecida delimitada por um cilindro de vidro de 24 cm de diâmetro. O tempo decorrido até o animal demonstrar um comportamento nociceptivo (lamber, chacoalhar ou retirar a pata traseira da placa) foi registrado como período de latência. Foi determinado o tempo limite de permanência sobre a placa de 30 segundos para que não ocorresse lesão tecidual. Os tratamentos consistiram em veículo (salina) ou DEAB (30 mg/kg), por via oral, 1 hora antes do teste ou morfina 5 mg/kg (s.c.) 30 minutos antes do início da avaliação. Os animais (n=8) foram avaliados aos 60, 90 e 120 minutos após os tratamentos orais e 30, 60 e 90 após os tratamentos subcutâneos (figura 6).

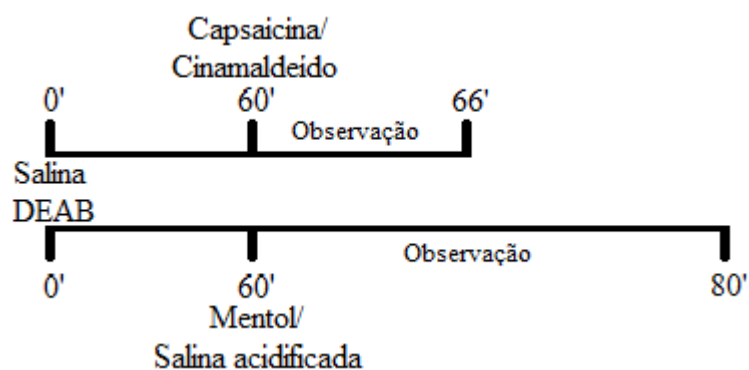
Figura 7 – Representação esquemática do modelo da placa quente. A barra representa a ordem de eventos ao longo do experimento.



Avaliação da Participação de Receptores Associados à Canais Iônicos (TRPV1; TRPA1; TRPM8 e ASIC) na Antinocicepção do DEAB

Para investigar a participação dos receptores de potencial transitório, os TRPs, (TRPV1; TRPA1; TRPM8) ou receptores dos canais iônicos sensíveis ao ácido (ASIC), na atividade antinociceptiva do DEAB os camundongos machos (n=8-10) receberam injeção intraplantar de 20 μ L de capsaicina (agonista TRPV1, 2 μ g/pata), cinamaldeído (agonista TRPA1, 40 nmol/pata), mentol (agonista TRPM8, 2 μ mol/pata) ou salina acidificada (ativador de receptor TRPV1 e ASIC) (3% de ácido acético; pH=2,0). Os animais foram tratados por via oral com veículo ou DEAB (30 mg/kg) e observados por 6 minutos seguidos (para capsaicina e cinamaldeído) ou 20 minutos seguidos (para mentol e salina acidificada). O tempo, em segundos, que o animal lambeu a pata foi considerado como indicativo de nocicepção (figura 8) (Sakurada *et al.*, 1992; Andrade *et al.*, 2008; Bautista *et al.*, 2006; Baggio *et al.*, 2012 com modificações).

Figura 8 – Representação esquemática dos modelos utilizados na avaliação do envolvimento dos receptores TRPs e ASIC na nocicepção do DEAB. A primeira barra representa a ordem de eventos ao longo dos experimentos relacionados aos receptores TRPV1 e TRPA1. A segunda barra representa os experimentos relacionados aos receptores TRPM8 e ASIC.

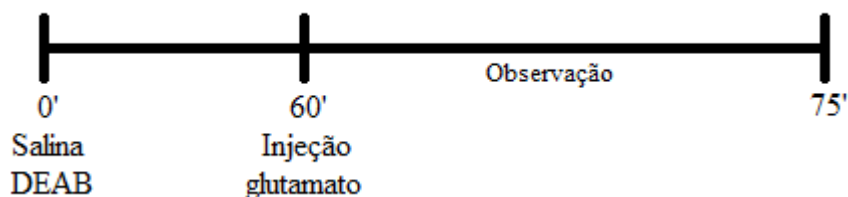


Avaliação da Participação do Sistema Glutamatérgico na Antinocicepção do DEAB

Para avaliar o papel do sistema glutamatérgico na atividade antinociceptiva do DEAB, uma injeção intraplantar de 20 μ L de 30 μ mol de solução de ácido glutâmico (pH=7,0) foi

administrada no camundongos machos. Os animais (n=8-10) tratados via oral com veículo ou DEAB (30 mg/kg), foram observados por 15 minutos seguidos. O tempo, em segundos, que o animal lambeu a pata foi considerado como indicativo de nocicepção (figura 9) (Beirith *et al.*, 2002; Meotti *et al.*, 2010).

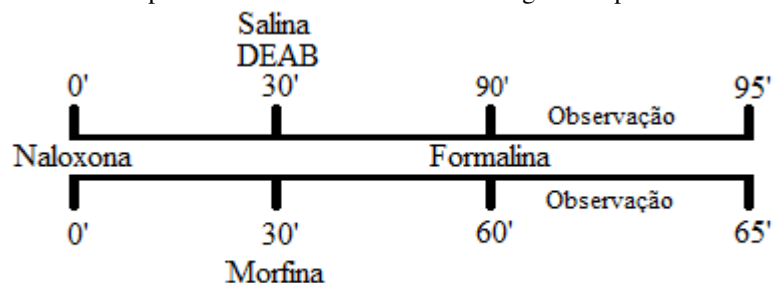
Figura 9 – Representação esquemática do modelo utilizado na avaliação do envolvimento do sistema glutamatérgico na nocicepção do DEAB. A barra representa a ordem de eventos ao longo do experimento.



Avaliação da Participação do Sistema Opioidérgico na Antinocicepção do DEAB

Para avaliar a participação de receptores opióides na atividade antinociceptiva do DEAB os camundongos machos (n=8-10) foram pré-tratados com naloxona por via intraperitoneal (i.p.) (antagonista não seletivo de receptor opióide) 1 mg/kg 30 minutos antes aos tratamentos, isto é, veículo (10 mL/kg, p.o.), DEAB (30 mg/kg, p.o.) e morfina (2,5 mg/kg, s.c.). Uma hora após os tratamentos orais e 30 minutos após o tratamento subcutâneo uma injeção de formalina foi administrada intraplantarmente na pata traseira direita dos animais que foram observados durante a fase neurogênica do teste (cinco minutos). O tempo, em segundos, que o animal lambeu a pata foi considerado como indicativo de nocicepção (figura 10) (Santos *et al.*, 1999 e Santos *et al.*, 2005 com modificações).

Figura 10 – Representação esquemática do modelo utilizado na avaliação do envolvimento do sistema opioidérgico na nocicepção do DEAB. A barra representa a ordem de eventos ao longo do experimento.



Edema de Orelha Induzido por Xilol

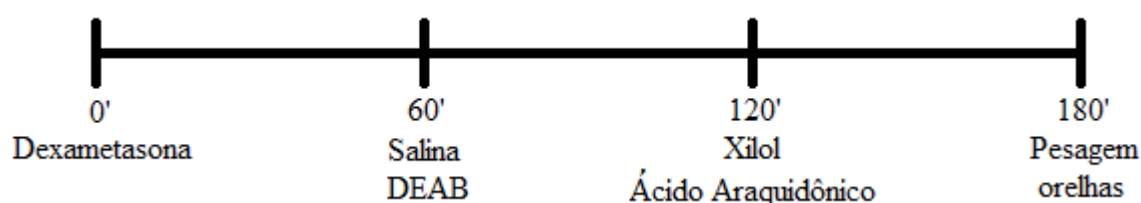
Para avaliar o efeito antiedematogênico do DEAB foi utilizado o modelo experimental de indução de edema com o uso tópico do xilol. Para indução do edema, foram aplicados 40 µL de

xilol, na orelha direita dos camundongos machos (20 µL na face anterior da orelha, 20 µL na face posterior). A orelha esquerda foi utilizada como controle. Os animais (n=8) foram submetidos ao jejum de duas horas. Foram tratados com dexametasona (5 mg/kg, i.p.) duas horas antes da indução do edema. DEAB nas doses 10, 30 e 100 mg/kg e o controle negativo (veículo) foram administrados por via oral uma hora antes da indução. Uma hora após a aplicação de xilol os camundongos foram eutanasiados e uma secção circular (7 mm de diâmetro) de suas orelhas esquerdas e direitas foram retiradas com o auxílio de um perfurador. Logo em seguida as orelhas foram pesadas. O edema foi caracterizado através da diferença de massa (em miligramas) entre a orelha direita e a orelha esquerda (figura 11) (Swingle *et al.*, 1981 com modificações).

Edema de Orelha induzido por Ácido Araquidônico

Para avaliar a participação do ácido araquidônico (AA) na ação anti-inflamatória do DEAB, foi utilizado o modelo experimental de indução de edema orelha com o uso tópico do AA. Para indução do edema, foram aplicados topicamente na orelha direita dos camundongos machos 20 µL de AA (diluído em acetona; 0,1 mg/µL); 10 µL na face anterior da orelha, 10 µL na face posterior). A orelha esquerda foi utilizada como controle. Os camundongos (n=8) foram submetidos ao jejum de duas horas e foram tratados com dexametasona (5 mg/kg, i.p.) duas horas antes da indução do edema. DEAB nas doses 10, 30 e 100 mg/kg e o controle negativo (veículo) foram administrados por via oral uma hora antes da indução. Uma hora após a aplicação de AA os camundongos foram eutanasiados e uma secção circular (7 mm de diâmetro) de suas orelhas esquerdas e direitas foram retiradas com um perfurador. Logo em seguida as orelhas foram pesadas e o edema foi caracterizado através da diferença de massa (em miligramas) entre a orelha direita e a orelha esquerda (figura 11) (Young *et al.*, 1984 com modificações).

Figura 11 – Representação esquemática dos modelos de edema de orelha induzido por xilol e AA. A barra representa a ordem de eventos ao longo de ambos os experimentos.



