

LEANDRO FLORES DO NASCIMENTO

**ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper aleyreanum* C.DC. (PIPERACEAE)
REDUZ A NOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA E NEUROPÁTICA
EM CAMUNDONGOS: PAPEL DOS RECEPTORES TRPA1**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências como requisito para a obtenção do título de doutor em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos

Coorientador: Prof. Dr. Nader Ghasemlou

Florianópolis – SC
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Nascimento, Leandro Flores
ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper aleyreanum* C.DC.
PIPERACEAE) REDUZ A NOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA E
NEUROPÁTICA EM CAMUNDONGOS: PAPEL DOS RECEPTORES
TRPA1 / Leandro Flores do Nascimento; orientador,
Adair Roberto Soares dos Santos, coorientador,
Nader Ghasemlou, 2018.
167 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de
Pós-Graduação em Neurociências, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

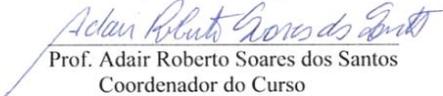
1. Neurociências. 2. *Piper aleyreanum*. 3. Dor pós-
operatória. 4. Dor neuropática. 5. Canais TRPA1. I.
Soares dos Santos, Adair Roberto. II. Ghasemlou,
Nader. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências.
IV. Título.

LEANDRO FLORES DO NASCIMENTO

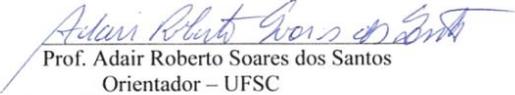
**“ÓLEO ESSENCIAL DE PIPER ALEYREANUM C.DC.
(PIPERACEAE) REDUZ A NOCICEPÇÃO
INFLAMATÓRIA E NEUROPÁTICA EM
CAMUNDONGOS: PAPEL DOS RECEPTORES TRPA1”**

Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de
Doutor em Neurociências na área de Neuropsicobiologia no
Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade
Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 2 de março de 2018.

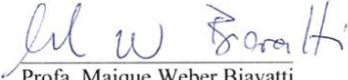

Prof. Adair Roberto Soares dos Santos
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:


Prof. Adair Roberto Soares dos Santos
Orientador – UFSC


Profa. Clelia Akiko H. Lima
Membro externo


Prof. Juliano Ferreira
Membro - UFSC


Profa. Maique Weber Biavatti
Membro – UFSC

Dedico este trabalho aos meus pais:
Antônio Neto e Alzira Flores,
por serem a luz que orienta meus caminhos
e a esperança que alimenta os meus sonhos.
Amo-os incondicionalmente!!!

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, pelas oportunidades, desafios e conquistas.

À minha família, em especial aos meus pais, por estarem sempre presente, dando o apoio e o suporte necessário para que eu alcance meus sonhos e objetivos, e aos meus irmãos, pela amizade, cumplicidade e apoio.

Às amigas Rute Helena e Olaércia, por sempre me tratarem como um filho, obrigado por toda amizade, cumplicidade, carinho e amor. Reciprocidade é o sentimento maior que nos une. Amo vocês!!!

Ao meu orientador, Dr. Adair R.S. Santos, pela oportunidade, pelos ensinamentos, discussões, orientações e por toda contribuição dada para a realização deste trabalho.

Ao meu coorientador, Dr. Nader Ghasemlou, por me receber em seu laboratório no Canadá e por acreditar e contribuir na realização desse trabalho. Meu muito obrigado pela oportunidade, pelas orientações, conversas, discussões e por todo o auxílio durante minha estadia na *Queen's University*.

Aos meus amigos do Canadá, em especial a minha amiga e “madrinha científica”, Dra. Jaqueline R. Silva, pela amizade, companheirismo e todo auxílio prestado, pois contribuíram diretamente na realização deste trabalho. Aos amigos, Sulo, Jelena, Cortney e Hanin, pela amizade, pelos momentos de descontração e por tornarem a experiência do Doutorado Sanduíche mais agradável e prazerosa.

À toda equipe do LANDI, em especial aos amigos mais próximos, Carol, Róli, Dani Secco, Dani Lima, Fernanda, Fernando e Wellington, que através da amizade, companheirismo, discussões e ajuda mútua, tornaram a caminhada mais suave.

Aos amigos do LIDOC, Thaís, Amanda, Natália e especialmente à Carolina Ruoso, pela amizade e por toda a ajuda prestada na reta final dos meus experimentos.

Aos funcionários do CCB, dona Vilma e seu Carlos, pelas conversas, risos e momentos de descontração.

Ao secretário da Pós-graduação em Neurociências, Nivaldo, pela eficiência na realização de seu trabalho, pela amizade e por todo auxílio prestado ao longo dos anos de doutorado.

Ao meu grande amigo Maurício Sinigaglia, por todo o tempo de convivência durante o período de doutorado. Não há dúvidas de que a amizade, carinho e respeito mútuo foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos amigos do peito: Gabriela, Suzane, Edu, Leda, Flaviane, Catharina, Ícaro e Thaís, pela amizade, momentos de risos, diversão e todo o resto. Amo todos vocês.

À UFSC e à *Queen's University* pela infra-estrutura oferecida.

À CAPES pelo suporte financeiro durante todo o doutorado no Brasil e no período de Doutorado Sanduíche no Canadá.

À todos os animais que permitem a realização de estudos como este, minha gratidão e respeito.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigado a todos vocês!!!

“A persistência é o menor caminho do êxito”
- Charles Chaplin

RESUMO

Nascimento, L.F. Óleo essencial de *Piper aleyreanum* C.DC. (Piperaceae) reduz a nociceção inflamatória e neuropática em camundongos: Papel dos receptores TRPA1. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2018.

Piper aleyreanum, uma planta medicinal conhecida como “João-brandinho” e “pimenta-longa”, é utilizada na medicina popular como anti-inflamatório, analgésico e antidepressivo. Por essa razão, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos benéficos do óleo essencial de *Piper aleyreanum* (OEPa) nos modelos de dor pós-operatória e neuropática, bem como explorar o mecanismo de ação envolvido. Após análise fitoquímica realizada através de cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massas foram identificados 42 compostos no OEPa, os quais encontram-se distribuídos na forma de monoterpenos (17,9%) e sesquiterpenos (77,6%). Nos testes de nociceção aguda, o OEPa (100 mg/kg) reduziu de forma significativa o comportamento nociceptivo induzido pela injeção intratecal de glutamato. Além disso, também reduziu a resposta nociceptiva dos agonistas glutamatérgicos AMPA e cainato, da citocina pró-inflamatória IL-1 β e do cinamaldeído, um ativador de canais TRPA1. Tanto após o tratamento agudo quanto prolongado com OEPa, foi observada redução significativa da hipersensibilidade térmica e mecânica causada pela ligação parcial do nervo isquiático (LPNI), um modelo de neuropatia periférica, sem que causasse tolerância ou interferisse na atividade locomotora dos animais. As análises toxicológicas revelaram ainda que o tratamento repetido com OEPa não apresentou efeitos tóxicos com base nos parâmetros analisados (atividade de enzimas hepáticas, níveis séricos de marcadores renais e análise macroscópica de órgãos). O tratamento agudo e prolongado com OEPa também foi efetivo em reduzir a hipersensibilidade mecânica causada pela incisão plantar, um modelo de dor pós-operatória. A análise por citometria de fluxo revelou que o tratamento com OEPa foi capaz de reduzir a infiltração de células do sistema imune no local da lesão, especialmente monócitos/macrófagos e neutrófilos. Testes *in vitro* mostraram ainda que o tratamento com OEPa não altera a atividade do fator nuclear kappa B (NF- κ B). Também foi demonstrado que o efeito antinociceptivo do OEPa é mediado por interações com o canal de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1), e com a atividade provocada por mastócitos e seu mediador histamina. Juntos, os dados aqui apresentados fornecem um suporte científico adicional para o efeito

antinociceptivo do OEPA na hiperalgesia provocada por incisão cirúrgica e lesão nervosa, sugerindo que o OEPA apresenta um potencial promissor que pode ser utilizado no controle da dor pós-operatória e neuropática.

Palavras-chave: *Piper aleyreanum*; óleo essencial; dor pós-operatória; dor neuropática; canais TRPA1.

ABSTRACT

Nascimento, L.F. Essential oil from *Piper aleyreanum* C.DC. (Piperaceae) reduces inflammatory and neuropathic nociception in mice: the role of TRPA1 channels. Florianópolis: Federal University of Santa Catarina, 2018.

