

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 03/03/2019.



**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.) Bural 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.) Bural In VIII Simpósio Ibero-americano de Plantas Medicináveis 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
- 6<sup>th</sup> 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 antinocicepção 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, nocicepção, 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

<b>Figura 1</b> – Neurotransmissão no corno dorsal da medula espinhal.....	20
<b>Figura 2</b> – Modulação inibitória da neurotransmissão.....	21
<b>Figura 3</b> – <i>A.brachypoda</i> , popularmente conhecida como Cipó-uma ou Cervejinha-do-campo.	24
<b>Figura 4</b> – Representação esquemática do modelo experimental de toxicidade aguda e <i>screening</i> hipocrático.....	26
<b>Figura 5</b> – Representação esquemática do modelo experimental do teste de performance motora. .....	26
<b>Figura 6</b> – Representação esquemática do modelo da placa quente. ....	28
<b>Figura 7</b> – Representação esquemática do modelo do teste da formalina.....	27
<b>Figura 8</b> – Representação esquemática dos modelos utilizados na avaliação do envolvimento dos receptores TRPs e ASIC na nocicepção do DEAB .....	28
<b>Figura 9</b> – Representação esquemática do modelo utilizado na avaliação do envolvimento do sistema glutamatérgico na nocicepção do DEAB .....	29
<b>Figura 10</b> – Representação esquemática do modelo utilizado na avaliação do envolvimento do sistema opioidérgico na nocicepção do DEAB. ....	29
<b>Figura 11</b> – Representação esquemática dos modelos de edema de orelha induzido por xilol e AA. ....	30
<b>Figura 12</b> – 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
<b>Figura 13</b> – 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
<b>Figura 14</b> – Composição fitoquímica do extrato diclorometânico das raízes de <i>Arrabidaea brachypoda</i> determinada por HPLC-PDA. ....	31
<b>Figura 15</b> – 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
<b>Figura 16</b> – 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

<b>Figura 17</b> – 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
<b>Figura 18</b> – 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
<b>Figura 19</b> – 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
<b>Figura 20</b> – 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
<b>Figura 21</b> – 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
<b>Figura 22</b> – 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
<b>Figura 23</b> – 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
<b>Figura 24</b> – 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
<b>Figura 25</b> – Efeito do tratamento com extrato diclorometano obtido das raízes de <i>Arrabidaea brachypoda</i> (DEAB) sob o edema de orelha induzido por xilol.....	44
<b>Figura 26</b> – 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

<b>Introdução</b> .....	18
<b>Justificativa</b> .....	22
<b>Objetivo</b> .....	23
<b>Material e Métodos</b> .....	24
<b>Animais</b> .....	24
<b>Dose</b> .....	25
<b>Modelos Experimentais</b> .....	25
<b>Toxicidade Aguda e <i>Screening</i> Hipocrático</b> .....	25
<b>Avaliação da Performance Motora</b> .....	26
<b>Teste da Placa Quente</b> .....	27
<b>Teste da Formalina</b> .....	26
<b>Avaliação da Participação de Receptores Associados à Canais Iônicos (TRPV1; TRPA1; TRPM8 e ASIC) na Antinocicepção do DEAB</b> .....	28
<b>Edema de Orelha induzido por Ácido Araquidônico</b> .....	30
<b>Análise Estatística</b> .....	30
<b>Resultados e Discussão</b> .....	31
<b>Conclusão</b> .....	45
<b>Referências</b> .....	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 $\delta$ , mielinizadas de calibre intermediário (2-5  $\mu$ m de diâmetro) e velocidade de condução levemente maior que as fibras C que não apresentam mielina, são estreitas (0,3-1,1  $\mu$ 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 $\delta$  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 $\delta$

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 $\delta$ , 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).

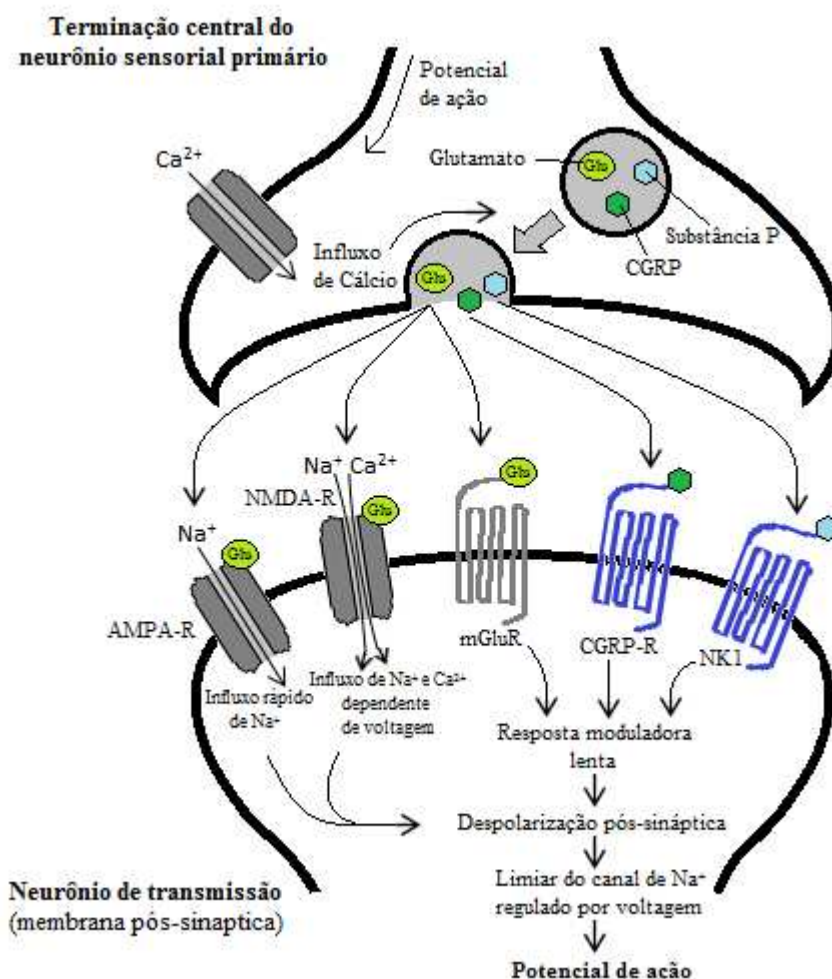
Os canais iônicos que incluem os receptores de potencial transitório (TRP) e os canais iônicos sensíveis a ácido (ASIC) vêm sendo relacionados como participantes importantes no processo doloroso (Dai, 2015).