Análise Estatística

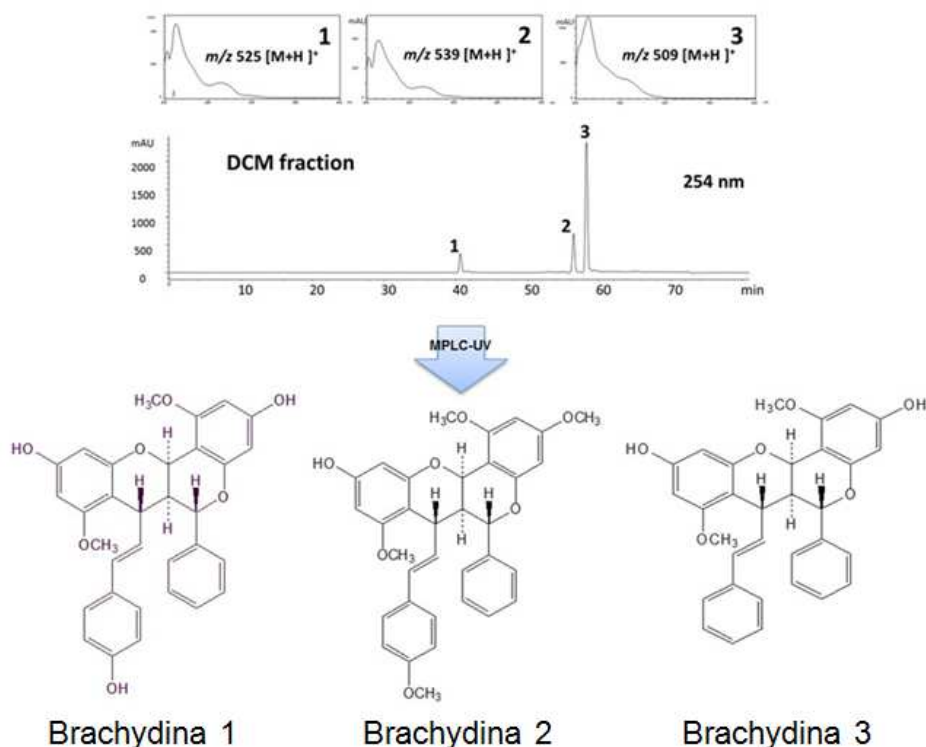
Os resultados estão apresentados sob a forma de média ± erro padrão da média. Os resultados foram submetidos ao teste t de Student na comparação entre dois grupos ou à análise

de variância (ANOVA) de uma via (na comparação entre três grupos ou mais) seguida pelos testes de Dunnett (para comparar tratamentos com o controle negativo) ou de Tukey (para comparar todos os grupos entre si). Resultados com amostras dependentes foram submetidos à ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni quando necessário. O nível de significância mínimo considerado foi menor que 0,05. O grau de significância foi determinado como: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; e *** $p < 0,001$.

Resultados e Discussão

Rocha *et al.* (2011) demonstraram o efeito anti-inflamatório e antinociceptivo do extrato etanólico da raiz de *A. brachypoda*. Esse extrato apresenta em sua composição uma grande diversidade de compostos fitoquímicos tais como flavonóides, triterpenóides, saponinas, glicosídeos cardiotônicos, compostos fenólicos, taninos e esteróides. Nesse trabalho avaliamos a ação do extrato diclorometano de *A. brachypoda*. O solvente utilizado nessa extração é, responsável pela extração de outro conjunto de compostos fitoquímicos. Estudos fitoquímicos realizados pelo grupo caracterizou a composição do DEAB mostrando que nesse extrato existem somente os flavonóides diméricos brachydina 1, brachydina 2 e brachydina 3 (figura 12).

Figura 12 – Composição fitoquímica do extrato diclorometânico das raízes de *Arrabidaea brachypoda* determinada por HPLC-PDA.



Iniciamos os ensaios biológicos com o DEAB testando sua segurança, avaliando sua toxicidade aguda e efeitos na ação motora dos animais. Esta é uma etapa importante dos estudos de plantas medicinais e fitoterápicos; a utilização das plantas e seus derivados nem sempre é segura como se acredita, as plantas medicinais e produtos naturais podem ser prejudiciais quando não se conhece seus possíveis efeitos colaterais (Nweze, 2012). Apesar de serem consideradas seguras, em geral, muitas plantas medicinais utilizadas com fins terapêuticos se mostraram capazes de causar intoxicação em doses altas ou quando usadas durante um período prolongado (Poornima *et al.*, 2012).

Associado com o estudo de toxicidade aguda, o *screening* hipocrático é muito útil e comumente usado na detecção de atividades farmacológicas e toxicológicas nas quais parâmetros comportamentais estereotipados podem ser indicativos de sua ação no organismo (Lucio *et al.*, 2000). Através da observação dos parâmetros comportamentais e morfológicos macroscópicos analisados, foi possível observar que a dose única do DEAB de 2000 mg/kg não revelou nenhuma alteração dos parâmetros avaliados além de uma leve anestesia tanto em fêmeas quanto em machos 30 minutos após a administração do extrato (anexo 1). Nos 14 dias subsequentes à administração do extrato nenhuma morte ou alteração de comportamento e aparência foram detectadas nos camundongos de ambos os sexos.

A avaliação diária da massa corporal é um importante meio de avaliação de compostos que podem ser metabolizados no fígado e após este processo se tornar ativos tóxicos para o organismo (Souza Brito, 1994). A evolução da massa corporal dos animais submetidos aos diferentes tratamentos não diferiu ao longo dos 14 dias de observação (figuras 13 e 14).

Figura 13 – Evolução da massa corporal dos camundongos machos nos 14 dias subsequentes à administração do extrato diclorometano obtido das raízes de *Arrabidaea brachypoda* (DEAB) no modelo de toxicidade aguda. ANOVA de duas vias.

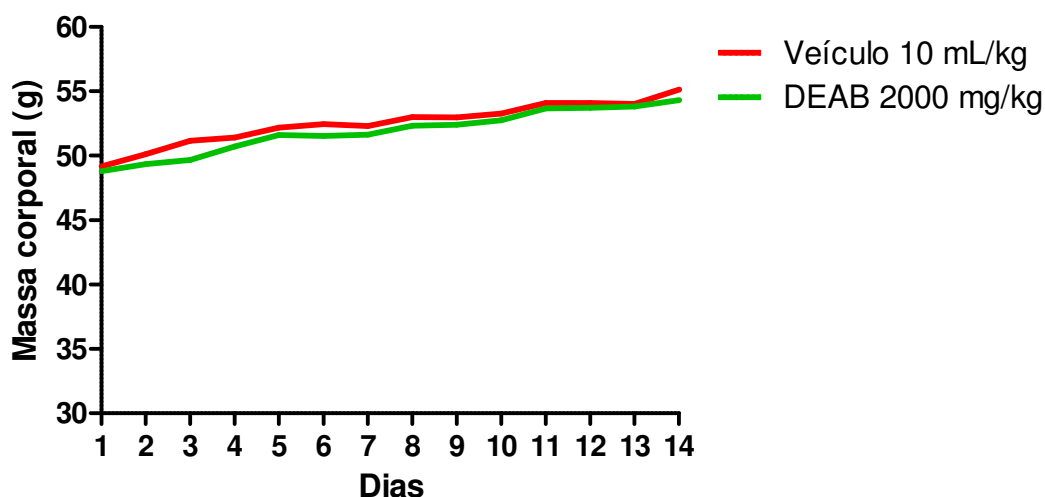
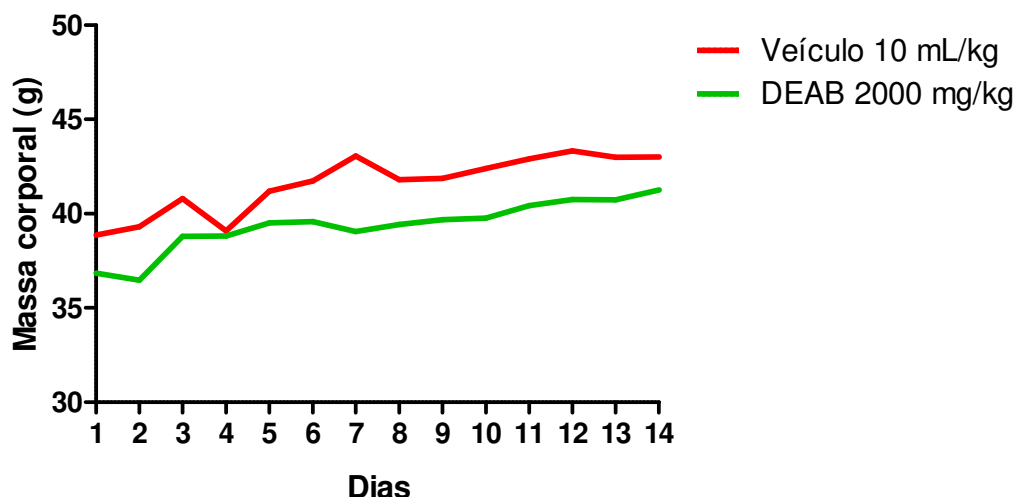


Figura 14 – Evolução da massa corporal dos camundongos fêmeas nos 14 dias subsequentes à administração do extrato diclorometano obtido das raízes de *Arrabidaea brachypoda* (DEAB) no modelo de toxicidade aguda. ANOVA de duas vias.



A relação entre massa de diferentes órgãos e massa corporal do animal também foi avaliada sem revelar nenhuma diferença entre os animais que receberam o DEAB e os que receberam veículo (tabelas 1 e 2).

Tabela 1 – Efeito do tratamento agudo com extrato diclorometano obtido das raízes de *Arrabidaea brachypoda* (DEAB) sobre os órgãos de camundongos machos no modelo de toxicidade aguda. Teste *t* de Student.

Tratamento	Coração	Pulmão	Fígado	Baço	Rins	Testículos
Salina	3,79 ± 0,09	4,15 ± 0,05	12,47 ± 0,22	3,65 ± 0,16	6,05 ± 0,11	3,96 ± 0,09
DEAB 2000 mg/kg	3,87 ± 0,08	4,13 ± 0,04	12,55 ± 0,18	3,37 ± 0,08	6,03 ± 0,13	4,14 ± 0,04

Tabela 2 – Efeito do tratamento agudo com extrato diclorometano obtido das raízes de *Arrabidaea brachypoda* (DEAB) sobre os órgãos de camundongos fêmeas no modelo de toxicidade aguda. Teste *t* de Student.