Piper aleyreanum, a medicinal plant known as “João-brandinho” e “pimenta-longa”, is used in the folk medicine as anti-inflammatory, analgesic, and antidepressant. For this reason, the present study aimed to investigate the beneficial effects of the essential oil from *Piper aleyreanum* (EOPa) in postoperative and neuropathic pain models, as well as to explore the mechanism of action involved in this effect. Upon phytochemical analysis using a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer were identified 42 compounds in the EOPa, which are split in monoterpenes (17,9%) and sesquiterpenes (77,6%). In the acute nociception tests, the EOPa (100 mg/kg) significantly reduced the nociceptive behavior induced by intrathecal injection of glutamate. In addition, it also reduced the nociceptive response of the glutamatergic agonists AMPA and kainate, the proinflammatory cytokine IL-1 β and cinnamaldehyde, a TRPA1 channel activator. In both, acute and prolonged treatment using EOPa, it was observed a significantly decreasing of the thermal and mechanical hyperalgesia provoked by a partial sciatic nerve ligation (PSNL), a peripheral neuropathy model, without cause tolerance or affect the locomotor activity of the animals. Toxicological analysis also revealed that the treatment with EOPa did not present toxic effects based on the parameters analyzed (hepatic enzyme activity, serum levels of renal markers and macroscopic analysis of organs). The acute and prolonged treatment was also effective to reduce the hyperalgesia and mechanical allodynia caused by incisional wound, a postoperative pain model. The flow cytometry analysis revealed that the EOPa treatment was able to reduce the cell infiltration from immune system at the local injury, specially monocytes/macrophages and neutrophils. *In vitro* assays also shown that EOPa treatment does not change the nuclear factor kappa B (NF- κ B) activity. It was also demonstrated that the EOPa antinociceptive effect is mediated by interactions with transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) and with activity provoked by mast cells and its mediator, histamine. Together, the data presented here provide an additional scientific support to the EOPa antinociceptive effect in the hyperalgesia induced by incisional wound

and nerve injury, suggesting that EOPa has a potential power that can be used to control postoperative and neuropathic pain.

Keywords: *Piper aleyreanum*; essential oil; postoperative pain; neuropathic pain; TRPA1 channels.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Axônios aferentes primários de fibras periféricas.....	30
Figura 2. Subclasses de neurônios sensoriais e suas inserções no corno dorsal da medula espinal.	32
Figura 3. Vias ascendentes da dor.....	34
Figura 4. Representação esquemática da circuitaria modulatória da dor	36
Figura 5. Inflamação provoca dor através de mediadores inflamatórios e sensibilização periférica	39
Figura 6. Subfamílias dos canais TRPs e seus domínios.....	48
Figura 7. Estrutura do canal TRPA1	50
Figura 8. Distribuição geográfica do gênero <i>Piper</i>	56
Figura 9. Representação esquemática e temporal dos testes comportamentais de nocicepção espontânea induzida por diferentes agentes algogênicos administrados pela via intratecal	71
Figura 10. Representação esquemática e temporal dos testes (comportamentais e bioquímicos) realizados em animais submetidos à LPNI.....	72
Figura 11. Representação esquemática e temporal dos testes realizados no modelo de incisão plantar.....	73
Figura 12. Representação esquemática e temporal dos testes comportamentais de nocicepção espontânea induzida por diferentes agentes algogênicos administrados pela via intraplantar.....	76
Figura 13. Perfil cromatográfico do óleo essencial de <i>Piper aleyreanum</i> obtido por CG-EM.....	83
Figura 14. OEPA reduz a resposta nociceptiva provocada pela injeção intratecal de agonistas glutamatérgicos	85
Figura 15. OEPA reduz a resposta nociceptiva provocada pela injeção intratecal da citocina pró-inflamatória IL-1 β	86
Figura 16. OEPA reduz a resposta nociceptiva induzida pela injeção intratecal de agonista TRPA1.....	87
Figura 17. OEPA administrado 1x ao dia reduz hiperalgesia mecânica no modelo animal de dor neuropática induzida pela LPNI.	88
Figura 19. OEPA reduz hiperalgesia térmica no modelo animal de dor neuropática induzida pela LPNI.....	90
Figura 20. OEPA não altera a atividade locomotora de animais neuropáticos	91
Figura 21. Efeito do OEPA (pela via intragástrica) na hipersensibilidade causada pela incisão plantar	94

Figura 22. Efeito do OEPA (pela via intragástrica) na hipersensibilidade causada pela incisão plantar.....	95
Figura 23. Efeito do OEPA (pela via intraperitoneal) na hipersensibilidade causada pela incisão plantar.....	96
Figura 24. Efeito do OEPA (pela via intraperitoneal) na hipersensibilidade causada pela incisão plantar.....	97
Figura 25. OEPA não altera a expressão periférica ou central de canais TRPA1 no modelo de incisão plantar.	98
Figura 26. Efeito do OEPA na migração de células mielóides no modelo de incisão plantar.	99
Figura 27. Efeito do OEPA na migração de leucócitos no modelo de incisão plantar.....	100
Figura 28. Efeito do OEPA na migração de monócitos/macrófagos no modelo de incisão plantar.....	101
Figura 29. Efeito do OEPA na migração de neutrófilos no modelo de incisão plantar.....	102
Figura 30. OEPA reduz a resposta nociceptiva provocada pela injeção intraplantar do óleo de mostarda, um agonista TRPA1.....	103
Figura 31. OEPA reduz a resposta nociceptiva provocada pela injeção intraplantar de isotiocianato de alila (AITC), um agonista TRPA1.....	104
Figura 32. OEPA reduz edema provocado pela injeção intraplantar de isotiocianato de alila.....	105
Figura 33. Curva dose-resposta da ação nociceptiva provocada pela injeção intraplantar de OEPA.....	106
Figura 34. Evidências farmacológicas do envolvimento do OEPA com canais TRPA1.....	107
Figura 35. OEPA reduz a resposta nociceptiva provocada pela injeção intraplantar do composto 48/80 e da histamina.....	108
Figura 36. Curva dose-resposta do OEPA sobre a viabilidade de células THP-1.....	109
Figura 37. Efeito do OEPA na atividade do fator nuclear kappa B.....	110
Figura 38. Representação esquemática do possível mecanismo de ação envolvido no efeito antinociceptivo do óleo essencial de <i>Piper aleyreanum</i>	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação fisiopatológica das principais características de duração da dor.	29
Tabela 2. Constituintes químicos do óleo essencial de <i>Piper aleyreanum</i>	84
Tabela 3. Efeito do óleo essencial de <i>Piper aleyreanum</i> sobre marcadores de função hepática e renal de camundongos Swiss após LPNI	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg	Micrograma
μl	Microlitro
15d-PGJ ₂	15-deoxi-delta-12,14-prostaglandina J ₂
4-HNE	4-hidroxinonenal
5,6-EET	Ácido 5,6-epoxieicotrienóico
a.C.	Antes de Cristo
AINE	Anti-inflamatório não esteroideal
AITC	Isotiocianato de alila
ALT	Alanina aminotransferase
AMP	Adenosina monofosfato
AMPA	Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropionico
AMPc	AMP cíclico
ANOVA	Análise de variância
ASIC	Canal sensível a ácido
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
BDNF	Fator neurotrófico derivado do encéfalo
BSA	Albumina de soro bovino
Ca ²⁺	Cálcio
CaMK	Quinase dependente de cálcio/calmodulina
CCL2	Quimiocina C-C <i>motif</i> ligante 2
CCR2	Receptor da quimiocina CCL2
cdNA	DNA complementar
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CFA	Adjuvante completo de Freund
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
CREB	Proteína de ligação aos elementos de resposta de cAMP

CX3CR1	Receptor da fraquitalcina
CXCL1	Quimiocina C-X-C <i>motif</i> ligante 1
CXCL12	Quimiocina C-X-C <i>motif</i> ligante 12
CXCL2	Quimiocina C-X-C <i>motif</i> ligante 2
CXCL5	Quimiocina C-X-C <i>motif</i> ligante 5
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRG	Gânglio da raiz dorsal
E.P.M.	Erro padrão da média
ELISA	Ensaio de Imunoadsorção Enzimática
ERK	Quinase controlada por sinalização extracelular
FP	Peptídeo N-formilado
FPR1	Receptor do peptídeo N-formilado
GABA	Ácido gama aminobutírico
GDNF	Fator neurotrófico derivado de células gliais
GGT	Gama-glutamilttransferase
GRF α 1	Receptor de GDNF
GRF α 3	Receptor de artemina
H ⁺	Prótons
HBSS	Solução salina balanceada com HEPES
HETE	Ácido hidroxieicosatetraenóico
HMGB1	Proteína B1 do grupo de alta mobilidade
i.g.	Intragástrico
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intraplantar
i.t.	Intratecal
IASP	Associação Internacional para Estudos da Dor (do inglês <i>International Association for Study of Pain</i>)
IB4	Isolectina B4
IL-12	Interleucina 12
IL-1 β	Interleucina 1 beta

