

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
FELIPE LUKACIEVICZ BARBOSA

ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DOS EXTRATOS  
VEGETAIS E DOS COMPOSTOS ANAMARINE E 10-*EPI*-OLGUINE ISOLADOS  
DAS FOLHAS OBTIDAS DE *Cantinoa stricta* (Benth.) Harley & J. F. B. Pastore  
(Lamiaceae)

CURITIBA  
2020

FELIPE LUKACIEVICZ BARBOSA

ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DOS EXTRATOS  
VEGETAIS E DOS COMPOSTOS ANAMARINE E 10-*EPI*-OLGUINE ISOLADOS  
DAS FOLHAS OBTIDAS DE *Cantinoa stricta* (Benth.) Harley & J. F. B. Pastore  
(Lamiaceae)

Tese apresentada para o Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio  
Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Élide Alves Stefanello

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Barbosa, Felipe Lukacievicz.

Atividade anti-inflamatória e antinociceptiva dos extratos vegetais e dos compostos anamarine e 10-*epi*-olguine isolados das folhas obtidas de *Cantinoa stricta* (Benth.) Harley & J. F. B. Pastore (Lamiaceae). / Felipe Lukacievicz Barbosa. – Curitiba, 2020.

132 f. : il.

Orientador: Aleksander Roberto Zampronio.

Coorientadora: Maria Élide Alves Stefanello.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Inflamação. 2. Produtos naturais. 3. Dor. 4. Anti-inflamatórios. 5. Atividade antinociceptiva. 6. Farmacologia. I. Título. II. Zampronio, Aleksander Roberto. III. Stefanello, Maria Élide Alves. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (20. ed.) 617.22



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FARMACOLOGIA -  
40001016038P0

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **FELIPE LUKACIEVICZ BARBOSA** intitulada: **ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DOS EXTRATOS VEGETAIS E DOS COMPOSTOS ANAMARINE E 10-EPI-OLGUINE ISOLADOS DAS FOLHAS OBTIDAS DE *Cantinoa stricta* (Benth.) Harley & J. F. B. Pastore (Lamiaceae)**, sob orientação do Prof. Dr. ALEKSANDER ROBERTO ZAMPRONIO, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 27 de Março de 2020.

Assinatura Eletrônica

16/04/2020 16:59:18.0

ALEKSANDER ROBERTO ZAMPRONIO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

27/03/2020 20:17:51.0

DANIELE MARIA FERREIRA

Avaliador Externo (FACULDADES PEQUENO PRÍNCIPE)

Assinatura Eletrônica

27/03/2020 16:57:53.0

VINICIUS BEDNARCZUK DE OLIVEIRA

Avaliador Externo (CENTRO UNIVERSITÁRIO CAMPOS DE  
ANDRADE)

Assinatura Eletrônica

16/04/2020 18:39:56.0

ELIZABETH SOARES FERNANDES

Avaliador Externo (INSTITUTO PELÉ PEQUENO PRÍNCIPE)

## ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DOUTORADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM FARMACOLOGIA

No dia vinte e sete de março de dois mil e vinte às 08:30 horas, na sala virtual, Google Hangouts, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de tese do doutorando **FELIPE LUKACIEVICZ BARBOSA**, intitulada: **ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DOS EXTRATOS VEGETAIS E DOS COMPOSTOS ANAMARINE E 10-EPI-OLGUINE ISOLADOS DAS FOLHAS OBTIDAS DE *Cantinoa stricta* (Benth.) Harley & J. F. B. Pastore (Lamiaceae)**, sob orientação do Prof. Dr. ALEKSANDER ROBERTO ZAMPRONIO. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: ALEKSANDER ROBERTO ZAMPRONIO (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), DANIELE MARIA FERREIRA (FACULDADES PEQUENO PRÍNCIPE), VINICIUS BEDNARCZUK DE OLIVEIRA (CENTRO UNIVERSITÁRIO CAMPOS DE ANDRADE), ELIZABETH SOARES FERNANDES (INSTITUTO PELÉ PEQUENO PRÍNCIPE). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de doutor está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, ALEKSANDER ROBERTO ZAMPRONIO, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 27 de Março de 2020.

Assinatura Eletrônica

16/04/2020 16:59:18.0

ALEKSANDER ROBERTO ZAMPRONIO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

27/03/2020 20:17:51.0

DANIELE MARIA FERREIRA

Avaliador Externo (FACULDADES PEQUENO PRÍNCIPE)

Assinatura Eletrônica

27/03/2020 16:57:53.0

VINICIUS BEDNARCZUK DE OLIVEIRA

Avaliador Externo (CENTRO UNIVERSITÁRIO CAMPOS DE  
ANDRADE)

Assinatura Eletrônica

16/04/2020 18:39:56.0

ELIZABETH SOARES FERNANDES

Avaliador Externo (INSTITUTO PELÉ PEQUENO PRÍNCIPE)

Dedico esta tese ao meu Pai Ademar (*in memoriam*) e à minha Mãe Inês, que nunca mediram esforços para que eu realizasse meus sonhos.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pelas oportunidades que me deu ao longo da vida.

Ao Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio por ter aberto as portas do seu laboratório pra mim mais uma vez, pelos ensinamentos, pela ajuda, pelo apoio, pelo carinho, pela dedicação, pelos conselhos, pelas “broncas” e principalmente pela paciência que teve comigo durante os mais de 7 anos de trabalho. E por ser um grande profissional.

A Profa. Dra. Maria Élide Stefanello por me aceitar como aluno e abrir seu laboratório para que eu pudesse entender um pouco mais sobre os processos químicos realizados no meu trabalho e pela ajuda na interpretação dos resultados.

Aos professores titulares e suplentes da banca examinadora por terem contribuído significativamente para o aprimoramento desse estudo e também para a minha formação como pesquisador.

A minha família pelo apoio nessa jornada, especialmente a Minha mãe Inês e ao meu irmão Luciano.

Aos meus sobrinhos por existirem na minha vida e me mostrarem o significado do amor puro.

Ao Cassio, pelo ombro amigo, pelos conselhos, pelas risadas, pelas conversas, por estar sempre do meu lado quando eu precisei e por me ajudar a ser uma pessoa melhor a cada dia.

Aos professores do Departamento de Farmacologia, pelas ajudas e pelo conhecimento passado durante todo o meu período como aluno da pós-graduação.

Aos animais pela evidente contribuição para esse trabalho e aos funcionários do biotério pela prestatividade.

Aos funcionários da Pós-Graduação em Farmacologia e do departamento de Farmacologia pela contribuição.

Aos amigos do laboratório de Produtos naturais: Magali: que me ensinou como trabalhar com processos cromatográficos, com processos de isolamentos e pelas longas conversas que me ajudaram muito; Ao Adson pela ajuda e contribuição na minha formação acadêmica; ao Cristhian por ter me ajudado na purificação das minhas substâncias; e a Vanessa que também me ajudou na rotina dos processos químicos.

Aos amigos no laboratório de inflamação e febre: Tatiane, Bruna, Isabela, Juliana, Luis, Mariane, Maycon, Leticia e Diogo pelas conversas, pelas ajudas, pelas risadas, pelos momentos que passamos juntos, meu muito obrigado.

Muito obrigado a Débora que me ajudou com alguns experimentos, pelo apoio, pelas risadas, pelos conselhos, pela amizade.

Meu muito obrigado ao Carlos, nosso aluno de iniciação científica que me ajudou muito no desenvolvimento desse trabalho e pela amizade que foi firmada.

Muito obrigado a Thais, que me ajudou nas correções da minha tese, dando algumas dicas e sugestões.

Muito obrigado a Claudia Corso pela ajuda com a confecção de alguns gráficos.

Muito obrigado a Sara Tolouei pela grande ajuda no meu trabalho bem como pelas conversas e ombro amigo.

A todos os meus amigos dos mais variados lugares que de forma direta e/ou indireta sempre torceram para que eu atingisse meu objetivo.

A toda a minha família que também sempre torceu por mim e sempre me incentivou nas horas certas.

Ao CNPq pelo apoio financeiro para o desenvolvimento do meu projeto.

A CAPES pelo bolsa de estudo concedida durante o meu doutorado.

A FAPAR pelo apoio em vários momentos quando precisei me ausentar pelo doutorado.

A todos os professores que trabalham comigo que também sempre me ajudaram, incentivaram e me apoiaram em todos os momentos.

Aos meus alunos que sempre me motivaram a crescer mais e também pela compreensão nas minhas faltas e falhas.

A UFPR que me acolheu mais uma vez para que eu realizasse mais esse sonho.

*“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que elas acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”  
(Fernando Pessoa)*

## RESUMO

Existem vários analgésicos usados para o tratamento de uma ampla gama de situações dolorosas e inflamatórias. No entanto, devido ao grande número de efeitos colaterais e muitas vezes da ineficácia das drogas, existe uma busca por novas drogas que possam ser mais seguras e mais eficazes. *Cantinoa stricta* (Harley & J.F.B. Pastore) pertence à família Lamiaceae. Apesar desta planta não apresentar indicação popular, as Lamiáceas ocupam o terceiro lugar na ordem de importância entre as espécies vegetais com ações farmacológicas. O presente estudo objetivou avaliar diferentes extratos de *C. stricta*, e sua atividade anti-inflamatória e antinociceptiva em camundongos. No estudo, foram preparados o extrato etanólico total (EEt) e o diclorometano (DCM). O efeito do EEt (10-100mg kg<sup>-1</sup>) e o DCM (50mg kg<sup>-1</sup>) administrados por via oral foram avaliados sobre a nocicepção induzida por formalina, hiperalgesia mecânica induzida por lipopolissacarídeo (LPS), nocicepção térmica aguda, desempenho motor e edema de pata induzido por carragenina (Cg). O EEt reduziu a fase inflamatória da formalina e a hiperalgesia mecânica induzida por LPS (com inibições de 61% e 90%, respectivamente) de maneira dependente da dose, mas não modificou a nocicepção térmica aguda. O DCM diminuiu a fase inflamatória da nocicepção induzida por formalina e a hiperalgesia mecânica (com redução de 62% e 98%, respectivamente) e também não modificou a nocicepção térmica aguda. Ambos EEt e DCM não comprometeram o desempenho motor dos animais. Ambos os extratos EEt e DCM também reduziram o edema induzido por Cg (redução de 46 e 47%, respectivamente, na quinta hora). A partir do DCM foram purificadas as substâncias anamarine e 10-*epi*-olguine. Ambas as substâncias foram efetivas em reduzir a hiperalgesia mecânica induzida por LPS e o edema de pata induzido por Cg quando administradas por via oral. Nenhuma delas apresentou atividade na nocicepção térmica aguda ou alterou o desempenho motor. A injeção local da anamarine (100-300ng/pata) e 10-*epi*-olguine (100-1000ng/pata) reduziu de maneira dose-dependente a hiperalgesia mecânica induzida pelo LPS quando os compostos foram administrados na pata ipsilateral, mas não na pata contra-lateral possuindo, portanto, um efeito local. Após a injeção local, esses dois compostos não modificaram a hiperalgesia induzida por citocinas como o fator de necrose tumoral- $\alpha$ , interleucina-1 $\beta$ , por autacóides como a prostaglandina E<sub>2</sub>, pelo ativador de adenilato ciclase forskolina e pelo análogo dibutilil adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (dbAMPc). Por outro lado, ambas inibiram a hiperalgesia causada pelas aminas simpáticas dopamina e epinefrina, pelo ativador de proteína quinase C (PKC) 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA). Ainda, ambas as substâncias bloquearam a hiperalgesia induzida por epinefrina em machos mas não em fêmeas. A administração local destas substâncias também reduziu significativamente o edema induzido por Cg. Estes dados em conjunto sugerem que o EEt de *Cantinoa stricta* apresenta uma importante atividade antinociceptiva, particularmente na hiperalgesia mecânica inflamatória, e anti-edematogênica. Esta atividade se deve, pelo menos em parte, a presença de anamarine e a 10-*epi*-olguine, que apresentam tanto efeito sistêmico quanto local. Estas substâncias atuam por mecanismos diferentes de outros analgésicos conhecidos como anti-inflamatórios não esteroidais, dipirona ou opióides, modulando a atividade/ação da PKC $\epsilon$  na sensibilização dos nociceptores.

Palavras chaves: inflamação, produtos naturais, dor inflamatória, Anamarine, 10-epiolguine

## ABSTRACT

There are several painkillers used to treat a wide range of painful and inflammatory conditions. However, due to the large number of side effects and often their ineffectiveness of the drugs that are used to treat inflammation and pain, there is a search for new drugs that could be safer and more effective. *Cantinoa stricta* (Harley & J.F.B. Pastore) belongs to the Lamiaceae family. Although this plant does not have a popular indication, the Lamiaceae in general occupy the third place in the order of importance among plant species with pharmacological actions. The present study aimed to evaluate different extracts of *C. stricta*, and their anti-inflammatory and antinociceptive activity in mice. In the study, the total ethanolic extract (EEt) and the dichloromethane (DCM) were used. The effect of EEt (10-100mg kg<sup>-1</sup>) and DCM (50mg kg<sup>-1</sup>) administered orally were evaluated on formalin-induced nociception, lipopolysaccharide (LPS) -induced mechanical hyperalgesia, acute thermal nociception, motor performance and carrageenan (Cg) -induced paw edema. EEt reduced the inflammatory phase of formalin and mechanical hyperalgesia induced by LPS (with inhibitions of 61% and 90%, respectively) in a dose-dependent manner, but did not modify acute thermal nociception. DCM decreased the inflammatory phase of formalin-induced nociception and mechanical hyperalgesia (with a reduction of 62% and 98%, respectively) and also did not modify acute thermal nociception. Both EEt and DCM did not compromise the animals' motor performance. Both EEt and DCM extracts also reduced edema induced by carrageenan (reduction of 46 and 47%, respectively, in the fifth hour). Anamarine and 10-epi-olguine were purified from DCM. Both substances were effective in reducing LPS-induced mechanical hyperalgesia and carrageenan-induced paw edema when administered orally. None of them showed activity in acute thermal nociception or altered motor performance. Local injection of anamarine (100-300ng/paw) and 10-epi-olguine (100-1000ng/paw) reduced the mechanical hyperalgesia induced by LPS in a dose-dependent manner when the compounds were administered in the ipsilateral paw, but not on the contralateral paw, therefore having a local effect. After local injection, these two compounds did not modify the hyperalgesia induced by cytokines such as tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$ , by autacoids such as prostaglandin E<sub>2</sub>, by the forskolin adenylate cyclase activator and by the analog dibutyryl adenosine 3',cyclic 5'-monophosphate (dbAMPc). On the other hand, both inhibited hyperalgesia caused by the sympathetic amines dopamine and epinephrine by the protein kinase C (PKC) activator 12-O-tetradecanoylforbol-13-acetate (TPA). In addition, both substances blocked epinephrine-induced hyperalgesia in males but not in females. Local administration of these substances also significantly reduced edema induced by carrageenan. These data together suggest that the EEt of *Cantinoa stricta* has an important antinociceptive activity, particularly in inflammatory mechanical hyperalgesia, and antiedematogenic. This activity is due, at least in part, to the presence of anamarine and 10-epi-olguine, which have both systemic and local effects. These substances act by mechanisms different from other analgesics known as non-steroidal anti-inflammatory drugs, dipyrrone or opioids, modulating the activity / action of PKC $\epsilon$  in the sensitization of nociceptors.

Keywords: inflammation, natural products, inflammatory pain, Anamarine, 10-epi-olguine

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 01	-	ESQUEMA GERAL DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA.....	20
FIGURA 02	-	PROCESSO GERAL DE MIGRAÇÃO CELULAR.....	24
FIGURA 03	-	VIA DE TRANSDUÇÃO DA DOR.....	27
FIGURA 04	-	TIPOS DE FIBRAS SENSORIAIS.....	30
FIGURA 05	-	MEDIADORES PERIFÉRICOS DA INFLAMAÇÃO.....	36
FIGURA 06	-	FOTOS DE <i>Cantinoa stricta</i> .....	45
FIGURA 07	-	ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DO EEt DAS FOLHAS DE <i>C. stricta</i> .....	61
FIGURA 08	-	EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DO EEt.....	61
FIGURA 09	-	COMPARAÇÃO ENTRE OS ESPECTROS DE RMN DE <sup>1</sup> H (200 MHZ) DOS DIFERENTES EXTRATOS.....	62
FIGURA 10	-	AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE $\delta_H$ 4,5-7,5 DOS ESPECTROS DE RMN DE <sup>1</sup> H DOS DIFERENTES EXTRATOS.....	62
FIGURA 11	-	EFEITO DO EEt E DO DCM SOBRE O COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO INDUZIDO PELA FORMALINA EM CAMUNDONGOS.....	65
FIGURA 12	-	EFEITO DO EEt E DO DCM SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELO LIPOPOLISSACARÍDEO EM CAMUNDONGOS.....	67
FIGURA 13	-	EFEITO DO EEt E DO DCM NO TESTE DE PLACA AQUECIDA E NO DESEMPENHO MOTOR EM CAMUNDONGOS.....	70
FIGURA 14	-	EFEITO DO EEt E DO DCM SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS.....	72
FIGURA 15	-	ESTRUTURA DA SUBSTÂNCIA 1.....	74
TABELA 1	-	DADOS DE RMN PARA A SUBSTÂNCIA 1 (CDCl <sub>3</sub> , 600 MHZ) EM COMPARAÇÃO COM OS DADOS DA LITERATURA PARA ANAMARINE.....	75
FIGURA 16	-	ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DE 1 (CDCl <sub>3</sub> , 600 MHZ).....	76
FIGURA 17	-	ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DE 1 (CDCl <sub>3</sub> , 600 MHZ). AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE $\delta_H$ 4,6-7,3.....	77

FIGURA 18	-	ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DE <b>1</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz).....	77
FIGURA 19	-	MAPA DE CONTORNO $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ DE CORRELAÇÃO A UMA LIGAÇÃO (HSQC) DE <b>1</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz).....	78
FIGURA 20	-	MAPA DE CONTORNO $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ DE CORRELAÇÃO A LONGA LIGAÇÃO (HMBC) DE <b>1</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz).....	78
FIGURA 21	-	ESTRUTURA DA SUBSTÂNCIA <b>2</b> .....	80
FIGURA 22	-	ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DA SUBSTÂNCIA <b>2</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz).....	80
FIGURA 23	-	ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DA SUBSTÂNCIA <b>2</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz). AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE $\delta_{\text{H}}$ 3,4 E 4,3 (REGIÃO DOS HIDROGÊNIOS OXIMETÍNICOS H-5, H-6 E H-7).....	81
FIGURA 24	-	ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DE <b>2</b> . AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE $\delta_{\text{H}}$ 4,8 E 7,4 (REGIÃO DOS HIDROGÊNIOS OXÍMETÍNICOS H-4, H-10 E H-11, E DOS HIDROGÊNIOS OLEFÍNICOS).....	81
FIGURA 25	-	MAPA DE CORRELAÇÃO $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ A UMA LIGAÇÃO (HSQC, $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz).....	82
FIGURA 26	-	MAPA DE CORRELAÇÃO $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ A LONGA DISTÂNCIA (HMBC, $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz).....	82
FIGURA 27	-	ILUSTRAÇÃO DA ESTRUTURA DE <b>2</b> OBTIDA POR CRISTALOGRAFIA DE RAIOS X.....	82
TABELA 2	-	DADOS DE RMN PARA A SUBSTÂNCIA <b>2</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) EM COMPARAÇÃO COM OS DADOS DA LITERATURA PARA 10- <i>EPI</i> -OLGUINE.....	84
FIGURA 28	-	EFEITO SISTÊMICO DA ANAMARINE SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELO LIPOPOLISSACARÍDEO EM CAMUNDONGOS.....	86
FIGURA 29	-	EFEITO SISTÊMICO DA 10- <i>EPI</i> -OLGUINE SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELO LIPOPOLISSACARÍDEO EM CAMUNDONGOS.....	87
FIGURA 30	-	EFEITO DA ANAMARINE E DA 10- <i>EPI</i> -OLGUINE NO TESTE DE PLACA AQUECIDA E NO DESEMPENHO MOTOR EM CAMUNDONGOS.....	89
FIGURA 31	-	EFEITO LOCAL DA ANAMARINE SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELO LIPOPOLISSACARÍDEO EM CAMUNDONGOS.....	93

FIGURA 32	- EFEITO LOCAL DA 10- <i>EPI</i> -OLGUINE SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELO LIPOPOLISSCARÍDEO EM CAMUNDONGOS.....	94
FIGURA 33	- EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO LOCAL DA ANAMARINE E DA 10- <i>EPI</i> -OLGUINE SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS.....	97
FIGURA 34	- EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO LOCAL DA ANAMARINE E DA 10- <i>EPI</i> -OLGUINE SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA POR SUBSTÂNCIAS ALGOGÊNICAS EM CAMUNDONGOS.....	101
FIGURA 35	- EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO LOCAL DA ANAMARINE E DA 10- <i>EPI</i> -OLGUINE SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA POR EPINEFRINA EM CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS...	103

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	-	Porcentagem
€	-	Euro
µg	-	Micrograma
µL	-	Microlitros
8HDD	-	8-hidroxideidrounniona
8ML	-	8-metoxilapachenol
AIES	-	Anti-inflamatórios esteroidais
AINE	-	Anti-inflamatório não esteroideal
AJ	-	Junções aderentes
AMPA	-	Receptor alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
ANA	-	Anamarine
AP1	-	Ativadora da proteína 1 (AP1)
ASIC	-	Canais iônicos sensíveis ao ácido
ATP	-	Adenosina trifosfato
Ca <sup>2+</sup>	-	Íon de Cálcio
cAMP	-	Monofosfato de adenosina 3', 5'-cíclico
Cav	-	Canal de cálcio voltagem dependente
CC	-	Cromatografia em coluna aberta
CCD	-	Cromatografia em camada delgada
CCDA	-	Cromatografia em camada delgada analítica
CCDP	-	Cromatografia em camada delgada preparativa
CCL3	-	ligante de quimiocina 3
CEUA	-	Comissão de Ética para o Uso de Animais
CFA	-	Adjuvante completo de <i>Freund</i>
Cg	-	Carragenina
CGRP	-	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CLR	-	Receptore de lectina do tipo C
CLV	-	Cromatografia sob vácuo
cm	-	Centímetro
COX1	-	cicloxygenase
COX2	-	Cicloxygenase 2
CVLM	-	medula ventrolateral caudal

CXCL1	-	ligantes de quimiocinas 1
DAMP	-	Padrão molecular associado a dano
dbAMPc	-	Dibutilil adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
DCM	-	Diclorometano
DEX	-	Dexametasona
DIA	-	Diazepam
DIP	-	Dipirona
DOP	-	Dopamina
DRG	-	Gânglio da raiz dorsal
EECS	-	Extrato Etanólico bruto da <i>Catinoa stricta</i>
EP	-	Éter de Petróleo
EP	-	Receptores de PGE2
EPI	-	Epi-10-olguine
EPN	-	Epinefrina
ERO	-	Espécies reativas de oxigênio
etc	-	<i>ET CETERA.</i>
EtOH	-	Etanol
FDA	-	<i>Food and Drug Administration</i>
FEN	-	Fentanil
FIG	-	Figura
FOR	-	Formalina
FORS	-	Forscolina
g	-	Gramas
GABA	-	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
GR	-	Receptor glicocorticóide
HG	-	Hormônios glicocorticoides
hr	-	Horas
HTM	-	Nociceptores mecânicos de alto limiar
i.p	-	Intraperitoneal
IASP	-	<i>International Association for the Study of pain</i>
ICAM1	-	Molécula de adesão intercelular 1
IKK	-	Complexo I $\kappa$ B quinase
IL-1	-	Interleucina 1

IL-1R	-	Receptores da interleucina
IL-1 $\beta$	-	Interleucina 1 $\beta$
IL-4	-	Interleucina 4
IL-6	-	Interleucina 6
IL-8	-	Interleucina 8
INDO	-	Indometacina
IP3	-	Inositol 1,4,5- trifosfato
ipl	-	Intraplantar
IRF	-	Fator regulador de interferon
I $\kappa$ B	-	Inibidor das proteínas NF- $\kappa$ B
JAK2	-	Janus quinase 2
K2P	-	Canal de potássio de dois poros
Kg	-	Quilograma
Kv	-	Canal de Potássio voltagem dependente
LPS	-	Lipopolissacarídeo
LPS	-	lipopolissacarídeo de bactéria gran
MAPK	-	Proteínas quinases ativadas por mitógeno
MEP	-	Máximo de efeito possível
mg	-	Miligrama
Mg <sup>2+</sup>	-	Íon de Magnésio
MHD	-	6-metoxi-7-hidroxi- $\alpha$ -duniona
mm	-	Milímetro
Na <sup>+</sup>	-	Íon de sódio
Nav	-	Canal de sódio voltagem dependente
NF- $\kappa$ B	-	Fator nuclear $\kappa$ B
ng	-	Nanograma
NK1R	-	Receptor da neurocinina 1
NLR	-	Receptor do tipo " <i>Nod-like</i> "
nm	-	Nanômetro
NMDA	-	Receptor N-metil-Daspartato
NORA	-	Noradrenalina
NTS	-	Núcleo do trato solitário
OMS	-	Organização Mundial da Saúde
ON	-	Óxido nítrico

PAG	-	Substância cinza periaquedutal
PAMP	-	Padrão molecular associado a patógeno
Pb	-	Núcleo parabrachial
PG	-	Prostaglandina
PGD2	-	Prostaglandina D2
PGE2	-	Prostaglandina E2
PGG2	-	Prostaglandina G2
PGH2	-	Prostaglandina H2
PGI2	-	Prostaciclina
PGI2	-	Prostaglandina H2
PKA	-	Proteína quinase do tipo A
PKC	-	Proteína quinase do tipo C
PLC	-	Fosfolipase C
PN	-	Produto Natural
ppm	-	Parte por milhão
PRR	-	Receptor de reconhecimento de padrão
RLR	-	Receptor do tipo RIG-I
RMN	-	Ressonância Magnética Nuclear
RPM	-	Rotações por minutos
RVM	-	Medula ventromedial rostral
sc	-	subcutâneo
SER	-	Serotonina
SNC	-	Sistema Nervoso Central
SNP	-	Sistema Nervoso Periférico
SP	-	Substância P
STAT	-	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
TJ	-	Junções estreitas
TLR	-	Receptore do tipo "Toll-like"
TMS	-	Tetrametilsilano
TNF	-	Fator de necrose tumoral
TPA	-	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
TRP	-	Receptor de potencial transitório
TRPA1	-	Canal catiônico de potencial de receptor transitório
TRPM8	-	TRP melastina 8

TRPV1	-	TRP vanilóide 1
TRPV2	-	TRP vanilóide 2
TRPV3	-	TRP vanilóide 3
TRPV4	-	TRP vanilóide 4
TTX	-	Tetrodotoxina
TXA2	-	Tromboxano A2
UFPR	-	Universidade Federal do Paraná
UPCB	-	Herbário do Departamento de Botânica
US\$	-	Dólar
UV	-	Ultravioleta
V	-	Veículo
v	-	Volume
VCAM1	-	Molécula de adesão celular vascular 1
VEGF	-	Fator de crescimento endotelial vascular
vo	-	Via oral
WDR	-	Neurônios de amplo alcance dinâmico
$\Delta$	-	Varição
$\delta$	-	Parte por milhão
$^{\circ}\text{C}$	-	Graus Celsius

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
1.1	O PROCESSO INFLAMATÓRIO.....	18
1.2	EDEMA E MIGRAÇÃO CELULAR.....	22
1.3	DOR.....	25
1.3.1	Mecanismos Gerais de Processamento e Condução da dor.....	25
1.3.2	Dor Inflamatória.....	35
1.4	FÁRMACOS ANTI-INFLAMATÓRIOS E ANALGÉSICOS.....	39
1.5	PRODUTOS NATURAIS.....	42
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	46
2.1	OBJETIVO GERAL.....	46
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	47
3.1	FLUXOGRAMA DO TRABALHO.....	47
3.2	MATERIAL BOTÂNICO.....	47
3.3	PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS.....	47
3.4	ISOLAMENTO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS .....	48
3.5	PROCEDIMENTOS QUÍMICOS GERAIS.....	49
3.6	SELEÇÃO DE MATERIAL PARA OS TESTES FARMACOLÓGICOS.....	50
3.7	ANIMAIS UTILIZADOS.....	50
3.8	MODELOS EXPERIMENTAIS PARA OS TESTES FARMACOLÓGICOS.....	51
3.8.1	NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA.....	51
3.8.2	TESTE DA PLACA AQUECIDA.....	52
3.8.3	HIPERALGESIA MECÂNICA.....	52
3.8.4	EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA.....	53
3.8.5	DESEMPENHO MOTOR.....	54
3.9	PROTOSCOLOS EXPERIMENTAIS.....	54
3.9.1	ESCOLHA DAS DOSES UTILIZADAS.....	54
3.9.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO EEt E DO DCM.....	55
3.9.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS.....	56

3.9.4	AVALIAÇÃO DO POSSÍVEL MECANISMO DE AÇÃO PERIFÉRICO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS.....	58
3.10	DROGAS E REAGENTES.....	58
3.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	59
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>60</b>
4.1	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS EEt E DCM.....	60
4.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO EEt E DO DCM.....	63
4.3	IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA 1.....	73
4.4	IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA 2.....	79
4.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS.....	84
4.5.1	EFEITO DA ANAMARINE E DA 10-EPI-OLGUINE NA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA POR LPS.....	84
4.5.2	EFEITO DA ANAMARINE E DA 10-EPI-OLGUINE NA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA POR DIFERENTES ESTÍMULOS.....	98
<b>5</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>104</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>105</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>106</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O corpo humano é exposto constantemente a estímulos nocivos externos e internos que podem afetar a homeostasia corporal. Ao longo de seu processo evolutivo, os seres humanos desenvolveram vários mecanismos para detectar, responder e reparar tais danos. A inflamação é a resposta adaptativa a esses estímulos, seja ela transmitida por infecção, trauma, cirurgia, queimaduras, isquemia ou tecido necrótico (VARELA et al., 2018).

Apesar da inflamação ser um processo complexo e benéfico para o corpo humano ela pode gerar alguns sinais clássicos que podem levar a algum tipo de desconforto para as pessoas ou até mesmo gerar sinais que acabam por interferir na qualidade de vida das pessoas. Dentre esses sinais temos a dor (AGHASAFARI et al., 2019). A dor tem um papel protetor importante, alertando-nos sobre ameaças e fornecendo um impulso para a preservação da integridade do corpo. No entanto em certos contextos, como durante a inflamação descontrolada, ela se torna algo indesejável e até incapacitante para o indivíduo (RONCHETTI et al., 2017).

Nesse sentido, muitas vezes é necessário fazer uma intervenção farmacológica para o tratamento da dor e de outros sinais da inflamação (DHINGRA et al., 2015). Porém as atuais classes de medicamentos para o tratamento de tais condições apresentam efeitos colaterais significativos e ainda existem alguns processos fisiopatológicos que carecem de tratamentos ou tratamentos mais efetivos. Por isso a busca por novas moléculas que possuam tais efeitos farmacológicos se torna importante (YAXLEY e LITFIN, 2016).

A prática de usar plantas, suas partes ou extratos como compostos anti-inflamatórios é conhecida desde a antiguidade. Nas últimas décadas, centenas de artigos de pesquisa e revisão foram publicados sobre as atividades anti-inflamatórias das plantas (ZHU et al., 2018). Por isso a busca de novas moléculas bioativas em diferentes espécies de plantas é um caminho muito promissor (AZAB et al., 2016).

### 1.1 O PROCESSO INFLAMATÓRIO

Há muitos agentes que cotidianamente podem causar diversos danos à saúde dos seres humanos, como vírus, bactérias, fungos, agentes químicos, etc. A fim de

reduzir os danos causados por esses agentes, os organismos possuem estruturas e sistemas de defesa. A reação inflamatória é um desses mecanismos (FULLERTON e GILROY, 2016). Assim, a inflamação é considerada uma resposta do sistema imune inato desencadeada por diversos estímulos e/ou condições como infecção e lesão tecidual (SHEN et al., 2017).

Com a finalidade de proteger o ser vivo de um ataque agressivo, desenvolve-se rapidamente a reação inflamatória no local de invasão (MATSUZAWA-ISHIMOTO et al., 2018). Cornelius Celsius, há mais de dois mil anos, descreveu esse processo pela primeira vez, bem como alguns sinais cardinais da inflamação, usados até hoje, tais como calor, dor, edema e rubor. Virchow descreveu um quinto cardinal – a perda de funções – que atualmente também é utilizado (AHMED, 2011; AGHASAFARI et al., 2019).

A inflamação aguda é um processo benéfico que ajuda a isolar a região lesada e permite que ocorra a mobilização de células para eliminar o agente agressor (VARELA et al., 2018). Já a inflamação crônica, por outro lado, se torna um problema e não uma solução para a área lesionada. Os tecidos inflamados cronicamente podem lesionar também tecidos saudáveis em uma tentativa mal direcionada de iniciar o processo de cicatrização (KUNNUMAKKARA et al., 2018).

Existe um caminho genérico da inflamação que consiste em indutores, sensores, mediadores e efetores. Os indutores podem ser organismos infecciosos ou estímulos não infecciosos, como toxinas ou substâncias estranhas ao corpo (SHIRAZI et al., 2017). Já os sensores são moléculas especializadas que são ativadas pelos indutores, que acionam a produção de mediadores (RAGGI et al., 2018). Os mediadores, por sua vez, são substâncias químicas endógenas que podem induzir a sensação de dor, podem promover ou inibir a inflamação e o reparo de tecidos e podem ativar os efetores, que são os tecidos e células (MEDZHITOV, 2008; VARELA et al., 2018).

Dentre os indutores podemos citar o padrão molecular associado a patógeno (PAMP, do inglês "*pathogen associated molecular patterns*"). Esses PAMPs podem ser por exemplo o flagelo ou o DNA/RNA de uma bactéria (PENG et al., 2018). Outro tipo de indutor pode ser o padrão molecular associado a dano (DAMP, do inglês "*damage associated molecular patterns*"), que por sua vez são moléculas liberadas a

partir de células danificadas do hospedeiro como o DNA mitocondrial por exemplo, como mostra na figura 01 (PATIDAR et al., 2018).

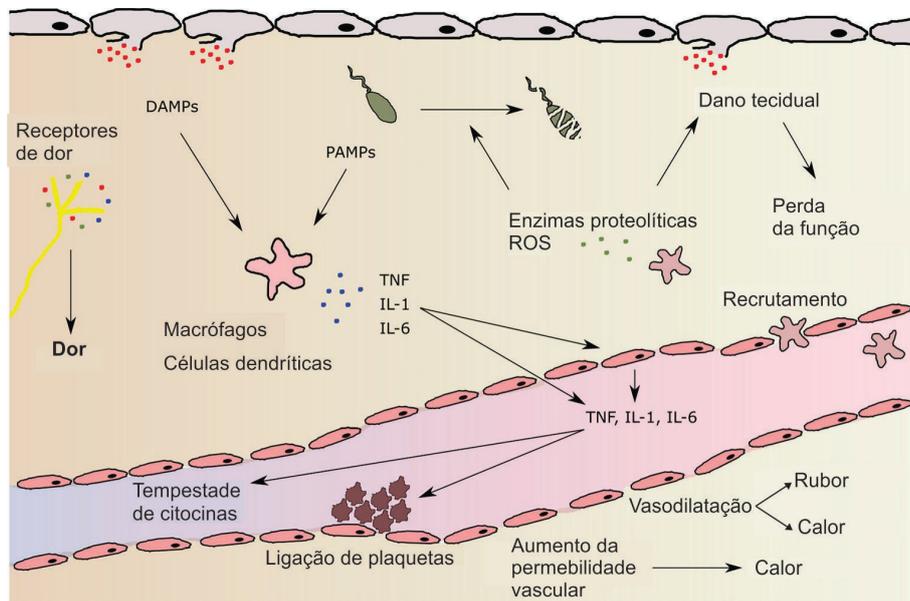


FIGURA 01: ESQUEMA GERAL DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA. A resposta do tecido a DAMPs e PAMPs leva a liberação de citocinas e outros mediadores que visam isolar o local e destruir o agente agressor, principalmente através da migração de leucócitos. Estes mediadores levam ao aparecimento dos sinais cardinais da resposta inflamatória, edema, calor, rubor e dor com eventual perda da função decorrente do dano tecidual. DAMPs: padrões moleculares associados a danos; PAMPs: padrões moleculares associados a patógenos; TNF: fator de necrose tumoral, IL-1: interleucina 1; IL-6: interleucina 6; ROS: espécies reativas de oxigênio. FONTE: Modificado de (VARELA et al., 2018)

Os PAMPs e DAMPs são reconhecidos por um grupo de receptores chamados de Receptor de reconhecimento de padrão (PRR, do inglês “*pattern recognition receptors*”) (SAIJO et al., 2018). Esses receptores podem estar na superfície da membrana celular como os receptores do tipo “*Toll*” (TLR, do inglês “*Toll-like receptors*”) (ANTHONEY et al., 2018) e receptor de lectina do tipo C (CLR, do inglês “*C-type Lectin Receptors*”) (CHIFFOLEAU, 2018) ou podem estar dentro das células como o receptor do tipo “*Nod*” (NLR, do inglês “*Nod-like receptor*”) (YANG et al., 2019) e receptor do tipo RIG-I (RLR, do inglês “*RIG-I-Like receptor*”) (ZHAO e KARIJOLICH, 2019).

Esses receptores estão presentes, por exemplo, em macrófagos e células dendríticas e após sua ligação com os PAMPs ou DAMPs vai levar a ativação de um inflamassoma e subsequente ativação de fatores de transcrição (Figura 01) (AMARANTE-MENDES et al., 2018). O principal deles no processo inflamatório é o

fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) que ativa a transcrição de diversas proteínas, entre elas, citocinas, enzimas e receptores (MITCHELL et al., 2016; ZHANG et al., 2017). Estas proteínas sintetizadas *de novo* em vão amplificar a ação de alguns outros mediadores já presentes nas células (como a histamina dos mastócitos e serotonina das plaquetas) ou de mediadores formados no plasma (como as proteínas do sistema complemento e as cininas).

Essas moléculas supracitadas vão iniciar os processos de edema, migração celular e dor (Figura 01). O edema envolve os processos de vasodilação e aumento da permeabilidade vascular e tem como função principal restringir o acesso do agente agressor e diluir eventuais moléculas tóxicas presentes (AGITA e ALSAGAFF, 2017; RHO et al., 2017). A migração celular tem como principal função a destruição do agente agressor (FRIEDL e MAYOR, 2017). A dor tem como principal função uma função protetora através da sinalização de que o tecido foi lesionado (VARELA et al., 2018). Estes processos, serão explicados com mais detalhes no capítulo subsequente, particularmente a dor, que é o foco principal deste estudo.

O processo pode ser resolvido, objetivando a eliminação e neutralização do agente agressor. O tecido agredido também deverá ser restaurado, assim como a permeabilidade vascular – com o envolvimento da apoptose dos neutrófilos existentes no local de infecção, remoção dos corpos apoptóticos, etc (FEEHAN e GILROY, 2019; SCHETT, 2019). Os macrófagos estão presentes nesses episódios, pois reconhecem e fagocitam os neutrófilos apoptóticos de modo que não agridam o tecido (HAMIDZADEH et al., 2017; OISHI e MANABE, 2018).

O processo de solucionar a inflamação é bastante ativo e depende da ação de vários mediadores pró-resolutivos e anti-inflamatórios, como por exemplo, lipoxinas (PIRAULT e BACK, 2018), prostaglandinas (PG) (HORTELANO et al., 2000), ciclopentenonas (BURSTEIN, 2020), anexina I (SUGIMOTO et al., 2016), resolvinas (SERHAN e LEVY, 2018) e mediadores da apoptose (CARTWRIGHT et al., 2019).

## 1.2 EDEMA E MIGRAÇÃO CELULAR

Existem três etapas principais nas respostas inflamatórias agudas, sendo elas: I) uma vasodilatação seguida de um aumento do fluxo sanguíneo na região lesionada; II) permeabilidade vascular com extravasamento de plasma da microcirculação, e III) migração de leucócitos para o tecido lesionado (GERMOLEC et al., 2018). Ou seja, as primeiras alterações observadas durante a inflamação são decorrentes das alterações no fluxo vascular e no calibre dos pequenos vasos sanguíneos (SHIRAZI et al., 2017). Arteríolas maiores e vasos capilares recém-abertos aumentam o fluxo sanguíneo para essa área. Gradualmente, alterações progressivas no endotélio venular aumentam a permeabilidade vascular da microvasculatura levando ao extravasamento plasmático (REGLERO-REAL et al., 2016). O acúmulo desse fluido no espaço intersticial é caracterizado como edema (MARKIEWSKI e LAMBRIS, 2007; TRAYES et al., 2013).

Em virtude da vasodilatação mencionada acima, os primeiros sinais cardinais da inflamação que aparecem são o rubor e o calor (Figura 01). O primeiro em virtude do fluxo sanguíneo e o segundo com o aumento de troca de calor entre o sangue e o tecido (BERNARDI et al., 2015; RUSSELL et al., 2018). Essa vasodilatação é mediada sobretudo pela ação de aminas vasoativas, como por exemplo, a serotonina e a histamina. A histamina é liberada principalmente pelos mastócitos agindo primordialmente nos receptores do tipo H<sub>1</sub> na microcirculação (BRANCO et al., 2018; THANGAM et al., 2018). A serotonina pode ser liberada pelas plaquetas e células enterocromafins agindo nos seus receptores próprios, 5-HTR, variando nas isoformas 5-HTR1-7 (SCHOENICHEN et al., 2019; WU et al., 2019).

Além dessas aminas, os peptídeos vasoativos como a substância P e a bradicinina também participam desse processo. A substância P (SP) é liberada pelos neurônios sensoriais e vai agir no receptor da neurocinina 1 (NK1R, do inglês "*neurokinin 1 receptor*") (SCHANK e HEILIG, 2017). Ela encontra-se armazenada em vesículas secretoras e sua ação tem como consequência a liberação de histamina pelo mastócito (SUVAS, 2017). Já a bradicinina (e outras cininas similares) pode ser formada no plasma pela ação do sistema caliceína-cininas e vai agir nos seus receptores do tipo B1 e B2 (RICCIARDOLO et al., 2018; TANG et al., 2018) e além da vasodilatação, também está envolvida nos processos de dor (CHOI e HWANG,

2018). Essas moléculas em conjunto induzem a liberação de óxido nítrico (ON), que é um potente vasodilatador, aumentando o edema por modificar completamente o fluxo sanguíneo local (SU, 2017; ANCIÓN et al., 2019).

Outro efeito dos peptídeos citados é levar a um aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (KUME e TAKADA-TAKATORI, 2018) que ativa a enzima fosfolipase  $A_2$  para produzir, a partir do ácido araquidônico presente nas membranas, alguns prostanóides que também podem apresentar um efeito vasodilatador (HARA et al., 2019; MOUCLIS e DENNIS, 2019). Esses prostanóides são produzidos pela enzima cicloxigenase (COX). Existem duas isoformas da COX presentes em humanos que já foram elucidadas (BENNETT e GILROY, 2016; CALDER, 2017). A COX-1 é a principal fonte de prostanóides que medeia funções fisiológicas, mas também pode estar envolvida em processos patológicos (PANNUNZIO e COLUCCIA, 2018; TSUGE et al., 2019). A COX-2 é a isoforma que é induzida durante o processo inflamatório por citocinas liberadas principalmente por macrófagos ativadas pelos PAMPs ou DAMPs, entre elas a interleucina- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina-6 (IL-6) (Figura 01) (KITAMURA et al., 2017; DESAI et al., 2018; SETHI et al., 2019).