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<sup>+</sup> (Deval *et al.*, 2010).

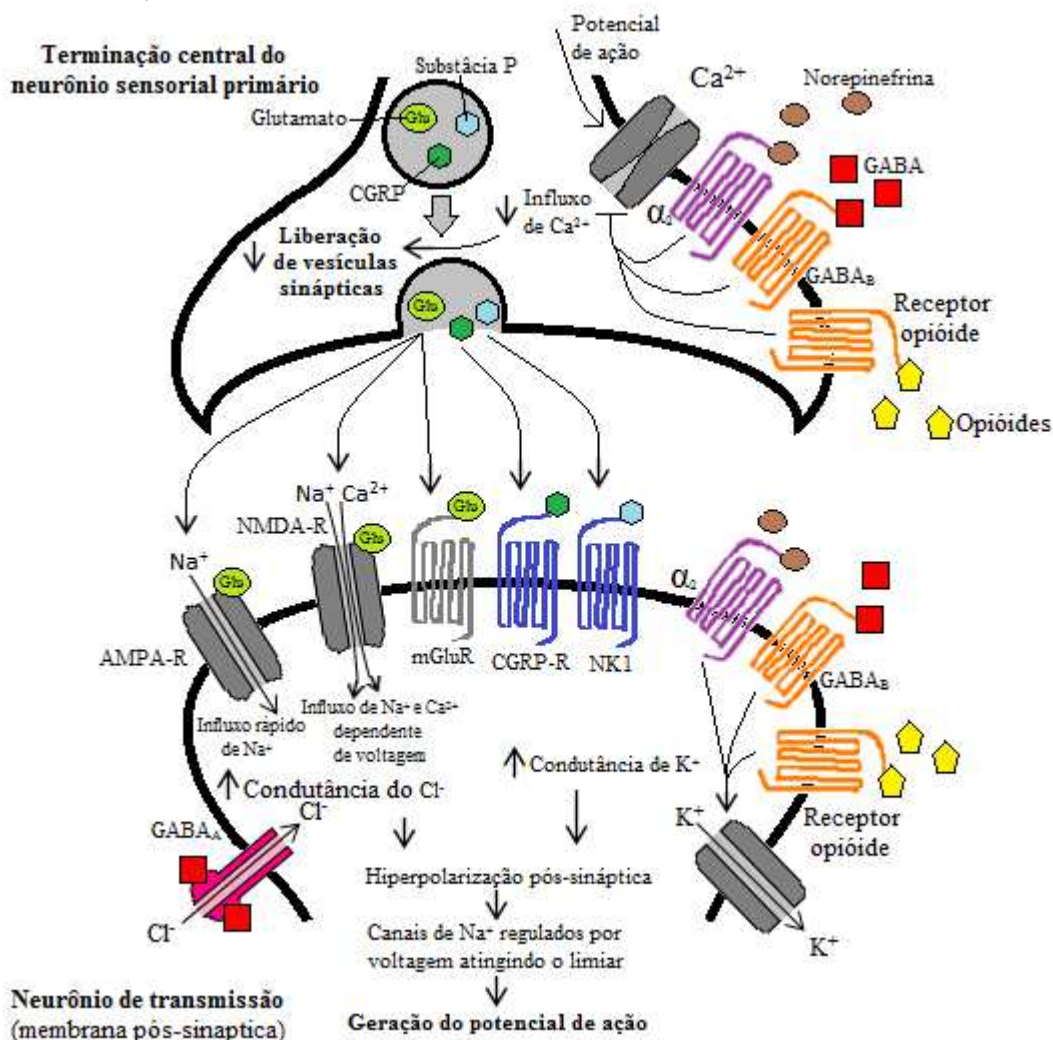
O potencial de ação gerado por esses receptores nas fibras aferentes primária são transmitidos até o corno dorsal da medula espinhal onde farão sinapse com os neurônios de projeção (figura 1), estimulando-os a transportar a informação nociceptiva até centros supraespinhais (Millan, 2002; Almeida *et 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 nocicepção (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 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 (PGI<sub>2</sub>) 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.



## **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  $\beta$ -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 $\gamma$ /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 $\beta$ , 6 $\beta$ , 16 $\beta$ -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 screening 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](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 Charchill 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**. 6ª. 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.