IL-6	Interleucina 6
INPA	Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia
IR	Índice de retenção
JNK	Quinase c-JUN N-terminal
kg	Quilograma
LPNI	Ligação parcial do nervo isquiático
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
ml	Mililitro
mRNA	RNA mensageiro
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NGF	Fator de crescimento do nervo
Nav1.7	Canal de sódio controlado por voltagem de subunidade alfa tipo IX
nm	Nanômetro
NMDA	N-metil D-Aspartato
nmol	Nanomolar
NO	Óxido nítrico
OEPa	Óleo essencial de <i>Piper aleyreanum</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
P2X	Receptor purinérgico
P2X ₃	Receptor purinérgico subtipo 3
P2X ₄	Receptor purinérgico subtipo 4
PAG	Substância Cinzenta Periaquedutal
PAR ₁₋₄	Receptor ativado por protease subtipos de 1 a 4
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCRq	PCR quantitativa
pg	Picograma
PGA ₂	Prostaglandina A ₂
PGE ₂	Prostaglandina E ₂ ,

PGI ₂	Prostaciclina
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PKC γ	Isoforma gama da proteína quinase C
PMA	Éster de forbol
pmol	Picomolar
rACC	Córtex cingulado anterior rostral
RNA	Ácido ribonucleico
RTK	Receptor tirosina quinase
RVM	Porção rostromedial do bulbo
SEAP	Fosfatase alcalina secretada
SNC	Sistema Nervoso Central
SP	Substância P
TMP	Tiamina monofosfatase
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TrkA	Receptor neurotrófico de tirosina quinase tipo I
TrkB	Receptor neurotrófico de tirosina quinase tipo II
TRL	Receptor tipo <i>Toll</i>
TRP	Receptor de potencial transitório
TRPA	Receptor de potencial transitório anquirina
TRPA1	Receptor de potencial transitório anquirina I
TRPC	Receptor de potencial transitório canônico
TRPM	Receptor de potencial transitório melastatina
TRPML	Receptor de potencial transitório mucolipina
TRPP	Receptor de potencial transitório policistina
TRPV	Receptor de potencial transitório vanilóide
TRPV1	Receptor de potencial transitório vanilóide I
UACC	<i>University Animal Care Committee</i>
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	27
1.1 Dor e Nocicepção	27
1.2 Classificação da Dor	28
1.3 Fisiopatologia da Dor	29
1.4 Dor e Inflamação: Sensibilização Periférica e Central	38
1.5 Dor Pós-Operatória	43
1.6 Dor Neuropática	45
1.7 Receptores de Potencial Transitório (TRPs)	47
1.8 TRPA1	49
1.9 Plantas Medicinais	51
1.10 Óleos Essenciais	54
1.11 Família Piperaceae	55
1.12 Gênero <i>Piper</i>	556
1.13 <i>Piper aleyreanum</i>	558
2. JUSTIFICATIVA	61
3. OBJETIVOS	63
3.1 Objetivo Geral	63
3.2 Objetivos Específicos	63
4. MATERIAL E MÉTODOS	65
4.1 Estudo Fitoquímico	65
4.1.1 Coleta e Identificação da Planta	65
4.1.2 Extração do Óleo Essencial	65
4.1.3 Identificação dos Constituintes do Óleo Essencial	65
4.2 Estudo Farmacológico	66
4.2.1 Animais	66
4.2.2 Desenho Experimental	67
4.2.3 Drogas e Reagentes	69
4.2.4 Testes Nociceptivos	69

4.2.4.1 Nociceção induzida pela administração intratecal de agonistas glutamatérgicos e citocinas pró-inflamatórias.....	69
4.2.4.2 Nociceção induzida pela administração intratecal de agonistas TRPs	70
4.2.4.3 Nociceção induzida pela Ligação Parcial do Nervo Isquiático (Dor Neuropática).....	71
4.2.4.4 Nociceção induzida pela incisão plantar (Dor Pós-operatória) .	72
4.2.4.5 Nociceção induzida pela administração intraplantar de óleo de mostarda.....	73
4.2.4.6 Nociceção induzida pela administração intraplantar de isotiocianato de alila	74
4.2.4.7 Nociceção induzida pela administração intraplantar de OEPA ..	74
4.2.4.8 Nociceção induzida pela administração intraplantar do composto 48/80.....	75
4.2.4.9 Nociceção induzida pela administração intraplantar de histamina	75
4.2.5 Testes Comportamentais	76
4.2.5.1 Avaliação da hipersensibilidade mecânica (von Frey)	76
4.2.5.2 Avaliação da hiperalgesia térmica (placa quente/fria)	77
4.2.5.3 Avaliação da atividade locomotora (campo aberto)	77
4.2.6 Ensaios Bioquímicos, Moleculares e Imunológicos	78
4.2.6.1 Teste de citotoxicidade (Ensaio azul de trypan).....	78
4.2.6.2 Extração de RNA e PCR Quantitativa em Tempo Real	78
4.2.6.3 Atividade NF- κ B.....	79
4.2.6.4 Citometria de fluxo	79
4.2.6.5 Análise toxicológica	80
4.3 Análise Estatística	81
5. RESULTADOS.....	83
5.1 Identificação dos constituintes químicos do OEPA.....	83
5.2 Efeito do OEPA na nociceção espontânea induzida pela administração intratecal de agonistas glutamatérgicos	85
5.3 Efeito do OEPA na nociceção espontânea induzida pela administração intratecal de citocinas pró-inflamatórias	86

5.4 Efeito do OEPA na nocicepção espontânea induzida pela administração intratecal de agonistas de canais TRPs.....	86
5.5 Efeito do OEPA na hiperalgesia mecânica e térmica induzida pela lesão parcial do nervo isquiático (LPNI).....	87
5.5.1 Hiperalgesia mecânica (LPNI).....	87
5.5.2 Hiperalgesia térmica (LPNI).....	90
5.6 Avaliação da atividade locomotora	91
5.7 Efeito do OEPA sobre marcadores de lesão hepática e renal.....	91
5.8 Efeito do OEPA na hipersensibilidade mecânica induzida pela incisão plantar	92
5.8.1 Hipersensibilidade mecânica (incisão plantar).....	92
5.8.2 Expressão gênica de canais TRPA1 (incisão plantar)	97
5.8.3 Migração de células do sistema imune (incisão plantar).....	98
5.9 Efeito do OEPA na nocicepção espontânea induzida pelo óleo de mostarda.....	102
5.10 Efeito do OEPA na nocicepção espontânea induzida pela administração intraplantar de isotiocianato de alila (AITC)	103
5.11 Efeito do OEPA no edema induzido pela administração intraplantar de isotiocianato de alila (AITC).....	104
5.12 Nocicepção induzida pela administração intraplantar de OEPA.....	106
5.13 Envolvimento do OEPA com canais TRPA1	106
5.14 Efeito do OEPA na nocicepção espontânea induzida pelo composto 48/80 e histamina	108
5.15 Efeito do OEPA sobre a viabilidade celular pelo método azul de tripan	108
5.16 Efeito do OEPA sobre a atividade NF-κB.....	109
5.17 Efeito do OEPA sobre a viabilidade celular por análise de citometria de fluxo	110
6. DISCUSSÃO	113
7. CONCLUSÃO	127
REFERÊNCIAS.....	129

1. INTRODUÇÃO

1.1 Dor e Nocicepção

A dor tem sido uma grande preocupação da humanidade desde os tempos antigos e continua sendo até os dias atuais um dos assuntos mais importantes entre os profissionais de saúde. Sabe-se que a capacidade de detectar estímulos nocivos é essencial para a sobrevivência e o bem-estar de um organismo. Contudo, a dor possui um papel dual que fascina os pesquisadores há séculos. Por um lado, ela representa um mecanismo de proteção fisiológica que atua como um sistema de alarme, notificando o organismo da presença de algum perigo ou estímulo nocivo presente no ambiente. A dor também é importante por auxiliar no reparo de um tecido que sofreu algum tipo de lesão, uma vez que cria uma região localizada de hipersensibilidade (promovido pelo processo inflamatório), minimizando o movimento e o contato com a área lesionada até que sua recuperação ocorra. Por outro lado, a dor pode não possuir nenhuma função benéfica, mas, ao contrário, torna-se uma condição patológica, capaz de provocar dor espontânea, persistente e grave hipersensibilidade, como ocorre na dor crônica (Basbaum e Woolf, 1999; Basbaum, 2009; Kuner, 2010; Woolf, 2010).