Tanto a COX-1 como a COX-2 transformam o ácido araquidônico primeiramente em  $\text{PGG}_2$  e após uma peroxidação, reduz a  $\text{PGG}_2$  em  $\text{PGH}_2$  (INNES e CALDER, 2018; WANG et al., 2019). A  $\text{PGH}_2$  é subsequentemente metabolizada em  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGD}_2$ ,  $\text{PGI}_2$  e tromboxano  $A_2$  ( $\text{TXA}_2$ ) por meio de sintases específicas. Todas as prostaglandinas são importantes vasodilatadores, atuando em receptores específicos, localizados no músculo liso vascular de pequenas arteríolas (RONCHETTI et al., 2017).

O aumento da permeabilidade vascular é causado por alterações funcionais e estruturais na barreira endotelial venular. Muitas dessas alterações endoteliais são mediadas por moléculas já citadas como histamina, serotonina, substância P, cininas, entre outras como mostra a Figura 02 (SIEVE et al., 2018; JIA et al., 2019). A expressão e liberação desses mediadores é controlada, pelo menos em parte, por anafilatoxinas (AJONA et al., 2019).

A permeabilidade vascular aumentada, o fluxo sanguíneo mais lento e a produção de mediadores inflamatórios, como as quimiocinas, facilitam o processo de extravasamento, no qual os leucócitos saem da corrente sanguínea e migram para o

espaço intersticial (Figura 02) (GRIFFITHS et al., 2017). Aqui, os monócitos se diferenciam em macrófagos do tipo M1 ou M2 (GUILLIAMS et al., 2018). Os macrófagos do tipo M1 produzem ainda espécies reativas de oxigênio (EROs) e recrutam outras células imunológicas (HUGHES e O'NEILL, 2018), enquanto os do tipo M2 agem em uma fase posterior, pois promove a reparação do tecido liberando fatores de crescimento (MITTAL et al., 2014; RHO et al., 2017).

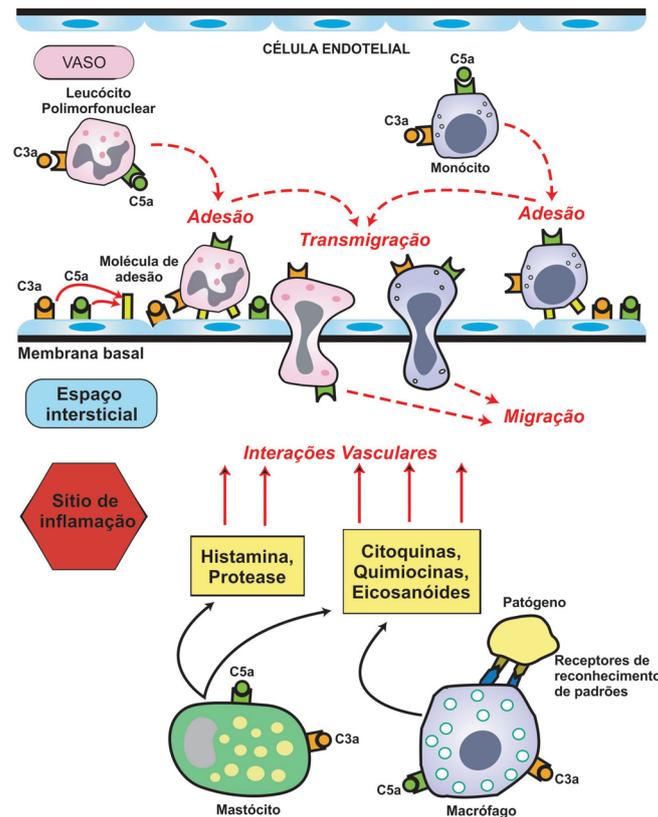


FIGURA 02 – PROCESSO GERAL DE MIGRAÇÃO CELULAR. A figura mostra como alguns mediadores inflamatórios (histamina, citocinas, quimiocinas, entre outros) produzidos por células de defesa acabam por interferir na permeabilidade da membrana e atrair leucócitos da corrente sanguínea em direção ao sítio inflamatório. Este processo é regulado por moléculas superficiais de sinalização no tecido endotelial (moléculas de adesão) e também é favorecido por processos hemodinâmicos. A migração se dá através dos processos de rolagem, adesão e transmigração. C3a e C5a: anafilatoxinas. Fonte: Modificado de (MARKIEWSKI e LAMBRIS, 2007).

O evento molecular mais importante associado ao extravasamento dessas células sanguíneas é uma regulação positiva das moléculas de adesão expressas por leucócitos e células endoteliais, que permite que ocorram interações entre essas células (HUGHES e NIBBS, 2018; VON LERSNER et al., 2019). Essas interações causam a rolagem, adesão e, finalmente, transmigração de leucócitos através da barreira (PAUPE e PRUDENT, 2018; ARRIAGADA et al., 2019).

Estes processos em conjunto promovem, portanto, 3 dos sinais cardinais da inflamação, ou seja, tumor (edema), rubor e calor.

### 1.3 DOR

#### 1.3.1 Mecanismos Gerais de Processamento e Condução da dor

Existem várias definições para a dor, entretanto uma das mais abrangentes e aceita é a definição da Associação Internacional para o Estudos da Dor (IASP, do inglês "*International Association for the Study of pain*"). A IASP define dor como "uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano real ou potencial ao tecido, ou descrita em termos de tal dano" (IASP, 2017).

A dor é uma das características que define muitos diagnósticos de doenças. Pode servir como um índice da gravidade e atividade de uma condição subjacente, um indicador prognóstico e um determinante do uso dos serviços de saúde (ORR et al., 2017). Ainda a mesma é uma das principais razões pela qual os pacientes procuram atendimento médico (STEIN e KOPF, 2019). A dor persistente geralmente causa comprometimento e incapacidade funcional, sofrimento psicológico, ansiedade, depressão e privação do sono. Ela ainda interrompe as atividades da vida diária e as relações pessoais sendo considerada a causa mais comum de incapacidade prolongada (ANWAR, 2016; DAVIS e CURTIN, 2016).

Entretanto, a dor é de fundamental necessidade ao se pensar na sobrevivência e manutenção do organismo. Potenciais de ação nocivos capazes de causar alguma lesão tecidual são processados na forma de dor e ainda a dor pode desencadear inúmeros comportamentos de proteção a um tecido já ferido (COHEN e HOOTEN, 2017; BEAZLEY-LONG et al., 2018; ST JOHN SMITH, 2018). A função de proteção que está ligada à dor é um apelo à ação (RAZAVI e HOSSEINZADEH, 2017; HEINRICH e SWEIS, 2018).

Com relação a duração, a dor pode ser classificada como aguda ou crônica. A dor aguda é a resposta fisiológica normal a um estímulo adverso que pode ser de origem química, térmica ou mecânica (DANCEL et al., 2017). Ela é um resultado da ativação dos nociceptores, receptores da dor, no local do tecido (PINHO-RIBEIRO et

al., 2017). Esse tipo de dor geralmente acontece com uma cirurgia, lesão traumática, dano tecidual e processo inflamatório (WARDHAN e CHELLY, 2017; BELL, 2018).

A IASP define nociceptores como sendo “o receptor sensitivo de alto limiar do sistema nervoso somatossensorial periférico capaz de codificar e transmitir estímulos nocivos”. E a mesma define estímulos nocivos como “um estímulo que danifica ou ameaça danos aos tecidos normais” (IASP, 2017). E em função dessa definição, nesse trabalho o termo “nociceptor” será considerado sinônimo de fibra nociceptiva periférica.

A dor aguda quando não é adequadamente controlada pode levar ao desenvolvimento de dor crônica. Essa geralmente se refere à dor intratável que tem duração de 3 meses ou mais e não se resolve em resposta ao tratamento (HYLANDS-WHITE et al., 2017; KNEZEVIC et al., 2018). Nesse tipo de dor, a adaptação positiva não ocorre, e por isso com o passar do tempo o sistema sensorial se torna mais sensível, hiper-responsivo e capaz de produzir uma dor intensa, dispersa e incessante. Existem vários tipos de dores crônicas, com fisiopatologias distintas e complexas (BURKE et al., 2017; ARENDT-NIELSEN et al., 2018). (CROFFORD, 2015; HEINRICHER, 2016).

Com relação a fisiopatologia da dor ela pode ser classificada como nociceptiva ou não-nociceptiva. A dor não-nociceptiva pode ser subdividida em dor neuropática e idiopática (ZILLIOX, 2017; ST JOHN SMITH, 2018). A dor neuropática é a “dor causada por uma lesão ou doença do sistema nervoso somatossensorial” (IASP, 2017). A dor idiopática implica um amplo espectro de estados de dor pouco compreendidos, como a síndrome dolorosa miofascial (ANWAR, 2016).

Já a dor nociceptiva é definida como sendo a “dor que surge de danos reais ou que colocam em perigo o tecido não nervoso e é devida à ativação de nociceptores” (IASP, 2017) se subdividindo em dor visceral e somática (ANWAR, 2016; ORR et al., 2017). A dor visceral, também conhecida como dor referida, se correlaciona com os tecidos dos órgãos internos (GEBHART e BIELEFELDT, 2016).

A dor somática, por sua vez, refere-se a lesões no sistema músculo-esquelético incluindo a pele, os músculos e ossos (GEBHART e BIELEFELDT, 2016). Este é o tipo de dor que será mais explorado neste estudo. Existem quatro processos fisiológicos envolvidos na nocicepção somática: transdução, transmissão, percepção e modulação (Figura 03) (MITSI e ZACHARIOU, 2016; SNEDDON, 2018).

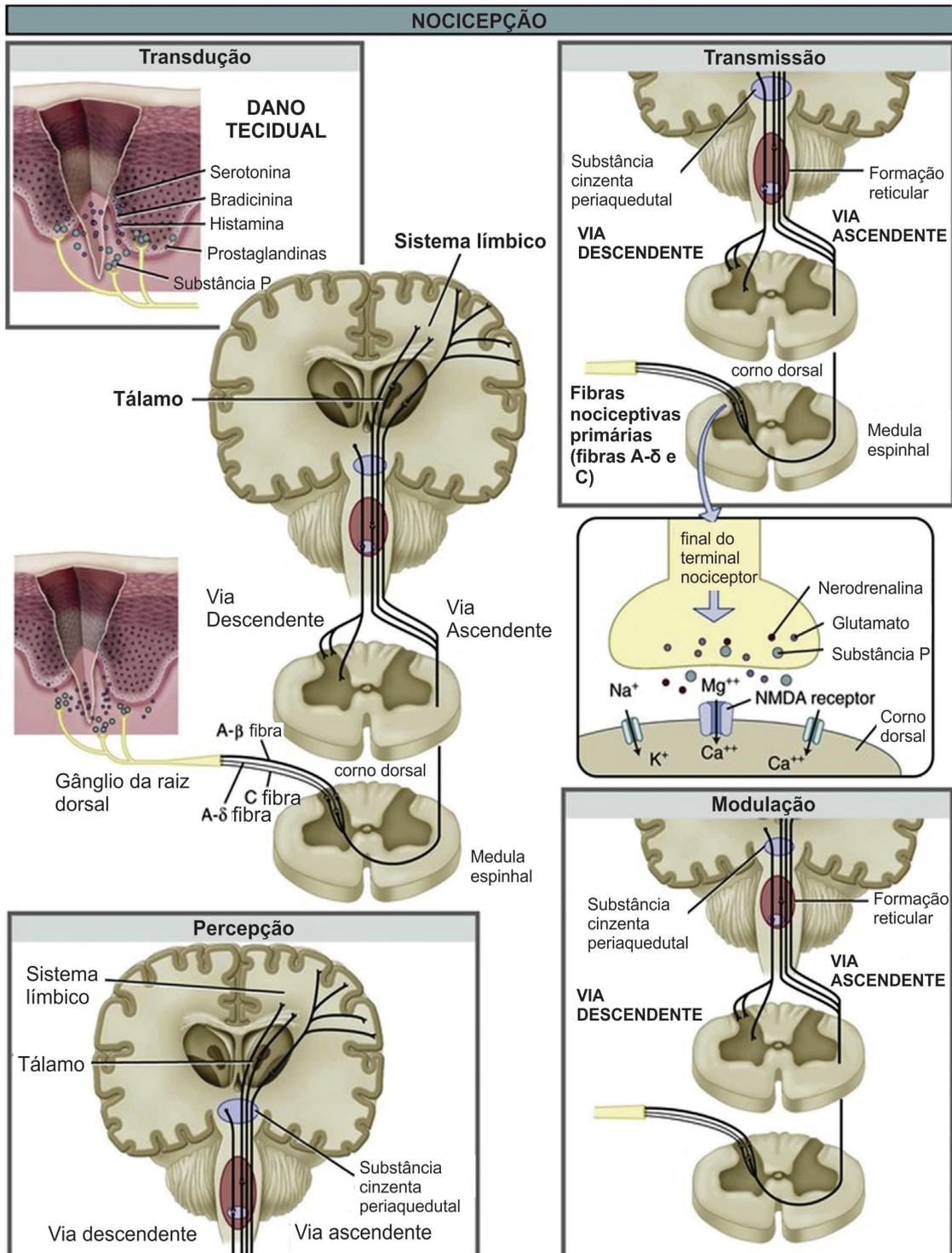


FIGURA 03: VIA DE TRANSDUÇÃO DA DOR. A figura mostra o esquema geral da transdução do estímulo doloroso. A transdução compreende a conversão de estímulos periféricos em potencial de ação que através da transmissão atinge o sistema nervoso central. A percepção é o passo onde a pessoa tem a experiência real tanto sensorial quanto afetiva relacionada a dor e por último temos a modulação que é quando temos uma alteração do estímulo de dor. Fonte: Adaptado de (ELLISON, 2017)

Em linhas gerais, o processo de transdução ocorre quando os estímulos nocivos agem nos nociceptores periféricos e são convertidos em atividade elétrica, culminando em um potencial de ação (BELANGER et al., 2018). Ou seja, a nocicepção é o processo pelo qual intensos estímulos térmicos, mecânicos ou químicos são detectados pelos nociceptores (ROSENQUIST et al., 2017). A IASP define nocicepção como sendo “o processo neural de codificação de estímulos nocivos” (Figura 03) (IASP, 2017).

A transmissão é a transferência sináptica de informações que ocorre na sinapse entre os neurônios de primeira e segunda ordem no corno dorsal da medula espinhal e nas sinapses subsequentes que levam a informação até o sistema nervoso central (Figura 03) (YAM et al., 2018; RUSSO e SUNDARAMURTHI, 2019). O termo percepção remete-se a experiência consciente e real da dor, levando em conta tanto seus aspectos sensoriais (localização, caráter e discriminação) quanto os afetivos (emocionais) (Figura 03) (LAUTENBACHER et al., 2017; RONCHETTI et al., 2018). Por fim, a modulação é o último processo da nocicepção. Ela refere-se à alteração (por exemplo, aumento ou supressão) da entrada sensorial (NASER e KUNER, 2018). Nesta etapa final, a modulação dos estímulos dolorosos antes da percepção da dor é por inibição ou aprimoramento através de influências supra-espinhais decorrentes da ponte, da medula e do mesencéfalo (Figura 03) (ELLISON, 2017; WOLLER et al., 2017).

Antes de fazermos uma análise mais profunda no processamento da via nociceptiva, é imprescindível diferenciar o termo “dor” e “nocicepção” definidos acima dos termos “hiperalgesia” e “alodinia”. A IASP define hiperalgesia como “aumento da dor por um estímulo que normalmente provoca dor”. Isso implica que a ampliação da sensibilidade à dor é frequentemente decorrente de significativas mudanças primeiramente no processo periférico e, depois, no processo central de sinalização da dor. Já a alodinia significa “dor devido a um estímulo que normalmente não provoca dor”. A alodinia ocorre através da ativação periférica de receptores sensíveis ao estímulo mecânico, térmico ou químico que sofrem alterações e começam a ser aptos a estimular o processo nociceptivo central. Ainda segundo a IASP a dor apresenta dois componentes: o sensorial e o emocional; o termo “nocicepção”, como já explicado, refere-se apenas ao componente sensorial (IASP, 2017).

A via nociceptiva é também chamada de via ascendente da dor e ela começa, como já dito, com o processo de transdução (WOLLER et al., 2017). Esse primeiro processo começa quando os nociceptores localizados na periferia são ativados por um estímulo nocivo causando a abertura de canal iônico (sódio, potássio, cálcio) criando impulsos elétricos (POZSGAI et al., 2019; SALZER et al., 2019). Esses impulsos, com frequência proporcional à intensidade do estímulo, são propagados ao longo dos axônios das fibras aferentes de primeira ordem, que são nociceptivas, através do gânglio da raiz dorsal (DRG, do inglês "*dorsal root ganglion*") até os terminais do axônio no corno dorsal da medula espinhal que por sua vez, ascende ao tronco cerebral, ao tálamo e ao córtex (FERDOUSI e FINN, 2018; GARCIA et al., 2020).

As fibras nervosas periféricas podem ser classificadas, em termos de estrutura, diâmetro, grau de mielinização e velocidade de condução em A $\alpha$  e A $\beta$ , A $\delta$  ou C, como mostra na Figura 04 (WEHRWEIN et al., 2016; GRASSEL e MUSCHTER, 2017). Para o processamento da dor as fibras do tipo A $\delta$  ou C são as mais importantes (ARMSTRONG e HERR, 2020; XU et al., 2020). Estudos anatômicos mostram que a maioria dos tipos de fibras cutâneas dos mamíferos são em grande parte nociceptivas, representando algo em torno de 68% das fibras (NAIR et al., 2017). Dessas 12% são do tipo A $\delta$ , 30% do tipo C polimodal, 20% do tipo C mecanotérmica ou que respondem somente ao calor e 5% do tipo C silenciosas, que são aquelas que respondem apenas ao calor quando são sensibilizadas (DUAN e XIE, 2016; MERIGHI, 2018).

As fibras aferentes A $\delta$  são pouco mielinizadas e variam em seu diâmetro entre 2,0-6,0  $\mu$ m e têm velocidade de transmissão intermediária de 2-10 m/s em direção ao SNC (Figura 04) (KOFLEER et al., 2019). Essas fibras produzem dor aguda e bem definida, que normalmente é estimulada por um corte, um choque elétrico ou um golpe físico (ARCILLA e TADI, 2020). A ativação dessas fibras causa uma retirada do reflexo espinhal da parte do corpo afetada do estímulo, antes que uma sensação de dor seja percebida no sistema nervoso central. Isso permite uma resposta rápida de "fuga" ou preparação para "luta" (BASANTSOVA et al., 2019). Alguns dados da literatura apontam que algumas dessas fibras A $\delta$  são termossensíveis sendo que em torno de 12% são sensíveis ao calor, com um limiar

de ativação em torno de 42°C, e 50% são sensíveis ao frio, com um limiar de ativação em torno de 8°C (GLATTE et al., 2019; OAKLANDER e NOLANO, 2019).

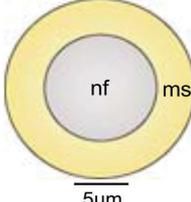
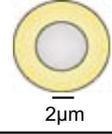
Fibra	Corte transversal	Tipo de fibra	Sensação	% <sup>a</sup>	CV (m/s)	vFT (mN) <sup>b</sup>	Termo - sensibilidade <sup>c</sup>
A		RAM	Toque	10	>10	1.0	
		SAM	Toque	12	>10	1.5	
A $\delta$		D-hair	Toque	6	2-10	<0.5	
		AM	Nociceção	12	2-10	5	
C		C-polimodal	Nociceção	30	<1.5	10	
		CM/MH/MC/H	Nociceção	20	<1.5	6	
		"silent"	Nociceção <sup>d</sup>	~5	<1.5	N/A	
		CLT $\beta$	Toque <sup>e</sup>	~5	<1.5	<0.5	

FIGURA 04: TIPOS DE FIBRAS SENSORIAIS. A figura mostra os tipos de fibras sensoriais. Fazendo uma comparação com relação ao diâmetro, o grau de mielinização, a taxa de condução do estímulo e ainda mostrando a quais sensações elas respondem. Fonte: Modificado de (SMITH e LEWIN, 2009). LEGENDA: %: porcentagens (referem-se ao número total de fibras cutâneas); CV (m/s): velocidade de condução (m/s) (Alguns neurônios expressam canais de íons, cuja ativação produz sensações de quente/frio, em vez de dolorosamente quente/frio. É descrito apenas se é possível para uma classe de neurônio transduzir quente (vermelho) / frio (azul) nocivo, mas isso não significa todo neurônio dessa classe); vFT(mN): limiar de vonFrey (mili Newton); nf: fibra nervosa; ms: bainha de mielina;  $\mu$ m: micrômetro; RAM: mecanorreceptor de adaptação rápida; SAM: mecanorreceptor de adaptação lenta; D-hair: fibra não mecano nociceptiva; AM: fibra A $\delta$  mecano nociceptiva; CM: fibra do tipo C mecano nociceptiva; MH: fibra do tipo C nociceptiva mecano-quente; MC: fibra do tipo C nociceptiva mecano-frio; H: fibra do tipo C nociceptiva ao quente; "silente": fibra do tipo C nociceptiva silenciosa; CLT: fibra do tipo C de baixo limiar.

As fibras do tipo C são fibras menores não mielinizadas que constituem a maioria dos nociceptores periféricos. Elas possuem diâmetro entre 0,4-1,2  $\mu$ m, são agrupadas em fascículos, cercadas por células de Schwann, mostram uma velocidade de condução de 0,5-2,0 m/s e devido a esse diâmetro são muito suscetíveis à danos (Figura 04) (CARRICONDO e ROMERO-GOMEZ, 2019). Estas são de condução lenta e se recuperam da fadiga mais lentamente do que as fibras A $\delta$  (NAGI et al., 2019). Numerosas fibras do tipo C são combinadas em forma de rede, portanto, a área coberta pelas fibras C ramificadas é geralmente ampla e o paciente é capaz de localizar a dor apenas aproximadamente (FINSTERER et al., 2017). Por esse motivo as fibras C produzem um tipo dor mais duradoura,

tipicamente caracterizada como dor lenta e difusa. As fibras C reagem a estímulos mecânicos, térmicos e químicos e por esse motivo são classificadas como nociceptor polimodal C (GWATHMEY e PEARSON, 2019; AL-CHALABI et al., 2020).

As fibras A $\delta$  e C podem ser classificadas em duas classes principais. O tipo I são os chamados nociceptores mecânicos de alto limiar (HTM, do inglês "*high threshold mechanical nociceptor*") que respondem a estímulos mecânicos e químicos, mas possui limiares responsivos ao calor relativamente altos, >50°C (FLECKENSTEIN et al., 2017). Caso o estímulo térmico seja mantido, esses aferentes do tipo I responderão a temperaturas mais baixas. E o mais importante, eles podem sofrer o processo de sensibilização, ou seja, o limiar para a ativação da fibra nociceptiva ao calor ou ao estímulo mecânico se reduzirá (VIATCHENKO-KARPINSKI e GU, 2016; GINZBURG et al., 2018).

Por sua vez, as fibras tipo II têm um limiar que responde ao calor muito mais baixo, temperaturas inferiores à 43°C. Em contrapartida elas se ativam com um limiar mecânico muito alto (DJOUHRI, 2016). A atividade desse aferente quase certamente medeia a "primeira" resposta da dor aguda ao calor nocivo. Por outro lado, a fibra Tipo I provavelmente medeia a "primeira" dor provocada pela compressão de um alfinete e outros estímulos mecânicos intensos (MOULTON e BORSOOK, 2019).

As fibras nociceptivas do tipo C ainda podem ser divididas em dois grupos: as fibras peptidérgicas marcadas pela expressão do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP, do inglês "*calcitonin gene-related peptide*") e substância P (SAMPAOLO et al., 2017; DEMBO et al., 2018) e o grupo não peptidérgico identificado pela ligação da isolectina B4 (BEAUDRY et al., 2017). Sendo que a ativação dessas fibras peptidérgicas acabam por ativar a micróglia, que aumenta o estímulo da dor (GAZERANI et al., 2016).

Existem vários tipos de receptores periféricos que podem ser ativados para o processo de transdução da dor. Como aqueles que estão relacionados com a temperatura. Dentre esses temos os receptores de potencial transitório (TRP, do inglês "*transient receptor potential*") TRP (BALEMANS et al., 2017; HOSSAIN et al., 2019). Dentre os subtipos dessa família temos o canal TRP vanilóide 1 (TRPV1) parece desempenhar um papel de destaque na sensação de calor (HILL et al., 2018; BUJAK et al., 2019). Por outro lado, temos receptores como o TRP melastina 8

(TRPM8), também conhecido como receptor do mentol. Alguns dados mostram que esses receptores são ativados na detecção de uma resposta nociva ao frio, numa faixa de temperatura que varia de 10-15°C (DAI, 2016; GAVVA et al., 2019). Além desses dois já citados temos também o receptor do tipo TRPA1, que é ativado pelo Lipopolissacarídeo (LPS) de Bactéria gram negativa entre outros (LAING e DHAKA, 2016; HUNG e TAN, 2018).

Além do estímulo ao frio e ao calor, os nociceptores podem ser ativados por estresse químico. Dentre esses canais temos os iônicos sensíveis ao ácido (ASICs, do inglês *acid sensitive ion channels*) (HUGHES et al., 2007; KELLENBERGER e SCHILD, 2015); os canais piezoelétricos (COSTE et al., 2010); os receptores da bradicinina B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, que são acoplados a proteína G (KHAN et al., 2019; MARCEAU et al., 2020); o receptor da Substância P, receptor da neurocinina-1 (NK1R) (SCHANK e HEILIG, 2017); além de vários receptores de citocinas pró inflamatórias, que podem ser acoplados a proteína G ou do tipo tirosina quinase (COOK et al., 2018; CHOPRA et al., 2019).

E por fim podemos ter os receptores relacionados com a percepção dolorosa pela estimulação mecânica. Dentre esses podemos citar novamente os receptores ASICs (OMERBASIC et al., 2015; GREGORY et al., 2018); os receptores do tipo TRPV4 (LINDY et al., 2014; MOORE et al., 2018); os receptores TRPA1 (LI et al., 2018; LOGASHINA et al., 2019) e também temos as proteínas Piezo, são subunidades formadoras de poros de canais iônicos que se abrem em resposta a estímulos mecânicos (VOLKERS et al., 2015; WU et al., 2017)

Uma vez que o estímulo nocivo tenha sido ativado na periferia, ele deve ser transmitido como um potencial de ação para o sistema nervoso central, processo esse chamado de transmissão, como citado acima (NASER e KUNER, 2018). Os nociceptores expressam uma ampla variedade de canais dependentes de voltagem como por exemplo os Nav, Cav e Kv que transmitem o potencial de ação ou, mais comumente, em um conjunto de potenciais de ação que codificam a intensidade de um estímulo nocivo aplicado em seus campos receptivos (BENNETT et al., 2019; TAKAYAMA et al., 2019).

O corno dorsal da medula espinhal é o local da primeira sinapse do neurônio aferente primário de primeira ordem com o de segunda ordem. Essa região é um local de uma importante modulação e integração de informações sensoriais antes de

serem projetadas ao cérebro (MCGARAUGHTY et al., 2018). Anatomicamente, os corpos celulares dos nociceptores estão localizados nos DRG adjacentes à medula espinhal ou nos gânglios do trigêmeo no caso de informações sensoriais decorrentes da face (CHUN e KWON, 2019; UTA et al., 2019). Seus axônios surgem desses corpos celulares e possuem um ramo periférico que inerva os tecidos onde os estímulos são transmitidos e um ramo central que inerva a medula espinhal. Embora outras classes de fibras aferentes primárias sensoriais possam ter um aparato complexo na periferia para a detecção de estímulos, os nociceptores estão presentes na periferia como terminações nervosas livres simples e ramificadas (CORDERO-ERAUSQUIN et al., 2016; GARCIA et al., 2020).

A substância cinzenta da medula espinhal é dividida em lâminas com base em critérios citoarquitetônicos (REXED, 1952). As fibras nociceptivas aferentes primárias terminam no corno dorsal de uma maneira bem ordenada, determinada pelo tipo de fibra dentro de um arranjo somatotópico (MERIGHI, 2018). Os nociceptores do tipo A $\delta$  terminam principalmente na lâmina I, que fica na parte marginal do corno. As fibras nociceptivas aferentes primárias do tipo C peptidérgicas terminam principalmente nas lâminas I e II, mais externas, enquanto a maioria das fibras C não peptidérgicas forma uma banda que ocupa a parte central da lâmina II (OSSIPOV et al., 2010; ABRAIRA et al., 2017).

Na sinapse entre os neurônios de primeira e de segunda ordem pode ocorrer o processo de sensibilização central (JI et al., 2018). A IASP define esse termo como “maior responsividade dos neurônios nociceptivos no sistema nervoso central à sua entrada aferente normal ou abaixo do limiar” (IASP, 2017). Ou seja, esse processo pode acontecer através da condução normal do estímulo que está na via ascendente da dor ou através de alguma patologia que modifica essas sinapses deixando-as mais responsivas aos estímulos dolorosos (WOLLER et al., 2017).

Vários mecanismos complexos estão relacionados com à sensibilização central, mas é bem estabelecido que o receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) desempenha um papel fundamental nesse processo (XIE et al., 2018). O receptor NMDA apresenta-se normalmente bloqueado por um íon  $Mg^{2+}$  quando a célula apresenta-se em potencial de repouso (JAFRI et al., 2018). A despolarização sustentada do neurônio por ações do glutamato em receptores o receptor alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e também de SP e CGRP, em

seus respectivos receptores remove este bloqueio exercido pelos íons  $Mg^{2+}$  permitindo assim que glutamato possa ativar também o receptor NMDA (CHEN et al., 2019; KHAN et al., 2019). E essa ativação resulta em um influxo maior de  $Na^+$  e  $Ca^{2+}$  no terminal e, assim, amplificação do sinal (SANDKUHLER e GRUBER-SCHOFFNEGGER, 2012; BELL, 2018).

Para que um estímulo nocivo seja percebido como doloroso, ele deve ser projetado então para os centros superiores do cérebro (PETITJEAN et al., 2019). Os neurônios de projeção nociceptiva são concentrados na lâmina I e espalhados pelas lâminas III-VI (FERNANDES et al., 2018). Os neurônios de projeção nas lâminas V, que são mais profundas, podem não ser específicos para estímulos nocivos e são denominados neurônios de faixa dinâmica ampla (WDR, do inglês “*wide dynamic range*”), pois respondem a uma ampla faixa de entrada e codificam a intensidade do estímulo (ZAIN e BONIN, 2019).

A percepção é o terceiro processo envolvido na nocicepção. Ela se refere à decodificação ou interpretação de dados aferentes no cérebro que dá origem à experiência sensorial específica do indivíduo (LAUTENBACHER et al., 2017). Os neurônios de segunda ordem emitem, dentro da medula, axônios que atravessam para o lado oposto que cruzam a linha mediana e adentram nos tratos ascendentes da substância branca da coluna vertebral (APKARIAN et al., 2005; WEST et al., 2015).

Esses tratos então inervam várias partes do tronco encefálicos e núcleos talâmicos através de dois tratos espinotalâmicos. O trato neospinotalâmico transmite impulsos rápidos para dor aguda enquanto que o trato paleospinotalâmico transmite impulsos mais lentos para uma dor difusa ou crônica (SINGER et al., 2017). Ambos dirigem-se ao tálamo passando pela formação reticular, e do tálamo os neurônios de terceira ordem projetam-se para as diferentes áreas do encéfalo (AL-CHALABI et al., 2020; DYDYK e MUNAKOMI, 2020).

As diferentes projeções para o tronco cerebral e núcleos talâmicos incluem o bulbo ventrolateral caudal, o bulbo ventromedial rostral (RVM), o núcleo parabrachial (Pb), a substância cinza periaquedutal (PAG), o núcleo do trato solitário (NTS) e tálamo (LEUNG e STROMAN, 2016; KATO et al., 2018). Os impulsos são então projetados no córtex somatossensorial para interpretação e em outras áreas do

cérebro para uma resposta integrada aos estímulos dolorosos (NASER e KUNER, 2018; WHITSEL et al., 2019).

Cada uma dessas áreas citadas acima está relacionada com um dos aspectos relacionados com a dor. O Pb é particularmente importante em termos do componente afetivo da dor, uma vez que sua saída proporciona uma conexão rápida com a amígdala e o hipotálamo (THOMPSON e NEUGEBAUER, 2019). O tálamo tem sido associado aos aspectos discriminatórios sensoriais da dor devido às suas conexões com o córtex somatossensorial (BLASZCZYK et al., 2018). Acredita-se que o PAG e o CVLM estejam a montante de outras áreas do tronco cerebral que controlam poderosas entradas descendentes da medula espinhal. A parte do córtex cingulado anterior e o córtex insular também estão relacionados com o comportamento afetivo da dor (WEST et al., 2015; PORRECA e NAVRATILOVA, 2017; WOLLER et al., 2017).

A modulação é o último processo de nocicepção. Nesta a modulação dos estímulos dolorosos antes da percepção da dor é por inibição ou aprimoramento através de influências supraespinhais decorrentes da ponte, bulbo e mesencéfalo (HUANG et al., 2019). Um desses mecanismos é a via inibitória descendente que de maneira geral apresenta um importante efeito analgésico diminuindo a percepção da dor vinda da via ascendente nociceptiva (VANEGAS e SCHAIBLE, 2004; BANNISTER e DICKENSON, 2017). A PAG recebe informações de centros cerebrais superiores e é capaz de ativar um poderoso efeito analgésico. A PAG recebe neurônios de locais corticais e possui conexões recíprocas com a amígdala (HARPER et al., 2018). A RVM pode facilitar ou inibir as entradas nociceptivas e atua como um filtro final no controle da facilitação descendente da dor (LI et al., 2017; TOBALDINI et al., 2019).

### 1.3.2 Dor Inflamatória

A dor inflamatória pode ser produzida por fenômenos independentes ou interdependentes. Alguns desses fenômenos podem agir através da estimulação direta de nociceptores, e outros dependem de mediadores que agem em tipos específicos de nociceptores ou então produzem modificações na via nociceptiva central (ELLISON, 2017).

Algumas substâncias endógenas, que são produzidas pelas células que sofreram algum tipo de lesão, como a substância P, produzida por neurônios, produzem um efeito excitatório podendo agir juntamente com a bradicinina (BK), que por sua vez é produzida no plasma (VIEIRA et al., 2018). Já outras substâncias agem principalmente na via de sensibilização, como algumas citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) ou prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>), que são derivadas do ácido araquidônico, ou ainda aminas simpáticas, como dopamina e epinefrina, que são liberadas pelos terminais nervosos (PAULSEN et al., 2017). A sensibilização diminui o limiar de despolarização dos nociceptores, consequentemente tornando-o responsivo a uma intensidade menor de estímulo. E em conjunto todos esses mediadores inflamatórios, produzido e/ou liberados por diferentes tipos celulares causam a sensibilização periférica como mostrado da Figura 05. (COUTAUX et al., 2005; BASBAUM et al., 2009; CHIU et al., 2012; YAKSH et al., 2015; ELLISON, 2017).

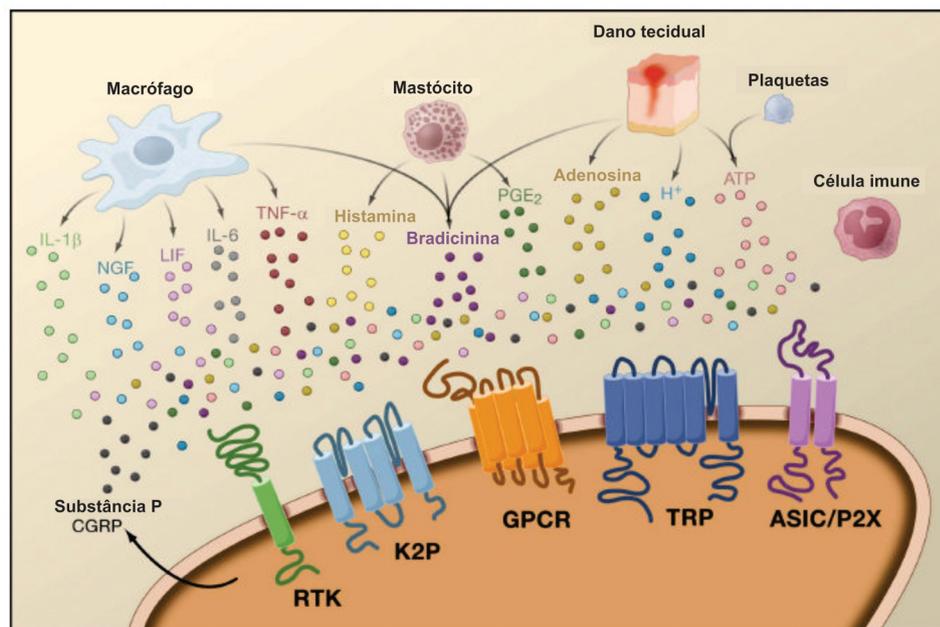


FIGURA 05: MEDIADORES PERIFÉRICOS DA INFLAMAÇÃO. A figura mostra como diferentes tipos celulares ou um dano tecidual trabalham em conjunto para produzir uma série de mediadores periféricos que estão envolvidos na sensibilização periférica aos estímulos de dor. E a figura ainda mostra alguns tipos de receptores onde esses mediadores podem atuar, lembrando que para cada mediador temos seus receptores específicos. Fonte: Modificado de (BASBAUM et al., 2009).

Legenda: IL-1 $\beta$ : Interleucina 1 $\beta$ ; NGF: Fator de crescimento do nervo; LIF: fator inibidor de leucemia; IL-6: Interleucina 6, TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral alfa; PGE<sub>2</sub>: prostaglandina E<sub>2</sub>; H<sup>+</sup>: próton; ATP: adenosina trifosfato, CGRP: Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, RTX: receptor de tirosina quinase; K2P: canal de Potássio de dois poros; GPCR: receptor acoplado a proteína G; TRP: receptor de potencial transitório; ASIC: Canais iônicos sensíveis ao ácido; P2X: canais de íons dependentes de ATP.

Para poder fazer uma análise sobre os processos que estão envolvidos com a dor inflamatória, vamos discutir um pouco sobre a ação de alguns desses mediadores inflamatórios que acabam causando esse tipo de dor.

Como mencionado com mais detalhes nos capítulos anteriores, o reconhecimento de um PAMP ou DAMP por macrófagos e outras células do sistema imune, através dos receptores TLR e NLR resulta na ativação de fatores de transcrição como o NF- $\kappa$ B (SEN e BALTIMORE, 1986; KARIN e GRETEN, 2005; BELL, 2018). Essa ativação ocorre através da fosforilação do inibidor do NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) (XIANG et al., 2019). Com a ativação do NF- $\kappa$ B um dos primeiros mediadores inflamatórios produzido é o TNF- $\alpha$  (SUBEDI et al., 2017).

O TNF- $\alpha$  é uma citocina pleiotrópica envolvida na patogênese de uma série de processos fisiológicos que controlam a inflamação desempenham papel direto na geração e manutenção da dor, facilitando a sensibilização central e a hiperalgesia (ZHU et al., 2019). Essa citocina pode ser produzida por macrófagos, células T, mastócitos, neutrófilos, células endoteliais entre outras (Figura 05) (ANNIBALDI e MEIER, 2018; MEHTA et al., 2018).

O TNF- $\alpha$  pode ativar dois tipos de receptores o TNFR1 e o TNFR2 (ZELOVA e HOSEK, 2013). Na parte intracelular esses receptores são capazes de desencadear diferentes vias de sinalização devido à sua interação com várias proteínas citosólicas. Dentre as vias intracelulares a via das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK, do inglês *mitogenactivated protein kinases*) têm uma posição significativa na sinalização intracelular do TNF- $\alpha$  (KALLIOLIAS e IVASHKIV, 2016; MEHTA et al., 2018).

Outro mediador inflamatório importante é a IL-1 $\beta$ , que é considerada outra das primeiras citocinas produzidas durante a inflamação (ROSS et al., 2016; BARTEKOVA et al., 2018). Ela é produzida por diferentes tipos celulares como macrófagos e mastócitos sendo também considerada um potente agente hiperalgésico mecânico e térmico (Figura 05) (LIU et al., 2017; MATSUDA et al., 2019).

A família de receptores da interleucina 1 (IL-1R) compreende 10 membros que compartilham uma estrutura altamente semelhante sendo que os mais importantes são o IL-1R1 e IL-1R2, que são capazes de se ligar a IL-1 $\alpha$  e a IL-1 $\beta$

(BORASCHI et al., 2018). Esses receptores são expressos por uma infinidade de células como células T, leucócitos polimorfonucleares, monócitos, macrófagos e células B. Após a formação do complexo IL-1R é ativado uma cascata intracelular contendo a proteína adaptadora MyD88 que por sua vez recruta proteínas da família de quinase associada a IL-1R que no final regulam a expressão de genes que regulam outras citocinas pró inflamatórias aumentando a transdução do sinal (SCHAFERS e SORKIN, 2008; BENT et al., 2018).

Outros mediadores inflamatórios importantes são os prostanóides. O processo de síntese das PG já foi descrito com detalhes anteriormente e dentre as moléculas que são produzidas temos a PGE<sub>2</sub>. A PGE<sub>2</sub> é geralmente considerada um agente sensibilizante porque melhora a sensibilização dos nociceptores ao diminuir o limiar dos canais de sódio resistentes à tetrodoxina, modula o canal TRPV1 para a sensação de calor e sensibiliza os neurônios aferentes primários à bradicinina (Figura 05) (STRAUS e GLASS, 2001; JANG et al., 2020).

A PGE<sub>2</sub> atua em receptores acoplados à proteína G e a família é composta por quatro subtipos (EP1-EP4), cada um dos quais ativa vias de sinalização distintas (BREYER et al., 2001; JABBOUR e SALES, 2004; KAWAHARA et al., 2015). A sinalização induzida por EP medeia a fosforilação de PKA e PKC. Curiosamente, parece haver modulação entre as ações de PKA e PKC na sinalização desse receptor visto que alguns dados da literatura mostram que a PKA é capaz de regular a atividade da PKC $\epsilon$ . (TAMURA et al., 2005; DOMINGUEZ et al., 2008; SACHS et al., 2009; WATERS e BROOKS, 2015; VIEIRA et al., 2016). Além desses fatores a PGE<sub>2</sub> pode interferir em outros canais e moléculas. A PGE<sub>2</sub> ativa o canal TRPV<sub>1</sub> e pode interagir com a bradicinina de maneira íntima no processamento da dor inflamatória. Por isso a PGE<sub>2</sub> tem um importante papel no processo de transmissão da dor e na sensibilização tanto periférica quanto central (RONCHETTI et al., 2017; JANG et al., 2020).