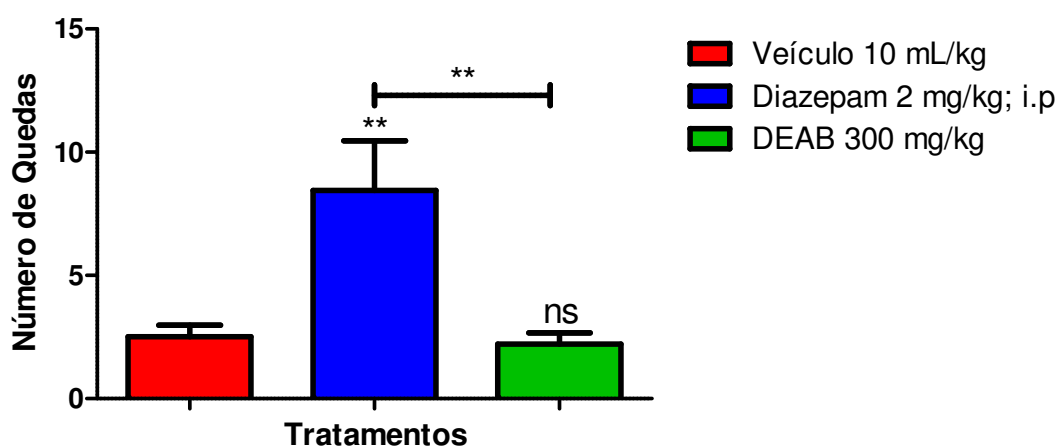
Tratamento	Coração	Pulmão	Fígado	Baço	Rins	Ovários	Útero
Salina	3,81 ± 0,08	4,19 ± 0,09	12,52 ± 0,17	3,64 ± 0,19	5,67 ± 0,14	1,23 ± 0,08	2,96 ± 0,25
DEAB 2000 mg/kg	3,89 ± 0,12	4,33 ± 0,13	12,65 ± 0,18	3,80 ± 0,13	5,66 ± 0,16	1,09 ± 0,09	2,46 ± 0,27

A ausência de sinais de toxicidade do DEAB assegurou o prosseguimento dos estudos sobre o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório da espécie.

Os modelos experimentais de nociceção, em animais, avaliam o comportamento nociceptivo através de respostas motoras, que podem ser suprimidas por medicamentos sedativos ou relaxantes musculares (Le Bars, 2001). Com a finalidade de excluir um efeito miorreaxante ou sedativo do extrato, que levaria a um resultado falso positivo na avaliação de sua ação analgésica, foi realizado o teste *rota-rod*.

Nossos resultados demonstraram que os animais que receberam veículo e extrato não apresentaram diferença no número de quedas da barra giratória quando comparados entre si, apenas o grupo tratado com diazepam (controle positivo) um benzodiazepínico com efeito ansiolítico e relaxante muscular, apresentou, como esperado, um número elevado de quedas quando comparado aos grupos tratados com veículo e DEAB (figura 15).

Figura 15 – Efeito do tratamento agudo com extrato diclorometano obtido das raízes de *Arrabidaea brachypoda* (DEAB) e diazepam sobre o número de quedas dos animais no modelo *rota-rod*. ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnett. Teste *t* de Student. ** $p < 0,01$ e ns: diferença não significativa.



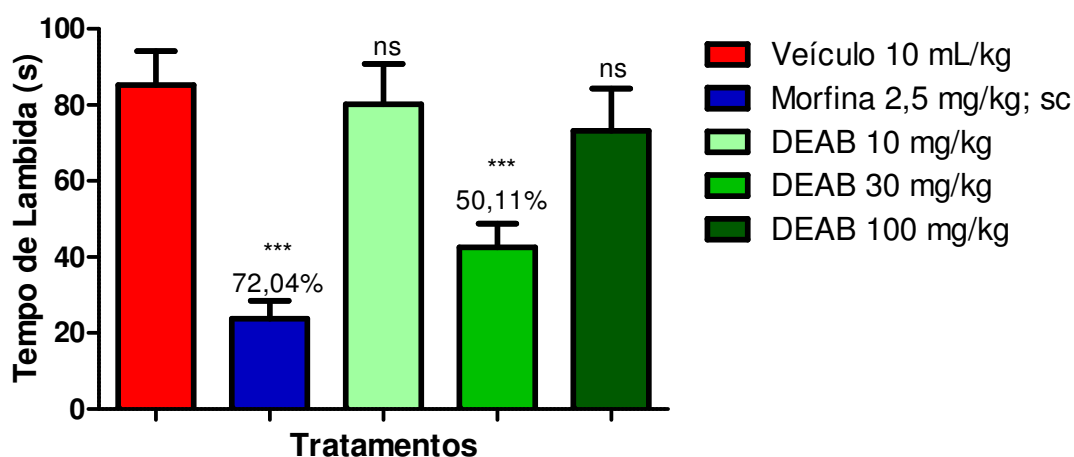
Com os resultados obtidos nesses primeiros experimentos, é possível assegurar que o DEAB não possui efeitos miorreaxantes ou sedativos nem mesmo tóxicos quando, o que nos permitiu continuarmos o estudo inicialmente proposto.

O primeiro teste para avaliar a ação antinociceptiva do extrato foi o teste da formalina, um modelo específico de nociceção aguda. Este teste apresenta uma resposta distinta (bifásica) de resposta à dor. A primeira fase inicia-se logo após a administração de formalina e desaparece após aproximadamente cinco minutos. Esta é uma fase indicativa de dor neurogênica (mecanismo central), que sofre ação principalmente de fármacos narcóticos (opióides). A segunda fase, ou fase tardia, inicia-se entre 15-30 minutos após a administração de formalina e

permanece até cerca de 60 minutos. Esta fase é indicativa de dor inflamatória, e pode ser modulada pela ação de fármacos de ação periférica como os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) e narcótico (Hunskar & Hole, 1987; Tjolsen *et al.*, 1992).

Nossos resultados demonstram que na fase de dor neurogênica apenas os grupos tratados com morfina e com a dose intermediária de DEAB (30 mg/kg) apresentaram redução no tempo de lambida da pata quando comparados com o grupo controle negativo (figura 16).

Figura 16 – Efeito do tratamento com extrato diclorometano obtido das raízes de *Arrabidaea brachypoda* (DEAB) sob o tempo de nociceção (lambida de pata) na fase neurogênica do modelo de formalina. ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ e ns: diferença não significativa.

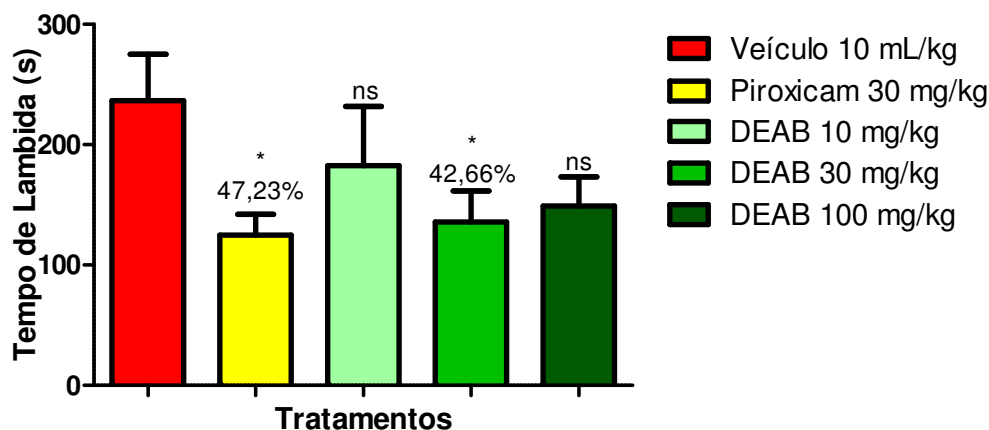


A dor neurogênica é causada pela ativação direta de receptores TRPA1 (um membro da família de receptores TRP), altamente expressos nas fibras C. A ativação desses receptores, pela formalina, acarreta na liberação de substância P (SP) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). A SP produz hiperalgesia mediada por mensageiros intracelulares como NO, ácido araquidônico e proteína quinase C (PKC) (Coderre & Yashpal, 1994). O CGRP sensibiliza os neurônios do corno dorsal da medula espinhal, e este efeito pode ser bloqueado por inibidores da proteína quinase A (PKA) ou PKC (Sun *et al.*, 2004).

A dor inflamatória é caracterizada pela liberação de mediadores pró-inflamatórios como prostaglandinas, NO, bradicinina, serotonina, histamina e glutamato, que sensibilizam a medula espinhal (Hunskar & Hole, 1987; Tjolsen *et al.*, 1992; McNamara *et al.*, 2007; Trevisani *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2012). A injeção intraplantar de formalina resulta também em comportamentos relacionados à dor, tais como a lambida e a mordida da pata lesada (Shibata *et al.*, 1989; Le Bars, 2001). Fármacos anti-inflamatórios esteroidais e não-esteroidais são capazes de diminuir o comportamento nociceptivo durante a segunda fase enquanto a primeira fase não é afetada (Hunskar *et al.*, 1985; Rosland *et al.*, 1990).

O mesmo aconteceu na fase de dor inflamatória, o grupo controle positivo, tratado com piroxicam e o grupo que recebeu DEAB 30 mg/kg foram os únicos capazes de diminuir a nociceção quando comparados ao grupo que recebeu veículo (figura 17).

Figura 17 – Efeito do tratamento com extrato diclorometano obtido das raízes de *Arrabidaea brachypoda* (DEAB) sob o tempo de nociceção (lambida de pata) na fase inflamatória do modelo de formalina. ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett. * $p < 0,05$ e ns: diferença não significativa.



Nesse mesmo modelo experimental Rocha *et al.*, (2011) demonstraram que o extrato etanólico de *A. braquipoda* não apresentou nenhum efeito na dor neurogênica nas doses 30, 100 e 300 mg/kg indicando, que a diferença na composição do extrato apolar, avaliado nesse trabalho, foi capaz de concentrar substâncias com maior capacidade de atuar sobre esse tipo de dor.

A partir dos resultados obtidos com o DEAB na fase da dor neurogênica e inflamatória, optamos por dar continuidade com a dose de 30 mg/kg para investigar os mecanismos de ação envolvidos na atividade antinociceptiva.