O caráter adaptativo e protetor da dor pode ser evidenciado claramente em condições em que um indivíduo é totalmente incapaz de sentir dor, a exemplo do que acontece na insensibilidade congênita à dor (uma doença genética autossômica recessiva rara causada por mutações no gene SCN9A, posicionado no *locus* cromossômico 2q24.3). O gene SCN9A é responsável por codificar o canal de sódio controlado por voltagem de subunidade alfa tipo IX (Na_v1.7), um canal que é altamente expresso em neurônios nociceptivos, onde exerce o importante papel de gerar o potencial de ação destas células. Como consequência das mutações causadas no gene SCN9A, os indivíduos perdem a capacidade de sentir dor, o que resulta no surgimento de outras condições associadas à essas mutações, como lesões causadas por queimaduras, traumas repetidos (incluindo fraturas e deformidades ósseas), auto-mutilação e consequentemente, morte prematura (Cox *et al.*, 2006; Drenth and Waxman, 2007; Peddareddygari, *et al.*, 2014).

De acordo com a Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP, do inglês *International Association for the Study of Pain*), a dor pode ser definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão tecidual, real ou potencial, ou descrita

em termos de tal dano (Loeser e Treede, 2008). Dessa forma, considerando que a dor representa uma experiência complexa e muitas vezes subjetiva, que envolve tanto o componente emocional quanto o sensorial, torna-se apropriado atribuir o termo “dor” quando os componentes emocionais são expressos com clareza, como ocorre com seres humanos e o termo “nocicepção” quando a investigação da dor é pautada na precisão e reprodutibilidade do componente sensorial, como classicamente pode ser observada em modelos animais (Russo e Brose, 1998; Bars *et al.*, 2001; Barrot, 2012). Contudo, apesar de menos comum, o componente emocional da dor sentida pelos animais tem sido recentemente demonstrado na literatura (Leite-Almeida *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012).

1.2 Classificação da Dor

Dentre as diversas formas de classificação da dor, a mais comum refere-se à sua origem e duração. Quanto a origem, ela pode ser dividida em: *dor nociceptiva*, assim denominada quando a dor é provocada pela ativação direta ou excessiva dos nociceptores frente à estímulos intensos, como ocorre ao tocar em objetos muito quentes, frios ou pontiagudos. Nesse tipo de dor a proteção fisiológica é o fator principal, essencial para detectar e minimizar o contato com o estímulo nocivo; *dor inflamatória*, que ocorre quando há sensibilização dos nociceptores por mediadores inflamatórios liberados pela ativação de células do sistema imune, seja por uma lesão ou por uma infecção tecidual (Esse tipo de dor também representa dor de caráter adaptativo e protetor); e *dor patológica*, sendo que esta não tem caráter protetor, mas ao contrário, é mal adaptativa e resulta do funcionamento anormal do sistema nervoso em virtude de um dano (dor neuropática), ou mesmo de condições em que não há dano físico ou inflamação (dor disfuncional), como acontece na fibromialgia, síndrome do intestino irritável, entre outras síndromes onde existe dor substancial, sem estímulo nocivo ou inflamação periférica patológica (Woolf, 2010; Nakamura *et al.*, 2014).

Quanto a duração a dor pode ser ainda dividida em: *aguda*, *sub-crônica* e *crônica*, conforme características que são demonstradas na tabela 1 (Millan, 1999).

Tabela 1. Classificação fisiopatológica das principais características de duração da dor.

Tipo	Duração	Característica Temporal Relacionada à Causa	Característica Principal	Classe	Valor Adaptativo	Resposta adaptativa
Aguda	Seg. a minutos	Estímulo instantâneo	Proporcional a causa	Nociceptiva	Altamente protetor	Retirada; Evasão
Sub-crônica	Horas a dias	Resolução após recuperação	Hiperalgisia 1ª e 2ª; Alodínia; Dor espontânea	Principalment e nociceptiva, mas também neuropática	Protetor; Recuperação	Evitar contato com o tecido afetado
Crônica	Meses a anos	Persistente; Prolongada; Pode exceder a resolução do dano tecidual	Hiperalgisia 1ª e 2ª; Alodínia; Dor espontânea; Parestesias; Pronunciado componente afetivo	Nociceptiva; Neuropática	Nenhum; Mal adaptativo	Psicológico e cognitivo

1ª e 2ª, primária e secundária, respectivamente. Adaptado de Millan, 1999.

1.3 Fisiopatologia da Dor

A dor é uma experiência de natureza sensorial e psicológica que envolve 4 dimensões principais: sensorial-discriminativa; afetiva e emocional; cognitiva; e comportamental. A nociceção representa o componente sensorial e compreende o processo de transdução, transmissão e modulação do estímulo nociceptivo. Na transdução, os sinais nociceptivos são convertidos em impulsos elétricos por estruturas especializadas denominadas nociceptores, presentes nas terminações de neurônios sensoriais, também conhecidos como neurônios aferentes primários ou neurônios de primeira ordem (Kitahata, 1993; Dubin e Patapoutian, 2010).

Os nociceptores são estruturas amplamente distribuídas na pele, nos músculos, nas articulações e na parede dos órgãos e podem ser ativados por estimulação direta de agentes térmicos, químicos e mecânicos, além de moléculas liberadas no local da inflamação, como bradicinina, prostaglandinas, histamina, serotonina, entre outros (Calvino e Grilo, 2006; Woolf e Ma, 2007). Estas estruturas são encontradas em dois grupos especializados de fibras nervosas: fibras C (não-mielinizadas) e fibras A δ (pouco mielinizadas), sendo que ambas são distintas dos sensores táteis mielinizados (fibras A β) e dos proprioceptores.

Nociceptores presentes em fibras A δ , assim como a maioria daqueles encontrados em fibras C são do tipo polimodal e, portanto, respondem a estímulos nocivos de origem térmica, química e mecânica (Julius e Basbaum, 2001; Scholz e Woolf, 2002).

As fibras aferentes primárias são classificadas em três grandes grupos, segundo seu diâmetro, grau de mielinização e velocidade de condução (Fig. 1). As fibras A β constituem fibras de grosso calibre (maior que 10 μ m), mielinizadas e de condução rápida, responsáveis por sensações inócuas, como tato, vibração e pressão. As fibras A δ são de diâmetro intermediário (2 a 6 μ m), mielinizadas, com velocidade de condução intermediária, responsáveis pela detecção da dor rápida e aguda (“primeira dor”). Já as fibras C são fibras de pequeno calibre (0,4 a 1,2 μ m), não mielinizadas e de velocidade de condução lenta, responsáveis pela detecção de dor lenta e difusa (“segunda dor”). Fibras aferentes primárias normalmente transmitem a informação nociceptiva através de fibras do tipo A δ e C, uma vez que na ausência de dano tecidual ou nervoso as fibras A β transmitem apenas informação de estímulos inócuos, como um toque leve, por exemplo (Julius e Basbaum, 2001; Basbaum *et al.*, 2009).



Figura 1. Axônios aferentes primários de fibras periféricas. A figura mostra as diferenças entre as fibras, conforme o grau de mielinização, diâmetro da fibra e função sensorial. As fibras sensoriais A α e A β , fibras mielinizadas de grande diâmetro, são responsáveis por conduzir estímulos de propriocepção e estímulos não dolorosos, como um toque leve. As fibras A δ são fibras levemente mielinizadas e diâmetro médio que respondem a estímulos nociceptivos químicos, mecânicos e térmicos (com limiar de aproximadamente 53 °C nas fibras A δ tipo I e 43° C nas fibras A δ tipo II). Já as fibras C, fibras não-mielinizadas de pequeno diâmetro, são fibras que respondem a estímulos nociceptivos térmicos inócuos ou com limiar acima de 43° C, além de estímulos químicos e mecânicos. Essas fibras também são responsáveis pela transmissão das informações nociceptivas relacionadas com a coceira. Adaptado de Julius e Basbaum, 2001.

As fibras nociceptivas, que incluem as fibras A δ e C, podem ainda apresentar subdivisões. As fibras A δ são agrupadas em duas classes principais: as do tipo I são constituídas por fibras que respondem à estímulos químicos e mecânicos, mas com limiares de ativação térmico elevado (>50 °C), já as fibras do tipo II, embora também respondam a estímulos químicos e térmicos, possuem um limiar mais elevado para promover a ativação mecânica. Assim como as fibras A δ , as fibras C também são divididas em duas populações distintas: as peptidérgicas, que são caracterizadas pela liberação de neuropeptídeos, incluindo a substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), bem como pela expressão de receptores: receptor neurotrófico de tirosina quinase tipo I (TrkA), receptor vanilóide subtipo I (VR1) e do receptor GFR α 1; enquanto as fibras não-peptidérgicas, são caracterizadas pela expressão do receptor RET (um receptor tirosina quinase), do receptor GFR α 1, do receptor GFR α 3 e do receptor VR1. Grande parte fibras não-peptidérgicas também podem ser diferenciadas das fibras peptidérgicas pela marcação com a isolectina B4 (IB4), através de sua ligação com receptores RET. Além disso, fibras não-peptidérgicas também podem expressar a enzima tiamina monofosfatase (TMP), bem como receptores purinérgicos, sobretudo do subtipo P2X₃ (Fig. 2) (Julius and Basbaum, 2001; Sah *et al.*, 2003; Basbaum *et al.*, 2009).