Outra classe de mediadores que estão envolvidos no processo de nocicepção são as catecolaminas. Vários estudos mostram a participação da dopamina, da noradrenalina e da adrenalina tanto em dores inflamatórias quanto em dores neuropáticas (COURTIES et al., 2017; GOMES et al., 2020). A liberação de TNF- $\alpha$  pode desencadear a liberação de IL-6 e IL-1 $\beta$  que pode levar a liberação de dopamina e noradrenalina do sistema nervoso simpático. Essa cascata de citocinas

controla o vínculo entre a lesão e liberação de prostaglandinas e aminas simpaticomiméticas que sensibilizam os nociceptores aferentes levando a hiperalgesia (CUNHA et al., 2005; ROCHA et al., 2018).

No processo nociceptivo as catecolaminas agem principalmente via receptores adrenérgicos periféricos do subtipo  $\beta 2$  e  $\beta 3$  ( $\beta 2$  e  $\beta 3$ ARs) que são receptores acoplados a proteína G (CARACI et al., 2019). A ativação desses receptores podem produzir dor diretamente, aumentando a excitabilidade dos nociceptores aferentes ou também podem influenciar a dor através da ativação de células imunorreguladoras como as células T, mastócitos e macrófagos (CISZEK et al., 2016; ZHANG et al., 2018). Alguns dados da literatura sugerem que a hiperalgesia mediada por receptores adrenérgicos  $\beta$  é mediada pelo menos por dois sistemas de segundo mensageiro, cAMP/PKA e PKC (KHASAR, MCCARTER, et al., 1999; DINA et al., 2001; PIERETTI et al., 2016).

#### 1.4 FÁRMACOS ANTI-INFLAMATÓRIOS E ANALGÉSICOS

A inflamação e a dor são respostas de defesa do organismo. Apesar disso, pensando na proteção do mesmo, os pacientes lidam com sensações desagradáveis, que por vezes estão conectadas ao sofrimento em várias patologias, especialmente em doenças inflamatórias crônicas. Assim, o uso de fármacos anti-inflamatórios e analgésicos é muito frequente na grande maioria dos pacientes.

Há muitas classes de substâncias que podem ser empregadas como anti-inflamatórias e analgésicas. Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) constituem a principal classe dos fármacos utilizados. Nesta classe tem-se o ácido acetilsalicílico, que é uma das drogas mais usadas no mundo (STRAWSON, 2018). Os AINEs são muito consumidos devido aos seus fins anti-inflamatórios, analgésicos e antipiréticos (MOORE et al., 2019). Esses fins se devem à inibição das enzimas COX, inibindo a produção de periféricamente quanto no SNC. Dentre os exemplos dessas moléculas formadas pela ação da COX temos, os já mencionados  $PGE_2$ ,  $PGD_2$ ,  $PGI_2$  e  $TXA_2$  (HAWKEY, 2001; PETHO e REEH, 2012; DENNIS e NORRIS, 2015).

Esse mecanismo de ação foi exposto primeiramente em 1971 pelo pesquisador John R. Vane (VANE, 1971). Os AINEs podem ser classificados como

não seletivos, quando inibem tanto a COX-1 quanto a COX-2, ou seletivos quando inibem seletivamente a COX-2, induzida durante o processo inflamatório (RAO e KNAUS, 2008; RAYAR et al., 2017). Um dos maiores problemas do uso dos AINEs não seletivos é seu efeito no trato gastrointestinal uma vez que as prostaglandinas exercem uma função protetora sobre a mucosa gástrica diminuindo a secreção de ácido e aumentando a secreção de muco e bicarbonato. Alguns outros efeitos colaterais podem estar associados a estes medicamento como hipersensibilidade, alteração no tempo de coagulação e alteração na função renal entre outros (BACCHI et al., 2012; RONCHETTI et al., 2017).

Já os AINEs seletivos para COX-2 estão mais relacionados com problemas cardiovasculares. Para o tratamento da dor inflamatória, os AINEs ainda representam a classe mais prescrita mundialmente (CHAN et al., 2009; WALKER, 2018; JANG et al., 2020). (CHAN et al., 2009; BACCHI et al., 2012; RONCHETTI et al., 2017; WALKER, 2018; JANG et al., 2020). Os AINES apresentam propriedades antiinflamatórias, analgésicas e antipiréticas. São as drogas de primeira escolha no tratamento de doenças reumáticas e não-reumáticas como, artrite reumatóide, osteoartrite e artrite psoriática, assim como nas sequelas de traumas e contusões e ainda em condições de pós-operatório. É o principal tratamento para a dor leve e moderada devido as suas propriedades analgésicas prolongadas e diminuem a temperatura corporal elevada (ARANDA et al., 2017).

Outra classe de anti-inflamatórios utilizada são os anti-inflamatórios esteroidais (AIES), também chamados de glicocorticoides. As ações dos glicocorticóides são mediadas por interações com o receptor glicocorticóide (GR), um fator de transcrição que pertence à superfamília dos receptores nucleares (GULER-YUKSEL et al., 2018). Após a ligação do ligante, o complexo glicocorticoide-GR migra para o núcleo e se liga aos elementos de resposta ao GC (GRE) nas regiões promotoras dos genes alvo, levando à regulação positiva ou negativa da transcrição de centenas de genes (RAMAMOORTHY e CIDLOWSKI, 2016; WEIKUM et al., 2017). Dentre algumas ações anti-inflamatórias que eles apresentam estão a diminuição dos genes de uma serie dos mediadores pró inflamatórios como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , diminuição da ativação do NF $\kappa$ B e diminuição da atividade da fosfolipase A<sub>2</sub> (GRAD e PICARD, 2007; MURPHY et al., 2011; HUDSON et al., 2013; VANDEWALLE et al., 2018).

Entre os glicocorticoides mais usados em terapia estão a prednisolona, metilprednisolona, betametasona e dexametasona. Os GCs também apresentam um efeito imunossupressor. Na prática clínica os GCs são utilizados em várias situações, dentre elas: reposição hormonal, imunossupressão, terapia antialérgica e anti-inflamatória, além de tratamentos anticâncer (ADCOCK e MUMBY, 2017).

Eles apresentam uma ação inibitória no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e os vários efeitos metabólicos responsáveis pelos graves efeitos colaterais que ocorrem durante a terapia anti-inflamatória com GCs. (JUSZCZAK e STANKIEWICZ, 2018). Dentre esses efeitos colaterais podemos citar hipertensão, hiperglicemia, osteoporose, suscetibilidade a infecções, problemas oculares, problemas cardíacos, alteração do metabolismo geral, síndrome de Cushing, distúrbios de humor e do sono (HUSCHER et al., 2009; AYROLDI et al., 2014; ORAY et al., 2016).

Outra classe utilizada em processos inflamatórios com a finalidade analgésica é a dos opióides. Essa classe possui uma potente ação analgésica através de uma ação tanto central como periférica (AKBARI, 2012; STEIN, 2018; MATSUDA et al., 2019). Os opióides exercem seus potentes efeitos analgésicos através de receptores opióides acoplados à proteína G identificados com receptores opióides  $\mu$  (MOR),  $\delta$  (DOR),  $\kappa$  (KOP) e nociceptina (NOR). Embora possuam uma farmacologia complexa, frequentemente a principal atividade analgésica é atribuída a receptores MOR. E todos eles estão ligados a proteína G inibitória ( $G_i$ ), e portanto inibem a adenilato ciclase e diminuem as concentrações de cAMP intracelular levando a ações inibitórias nos neurônios como o fechamento de canais de  $Ca^{2+}$  dependentes de voltagem (impedindo a liberação de neurotransmissores) ou a abertura de canais de  $K^+$  (e conseqüente hiperpolarização do neurônio) (KIEFFER e EVANS, 2009; WILLIAMS et al., 2013; TOLL et al., 2016; CORDER et al., 2018). Apesar de serem importantes analgésicos eles podem produzir sedação, constipação, náusea, vômito, depressão respiratória, com tendência a produzir dependência e tolerância. Eles atuam pela ativação de mecanismos inibitórios descendentes ou inibindo as sinapses nociceptivas espinhais (BENYAMIN et al., 2008; CONVERTINO et al., 2015; NYGARD et al., 2016; BOHN e AUBE, 2017).

Além destas clássicas drogas, outras são utilizadas como anti-inflamatórias e analgésicas em patologias mais específicas. Por esta razão e por estarem fora do escopo deste trabalho não serão discutidas aqui.

Devido a patologias que não respondem de maneira adequada às drogas convencionais e também devido aos efeitos colaterais das drogas que já estão no mercado, há uma procura constante a novas drogas que possuam um efeito melhor e/ou com menos efeitos colaterais. Nesse sentido a busca por produtos naturais é uma área muito promissora e a pesquisa de atividades biológicas em espécies vegetais é um campo que está cada vez mais sendo estudado. Alguns dados mostram que no período de 1981 até 2014, de todos os fármacos aprovados pela Agência Reguladora dos Estados Unidos, “*Food and Drug Administration*” (FDA), 65% eram PNs ou derivados sintéticos/semisintéticos dos mesmos (NEWMAN e CRAGG, 2016).

## 1.5 PRODUTOS NATURAIS

Os produtos naturais (PNs) representam uma grande família de diversas moléculas químicas com uma ampla variedade de estruturas e atividades biológicas que encontraram múltiplos usos, principalmente na medicina humana e veterinária e na agricultura. Eles são originários de bactérias, fungos, animais marinhos e plantas (KATZ e BALTZ, 2016). Nos últimos 30 anos, a porcentagem de PNs ou derivados semi-sintéticos baseados em PNs aumentou aproximadamente 50% do total de novas moléculas. Em algumas áreas, como na pesquisa de moléculas com atividades antitumorais, esse aumento foi de 74% (GIDDINGS e NEWMAN, 2013; DEMAIN, 2014).

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa tem mostrado evidências de que plantas que não possuem indicação popular podem apresentar atividades similares a outras plantas do mesmo gênero já utilizadas popularmente. Ou ainda, podem apresentar alguma atividade biológica diferente da qual é indicada. Um exemplo disso é *Sinningia allagophylla*, uma planta pertencente à família Gesneriaceae. Esta planta é utilizada popularmente como antipirética e em seu extrato bruto foi encontrado o 8-metoxilapachenol (8ML) que apresentou uma importante atividade anti-inflamatória, reduzindo o edema de pata induzido por carragenina (Cg) e uma

potente atividade antinociceptiva em camundongos, atividades estas comumente relacionadas a atividade antipirética (BARBOSA et al., 2013). Os resultados obtidos com *S. allagophylla* nos levaram a estudar outras plantas deste gênero, dentre elas *S. aggregata*. Estudos realizados pelo nosso grupo demonstraram que *S. aggregata*, uma *Sinningia* que não possui nenhuma indicação popular, possui uma importante atividade antinociceptiva pelo menos em parte pela presença do composto, inédito na época, Agregatina D. O mecanismo de ação desse PN ainda não foi completamente elucidado, mas certamente difere dos analgésicos conhecidos (SOUZA et al., 2015).

Outra *Sinningia* estudada pelo nosso grupo, que também não apresenta nenhuma indicação popular foi *S. canescens*. Um composto isolado da mesma, identificado como 6-metoxi-7-hidroxi- $\alpha$ -duniona (MHD) apresentou um efeito anti-inflamatório, no modelo de edema de pata induzido CG, um efeito antinociceptivo, no modelo de hiperalgesia causada pela formalina e no modelo de nocicepção induzida pela CG, além de apresentar também um efeito antipirético, no modelo de febre induzida por LPS (LOMBA et al., 2017). Por fim, *Sinningia reitzii*, outra planta isenta de indicação popular, foi estudada pelo nosso grupo, sendo isolada a molécula, até então inédita na literatura, 8-hidroxideidrodunniona (8HDD). Esse PN, assim como o 8ML, apresentou uma atividade anti-inflamatória no modelo de edema de pata e uma atividade antinociceptiva no modelo de nocicepção, ambas induzidas pela CG (SOARES et al., 2017).

Com estas considerações em mente, passaremos a analisar a família Lamiaceae (anteriormente chamada de Labiatae), da qual pertence a espécie *Cantinoa stricta*, sendo esta a sexta maior família de plantas. Esta família possui mais de 250 gêneros e mais de 7200 espécies já catalogadas, de distribuição cosmopolita (BEKUT et al., 2018). No Brasil, a família está representada por 23 gêneros sendo que aproximadamente 230 espécies são nativas e as outras cultivadas. Na América do Sul essa família apresenta dois gêneros principais, que são *Salvia sp.* e *Hyptis sp.*, sendo que nessa família a maioria das espécies são arbustos e ervas (KHOURY et al., 2016).

A maioria das espécies dessa família são plantas aromáticas, que produzem óleos essenciais, e por esse motivo apresentam uma importância econômica muito grande sendo empregados tanto na culinária como na perfumaria. Dentre algumas

espécies, popularmente conhecidas no Brasil, podemos citar a hortelã, orégano, tomilho, manjerição, sálvia, alecrim, alfazema, erva-cidreira entre outras (BEKUT et al., 2018). Essas plantas apresentam, além dos óleos essenciais, diterpenos, triterpenos, compostos fenólicos e flavonoides além de outros segundos metabólitos (KASSUYA C. et al., 2009). Essas substâncias são responsáveis por algumas das atividades já citadas na literatura para estas plantas como a atividade antioxidante, antitumoral, quimiopreventiva, cardioprotetora, anti-inflamatória, analgésica, antidepressiva, ansiolítica, antimicrobiana, entre outras (ABU-DARWISH et al., 2013; URITU et al., 2018).

Com relação à algumas espécies e suas atividades biológicas do gênero *Thymus*, o extrato de tomilho (*Thymus vulgaris*) demonstrou atividades quimiopreventivas e terapêuticas significativas contra o células tumorais de mama (KUBATKA et al., 2019) e o óleo apresentou importante atividade antimicrobiana contra alguns patógenos causadores de infecções orais (FANI e KOHANTEB, 2017). Já no gênero *Mentha*, a hortelã (*Mentha spicata*), por exemplo, apresenta atividades antioxidantes, antimicrobiana (BARDAWEEL et al., 2018) e analgésica entre outras (MAHBOUBI, 2017). O gênero *Melissa* tem como principal representante a erva cidreira (*Melissa officinalis*). A erva cidreira apresenta ação sedativa, hipnótica (CASES et al., 2011) antioxidante (CAPECKA et al., 2005), antiviral (ASTANI et al., 2012), anti-inflamatória, entre outras (BOUNIHI et al., 2013).

O gênero *Salvia*, o maior dessa família, apresenta uma série de espécies que são utilizadas na medicina popular. Dentre as espécies, a planta conhecida como sálvia (*Salvia officinalis*) é uma das principais. As espécies desse gênero apresentam atividades como anti-inflamatórias (ONIGA et al., 2007), antioxidantes (SULNIUTE et al., 2016), antidepressivas, ansiolítica (HERRERA-RUIZ et al., 2006), neurotróficas (LOPRESTI, 2017), efeitos cardioprotetores, entre outros (XU et al., 2018). Por essa ampla variedade de atividades farmacológicas a família *Lamiaceae* ocupa o terceiro lugar em ordem de importância dentre as famílias de plantas mais estudadas (BEKUT et al., 2018; URITU et al., 2018).

*Cantinoa stricta* (Figura 06), outra espécie pertencente a esta família, assim como outras já citadas não apresenta indicações populares. Até pouco tempo atrás ela era chamada de *Hyptis stricta*. O recém-criado gênero *Cantinoa* (Harley & J.F.B. Pastore) era conhecido, por análise molecular, como um gênero irmão de *Hyptis* e

inclui 23 espécies que ocorrem no Brasil (HARLEY e PASTORE, 2012). Esse gênero é representado por ervas, subarbustos ou arbustos e as folhas são frequentemente aromáticas e mesomórficas, características gerais presentes nessa família (DE ALMEIDA et al., 2020). Existem poucos trabalhos na literatura que reportam alguma atividade biológica de espécies desse gênero. O óleo essencial de *Cantinoa americana* (Aubl.) (Harley & J.F.B. Pastore), que até pouco tempo atrás era conhecida como *Hyptis spicigera* (Lam.), apresentou uma ação inseticida e repelente contra o caruncho de trigo (*Sitophilus granarius*) (CONTI et al., 2010). Já o óleo de *Cantinoa stricta* apresentou atividade antiproliferativa contra linhagens tumorais de células da mama, glioma, pulmão, melanoma e próstata (SCHARF et al., 2015).

Porém, não existem dados na literatura científica que apontem alguma atividade anti-inflamatória ou analgésica dessa planta. Mesmo assim, é possível que *Cantinoa stricta* possua tais efeitos farmacológicos, visto que outras espécies da mesma família apresentam semelhantes efeitos.



FIGURA 06 – FOTOS DE *Cantinoa stricta*. Essas fotos mostram as folhas e flores da planta in natura e também uma exsicata da mesma. FONTE: REFLORA. Disponível em: <[www.floradobrasil.jbrj.gov.br](http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br)>. Acesso em 15/01/2020)

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

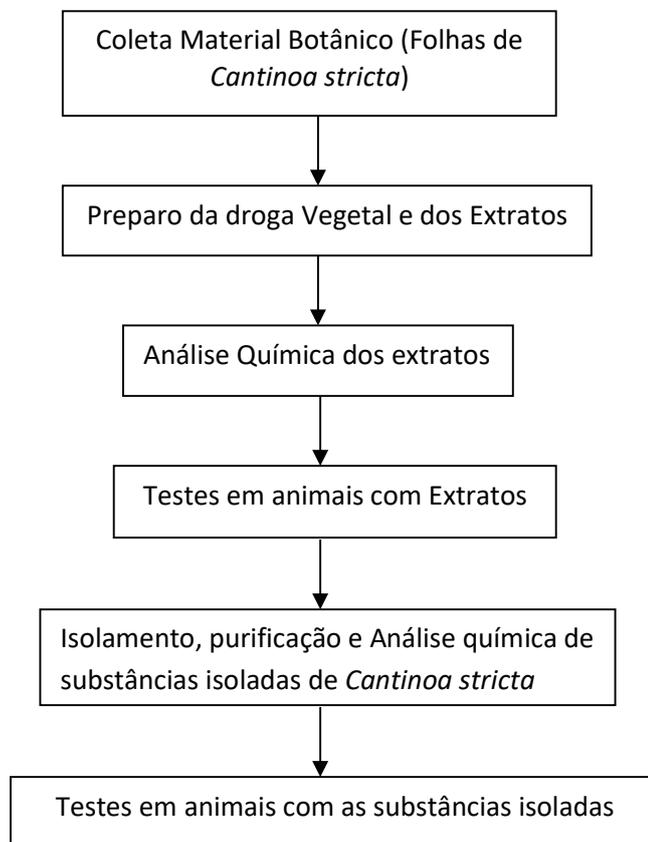
Avaliar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato etanólico total (EEt) e em diclorometano (DCM) das folhas obtidas da *Cantinoa stricta*. Adicionalmente, objetivamos identificar e isolar substâncias presentes no extrato com estas atividades e investigar os possíveis mecanismos de ação destes compostos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar e avaliar características químicas do EEt e DCM de *C. stricta*.
- Avaliar o efeito antinociceptivo (em diferentes modelos de nocicepção e hiperalgesia) e anti-inflamatório (anti-edematogêncio) do EEt e DCM de *C. stricta* e de outros extratos de interesse determinados pela análise química.
- Identificar e purificar substâncias presentes nestes extratos com interesse farmacológico, especificamente, com atividade antinociceptiva e anti-inflamatória.
- Comparar o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório sistêmico e local das substâncias identificadas.
- Investigar o possível mecanismo de ação antinociceptiva destas substâncias isoladas através de testes *in vivo* no modelo de hiperalgesia mecânica induzida por diferentes estímulos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 FLUXOGRAMA DO TRABALHO



#### 3.2 MATERIAL BOTÂNICO

Folhas de *Cantinoa stricta* foram coletadas em Curitiba, PR (25°30'44.6" S; 49°18.7'13") em março/2011. A Planta foi identificada pela Dra. Élide Pereira dos Santos, que depositou uma exsicata (EP Santos 1255) no herbário da Universidade Federal do Paraná (UPCB). O acesso ao patrimônio genético brasileiro foi registrado no Sisgen sob o número ACF4109.

#### 3.3 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

As folhas foram secas em estufa a 40°C. Após a secagem, o material foi triturado em moinho de facas. O material seco e triturado (102 g) foi deixado em contato com etanol (EtOH, 99%, 1,0 L), a temperatura ambiente, por 24 h. Após

esse tempo, a mistura foi filtrada, a solução separada, e uma nova porção de solvente foi adicionada ao resíduo vegetal. Após 24 h, foi feita nova filtração e o solvente foi renovado. Esse procedimento foi repetido mais uma vez (total de três extrações). As soluções obtidas foram reunidas e o solvente eliminado em evaporador rotativo, a baixa pressão, rendendo o extrato etanólico total (EEt, 7,18 g).

Outra porção de material vegetal seco (383,9 g) foi submetida a extração do mesmo modo descrito acima, mas usando como solvente o éter de petróleo (EP, 3,8 L). Após três extrações com EP, o solvente foi mudado para diclorometano (DCM, 3,8 L, três extrações sucessivas) e, finalmente para EtOH (3,8 L, três extrações sucessivas). Após a evaporação dos solventes foram obtidos três extratos: em EP (6,2 g), em DCM (13,0 g) e em EtOH (6,1 g).

#### 3.4 ISOLAMENTO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Parte do extrato em DCM (10,0 g) foi submetido à cromatografia líquida sob vácuo, usando gel de sílica (50 g), e uma eluição em gradiente de polaridade, com os seguintes eluentes: hexano:acetona 98:2; 9:1; 8:2; 1:1 e acetona pura (300 mL cada eluente). Todas as misturas foram v/v. Foram obtidas sete frações: CSD1 (0,309 g), CSD2 (0,102 g), CSD3 (0,675 g), CSD4 (0,607 g), CSD5 (2,69 g), CSD6 (3,94 g) e CSD7 (1,69 g).

A fração CSD7 foi submetida à uma cromatografia em coluna aberta de gel de sílica (CC), eluída em gradiente, com os seguintes solventes: hexano:acetona 7:3; 1:1, acetona pura, e MeOH puro. Foram recolhidas 51 subfrações de 30 mL. Após a análise por CCDA, essas subfrações foram agrupadas, com base na similaridade cromatográfica em 10 subfrações (CSD7<sub>1-10</sub>). Uma alíquota (28,4 mg) da subfração CSD7<sub>2</sub> (114 mg) foi purificada por CCDP (hexano:acetona 3:2), rendendo a substância **2** impura (21,0 mg). Após recristalização em diclorometano, foram obtidos 5,1 mg da substância **2**.

Uma alíquota (58,1 mg) da subfração CSD7<sub>3</sub> (560,8 mg) foi purificada por CCDP (DCM:MeOH 99:1), fornecendo a substância **1** (52,1 mg) ligeiramente impura. Após recristalização em DCM foram obtidos 25,1 mg da substância **1** pura.

### 3.5 PROCEDIMENTOS QUÍMICOS GERAIS

As medidas de rotação específica foram realizadas em um polarímetro JASCO P-2000 (Departamento de Química da UFPR), com lâmpada de sódio (589 nm) e clorofórmio como solvente, a temperatura ambiente.

As separações cromatográficas em coluna aberta (CC) e sob vácuo (CLV) foram realizadas usando-se gel de sílica 60 para coluna (Macherey-Nagel). As análises por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) foram realizadas em placas comerciais (Macherey-Nagel), recobertas com gel de sílica na espessura de 0,25 mm, e contendo um indicador de fluorescência (254 nm). As separações por cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) foram realizadas em placas preparadas manualmente em placas de vidro 20 x 20 cm, uma espessura de 1,00 mm de gel de sílica com indicador de fluorescência (60PF<sub>254</sub>, Macherey-Nagel). As placas foram reveladas com luz UV (254 e 366 nm). As placas analíticas foram reveladas também com solução etanólica de ácido sulfúrico (5%, v/v). As frações obtidas foram agrupadas por similaridade após análise por CCDA. As frações foram selecionadas para purificação considerando o seu perfil cromatográfico em CCDA e o seu espectro de RMN de <sup>1</sup>H. A amostra foi considerada pura quando apresentou uma única mancha ao ser analisada por CCDA em três eluentes diferentes. Os solventes usados na extração e nas separações cromatográficas foram produtos analíticos das marcas Synth ou Vetec.

Espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) unidimensionais (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C (<sup>1</sup>H)) e bidimensionais (HSQC, HMBC) foram obtidos em espectrômetros DPX-200 e/ou Avance 600 (Bruker), do Centro de RMN da UFPR. Os equipamentos foram operados a 4,7, e 14,1 Tesla, respectivamente, e os núcleos foram observados a 200 e 600 MHz para <sup>1</sup>H e 50 e 150 MHz para <sup>13</sup>C. Os experimentos foram conduzidos em solventes deutерados (clorofórmio ou metanol), usando-se tetrametilsilano (TMS) como referência interna. Os deslocamentos químicos foram medidos em ppm ( $\delta$ ), sendo o sinal do TMS considerado como zero. Os dados obtidos foram analisados no software TopSpin e comparados com aqueles publicados na literatura.

Dados de difratometria de Raios X foram obtidos em um difratômetro automático de Raios X para monocristais modelo Bruker D8 Ventura, equipado com

um detector Photon 100 CMOS, e uma fonte de radiação Cu-Ka, e um monocromador Göbbel. Os quadros de imagens foram integrados utilizando o programa Bruker SAINT. A correção da absorção foi realizada utilizando o software SADABS e a estrutura foi resolvida e refinada utilizando o software Bruker SHELXTL. A coleta de dados foi realizada no Laboratório de Difractometria de Raios X de Monocristal, no Departamento de Química, UFPR.

### 3.6 SELEÇÃO DE MATERIAL PARA OS TESTES FARMACOLÓGICOS

Considerando os procedimentos descritos acima e de acordo com os resultados obtidos na análise de RMN dos extratos durante a execução deste procedimento foram selecionados para os testes farmacológicos o EEt, o extrato DCM e as substâncias puras **1** e **2**.

### 3.7 ANIMAIS UTILIZADOS

Para a avaliação da atividade farmacológica foram utilizados camundongos *Mus musculus*, variedade *Swiss* machos e fêmeas (OBS: as fêmeas foram utilizadas em um único experimento), com idade em torno de 60 dias (25-35 g), originários do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Os animais foram alojados sob condições padrões com ciclo claro/escuro de 12 h (luzes acesas às 07:00 h), temperatura ambiente de  $22 \pm 2$  °C, umidade controlada (60-80%), com ração padrão para roedores e água potável *ad libitum*. Os animais foram mantidos em salas de aclimação do Laboratório de Inflamação e Febre do Departamento de Farmacologia da UFPR por 3-5 dias antes de qualquer procedimento. Um dia antes do experimento os animais foram transferidos para a sala de experimentação para adaptação. Ao final dos experimentos os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. Todos os protocolos da experimentação animal foram aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas (CEUA/BIO) da UFPR sob o número 937 e foram conduzidos de acordo com as Diretrizes Brasileiras para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins científicos e didáticos – DBCA.

### 3.8 MODELOS EXPERIMENTAIS PARA OS TESTES FARMACOLÓGICOS

Para avaliação da atividade farmacológica foram utilizados modelos experimentais bastante conhecidos que serão descritos brevemente a seguir de maneira genérica. Posteriormente, descreveremos os protocolos experimentais identificando quando e em que condições experimentais cada um dos modelos foi utilizado.

Para avaliação da atividade antinociceptiva foram utilizados os modelos de nocicepção induzida por formalina, placa aquecida e hiperalgesia mecânica. Para avaliação da atividade anti-inflamatória foi utilizado o modelo de edema de pata induzido por carragenina. Para avaliação de possíveis comprometimentos motores que pudessem interferir principalmente nos testes comportamentais relacionados a nocicepção foi avaliado o desempenho motor dos animais no teste de Rota-Rod.

#### 3.8.1 NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA

A nocicepção induzida por formalina foi adaptada do método descrito por (HUNSKAAR e HOLE, 1987). No dia do experimento, os animais foram colocados individualmente sob funil de vidro invertido cercado por espelhos para facilitar a observação do comportamento nociceptivo e permaneceram neste ambiente por pelo menos 10 min para ambientação. Em seguida, os animais receberam os tratamentos específicos com os extratos seguidos de uma injeção intraplantar (i.pl.) de solução de formalina 2,5 % v/v (0,92 % de formaldeído em salina) ou veículo (salina) na pata posterior direita. Os animais foram recolocados sob o funil de vidro para avaliação do comportamento nociceptivo. Foi considerado como comportamento nociceptivo a elevação, lambedura ou mordedura da pata que recebeu formalina. O tempo em s em que o animal permaneceu executando estes comportamentos dentro de blocos de tempo de 5 min foi avaliado até completar 40 min. Este teste pode ser dividido em Fase I e Fase II. A fase I é caracterizada pela fase neurogênica (estímulo direto da formalina sobre o nociceptor) e acontece nos primeiros 5 min. Após este período, observa-se um período quiescente que é seguido pela Fase II, também é chamada de fase inflamatória, e que acontece no

intervalo de tempo de 15-40 minutos após a administração de formalina. Os resultados foram expressos como o tempo total (em s) que o animal executou o comportamento nociceptivo em cada fase.

### 3.8.2 TESTE DA PLACA AQUECIDA

Para avaliar o efeito dos extratos e substâncias isoladas sobre a nocicepção térmica aguda foi utilizado o teste da placa aquecida de acordo com o método descrito anteriormente (EDDY e LEIMBACH, 1953). Neste teste, o aparelho de placa aquecida (Bonther, Ribeirão Preto – SP) teve a temperatura da placa ajustada para a temperatura de  $54 \pm 1^\circ\text{C}$ . Esse aparelho conta com um anteparo retangular de acrílico que é utilizado para impedir que o animal escape da placa bem como para facilitar a visualização do comportamento nociceptivo. Antes de qualquer tratamento, os animais foram colocados sobre a superfície aquecida e foi avaliado o tempo (em s) necessário (tempo de latência) para que o animal apresentasse algum dos comportamentos nociceptivos que incluíam balançar ou lambe as patas traseiras bem como a tentativa de subir no anteparo. Os animais que apresentaram essa latência basal superior a 15 s foram excluídos do estudo. Em seguida, os animais receberam os tratamentos com os extratos ou substâncias isoladas de acordo com o protocolo experimental apropriado e submetidos novamente à superfície aquecida. O tempo de latência após o tratamento (latência pós-droga) foi então avaliado 1, 3 e 5 h após o tratamento. Neste teste foi utilizado como tempo de corte 30 s a fim de evitar dano tecidual às patas dos animais. Os resultados foram expressos como porcentagem do máximo de efeito possível (% MEP), calculados de acordo com a seguinte equação:

$$\%MEP = (\text{latência pós droga} - \text{latência basal} / \text{tempo de corte} - \text{latência basal}) \times 100$$

### 3.8.3 HIPERALGESIA MECÂNICA

O modelo de hiperalgesia mecânica também foi utilizado para testar a atividade antinociceptiva e foi executado conforme descrito por (CUNHA et al., 2004). A hiperalgesia mecânica foi avaliada utilizando-se o analgesímetro digital (Insight, Ribeirão Preto, SP). Os animais foram colocados individualmente em uma

caixa de acrílico (9,5 cm x 6 cm x 10 cm de altura) sobre uma plataforma com assoalho feito de tela de arame por 60 min para a habituação. O assoalho da malha permite que a ponta do analgesímetro estimule a região plantar média da pata posterior do animal, utilizando uma ponta descartável de polipropileno (0,5 mm de diâmetro). Esta ponteira é conectada a um transdutor de força e *display* digital que permite a determinação da massa (em g) aplicada. Uma massa crescente foi aplicada à pata do animal, até a ocorrência de resposta de retirada. O limiar mecânico foi calculado como o valor médio de três respostas de retirada semelhantes, com um máximo de 5 estímulos intervalados por 15 s. Os animais que apresentaram limiar basal entre 4,0 e 7,0 g foram selecionados para o experimento. Em seguida os animais foram tratados com os extratos ou substâncias isoladas seguida pela administração do estímulo algogênico. Como este teste também foi utilizado para avaliação de modo de ação das substâncias isoladas, os estímulos algogênicos variaram e serão descritos em detalhes nos protocolos experimentais. O limiar mecânico foi então avaliado novamente 1, 3 e 5 h após a administração do estímulo algogênico. A hiperalgesia mecânica caracteriza-se pela redução do limiar mecânico após a administração do estímulo algogênico comparativamente ao limiar basal. Ainda, para evidenciar alguns efeitos foi calculada a intensidade de hiperalgesia. Para tanto, foi determinada a diferença entre o limiar mecânico nos diferentes tempos após a administração do estímulo e o limiar basal o que gerou uma curva da variação do limiar mecânico. A intensidade de hiperalgesia foi então calculada através da obtenção da área sob a curva em unidades arbitrárias (U.A.).

#### 3.8.4 EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA

O edema de pata induzido por carragenina foi executado conforme descrito por (KASSUYA C. A. et al., 2009). De maneira sucinta, a espessura das patas direita e/ou esquerda foi medida com o auxílio de um micrômetro digital antes de qualquer manipulação (basal). Em seguida, os animais receberam os tratamentos com extratos, substâncias isoladas ou os respectivos veículos. Em seguida, os animais receberam uma injeção i.pl. de carragenina (Cg, 300 µg/pata) na pata direita ou somente o veículo. A espessura da pata foi novamente avaliada 1, 3 e 5 h após a

injeção de Cg. A diferença entre as espessuras da pata antes e após a aplicação de Cg foi quantificada em  $\mu\text{m}$  e tomada índice de edema.

### 3.8.5 DESEMPENHO MOTOR

Esse teste foi realizado de acordo com o método descrito por (DUNHAM e MIYA, 1957). O desempenho motor do animal foi avaliado no aparelho *rota-rod* (Ugo Basille, Itália). Antes de qualquer manipulação os animais foram treinados no aparelho um dia antes da realização do teste. Para isso, os animais foram colocados em uma barra giratória, em uma velocidade de 22 rpm por 3 min. Durante a seção de treino, caso os animais caíssem da barra giratória antes da finalização deste tempo, eles foram recolocados sob a barra giratória. No dia do experimento, os animais receberam as maiores doses utilizadas dos extratos e substâncias isoladas e então submetidos novamente a barra giratória em tempos específicos após o tratamento (protocolos experimentais). O tempo de permanência na mesma foi cronometrado, respeitando o mesmo tempo de corte utilizado para o treino. O tempo em s foi expresso como índice de desempenho motor.

## 3.9 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Em todos os protocolos experimentais descritos abaixo, o volume de injeção por via oral (v.o.) ou subcutânea (s.c.) foi sempre de 10 ml/kg enquanto o volume de injeção intraplantar (i.pl.) foi sempre de 20  $\mu\text{L}$  por pata.

### 3.9.1 ESCOLHA DAS DOSES UTILIZADAS

Iniciamos os testes de nocicepção induzido por formalina com o tratamento do EEt na dose de 100mg/kg, pois essa dose é considerada uma dose de partida para testes em animais. E em virtude dos resultados obtidos nessa dose, foram utilizadas mais duas doses abaixo dela (30 e 10 mg/kg). Como o rendimento do extrato em DCM foi de 50%, a dose utilizada foi de 50mg/kg (tendo como ponto de partida a maior dose utilizada no experimento da formalina). Esse mesmo raciocínio de aplicou para o experimento de edema da pata induzida por Cg.

Como o foco do nosso trabalho seria estudar mais a fundo a hiperalgesia mecânica queríamos uma curva dose resposta no tratamento com o EEt. Para isso na hiperalgesia mecânica induzida por LPS foi utilizada doses menores (30-10mg/kg) e a dose de 15mg/kg do extrato em DCM, também levando em conta o rendimento. Após a separação e purificação das substâncias 1 e 2, como também é normal o rendimento da substância majoritária ser em torno de 1% em relação ao extrato total, iniciamos o tratamento com as moléculas na dose de 1mg/kg e depois adaptamos para uma curva dose resposta na hiperalgesia mecânica induzida por LPS. Após essas doses administradas pela v.o fizemos um tratamento local (i.pl.) e para isso partimos de uma dose 1000 vezes menor (tendo como parâmetro a maior dose das substâncias utilizadas na hiperalgesia mecânica induzida por LPS) das substâncias e depois adaptamos para obter uma curva dose resposta.

### 3.9.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO EEt E DO DCM

Inicialmente, avaliou-se a atividade antinociceptiva do EEt e do DCM no modelo de nocicepção induzida por formalina. Para tanto, os animais foram tratados por v.o. com diferentes doses de EEt (10, 30 ou 100 mg/kg), extrato DCM (50 mg/kg), veículo (Tween 80 0,1% em solução salina 0,9%, v/v) ou Indometacina (INDO, 5 mg/kg) utilizada como controle positivo. Uma hora após os tratamentos, os animais receberam a formalina na pata direita e o comportamento nociceptivo foi avaliado conforme descrito anteriormente.

A atividade antinociceptiva do EEt e do DCM também foi avaliada no modelo de hiperalgesia mecânica induzida por LPS. Para tanto, os animais foram tratados por v.o. com EEt (10, 18 ou 30 mg/kg), DCM (15 mg/kg) ou veículo (Tween 80 0,1% em solução salina 0,9%, v/v) ou Indometacina (5 mg/kg) utilizada como controle positivo. Uma hora após os tratamentos, os animais receberam LPS (100 ng, i.pl.) na pata direita e o comportamento nociceptivo foi avaliado conforme descrito anteriormente.

Adicionalmente, a atividade antinociceptiva do EEt e do DCM foi avaliada no modelo de placa aquecida. Os animais foram tratados por v.o. com EEt (100 mg/kg), DCM (50 mg/kg) ou por via s.c. com o agonista opióide fentanil (100 µg/kg)

utilizado como controle positivo. Uma, três e cinco horas após o tratamento por v.o. ou 15 min após o tratamento s.c., os animais foram colocados novamente sobre a superfície aquecida e o tempo até o aparecimento do comportamento nociceptivo foi avaliado.

Como teste complementar a avaliação da atividade antinociceptiva dos extratos foi avaliado o efeito dos extratos sobre o desempenho motor dos animais. Os animais foram tratados por v.o. com EEt (100 mg/kg), DCM (50 mg/kg) ou por via s.c. com diazepam (5 mg/kg), esse utilizado como controle positivo. Essas doses dos extratos foram as maiores utilizadas nos experimentos anteriores. Uma, três e cinco horas após o tratamento v.o. ou 15 min após o tratamento s.c. os animais foram colocados sob a barra giratória e o tempo de permanência destes no aparelho foi avaliado.

Para a avaliação da atividade anti-inflamatória do EEt e do DCM utilizou-se o modelo de edema de pata induzido por carragenina. Após a avaliação da espessura basal das patas os animais foram tratados por v.o. com EEt (10, 30 ou 100 mg/kg), extrato DCM (50 mg/kg) ou veículo (Tween 80 0,1% em solução salina 0,9%, v/v) ou dexametasona (1 mg/kg) utilizada como controle positivo. Uma hora após os tratamentos, os animais receberam a carragenina por via i.pl. na pata direita e o edema foi avaliado conforme descrito acima.

### 3.9.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

Para avaliação da atividade antinociceptiva das substâncias isoladas **1** e **2** foi utilizado o teste de hiperalgisia mecânica e as substâncias foram avaliadas após administração sistêmica (v.o.) ou local (i.pl.). Assim, após a avaliação do limiar basal dos animais, estes foram tratados com diferentes doses da substância **1** (1, 1,8 e 3 mg/kg, v.o. ou 30, 90 e 300 ng/pata, i.pl.), ou da substância **2** (1, 3 e 10 mg/kg, v.o. ou 100, 300 e 1000 ng/pata, i.pl.) ou como o veículo (Tween 80 0,1 % em salina v/v, v.o. ou i.pl.). As doses das substâncias isoladas foram baseadas no rendimento obtido durante a purificação das mesmas. Indometacina (5 mg/kg, v.o. ou 150 ng/pata, i.pl.) ou dipirona (320 µg/pata, i.pl.) foram utilizadas como controles positivos. Uma hora após o tratamento por v.o. ou 15 min após o tratamento i.pl., os

animais receberam uma injeção i.pl. de LPS (100 ng/pata) ou veículo (salina). O limiar mecânico dos animais foi avaliado novamente, como descrito acima, 1, 3 e 5 h após a injeção do LPS.

Em um experimento subsequente, a fim de confirmar que o efeito das substâncias **1** e **2** administradas por via i.pl. não estava promovendo um efeito sistêmico, grupos distintos de camundongos receberam na pata ipsilateral (pata posterior direita) ou na pata contralateral (pata posterior esquerda) as maiores doses de substâncias **1** e **2**. Quinze minutos após esse tratamento, os animais receberam LPS (100 ng/pata) sempre na pata ipsilateral (pata direita). O limiar mecânico foi avaliado na pata direita 1, 3 e 5 h após a administração de LPS como descrito anteriormente.

Em seguida foi avaliada a atividade antinociceptiva das substâncias isoladas no modelo de nocicepção térmica aguda. Para tanto, os animais foram tratados com as maiores doses de substância **1** ou **2** por v.o. ou com fentanil (100 µg/kg, s.c.), esse utilizado como controle positivo. Uma hora após o tratamento com as substâncias isoladas ou 15 min após o tratamento com fentanil, os animais foram colocados novamente sobre a superfície aquecida e o tempo até o aparecimento dos comportamentos nociceptivos descritos foi avaliado.

Como teste complementar a estas avaliações da atividades antinociceptivas das substâncias isoladas foi ainda avaliado o desempenho motor dos animais após o tratamento com as substâncias. Para tanto, os animais foram tratados com as maiores doses de substância **1** ou **2** por v.o. ou Diazepam (5 mg/kg, s.c.), esse utilizado como controle positivo. Uma, três e cinco horas após o tratamento v.o. ou 15 min após o tratamento s.c., os animais foram colocados sob a barra giratória e o tempo de permanência destes no aparelho foi avaliado.

Para a avaliação da atividade anti-inflamatória das substâncias isoladas **1** e **2** utilizou-se o modelo de edema de pata induzido por carragenina. Após a avaliação da espessura basal das patas. os animais receberam por via i.pl. as maiores doses de substância **1** ou **2**, veículo (Tween 80 0,1 % em salina v/v) ou dexametasona (30 ng/pata) usada como controle positivo. Quinze minutos após os tratamentos, os animais receberam a carragenina na pata direita e o edema foi avaliado conforme descrito acima.

### 3.9.4 AVALIAÇÃO DO POSSÍVEL MECANISMO DE AÇÃO PERIFÉRICO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

Para o estudo do(s) possível(is) mecanismo(s) envolvido(s) no efeito antinociceptivo das substâncias **1** e **2** foi utilizado o teste de hiperalgesia mecânica. Nesta fase do estudo, diferentes agentes algogênicos foram utilizados para indução de hiperalgesia. Para tanto, o limiar basal dos animais foi determinado e, em seguida, os animais foram tratados com as maiores doses locais (i.pl.) efetivas das substâncias **1** e **2** na hiperalgesia mecânica induzida por LPS. Após 15 min, os animais receberam por via i.pl. os agentes algogênicos TNF- $\alpha$  (1 pg/pata), IL-1 $\beta$  (100 pg/pata), PGE<sub>2</sub> (100 ng/pata), dopamina (3  $\mu$ g/pata), epinefrina (100 ng/pata), forskolina (1  $\mu$ g/pata), dibutilil adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (dbAMPc, 5  $\mu$ g/pata) ou 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA, 50 pmol/pata) ou veículo (salina). As doses dos agentes algogênicos para indução de hiperalgesia foram baseadas em estudos anteriores (KHASAR, LIN, et al., 1999; CASTARDO et al., 2008; CUNHA et al., 2008). O limiar mecânico dos animais foi avaliado novamente 1, 3 e 5 h após a administração do agente algogênico.