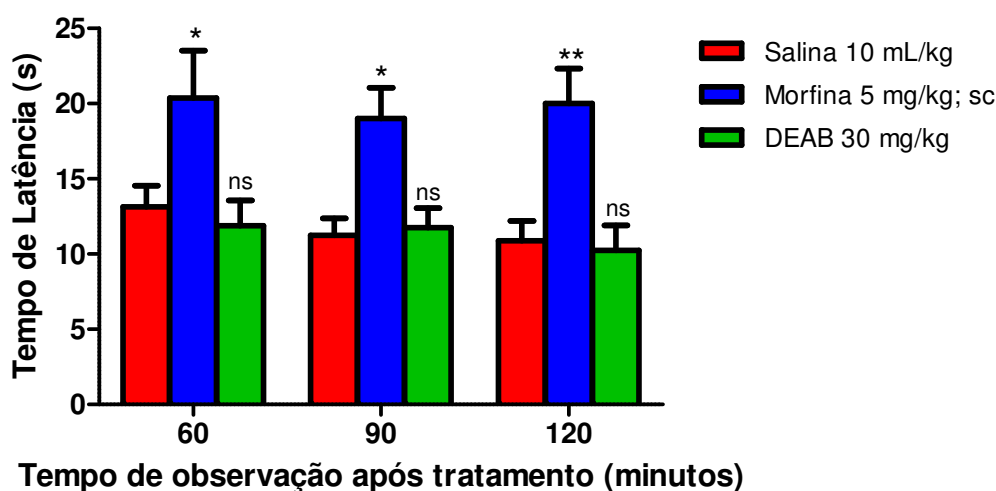
O modelo da placa quente foi escolhido para caracterizar a atividade do DEAB. Além de promover medidas de respostas nociceptivas semelhante à dor humana por mediar respostas supraespinhais que se diferem dos reflexos nociceptivos espinhais. Este modelo experimental é objetivo, acessível e pode ser empregado repetidamente com grande reprodutibilidade (Gunn *et al.*, 2011). O teste da Placa Quente é caracterizado por dois componentes comportamentais: a lambida de pata e o salto. A lambida de pata é suprimida por analgésicos opióides, enquanto que o salto pode ser inibido por analgésicos menos potentes, como ácido acetilsalicílico ou paracetamol (Le Bars, 2001).

Aproximadamente 45% dos nociceptores térmicos de pequeno e médio diâmetro (fibras C e A δ tipo I) são ativados por volta de 45 °C, enquanto que 5-10% das fibras A δ tipo II têm correntes evocadas a aproximadamente 52 °C e são insensíveis a capsaicina (Nagy & Rang,

1999; Kirschstein *et al.*, 1999). As fibras C e A δ tipo I respondem ao estímulo térmico devido a ativação de receptores vanilóides tipo 1 (TRPV1), (Julius & Basbaum, 2001) enquanto o componente independente dos receptores TRPV1 envolve diversos receptores da mesma família incluindo os TRPV-2, -3 e -4 (Basbaum *et al.*, 2009).

Nossos resultados demonstram que o DEAB não foi capaz de aumentar o período de latência dos animais em permanecer na placa em nenhum dos tempos avaliados (60, 90 e 120 min após o tratamento), mostrando que o efeito antinociceptivo da planta não é mediado por mecanismos supraespinhais (figura 18).

Figura 18 – Efeito do tratamento com extrato diclorometano obtido das raízes de *Arrabidaea brachypoda* (DEAB) sob o tempo de latência de resposta (lambida da pata traseira) ao estímulo nocivo no modelo de placa quente. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e ns: diferença não significativa.



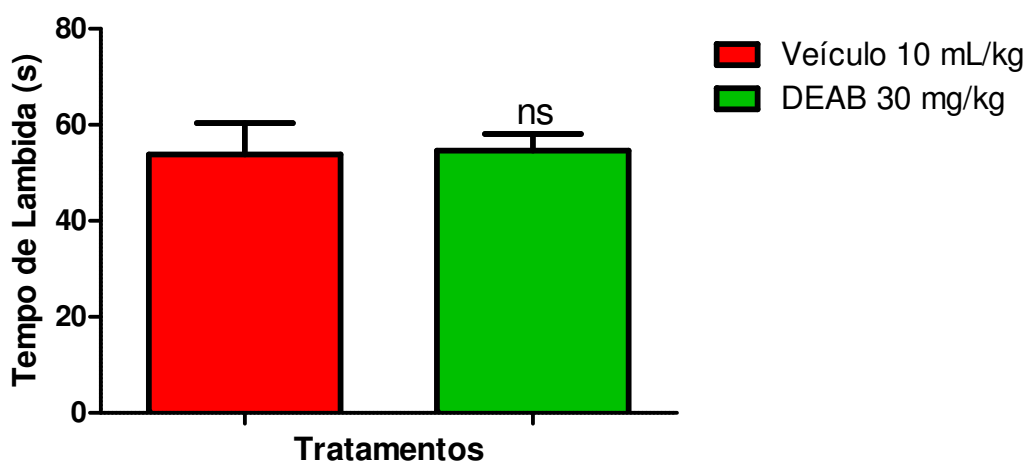
A ausência de efeito antinociceptivo do DEAB sob os estímulos térmicos nos instigou a prosseguir na avaliação da ação do extrato sobre outros receptores, tais como os receptores associados a canais iônicos, que incluem os receptores de potencial transitório (TRPs) e os canais iônicos sensíveis a ácido (ASIC).

A família dos canais TRPs é uma das maiores dentre os canais iônicos sendo expressos desde fungos até humanos; esses receptores desempenham papéis importantes na resposta a diversos estímulos, como luz, som, temperatura, substâncias químicas e toque (Levine & Alessandri-Haber, 2007). As subfamílias TRPV (receptor de potencial transitório vanilóide), TRPA (receptor de potencial transitório anquirina) e TRPM (receptor de potencial transitório melastatina) pertencem ao grupo 1 dos receptores TRPs, devido a forte homologia de sequência, e são ativados principalmente por estímulos térmicos e químicos (Venkatachalam & Montell, 2007). O papel exercido pelos canais TRPs na mediação da dor patológica os tornam alvos valiosos no estudo e desenvolvimento de analgésicos (Dai, 2015).

O receptor de potencial transitório vanilóide subtipo 1 (TRPV1) é um receptor ativado pela capsaicina, substância derivada da pimenta vermelha, e responsável pela transdução da sensação de calor nocivo e dor (Immke & Gavva, 2006; Pietrovski, *et al.*, 2006; Sakurada, *et al.*, 2003).

Os resultados de nosso estudo demonstraram que o DEAB não apresentou atividade antinociceptiva no modelo de dor induzida por capsaicina. Os animais que receberam extrato exibiram o mesmo tempo de resposta ao estímulo nociceptivo que os animais tratados com veículo (figura 19).

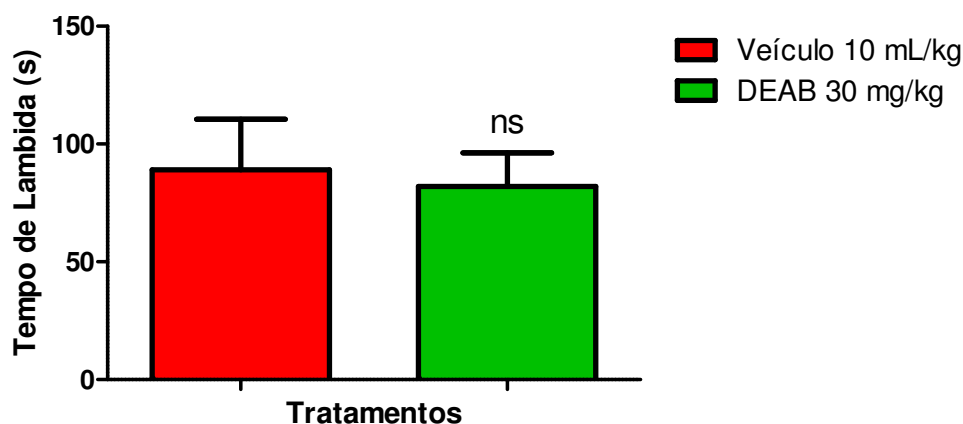
Figura 19 – Efeito do tratamento com extrato diclorometano obtido das raízes de *Arrabidaea brachypoda* (DEAB) sob o tempo de nocicepção (lambida de pata) no modelo de nocicepção induzida por capsaicina (agonista TRPV1). Teste *t* de Student. ns: diferença não significativa.



O receptor de potencial transitório anquirina subtipo 1 (TRPA1) é outro receptor polimodal podendo ser ativado, térmica, química e mecanicamente. Os canais TRPA1 são capazes de reconhecer uma grande quantidade de substâncias químicas endógenas e exógenas, como o alilisotiocianato (AITC, derivado da mostarda), alicina (alho) e cinamaldeído (canela) (Andrade *et al.*, 2008; Dai, 2015).

O DEAB também não demonstrou participação na via do TRPA1. Os animais tratados com o extrato não diferiram no tempo que passaram lambendo a pata quando comparados aos animais que receberam veículo no teste de nocicepção induzido por cinamaldeído (figura 20).

Figura 20 – Efeito do tratamento com extrato diclorometano obtido das raízes de *Arrabidaea brachypoda* (DEAB) sob o tempo de nociceção (lambida de pata) no modelo de nociceção induzida por cinamaldeído (agonista TRPA1). Teste *t* de Student. ns: diferença não significativa.

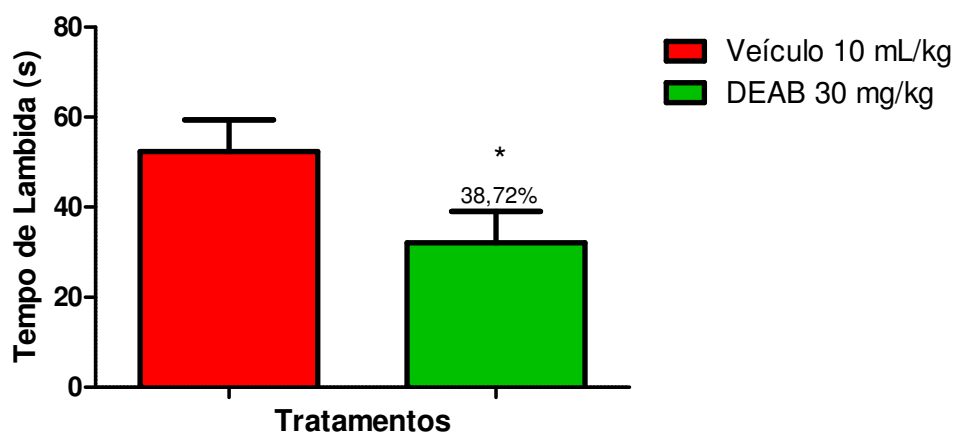


O receptor de potencial transitório melastatina subtipo 8 (TRPM8) é um receptor sensível aos estímulos térmicos frios e substâncias como o mentol (Julius, 2013). A aplicação tópica do mentol em baixas concentrações reduz a irritação causada pela capsaicina, a hipersensibilidade ao calor, torções e cefaleia. Porém, a injeção intraplantar de altas concentrações de mentol induz a alodínia ao frio e a hiperalgesia, além de poder ativar receptores TRPA-1 (Pan *et al.*, 2012).

O TRPM8 vem sendo relacionado à mediação de hipersensibilidade à dor inerente à inflamação por ser ativado por uma grande amplitude de temperaturas, incluindo frios inócuos e nocivos. Esse receptor também tem um papel regulatório na acidez intracelular e plasticidade frente a estímulos prolongados (Levine & Alessandri-Haber, 2007).