Assim, uma vez que o estímulo nociceptivo é convertido em impulso elétrico, a informação é transmitida até a medula espinal através das fibras nociceptivas. Estas, projetam-se até o corno dorsal da medula espinal, que por sua vez, encontra-se organizado e dividido em 10 lâminas, conforme características anatômicas e eletrofisiológicas distintas, onde constituem as chamadas lâminas de Rexed. O corno dorsal é formado pelas lâminas I (camada marginal), II (substância gelatinosa), III, IV (núcleo próprio) e V e VI (camadas profundas) (Fig. 2). O corno ventral é formado pelas lâminas de VII, VIII e IX, ao passo que a lâmina X representa a região que circunda o canal medular (Millan, 1999).

As conexões entre as fibras sensoriais e o corno dorsal da medula seguem uma organização bastante precisa. Fibras A β projetam-se para camadas profundas (III, IV e V), enquanto fibras A δ projetam-se tanto superficialmente para a lâmina I, como para lâminas mais profundas (lâmina V). A maior parte das fibras peptidérgicas terminam na lâmina I e na parte mais externa da lâmina II, ao passo que as fibras não-peptidérgicas terminam na região interna da lâmina II, uma região caracterizada pela presença de interneurônios excitatórios que expressam a isoforma *gamma* da proteína quinase C (PKC γ) e tem sido relacionada

com dor persistente induzida por lesão (Malmberg *et al.*, 1997; Basbaum *et al.*, 2009).

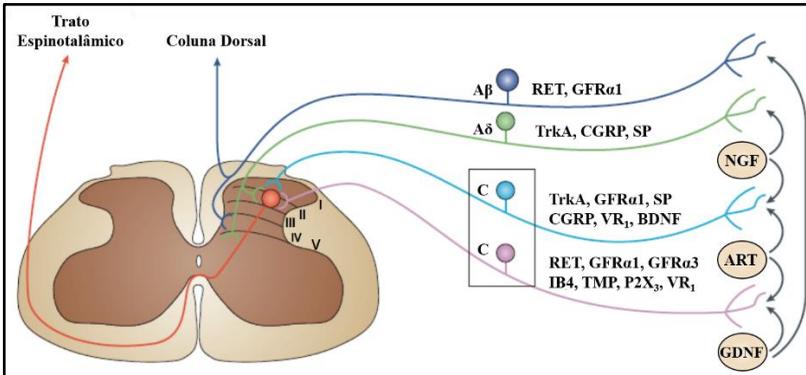


Figura 2. Subclasses de neurônios sensoriais e suas inserções no corno dorsal da medula espinal. Fibras mielinizadas A β são mecanorreceptores de baixo limiar que respondem a sensações de toque, pressão e vibração. Estas fibras comunicam-se com interneurônios das lâminas III e IV do corno dorsal, além de projetar-se rostralmente através das colunas dorsais. Fibras A δ e fibras C respondem aos estímulos nociceptivos e projetam seus axônios até as lâminas I, II e V do corno dorsal, onde comunicam-se com neurônios de segunda ordem que ascendem para o trato espinotalâmico. As fibras A δ produzem substância P (SP) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), e expressam receptores neurotróficos de tirosina quinase tipo I (TrkA). As fibras C, por sua vez, são divididas em peptidérgicas, quando produzem SP e CGRP, e expressam receptor vanilóide subtipo I (VR1), receptor neurotrófico de tirosina quinase tipo I (TrkA), bem como GFR α 3 (receptor do GDNF); e fibras não-peptidérgicas, as quais caracterizam-se pela expressão de RET (receptor GDNF e artemina), GFR α 1 (receptor do GDNF), GFR α 3 (receptor da artemina), canal iônico (purinérgico) ativado por ATP subtipo (P2X $_3$) e VR1. Além disso, essas fibras também podem ligar-se a isolectina B4 e conter a enzima tiamina monofosfatase (TMP). Adaptado de Sah *et al.*, 2003.

O corno dorsal da medula espinal constitui o primeiro local de modulação da informação que chega da periferia e alcança o SNC, sendo por isso, considerado uma estação de controle da informação. Nessa estrutura, os axônios dos neurônios de projeção (neurônios de segunda ordem), decussam através da comissura anterior, formando os tratos espinais ascendentes que conduzem informações até centros superiores, como ponte e tálamo. Os neurônios de projeção das lâminas I e V constituem a principal via de comunicação da informação que vai do corno dorsal em direção ao encéfalo, e representam o ponto inicial de múltiplas vias de ascensão da informação nociceptiva. Estas, por sua vez, podem ser divididas em 5 tratos principais: espinotalâmica, espinoreticular, espinomesencefálica, espinocervicotalâmica e espinohipotálâmica (Basbaum e Jessell, 2000; Calvino e Grilo, 2006).

O trato espinotalâmico constitui a via nociceptiva ascendente mais importante da medula espinal, sendo formada por axônios de neurônios nociceptivos específicos (fibras C e A δ), além daqueles de amplo espectro dinâmico (sensíveis tanto a estímulos nocivos quanto inócuos) provenientes das lâminas I, V, VI e VII do corno dorsal. Essa via projeta-se até os núcleos talâmicos e possui um papel chave na transmissão da informação nociceptiva (Fig. 3). Estímulos nociceptivos que são projetados para o tálamo lateral através do trato espinotalâmico lateral estão relacionados aos aspectos de processamento sensorial e discriminativos da dor (ou seja, localização e intensidade do estímulo), ao passo que aqueles transmitidos pela face medial e pela via espinomesencefálica projetam-se para o tálamo medial e estruturas límbicas, responsáveis pelo processamento de componentes aversivos e emocionais da dor (Hunt e Mantyh, 2001; Scholz e Woolf, 2002, Kuner, 2010).

O trato espinoreticular é formado por axônios de neurônios que não cruzam a linha média, sendo provenientes das lâminas VII e VIII. Este trato ascende pelo quadrante anterolateral da medula espinal até atingir a formação reticular e o tálamo. Já o trato espinomesencefálico (ou espinoparabraquial) é formado por axônios de neurônios de projeção oriundos das lâminas I e V, transmitindo informações que contribuem para o componente afetivo da dor. Este trato projeta-se pelo quadrante anterolateral da medula espinal em direção à formação reticular e à substância cinzenta periaquedutal (PAG), bem como para o núcleo parabraquial, cujos neurônios comunicam-se com a amígdala, um núcleo chave do sistema límbico na regulação do estado emocional (Millan, 1999; Kuner, 2010; Kandel *et al.*, 2014).

O trato cervicotalâmico é formado por neurônios do núcleo cervical lateral que recebem sinais de neurônios presentes nas lâminas III e IV do corno dorsal. A maior parte dos axônios desse trato cruza a linha média e ascende através da via lemnisco medial do tronco encefálico até os núcleos mesencefálicos e núcleos ventroposterior lateral e posteromedial do tálamo. Outros neurônios das lâminas III e IV enviam seus axônios diretamente para a coluna dorsal até chegarem nos núcleos cuneiforme e grácil do bulbo (Millan, 1999; Kandel *et al.*, 2014).

O trato espino-hipotalâmico é formado por axônios de neurônios encontrados nas lâminas I, V e VIII do corno dorsal da medula, os quais projetam-se para núcleos hipotalâmicos que atuam como centros de controle autônomos, envolvidos em respostas neuroendócrinas e cardiovasculares (Millan, 1999; Kandel *et al.*, 2014).