Estudos anteriores têm demonstrado que a hiperalgesia induzida por EPN possui mecanismos distintos em machos e fêmeas. Considerando estes estudos e com a finalidade de esclarecer ainda mais o mecanismo de ação destas substâncias, ambas as substâncias foram testadas na hiperalgesia mecânica induzida por EPN em machos e fêmeas. Para isto, o limiar basal de camundongos machos e fêmeas foi determinado e, em seguida, os animais foram tratados com as maiores doses locais (i.pl.) efetivas das substâncias **1** e **2**. Após 15 min, a hiperalgesia mecânica foi induzida via i.pl. por EPN (100 ng/pata). O limiar mecânico dos animais foi avaliado novamente 1, 3 e 5 h após a administração do agente algogênico.

### 3.10 DROGAS E REAGENTES

Lipopolissacarídeo de *E. coli* (0111:B4), carragenina (Fração V), indometacina, fentanil, diazepam, PGE<sub>2</sub>, cloridrato de dopamina, epinefrina, forskolina, dbAMPc e TPA foram adquiridos da Sigma Chemical Co., E.U.A. IL-1 $\beta$  e

TNF- $\alpha$  foram adquiridos da R & D Systems, E.U.A. Todos os outros reagentes foram adquiridos de companhias brasileiras com comprovada certificação de qualidade e possuíam grau analítico.

### 3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) do tempo executando o comportamento nociceptivo frente a formalina (s), limiar mecânico (g), intensidade de hiperalgesia (U.A.), variação da espessura da pata ( $\mu$ M), % MEP, desempenho motor (s). Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) de duas vias de medidas repetidas quando apresentados em escala temporal (efeito x tempo x tratamento) ou de uma via quando não houve a variável tempo (efeito x tratamento). Todas essas análises foram seguidas do teste de Bonferroni para comparações múltiplas. Valores de  $p$  menores do que 0,05 ( $p < 0,05$ ) foram considerados como indicativos de diferença significativa. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa *GraphPad Prism*, versão 6 (San Diego, CA, E.U.A.).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fim de tornar a apresentação dos resultados do estudo mais clara e, considerando que os resultados de identificação e purificação das substâncias ativas no EEt foi desenvolvida paralelamente aos resultados obtidos com os testes farmacológicos, optamos por apresentar os resultados e discussão em um único capítulo.

### 4.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS EEt E DCM

O rendimento do EEt foi de 7,04% em relação ao material vegetal seco. Os extratos em EP, DCM e EtOH renderam, respectivamente, 1,61%, 3,37% e 1,58% em relação ao material vegetal seco. Considerando a soma dos três extratos, o extrato em DCM representou 51,1% da massa total obtida a partir do segundo material.

O extrato etanólico total foi analisado por RMN de  $^1\text{H}$ . O seu espectro (Figura 07) mostrou sinais que podem ser atribuídos a presença de grupos metila ( $\delta_{\text{H}}$  1,20), grupos acetato ( $\delta_{\text{H}}$  2,04, 2,09 e 2,15), grupos oximetínicos ( $\delta_{\text{H}}$  4,9-5,19) e hidrogênios de ligações duplas e/ou de anéis aromáticos ( $\delta_{\text{H}}$  5,84-7,12). Ampliando-se a região entre  $\delta_{\text{H}}$  5,5-7,5 (Figura 08), observa-se dois sinais semelhantes em  $\delta_{\text{H}}$  6,96 e 7,12, com área relativa de 1:3,7, sugerindo duas substâncias semelhantes, mas em proporções diferentes no extrato.

Para isolar os constituintes, novos extratos foram preparados em EP, DCM e EtOH, sucessivamente. Estes extratos foram analisados por RMN de  $^1\text{H}$  e os seus espectros comparados com o espectro do EEt. Pode-se observar (Figuras 09 e 10) que as substâncias insaturadas ficaram concentradas no extrato em DCM. Assim, tanto o EEt quanto o DCM foram testados para as atividades antinociceptivas e anti-inflamatórias iniciais. O extrato em hexano apresenta sinais de esteróides e substâncias alifáticas de cadeia longa, enquanto o extrato em EtOH apresenta sinais de substâncias alifáticas de cadeia longa.

A análise e interpretação dos espectros de RMN foram conduzidas pela Profa. Dra. Maria Élide Alves Stefanello.

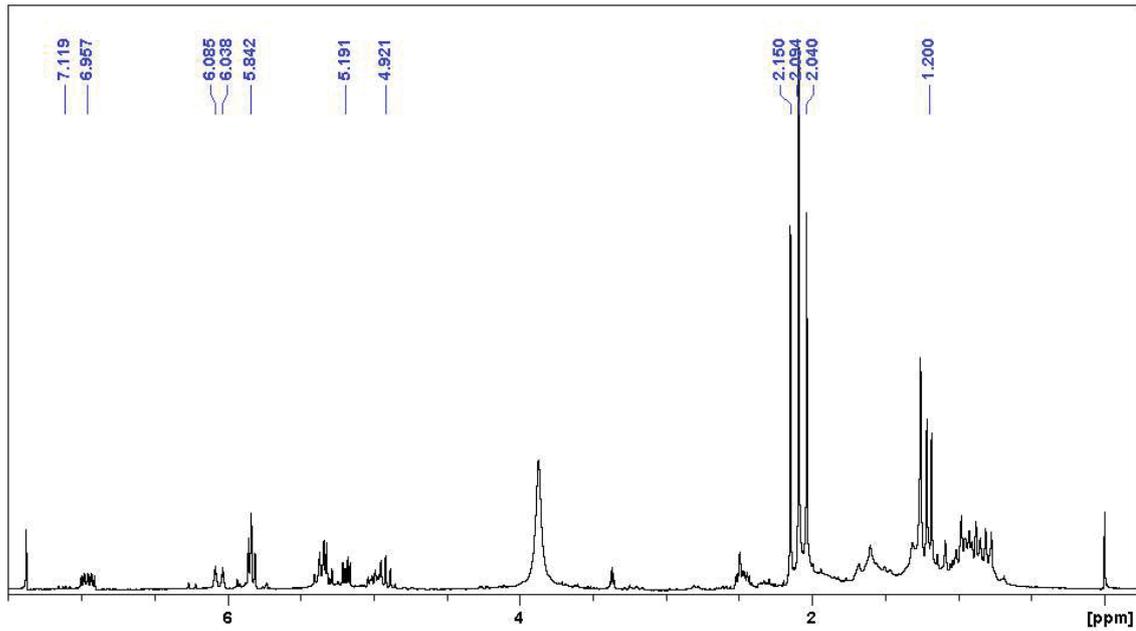


FIGURA 07: ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DO EEt DAS FOLHAS DE *C. stricta* (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$  +  $\text{MeOH-D}_4$ ). O sinal largo próximo de  $\delta_{\text{H}}$  4,0 é de água.

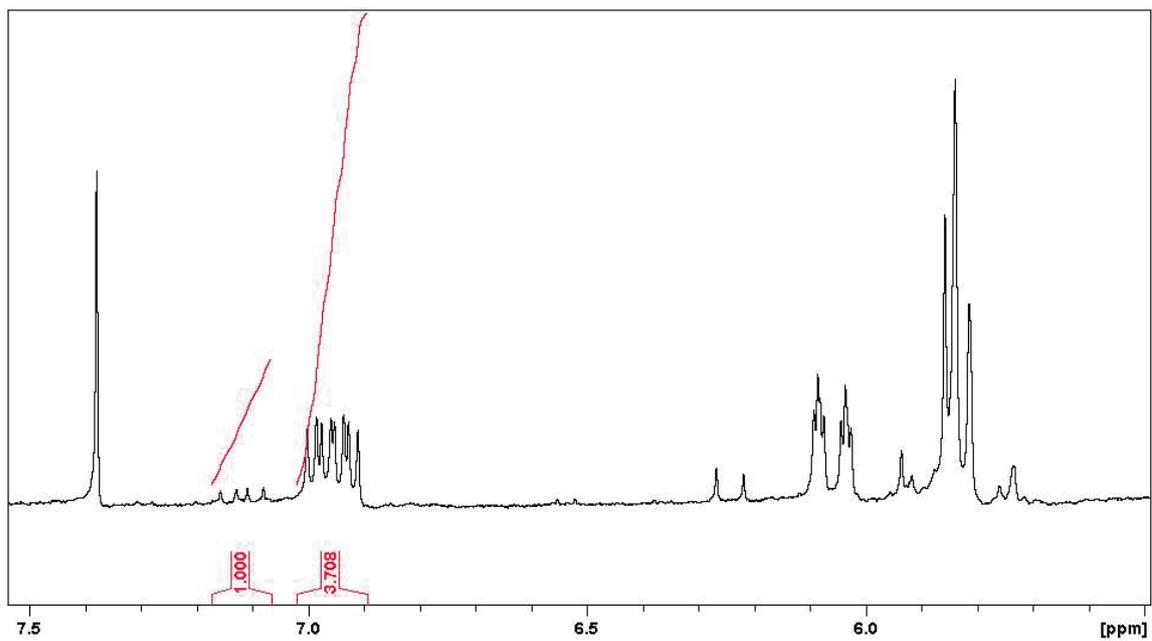


FIGURA 08: EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DO EEt. Observa-se, entre outros, dois sinais na região ao redor de  $\delta_{\text{H}}$  7,0 com intensidade relativa de 1:3,7. O sinal intenso perto de  $\delta_{\text{H}}$  7,4 é do solvente ( $\text{CDCl}_3$ ).

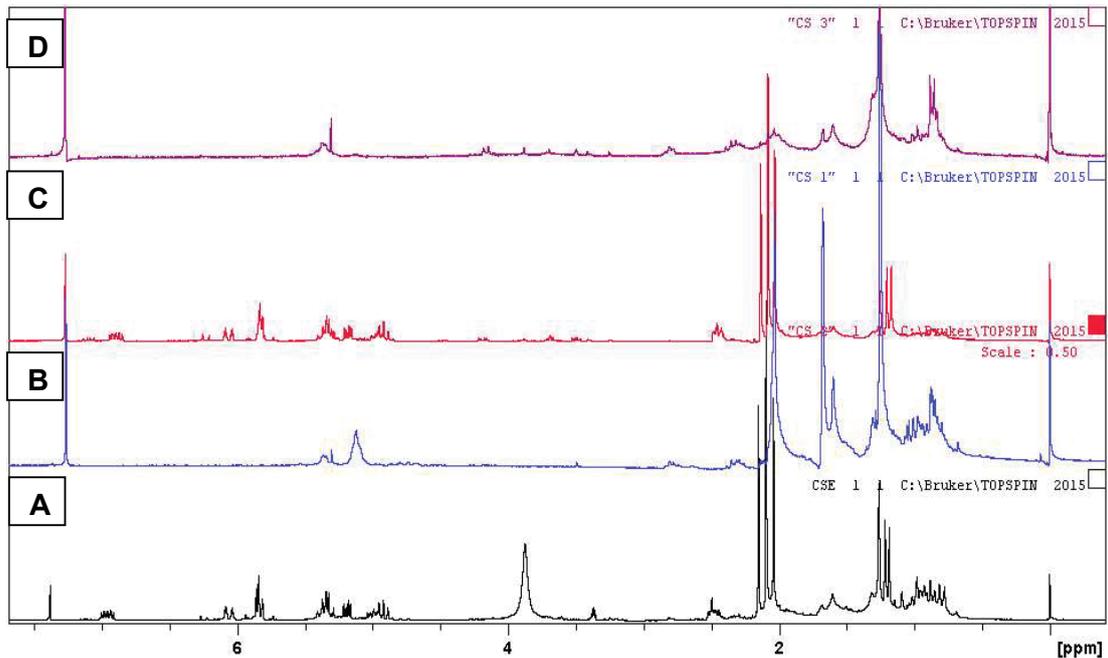


FIGURA 09: COMPARAÇÃO ENTRE OS ESPECTROS DE RMN DE  $^1\text{H}$  (200 MHz) DOS DIFERENTES EXTRATOS. **A:** EEt; **B:** extrato em EP; **C:** extrato em DCM; **D:** extrato etanólico obtido após extração com EP e DCM.

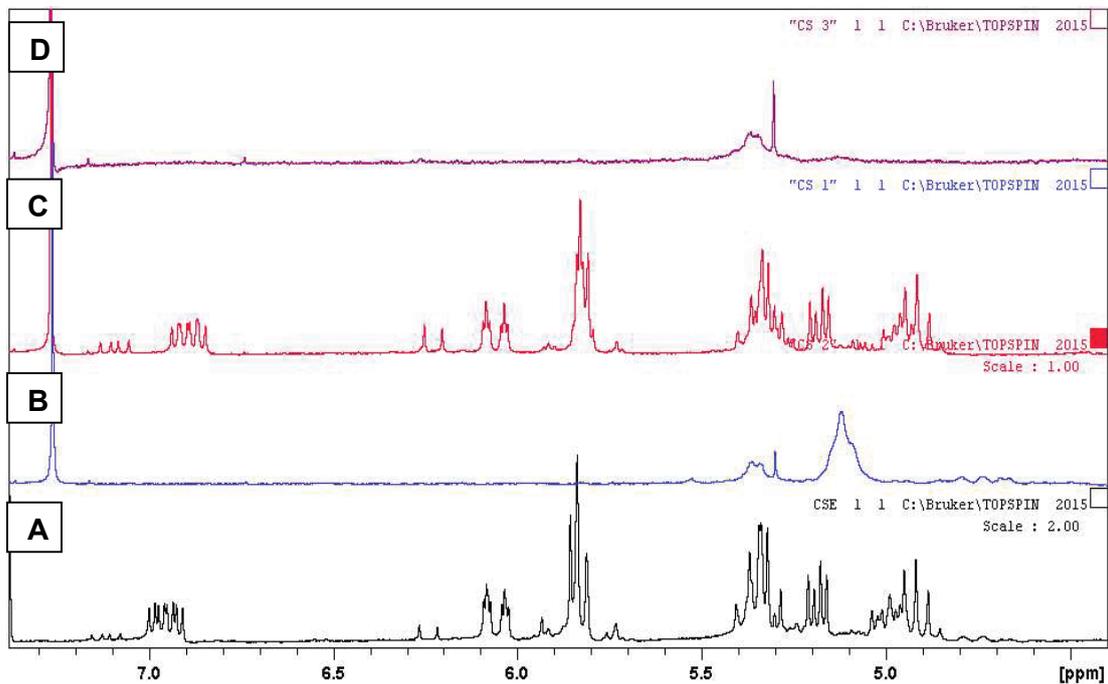


FIGURA 10: AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE  $\delta_{\text{H}}$  4,5-7,5 DOS ESPECTROS DE RMN DE  $^1\text{H}$  DOS DIFERENTES EXTRATOS. **A:** EEt; **B:** extrato em EP; **C:** extrato em DCM; **D:** extrato etanólico obtido após extração com EP e DCM. Observa-se uma grande semelhança entre o EEt e o extrato em DCM.

## 4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO EEt E DO DCM

Em muitos laboratórios, o primeiro teste a ser utilizado no *screening* de drogas analgésicas é o teste da formalina. Este teste, além de ser um teste de fácil execução, apresenta uma correlação boa com analgésicos eficazes na clínica. A administração i.pl. de formalina induziu uma resposta bifásica como esperado, com a fase I (neurogênica) nos primeiros 5 min, uma fase quiescente entre 5 e 15 min e a fase II (inflamatória) ocorrendo entre 15 e 40 min após a administração (dados não mostrados). Na figura 11 apresentamos o tempo total que os animais apresentaram comportamento nociceptivo na fase I e II. Podemos verificar que o tratamento dos animais somente com veículo não promoveu comportamento nociceptivo perceptível em nenhum momento (Figura 11). Como podemos verificar na Figura 11A nenhum dos tratamentos modificou a fase I da resposta à formalina quando comparados com o grupo que recebeu somente o agente algogênico. Porém, o tratamento dos animais com as diferentes doses do EEt, com o DCM ou com o anti-inflamatório não esteroidal indometacina promoveu uma redução significativa da nocicepção na fase II ou fase inflamatória (Figura 11B). O tratamento dos animais com EEt nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg causou uma inibição de 60%, 60%, 61%, respectivamente, da nocicepção. O tratamento com o DCM na dose de 50 mg/kg reduziu em 62% enquanto o tratamento com a indometacina reduziu em 60% a Fase II da nocicepção induzida pela formalina.

O fato de que o EEt apresentou efeito antinociceptivo similar em todas as doses testadas sugere que o efeito atingido com este extrato já é máximo mesmo na menor dose (10 mg/kg). Este dado é bastante surpreendente. Estudos anteriores de nosso laboratório com outras plantas, como *Magnolia ovata*, e de outros laboratórios com diferentes plantas mostram que as doses utilizadas de extratos para diminuir a nocicepção induzida por formalina pode chegar na faixa de 100-300 mg/kg do extrato bruto (KASSUYA C. A. et al., 2009; MONIRUZZAMAN et al., 2015; SANTOS et al., 2017; HAJHASHEMI et al., 2018). Assim, estes dados iniciais sugerem a presença de substância(s) analgésica(s) bastante potente(s) no EEt.

Além disso, um efeito similar de redução da nocicepção induzida pela formalina foi observado na dose de 50 mg/kg do DCM. Em parte, este resultado já

era esperado uma vez que grande parte das substâncias insaturadas presentes no EEt ficaram concentradas no extrato DCM. Não é possível fazer uma correlação de potência ou atividade específica entre EEt e DCM como os dados apresentados. Isto porque, seja o EEt na menor ou o DCM, na dose utilizada já produzem respostas máximas. Estas correlações só seriam possíveis em curvas dose-respostas com pelo menos 3 doses com efeitos quantitativamente diferentes de cada um dos extratos.

Adicionalmente, ambos os extratos produziram reduções semelhantes à redução da nocicepção pelo controle positivo indometacina. Assim, parece que, pelo menos algumas das moléculas responsáveis pelo efeito anti-nociceptivo no EEt estão também presentes no DCM. Esta potente atividade analgésica somada à diversidade de moléculas presentes nessa família aumentou o nosso interesse para a continuação do estudo.

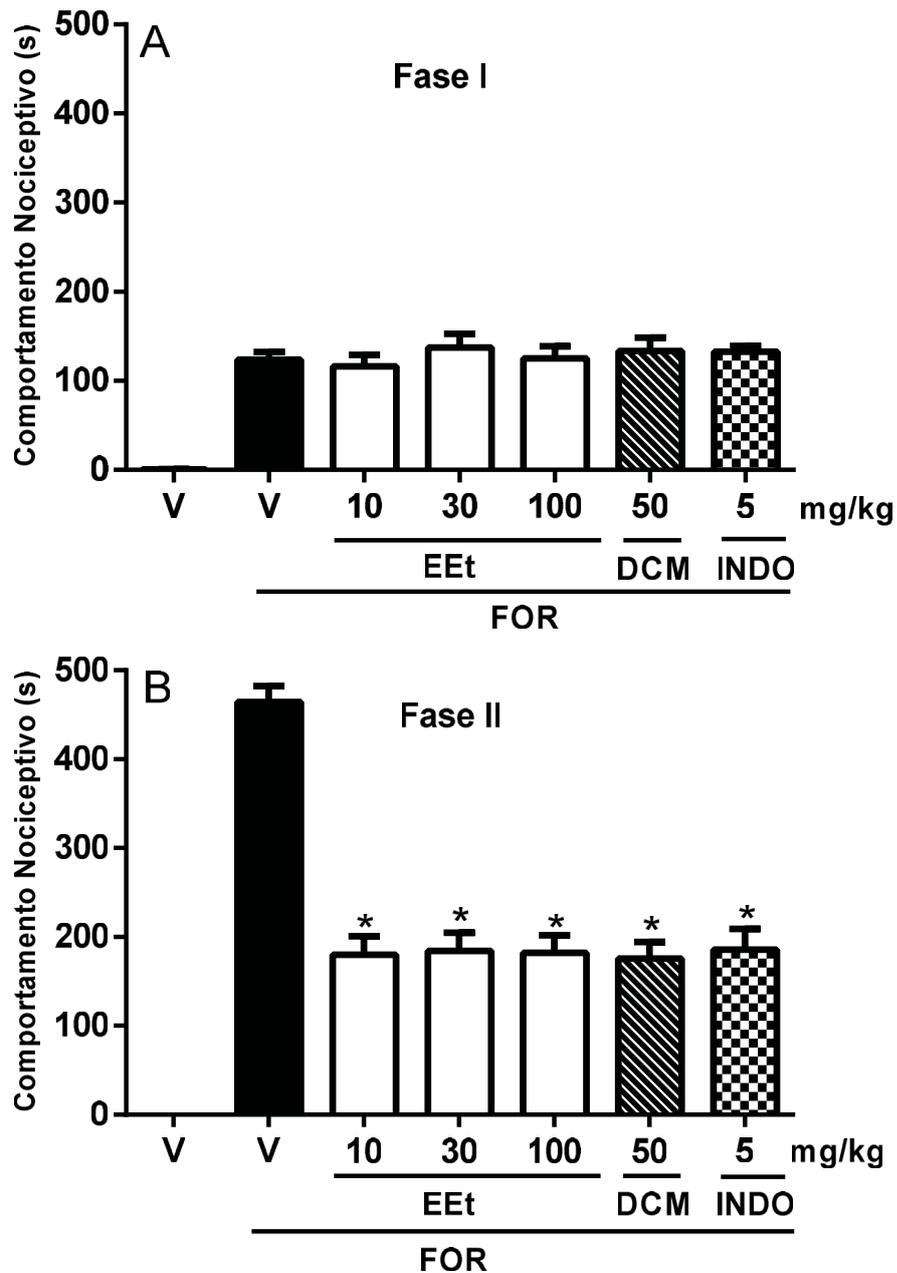


FIGURA 11: EFEITO DO EEt E DO DCM SOBRE O COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO INDUZIDO PELA FORMALINA EM CAMUNDONGOS. Os animais foram tratados por via oral com extrato etanólico bruto total de *Cantinoa stricta* (EEt), nas doses de 10, 30 ou 100 mg/kg, com o extrato Diclorometano (DCM) na dose de 50 mg/kg, com veículo (V, Tween 80 0,1 %) ou com indometacina (INDO), na dose de 5 mg/kg. Uma hora após o tratamento, os animais receberam uma injeção ipl de uma solução de 2,5% de formalina (FOR) como estímulo nociceptivo. As barras mostram a média  $\pm$  E.P.M. do tempo (s) que o animal passou executando o comportamento nociceptivo na Fase I (Painel A, 5 min) e Fase II (Painel B, 15-40 min) após a administração da FOR (n=6-8). As diferenças entre os grupos foram avaliadas por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. Os símbolos demonstram diferença estatística em comparação com o grupo tratado com V + FOR (\* $p < 0,05$ ).

Outro ponto importante a ser ressaltado é que tanto o EEt quanto o DCM reduziram somente a fase II da nocicepção induzida por formalina sem afetar a fase I. Como ressaltado anteriormente, uma das principais características da dor inflamatória é a indução de hiperalgesia. Estudos anteriores demonstraram que o fenômeno de hiperalgesia mecânica pode ser induzido pela administração i.p. de LPS tanto em ratos como em camundongos (CALIL et al., 2014). Assim, com a finalidade de investigar se os extratos estariam reduzindo especificamente o processo hiperalгésico, avaliamos seu efeito sobre a hiperalgesia mecânica induzida por LPS.

A figura 12 mostra que a administração i.p. de veículo não alterou o limiar mecânico dos animais em qualquer dos tempos testados. Por outro lado, a administração de LPS i.p. induziu uma hiperalgesia mecânica significativa a partir da 3ª hora após a administração do estímulo que permaneceu significativamente diferente do controle até a 5ª hora. O tratamento dos animais com o EEt na dose de 10 mg/kg, diferentemente do que foi observado no modelo de formalina, não modificou a hiperalgesia mecânica induzida por LPS. Entretanto, o tratamento dos animais com EEt nas doses de 18 e 30 mg/kg, assim como o DCM na dose de 15mg/kg, reduziram a hiperalgesia mecânica induzida por este estímulo tanto na 3ª como na 5ª hora (Figura 12A). A fim de obtermos uma análise mais global do efeito dos extratos na hiperalgesia foi calculada a intensidade da hiperalgesia pela diferença entre o limiar basal e o limiar após o estímulo algogênico nos diferentes tempos. A partir destas curvas, foi calculada a área sob as curvas obtidas e este parâmetro foi chamado de intensidade de hiperalgesia. Os dados de intensidade de hiperalgesia são apresentados na Figura 12B. A análise destes dados demonstra que a inibição da hiperalgesia mecânica induzida pelo LPS pelo EEt apresentou-se de maneira dependente da dose, ou seja, enquanto a menor dose não apresentou uma redução significativa da hiperalgesia, a dose intermediária reduziu parcialmente e a maior dose do EEt reduziu aproximadamente 90% a intensidade da hiperalgesia mecânica induzida por LPS (Figura 12B). De maneira similar, o DCM, na dose utilizada, reduziu a intensidade da hiperalgesia de maneira similar à indometacina, ou seja, em torno de 98% (Figura 12B). Estes dados em conjunto sugerem que o EEt e o DCM possuem substâncias com potencial antinociceptivo que atuam no fenômeno de hiperalgesia mecânica e, portanto, em condições experimentais que apresentam este fenômeno.

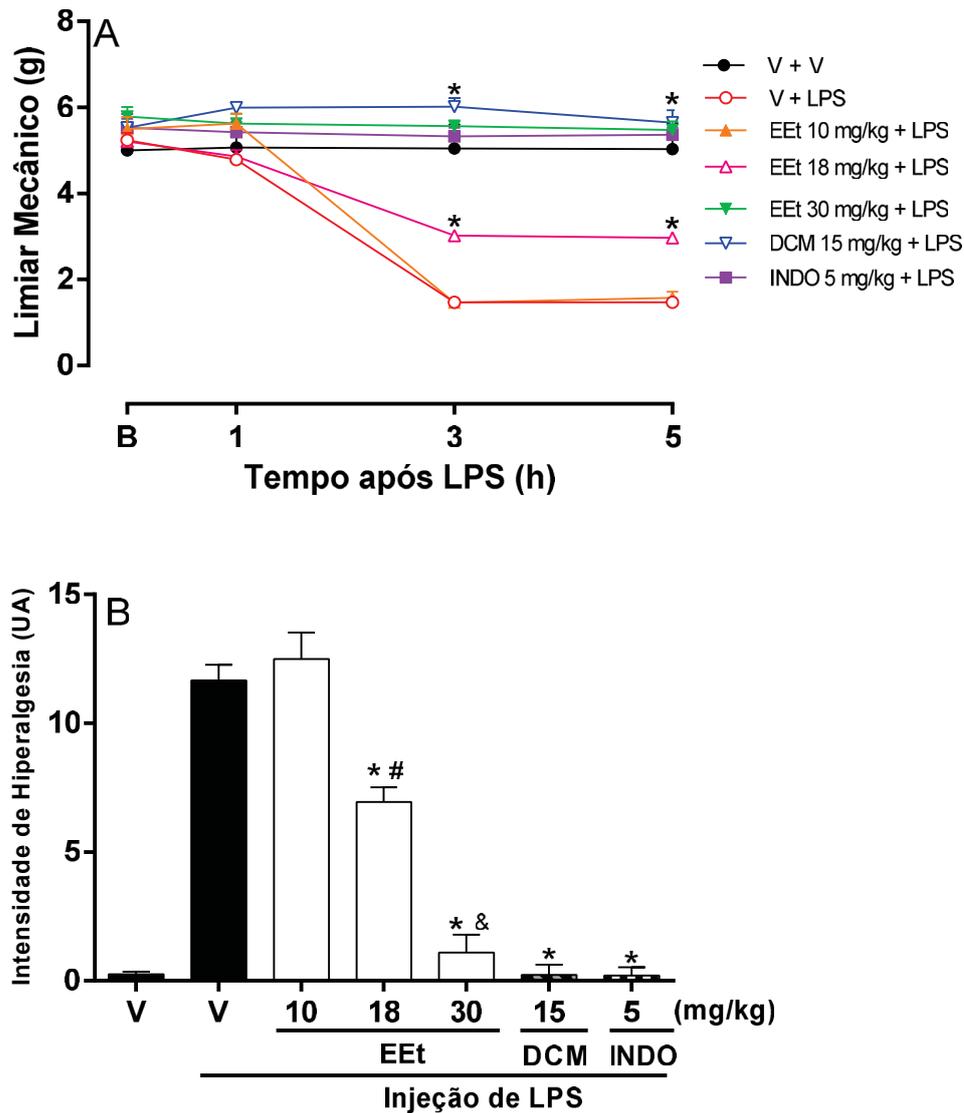


FIGURA 12: EFEITO DO EEt E DO DCM SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELO LIPOPOLISSACARÍDEO EM CAMUNDONGOS. O limiar mecânico basal (B) dos animais foi avaliado antes de qualquer tratamento. Em seguida, os animais foram tratados pela via oral com extrato etanólico total de *C. stricta* (EEt) nas doses de 10, 18 ou 30 mg/kg, com o extrato diclorometano (DCM) na dose de 15 mg/kg, com veículo (V, Tween 80 0,1 %) ou com Indometacina (INDO, 5 mg/kg). Uma hora após o tratamento, os animais receberam lipopolissacarídeo (LPS, 100 ng/pata, i.pl. ) como estímulo hiperálgico. O limiar mecânico dos animais foi avaliado novamente 1, 3 e 5 h após a administração do estímulo hiperálgico (A). O painel B mostra intensidade de hiperálgia (U.A.) calculada a partir da área sob curva dos dados em A. Os pontos e as barras representam a média  $\pm$  E.P.M. do limiar mecânico da pata dos animais (g) ou da intensidade de hiperálgia (U.A.) (n=6-8). As diferenças entre os grupos foram analisadas por ANOVA de duas vias (A) de uma via (B), seguida pelo teste de Bonferroni. Os símbolos demonstram diferença estatística em comparação com o grupo que recebeu V + LPS (\* p<0,05), EEt 10 ng/pata + LPS (# p<0,05) ou EEt 18 ng/pata + LPS (& p<0,05).

Um outro modelo empregado para avaliar o efeito destes extratos foi o modelo de nocicepção térmica aguda. Dentre as particularidades deste modelo, o comportamento nociceptivo avaliado (lambadura e sacudida das patas) é um comportamento elaborado e não reflete somente um reflexo de retirada, sugerindo seu processamento no sistema nervoso central. Mais importante, a nocicepção avaliada no modelo de nocicepção térmica aguda não está relacionada a um processo inflamatório (como no com a formalina ou o LPS) devido ao tempo de corte do experimento (30 s) que previne a lesão tecidual. Este modelo não está associado, portanto, a uma dor inflamatória e reflete simplesmente uma dor aguda a um estímulo térmico (BANNON e MALMBERG, 2007). Portanto, este modelo é frequentemente utilizado para avaliar substâncias que possuam um perfil similar aos opioides ou que promovam a liberação de opioides endógenos (HUANG et al., 2020; ZAKARIA et al., 2020).

Os resultados na figura 13A mostram que EEt e o DCM administrados por v.o., nas mesmas doses que inibiram a segunda fase da nocicepção induzida pela formalina (100 mg/kg e 50 mg/kg, respectivamente) não aumentaram o tempo de latência dos animais sobre a placa aquecida à 54°C, ou seja, não apresentaram nenhum efeito antinociceptivo neste modelo, quando comparado com o grupo de animais tratados com veículo. Esse resultado foi obtido 1 h após o tratamento com os extratos por via oral. Resultados similares foram observados na terceira e quinta hora após o tratamento com os extratos (dados não apresentados). Por outro lado, o tratamento dos animais com fentanil, um agonista opioide sintético, aumentou significativamente, em 94%, o tempo de permanência na placa aquecida quando comparado com o tratamento com veículo (Figura 13A). Vale ressaltar que esse efeito já era esperado levando-se em conta os resultados do teste de formalina uma vez que fármacos similares aos opioides diminuem também a primeira fase da formalina, fase neurogênica, como mostra dados da literatura (SALAT et al., 2018).

As atividades antinociceptiva ou antihiperálgica avaliadas nesse trabalho exigem um desempenho motor dos animais intacto em todos os modelos utilizados (formalina, hiperálgia mecânica, placa aquecida). É bastante comum que substâncias hipnótico-sedativas como os benzodiazepínicos apresentem resultados positivos (falso-positivos) em testes para avaliação das atividades antinociceptivas por afetarem o desempenho motor dos animais. Deste modo, o desempenho motor

dos animais no rota-rod foi avaliado utilizando-se as maiores doses que apresentaram os efeitos analgésicos no modelo da nocicepção induzido por formalina.

Nem o EEt nem o DCM, nas doses testadas, interferiu no desempenho motor dos animais nesse teste, quando comparados com o grupo com animais que receberam veículo (Figura 13B). Por outro lado, quando os animais foram tratados com diazepam, um benzodiazepínico usado nesse modelo como controle positivo, houve uma redução significativa do tempo de permanência do animal no aparelho de 97 % (Figura 13B). Estes dados em conjunto nos permitem sugerir que o efeito de ambos os extratos trata-se realmente de uma atividade anti-nociceptiva ou anti-hiperalgésica pois os animais não apresentaram comprometimento motor.

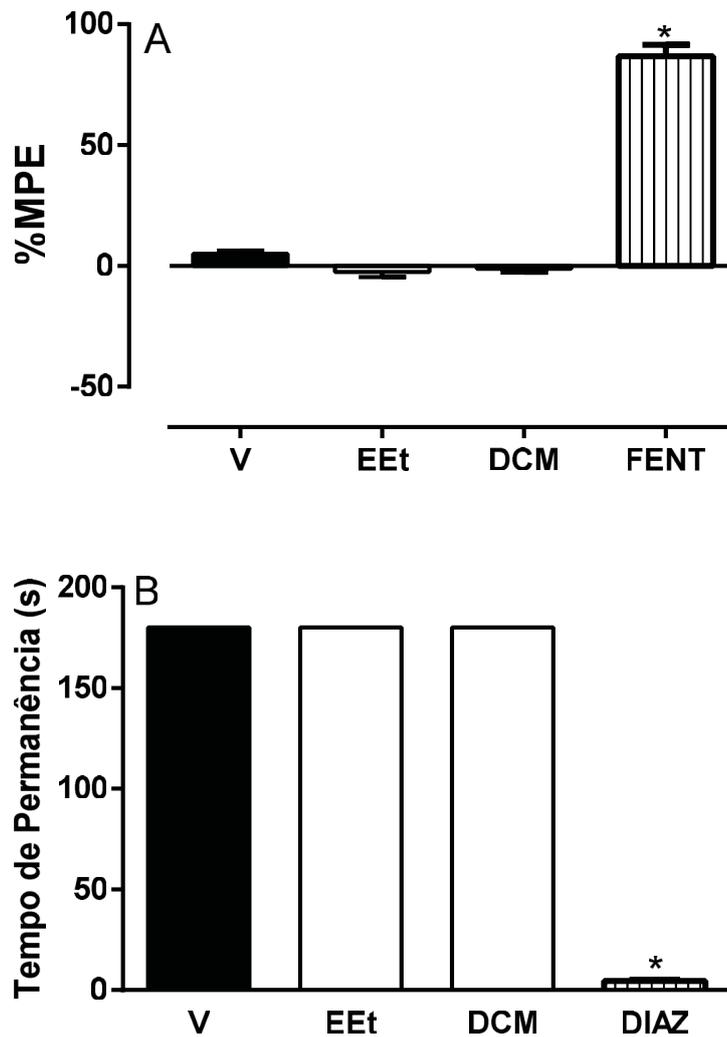


FIGURA 13: EFEITO DO EEt E DO DCM NO TESTE DE PLACA AQUECIDA E NO DESEMPENHO MOTOR EM CAMUNDONGOS. Os camundongos foram tratados por v.o. com extrato etanólico total de *C. stricta* (EEt, 100 mg/kg), com o extrato Diclorometano (DCM, 50 mg/kg) ou veículo (V, Tween 80 0,1 %). No painel A, o comportamento nociceptivo na placa quente foi avaliado 1 h após o tratamento. Animais controles receberam fentanil (FENT) (100 µg/kg s.c.), 15 min antes do teste. No painel B, o tempo de permanência no aparelho foi avaliado 1 h após o tratamento dos animais. Animais controles receberam diazepam (DIAZ; 5 mg/kg s.c.) 15 min antes do teste. Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. da % do máximo efeito possível (%MEP) ou do tempo de permanência no aparelho (s) (n=6-8). As diferenças entre os grupos foram analisadas por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. Os símbolos demonstram diferença estatística em comparação com o grupo tratado com veículo (\* p<0,05).

Como já mencionado discutido anteriormente, além da dor, o edema também é um dos sinais cardinais da inflamação (PIKOULIS et al., 2004; MARKIEWICZ e PASENKIEWICZ-GIERULA, 2011). Dados da literatura mostram que vários mediadores inflamatórios liberados após a administração de um estímulo inflamatório como LPS ou carragenina induzem hiperalgesia (CUNHA et al., 2005; CALIL et al., 2014) mas também estão envolvidos no desenvolvimento do edema induzido especificamente por carragenina na pata do animal (DE ARAUJO et al., 2019). Portanto, já que esses extratos apresentaram uma atividade anti-hiperalgésica frente ao estímulo do LPS, havia a possibilidade desta atividade anti-nociceptiva estar relacionada a atividade anti-inflamatória também.

A figura 14 mostra que a administração de salina não causou um edema significativo na pata dos animais. Já a administração de carragenina levou a um aumento na espessura da pata do animal, caracterizando o edema, que se iniciou na primeira hora e se manteve até a quinta hora (Figura 14A). O tratamento pela v.o. com o EEt nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg, assim como o tratamento pela v.o. com o DCM na dose de 50 mg/kg reduziu significativamente o edema induzido por carragenina. Esta redução mostrou-se significativa na terceira hora e manteve-se até a quinta hora (Figura 14A). O tratamento com o controle positivo dexametasona, um anti-inflamatório esteroideal padrão, na dose de 1 mg/kg, também apresentou o mesmo padrão de redução (Figura 14A). Analisando-se somente a quinta hora após a aplicação da carragenina, o tratamento com o EEt nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg diminuiu o edema em 42%, 46% e 46%, respectivamente (Figura 14B). Já o tratamento com o DCM, na dose de 50 mg/kg, causou uma diminuição de 47% e a DEX, na dose de 1 mg/kg, uma diminuição de 56% (Figura 14B).

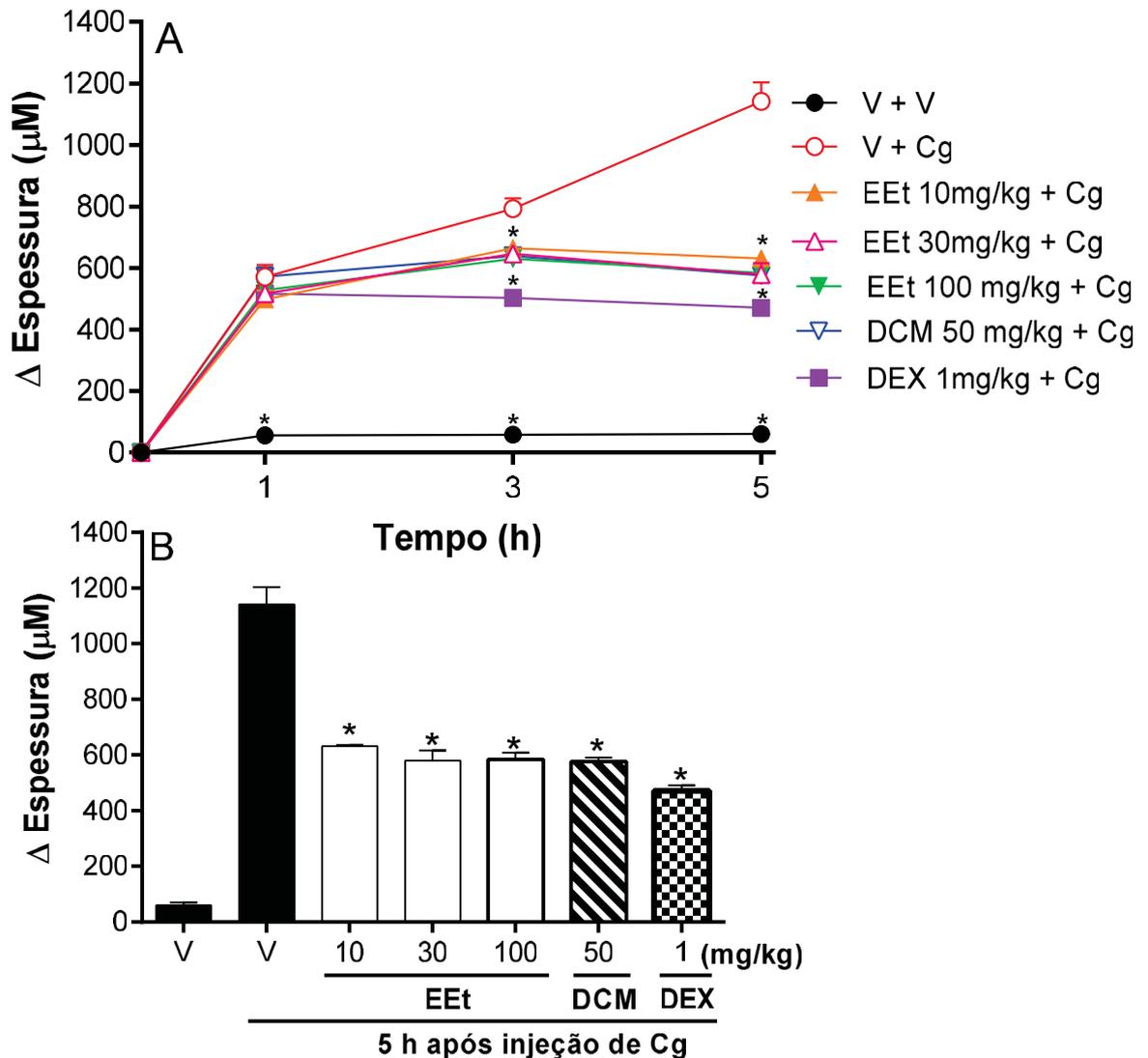


FIGURA 14: EFEITO DO EEt E DO DCM SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS. Os animais foram tratados pela via oral com extrato etanólico bruto de *C. stricta* (EEt) nas doses de 10, 30 ou 100 mg/kg, com o extrato Diclorometano (DCM) na dose de 50 mg/kg, com veículo (V; Tween 80), ou com dexametasona (DEX, 1 mg/kg). Uma hora após o tratamento os animais receberam uma injeção ipl de carragenina (Cg, 300 μg/pata) como estímulo inflamatório e a espessura da pata avaliada nos tempos indicados (A). O painel B mostra uma comparação dos resultados 5 h após a administração de Cg. Os pontos e as barras representam a média  $\pm$  E.P.M. da espessura ( $\mu$ m) da pata dos animais (n=6-8). As diferenças entre os grupos foram analisadas por ANOVA de duas vias (A) ou de uma via (B) seguida pelo teste de Bonferroni. Os símbolos demonstram diferença estatística em comparação com o grupo tratado com V + Cg (\* p<0,05).