No teste de nociceção induzida por mentol o DEAB o tempo de lambida de pata diminuiu 38,72% quando comparado ao grupo tratado com veículo, indicando, que o efeito antinociceptivo do extrato ocorre através da modulação destes receptores (figura 21).

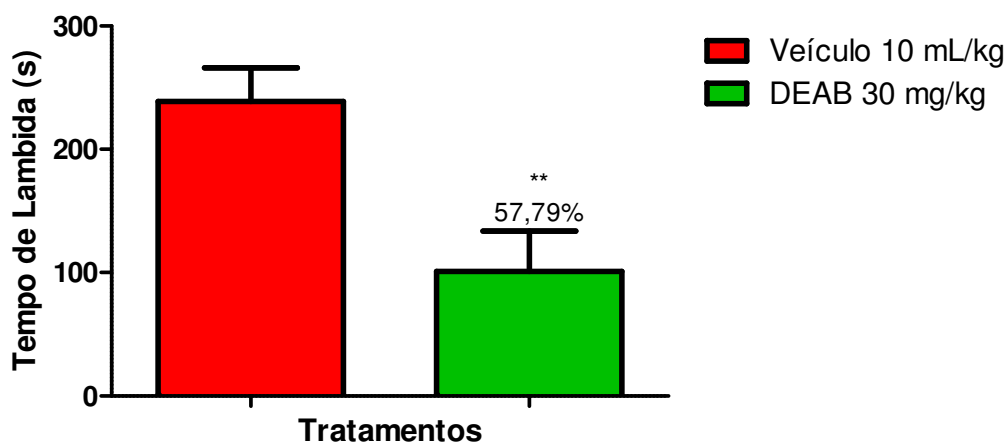
Figura 21 – Efeito do tratamento com extrato diclorometano obtido das raízes de *Arrabidaea brachypoda* (DEAB) sob o tempo de nocicepção (lambida de pata) no modelo de nocicepção induzida por mentol (agonista TRPM8). Teste *t* de Student. * $p < 0,05$.



Além dos TRPs, outro receptor associado a canais iônicos são os receptores ASICs, cuja ativação se dá pela acidificação do meio. Lesão tecidual e inflamação causam acidose local e o pH ácido resultante pode causar dor pela ativação desses receptores (Sluka *et al.*, 2009; Wemmie *et al.*, 2013). São descritos pelo menos cinco subtipos de receptores ASICs, cada subtipo apresenta uma sensibilidade diferente ao pH e seu próprio padrão de expressão, sendo que a maioria deste subtipos é expressa no gânglio da raiz dorsal, preferencialmente os 1b e 3, onde estão envolvidos na nocicepção mecânica e por acidose tecidual (Julius & Basbaum, 2001; Basbaum *et al.*, 2009; Bashari *et al.*, 2009).

Os resultados apresentados na figura 22 mostram que a administração oral do DEAB inibiu a nocicepção induzida pela salina acidificada em 57,8%, demonstrando, portanto o envolvimento do receptor ASIC na antinocicepção do extrato.

Figura 22 – Efeito do tratamento com extrato diclorometano obtido das raízes de *Arrabidaea brachypoda* (DEAB) sob o tempo de nocicepção (lambida de pata) no modelo de nocicepção induzida por salina acidificada (receptores ASIC). Teste *t* de Student. ** $p < 0,01$.



O sistema glutamatérgico é um importante mediador da transmissão na de estímulos nocivos, seu papel é desempenhado através do glutamato, um aminoácido excitatório amplamente encontrado no sistema nervoso central, onde participa de processos fisiológicos e patológicos incluindo a dor. As ações do glutamato são mediadas pela ativação de receptores metabotrópicos e ionotrópicos expressos em todos os níveis do sistema nervoso central (Palazzo *et al.*, 2014).

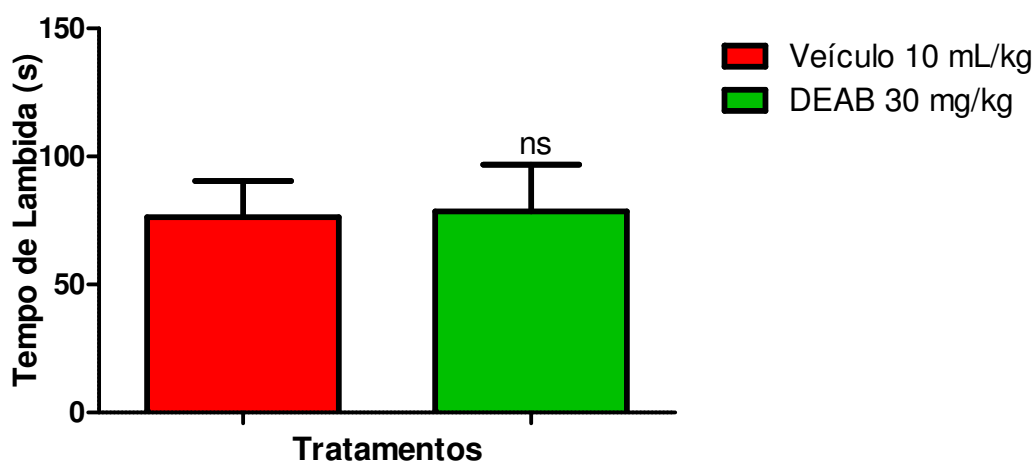
Os receptores metabotrópicos são acoplados a proteínas G, e agem indiretamente nos canais iônicos modulando o processo nociceptivo. Estes receptores só são ativados quando os níveis de glutamato estão elevados durante a estimulação repetitiva da sinapse entre o neurônio sensorial primário e os neurônios de projeção (Nicoll, 2012; Palazzo *et al.*, 2014;).

Os receptores ionotrópicos podem ser divididos em receptores AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico), NMDA (N-metil-D-aspartato), KA (cainato). Os receptores AMPA e KA são permeáveis ao Na^+ e ao K^+ , enquanto que o NMDA é altamente permeável ao Ca^{2+} , assim como ao Na^+ e ao K^+ . Já (Nicoll, 2012).

A modulação do sistema glutamatérgico pode ser vantajosa na terapêutica de quadros dolorosos quando empregada em associação a outros medicamentos já utilizados nos tratamentos, o que torna fármacos que diminuam a liberação de glutamato alvos interessantes para o desenvolvimento de novas terapias (Osikowicz *et al.*, 2013).

Entretanto, como demonstrado na figura 23 a atividade antinociceptiva exercida pelo DEAB não envolve o sistema glutamatérgico.

Figura 23 – Efeito do tratamento com extrato diclorometano obtido das raízes de *Arrabidae brachypoda* (DEAB) sob o tempo de nocicepção (lambida de pata) no modelo de nocicepção induzida por ácido glutâmico para avaliar o envolvimento do sistema glutamatérgico. Teste *t* de Student. ns: diferença não significativa.



O sistema opióide é essencial na modulação de estímulos dolorosos e nocicepção. A modulação ocorre através de peptídeos e receptores opióides cuja expressão ocorre ao longo de diversos pontos do sistema nervoso central e tecidos periféricos (Al-Hasani & Bruchas, 2011).

Os receptores μ , κ , δ são os principais receptores opióides já identificados, todos são acoplados a proteína G e quando ativados mediam diversos efeitos que incluem analgesia, depressão respiratória, euforia, disforia e inibição do trânsito gastrointestinal (Waldhoer *et al.*, 2004).

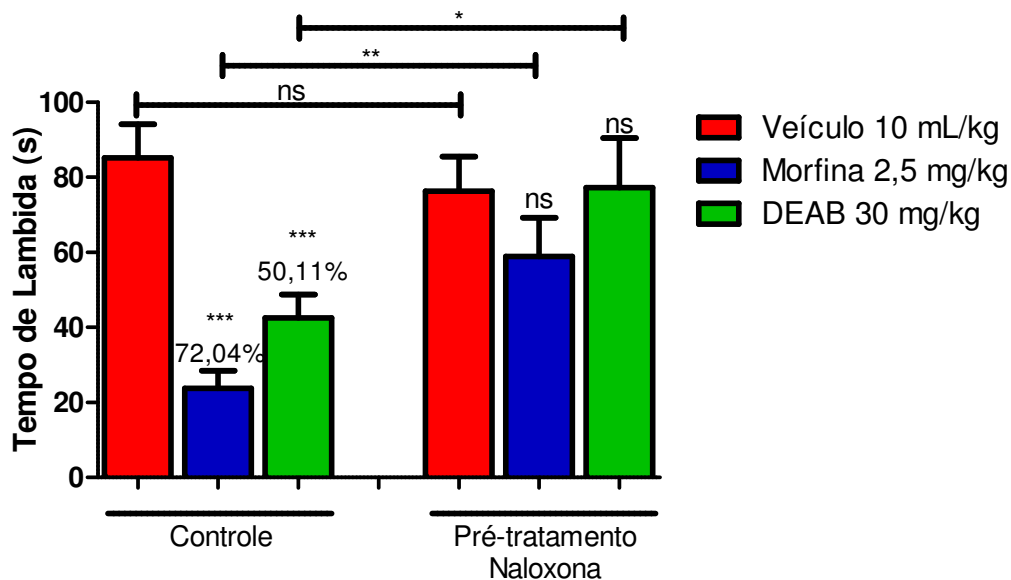
Apesar de produzirem uma grande variedade de efeitos esses três receptores têm sido associados com analgesia espinhal e supraespinhal modulando a via da transmissão da dor no corno dorsal da medula espinhal (Todd & Spike, 1993; Coggeshall & Carlton, 1997; Fürst, 1999; Longhi-Balbinot *et al.*, 2011); além disso os receptores sinalizam de forma muito semelhante, afetando a regulação de canais iônicos, modulando o processamento de Ca^{2+} intracelular e alterando a fosforilação de proteínas (Schumacher *et al.*, 2012; Stoelting *et al.*, 2015).

Tanto os opióides endógenos quanto os exógenos, como a morfina, agem como agonistas dos receptores opióides, produzindo analgesia através da inibição pré e pós-sináptica no corno dorsal da medula. Nas fibras pré-sinápticas (A δ e C) a ativação de receptores opióides é responsável pelo fechamento de canais de Ca^{2+} regulados por voltagem, reduzindo a liberação de transmissores, e nas fibras pós-sinápticas promove hiperpolarização da membrana através da abertura de canais de K^+ (Schumacher *et al.*, 2012).

A naloxona é uma substância antagonista pura, não seletiva, dos receptores opióides. Quando administrada sozinha em indivíduos normais seus efeitos são mínimos, porém ela tem a capacidade de bloquear os efeitos de opióides endógenos e exógenos, servindo como ferramenta farmacológica para o estudo do envolvimento desses receptores (Bullcok & Manias, 2014; Rang *et al.*, 2015).