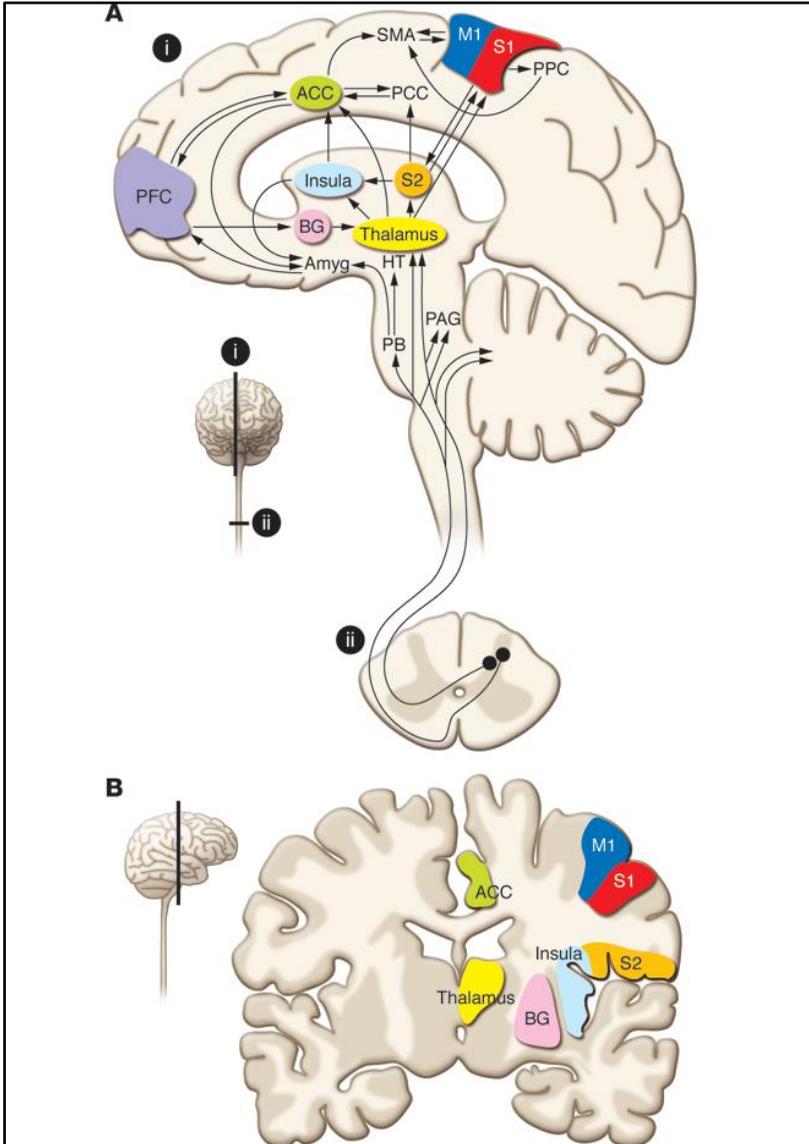


Figura 3. Vias ascendentes da dor. Representação esquemática mostrando as regiões, suas interconexões e as vias aferentes da dor (A). As regiões representadas por cores correspondem às áreas envolvidas na dor vistas a partir de um corte sagital (A) e coronal (B). Legenda: S1 e S2 (córtex somatossensorial primário e secundário, respectivamente), ACC (córtex cingulado anterior), Thalamus (tálamo), PCC (córtex pré-frontal), BG (gânglio basal), HT (hipotálamo), Amyg (Amígdala), PB (núcleo parabraquial). Fonte: Schweinhardt e Bushnell, 2010.

Por sua vez, os neurônios de terceira ordem são responsáveis pela ascensão das informações nociceptivas provenientes do tálamo, projetando-as até regiões corticais. Neurônios do núcleo talâmico lateral projetam-se para o córtex somatossensorial primário e permitem a localização e caracterização do estímulo doloroso, ao passo que neurônios das áreas nuclear medial e intralaminar são projetados para o giro cingulado anterior, onde acredita-se estar envolvido na percepção do sofrimento e reação emocional à dor. Embora o processamento central da dor seja concentrado no tálamo, sabe-se que a dor é uma percepção mais complexa que envolve diversas áreas corticais, tais como córtex somatossensorial primário e secundário, córtex insular, córtex cingulado anterior e córtex pré-frontal, cuja atividade é influenciada de modo crítico pelo contexto no qual o estímulo nocivo é apresentado, bem como pela experiência individual prévia (Cross, 1994; D’Mello e Dickenson, 2008).

Estudos relacionados aos estados emocionais negativos mostram que há aumento da atividade provocada pela dor em áreas límbicas como córtex pré-frontal e córtex insular, evidenciando que o estado emocional pode influenciar na percepção da dor (Phillips *et al.*, 2013). Além disso, sabe-se que a antecipação ou expectativa de dor também pode ativar áreas relacionadas à dor na ausência de um estímulo doloroso físico (Apkarian *et al.*, 2005).

Além das vias ascendentes, existem ainda as vias descendentes de modulação da dor, que podem ser tanto de natureza facilitatória quanto inibitória do estímulo nociceptivo (Fig. 4). A modulação descendente do processamento nociceptivo inicia-se no córtex, em áreas da amígdala e do córtex cingulado anterior rostral (rACC), sendo a PAG o principal alvo dessas estruturas. A PAG é uma área altamente interconectada com o hipotálamo e estruturas corticais límbicas, como a amígdala, e também pode receber estímulos diretos do trato espinomesencefálico. A PAG projeta seus neurônios para a porção rostroventral do bulbo (RVM), através de três tipos de neurônios: neurônios *on* (estimulatório), neurônios *off* (inibitórios) e neurônios neutros. Esses 3 tipos de neurônios também são encontrados na RVM, de onde projetam-se para o corno dorsal da medula espinal para amplificar ou inibir o estímulo nociceptivo, conforme diferentes circunstâncias psicológicas, como estresse, medo, antecipação e foco de atenção. O sistema PAG-RVM tem um papel fundamental nas estratégias para lidar com estressores intrínsecos e extrínsecos, além de ser reconhecido como um sítio central de agentes analgésicos, como opióides, inibidores de ciclo-oxigenase e canabinóides (Fig. 4) (Heinricher *et al.*, 2009; Schweinhardt e Bushnell, 2010).

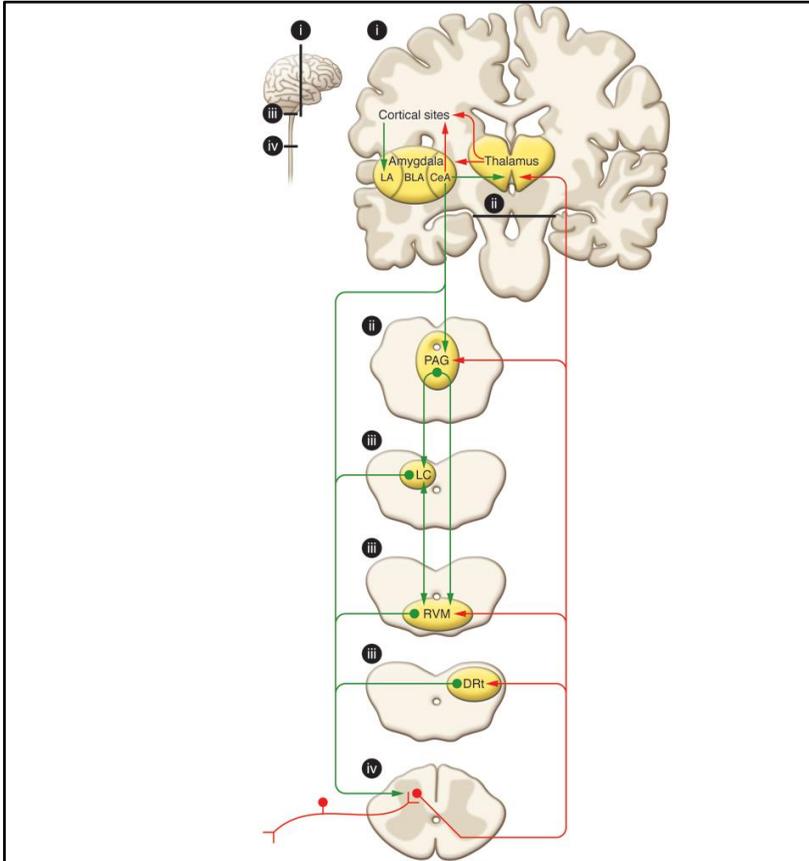


Figura 4. Representação esquemática da circuitaria modulatória da dor. Na via ascendente da dor (em vermelho), estímulos nociceptivos alcançam o corno dorsal da medula espinal (parte IV da figura) através de fibras aferentes primárias (neurônios de primeira ordem) e fazem sinapses com neurônios de projeção (neurônios de segunda ordem), que ascendem principalmente através do trato contralateral espinotalâmico. As projeções ascendentes vão em direção ao bulbo (parte III da figura - onde alcançam o núcleo reticular dorsal (DRt) e a porção ventromedial do bulbo (RVM)), mesencéfalo (parte II da figura - onde alcançam a substância cinzenta periaquedual (PAG)) e tálamo, cujas projeções rostrais tem como alvo áreas que incluem sítios corticais e a amígdala. A parte capsular da “amígdala nociceptiva” (CeA) recebe estímulos nociceptivos do tronco cerebral e medula espinal. Estímulos provenientes do tálamo e do córtex entram através da amígdala lateral (LA) e basolateral (BLA). A CeA envia sinais para os sítios corticais e o tálamo, onde percepções cognitivas e conscientes da dor são integradas. A modulação descendente da dor (em verde) é mediada através de projeções para a PAG e para o corno dorsal da medula espinal através do funículo dorsolateral (DLF), que integra informações provenientes do bulbo (*locus coeruleus*, RVM e DRt). Em paralelo, o *locus coeruleus* noradrenérgico (LC) recebe estímulos da PAG, comunica-se com a RVM, e envia projeções noradrenérgicas inibitórias descendentes para a medula espinal. Projeções antinociceptivas e nociceptivas espinais da RVM modulam positiva e negativamente os estímulos e fornece um sistema modulatório endógeno da dor. Fonte: Ossipov *et al.*, 2010.