Assim, os dados apresentados até o momento sugerem que tanto o EEt quanto o DCM possuem atividades antinociceptiva e anti-inflamatória importantes. Estas atividades podem ou não estar relacionadas as mesmas substâncias e, pelo menos até o momento, não é possível precisar se estes extratos possuem substâncias que possam oferecer efeitos anti-inflamatórios e/ou analgésicos diferentes dos fármacos já conhecidos. Além disso, como descrito anteriormente, o DCM possui as substâncias insaturadas similares ao EEt e em maior concentração. Em vista disso o extrato em DCM foi fracionado por cromatografia, fornecendo as substâncias 1 e 2, cuja identificação apresentaremos a seguir. A análise e interpretação dos espectros de RMN bem como a elucidação das estruturas moleculares foram conduzidas pela Profa. Dra. Maria Élide Alves Stefanello.

#### 4.3 IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA 1

A substância 1 foi isolada como um sólido incolor e cristalino. A sua rotação específica em clorofórmio foi de + 23,27. O seu espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figuras 16 e 17) mostrou sinais de um grupo metila ligado a um carbono secundário ( $\delta_{\text{H}}$  1,19, duplete), de quatro grupos acetato ( $\delta_{\text{H}}$  2,02; 2,07; 2,08 e 2,13), de hidrogênios metilênicos ( $\delta_{\text{H}}$  2,44; 2,47), de vários hidrogênios oximetínicos ( $\delta_{\text{H}}$  4,92-5,37), e de hidrogênios olefínicos ( $\delta_{\text{H}}$  5,80-6,88). São os mesmos sinais observados para a substância majoritária nos extratos etanólico total e DCM. O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 18) totalmente desacoplado apresentou os sinais de quatro grupos acetato ( $\delta_{\text{C}}$  20,5-21,0 e 169,7 a 170), de um grupo metila ( $\delta_{\text{C}}$  29,1), de cinco carbonos oximetínicos ( $\delta_{\text{C}}$  67,3-75,8), de 4 carbonos olefínicos ( $\delta_{\text{C}}$  121,4-144,5), e de um grupo carbonila de uma lactona ( $\delta_{\text{C}}$  163,4). Desconsiderando os grupos acetato, a substância 1 tem um esqueleto básico de 12 carbonos. Esse dado indica que 1 pertence à classe das pironas, um grupo de substâncias que é considerado como marcador químico do gênero *Hyptis* (MARTINEZ-FRUCTUOSO et al., 2019) o antigo nome de *Cantinoa*. O mapa de contorno  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  de correlação a uma ligação (HSQC, Figura 19) forneceu os deslocamentos químicos dos carbonos aos quais os hidrogênios estavam ligados. E o mapa de contorno  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância (HMBC, Figura 20) permitiu determinar a sequência de ligação dos diferentes grupos na molécula.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  foram observados sinais para duas ligações duplas. Uma delas está representada pelo duplete largo em  $\delta_{\text{H}}$  6,05 ( $J = 9,5$  Hz) e pelo multiplete em  $\delta_{\text{H}}$  6,88. A constante de acoplamento do primeiro sinal indica uma configuração Z, estando essa ligação dupla no anel da pirona. Essa posição é confirmada pelas correlações observadas no mapa de correlação a longa distância  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HMBC, Figura 20). Ali se observa que o hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  6,88 apresenta correlações com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  163,4, 75,8 e 29,2, enquanto que o sinal em  $\delta_{\text{H}}$  6,05 mostra correlações com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  163,4 e 29,2. Isso indica que essa ligação dupla está nas posições C-2/C-3, tendo em C-4 um grupo metileno ( $\delta_{\text{C}}$  29,2). A outra ligação dupla está representada pelos sinais em  $\delta_{\text{H}}$  5,85 (dd,  $J = 15,8$  e 4,0 Hz) e 5,80 (dd,  $J = 15,8$  e 6,1 Hz). A larga constante de acoplamento (15,8 Hz) indica que essa ligação dupla tem uma configuração E. A sua posição foi deduzida pelas correlações no HMBC. O sinal em  $\delta_{\text{H}}$  5,85 mostra correlação com o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  29,2, devendo estar em C-6. O outro hidrogênio olefínico ( $\delta_{\text{H}}$  5,80) mostra correlações com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  75,5 e 71,8, estando vizinho a um grupo acetato. Os quatro grupos acetato devem estar em C-8, C-9, C-10, e C-11. Com essas informações, e as demais correlações observadas (Tabela 1) a estrutura de 1 foi deduzida como uma  $\delta$ -lactona ( $\alpha$ -pirona), com uma cadeia lateral de sete carbonos, contendo uma ligação dupla e quatro grupos acetato vizinhos (Figura 15). A partir daí uma busca na literatura mostrou que essa substância era conhecida, tendo sido isolada de uma espécie de *Hyptis*, e denominada Anamarine (ALEMANY et al., 1979). Uma vez que os nossos dados de RMN são quase idênticos aos da anamarine (Tabela 1), podemos considerar que a substância 1 tem a mesma estereoquímica relativa da anamarine.

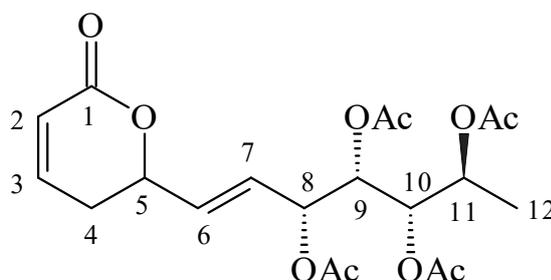


FIGURA 15: ESTRUTURA DA SUBSTÂNCIA 1

Posição	Substância 1			anamarine	
	$\delta_H$ ; mult. (J em Hz)	$\delta_C$	HMBC	$\delta_H$ ; mult. (J em Hz)	$\delta_C$
1		163,4			163,4
2	6,05; dl (9,8)	121,4	1, 4	6,05; ddd (9,9:1,7:1,7)	121,5
3	6,88; ddd (9,8:5,3:3,0)	144,5	1, 4,5	6,88; ddd (9,9:5,2:3,5)	144,4
4	2,50-239; m	29,1	2, 5, 6	2,47-2,41; m	29,1
5	4,98-4,90; m	75,8		4,99-4,90; m	75,8
6	5,80; dd (15,6:6,2)	125,5	4, 5, 7, 8	5,88-5,74; m	125,6
7	5,85; dd (15,6:4,1)	132,9	5, 6, 8	5,88-5,74; m	133,0
8	5,37; dd (7,2:6,2)	71,8	7, 6, 9, CO-8	5,36; dd (7,2:5,2)	71,9
9	5,31; dd (7,2:3,6)	70,4	10	5,30; dd (7,2:3,5)	70,5
10	5,18; dd (6,7:3,6)	71,5	11,12, CO-10	5,17; dd (7,0:3,5)	71,6
11	4,92; quinteto (6,5) em sobreposição com H-5	67,3	10, 12, CO-11	4,91; dq (6,4:6,4)	67,3
12	1,19; d (6,5)	15,7	10, 11	1,17; d (6,4)	15,8
CH <sub>3</sub> CO- 8	2,08; s	20,8 (Me) 169,7 (CO)	CO-8	2,07; s	20,8 169,6
CH <sub>3</sub> CO- 9	2,12; s	21,0 (Me) 168,8 (CO)	CO-9	2,12; s	20,9 169,8
CH <sub>3</sub> CO- 10	2,07; s	20,8 (Me) 169,8 (CO)	CO-10	2,06; s	20,6 169,7

CH <sub>3</sub> CO- 11	2,02; s	21,1 (Me) 170,0 (CO)	CO-11	2,02; s	21,0 170,0
---------------------------	---------	-------------------------	-------	---------	---------------

TABELA 1: DADOS DE RMN PARA A SUBSTÂNCIA 1 (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz) EM COMPARAÇÃO COM OS DADOS DA LITERATURA PARA ANAMARINE (GAO e O'DOHERTY, 2005).

Mult.: multiplicidade do sinal: d – duplete; dd – duplo duplete; ddd – duplo duplo duplete; dl – duplete largo; s – simpleto; m – multiplete; HMBC: correlações <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C. Os números se referem à cadeia carbônica.

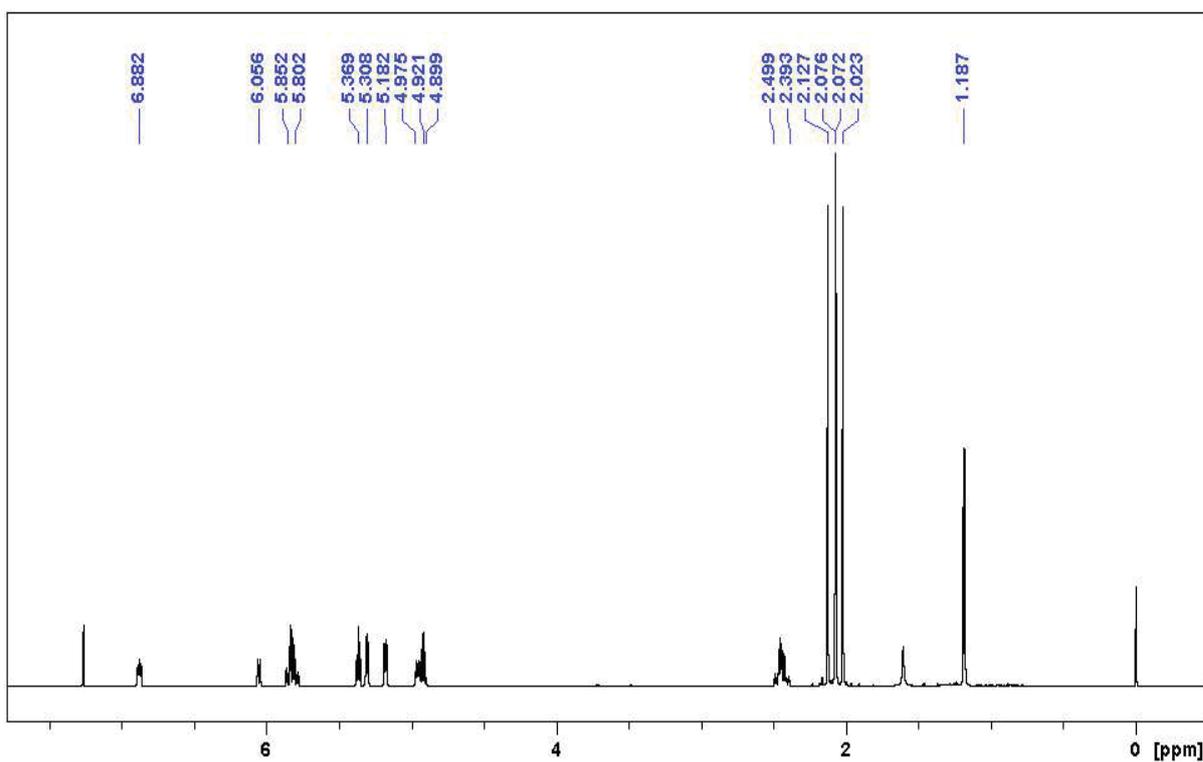


FIGURA 16 – ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup>H DE 1 (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz).

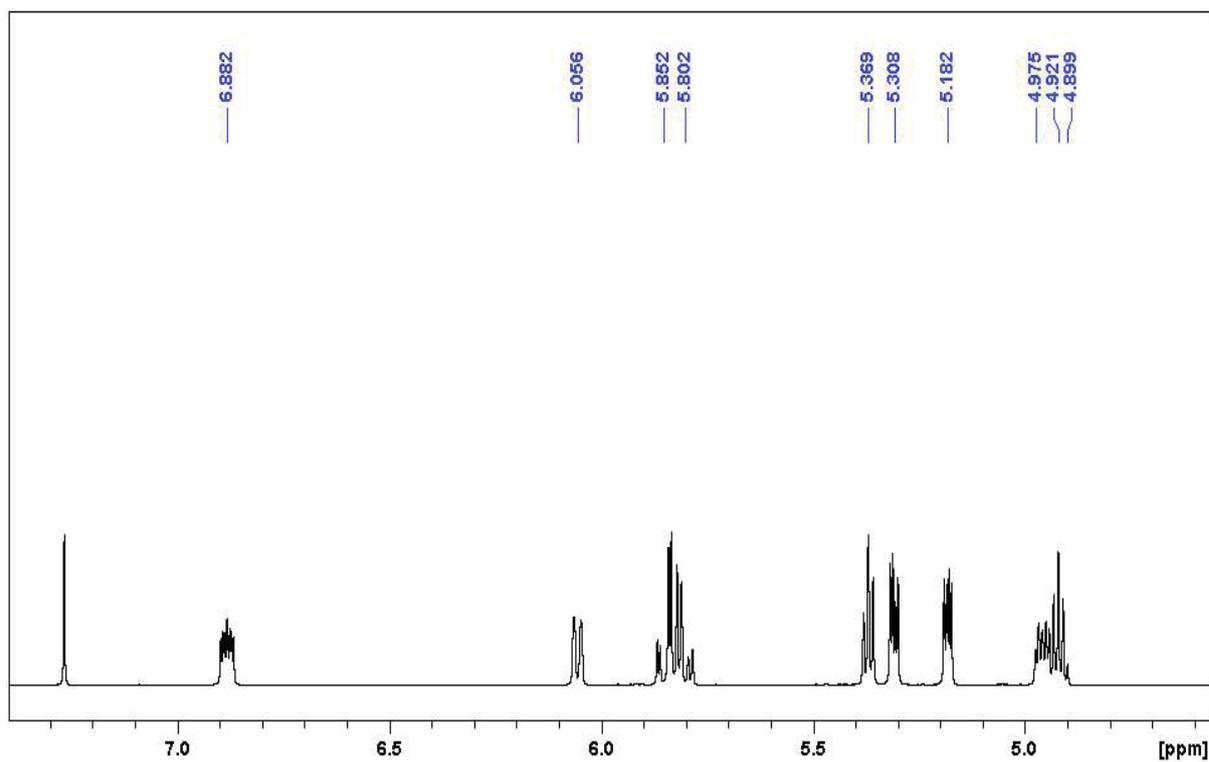


FIGURA 17: ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup>H DE 1 (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHZ). AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE δ<sub>H</sub> 4,6-7,3.

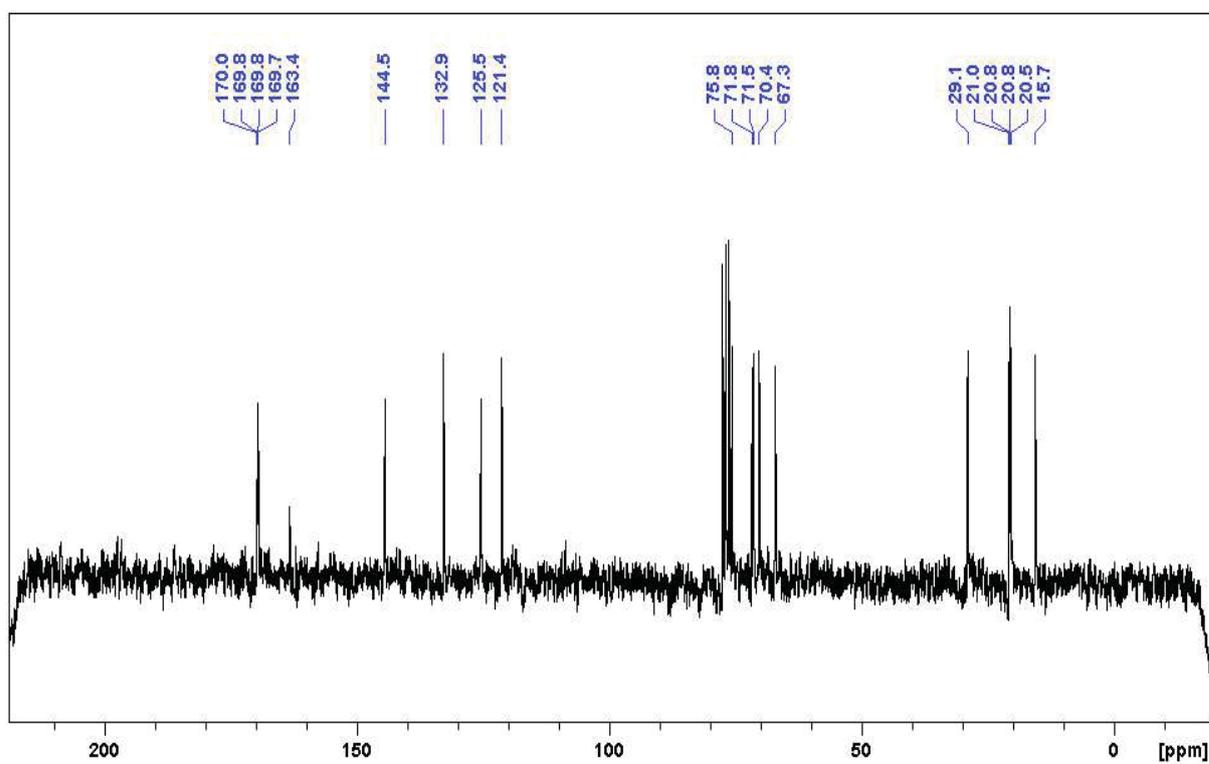


FIGURA 18: ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup>C DE 1 (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHZ)

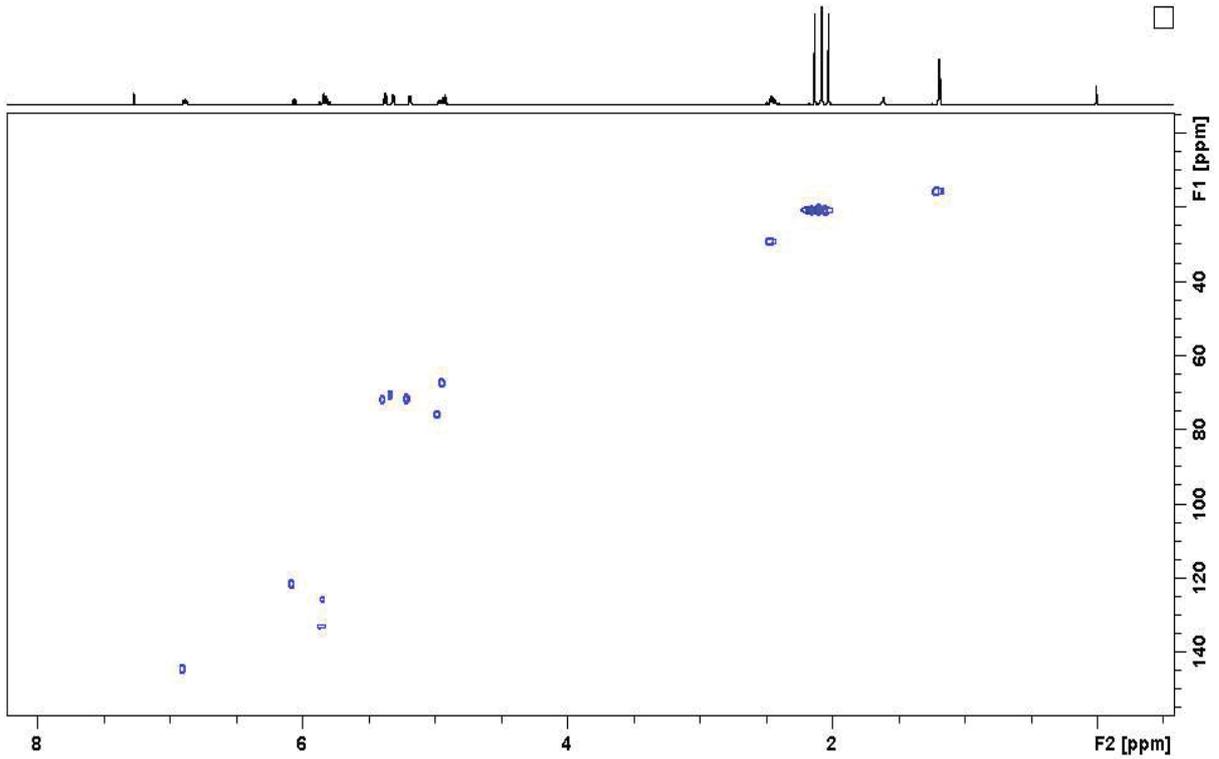


FIGURA 19: MAPA DE CONTORNO  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  DE CORRELAÇÃO A UMA LIGAÇÃO (HSQC) DE 1 (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz)

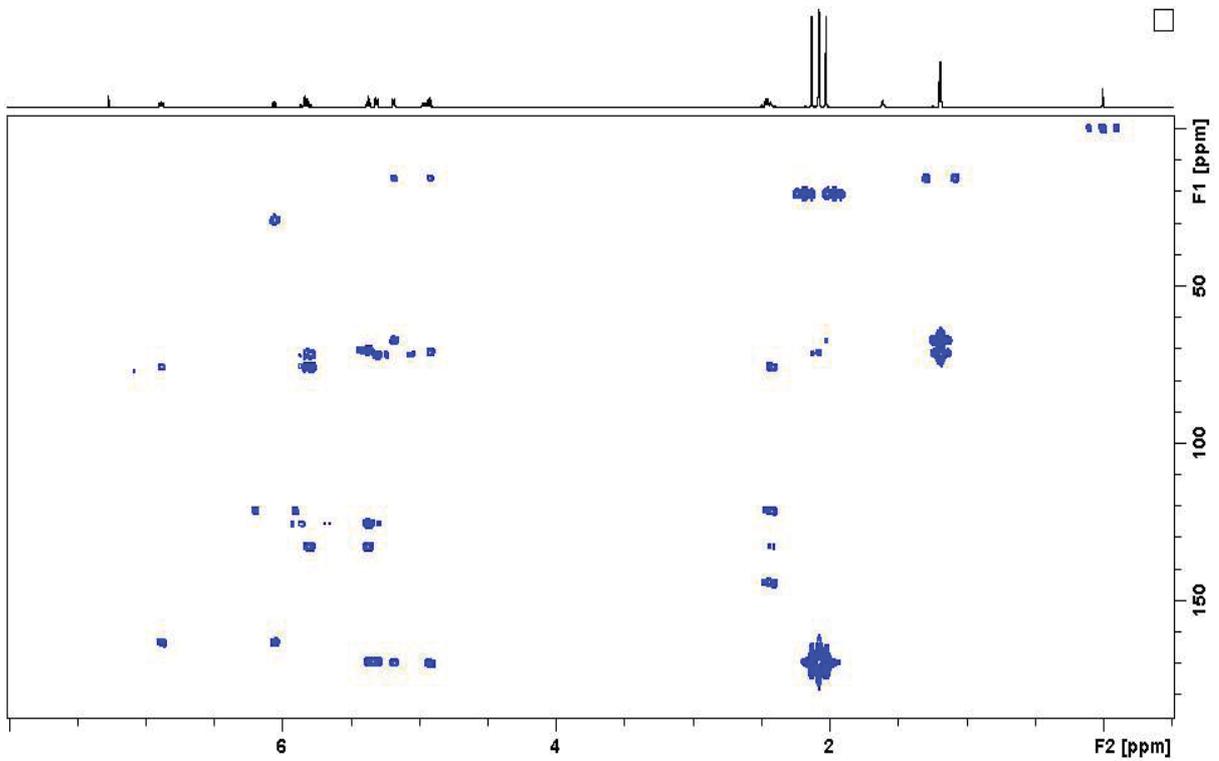


FIGURA 20: MAPA DE CONTORNO  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  DE CORRELAÇÃO A LONGA LIGAÇÃO (HMBC) DE 1 (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz)

#### 4.4 IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA 2

Esta substância também foi isolada como um sólido cristalino incolor, com rotação específica de +103,57 (clorofórmio). O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância 2 (Figuras 22, 23 e 24) foi semelhante aquele da substância 1, indicando que essas duas substâncias pertencem à mesma classe. No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de 2 (Figuras 22, 23 e 24) foram observados sinais de um grupo metila ligado a um carbono secundário ( $\delta_{\text{H}}$  1,19, d), de três grupos acetato ( $\delta_{\text{H}}$  2,03, 2,07 e 2,13), de seis hidrogênios oximetínicos ( $\delta_{\text{H}}$  3,49-5,33), de uma ligação dupla com configuração E ( $\delta_{\text{H}}$  5,78, dd,  $J = 15,8$  e  $4,9$ , e  $\delta_{\text{H}}$  5,86, dd,  $J = 15,8$  e  $6,4$ ), e de uma ligação dupla com configuração Z ( $\delta_{\text{H}}$  6,22, d,  $J = 9,7$  Hz e  $\delta_{\text{H}}$  7,08, dd,  $J = 9,7$  e  $5,8$  Hz).

O mapa de contorno  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a uma ligação (HSQC, Figura 25) permitiu associar cada um desses hidrogênios aos carbonos aos quais estavam ligados. As correlações entre os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  3,49 e 3,68 com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  54,5 e 55,6, respectivamente, revelaram a presença de um grupo epóxido, pois esses deslocamentos químicos são típicos deste grupo. A pequena constante de acoplamento (4,4 Hz) indicou uma relação cis para o anel epóxido.

O mapa de contorno  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância (HMBC, Figura 26) permitiu determinar a sequência dos diversos grupos. Assim, a ligação dupla com configuração Z foi colocada nas posições C-2 e C-3 do anel da pirona devidos as correlações entre o hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  7,08 (H-3) e os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  161,2 (C-1), 74,8 (C-5) e 62,5 (C-4). Por outro lado, o hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  5,27 estava ligado ao carbono em  $\delta_{\text{C}}$  62,5, e apresentava correlações com um carbono de um grupo acetato ( $\delta_{\text{C}}$  169,8), indicando uma acetilação em C-4. Restaram dois grupos acetato e um epóxido para a cadeia lateral. O grupo epóxido foi localizado em C-6 e C-7 devido a uma correlação fraca entre o hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  3,49 (H-6) com C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  74,8). A outra ligação dupla foi colocada em C-8 e C-9 devido as correlações entre os seus hidrogênios e os carbonos do grupo epóxido (Tabela 2). Restaram dois grupos acetato, que só podem estar em C-10 e C-11. A estrutura 2 é compatível com todas essas informações (Figura 21). Uma revisão na literatura mostrou que existem duas substâncias conhecidas com essa estrutura plana, a olguine e a 10-*epi*-olguine, as quais que diferem na configuração do carbono 10. Os nossos dados de RMN coincidiram com os dados da 10-*epi*-olguine (LU et al., 1997), como

mostrado na Tabela 2. Para confirmar a estrutura foi obtido um monocristal de 2, e este foi analisado por cristalografia de raios X (Figura 27). Os resultados confirmaram a substância 2 como sendo a 10-*epi*-olguine.

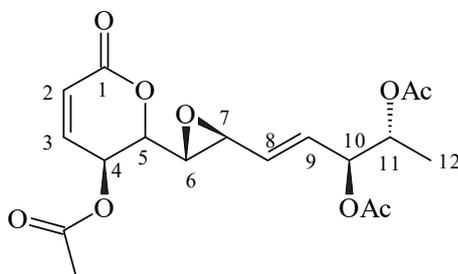


FIGURA 21: ESTRUTURA DA SUBSTÂNCIA 2

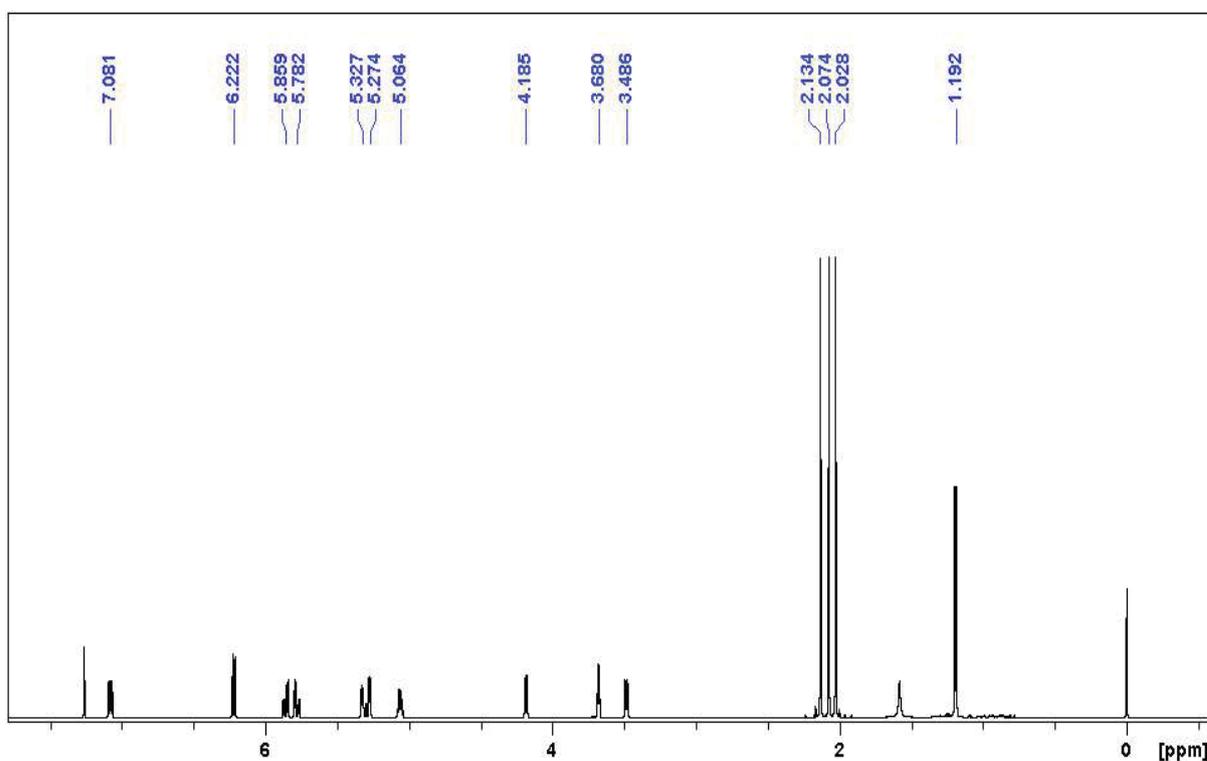


FIGURA 22: ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DA SUBSTÂNCIA 2 ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz).

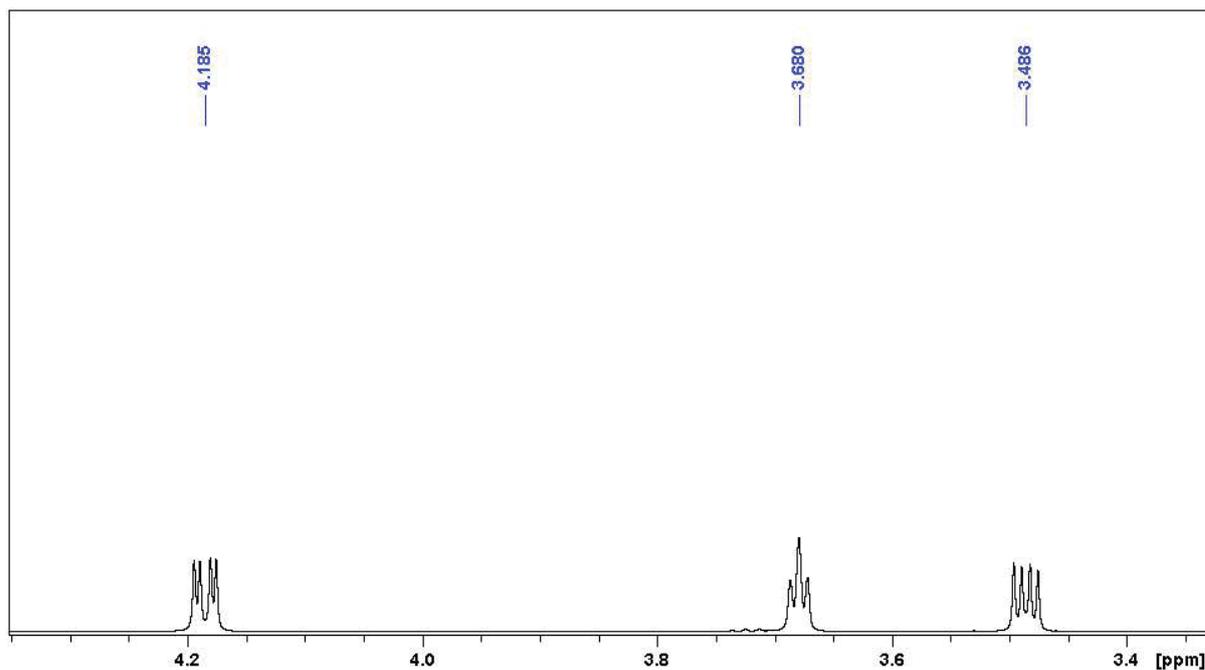


FIGURA 23: ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DA SUBSTÂNCIA 2 ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz). AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE  $\delta_{\text{H}}$  3,4 E 4,3 (REGIÃO DOS HIDROGÊNIOS OXIMETÍNICOS H-5, H-6 E H-7).

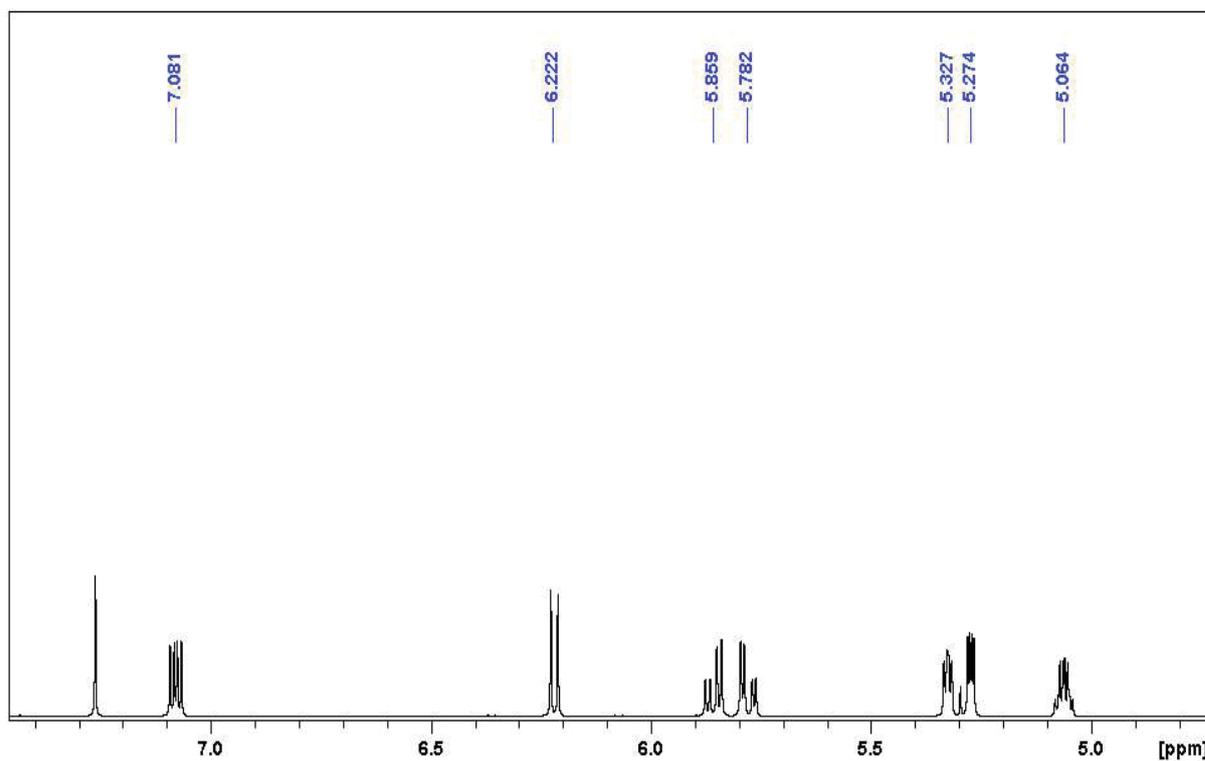


FIGURA 24 - ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DE 2. AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE  $\delta_{\text{H}}$  4,8 E 7,4 (REGIÃO DOS HIDROGÊNIOS OXÍMETÍNICOS H-4, H-10 E H-11, E DOS HIDROGÊNIOS OLEFÍNICOS).

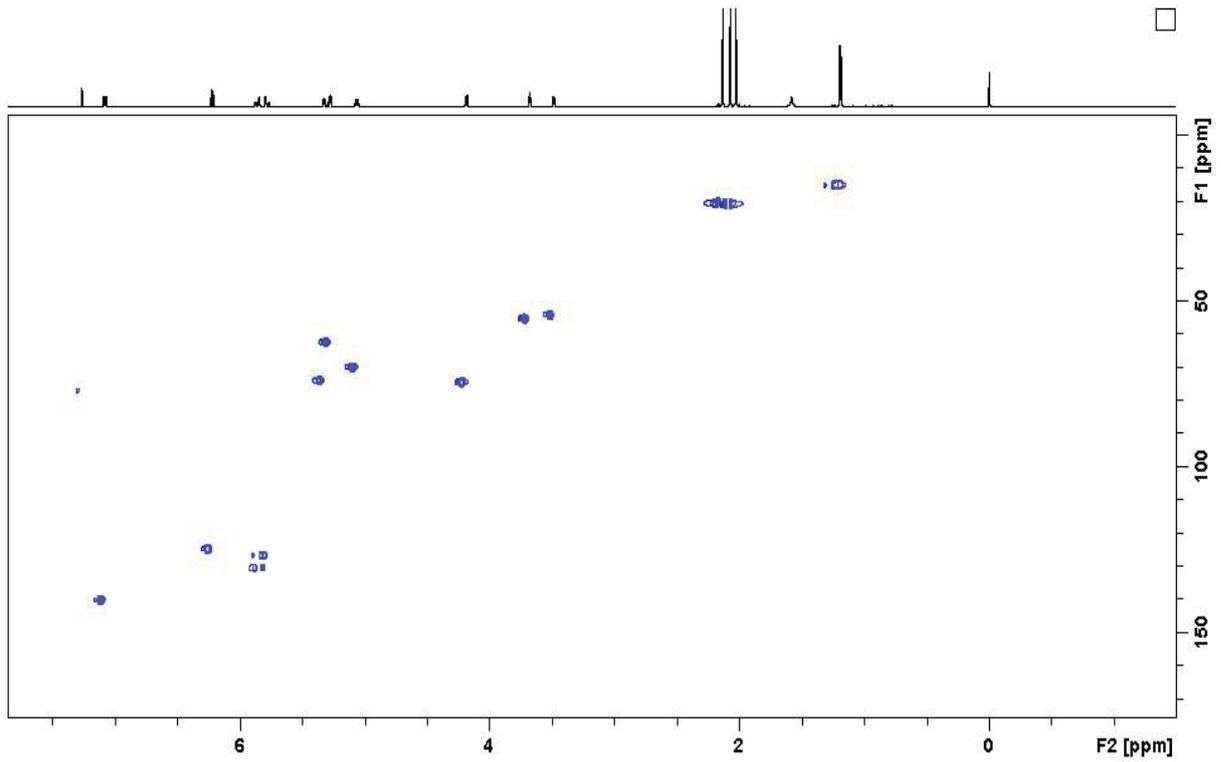


FIGURA 25: MAPA DE CORRELAÇÃO  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  A UMA LIGAÇÃO (HSQC,  $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz).

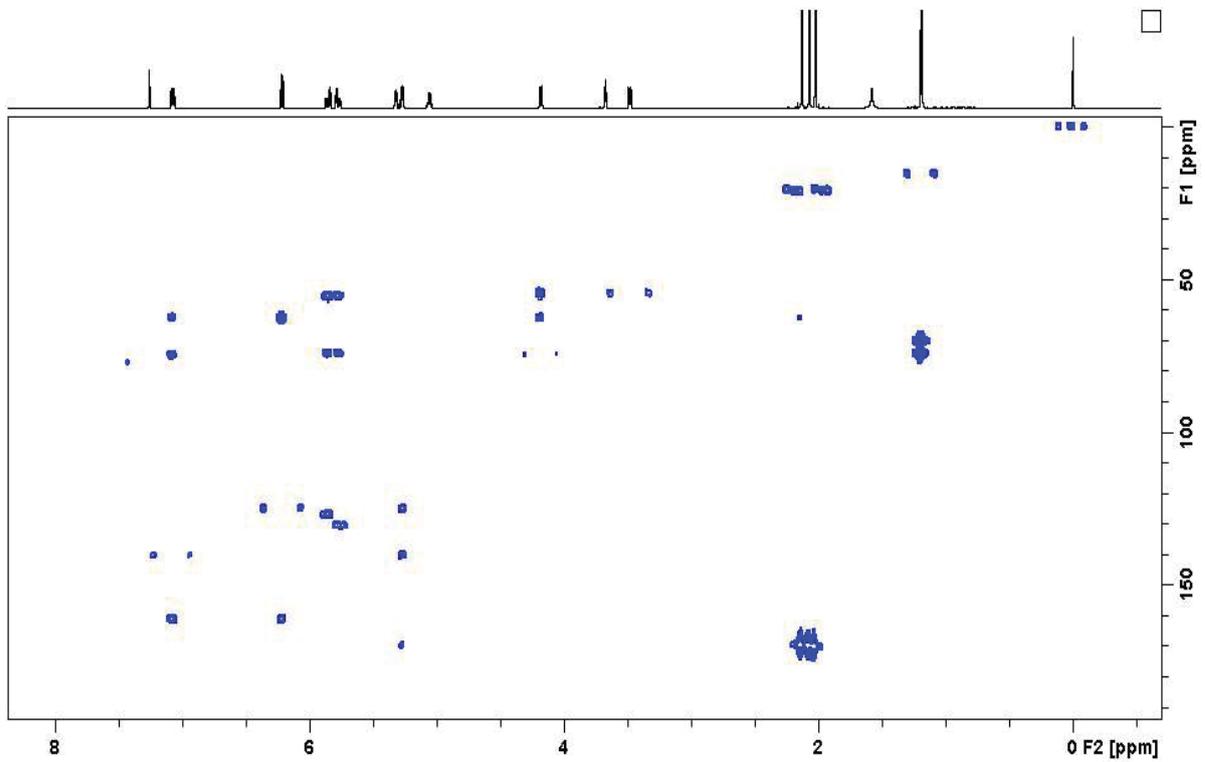


FIGURA 26: MAPA DE CORRELAÇÃO  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  A LONGA DISTÂNCIA (HMBC,  $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz).

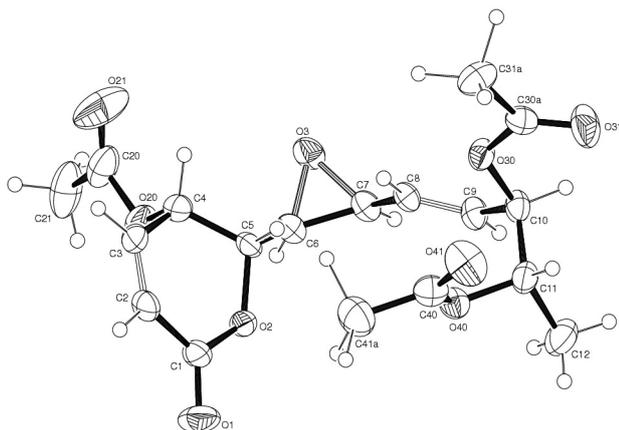


FIGURA 27: ILUSTRAÇÃO DA ESTRUTURA DE 2 OBTIDA POR CRISTALOGRAFIA DE RAIOS X.