Os resultados obtidos mostram que o pré-tratamento feito com naloxona foi capaz de inibir a ação antinociceptiva tanto do extrato quanto da morfina quando comparados a animais que não receberam pré-tratamento, indicando, portanto, a participação do sistema opioidérgico na antinocicepção do extrato (Figura 24).

Figura 24 – Efeito do tratamento com extrato diclorometano obtido das raízes de *Arrabidaea brachypoda* (DEAB) sobre o tempo de nocicepção (lambida de pata) no envolvimento do sistema opióide do modelo de formalina (fase neurogênica). ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett e teste *t* de Student. **p*<0,05; ***p*<0,01; ****p*<0,001 e ns: diferença não significativa.

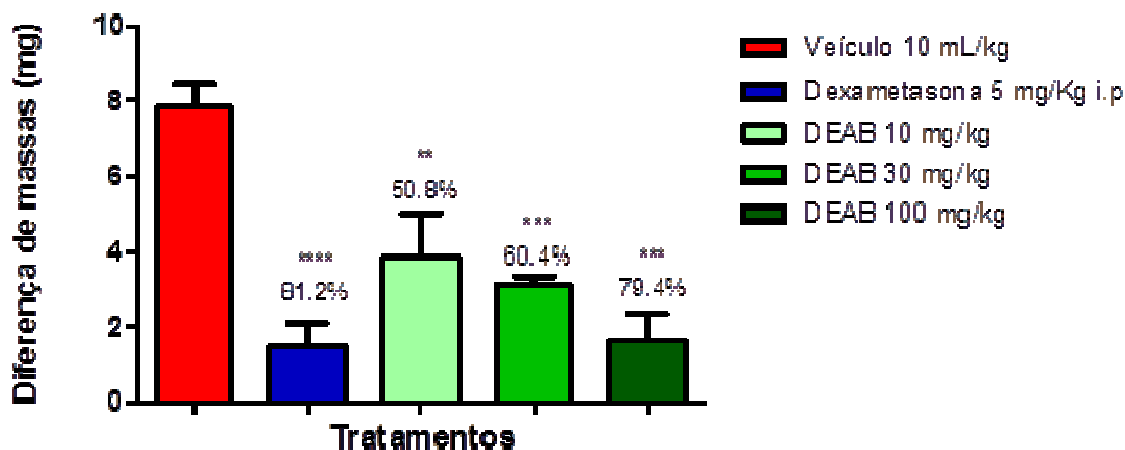


Até o presente foi possível caracterizar que a ação antinociceptiva do extrato DEAB envolve a atuação de receptores TRPM8, ASIC além do sistema opioidérgico e também a não participação dos receptores TRPV1, TRPA1 e do sistema glutamatérgico. Com base nos resultados positivos de antinocicepção do extrato, partimos para a avaliação da ação anti-inflamatória desse extrato.

O edema de orelha induzido por xilol é um método utilizado em testes preliminares de agentes anti-inflamatórios, especialmente aqueles que inibem a fosfolipase A2 (Jacobs *et al.*, 1985; Zanini Jr *et al.*, 1992). O xilol produz uma inflamação predominantemente neurogênica mediada, principalmente, pela substância P e CGRP; o aumento do Ca²⁺ intracelular causado pela lesão do xilol induz a liberação de neuropeptídeos sensoriais como a substância P e o CGRP (Trevisani *et al.*, 2007). A substância P provoca extravasamento de plasma (e conseqüentemente edema), enquanto que CGRP potencializa o seu efeito através da indução de vasodilatação e edema, que caracteriza o estágio inicial da inflamação aguda (Geppetti *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 2007).

O DEAB diminuiu o edema induzido por xilol com as três doses testadas. A menor dose do extrato (10 mg/kg) reduziu em 50,8% o edema instalado, enquanto a dose intermediária (30 mg/kg) diminuiu em 60,4% e a maior dose testada (100 mg/kg) reduziu em 79,4% o edema quando comparadas ao grupo tratado com veículo (figura 25).

Figura 25 – Efeito do tratamento com extrato diclorometano obtido das raízes de *Arrabidaea brachypoda* (DEAB) sob o edema de orelha induzido por xilol. ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnett. **p<0,01; ***p<0,001 e ****p<0,0001.

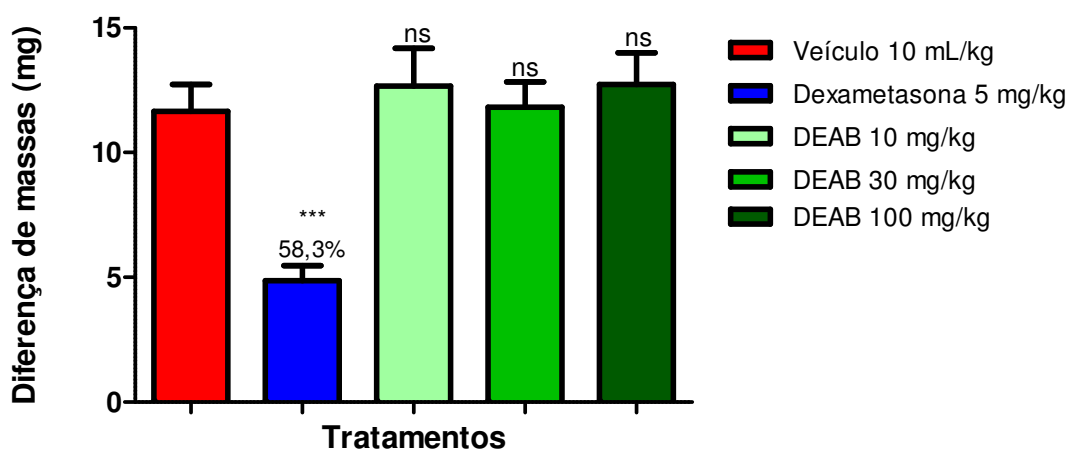


Para elucidar como o DEAB exerce o efeito anti-inflamatório apresentado no modelo de xilol nós utilizamos um modelo mais específico, no qual a indução do edema de orelha foi realizada com o uso do AA.

O AA aplicado topicamente induz uma reação inflamatória intensa de curta duração, na qual pode ser observada a vasodilatação e a hiperemia após 5 minutos da aplicação, o edema atinge a maior intensidade aos 60 minutos, coincidindo com o extravasamento de proteínas e leucócitos. O AA é o precursor de diversos eicosanoides que estão envolvidos com os processos inflamatórios, sendo os mais relevantes os prostanóides (PGE₂ e PGI₂) sintetizados pelas COXs e os leucotrienos (B₄, C₄ e D₄) sintetizados pelas lipooxigenases (Young *et al.*, 1983; Chang *et al.*, 1986; Humes *et al.*, 1986; Crummey *et al.*, 1987; Capra *et al.*, 2015).

O DEAB não foi capaz de diminuir o edema causado pelo ácido araquidônico em nenhuma das doses testadas (figura 26), demonstrando que sua ação não está relacionada às vias da ciclooxigenases ou lipooxigenases.

Figura 26 – Efeito do tratamento com extrato diclorometano obtido das raízes de *Arrabidaea brachypoda* (DEAB) sob o edema de orelha induzido por ácido araquidônico. ANOVA de uma via seguida por teste de Dunnett. *** $p < 0,001$ e ns: diferença não significativa.



Andersson *et al* (2007) demonstraram que a inibição da fosfolipase A2 é capaz de prevenir a ativação dos receptores TRPM8 frente ao frio, ilicina e mentol. A inibição dessa enzima também explicaria o efeito anti-inflamatório do extrato, considerando a sua participação no processo inflamatório. Além disso, os receptores ASICs têm papel importante no processamento nociceptivo durante a inflamação cuja intensidade correlaciona-se com a acidificação do pH local que pode ser revertida com o tratamento de anti-inflamatórios (Goldie & Nachemson, 1970; Gautam *et al.*, 2010). Portanto, o próximo passo desse projeto é a avaliação da ação do DEAB sobre a fosfolipase A2.

Com nossos resultados foi possível confirmar a segurança do uso dessa espécie, caracterizar a atividade antinociceptiva do extrato diclorometano da raiz de *Arrabidaea brachypoda* em modelos *in vivo* e através da avaliação dos diferentes receptores envolvidos na antinocicepção, constatar o envolvimento dos receptores TRPM8 e ASIC, além do sistema opioidérgico na antinocicepção do extrato bem como descartar o envolvimento dos receptores TRPV1, TRPA1 e do sistema glutamatérgico na ação do DEAB. Além disso o extrato também possui efeito anti-inflamatório, cuja ação não envolve a via do ácido araquidônico.

Conclusão

O DEAB pode ser considerado de baixíssima toxicidade, seguro para uso agudo. O extrato apresenta atividade antinociceptiva atuando nos receptores TRPM8, ASIC e no sistema opioidérgico, além de atividade anti-inflamatória.

Referências

- ALCERITO, T. et al. Foliar epicuticular wax of *Arrabidaea brachypoda*: flavonoids and antifungal activity, **Biochemical Systematics and Ecology**, v.30, p.677-83, 2002.
- AL-HASANI, R.; BRUCHAS, M. R. Molecular Mechanisms of Opioid Receptor-Dependent Signaling and Behavior, **Anesthesiology**, v.115, n.6, p.136-1381, 2011.
- ALI, N.; LEWIS, M. **Understanding pain: an introduction for patients and caregivers**, 1 ed, Rowan & Littlefield, 2015. eBook.
- ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review, **Brain Res.**, v.1000, p.40-56, 2004.
- ANDERSSON, D. A.; NASH, M. W.; BEVAN, S. Modulation of the cold-activated channel TRPM8 by lysophospholipids and polyunsaturated fatty acids, **J. Neurosci.** v.27, n.12, p.3347-3355, 2007.
- ANDRADE, E. L. et al. Pronociceptive response elicited by TRPA1 receptor activation in mice. **Neurosci.**, v.152, p.511–520, 2008.
- AKIKO, T. et al. Inhibition of both COX-1 and COX-2 is required for development of gastric damage in response to nonsteroidal antiinflammatory drugs. **J. Physiol.**, v.95, p.21–27, 2001.
- BAGGIO, C. H. et al. Antinociception of β -d-glucan from *Pleurotus pulmonarius* is possibly related to protein kinase C inhibition. **Int. J. Biol. Macromol.**, v.50, n.3, p. 872-877, 2012.
- BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain, **Cell**, v.139, p.267-284, 2009.
- BASHARI, E. et al. Two PKC consensus sites on human acid-sensing ion channel 1b differentially regulate its function. **Am. J. Cell Physiol.**, v.296, n.2, p. C372-C384, 2009.
- BAUTISTA, D. M. et al. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. **Cell**, v.124, p.1269–1282, 2006.