A amígdala desempenha um papel importante na percepção da dor e está envolvida em respostas emocionais. Acredita-se que esta estrutura seja um componente crítico da dor, uma vez que possui conexões com a PAG e sítios corticais. Interações entre o córtex pré-frontal e a amígdala estão relacionadas a modulação afetiva-emocional das funções cognitivas da dor, dirigindo tarefas como tomada de decisões e avaliação de risco/recompensa *versus* dor. Assim, a amígdala constitui uma área que contribui significativamente para a integração da dor, além de estar associada com respostas como medo e ansiedade (Ossipov *et al.*, 2010).

As vias de controle descendente podem modular a resposta nociceptiva através de diversos neurotransmissores, como epinefrina, norepinefrina, serotonina, GABA (ácido gama aminobutírico), glicina, dopamina, além de diversos opióides e canabinóides endógenos. Os receptores de opióides, por exemplo, além de estarem na periferia e no corno dorsal da medula, também são encontrados no tronco cerebral, onde opióides endógenos, como encefalina, β -endorfina e dinorfina, ligam-se aos seus receptores e atuam como parte de um mecanismo antinociceptivo interno. Além disso, estudos também têm mostrado o papel do sistema descendente inibitório noradrenérgico do *locus ceruleus* e *locus subceruleus*. A presença de receptores noradrenérgicos α -2 nas lâminas II e IV no corno dorsal da medula contribuem com essa via através da ativação desses receptores pela noradrenalina. Estudos recentes também já demonstraram que a ativação de receptores α -adrenérgicos causa despolarização de interneurônios GABA, demonstrando um mecanismo adicional da via inibitória (Cross, 1994; Millan, 2002; Scholz e Woolf, 2002; Heinricher *et al.*, 2009; Ossipov *et al.*, 2010).

Assim, a sinalização nociceptiva é crucial para o organismo prevenir danos e garantir sua sobrevivência. No entanto, sob determinadas circunstâncias, sejam elas psicológicas ou patológicas, essa sinalização pode provocar alteração do estímulo sensorial, causando dor que já não é benéfica ao organismo. Esta alteração pode levar a estimulação dos terminais sensoriais periféricos (*sensibilização periférica*) e centrais (*sensibilização central*), de maneira a causar respostas exageradas de dor frente a estímulos que normalmente não produzem dor (alodínia), ou gerando dor em um nível maior do que o normal frente ao estímulo doloroso (hiperalgesia) (Linley *et al.*, 2010; Woolf, 2011).

1.4 Dor e Inflamação: Sensibilização Periférica e Central

A resposta inflamatória é um fenômeno complexo, dinâmico e multimediado, que caracteriza uma cascata de eventos bioquímicos e celulares frente a uma infecção ou lesão tecidual. De modo geral, esse processo é marcado pelo extravasamento de fluídos, ativação enzimática, migração celular, liberação de mediadores, sensibilização e ativação de receptores, lise tecidual e reparo, que em conjunto podem ser observados como os sinais e sintomas clássicos da inflamação: dor, calor, rubor, edema e redução da função (Julius e Basbaum, 2001; Broughton *et al.*, 2006; Bausbaum *et al.*, 2009).

Durante o processo inflamatório, diversos mediadores são liberados e dão origem à chamada “sopa inflamatória” que é formada no local da lesão. Esses mediadores são produzidos e liberados principalmente por células do sistema imune que residem ou foram infiltradas no local da lesão, e representam um grande conjunto de moléculas de sinalização, como neurotransmissores (glutamato), neuromoduladores (Substância P, CGRP.), peptídeos (bradicinina), eicosinóides (prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos), neurotrofinas (NGF), citocinas (IL-1 β , TNF- α), quimiocinas (fraquitalcina), bem como proteases extracelulares (trombina) e prótons (Fig. 5). Muitas dessas substâncias, incluindo as quimiocinas, podem ativar ou modificar diretamente a atividade de nociceptores através de receptores ou canais iônicos e, dessa forma, são responsáveis pela amplificação e manutenção do processo inflamatório (Bausbaum *et al.*, 2009; Amaya *et al.*, 2013).

Dentre os mediadores inflamatórios, bradicinina, prostaglandina E₂ (PGE₂), NGF e interleucinas pró-inflamatórias, possuem destaque uma vez que exercem um importante papel na nocicepção. As prostaglandinas, incluindo a PGE₂, são potentes mediadores da dor e da inflamação, e estão envolvidas no processo de vasodilatação, formação de edema e desenvolvimento de hiperalgesia. Dentre as citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL-1 β destacam-se por serem rapidamente liberadas e contribuírem com o recrutamento e ativação de células do sistema imune. Estas citocinas também contribuem através da síntese de NGF e PGE₂, que ocorre de forma secundária à indução da atividade de ciclo-oxigenase-2 (COX-2) em células do sistema imune e outras células não-neuronais residentes. Além disso, ambas as citocinas tem ação excitatória em neurônios sensoriais, onde aumentam substancialmente a excitabilidade e, conseqüentemente, sua atividade espontânea e evocada (Safieh-Garabedian *et al.*, 1995, Binshtok, 2008).

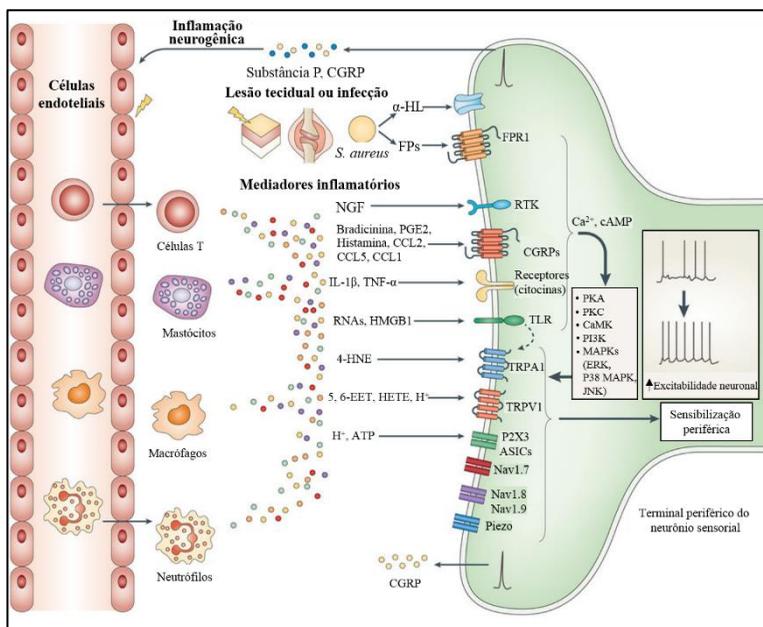


Figura 5. Inflamação provoca dor através de mediadores inflamatórios e sensibilização periférica. Dano tecidual ou infecção causa inflamação pelo extravasamento de plasma e infiltração de células do sistema imune, como macrófagos, neutrófilos e células T para o tecido lesionado. A infiltração de células do sistema imune e células residentes liberam mediadores inflamatórios, como bradicinina, prostaglandinas, prótons (H^+), adenosina trifosfato (ATP), fator de crescimento do nervo (NGF), citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) e quimiocinas pró-inflamatórias (CCL2, CXCL1 e CXCL5). Neurônios sensoriais expressam receptores para todos os mediadores inflamatórios, incluindo receptores acoplados a proteína G (GPCRs), receptores ionotrópicos e receptores tirosina quinase. Como consequência da ativação desses receptores ocorre a ativação de segundos mensageiros, como Ca^{2+} e AMP cíclico (AMPc), que por sua vez, ativam várias quinases, como proteína quinase A (PKA), proteína quinase C (PKC), proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina (CaMK), fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), proteínas quinases activadas por mitógenos (MAPKs) e quinases regulada por sinal extracelular (ERK), p38 MAPK e c-Jun N-terminal (JNK). A ativação dessas quinases causa hipersensibilidade e hiperexcitabilidade do nociceptor (sensibilização periférica) através da modulação de estruturas chave envolvidas na transdução de sinal, como receptores de potencial transitório anquirina tipo 1 (TRPA1), vanilóide tipo I (TRPV1) e Piezo (canal iônico ativado por estiramento), bem como moléculas que ativam canais de sódio dependente de voltagem (Nav1.7, Nav1.8 e Nav1.9). Os neurônios sensoriais também expressam receptores tipo Toll (TRLs), que podem ser ativados por ligantes exógenos (incluindo vírus e bactérias) e ligantes endógenos (RNAs). Infecção bacteriana por *Staphylococcus aureus* também pode ativar diretamente os nociceptores e induzir hiperexcitabilidade pela liberação de peptídeos N-formilados (FPs) e pela toxina α -hemolisina (α -HL). A ativação do nociceptor também libera SP e CGRP, que estão envolvidos na inflamação neurogênica. Legenda: 4-hidroxi nonenal (4-HNE), ácido 5,6-epoxieicotrienóico (5,6-EET), canal sensível à ácido (ASIC), receptor do peptídeo formil (FPR1), ácido hidroxieicosatetraenóico (HETE), proteína B1 do grupo de alta mobilidade (HMGB1), receptor purinérgico (P2X3), prostaglandina E_2 , receptor tirosina quinase (RTK). Adaptado de: Ji *et al.*, 2014.