Posição	Substância 2			10- <i>epi</i> -olguine	
	$\delta_{\text{H}}$ ; mult. ( <i>J</i> em Hz)	$\delta_{\text{C}}$	HMBC	$\delta_{\text{H}}$ ; mult. ( <i>J</i> em Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		161,2			161,5
2	6,22; d (9,8)	125,1	1, 4	6,15; d (9,6)	125,1
3	7,08; dd (9,8:5,7)	140,6	1, 4,5	7,01; dd (9,6:5,7)	140,7
4	5,27; dd (5,7:2,9)	62,5	2, 4, CO-4	5,21; dd (5,5:3,0)	62,8
5	4,18; dd (8,3:2,9)	74,8	4, 6	4,14; dd (8,4:3,0)	75,0
6	3,49; dd (8,3:4,1)	54,5	5	3,41; dd (8,4:4,2)	54,7
7	3,68; dd (4,5:4,1)	55,6		3,61; dd (4,5:4,2)	55,8
8	5,78; dd (15,8:4,5)	127,1	7, 9,10	5,71; dd (15,6:4,5)	127,2
9	5,86; dd (15,8:6,5)	130,7	7, 8, 10	5,80; dd (15,6:5,7)	130,8
10	5,33; dd (6,5:4,0)	74,4		5,26; dd (5,7:3,9)	74,4
11	5,06; m	70,2		4,98; dq (6,6:4,0)	70,4
12	1,19; d (6,5)	15,3	10, 11	1,04; d (6,6)	15,5

CH <sub>3</sub> CO-4	2,13; s	20,9 (Me) 169,8 (CO)	CO-4	2,04; s	20,8  170,0
CH <sub>3</sub> CO-10*	2,07; s	20,9 (Me) 170,0 (CO)	CO-10	2,01; s	21,2  170,2
CH <sub>3</sub> CO-11*	2,03; s	21,0 (Me) 170,3 (CO)	CO-11	1,93; s	21,3  170,5

TABELA 2: DADOS DE RMN PARA A SUBSTÂNCIA 2 (CDCL<sub>3</sub>, 600 MHZ) EM COMPARAÇÃO COM OS DADOS DA LITERATURA PARA 10-EPI-OLGUINE (LU et al., 1997).

\* atribuições que podem estar invertidas.

#### 4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

Neste capítulo passaremos a avaliar a atividade farmacológicas das substâncias 1 e 2 isoladas do extrato DCM da *C. stricta*. Em decorrência da identificação destas substâncias como sendo anamarine (ANA) e 10-*epi*-olguine (EPI) passaremos a utilizar estes nomes químicos.

##### 4.5.1 EFEITO DA ANAMARINE E DA 10-EPI-OLGUINE NA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA POR LPS

O primeiro grupo de experimentos foi desenvolvido no sentido de avaliar o efeito da anamarine e da 10-*epi*-olguine administradas pela mesma via que os extratos (v.o.) sobre a hiperalgesia mecânica induzida por LPS. O tratamento com a

anamarine na dose de 1 mg/kg não causou alteração significativa na hiperalgesia mecânica induzida pelo LPS, quando comparada com o grupo tratado somente com o veículo (Figura 28). Porém, o tratamento com anamarine nas doses de 1,8 e 3,0 mg/kg reduziu significativamente a hiperalgesia mecânica induzida por LPS, que se iniciou na terceira hora e se manteve até a quinta hora (Figura 28A). Analisando a intensidade de hiperalgesia, a anamarine nas doses de 1,8 e 3,0 mg/kg também reduziu a hiperalgesia mecânica em 42% e 80%, respectivamente enquanto a menor dose não apresentou uma redução significativa (Figura 28B). Estes dados demonstram um efeito dependente da dose da anamarine sobre a hiperalgesia induzida por LPS.

Por outro lado, o tratamento sistêmico com a 10-*epi*-olguine na dose de 1 mg/kg não causou alteração significativa na hiperalgesia mecânica induzida pelo LPS, quando comparada com o grupo tratado com veículo (Figura 29). Porém, o tratamento com a 10-*epi*-olguine nas doses de 3,0 e 10,0 mg/kg reduziu significativamente a hiperalgesia mecânica induzida por LPS. A redução foi evidente a partir da terceira hora e se manteve até a quinta hora (Figura 29A). Guardando-se as diferenças entre as doses, a análise da intensidade de hiperalgesia demonstrou que o efeito da 10-*epi*-olguine foi similar ao observado para a anamarine. O tratamento dos animais com 10-*epi*-olguine por via oral na dose de 1,0 mg/kg não modificou a intensidade de hiperalgesia induzida por LPS enquanto nas doses de 3,0 e 10 mg/kg a 10-*epi*-olguine reduziu a hiperalgesia mecânica em 48% e 95%, respectivamente (Figura 29B). O efeito da 10-*epi*-olguine na hiperalgesia mecânica também se mostrou dependente da dose (Figura 29B). O tratamento com a indometacina reduziu em 85% e 98% a hiperalgesia mecânica induzida pelo LPS (Figura 28B e 29B, respectivamente).

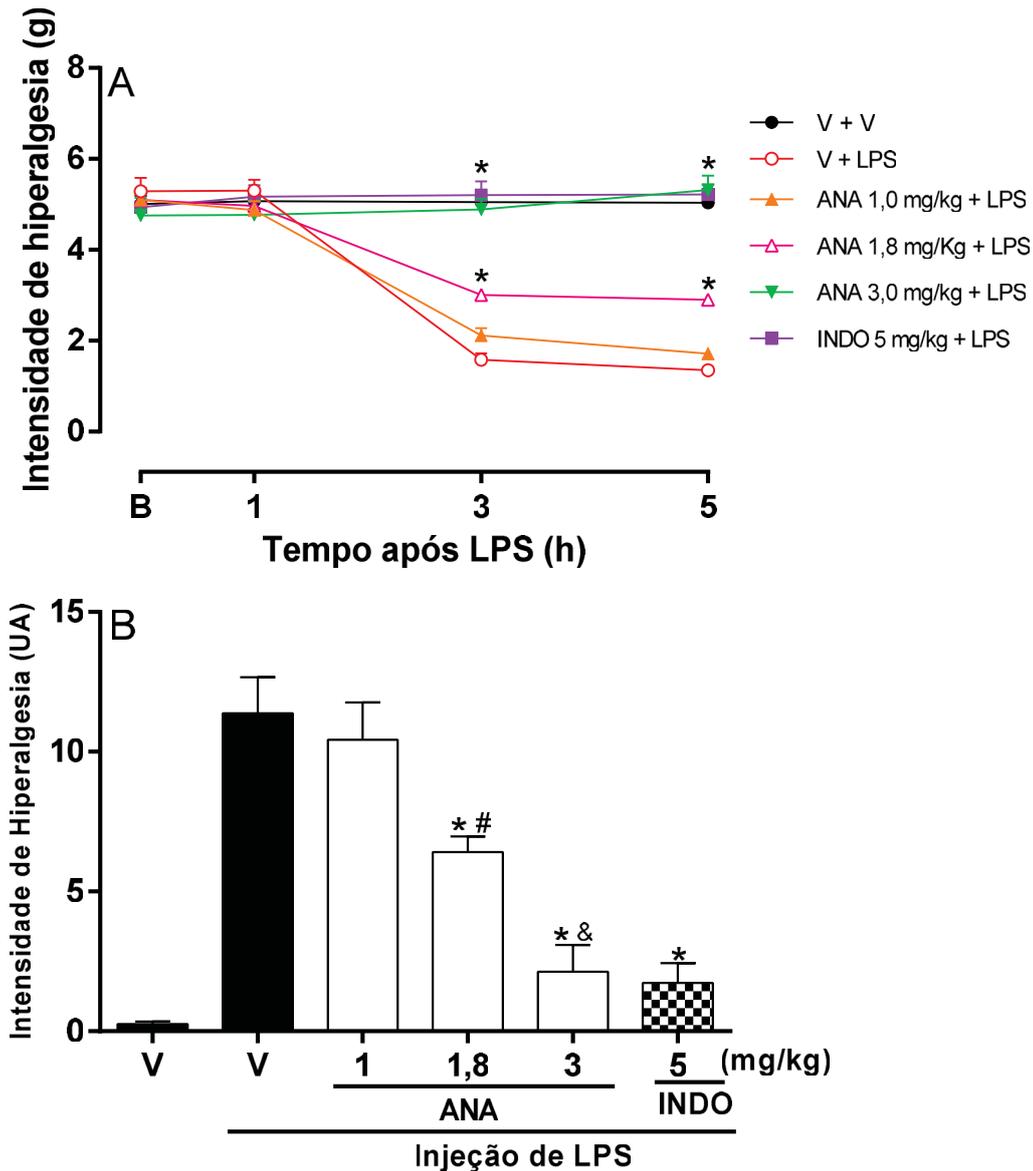


FIGURA 28: EFEITO SISTÊMICO DA ANAMARINE SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELO LIPOPOLISSACARÍDEO EM CAMUNDONGOS. O limiar mecânico basal (B) dos animais foi avaliado antes de qualquer tratamento. Em seguida, os animais foram tratados pela v.o. com anamarine (ANA) nas doses de 1,0, 1,8 ou 3,0 mg/kg, com veículo (V, Tween 80 0,1 %), ou com indometacina (INDO, 5 mg/kg). Uma hora após o tratamento, os animais receberam uma injeção i.p. de lipopolissacarídeo (LPS, 100 ng/pata) como estímulo hiperalgésico. O limiar mecânico dos animais foi avaliado novamente 1, 3 e 5 h após a administração do estímulo hiperalgésico (A). O painel B mostra intensidade de hiperalgisia (U.A.) calculada a partir da área sob curva dos dados em A. Os pontos e as barras representam a média  $\pm$  E.P.M. do limiar mecânico da pata dos animais ou da intensidade de hiperalgisia (n=6-8). As diferenças entre os grupos foram analisadas por ANOVA de duas vias (A) de uma via (B), seguida pelo teste de Bonferroni. Os símbolos demonstram diferença estatística em comparação com o grupo que recebeu V + LPS (\* p<0,05), ANA 1,0 mg/pata + LPS (# p<0,05) ou ANA 1,8 mg/pata + LPS (& p<0,05).

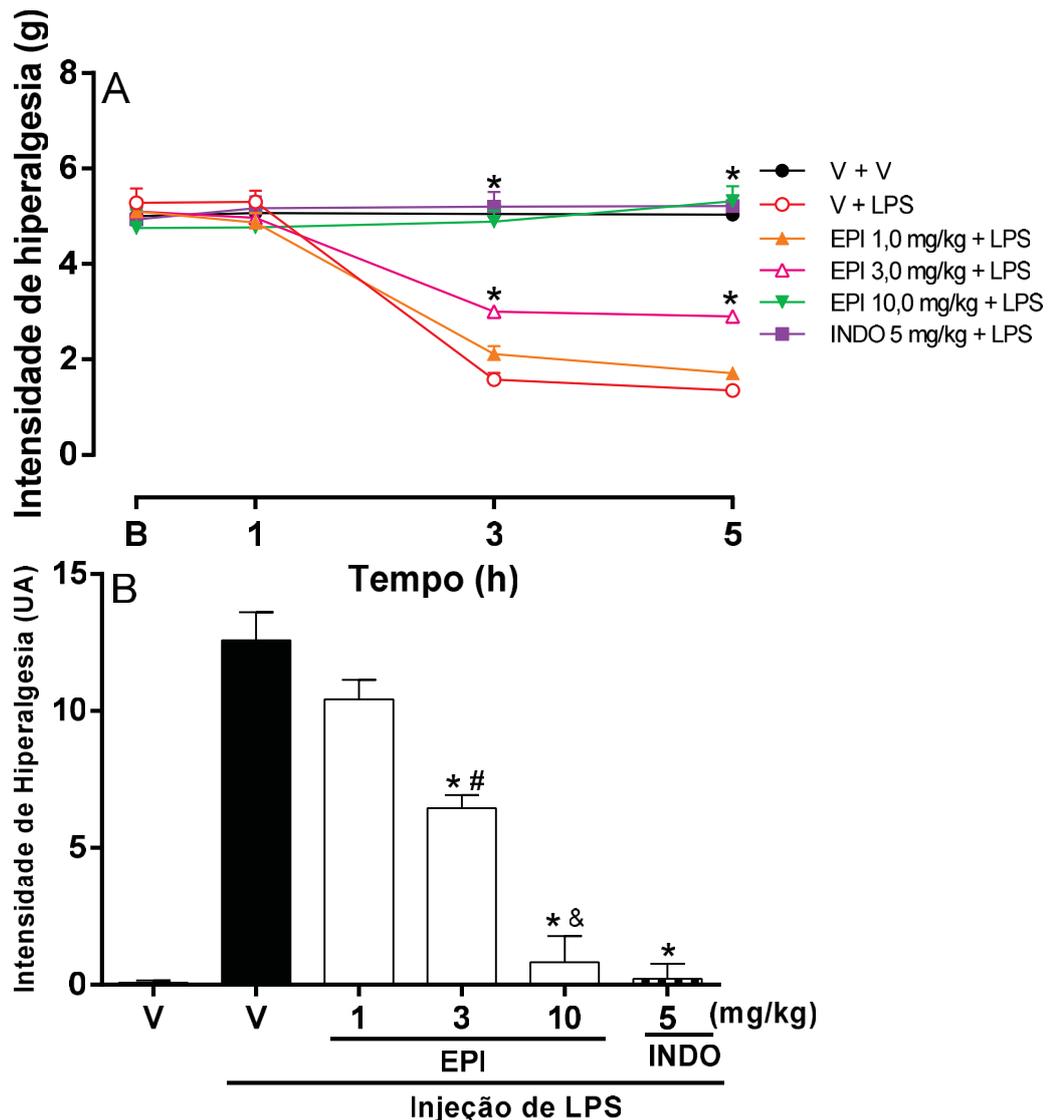


FIGURA 29: EFEITO SISTÊMICO DA 10-EPI-OLGUINE SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELO LIPOPOLISSCARÍDEO EM CAMUNDONGOS. O limiar mecânico basal (B) dos animais foi avaliado antes de qualquer tratamento. Em seguida, os animais foram tratados pela via oral com 10-*epi*-olguine (EPI) nas doses de 1,0, 3,0 ou 10,0 mg/kg, com veículo (V; Tween 80 0,1 %), ou com indometacina (INDO, 5 mg/kg). Uma hora após o tratamento, os animais receberam uma injeção ipl de lipopolissacarídeo (LPS; 100 µg/pata) como estímulo hiperalgésico. O limiar mecânico dos animais foi avaliado novamente 1, 3 e 5 h após a administração do estímulo hiperalgésico (A). O painel B mostra intensidade de hiperalgisia (U.A.) calculada a partir da área sob curva dos dados em A. Os pontos e as barras representam a média  $\pm$  E.P.M. do limiar mecânico da pata dos animais ou da intensidade de hiperalgisia (n=6-8). As diferenças entre os grupos foram analisadas por ANOVA de duas vias (A) de uma via (B), seguida pelo teste de Bonferroni. Os símbolos demonstram diferença estatística em comparação com o grupo que recebeu V + LPS (\* p<0,05), EPI 1,0 mg/pata + LPS (# p<0,05) ou EPI 3,0 mg/pata + LPS (& p<0,05).

O efeito do tratamento sistêmico dos animais com anamarine e 10-*epi*-olguine nas maiores doses também foi avaliado nos modelos de nocicepção térmica (placa aquecida) e no desempenho motor. Os resultados apresentados na Figura 30A demonstram que a anamarine e a 10-*epi*-olguine, administrados por v.o., nas mesmas doses (3,0 mg/kg e 10,0 mg/kg, respectivamente) que inibiram hiperalgesia induzida pelo LPS não aumentaram o tempo de permanência sobre a placa aquecida, ou seja, não apresentaram nenhum efeito antinocicpetivo neste modelo. Esse mesmo resultado foi observado na terceira e quinta hora após o tratamento (dados não apresentados). Por outro lado, o tratamento dos animais com fentanil, aumentou significativamente (95%) o tempo de permanência na placa aquecida quando comparado com o tratamento com veículo (Figura 30A).

De forma semelhante, a anamarine e a 10-*epi*-olguine, administrados por v.o., nas mesmas doses citadas acima, não afetaram de forma significativa o desempenho motor dos animais quando comparados com os animais que foram tratados apenas com veículo (grupo controle) (Figura 30B). Esses resultados, como nos resultados da placa aquecida, foram obtidos 1 h após o tratamento. E esse perfil se manteve na terceira e quinta hora após o tratamento (dados não apresentados). Em contraste, os animais que foram tratados com diazepam, apresentaram uma redução significativa, 95 %, da coordenação motora no teste do rota-rod, sendo esse o controle positivo desse experimento (Figura 30B).

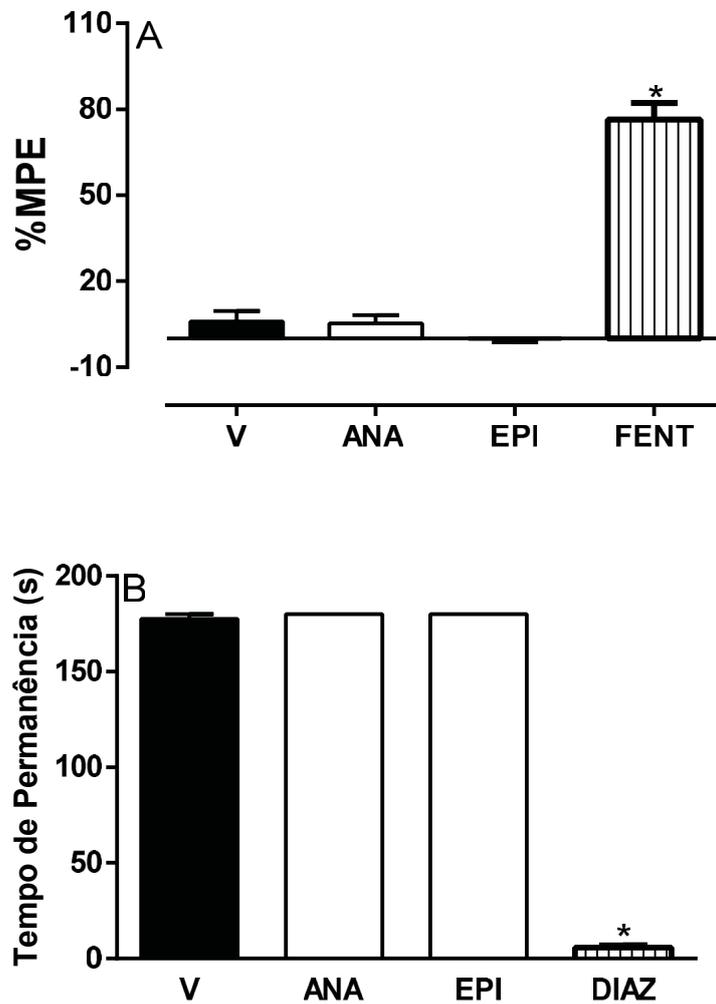


FIGURA 30: EFEITO DA ANAMARINE E DA 10-*EPI*-OLGUINE NO TESTE DE PLACA AQUECIDA E NO DESEMPENHO MOTOR EM CAMUNDONGOS. Os animais foram tratados pela via oral com Anamarine (ANA; 3,0 mg/kg), com 10-*epi*-olguine (EPI, 10,0 mg/kg) ou veículo (V) (Tween 80 0,1 %). No painel A, o comportamento nociceptivo na placa aquecida foi avaliado 1 h após os tratamentos. Animais controles receberam fentanil (FENT) (100 µg/kg sc), 15 min antes do teste. No painel B, o tempo de permanência no aparelho foi avaliado 1 h após o tratamento dos animais com ANA, EPI ou veículo (V) como indicativo do desempenho motor. Animais controles receberam diazepam (DIAZ; 5 mg/kg sc), 15 min antes do teste. Cada barra representa a média ± E.P.M. da % MEP ou do tempo de permanência no aparelho (s). As diferenças entre os grupos foram analisadas por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos. Os símbolos demonstram diferença estatística em comparação com o grupo tratado com veículo (\*  $p < 0,05$ ).

Os dados obtidos até o momento sugerem que ambas as substâncias isoladas do extrato DCM da *C. stricta*, anamarine e 10-epi-olguine apresentaram uma atividade antinociceptiva na nocicepção induzida pela administração i.pl. de LPS. A atividade destas substâncias é bastante similar àquela observada no extrato DCM, sendo bastante efetivas na hiperalgesia mecânica de origem inflamatória mas não sendo efetivas na nocicepção térmica aguda e não afetando o desempenho motor dos animais. Estes dados nos permitem afirmar que, pelo menos em parte, a atividade antinociceptiva do EEt e do DCM se deve a presença destas substâncias.

No entanto, a administração sistêmica destas substâncias neste experimento não nos permite inferir o local exato de sua ação. A complexidade da via nociceptiva ascendente apresentada no início deste estudo bem como sua modulação por vias descendentes permite diversos potenciais alvos de drogas analgésicas.

Por outro lado, estudar o mecanismo de ação destas substâncias utilizando-se a administração sistêmica demandaria maiores quantidades das substâncias purificadas que no momento não estavam disponíveis. A administração local destas substâncias poderia, portanto, visar estes dois pontos, ou seja, uma menor quantidade de material puro seria necessária para os testes e poderíamos obter pistas importantes sobre o mecanismo de ação uma vez que os dados sugeriam um efeito sobre a sensibilização de terminais nociceptivos.

Seguindo esta lógica, procedeu-se à avaliação do efeito da administração i.pl. das substâncias isoladas sobre a hiperalgesia mecânica induzida por LPS. O tratamento com a anamarine na menor dose selecionada não causou alteração significativa na hiperalgesia mecânica induzida pelo LPS quando comparado com o grupo tratado somente com o veículo (Figura 31). Entretanto, o tratamento com anamarine nas doses de 90 ou 300 ng/pata reduziu significativamente a hiperalgesia mecânica. Essa diminuição também se iniciou na terceira hora e se manteve até a quinta hora (Figura 31A). Da mesma maneira, o tratamento com indometacina reduziu significativamente a hiperalgesia mecânica induzido pelo LPS (Figura 31A). De maneira similar ao que foi observado para a administração sistêmica, a análise da intensidade de hiperalgesia demonstrou um efeito dependente da dose (Figura 31B) com reduções de 0, 48% e 86% para as doses de 30, 90 e 300 ng/pata, respectivamente. Já o tratamento com a indometacina diminuiu a hiperalgesia mecânica do LPS em 87% (Figura 31B). Além disso, podemos notar tanto no Painel

A quanto no B da Figura 31 que a administração da anamarine na maior dose testada, 300 ng/pata, não causou qualquer alteração do limiar mecânico dos animais. Com os dados obtidos para a administração local foi possível construir uma curva dose-efeito para o efeito inibitório da anamarine (Figura 31C) e calcular a dose efetiva 50% (DE50) que foi de 94 ng/pata.

A fim de confirmar que o efeito observado se tratava de um efeito local da anamarine, grupos distintos animais foram tratados na pata direita ou na pata esquerda com substância ou com veículo na pata direita. Após 15 min, os três grupos receberam uma injeção i.pl. do agente algogênico LPS sempre na pata direita, onde também foi medido o limiar mecânico. No grupo que recebeu o tratamento com anamarine na pata ipsilateral, ou seja, anamarine e LPS na mesma pata, o tratamento reverteu a hiperalgisia induzida pelo LPS na terceira hora e se manteve até a quinta hora (Figura 31D). Já o tratamento com anamarine na pata esquerda (contralateral) não modificou a hiperalgisia causada pelo LPS na pata direita do animal, confirmando que o efeito observado quando da injeção i.pl. de anamarine é local.

Os resultados obtidos com 10-*epi*-olguine foram qualitativamente idênticos. De maneira sucinta, o tratamento com a 10-*epi*-olguine na menor dose não modificou a hiperalgisia mecânica enquanto que nas doses maiores este tratamento reduziu significativamente esta resposta. Essa diminuição também se iniciou na terceira hora e se manteve até a quinta hora (Figura 32A). De maneira similar ao que foi observado para a administração sistêmica, a análise da intensidade de hiperalgisia demonstrou um efeito dependente da dose (Figura 32B) com reduções de 0, 36% e 91% para as doses de 100, 300 e 1000 ng/pata, respectivamente. Portanto, o efeito antinociceptivo da 10-*epi*-olguine, do ponto de vista quantitativo se deu em doses superiores àquelas observadas para a anamarine. Neste experimento, o tratamento com a indometacina diminuiu a hiperalgisia mecânica induzida por LPS em 91% (Figura 32B). De maneira similar a anamarine, a administração somente de 10-*epi*-olguine na pata não causou qualquer alteração do limiar mecânico dos animais. Com os dados obtidos para a administração local foi possível construir uma curva dose-efeito para o efeito inibitório da EPI (Figura 32C) e a DE50 calculada foi de 304 ng/pata. A Figura 32D, de maneira similar ao observado para anamarine, demonstra que a 10-*epi*-olguine só foi efetiva em reduzir

a hiperalgesia mecânica quando administrada na mesma pata que o LPS e não na pata contralateral sugerindo um efeito local.

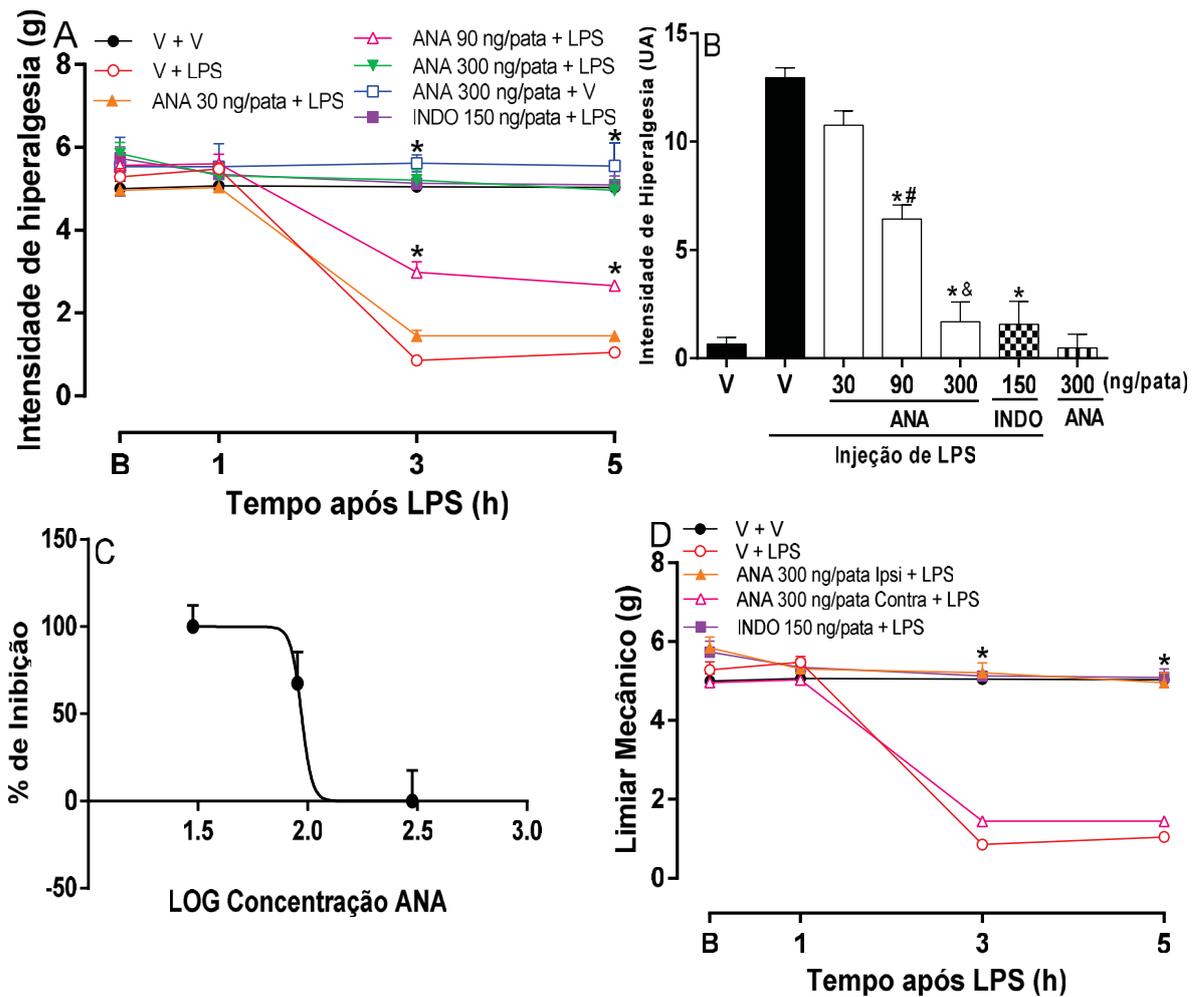


FIGURA 31: EFEITO LOCAL DA ANAMARINE SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELO LIPOPOLISSCARÍDEO EM CAMUNDONGOS. O limiar mecânico basal (B) dos animais foi avaliado antes de qualquer tratamento. Em seguida, os animais foram tratados pela via ipl com anamarine (ANA) nas doses de 30, 90 ou 100 ng/pata, com veículo (V, Tween 80 0,1 %), ou com Indometacina (INDO, 150 ng/pata). Quinze minutos após o tratamento, os animais receberam Lipopolissacarídeo (LPS, 100 µg/pata) como estímulo hiperalgésico ou veículo. O limiar mecânico dos animais foi avaliado novamente 1, 3 e 5 h após a administração do estímulo hiperalgésico (A). O painel B mostra intensidade de hiperalgesia (U.A.) calculada a partir dos dados mostrados em A. O painel C mostra o cálculo da DE50 da ANA com base nos dados de intensidade de hiperalgesia. O Painel D mostra o efeito da ANA administrada na pata ipsilateral (ipsi) ou contralateral (contra) à administração de LPS. INDO foi administrada na pata ipsilateral. Os pontos e as barras representam a média ± E.P.M. do limiar mecânico da pata dos animais, da intensidade de hiperalgesia, ou da % de inibição da hiperalgesia (n=6-8). As diferenças entre os grupos foram analisadas por ANOVA de duas vias (A e D) ou de uma via (B), seguida pelo teste de Bonferroni. Os símbolos demonstram diferença estatística em comparação com o grupo que recebeu V + LPS (\* p<0,05), ANA 30 ng/pata + LPS (# p<0,05) ou ANA 90 ng/pata + LPS (& p<0,05).

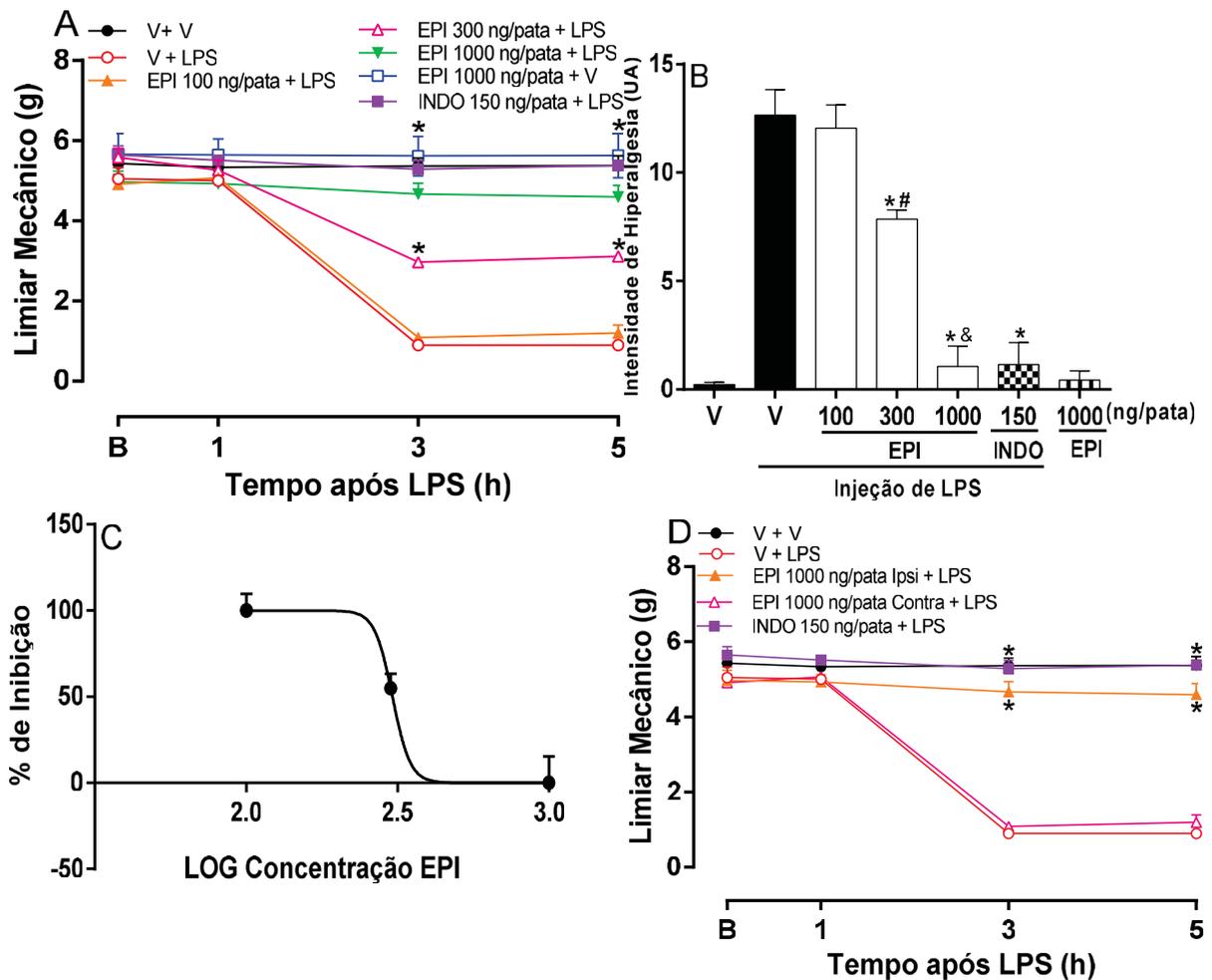


FIGURA 32: EFEITO LOCAL DA 10-EPI-OLGUINE SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELO LIPOPOLISSCARÍDEO EM CAMUNDONGOS. O limiar mecânico basal (B) dos animais foi avaliado antes de qualquer tratamento. Em seguida, os animais foram tratados pela via ipsilateral com 10-*epi*-olguine (EPI) nas doses de 100, 300 ou 1000 ng/pata, com veículo (V; Tween 80 0,1%), ou com indometacina (INDO, 150 ng/pata). Quinze minutos após o tratamento, os animais receberam lipopolissacarídeo (LPS, 100 µg/pata) como estímulo hiperalgésico ou veículo. Foi medido o limiar mecânico dos animais em 1, 3 e 5 horas (h) após a administração do estímulo hiperalgésico e seu resultado está expresso como Intensidade de hiperalgesia (g) (B = limiar basal dos animais). O painel B mostra intensidade de hiperalgesia (U.A.). O painel C mostra o cálculo da IC<sub>50</sub> da EPI com base nos dados de intensidade de hiperalgesia. O Painel D mostra o efeito da EPI administrada na pata ipsilateral (ipsi) ou contralateral (contra) à administração de LPS. INDO foi administrada na pata ipsilateral. Os pontos e as barras representam a média ± E.P.M. do limiar mecânico da pata dos animais, da intensidade de hiperalgesia, ou da % de inibição da hiperalgesia (n=6-8). As diferenças entre os grupos foram analisadas por ANOVA de duas vias (A e D) ou de uma via (B), seguida pelo teste de Bonferroni. Os símbolos demonstram diferença estatística em comparação com o grupo que recebeu V + LPS (\* p<0,05), EPI 100 ng/pata + LPS (# p<0,05) ou EPI 300 ng/pata + LPS (& p<0,05).

Os dados obtidos nestes experimentos demonstram que tanto a anamarine quanto a 10-*epi*-olguine possuem um efeito local na redução da hiperalgisia inflamatória induzida por LPS. É importante ressaltar, entretanto, que a ocorrência deste efeito local não exclui a possibilidade destas substâncias possuírem outros sítios de ação quando da administração sistêmica que podem incluir inclusive sítios no sistema nervoso central.

Como podemos observar ainda, as doses de anamarine que foram efetivas em reduzir a hiperalgisia mecânica induzida por LPS foram inferiores as doses necessárias para se obter um efeito similar na hiperalgisia do que com 10-*epi*-olguine. A construção de uma curva da % de inibição (efeito) pela dose nos permitiu calcular a DE50 das duas substâncias. Embora a concentração das substâncias em base molar não tenha sido utilizada para estes cálculos (o que aumentaria a precisão desta informação) a fim de manter-se as mesmas unidades de massa através do estudo, a anamarine e a 10-*epi*-olguine possuem massas moleculares bastante similares. A comparação destas DE50 demonstrou que a 10-*epi*-olguine possui uma DE50 aproximadamente 3 vezes superior a anamarine (304 x 94 ng/pata, respectivamente) demonstrando que esta última é a mais potente das substâncias presentes na *C. stricta*.

A constatação deste efeito local das duas substâncias nos permitiu dar continuidade ao estudo utilizando a administração local das substâncias e, portanto, uma menor quantidade de substância isolada foi necessária.

Além da atividade antinociceptiva, o EEt e o DCM apresentaram também atividade anti-edematogênica, o que sugeriu que a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória nestes extratos poderiam estar correlacionadas. Assim, para avaliar se o mesmo se repetia com as substâncias isoladas, avaliou-se o efeito destas substâncias no edema de pata induzido por carragenina. O tratamento i.pl. com o anamarine (300ng/pata) e com 10-*epi*-olguine (1000ng/pata) reduziu significativamente edema induzido por carragenina sendo que este efeito mostrou-se evidente na fase mais tardia do processo, entre a terceira e quinta hora (Figura 33A). O tratamento com o nosso controle positivo dexametasona também apresentou o mesmo perfil das moléculas testadas (Figura 33A). Analisando somente o efeito na quinta hora após a aplicação da carragenina observamos que o tratamento com a anamarine e com a 10-*epi*-olguine reduziu o edema em 55% e 39%,

respectivamente (Figura 33B) enquanto a dexametasona reduziu em 57% (Figura 33B).

Estes dados demonstram que, assim como para o efeito antinociceptivo, a anamarine e a 10-*epi*-olguine possuem um efeito anti-inflamatório local. Estes dados sugerem, mais uma vez, que os efeitos antinociceptivo (particularmente a redução da hiperalgesia mecânica inflamatória) e o efeito anti-inflamatório destas substâncias estão correlacionados.

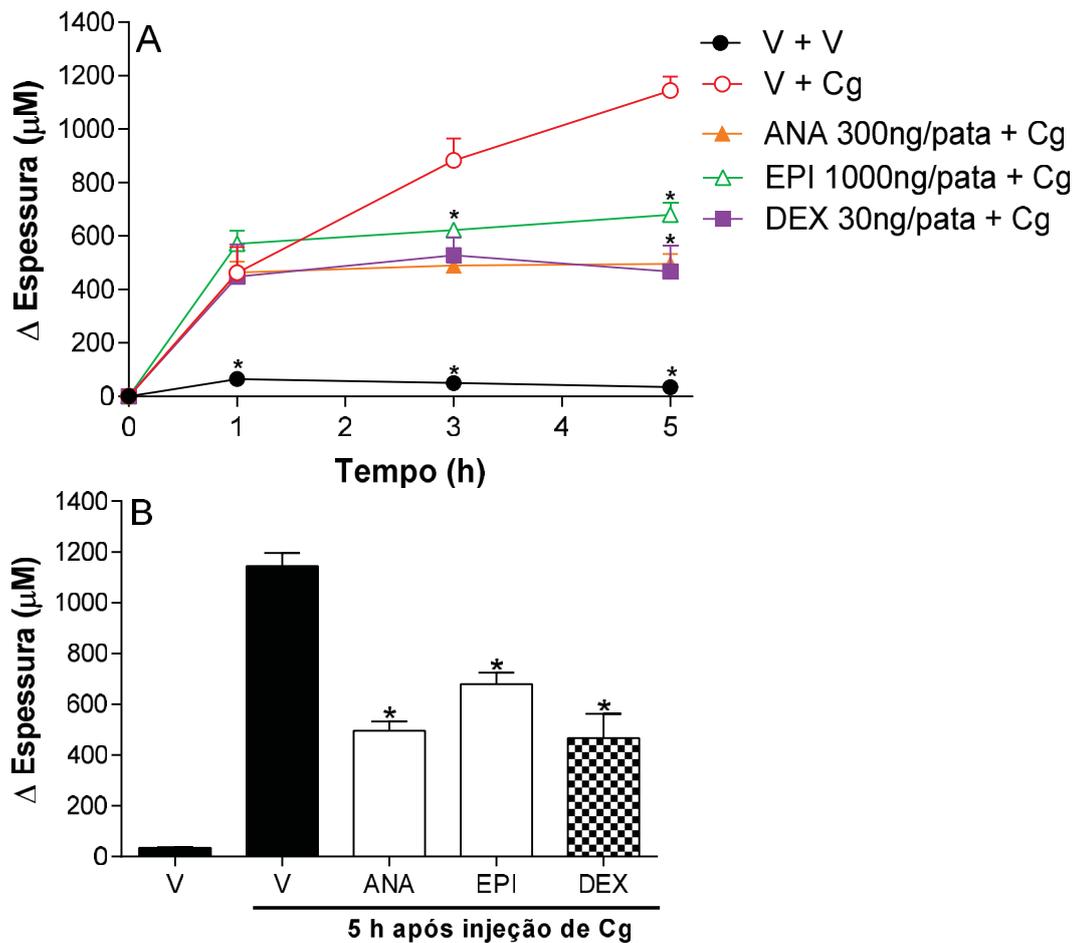


FIGURA 33: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO LOCAL DA ANAMARINE E DA 10-EPI-OLGUINE SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS. Os animais foram tratados pela via intraplantar com Anamarine (ANA, 300ng/pata), 10-*epi*-olguine (EPI, 1000ng/pata), veículo (V, Tween 80 0,1 %) ou dexametasona (DEX, 30 ng/pata). Uma hora após o tratamento os animais receberam Carragenina (Cg, 300 μg/pata) como estímulo inflamatório e a espessura da pata avaliada nos tempos indicados (A). O painel B mostra uma comparação dos resultados 5 h após a administração de Cg. Os pontos e as barras representam a média  $\pm$  E.P.M. da espessura ( $\mu$ m) da pata dos animais ( $n=6-8$ ) nos diferentes tempos após a injeção de Cg ou na quinta hora após a administração de Cg, respectivamente. As diferenças entre os grupos foram analisadas por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. Os símbolos demonstram diferença estatística em comparação com o grupo tratado com V + Cg (\*  $p<0,05$ ).

#### 4.5.2 EFEITO DA ANAMARINE E DA 10-*EPI*-OLGUINE NA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA POR DIFERENTES ESTÍMULOS.