- BEIRITH, A.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Res.**, v.924, p.219-228, 2002.
- BOLZANI, V. S.; PAULETI, P. M.; YOUNG, M. C. Chemical constituents of *Arrabidaea samydoides* (Bignoniaceae), **Química Nova**, v.26, p.641-43, 2003.
- BULLOCK, S.; MANIAS, E. Narcotic Analgesics In: **Fundamentals of Pharmacology**, 7 ed., Australia: Pearson, c.40, 2014, eBook.
- CAPRA, V. et al. Transcellular biosynthesis of eicosanoid lipid mediators. **Biochim. Biophys. Acta.** v.1851, p.377–382, 2015.
- CHANG, J. et al. Correlation between mouse skin inflammation induced by arachidonic acid and eicosanoid synthesis. **J. Inflamm.**, v.10, p. 205-214, 1986.
- CHEN, L. et al. Prostanoids and inflammatory pain. **Prostaglandins Other Lipid Mediators**, v.104-5, p.58-66 2012.
- CODERRE, T. J; YASHPAI, K. Intracellular Messengers Contributing to Persistent Nociception and Hyperalgesia Induced by L-Glutamate and Substance P in the Rat Formalin Pain Model. **Eur. J. Neurosci.**, v.6, p.1328–1334, 1994.
- COGGESHALL, R. E.; CARLTON, S. M. Receptor localization in the mammalian dorsal horn and primary afferent neurons. **Brain Res. Rev.**, v.1, n. 24, p. 28-66, 1997.
- COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonóides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Rev. Virt. Quim.**, v.1, p. 241-56, 2009.
- CRUMMEY, A. et al. Inhibition of arachidonic acid-induced ear oedema as a model for assessing topical antiinflammatory compounds. **Agents Actions**, v. 20, p. 69-76, 1987.
- CUNHA, T. M. et al. Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3K γ /AKT/nNOS/NO/KATP signaling pathway. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v.107, n.9, p.4442-4447, 2010.
- DAI, Y. TRPs and pain. **Semin. Immunopathol.** v.38, n.3, p.277-291, 2015.

- DEVAL, E. *et al.* Acid-Sensing Ion Channels (ASICs): Pharmacology and implication in pain, **Pharmacol. Ther.**, v.128, p.549-558, 2010.
- DUBIN, A. E.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **J. Clin. Invest.**, v.120, p.3760-772, 2010.
- DUNHAM, N. W.; MYIA, T. S. A note an simple apparatus for detection neurological deficit in rats and mice. **J. Am. Pharm. Assoc.**, v.46, p.208-9, 1957.
- EDDY, E. T.; LEIMBACH, C. V. Synthetic analgesic. II. Dithienylbutenyl and dithienylbutyl amines. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.107, p.385-393, 1953.
- ELLIS, A.; BENNETT, D. L. H. Neuroinflammation and the generation of neurogenic pain, **Brit. J. Anaesth.**, v.111, p.26-37, 2013.
- FITZGERALD, G. A. COX-2 and beyond: approaches to prostaglandin inhibition in human disease. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v.2, p.879-90, 2003.
- FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Res. Bull.**, v. 48, n. 2, p. 129-41, 1999.
- GAUTAM, M.; BENSON, C. J.; SLUKA, K. A. Increased response of muscle sensory neurons to decreases in pH after muscle inflammation, **Neuroscience**, v.170, n.3, p.893-900, 2010.
- GEPPETTI, P; HOLZER, P. Neurogenic Inflammation. **Boca Raton: CRC Press**, Florida, p. 153-167, 1996.
- GOLDIE, I.; NACHEMSON, A. Synovial pH in rheumatoid knee joints: II. The effect of local corticosteroid treatment. **Acta Orthopaedica Scandinavica**. v.41, n.3, p.354-362, 1970.
- GRIFFIN, R. S.; WOOLF, C. J. Pharmacology of Analgesia In: GOLAN, D. E. *et al.* **Principles of Pharmacology: The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy**, 3 ed, Lippincott Williams & Wilkins, c.16, p.240-255, 2011. eBook
- GROSSER, T.; FRIES, S.; FITZGERALD, G. A. Biological basis for the cardiovascular consequences of Cox 2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. **J. Clin. Invest.**, v.116, p.4–15, 2006.

- GUNN, A. et al. The Influence of non-nociceptive factors on hot-plate latency in rats. **J. Pain**, v. 12, p.222–227, 2011.
- GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow, **Molecular Aspects of Medicine**, v.27, p.1-93, 2006.
- JACOBS, R. S. et al. Some pharmacological observations on marine natural products. **Tetrahedron**, v.41, p. 981–984, 1985.
- JULIUS, D.; BASBAUM A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, p. 203-210, 2001.
- HUANG, M. T. et al. Inhibitory effects of black tea theaflavin derivatives on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation and arachidonic acid metabolism in mouse ears. **Mol. Nutri. Food Res.**, v.50, n.2, p.115-122, 2006.
- HUMES, J. L.; OPAS, E. E.; BONNEY, R. J. Arachidonic acid metabolites in mouse ear oedema. **Advances in Inflammations Research**. Nova York: Raven Press, p. 57-65, 1986.
- HUNSKAAR, S; FASMER, O.B; HOLE, K. Formalin test in mice a useful technique for evaluating mild analgesic. **J. Neurosci. Methods**, v. 14, p. 69-76, 1985.
- HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v.30, n.1, p.103-4, 1987.
- IASP, IASP Taxonomy – Pain Terms, disponível em <http://www.iasp-pain.org/Education/Content.aspx?ItemNumber=1698#Pain>, acessado em 27 mai, 2015.
- IMMKE, D. C.; GAVVA, N. R. The TRPV1 receptor and nociception, **Semin. Cell. Dev. Biol.** v.17, n.5, p.582-591, 2006.
- JACOBS, R.S. et al. Some pharmacological observations on marine natural products. **Tetrahedron.**, v.41, p. 981–984, 1985.
- JULIUS, D. TRP Channels and Pain, **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.**; v.29, p.355-384, 2013.
- KIRSCHSTEIN, T. Inhibition of rapid heat responses in nociceptive primary sensory neurons of rats by vanilloid receptor antagonists. **J. Neurophysiol**, v.82, p.2853–2860, 1999.

- KISHIYAMA, J. L. Disorders of the Immune System. In: HAMMER, G. D.; MCPHEE, J. S.; **Pathophysiology of Disease, An Introduction to Clinical Medicine**, 6 ed, McGraw-Hill, c.3, p.31-59, 2014. eBook.
- KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. R. B. Antiinflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2): aspectos atuais. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, v.52, n.4, p. 498-512, 2002.
- LAING, R. J.; DHAKA, A. ThermoTRPs and Pain, **The Neuroscientist**, v.22, n.2, p.171-187, 2016.
- LE BARS, D.; GORAZIU, M.; CADDEN, S.W. Animal models of anti-nociception. **Pharmacol. Review.** v.53, p.597-652, 2001.
- LEITE, J. P. V. et al. Trypanocidal activity of triterpenes from *Arrabidaea triplinervia* and derivatives, **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.29(11), p.2307-309, 2006.
- LEVINE, J. D.; ALESSANDRI-HABER, N. TRP channels: Targets for the relief of pain, **Biochim. Biophys. Acta.** v.1772, n.8, p.989-1003, 2007.
- LIN, S. et al. *In vivo* effect of casticin on acute inflammation. **J. Chinese Integr. Med.**, v.5p.573-576, 2007.
- LONGHI-BALBINOT, D.T et al.. Further analyses of mechanisms underlying the antinociceptive effect of the triterpene 3 β , 6 β , 16 β -trihydroxylup-20(29)-ene in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 653, n.1-3, 25, p. 32-40, 2011.
- LUCIO, E.M.R.A. et al. Avaliação toxicológica aguda e creening hipocrático da epilsopilosina, alcaloide secundário de *Pilocarpus microphyllus* Stapf. **Rev. Bras.Farmacogn.**, V. 9/10, p. 23-25, 2000.
- MALONE, M. H.; ROBICHAUD, R. C. **A Hippocratic Screen for Pure or Crude Drug Materials.** Llooydia, v.25, p.320-322, 1962.
- MAO, J. Opioid-induced abnormal pain sensitivity: implications in clinical opioid therapy. **Pain.** v.100, p.213–217, 2002.

- MARTIN, F. et al. Antioxidant C-glucosylxanthones from the leaves of *Arrabidaea patellifera*. **Journal of Natural Products**, v.71(11), p.1887-890, 2008.
- MCGETTIGAN, P.; HENRY, D. Use of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs That Elevate Cardiovascular Risk: An Examination of Sales and Essential Medicines Lists in Low-, Middle-, and High- Income Countries. **PLOS Medicine**, v.10, n.2, 2013.
- MCNAMARA, C. R. et al. TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v.104, n.33, p. 13525-13530, 2007.
- MEOTTI, F. C.; COELHO, I. S.; SANTOS, A. R. S. The nociception induced by glutamate in mice is potentiated by protons released into the solution. **J. Pain**, v.11, n.6, p.570-578, 2010.
- MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review, **Progress in Neurobiology**, v.57, p.1-164, 1999.
- MILLAN, M. J. Descending control of pain, **Progress in Neurobiology**, v.66, p.355-474, 2002.
- NAGY, I; RANG, H. Noxious heat activates all capsaicin-sensitive and also a sub-population of capsaicin-insensitive dorsal root ganglion neurons. **Neuroscience**, v. 88, p. 995–997, 1999.
- NICOLL, R. A. Introduction to the Pharmacology of CNS Drugs In: KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. (Ed) **Basic & Clinical Pharmacology**, 12 ed., LANGE Basic Science, c.21, p.359-371, 2012, eBook.
- NILIUS, B.; OWSIANIK, G. The transient receptor potential family of ion channels, **Genome Biol.**, v.12, n.3, p.218-229, 2011.
- NWEZE, N. et al. .Subacute toxicity study of the methanolic seed extract of *Buchholzia coriacea* (Capparaceae) in rats, **Comparative Clinical Pathology**, v.21, n.5, p.967-974, 2012
- OECD, *Test No. 420: Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, **OECD Publishing**. 2002. Disponível em <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-420-acute-oral-toxicity-fixed-dose-procedure_9789264070943 en;jsessionid=7ard0m7kfir2q.x-oecd-live-01>
- OSIKOWICZ, M.; MIKA, J.; PRZEWLOCKA, B. The glutamatergic system as a target for neuropathic pain relief, **Exp. Physiol.**, v.98, n.2, p.372-284, 2013