A identificação do efeito local da anamarine e da 10-*epi*-olguine nos permitiu estudar com um pouco mais de detalhes seu modo de ação. Para tanto, o efeito da administração local dessas moléculas foi avaliado na hiperalgesia mecânica induzida por diferentes estímulos algogênicos.

De maneira surpreendente, apesar de serem efetivas em reduzir a hiperalgesia induzida por LPS, ambas as substâncias não modificaram a hiperalgesia induzida por TNF- $\alpha$  (Figura 34A) e IL-1 $\beta$  (Figura 34B), duas das citocinas mais comumente relacionadas ao efeito nociceptivo do LPS. Diversos estudos demonstram que estas citocinas induzem a síntese de COX-2 (SAMAD et al., 2001; SCHAFERS et al., 2004; BASBAUM et al., 2009) com consequente geração de prostaglandinas que estão entre os principais indutores de hiperalgesia inflamatória (FERREIRA et al., 1973; SAMAD et al., 2001; ANWAR, 2016; BELL, 2018). O efeito antinociceptivo dos anti-inflamatórios não esteroidais como a aspirina e a indometacina, está relacionado ao bloqueio desta enzima e portanto das prostaglandinas (FERREIRA et al., 1973; VARELA et al., 2018). De fato, nosso controle positivo indometacina foi efetivo em bloquear a hiperalgesia induzida por ambas as citocinas (Figura 34A e Figura 34B). Portanto, estes dados sugerem que a anamarine e 10-*epi*-olguine possuem um mecanismo de ação diferente dos anti-inflamatórios não esteroidais clássicos.

Alguns estudos demonstram que a hiperalgesia induzida por LPS possui dois componentes importantes, o componente prostaglandina e o componente simpático (Calil et al., 2014; Cunha et al., 2007). Ambos são capazes, dentre outros mecanismos, de ativar a adenilato ciclase e promover o aumento de AMPc dentro do terminal nociceptivo. Este aumento de AMPc promove, através principalmente da ativação de PKA, a ativação dos canais de sódio Nav<sub>1.8</sub> e Nav<sub>1.9</sub>, responsáveis em última análise, pela entrada de sódio no terminal e consequente redução do limiar de excitação que caracteriza o estado hiperalgésico (CUNHA et al., 1999; DINA et al., 2001; KAWABATA, 2011). De fato, nossos resultados demonstram que a administração de PGE<sub>2</sub> (Figura 34C), das aminas simpatomiméticas dopamina (Figura 34D) e epinefrina (Figura 34E), do ativador da adenilato ciclase forskolina

(Figura 34F) e de uma forma estável do AMPc, o dbAMPc (Figura 34G) induziram hiperalgesia nos animais. Nestes experimentos foi utilizado como controle positivo a dipirona, que embora seja classificada como anti-inflamatório não esteroide, possui mecanismos de ação adicionais. Já foi demonstrado que a administração local de dipirona promove a abertura de canais de potássio sensíveis ao ATP, permitindo a saída de  $K^+$  das células sensibilizadas. Esta saída de cargas positivas é responsável pela restauração do limiar do nociceptor aos níveis prévios à sensibilização (ALVES e DUARTE, 2002). Assim, como mostrado em nossos experimentos, a dipirona reverte a hiperalgesia induzida por todos estes estímulos (Figuras 34C a 34G). Diferentemente da dipirona, a anamarine e a 10-*epi*-olguine não modificaram a hiperalgesia induzida por  $PGE_2$ , forskolina e dbAMPc mas foram efetivas em abolir a hiperalgesia induzida pelas aminas simpatomiméticas dopamina e epinefrina (Figura 34F e 34G, respectivamente).

Estes dados sugerem que o efeito antinociceptivo destas substâncias não está relacionado ao componente prostaglandina da hiperalgesia mecânica, mas sim ao componente simpático desta resposta. Embora tanto as prostaglandinas como as aminas simpatomiméticas dividam um mecanismo comum de geração de hiperalgesia que envolve o aumento de AMPc no terminal nociceptivo, existem autores que sugerem que a hiperalgesia pode ser gerada através de outros segundos mensageiros. Em 2001, Dina e colaboradores demonstraram que em camundongos machos, enquanto a  $PGE_2$  utiliza somente a ativação de PKA para gerar hiperalgesia a epinefrina, através da ativação de receptores  $\beta$  adrenérgicos por utilizar, além da PKA, a MEK e a  $PKC\epsilon$  (DINA et al., 2001).

O TPA é um conhecido ativador de PKC e estudos anteriores já demonstravam que a injeção ipl de TPA induz hiperalgesia mecânica. Nossos dados corroboram esta observação. A administração de TPA promoveu uma redução do limiar mecânico dos animais (Figura 34H). O tratamento dos animais com ANA e EPI aboliu esta resposta hiperalgésica (Figura 34H). Estes dados sugerem que o efeito antinociceptivo destas substâncias está relacionado a ativação de PKC durante a hiperalgesia. Portanto, não é de surpreender que estas substâncias não bloqueiem vias essencialmente relacionadas à ativação da PKA como o que ocorre após a administração de  $PGE_2$ , forskolina e o próprio AMPc.

Para corroborar estes dados, um último experimento foi feito. Interessantemente, Dina et al. (2001) demonstraram uma diferença essencial entre machos e fêmeas quanto as vias indutoras de hiperalgesia com relação à epinefrina. Enquanto em machos, como citado anteriormente, a EPI ativava 3 vias de transdução de sinal (PKA, a MEK e a PKC $\epsilon$ ), em fêmeas, este agonista ativa somente a via de transdução de sinal através da MEK. Portanto, considerando que a ativação da PKC $\epsilon$  seria o principal alvo da ANA e da EPI, estas substâncias não deveriam ser efetivas na hiperalgesia induzida por epinefrina em fêmeas. Corroborando esta hipótese, enquanto o tratamento dos camundongos machos com ANA e EPI aboliu a hiperalgesia mecânica induzida por epinefrina em machos (Figura 35A) estas foram inefetivas na hiperalgesia mecânica em fêmeas (Figura 35B).

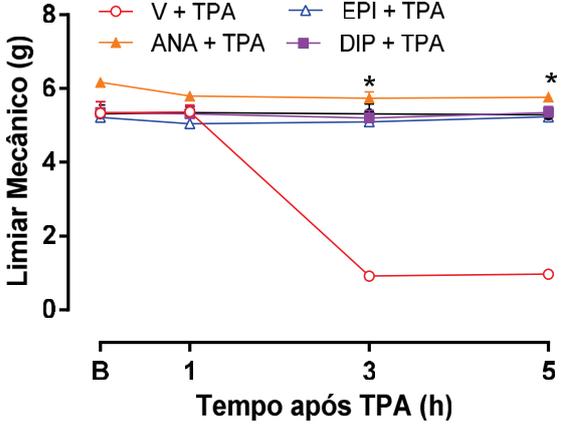
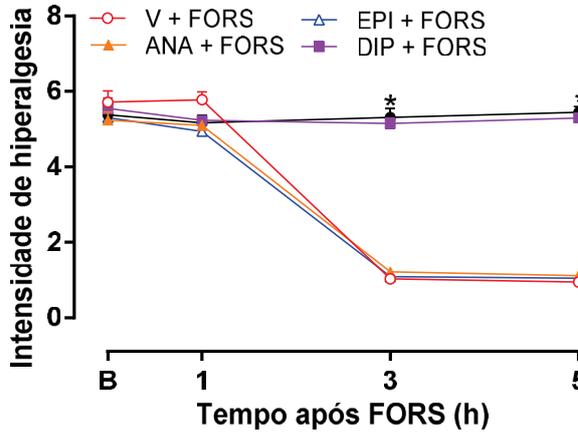
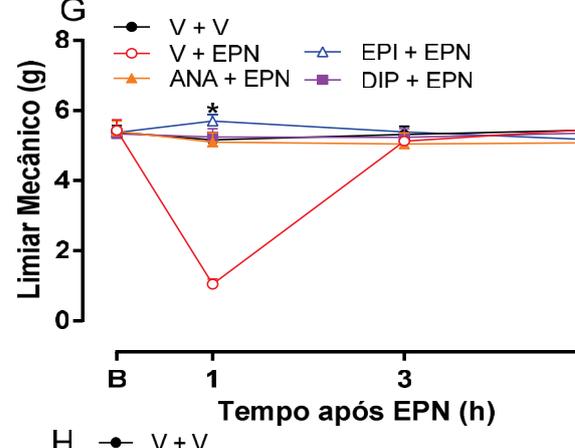
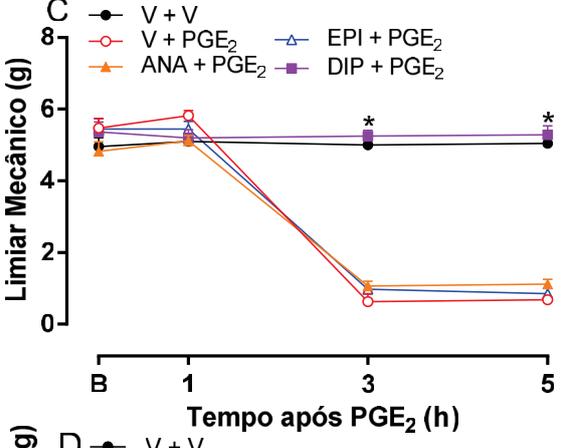
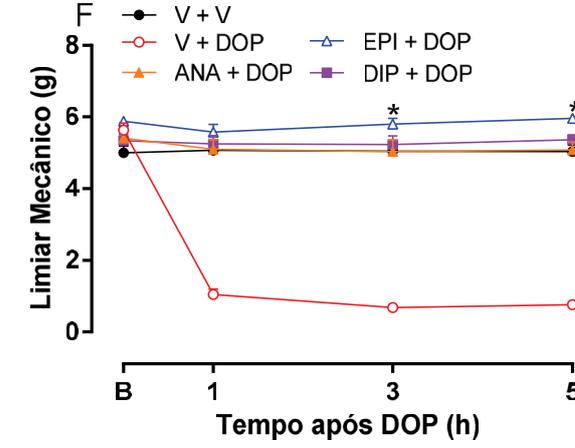
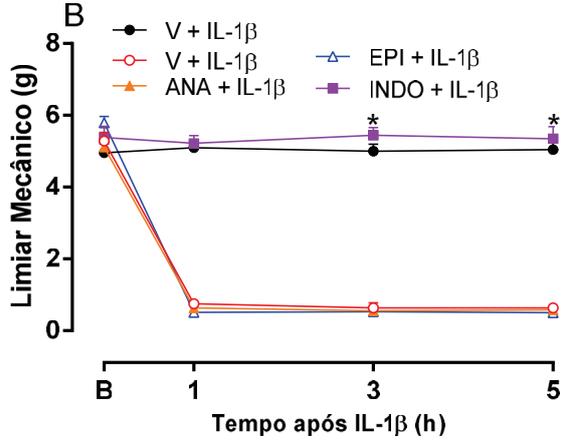
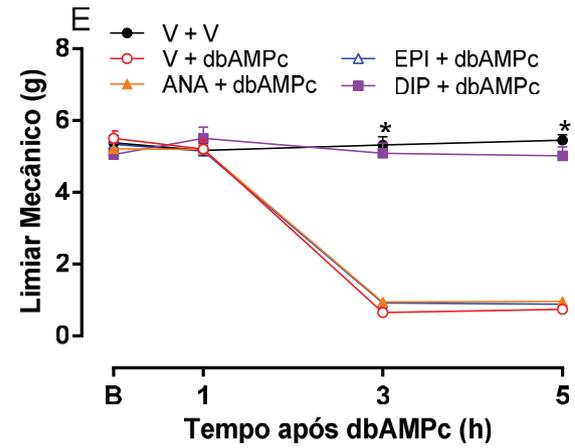
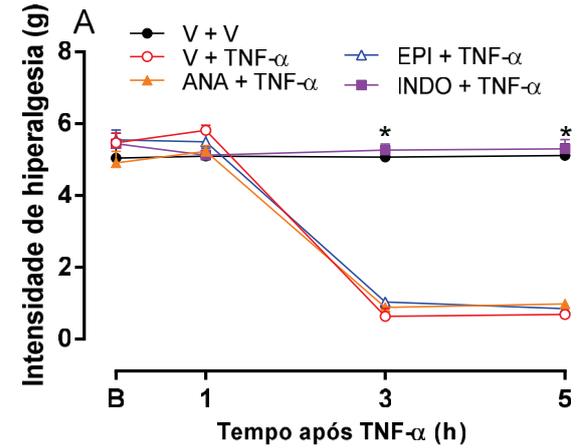


FIGURA 34: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO LOCAL DA ANAMARINE E DA 10-*EPI*-OLGUINE SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA POR SUBSTÂNCIAS ALGOGÊNICAS EM CAMUNDONGOS. O limiar mecânico basal (B) dos animais foi avaliado antes de qualquer tratamento. Em seguida, os animais foram tratados com anamarine (ANA, 300 ng/pata), 10-*epi*-olguine (EPI, 1000 ng/pata), veículo (V, Tween 80 0,1 %), indometacina (INDO, 150 ng/pata) ou dipirona (DIP, 320 µg/pata) na pata direita. Quinze minutos após o tratamento, os animais receberam fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , 1 pg/pata, painel A), Interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ , 100 pg/pata, painel B), prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>, 100 ng/pata, painel C), Forscolina (FORS, 1 µg/pata, painel D), dibutilil adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (dbAMPc, 5 µg/pata, painel E), Dopamina (DOP, 3 µg/pata, painel F), Epinefrina (EPN, 100 ng/pata, painel G) ou 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA, 50 pmol/pata, painel H) na pata direita como estímulo hiperalgésico. O limiar mecânico dos animais foi avaliado novamente 1, 3 e 5 h após a administração do estímulo. Os pontos representam a média  $\pm$  E.P.M. da variação do limiar mecânico da pata dos animais (n=6-8). As diferenças entre os grupos foram analisadas por ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Bonferroni. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. Os símbolos demonstram diferença estatística em comparação com o grupo que recebeu o mediador inflamatório e foi tratado com V (\*  $p < 0,05$ ).

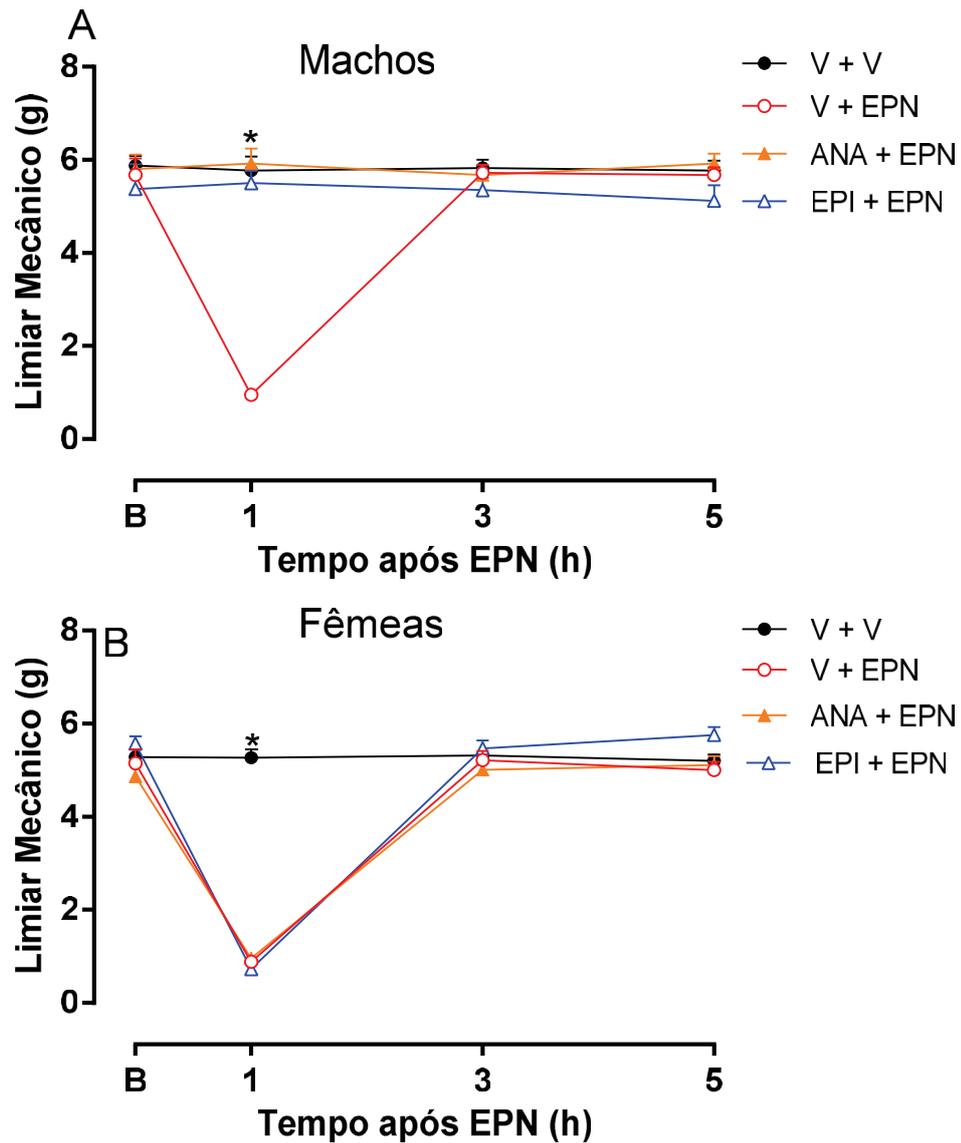


FIGURA 35: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO LOCAL DA ANAMARINE E DA 10-EPI-OLGUINE SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA POR EPINEFRINA EM CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS. O limiar mecânico basal (B) dos animais foi avaliado antes de qualquer tratamento. Em seguida, os animais foram tratados com anamrine (ANA, 300 ng/pata), 10-*epi*-olguine (EPI, 1000 ng/pata) ou veículo (V, Tween 80 0,1 %) na pata direita. Quinze minutos após o tratamento, os animais receberam Epinefrina (EPN, 100 ng/pata) na pata direita. O limiar mecânico dos animais foi avaliado novamente 1, 3 e 5 h após a administração do estímulo hiperálgico. Os pontos e as barras representam a média  $\pm$  E.P.M. do limiar mecânico (g) da pata dos animais machos (A) ou fêmeas (B). As diferenças entre os grupos foram analisadas por ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Bonferroni. Os símbolos demonstram diferença estatística em comparação com o grupo que recebeu o mediador inflamatório e foi tratado com V (\*  $p < 0,05$ ).

## 5 PERSPECTIVAS FUTURAS

Em virtude dos achados nesse trabalho, acreditamos que tanto a anamarine quanto a 10-*epi*-olguine são boas candidatas para a continuação com a pesquisa para um possível desenvolvimento de um fármaco. Durante os experimentos, com as doses testadas, os animais não apresentaram mudanças de comportamentos e não foi observado nenhum indicio de toxicidade aparente. Contudo, um próximo passo nos ensaios pré-clínicos seria realizar os estudos toxicidade aguda, toxicidade crônica e genotoxicidade.

Como acreditamos que as duas moléculas estejam modulando a PKC $\epsilon$  elas poderiam, além de serem utilizadas para o tratamento de dor inflamatória, ser utilizadas para o tratamento de outros tipos de dor. Pois existem evidências da participação da PKC $\epsilon$  na dor por quimioterápicos como o paclitaxel (GAO et al., 2016) e algumas dores neuropáticas (MOODIE et al., 2013; CAPUANI et al., 2016; CHOI et al., 2019). Sendo que algumas dessas fisiopatologias carecem de tratamentos mais eficazes. Assim, tanto a Anamarine quanto a 10-*epi*-olguine poderiam ser utilizadas em tais situações.

## 6 CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou que:

- O extrato etanólico de *Cantinoa stricta* apresenta uma importante atividade antinociceptiva e antiedematogênica.
- A atividade antinociceptiva desta planta está relacionada a redução da hiperalgesia mecânica inflamatória, não sendo efetiva na redução de dores agudas não inflamatórias, particularmente de origem térmica.
- Dos extratos obtidos desta planta foram purificadas e testadas duas substâncias farmacologicamente ativas a anamarine e a 10-epi-olguine, relacionadas as atividades descritas para os extratos.
- Estas substâncias apresentaram atividade antinociceptiva tanto quando administradas por via oral quanto por diretamente no local, também sobre a hiperalgesia mecânica de origem inflamatória.
- A anamarine é cerca de 3 vezes mais potente que a 10-epi-olguine considerando os testes utilizados neste estudo.
- A atividade anti-inflamatória destas substâncias também ocorre por um efeito local.
- Estas substâncias não atuam por mecanismos similares à outros analgésicos conhecidos como anti-inflamatórios não esteroidais, dipirone ou opióides mas atuam modulando a atividade/ação da PKC $\epsilon$  na sensibilização dos nociceptores.

## REFERÊNCIAS

ABRAIRA, V. E. et al. The Cellular and Synaptic Architecture of the Mechanosensory Dorsal Horn. **Cell**, v. 168, n. 1-2, p. 295-310 e19, Jan 12 2017.

ABU-DARWISH, M. S. et al. Essential oil of common sage (*Salvia officinalis* L.) from Jordan: assessment of safety in mammalian cells and its antifungal and anti-inflammatory potential. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 538940, 2013.

ADCOCK, I. M.; MUMBY, S. Glucocorticoids. **Handb Exp Pharmacol**, v. 237, p. 171-196, 2017.

AGHASAFARI, P.; GEORGE, U.; PIDAPARTI, R. A review of inflammatory mechanism in airway diseases. **Inflamm Res**, v. 68, n. 1, p. 59-74, Jan 2019.

AGITA, A.; ALSAGAFF, M. T. Inflammation, Immunity, and Hypertension. **Acta Med Indones**, v. 49, n. 2, p. 158-165, Apr 2017.

AHMED, A. U. An overview of inflammation: mechanism and consequences. **Frontiers in Biology**, v. 6, n. 4, p. 274, July 29 2011.

AJONA, D.; ORTIZ-ESPINOSA, S.; PIO, R. Complement anaphylatoxins C3a and C5a: Emerging roles in cancer progression and treatment. **Semin Cell Dev Biol**, v. 85, p. 153-163, Jan 2019.

AKBARI, E. The role of cyclo-oxygenase inhibitors in attenuating opioid-induced tolerance, hyperalgesia, and dependence. **Med Hypotheses**, v. 78, n. 1, p. 102-6, Jan 2012.

AL-CHALABI, M.; REDDY, V.; GUPTA, S. Neuroanatomy, Spinothalamic Tract. In: (Ed.). **StatPearls**. Treasure Island (FL), 2020.

ALEMANY, A. et al. New compounds from Hyptis. X-ray crystal and molecular structures of anamarine. **Tetrahedron Letters**, v. 20, n. 37, p. 3583-3586, 1979.

ALVES, D.; DUARTE, I. Involvement of ATP-sensitive K(+) channels in the peripheral antinociceptive effect induced by dipyrone. **Eur J Pharmacol**, v. 444, n. 1-2, p. 47-52, May 24 2002.

AMARANTE-MENDES, G. P. et al. Pattern Recognition Receptors and the Host Cell Death Molecular Machinery. **Front Immunol**, v. 9, p. 2379, 2018.

ANCION, A. et al. A Review of the Role of Bradykinin and Nitric Oxide in the Cardioprotective Action of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors: Focus on Perindopril. **Cardiol Ther**, v. 8, n. 2, p. 179-191, Dec 2019.

ANNIBALDI, A.; MEIER, P. Checkpoints in TNF-Induced Cell Death: Implications in Inflammation and Cancer. **Trends Mol Med**, v. 24, n. 1, p. 49-65, Jan 2018.

ANTHONEY, N.; FOLDI, I.; HIDALGO, A. Toll and Toll-like receptor signalling in development. **Development**, v. 145, n. 9, Apr 25 2018.

ANWAR, K. Pathophysiology of pain. **Dis Mon**, v. 62, n. 9, p. 324-9, Sep 2016.

APKARIAN, A. V. et al. Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. **Eur J Pain**, v. 9, n. 4, p. 463-84, Aug 2005.

ARANDA, J. V. et al. Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs in Newborns and Infants. **Pediatr Clin North Am**, v. 64, n. 6, p. 1327-1340, Dec 2017.

ARCILLA, C. K.; TADI, P. Neuroanatomy, Unmyelinated Nerve Fibers. In: (Ed.). **StatPearls**. Treasure Island (FL), 2020.

ARENDRT-NIELSEN, L. et al. Assessment and manifestation of central sensitisation across different chronic pain conditions. **Eur J Pain**, v. 22, n. 2, p. 216-241, Feb 2018.

ARMSTRONG, S. A.; HERR, M. J. Physiology, Nociception. In: (Ed.). **StatPearls**. Treasure Island (FL), 2020.

ARRIAGADA, C.; SILVA, P.; TORRES, V. A. Role of glycosylation in hypoxia-driven cell migration and invasion. **Cell Adh Migr**, v. 13, n. 1, p. 13-22, Dec 2019.

ASTANI, A.; REICHLING, J.; SCHNITZLER, P. Melissa officinalis extract inhibits attachment of herpes simplex virus in vitro. **Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 70-7, 2012.

AYROLDI, E.; MACCHIARULO, A.; RICCARDI, C. Targeting glucocorticoid side effects: selective glucocorticoid receptor modulator or glucocorticoid-induced leucine zipper? A perspective. **FASEB J**, v. 28, n. 12, p. 5055-70, Dec 2014.

AZAB, A.; NASSAR, A.; AZAB, A. N. Anti-Inflammatory Activity of Natural Products. **Molecules**, v. 21, n. 10, Oct 1 2016.

BACCHI, S. et al. Clinical pharmacology of non-steroidal anti-inflammatory drugs: a review. **Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem**, v. 11, n. 1, p. 52-64, 2012.

BALEMANS, D. et al. Transient receptor potential ion channel function in sensory transduction and cellular signaling cascades underlying visceral hypersensitivity. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 312, n. 6, p. G635-G648, Jun 1 2017.

BANNISTER, K.; DICKENSON, A. H. The plasticity of descending controls in pain: translational probing. **J Physiol**, v. 595, n. 13, p. 4159-4166, Jul 1 2017.

BANNON, A. W.; MALMBERG, A. B. Models of nociception: hot-plate, tail-flick, and formalin tests in rodents. **Curr Protoc Neurosci**, v. Chapter 8, p. Unit 8 9, Oct 2007.

BARBOSA, F. L. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the ethanolic extract, fractions and 8-methoxylapachenol from *Sinningia allagophylla* tubers. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 113, n. 1, p. 1-7, Jul 2013.

BARDAWEEL, S. K. et al. Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and Antiproliferative activities of essential oil of *Mentha spicata* L. (Lamiaceae) from Algerian Saharan atlas. **BMC Complement Altern Med**, v. 18, n. 1, p. 201, Jul 3 2018.

BARTEKOVA, M. et al. Role of cytokines and inflammation in heart function during health and disease. **Heart Fail Rev**, v. 23, n. 5, p. 733-758, Sep 2018.

BASANTSOVA, N. Y. et al. Small-fiber neuropathy definition, diagnosis, and treatment. **Neurol Sci**, v. 40, n. 7, p. 1343-1350, Jul 2019.

BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-84, Oct 16 2009.

BEAUDRY, H. et al. Distinct behavioral responses evoked by selective optogenetic stimulation of the major TRPV1+ and MrgD+ subsets of C-fibers. **Pain**, v. 158, n. 12, p. 2329-2339, Dec 2017.

BEAZLEY-LONG, N. et al. The physiological functions of central nervous system pericytes and a potential role in pain. **F1000Res**, v. 7, p. 341, 2018.

BEKUT, M. et al. Potential of selected Lamiaceae plants in anti(retro)viral therapy. **Pharmacol Res**, v. 133, p. 301-314, Jul 2018.

BELANGER, P.; WEST, C. R.; BROWN, M. T. Development of pain therapies targeting nerve growth factor signal transduction and the strategies used to resolve safety issues. **J Toxicol Sci**, v. 43, n. 1, p. 1-10, 2018.

BELL, A. The neurobiology of acute pain. **Vet J**, v. 237, p. 55-62, Jul 2018.

BENNETT, D. L. et al. The Role of Voltage-Gated Sodium Channels in Pain Signaling. **Physiol Rev**, v. 99, n. 2, p. 1079-1151, Apr 1 2019.

BENNETT, M.; GILROY, D. W. Lipid Mediators in Inflammation. **Microbiol Spectr**, v. 4, n. 6, Nov 2016.

BENT, R. et al. Interleukin-1 Beta-A Friend or Foe in Malignancies? **Int J Mol Sci**, v. 19, n. 8, Jul 24 2018.

BENYAMIN, R. et al. Opioid complications and side effects. **Pain Physician**, v. 11, n. 2 Suppl, p. S105-20, Mar 2008.

BERNARDI, M. et al. Mechanisms of decompensation and organ failure in cirrhosis: From peripheral arterial vasodilation to systemic inflammation hypothesis. **J Hepatol**, v. 63, n. 5, p. 1272-84, Nov 2015.

BLASZCZYK, L. et al. Sequential alteration of microglia and astrocytes in the rat thalamus following spinal nerve ligation. **J Neuroinflammation**, v. 15, n. 1, p. 349, Dec 20 2018.

BOHN, L. M.; AUBE, J. Seeking (and Finding) Biased Ligands of the Kappa Opioid Receptor. **ACS Med Chem Lett**, v. 8, n. 7, p. 694-700, Jul 13 2017.

BORASCHI, D. et al. The family of the interleukin-1 receptors. **Immunol Rev**, v. 281, n. 1, p. 197-232, Jan 2018.

BOUNIHI, A. et al. In Vivo Potential Anti-Inflammatory Activity of Melissa officinalis L. Essential Oil. **Adv Pharmacol Sci**, v. 2013, p. 101759, 2013.

BRANCO, A. et al. Role of Histamine in Modulating the Immune Response and Inflammation. **Mediators Inflamm**, v. 2018, p. 9524075, 2018.

BREYER, R. M. et al. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 41, p. 661-90, 2001.

BUJAK, J. K. et al. Inflammation, Cancer and Immunity-Implication of TRPV1 Channel. **Front Oncol**, v. 9, p. 1087, 2019.

BURKE, N. N. et al. Psychological stress in early life as a predisposing factor for the development of chronic pain: Clinical and preclinical evidence and neurobiological mechanisms. **J Neurosci Res**, v. 95, n. 6, p. 1257-1270, Jun 2017.

BURSTEIN, S. H. The chemistry, biology and pharmacology of the cyclopentenone prostaglandins. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v. 148, p. 106408, Jun 2020.

CALDER, P. C. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man. **Biochem Soc Trans**, v. 45, n. 5, p. 1105-1115, Oct 15 2017.

CALIL, I. L. et al. Lipopolysaccharide induces inflammatory hyperalgesia triggering a TLR4/MyD88-dependent cytokine cascade in the mice paw. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e90013, 2014.

CAPECKA, E.; MARECZEK, A.; LEJA, M. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. **Food chemistry**, v. 93, n. 2, p. 223-226, 2005/11// 2005.

CAPUANI, B. et al. The role of epsilon PKC in acute and chronic diseases: Possible pharmacological implications of its modulators. **Pharmacol Res**, v. 111, p. 659-667, Sep 2016.

CARACI, F. et al. Rescue of Noradrenergic System as a Novel Pharmacological Strategy in the Treatment of Chronic Pain: Focus on Microglia Activation. **Front Pharmacol**, v. 10, p. 1024, 2019.

CARRICONDO, F.; ROMERO-GOMEZ, B. The Cochlear Spiral Ganglion Neurons: The Auditory Portion of the VIII Nerve. **Anat Rec (Hoboken)**, v. 302, n. 3, p. 463-471, Mar 2019.

CARTWRIGHT, J. A.; LUCAS, C. D.; ROSSI, A. G. Inflammation Resolution and the Induction of Granulocyte Apoptosis by Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Drugs. **Front Pharmacol**, v. 10, p. 55, 2019.

CASES, J. et al. Pilot trial of Melissa officinalis L. leaf extract in the treatment of volunteers suffering from mild-to-moderate anxiety disorders and sleep disturbances. **Med J Nutrition Metab**, v. 4, n. 3, p. 211-218, Dec 2011.

CASTARDO, J. C. et al. Anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract and two biflavonoids from *Garcinia gardneriana* leaves in mouse paw oedema. **J Ethnopharmacol**, v. 118, n. 3, p. 405-11, Aug 13 2008.

CHAN, C. C. et al. Do COX-2 inhibitors raise blood pressure more than nonselective NSAIDs and placebo? An updated meta-analysis. **J Hypertens**, v. 27, n. 12, p. 2332-41, Dec 2009.

CHEN, S. R. et al. Streptozotocin-Induced Diabetic Neuropathic Pain Is Associated with Potentiated Calcium-Permeable AMPA Receptor Activity in the Spinal Cord. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 371, n. 2, p. 242-249, Nov 2019.

CHIFFOLEAU, E. C-Type Lectin-Like Receptors As Emerging Orchestrators of Sterile Inflammation Represent Potential Therapeutic Targets. **Front Immunol**, v. 9, p. 227, 2018.

CHIU, I. M.; VON HEHN, C. A.; WOOLF, C. J. Neurogenic inflammation and the peripheral nervous system in host defense and immunopathology. **Nat Neurosci**, v. 15, n. 8, p. 1063-7, Jul 26 2012.

CHOI, S. I.; HWANG, S. W. Depolarizing Effectors of Bradykinin Signaling in Nociceptor Excitation in Pain Perception. **Biomol Ther (Seoul)**, v. 26, n. 3, p. 255-267, May 1 2018.

CHOI, S. R. et al. nNOS-PSD95 interactions activate the PKC-epsilon isoform leading to increased GluN1 phosphorylation and the development of neuropathic mechanical allodynia in mice. **Neurosci Lett**, v. 703, p. 156-161, Jun 11 2019.

CHOPRA, S. et al. IRE1alpha-XBP1 signaling in leukocytes controls prostaglandin biosynthesis and pain. **Science**, v. 365, n. 6450, Jul 19 2019.

CHUN, S.; KWON, Y. B. The CCL2 elevation in primary afferent fibers produces zymosan-induced hyperalgesia through microglia-mediated neuronal activation in the spinal dorsal horn. **Brain Res Bull**, v. 149, p. 53-59, Jul 2019.

CISZEK, B. P.; O'BUCKLEY, S. C.; NACKLEY, A. G. Persistent Catechol-O-methyltransferase-dependent Pain Is Initiated by Peripheral beta-Adrenergic Receptors. **Anesthesiology**, v. 124, n. 5, p. 1122-35, May 2016.

COHEN, S. P.; HOOTEN, W. M. Advances in the diagnosis and management of neck pain. **BMJ**, v. 358, p. j3221, Aug 14 2017.

CONTI, B. et al. Hyptis suaveolens and Hyptis spicigera (Lamiaceae) essential oils: Qualitative analysis, contact toxicity and repellent activity against Sitophilus granarius (L.) (Coleoptera: Dryophthoridae). **Journal of Pest Science**, v. 84, p. 219-228, 06/01 2010.

CONVERTINO, M. et al. mu-Opioid receptor 6-transmembrane isoform: A potential therapeutic target for new effective opioids. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 62, p. 61-7, Oct 1 2015.

COOK, A. D. et al. Immune Cytokines and Their Receptors in Inflammatory Pain. **Trends Immunol**, v. 39, n. 3, p. 240-255, Mar 2018.

CORDER, G. et al. Endogenous and Exogenous Opioids in Pain. **Annu Rev Neurosci**, v. 41, p. 453-473, Jul 8 2018.

CORDERO-ERAUSQUIN, M. et al. Neuronal networks and nociceptive processing in the dorsal horn of the spinal cord. **Neuroscience**, v. 338, p. 230-247, Dec 3 2016.

COSTE, B. et al. Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. **Science**, v. 330, n. 6000, p. 55-60, Oct 1 2010.

COURTIES, A.; SELLAM, J.; BERENBAUM, F. Role of the autonomic nervous system in osteoarthritis. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v. 31, n. 5, p. 661-675, Oct 2017.

COUTAUX, A. et al. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, v. 72, n. 5, p. 359-71, Oct 2005.

CROFFORD, L. J. Chronic Pain: Where the Body Meets the Brain. **Trans Am Clin Climatol Assoc**, v. 126, p. 167-83, 2015.

CUNHA, F. Q.; TEIXEIRA, M. M.; FERREIRA, S. H. Pharmacological modulation of secondary mediator systems--cyclic AMP and cyclic GMP--on inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol**, v. 127, n. 3, p. 671-8, Jun 1999.

CUNHA, T. M. et al. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **J Leukoc Biol**, v. 83, n. 4, p. 824-32, Apr 2008.

CUNHA, T. M. et al. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 5, p. 1755-60, Feb 1 2005.

CUNHA, T. M. et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, n. 3, p. 401-7, Mar 2004.

DAI, Y. TRPs and pain. **Semin Immunopathol**, v. 38, n. 3, p. 277-91, May 2016.

DANCEL, R.; LILES, E. A.; FIORE, D. Acute Pain Management in Hospitalized Children. **Rev Recent Clin Trials**, v. 12, n. 4, p. 277-283, 2017.

DAVIS, G.; CURTIN, C. M. Management of Pain in Complex Nerve Injuries. **Hand Clin**, v. 32, n. 2, p. 257-62, May 2016.

DE ALMEIDA, V. P. et al. Anatomy, micromorphology, and histochemistry of leaves and stems of *Cantinoa althaeifolia* (Lamiaceae). **Microsc Res Tech**, Jan 21 2020.

DE ARAUJO, E. R. D. et al. Local anti-inflammatory activity: Topical formulation containing *Kalanchoe brasiliensis* and *Kalanchoe pinnata* leaf aqueous extract. **Biomed Pharmacother**, v. 113, p. 108721, May 2019.

DEMAIN, A. L. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 41, n. 2, p. 185-201, Feb 2014.

DEMBO, T. et al. Primary Afferent-Derived BDNF Contributes Minimally to the Processing of Pain and Itch. **eNeuro**, v. 5, n. 6, Nov-Dec 2018.

DENNIS, E. A.; NORRIS, P. C. Eicosanoid storm in infection and inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 15, n. 8, p. 511-23, Aug 2015.

DESAI, S. J.; PRICKRIL, B.; RASOOLY, A. Mechanisms of Phytonutrient Modulation of Cyclooxygenase-2 (COX-2) and Inflammation Related to Cancer. **Nutr Cancer**, v. 70, n. 3, p. 350-375, Apr 2018.

DHINGRA, A. K. et al. An update on Anti-inflammatory Compounds: A Review. **Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem**, v. 14, n. 2, p. 81-97, 2015.

DINA, O. A. et al. Sex hormones regulate the contribution of PKCepsilon and PKA signalling in inflammatory pain in the rat. **Eur J Neurosci**, v. 13, n. 12, p. 2227-33, Jun 2001.

DJOUHRI, L. Electrophysiological evidence for the existence of a rare population of C-fiber low threshold mechanoreceptive (C-LTM) neurons in glabrous skin of the rat hindpaw. **Neurosci Lett**, v. 613, p. 25-9, Feb 2 2016.

DOMINGUEZ, E. et al. JAK/STAT3 pathway is activated in spinal cord microglia after peripheral nerve injury and contributes to neuropathic pain development in rat. **J Neurochem**, v. 107, n. 1, p. 50-60, Oct 2008.

DUAN, W. R.; XIE, Y. K. Modulation of C-nociceptive Activities by Inputs from Myelinated Fibers. **Adv Exp Med Biol**, v. 904, p. 33-40, 2016.

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc**, v. 46, n. 3, p. 208-9, Mar 1957.

DYDYK, A. M.; MUNAKOMI, S. Thalamic Pain Syndrome. In: (Ed.). **StatPearls**. Treasure Island (FL), 2020.

EDDY, N. B.; LEIMBACH, D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl- and dithienylbutylamines. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 107, n. 3, p. 385-93, Mar 1953.

ELLISON, D. L. Physiology of Pain. **Crit Care Nurs Clin North Am**, v. 29, n. 4, p. 397-406, Dec 2017.

FANI, M.; KOHANTEB, J. In Vitro Antimicrobial Activity of Thymus vulgaris Essential Oil Against Major Oral Pathogens. **J Evid Based Complementary Altern Med**, v. 22, n. 4, p. 660-666, Oct 2017.

FEEHAN, K. T.; GILROY, D. W. Is Resolution the End of Inflammation? **Trends Mol Med**, v. 25, n. 3, p. 198-214, Mar 2019.

FERDOUSI, M.; FINN, D. P. Stress-induced modulation of pain: Role of the endogenous opioid system. **Prog Brain Res**, v. 239, p. 121-177, 2018.

FERNANDES, E. C. et al. Low- and high-threshold primary afferent inputs to spinal lamina III antennae-type neurons. **Pain**, v. 159, n. 11, p. 2214-2222, Nov 2018.

FERREIRA, S. H.; MONCADA, S.; VANE, J. R. Prostaglandins and the mechanism of analgesia produced by aspirin-like drugs. **Br J Pharmacol**, v. 49, n. 1, p. 86-97, Sep 1973.

FINSTERER, J. et al. Causally treatable, hereditary neuropathies in Fabry's disease, transthyretin-related familial amyloidosis, and Pompe's disease. **Acta Neurol Scand**, v. 136, n. 6, p. 558-569, Dec 2017.

FLECKENSTEIN, J. et al. The pain threshold of high-threshold mechanosensitive receptors subsequent to maximal eccentric exercise is a potential marker in the prediction of DOMS associated impairment. **PLoS One**, v. 12, n. 10, p. e0185463, 2017.

FRIEDL, P.; MAYOR, R. Tuning Collective Cell Migration by Cell-Cell Junction Regulation. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 9, n. 4, Apr 3 2017.

FULLERTON, J. N.; GILROY, D. W. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. **Nat Rev Drug Discov**, v. 15, n. 8, p. 551-67, Aug 2016.

GAO, D.; O'DOHERTY, G. A. De Novo Asymmetric Synthesis of Anamarine and Its Analogues. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 70, n. 24, p. 9932-9939, 2005/11/01 2005.

GAO, W. et al. Quercetin ameliorates paclitaxel-induced neuropathic pain by stabilizing mast cells, and subsequently blocking PKCepsilon-dependent activation of TRPV1. **Acta Pharmacol Sin**, v. 37, n. 9, p. 1166-77, Sep 2016.

GARCIA, K.; WRAY, J. K.; KUMAR, S. Spinal Cord Stimulation. In: (Ed.). **StatPearls**. Treasure Island (FL), 2020.

GAVVA, N. R. et al. Reduced TRPM8 expression underpins reduced migraine risk and attenuated cold pain sensation in humans. **Sci Rep**, v. 9, n. 1, p. 19655, Dec 23 2019.

GAZERANI, S. et al. The Role of C Fibers in Spinal Microglia Induction and Possible Relation with TRPV3 Expression During Chronic Inflammatory Arthritis in Rats. **Basic Clin Neurosci**, v. 7, n. 3, p. 231-40, Jul 2016.

GEBHART, G. F.; BIELEFELDT, K. Physiology of Visceral Pain. **Compr Physiol**, v. 6, n. 4, p. 1609-1633, Sep 15 2016.

GERMOLEC, D. R. et al. Markers of Inflammation. **Methods Mol Biol**, v. 1803, p. 57-79, 2018.

GIDDINGS, L. A.; NEWMAN, D. J. Microbial natural products: molecular blueprints for antitumor drugs. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 40, n. 11, p. 1181-210, Nov 2013.

GINZBURG, K. et al. Pain Perception and Body Awareness Among Individuals With Borderline Personality Disorder. **J Pers Disord**, v. 32, n. 5, p. 618-635, Oct 2018.

GLATTE, P. et al. Architecture of the Cutaneous Autonomic Nervous System. **Front Neurol**, v. 10, p. 970, 2019.

GOMES, F. I. F.; CUNHA, F. Q.; CUNHA, T. M. Peripheral nitric oxide signaling directly blocks inflammatory pain. **Biochem Pharmacol**, p. 113862, Feb 18 2020.

GRAD, I.; PICARD, D. The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. **Mol Cell Endocrinol**, v. 275, n. 1-2, p. 2-12, Sep 15 2007.

GRASSEL, S.; MUSCHTER, D. Peripheral Nerve Fibers and Their Neurotransmitters in Osteoarthritis Pathology. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 5, Apr 28 2017.

GREGORY, N. S. et al. Acid Sensing Ion Channel 1a (ASIC1a) Mediates Activity-induced Pain by Modulation of Heteromeric ASIC Channel Kinetics. **Neuroscience**, v. 386, p. 166-174, Aug 21 2018.

GRIFFITHS, H. R.; GAO, D.; PARARASA, C. Redox regulation in metabolic programming and inflammation. **Redox Biol**, v. 12, p. 50-57, Aug 2017.

GUILLIAMS, M.; MILDNER, A.; YONA, S. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. **Immunity**, v. 49, n. 4, p. 595-613, Oct 16 2018.

GULER-YUKSEL, M. et al. Glucocorticoids, Inflammation and Bone. **Calcif Tissue Int**, v. 102, n. 5, p. 592-606, May 2018.

GWATHMEY, K. G.; PEARSON, K. T. Diagnosis and management of sensory polyneuropathy. **BMJ**, v. 365, p. l1108, May 8 2019.

HAIJHASHEMI, V.; FAHMIDEH, F.; GHANADIAN, M. Antinociceptive effect of methanolic extract and alkaloid fractions of *Berberis integerrima* root in animal models. **Avicenna J Phytomed**, v. 8, n. 3, p. 227-236, May-Jun 2018.

HAMIDZADEH, K. et al. Macrophages and the Recovery from Acute and Chronic Inflammation. **Annu Rev Physiol**, v. 79, p. 567-592, Feb 10 2017.

HARA, S. et al. Calcium-independent phospholipase A2gamma (iPLA2gamma) and its roles in cellular functions and diseases. **Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids**, v. 1864, n. 6, p. 861-868, Jun 2019.

HARLEY, R.; PASTORE, J. F. A generic revision and new combinations in the Hyptidinae (Lamiaceae), based on molecular and morphological evidence. **Phytotaxa**, v. 58, p. 1-55, 06/27 2012.

HARPER, D. E. et al. Resting Functional Connectivity of the Periaqueductal Gray Is Associated With Normal Inhibition and Pathological Facilitation in Conditioned Pain Modulation. **J Pain**, v. 19, n. 6, p. 635 e1-635 e15, Jun 2018.

HAWKEY, C. J. COX-1 and COX-2 inhibitors. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 15, n. 5, p. 801-20, Oct 2001.

HEINRICH, H.; SWEIS, R. The role of oesophageal physiological testing in the assessment of noncardiac chest pain. **Ther Adv Chronic Dis**, v. 9, n. 12, p. 257-267, 2018.

HEINRICHER, M. M. Pain Modulation and the Transition from Acute to Chronic Pain. **Adv Exp Med Biol**, v. 904, p. 105-15, 2016.

HERRERA-RUIZ, M. et al. Antidepressant and anxiolytic effects of hydroalcoholic extract from *Salvia elegans*. **J Ethnopharmacol**, v. 107, n. 1, p. 53-8, Aug 11 2006.

HILL, R. Z. et al. S1PR3 Mediates Itch and Pain via Distinct TRP Channel-Dependent Pathways. **J Neurosci**, v. 38, n. 36, p. 7833-7843, Sep 5 2018.

HORTELANO, S. et al. Contribution of cyclopentenone prostaglandins to the resolution of inflammation through the potentiation of apoptosis in activated macrophages. **J Immunol**, v. 165, n. 11, p. 6525-31, Dec 1 2000.

HOSSAIN, M. Z. et al. The Role of Transient Receptor Potential (TRP) Channels in the Transduction of Dental Pain. **Int J Mol Sci**, v. 20, n. 3, Jan 27 2019.

HUANG, H. et al. Discovery of 3-((dimethylamino)methyl)-4-hydroxy-4-(3-methoxyphenyl)-N-phenylpiperidine-1-carb oxamide as novel potent analgesic. **Eur J Med Chem**, v. 189, p. 112070, Mar 1 2020.

HUANG, J. et al. A neuronal circuit for activating descending modulation of neuropathic pain. **Nat Neurosci**, v. 22, n. 10, p. 1659-1668, Oct 2019.

HUDSON, W. H.; YOUN, C.; ORTLUND, E. A. The structural basis of direct glucocorticoid-mediated transrepression. **Nat Struct Mol Biol**, v. 20, n. 1, p. 53-8, Jan 2013.

HUGHES, C. E.; NIBBS, R. J. B. A guide to chemokines and their receptors. **FEBS J**, v. 285, n. 16, p. 2944-2971, Aug 2018.

HUGHES, M. M.; O'NEILL, L. A. J. Metabolic regulation of NLRP3. **Immunol Rev**, v. 281, n. 1, p. 88-98, Jan 2018.

HUGHES, P. A. et al. Localization and comparative analysis of acid-sensing ion channel (ASIC1, 2, and 3) mRNA expression in mouse colonic sensory neurons within thoracolumbar dorsal root ganglia. **J Comp Neurol**, v. 500, n. 5, p. 863-75, Feb 10 2007.

HUNG, C. Y.; TAN, C. H. TRP Channels in Nociception and Pathological Pain. **Adv Exp Med Biol**, v. 1099, p. 13-27, 2018.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, n. 1, p. 103-14, Jul 1987.

HUSCHER, D. et al. Dose-related patterns of glucocorticoid-induced side effects. **Ann Rheum Dis**, v. 68, n. 7, p. 1119-24, Jul 2009.

HYLANDS-WHITE, N.; DUARTE, R. V.; RAPHAEL, J. H. An overview of treatment approaches for chronic pain management. **Rheumatol Int**, v. 37, n. 1, p. 29-42, Jan 2017.

INNES, J. K.; CALDER, P. C. Omega-6 fatty acids and inflammation. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 132, p. 41-48, May 2018.

JABBOUR, H. N.; SALES, K. J. Prostaglandin receptor signalling and function in human endometrial pathology. **Trends Endocrinol Metab**, v. 15, n. 8, p. 398-404, Oct 2004.

JAFRI, A. J. A. et al. Protective effect of magnesium acetyltaurate and taurine against NMDA-induced retinal damage involves reduced nitrosative stress. **Mol Vis**, v. 24, p. 495-508, 2018.

JANG, Y.; KIM, M.; HWANG, S. W. Molecular mechanisms underlying the actions of arachidonic acid-derived prostaglandins on peripheral nociception. **J Neuroinflammation**, v. 17, n. 1, p. 30, Jan 22 2020.

Jl, R. R. et al. Neuroinflammation and Central Sensitization in Chronic and Widespread Pain. **Anesthesiology**, v. 129, n. 2, p. 343-366, Aug 2018.

JIA, G. et al. Endothelial cell senescence in aging-related vascular dysfunction. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis**, v. 1865, n. 7, p. 1802-1809, Jul 1 2019.

JUSZCZAK, G. R.; STANKIEWICZ, A. M. Glucocorticoids, genes and brain function. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 82, p. 136-168, Mar 2 2018.

KALLIOLIAS, G. D.; IVASHKIV, L. B. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. **Nat Rev Rheumatol**, v. 12, n. 1, p. 49-62, Jan 2016.

KARIN, M.; GRETEN, F. R. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. **Nat Rev Immunol**, v. 5, n. 10, p. 749-59, Oct 2005.

KASSUYA, C. et al. Composição dos óleos essenciais de *Salvia lachnostachys* e *S. Melissiflora* (Lamiaceae). **LATIN AMERICAN JOURNAL OF PHARMACY**, v. 28, p. 919-921, 01/01 2009.

KASSUYA, C. A. et al. Antipyretic and anti-inflammatory properties of the ethanolic extract, dichloromethane fraction and costunolide from *Magnolia ovata* (Magnoliaceae). **J Ethnopharmacol**, v. 124, n. 3, p. 369-76, Jul 30 2009.

KATO, F.; SUGIMURA, Y. K.; TAKAHASHI, Y. Pain-Associated Neural Plasticity in the Parabrachial to Central Amygdala Circuit : Pain Changes the Brain, and the Brain Changes the Pain. **Adv Exp Med Biol**, v. 1099, p. 157-166, 2018.

KATZ, L.; BALTZ, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 43, n. 2-3, p. 155-76, Mar 2016.

KAWABATA, A. Prostaglandin E2 and pain--an update. **Biol Pharm Bull**, v. 34, n. 8, p. 1170-3, 2011.

KAWAHARA, K. et al. Prostaglandin E2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. **Biochim Biophys Acta**, v. 1851, n. 4, p. 414-21, Apr 2015.

KELLENBERGER, S.; SCHILD, L. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCI. structure, function, and pharmacology of acid-sensing ion channels and the epithelial Na<sup>+</sup> channel. **Pharmacol Rev**, v. 67, n. 1, p. 1-35, 2015.

KHAN, A.; KHAN, S.; KIM, Y. S. Insight into Pain Modulation: Nociceptors Sensitization and Therapeutic Targets. **Curr Drug Targets**, v. 20, n. 7, p. 775-788, 2019.

KHASAR, S. G. et al. A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase C epsilon mutant mice. **Neuron**, v. 24, n. 1, p. 253-60, Sep 1999.

KHASAR, S. G.; MCCARTER, G.; LEVINE, J. D. Epinephrine produces a beta-adrenergic receptor-mediated mechanical hyperalgesia and in vitro sensitization of rat nociceptors. **J Neurophysiol**, v. 81, n. 3, p. 1104-12, Mar 1999.

KHOURY, M. et al. Report on the Medicinal Use of Eleven Lamiaceae Species in Lebanon and Rationalization of Their Antimicrobial Potential by Examination of the Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Their Essential Oils. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2016, p. 2547169, 2016.

KIEFFER, B. L.; EVANS, C. J. Opioid receptors: from binding sites to visible molecules in vivo. **Neuropharmacology**, v. 56 Suppl 1, p. 205-12, 2009.

KITAMURA, H. et al. Interleukin-6/STAT3 signaling as a promising target to improve the efficacy of cancer immunotherapy. **Cancer Sci**, v. 108, n. 10, p. 1947-1952, Oct 2017.

KNEZEVIC, N. N. et al. The Role of Genetic Polymorphisms in Chronic Pain Patients. **Int J Mol Sci**, v. 19, n. 6, Jun 8 2018.

KOFLER, M.; LEIS, A. A.; VALLS-SOLE, J. Cutaneous silent periods - Part 2: Update on pathophysiology and clinical utility. **Clin Neurophysiol**, v. 130, n. 4, p. 604-615, Apr 2019.

KUBATKA, P. et al. Anticancer Activities of *Thymus vulgaris* L. in Experimental Breast Carcinoma in Vivo and in Vitro. **Int J Mol Sci**, v. 20, n. 7, Apr 9 2019.

KUME, T.; TAKADA-TAKATORI, Y. Nicotinic Acetylcholine Receptor Signaling: Roles in Neuroprotection. In: AKAIKE, A.; SHIMOHAMA, S., et al (Ed.). **Nicotinic Acetylcholine Receptor Signaling in Neuroprotection**. Singapore, 2018.

KUNNUMAKKARA, A. B. et al. Chronic diseases, inflammation, and spices: how are they linked? **J Transl Med**, v. 16, n. 1, p. 14, Jan 25 2018.

LAING, R. J.; DHAKA, A. ThermoTRPs and Pain. **Neuroscientist**, v. 22, n. 2, p. 171-87, Apr 2016.

LAUTENBACHER, S. et al. Age changes in pain perception: A systematic-review and meta-analysis of age effects on pain and tolerance thresholds. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 75, p. 104-113, Apr 2017.

LEUNG, R. H.; STROMAN, P. W. Neural Correlates of Cognitive Modulation of Pain Perception in the Human Brainstem and Cervical Spinal Cord using Functional Magnetic Resonance Imaging: A Review. **Crit Rev Biomed Eng**, v. 44, n. 1-2, p. 33-45, 2016.

LI, C. et al. Blocking TRPA1 and TNF-alpha Signal Improves Bortezomib-Induced Neuropathic Pain. **Cell Physiol Biochem**, v. 51, n. 5, p. 2098-2110, 2018.

LI, Z. et al. CaMKIIalpha may modulate fentanyl-induced hyperalgesia via a CeLC-PAG-RVM-spinal cord descending facilitative pain pathway in rats. **PLoS One**, v. 12, n. 5, p. e0177412, 2017.

LINDY, A. S. et al. TRPV channel-mediated calcium transients in nociceptor neurons are dispensable for avoidance behaviour. **Nat Commun**, v. 5, p. 4734, Sep 2 2014.

LIU, F. et al. Suppression of MyD88-dependent signaling alleviates neuropathic pain induced by peripheral nerve injury in the rat. **J Neuroinflammation**, v. 14, n. 1, p. 70, Mar 31 2017.

LOGASHINA, Y. A. et al. TRPA1 Channel as a Regulator of Neurogenic Inflammation and Pain: Structure, Function, Role in Pathophysiology, and Therapeutic Potential of Ligands. **Biochemistry (Moscow)**, v. 84, n. 2, p. 101-118, Feb 2019.

LOMBA, L. A. et al. A Naphthoquinone from *Sinningia canescens* Inhibits Inflammation and Fever in Mice. **Inflammation**, v. 40, n. 3, p. 1051-1061, Jun 2017.

LOPRESTI, A. L. Salvia (Sage): A Review of its Potential Cognitive-Enhancing and Protective Effects. **Drugs R D**, v. 17, n. 1, p. 53-64, Mar 2017.

LU, G.-H. et al. 10-epi-Olguine from *Rabdosia ternifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 4, p. 425-427, 1997/04/01 1997.

MAHBOUBI, M. *Mentha spicata* as natural analgesia for treatment of pain in osteoarthritis patients. **Complement Ther Clin Pract**, v. 26, p. 1-4, Feb 2017.

MARCEAU, F. et al. Bradykinin receptors: Agonists, antagonists, expression, signaling, and adaptation to sustained stimulation. **Int Immunopharmacol**, v. 82, p. 106305, Feb 24 2020.

MARKIEWICZ, M.; PASENKIEWICZ-GIERULA, M. Comparative model studies of gastric toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Langmuir**, v. 27, n. 11, p. 6950-61, Jun 7 2011.

MARKIEWSKI, M. M.; LAMBRIS, J. D. The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight. **Am J Pathol**, v. 171, n. 3, p. 715-27, Sep 2007.

MARTINEZ-FRUCTUOSO, L. et al. Structure Elucidation, Conformation, and Configuration of Cytotoxic 6-Heptyl-5,6-dihydro-2 H-pyran-2-ones from *Hyptis* Species and Their Molecular Docking to alpha-Tubulin. **J Nat Prod**, v. 82, n. 3, p. 520-531, Mar 22 2019.

MATSUDA, M.; HUH, Y.; JI, R. R. Roles of inflammation, neurogenic inflammation, and neuroinflammation in pain. **J Anesth**, v. 33, n. 1, p. 131-139, Feb 2019.

MATSUZAWA-ISHIMOTO, Y.; HWANG, S.; CADWELL, K. Autophagy and Inflammation. **Annu Rev Immunol**, v. 36, p. 73-101, Apr 26 2018.

MCGARAUGHTY, S.; CHU, K. L.; XU, J. Characterization and pharmacological modulation of nociceptive deep dorsal horn neurons across diverse rat models of pathological pain. **J Neurophysiol**, v. 120, n. 4, p. 1893-1905, Oct 1 2018.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428-35, Jul 24 2008.

MEHTA, A. K.; GRACIAS, D. T.; CROFT, M. TNF activity and T cells. **Cytokine**, v. 101, p. 14-18, Jan 2018.

MERIGHI, A. The histology, physiology, neurochemistry and circuitry of the substantia gelatinosa Rolandi (lamina II) in mammalian spinal cord. **Prog Neurobiol**, v. 169, p. 91-134, Oct 2018.

MITCHELL, S.; VARGAS, J.; HOFFMANN, A. Signaling via the NFkappaB system. **Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med**, v. 8, n. 3, p. 227-41, May 2016.

MITSI, V.; ZACHARIOU, V. Modulation of pain, nociception, and analgesia by the brain reward center. **Neuroscience**, v. 338, p. 81-92, Dec 3 2016.

MITTAL, M. et al. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. **Antioxid Redox Signal**, v. 20, n. 7, p. 1126-67, Mar 1 2014.

MONIRUZZAMAN, M.; FERDOUS, A.; IRIN, S. Evaluation of antinociceptive effect of ethanol extract of *Hedyotis corymbosa* Linn. whole plant in mice. **J Ethnopharmacol**, v. 161, p. 82-5, Feb 23 2015.

MOODIE, J. E. et al. A single-center, randomized, double-blind, active, and placebo-controlled study of KAI-1678, a novel PKC-epsilon inhibitor, in the treatment of acute postoperative orthopedic pain. **Pain Med**, v. 14, n. 6, p. 916-24, Jun 2013.

MOORE, C. et al. Regulation of Pain and Itch by TRP Channels. **Neurosci Bull**, v. 34, n. 1, p. 120-142, Feb 2018.

MOORE, N. et al. Pharmacoepidemiology of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Therapie**, v. 74, n. 2, p. 271-277, Apr 2019.

MOUCLIS, V. D.; DENNIS, E. A. Phospholipase A2 catalysis and lipid mediator lipidomics. **Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids**, v. 1864, n. 6, p. 766-771, Jun 2019.

MOULTON, E. A.; BORSOOK, D. C-Fiber Assays in the Cornea vs. Skin. **Brain Sci**, v. 9, n. 11, Nov 12 2019.

MURPHY, S. H. et al. Tumor suppressor protein (p)53, is a regulator of NF-kappaB repression by the glucocorticoid receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 41, p. 17117-22, Oct 11 2011.

NAGI, S. S. et al. An ultrafast system for signaling mechanical pain in human skin. **Sci Adv**, v. 5, n. 7, p. eaaw1297, Jul 2019.

NAIR, J. et al. Anatomy and physiology of phrenic afferent neurons. **J Neurophysiol**, v. 118, n. 6, p. 2975-2990, Dec 1 2017.

NASER, P. V.; KUNER, R. Molecular, Cellular and Circuit Basis of Cholinergic Modulation of Pain. **Neuroscience**, v. 387, p. 135-148, Sep 1 2018.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **J Nat Prod**, v. 79, n. 3, p. 629-61, Mar 25 2016.

NYGARD, S. K. et al. Stress-Induced Reinstatement of Nicotine Preference Requires Dynorphin/Kappa Opioid Activity in the Basolateral Amygdala. **J Neurosci**, v. 36, n. 38, p. 9937-48, Sep 21 2016.

OAKLANDER, A. L.; NOLANO, M. Scientific Advances in and Clinical Approaches to Small-Fiber Polyneuropathy: A Review. **JAMA Neurol**, Sep 9 2019.

OISHI, Y.; MANABE, I. Macrophages in inflammation, repair and regeneration. **Int Immunol**, v. 30, n. 11, p. 511-528, Oct 29 2018.

OMERBASIC, D. et al. ASICs and mammalian mechanoreceptor function. **Neuropharmacology**, v. 94, p. 80-6, Jul 2015.

ONIGA, I. et al. Effects of *Salvia officinalis* L. extract on experimental acute inflammation. **Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi**, v. 111, n. 1, p. 290-4, Jan-Mar 2007.

ORAY, M. et al. Long-term side effects of glucocorticoids. **Expert Opin Drug Saf**, v. 15, n. 4, p. 457-65, 2016.

ORR, P. M.; SHANK, B. C.; BLACK, A. C. The Role of Pain Classification Systems in Pain Management. **Crit Care Nurs Clin North Am**, v. 29, n. 4, p. 407-418, Dec 2017.

OSSIPOV, M. H.; DUSSOR, G. O.; PORRECA, F. Central modulation of pain. **J Clin Invest**, v. 120, n. 11, p. 3779-87, Nov 2010.

PANNUNZIO, A.; COLUCCIA, M. Cyclooxygenase-1 (COX-1) and COX-1 Inhibitors in Cancer: A Review of Oncology and Medicinal Chemistry Literature. **Pharmaceuticals (Basel)**, v. 11, n. 4, Oct 11 2018.

PATIDAR, A. et al. DAMP-TLR-cytokine axis dictates the fate of tumor. **Cytokine**, v. 104, p. 114-123, Apr 2018.

PAULSEN, O. et al. The relationship between pro-inflammatory cytokines and pain, appetite and fatigue in patients with advanced cancer. **PLoS One**, v. 12, n. 5, p. e0177620, 2017.

PAUPE, V.; PRUDENT, J. New insights into the role of mitochondrial calcium homeostasis in cell migration. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 500, n. 1, p. 75-86, May 27 2018.

PENG, Y.; VAN WERSCH, R.; ZHANG, Y. Convergent and Divergent Signaling in PAMP-Triggered Immunity and Effector-Triggered Immunity. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 31, n. 4, p. 403-409, Apr 2018.

PETHO, G.; REEH, P. W. Sensory and signaling mechanisms of bradykinin, eicosanoids, platelet-activating factor, and nitric oxide in peripheral nociceptors. **Physiol Rev**, v. 92, n. 4, p. 1699-775, Oct 2012.

PETITJEAN, H. et al. Recruitment of Spinoparabrachial Neurons by Dorsal Horn Calretinin Neurons. **Cell Rep**, v. 28, n. 6, p. 1429-1438 e4, Aug 6 2019.

PIERETTI, S. et al. Gender differences in pain and its relief. **Ann Ist Super Sanita**, v. 52, n. 2, p. 184-9, Apr-Jun 2016.

PIKOULIS, E. A. et al. Trauma management in ancient Greece: value of surgical principles through the years. **World J Surg**, v. 28, n. 4, p. 425-30, Apr 2004.

PINHO-RIBEIRO, F. A.; VERRI, W. A., JR.; CHIU, I. M. Nociceptor Sensory Neuron-Immune Interactions in Pain and Inflammation. **Trends Immunol**, v. 38, n. 1, p. 5-19, Jan 2017.

PIRAULT, J.; BACK, M. Lipoxin and Resolvin Receptors Transducing the Resolution of Inflammation in Cardiovascular Disease. **Front Pharmacol**, v. 9, p. 1273, 2018.

PORRECA, F.; NAVRATILOVA, E. Reward, motivation, and emotion of pain and its relief. **Pain**, v. 158 Suppl 1, p. S43-S49, Apr 2017.

POZSGAI, G.; BATAI, I. Z.; PINTER, E. Effects of sulfide and polysulfides transmitted by direct or signal transduction-mediated activation of TRPA1 channels. **Br J Pharmacol**, v. 176, n. 4, p. 628-645, Feb 2019.

RAGGI, P. et al. Role of inflammation in the pathogenesis of atherosclerosis and therapeutic interventions. **Atherosclerosis**, v. 276, p. 98-108, Sep 2018.

RAMAMOORTHY, S.; CIDLOWSKI, J. A. Corticosteroids: Mechanisms of Action in Health and Disease. **Rheum Dis Clin North Am**, v. 42, n. 1, p. 15-31, vii, Feb 2016.

RAO, P.; KNAUS, E. E. Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. **J Pharm Pharm Sci**, v. 11, n. 2, p. 81s-110s, Sep 20 2008.

RAYAR, A. M. et al. Update on COX-2 Selective Inhibitors: Chemical Classification, Side Effects and their Use in Cancers and Neuronal Diseases. **Curr Top Med Chem**, v. 17, n. 26, p. 2935-2956, 2017.

RAZAVI, B. M.; HOSSEINZADEH, H. A review of the role of orexin system in pain modulation. **Biomed Pharmacother**, v. 90, p. 187-193, Jun 2017.

REGLERO-REAL, N. et al. Endothelial Cell Junctional Adhesion Molecules: Role and Regulation of Expression in Inflammation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 36, n. 10, p. 2048-2057, Oct 2016.

REXED, B. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. **J Comp Neurol**, v. 96, n. 3, p. 414-95, Jun 1952.

RHO, S. S.; ANDO, K.; FUKUHARA, S. Dynamic Regulation of Vascular Permeability by Vascular Endothelial Cadherin-Mediated Endothelial Cell-Cell Junctions. **J Nippon Med Sch**, v. 84, n. 4, p. 148-159, 2017.

RICCIARDOLO, F. L. M. et al. Bradykinin in asthma: Modulation of airway inflammation and remodelling. **Eur J Pharmacol**, v. 827, p. 181-188, May 15 2018.

ROCHA, L. W. et al. Local administration of mangiferin prevents experimental inflammatory mechanical hyperalgesia through CINC-1/epinephrine/PKA pathway and TNF-alpha inhibition. **Eur J Pharmacol**, v. 830, p. 87-94, Jul 5 2018.

RONCHETTI, S. et al. Defining the role of glucocorticoids in inflammation. **Clin Sci (Lond)**, v. 132, n. 14, p. 1529-1543, Jul 31 2018.

RONCHETTI, S.; MIGLIORATI, G.; DELFINO, D. V. Association of inflammatory mediators with pain perception. **Biomed Pharmacother**, v. 96, p. 1445-1452, Dec 2017.

ROSENQUIST, E.; ARONSON, M.; CROWLEY, M. Definition and pathogenesis of chronic pain. 2015. **UpToDate**. [hwww.uptodate.com](http://www.uptodate.com), 2017.

ROSS, J. L. et al. Muscle IL1beta Drives Ischemic Myalgia via ASIC3-Mediated Sensory Neuron Sensitization. **J Neurosci**, v. 36, n. 26, p. 6857-71, Jun 29 2016.

RUSSELL, J. A.; RUSH, B.; BOYD, J. Pathophysiology of Septic Shock. **Crit Care Clin**, v. 34, n. 1, p. 43-61, Jan 2018.

RUSSO, M. M.; SUNDARAMURTHI, T. An Overview of Cancer Pain: Epidemiology and Pathophysiology. **Semin Oncol Nurs**, v. 35, n. 3, p. 223-228, Jun 2019.

SACHS, D. et al. The role of PKA and PKCepsilon pathways in prostaglandin E2-mediated hypernociception. **Br J Pharmacol**, v. 156, n. 5, p. 826-34, Mar 2009.

SAIJO, Y.; LOO, E. P.; YASUDA, S. Pattern recognition receptors and signaling in plant-microbe interactions. **Plant J**, v. 93, n. 4, p. 592-613, Feb 2018.

SALAT, K.; FURGALA, A.; SALAT, R. Evaluation of cebranopadol, a dually acting nociceptin/orphanin FQ and opioid receptor agonist in mouse models of acute, tonic, and chemotherapy-induced neuropathic pain. **Inflammopharmacology**, v. 26, n. 2, p. 361-374, Apr 2018.

SALZER, I. et al. Nociceptor Signalling through ion Channel Regulation via GPCRs. **Int J Mol Sci**, v. 20, n. 10, May 20 2019.

SAMAD, T. A. et al. Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. **Nature**, v. 410, n. 6827, p. 471-5, Mar 22 2001.

SAMPAOLO, S. et al. First study on the peptidergic innervation of the brain superior sagittal sinus in humans. **Neuropeptides**, v. 65, p. 45-55, Oct 2017.

SANDKUHLER, J.; GRUBER-SCHOFFNEGGER, D. Hyperalgesia by synaptic long-term potentiation (LTP): an update. **Curr Opin Pharmacol**, v. 12, n. 1, p. 18-27, Feb 2012.

SANTOS, J. A. et al. Antidepressive and antinociceptive effects of ethanolic extract and fruticuline A from *Salvia lachnostachys* Benth leaves on rodents. **PLoS One**, v. 12, n. 2, p. e0172151, 2017.

SCHAFERS, M. et al. Cyclooxygenase inhibition in nerve-injury- and TNF-induced hyperalgesia in the rat. **Exp Neurol**, v. 185, n. 1, p. 160-8, Jan 2004.

SCHAFERS, M.; SORKIN, L. Effect of cytokines on neuronal excitability. **Neurosci Lett**, v. 437, n. 3, p. 188-93, Jun 6 2008.

SCHANK, J. R.; HEILIG, M. Substance P and the Neurokinin-1 Receptor: The New CRF. **Int Rev Neurobiol**, v. 136, p. 151-175, 2017.

SCHARF, D. et al. Chemical Composition and Cytotoxic Activity of the Essential Oils of *Cantinoa stricta* (Benth.) Harley & J.F.B. Pastore (Lamiaceae). **Records of Natural Products**, v. 10, p. 257-261, 08/01 2015.

SCHETT, G. Resolution of inflammation in arthritis. **Semin Immunopathol**, v. 41, n. 6, p. 675-679, Nov 2019.

SCHOENICHEN, C.; BODE, C.; DUERSCHMIED, D. Role of platelet serotonin in innate immune cell recruitment. **Front Biosci (Landmark Ed)**, v. 24, p. 514-526, Jan 1 2019.

SEN, R.; BALTIMORE, D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. **Cell**, v. 46, n. 5, p. 705-16, Aug 29 1986.

SERHAN, C. N.; LEVY, B. D. Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. **J Clin Invest**, v. 128, n. 7, p. 2657-2669, Jul 2 2018.

SETHI, R. et al. Neurobiology and Therapeutic Potential of Cyclooxygenase-2 (COX-2) Inhibitors for Inflammation in Neuropsychiatric Disorders. **Front Psychiatry**, v. 10, p. 605, 2019.

SHEN, J. et al. Inflammation and epigenetic regulation in osteoarthritis. **Connect Tissue Res**, v. 58, n. 1, p. 49-63, Jan 2017.

SHIRAZI, L. F. et al. Role of Inflammation in Heart Failure. **Curr Atheroscler Rep**, v. 19, n. 6, p. 27, Jun 2017.

SIEVE, I.; MUNSTER-KUHNEL, A. K.; HILFIKER-KLEINER, D. Regulation and function of endothelial glycocalyx layer in vascular diseases. **Vascul Pharmacol**, v. 100, p. 26-33, Jan 2018.

SINGER, J. et al. Central poststroke pain: A systematic review. **Int J Stroke**, v. 12, n. 4, p. 343-355, Jun 2017.

SMITH, E. S.; LEWIN, G. R. Nociceptors: a phylogenetic view. **J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol**, v. 195, n. 12, p. 1089-106, Dec 2009.

SNEDDON, L. U. Comparative Physiology of Nociception and Pain. **Physiology (Bethesda)**, v. 33, n. 1, p. 63-73, Jan 1 2018.

SOARES, A. S. et al. Naphthoquinones of *Sinningia reitzii* and Anti-inflammatory/Antinociceptive Activities of 8-Hydroxydehydrodunnione. **J Nat Prod**, v. 80, n. 6, p. 1837-1843, Jun 23 2017.

SOUZA, G. V. et al. Antinociceptive activity of the ethanolic extract, fractions, and aggregatin D isolated from *Sinningia aggregata* tubers. **PLoS One**, v. 10, n. 2, p. e0117501, 2015.

ST JOHN SMITH, E. Advances in understanding nociception and neuropathic pain. **J Neurol**, v. 265, n. 2, p. 231-238, Feb 2018.

STEIN, C. New concepts in opioid analgesia. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 27, n. 10, p. 765-775, Oct 2018.

STEIN, C.; KOPF, A. Pain therapy - Are there new options on the horizon? **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v. 33, n. 3, p. 1014-20, Jun 2019.

STRAUS, D. S.; GLASS, C. K. Cyclopentenone prostaglandins: new insights on biological activities and cellular targets. **Med Res Rev**, v. 21, n. 3, p. 185-210, May 2001.

STRAWSON, J. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cancer pain. **Curr Opin Support Palliat Care**, v. 12, n. 2, p. 102-107, Jun 2018.

SU, J. B. Role of Bradykinin in the Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression by Cardiovascular Drugs. **Curr Pharm Des**, v. 23, n. 40, p. 6215-6222, 2017.

SUBEDI, L.; VENKATESAN, R.; KIM, S. Y. Neuroprotective and Anti-Inflammatory Activities of Allyl Isothiocyanate through Attenuation of JNK/NF-kappaB/TNF-alpha Signaling. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 7, Jul 3 2017.

SUGIMOTO, M. A. et al. Annexin A1 and the Resolution of Inflammation: Modulation of Neutrophil Recruitment, Apoptosis, and Clearance. **J Immunol Res**, v. 2016, p. 8239258, 2016.

SULNIUTE, V.; RAGAZINSKIENE, O.; VENSKUTONIS, P. R. Comprehensive Evaluation of Antioxidant Potential of 10 Salvia Species Using High Pressure Methods for the Isolation of Lipophilic and Hydrophilic Plant Fractions. **Plant Foods Hum Nutr**, v. 71, n. 1, p. 64-71, Mar 2016.

SUVAS, S. Role of Substance P Neuropeptide in Inflammation, Wound Healing, and Tissue Homeostasis. **J Immunol**, v. 199, n. 5, p. 1543-1552, Sep 1 2017.

TAKAYAMA, Y. et al. Emerging Perspectives on Pain Management by Modulation of TRP Channels and ANO1. **Int J Mol Sci**, v. 20, n. 14, Jul 11 2019.

TAMURA, S.; MORIKAWA, Y.; SENBA, E. Up-regulated phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3 and cyclic AMP-responsive element binding protein by peripheral inflammation in primary afferent neurons possibly through oncostatin M receptor. **Neuroscience**, v. 133, n. 3, p. 797-806, 2005.

TANG, M. et al. Bradykinin Receptors in Ischemic Injury. **Curr Neurovasc Res**, v. 15, n. 4, p. 359-366, 2018.

THANGAM, E. B. et al. The Role of Histamine and Histamine Receptors in Mast Cell-Mediated Allergy and Inflammation: The Hunt for New Therapeutic Targets. **Front Immunol**, v. 9, p. 1873, 2018.

THOMPSON, J. M.; NEUGEBAUER, V. Cortico-limbic pain mechanisms. **Neurosci Lett**, v. 702, p. 15-23, May 29 2019.

TOBALDINI, G. et al. Pain Inhibits Pain: an Ascending-Descending Pain Modulation Pathway Linking Mesolimbic and Classical Descending Mechanisms. **Mol Neurobiol**, v. 56, n. 2, p. 1000-1013, Feb 2019.

TOLL, L. et al. Nociceptin/Orphanin FQ Receptor Structure, Signaling, Ligands, Functions, and Interactions with Opioid Systems. **Pharmacol Rev**, v. 68, n. 2, p. 419-57, Apr 2016.

TRAYES, K. P. et al. Edema: diagnosis and management. **Am Fam Physician**, v. 88, n. 2, p. 102-10, Jul 15 2013.

TSUGE, K. et al. Molecular mechanisms underlying prostaglandin E2-exacerbated inflammation and immune diseases. **Int Immunol**, v. 31, n. 9, p. 597-606, Aug 23 2019.

URITU, C. M. et al. Medicinal Plants of the Family Lamiaceae in Pain Therapy: A Review. **Pain Res Manag**, v. 2018, p. 7801543, 2018.

UTA, D.; YOSHIMURA, M.; KOGA, K. Chronic pain models amplify transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) receptor responses in adult rat spinal dorsal horn. **Neuropharmacology**, v. 160, p. 107753, Dec 1 2019.

VANDEWALLE, J. et al. Therapeutic Mechanisms of Glucocorticoids. **Trends Endocrinol Metab**, v. 29, n. 1, p. 42-54, Jan 2018.

VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nat New Biol**, v. 231, n. 25, p. 232-5, Jun 23 1971.

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H. G. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? **Brain Res Brain Res Rev**, v. 46, n. 3, p. 295-309, Nov 2004.

VARELA, M. L. et al. Acute Inflammation and Metabolism. **Inflammation**, v. 41, n. 4, p. 1115-1127, Aug 2018.

VIATCHENKO-KARPINSKI, V.; GU, J. G. Mechanical sensitivity and electrophysiological properties of acutely dissociated dorsal root ganglion neurons of rats. **Neurosci Lett**, v. 634, p. 70-75, Nov 10 2016.

VIEIRA, A. S. et al. Janus kinase 2 activation participates in prostaglandin E2-induced hyperalgesia. **Life Sci**, v. 166, p. 8-12, Dec 1 2016.

VIEIRA, J. S. et al. Analgesic Effects Elicited by Neuroactive Mediators Injected into the ST 36 Acupuncture Point on Inflammatory and Neuropathic Pain in Mice. **J Acupunct Meridian Stud**, v. 11, n. 5, p. 280-289, Oct 2018.

VOLKERS, L.; MECHIOUKHI, Y.; COSTE, B. Piezo channels: from structure to function. **Pflugers Arch**, v. 467, n. 1, p. 95-9, Jan 2015.

VON LERSNER, A.; DROESEN, L.; ZIJLSTRA, A. Modulation of cell adhesion and migration through regulation of the immunoglobulin superfamily member ALCAM/CD166. **Clin Exp Metastasis**, v. 36, n. 2, p. 87-95, Apr 2019.

WALKER, C. Are All Oral COX-2 Selective Inhibitors the Same? A Consideration of Celecoxib, Etoricoxib, and Diclofenac. **Int J Rheumatol**, v. 2018, p. 1302835, 2018.

WANG, T. et al. Arachidonic Acid Metabolism and Kidney Inflammation. **Int J Mol Sci**, v. 20, n. 15, Jul 27 2019.

WARDHAN, R.; CHELLY, J. Recent advances in acute pain management: understanding the mechanisms of acute pain, the prescription of opioids, and the role of multimodal pain therapy. **F1000Res**, v. 6, p. 2065, 2017.

WATERS, M. J.; BROOKS, A. J. JAK2 activation by growth hormone and other cytokines. **Biochem J**, v. 466, n. 1, p. 1-11, Feb 15 2015.

WEHRWEIN, E. A.; ORER, H. S.; BARMAN, S. M. Overview of the Anatomy, Physiology, and Pharmacology of the Autonomic Nervous System. **Compr Physiol**, v. 6, n. 3, p. 1239-78, Jun 13 2016.

WEIKUM, E. R. et al. Glucocorticoid receptor control of transcription: precision and plasticity via allostery. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 18, n. 3, p. 159-174, Mar 2017.

WEST, S. J. et al. Circuitry and plasticity of the dorsal horn--toward a better understanding of neuropathic pain. **Neuroscience**, v. 300, p. 254-75, Aug 6 2015.

WHITSEL, B. L. et al. Contributions of Nociceptive Area 3a to Normal and Abnormal Somatosensory Perception. **J Pain**, v. 20, n. 4, p. 405-419, Apr 2019.

WILLIAMS, J. T. et al. Regulation of mu-opioid receptors: desensitization, phosphorylation, internalization, and tolerance. **Pharmacol Rev**, v. 65, n. 1, p. 223-54, Jan 2013.

WOLLER, S. A. et al. An overview of pathways encoding nociception. **Clin Exp Rheumatol**, v. 35 Suppl 107, n. 5, p. 40-46, Sep-Oct 2017.

WU, H. et al. Beyond a neurotransmitter: The role of serotonin in inflammation and immunity. **Pharmacol Res**, v. 140, p. 100-114, Feb 2019.

WU, J.; LEWIS, A. H.; GRANDL, J. Touch, Tension, and Transduction - The Function and Regulation of Piezo Ion Channels. **Trends Biochem Sci**, v. 42, n. 1, p. 57-71, Jan 2017.

XIANG, H. C. et al. AMPK activation attenuates inflammatory pain through inhibiting NF-kappaB activation and IL-1beta expression. **J Neuroinflammation**, v. 16, n. 1, p. 34, Feb 12 2019.

XIE, R. G. et al. Spinal CCL2 Promotes Central Sensitization, Long-Term Potentiation, and Inflammatory Pain via CCR2: Further Insights into Molecular, Synaptic, and Cellular Mechanisms. **Neurosci Bull**, v. 34, n. 1, p. 13-21, Feb 2018.

XU, J. et al. Ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacology of Chinese Salvia species: A review. **J Ethnopharmacol**, v. 225, p. 18-30, Oct 28 2018.

XU, M. et al. Pain and the immune system: emerging concepts of IgG-mediated autoimmune pain and immunotherapies. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 91, n. 2, p. 177-188, Feb 2020.

YAKSH, T. L. et al. The search for novel analgesics: targets and mechanisms. **F1000Prime Rep**, v. 7, p. 56, 2015.

YAM, M. F. et al. General Pathways of Pain Sensation and the Major Neurotransmitters Involved in Pain Regulation. **Int J Mol Sci**, v. 19, n. 8, Jul 24 2018.

YANG, X. et al. Structural Biology of NOD-Like Receptors. **Adv Exp Med Biol**, v. 1172, p. 119-141, 2019.

YAXLEY, J.; LITFIN, T. Non-steroidal anti-inflammatories and the development of analgesic nephropathy: a systematic review. **Ren Fail**, v. 38, n. 9, p. 1328-1334, Oct 2016.

ZAIN, M.; BONIN, R. P. Alterations in evoked and spontaneous activity of dorsal horn wide dynamic range neurons in pathological pain: a systematic review and analysis. **Pain**, v. 160, n. 10, p. 2199-2209, Oct 2019.

ZAKARIA, Z. A. et al. Methanol Extract of Dicranopteris linearis Leaves Attenuate Pain via the Modulation of Opioid/NO-Mediated Pathway. **Biomolecules**, v. 10, n. 2, Feb 12 2020.

ZELOVA, H.; HOSEK, J. TNF-alpha signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. **Inflamm Res**, v. 62, n. 7, p. 641-51, Jul 2013.

ZHANG, F. X. et al. Vesicular glutamate transporter isoforms: The essential players in the somatosensory systems. **Prog Neurobiol**, v. 171, p. 72-89, Dec 2018.

ZHANG, Q.; LENARDO, M. J.; BALTIMORE, D. 30 Years of NF-kappaB: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology. **Cell**, v. 168, n. 1-2, p. 37-57, Jan 12 2017.

ZHAO, Y.; KARIJOLICH, J. Know Thyself: RIG-I-Like Receptor Sensing of DNA Virus Infection. **J Virol**, v. 93, n. 23, Dec 1 2019.

ZHU, D. et al. Progressive Increase of Inflammatory CXCR4 and TNF-Alpha in the Dorsal Root Ganglia and Spinal Cord Maintains Peripheral and Central Sensitization to Diabetic Neuropathic Pain in Rats. **Mediators Inflamm**, v. 2019, p. 4856156, 2019.

ZHU, F.; DU, B.; XU, B. Anti-inflammatory effects of phytochemicals from fruits, vegetables, and food legumes: A review. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 58, n. 8, p. 1260-1270, May 24 2018.

ZILLIOX, L. A. Neuropathic Pain. **Continuum (Minneap Minn)**, v. 23, n. 2, Selected Topics in Outpatient Neurology, p. 512-532, Apr 2017.