- OSSIPOV, M. H.; DUSSOR, G. O.; PORRECA, F. Central modulation of pain **J. Clin. Invest.**, v.120, n.11, p.3779-3787, 2010.
- PALAZZO, E. et al.; Supraspinal metabotropic glutamate receptors: a target for pain relief and beyond, **Eur. J. Neuroscience**, v.39, p.444-454, 2014
- PAN, R. et al. Central mechanisms of menthol-induced analgesia. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.343, n.3, p.661-72, 2012.
- PERL, E. R. Ideas about pain, a historical view, **Nature Reviews**, v.8, p.71-80, 2007.
- PIETROVSKI, E.F. et al. Antinociceptive properties of the ethanolic extract and of the triterpene 3beta,6beta,16betatrihidroxilup-20(29)-ene obtained from the flowers of *Combretum leprosum* in mice. **Pharmacol. Biochem. Beha.**, v.83, p.90-9, 2006.
- POORNIMA, K. et al. Toxicological evaluation of ethanolic extract of *Tabernaemontana coronaria* (L) R. Br., **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v.2, p.S679-S684, 2012.
- RAGHAVAN, S.; HARVEY, A. D.; HUMBLE, S. R. New opioid side effects and implications for long-term therapy. **Trends Anesth. Crit. Care**, v.1, n.1, p.18-21, 2011.
- RANG, H. P. et al. Analgesic drugs In: **Rang and Dale's Pharmacology**, 8 ed. Elsevier Churchill Livingstone, c.42, p.509-529, 2015, eBook
- RHIND, S. G. et al. Indomethacin modulates circulating cytokine responses to strenuous exercise in humans. **Cytokine**, v.19, p.153-158, 2002.
- RISHTON, G. M. Natural Products as a Robust Source of new Drugs and Drug Leads: Past Successes and Present Day Issues, **Am J Cardiol**, v.101, p.43D-49D, 2008.
- ROCHA, C. Q. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau roots, **Journal of Ethnopharmacology**, v.133, p.396-401, 2011.
- RODRIGUES, E.; MENDES, F. R.; NEGRI, G. Plants indicated by Brazilian Indians to central nervous system disturbances: a bibliographical approach, **Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents**, v.6, p211-44, 2006.
- ROPPER, A. H.; SAMUELS, M. A.; KLEIN, J. P. **Adams and Victor's Principles of Neurology**, 10 ed, McGraw-Hill Education/Medical, 2014. eBook.

- ROSLAND, J. H. et al. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. **Pain**. v. 42, p. 235-242, 1990.
- ROTE, N. S.; HUETHER, S. E.; MCCANCE, K. L. Innate Immunity. In: MCCANCE, K. L.; HUETHER, N. S. (Ed.); **Pathophysiology: The Biologic Basis for Disease in Adults and Children**, 7 ed, Mosby, c.7, p.191-223, 2014.
- SAKURADA T. et al. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. **Neuropharm**, v.31, p.1279–85, 1992.
- SAKURADA, T. et al. Differential effects of intraplantar capsazepine and ruthenium red on capsaicin-induced desensitization in mice. **Pharmacol. Biochem. Beha.**,v. 75, p.115-121, 2003.
- SANTOS, A. R. S.; MIGUEL, O. G.; YUNES, R. A. Antinociceptive properties of the new alkaloid, cis-8, 10-di-N-propyllobelidiol hydrochloride dihydrate isolated from *Siphocampylus verticillatus*: evidence for the mechanism of action. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.289, p.417–26, 1999.
- SANTOS, A. R. S.; GADOTTI, V. M.; OLIVEIRA, G. L. Mechanisms involved in the antinociception caused by agmatine in mice. **Neuropharm.**, v.48, p.1021- 34, 2005.
- SARAIVA, J. F. K. COX-2 Risco Cardiovascular: efeito molécula ou classe dependente? **Phoenix Comunicação Integrada**, p.1-5, 2007.
- SCHMIDT, R. et al. Novel Classes of Responsive and Unresponsive C Nociceptors in Human Skin, **J. Neurosci.**, v.15, p.333-41, 1995.
- SCHUMACHER, M. A.; BASBAUM, A. I.; WAY, W. L. Opioids Analgesics & Antagonists In: KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. (Ed) **Basic & Clinical Pharmacology**, 12 ed., LANGE Basic Science, c.31, p.543-564, 2012, eBook.
- SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6^a. ed. Porto Alegre/Florianópolis :Universidade UFRGS / Editora da UFSC, 2010.
- SHIBATA, M. et al. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, v. 38, p. 347–352, 1989.

- SLUKA, K. A.; WINTER, O. C.; WEMMIE, J. A. Acid-sensing ion channels: A new target for pain and CNS diseases, **Curr. Opin. Drug Discov. Devel.**, v.12, n.5, p.693–704, 2009
- SOUZA BRITO, A. R. M. **Manual de ensaios toxicológicos in vivo: ciências médicas.** Campinas, Ed. Unicamp, p. 15-22, 1994.
- SUN, R.Q. et al. Calcitonin gene-related peptide receptor activation produces PKA- and PKC-dependent mechanical hyperalgesia and central sensitization. **J. Neurophysiol.**, v.92, p. 2859–2866, 2004.
- STOELTING, R. K. et al. Opioid Agonists and Antagonists In: **Stoelting's Handbook of Pharmacology and Physiology in Anesthetic Practice**, 3 ed., Wolters Kluwer Health, c.7, p.157-182, 2015, eBook
- SWINGLE, K. F.; REITER, M. J.; SCHWARTZMILLER, D. H. Comparison of croton oil and cantharidin induced inflammations of the mouse ear and their modification by topically applied drugs., **Arch. Int. Pharmacodyn.**, v.254, p.168-76, 1981.
- TABAS, I.; GLASS, C. K. Anti-Inflammatory Therapy in Chronic Disease: Challenges and Opportunities, **Science**, v.339, p.166—72, 2013.
- TEIXEIRA, M. J. O. Anatomia e Fisiologia das vias nociceptivas da dor. **Dor epidemiologia, fisiopatologia, avaliação, síndromes dolorosas e tratamento.** Ed Moreira Jr. 1 ed. 2001.
- TJOLSEN, A. et al. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v.51, p.5-17, 1992.
- TODD, A. J.; SPIKE, R. C. The localization of classical transmitters and neuropeptides within neurons in laminae I-III of the mammalian spinal dorsal horn. **Prog. Neurobiol.**, v. 41, n. 5, p. 609-45, 1993.
- TREVISANI, M. et al. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. **Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A.**, v.104, p.13519–13524, 2007.
- VENKATACHALAM, K.; MONTELL, C. TRP channels. **Annu. Rev. Biochem.**, v.76, p.387-417, 2007.

- WAITE, G. N. Immunology, Organ Interaction and Homeostasis. In: RHOADES, R. A.; BELL, D. R. (Ed); **Medical Physiology: principles for clinical medicine**, 4 ed., Lippincott Williams & Wilkins, c.10, p.188-211, 2013.
- WALDHOER, M.; BARTLETT, S. E.; WHISTLER, J. L. Opioid Receptors, **Annu. Rev. Biochem.**, v.73, p.953-990, 2004.
- WALLACE, J. L. Prostaglandins, NSAIDs, and Gastric Mucosal Protection: Why Doesn't the Stomach Digest Itself? **Physiol. Rev.**, v. 88, p 1547–65, 2008.
- WEMMIE, J. A.; TAUGHER, R. J.; KREPLE, C. J.; Acid-sensing ion channels in pain and disease, **Nat. Rev. Neurosci.** v.14, n.7, p.461–471, 2013.
- WOOLF, C. J. What is this thing called pain?, **J. Clin. Invest.**, v.120, p.3742-744, 2010.
- XIAN, Y.F. et al. Effect of *Rhizoma polygonati* on 12-O-tetradecanoylphorbol-acetate-induced ear edema in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v.142, p.851-56, 2012.
- YOUNG, J. M. et al. 12-0-tetradecanoylphorbol acetate- and arachidonic acid-induced ear edema. **J. Invest. Dermatol.**, v. 80, n. 1, p. 48-52, 1983.
- YOUNG, J. M. et al. The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid. **J. Invest. Dermatol.**, v.82, p.367- 371, 1984.
- YUNES, R. A. The use of natural products as sources of new analgesic drugs. **Atta-ur-Rahman (Ed.) Studies in Natural Products Chemistry**, v.30, p.191-212, 2005.
- ZANINIR JR., J. C. et al. Action of compounds from *Mandevilla velutina* on croton oil-induced ear oedema in mice. A comparative study with steroidal and nonsteroidal antiinflammatory drugs, **Phytotherapy Research**, v.6, p.1-5, 1992.
- ZORN, B. et al. 3-Desoxyanthocyanidins from *Arrabidaea chica*, **Phytochemistry**, v.56, p.831-35, 2001.

Anexo 1 - Screening Hipocrático – Toxicidade de fármacos por Análise Comportamental
Parâmetros analisados em camundongos machos e fêmeas tratados oralmente com dose única de veículo e DEAB 2000 mg/kg

Sintomas	Normal	Tempo para as análises comportamentais (minutos)				
		30`	60`	120`	240`	360`
Aparência geral	4	4	4	4	4	4
Frênilo vocal	0	0	0	0	0	0
Irritabilidade	0	0	0	0	0	0
Reposta ao toque	4	4	4	4	4	4
Aperto da cauda	4	4	4	4	4	4
Contorção	0	0	0	0	0	0
Trem posterior	0	0	0	0	0	0
Endireitamento	4	4	4	4	4	4
Tônus muscular	4	4	4	4	4	4
Força de agarrar	4	4	4	4	4	4
Ataxia	0	0	0	0	0	0
Reflexo auricular	4	4	4	4	4	4
Reflexo corneal	4	4	4	4	4	4
Tremores	0	0	0	0	0	0
Convulsões	0	0	0	0	0	0
Estimulações	4	4	4	4	4	4
Straub	0	0	0	0	0	0
Hipnose	0	0	0	0	0	0
Anestesia	0	2	2	2	2	2
Lacrimação	0	0	0	0	0	0
Ptose	0	0	0	0	0	0
Micção	4	4	4	4	4	4
Piloereção	0	0	0	0	0	0
Defecação	4	4	4	4	4	4
Hipotermia	0	0	0	0	0	0
Respiração	4	4	4	4	4	4
Cianose	0	0	0	0	0	0
Morte	0	0	0	0	0	0