Durante a inflamação os níveis de NGF são substancialmente elevados e contribuem com o aumento da síntese de SP e CGRP nos terminais dos aferentes primários. Essa neurotrofina também é responsável pela redução da atividade do neurotransmissor inibitório GABA nas terminações centrais, pelas alterações provocadas em receptores vanilóides (TRPV1) de fibras A δ acoplados a canais iônicos dependentes de ligante, além de acionar proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAPK). Estas, por sua vez, podem fosforilar o AMPc, dando início à transcrição gênica, e conseqüentemente, provocar alterações fenotípicas que contribuem para amplificação da transmissão sináptica. O NGF também pode atuar diretamente sobre mastócitos, e assim, ativar e sensibilizar terminações sensoriais através da degranulação destas células (Geppetti *et al.*, 1990; Schaible e Richter, 2004; Basbaum, 2009).

Por sua vez, a bradicinina ativa neurônios sensoriais induzindo a liberação de neuropeptídeos (SP, neuroquinina A e CGRP) que contribuem com os efeitos pró-inflamatórios locais e promovem a sensibilização do nociceptor. Como consequência da liberação de SP e da neuroquinina A ocorre a degranulação de mastócitos e a liberação de histamina. Além disso, ela também induz a produção e liberação de outros mediadores endógenos, como prostanóides (PGE₂, PGI₂), e citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 β e TNF- α (Dray e Perkins, 1993; Liang *et al.*, 2001; Basbaum, 2009).

Uma característica marcante dos nociceptores presentes nas fibras sensoriais é que eles expressam receptores específicos para cada um dos mediadores inflamatórios, os quais são agrupados em 3 tipos principais: 1- receptores acoplados à proteína G (GPCR - como os receptores da bradicinina, B₁ e B₂; receptores ativados por protease, PAR₁₋₄; receptor de histamina, H1, etc.); 2- receptores tirosina-quinase (receptores de fatores de crescimento, TrkA e TrkB) e 3- receptores ionotrópicos/canais de íons (P2X - receptores purinérgicos, ASICs - canais sensíveis a ácido e canais TRPs – canais receptores de potencial transitório). Nos dois primeiros casos, a ativação dos receptores por seus respectivos ligantes promove uma cascata de sinalização celular específica que tem como alvo canais de íons, ao passo que no terceiro exemplo, os receptores são os próprios canais iônicos. Como consequência da ação dos mediadores inflamatórios, ocorre: despolarização, diminuição do limiar de disparo do potencial de ação, atraso na repolarização e, conseqüentemente, hipersensibilidade e maior excitabilidade dos neurônios sensoriais (Linley *et al.*, 2010).

De modo geral, a dor que surge como sinal da resposta inflamatória costuma desaparecer com a sua resolução. Contudo, em

alguns casos em que o processo inflamatório não é completamente resolvido, pode haver um aumento excessivo na atividade dos nociceptores por mediadores de origem periférica, e assim, dar origem a chamada “sensibilização periférica”. Durante este processo, os nociceptores passam a ser estimulados de maneira constante, o que provoca sua sensibilização (redução do limiar de ativação e/ou aumento de responsividade). Como consequência dessa estimulação periférica, surge a chamada “sensibilização central”, que por sua vez, pode ser definida como uma “amplificação da sinalização neural dentro do SNC que provoca hipersensibilidade” (Bausbaum *et al.*, 2009; Woolf, 2011).

Diversos são os mecanismos que contribuem para o estabelecimento da sensibilização central, sendo 3 os de maior destaque: alterações provocadas na neurotransmissão glutamatérgica, perda de controle inibitório e interações entre neurônio-glia. No primeiro caso, a liberação de glutamato que ocorre nos terminais centrais de neurônios sensoriais é responsável pela sinalização da informação nociceptiva que chega da periferia e é conduzida para neurônios de segunda ordem na medula espinal. Esse processo ocorre principalmente mediante ativação de receptores pós-sinápticos AMPA e cainato (receptores glutamatérgicos ionotrópicos) enquanto os receptores do tipo NMDA (receptores glutamatérgicos metabotrópicos) permanecem quiescentes sob condições normais. Contudo, após uma lesão ocorre um aumento na liberação de neurotransmissores, provocando despolarização mediada por receptores do tipo NMDA. Como consequência, ocorre aumento no influxo de cálcio e maior conexão sináptica entre neurônios sensoriais e neurônios de transmissão do corno dorsal da medula, de modo a favorecer o estabelecimento de hiperalgesia (Basbaum *et al.*, 2009).

Interneurônios inibitórios que liberam GABA e glicina são densamente distribuídos no corno dorsal da medula espinal, onde atuam no processo de modulação da resposta nociceptiva. Contudo, a inibição desses neurônios facilita a despolarização de neurônios excitatórios, aumentando assim a transmissão de estímulos nociceptivos, o que acaba contribuindo para o desenvolvimento da alodínia mecânica. Além disso, lesões teciduais induzem a liberação de PGE₂ espinal, que age em receptores de interneurônios excitatórios e neurônios de projeção do corno dorsal da medula. Como resultado, ocorre estimulação da via AMPc/PKA que fosforila a subunidade GlyRa3 do receptor de glicina, tornando os neurônios não-responsivos aos efeitos inibitórios deste neurotransmissor (Keller *et al.*, 2007; Basbaum *et al.*, 2009).

Por fim, as células da glia, notavelmente micróglia e astrócitos, também contribuem para o processo de sensibilização central. A micróglia, que atua como macrófago do SNC, é distribuída homogeneamente na substância cinzenta da medula espinal, onde assume a função de sentinela de lesões ou processos infecciosos. Contudo, quando ocorre uma lesão nervosa periférica, por exemplo, a micróglia acumula-se na superfície do corno dorsal, em torno das fibras que foram lesionadas, onde, após ativação, passam a liberar citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , TNF- α e IL-6. Estas por sua vez, aumentam a sensibilização central neuronal, levando a um quadro de dor persistente (Basbaum *et al.*, 2009).

Também já foi demonstrado que o ATP ativa receptores P2X₄ presentes na membrana da micróglia e induz a liberação de BDNF. Este, por sua vez, se liga aos seus receptores TrkB em neurônios de projeção da lamina I, onde altera o gradiente de concentração dos íons cloreto, resultando na redução da ação inibitória de receptores GABA_A, favorecendo, portanto, as sinapses excitatórias. Além de BDNF, a micróglia ativada também libera e responde à diversas citocinas e quimiocinas, as quais contribuem para o desenvolvimento da sensibilização central. A fraquitalcina, por exemplo, é uma quimiocina constitutivamente expressa por neurônios espinais e por corpos celulares de neurônios sensoriais (DRG), embora seu receptor (CX3CR1) seja expresso apenas pela micróglia no SNC. Assim, quando ocorre uma lesão nervosa, os neurônios aumentam a liberação de fraquitalcina, que por sua vez, se ligam aos seus receptores microgliais e induzem fosforilação da p38 MAPK, repercutindo na liberação IL-1 β , IL-6 e óxido nítrico (NO) (Coull *et al.*, 2005; Clark *et al.*, 2009; Clark e Malcangio, 2014).

Estudos recentes têm mostrado que os astrócitos também participam do processo de sensibilização central, e sugerem que este processo é mediado pela ação da quimiocina CCL2 (também conhecida como proteína quimioatratante de monócito - MCP-1). Esta quimiocina é expressa em neurônios, micróglia e astrócitos e possui níveis aumentados em condições neuropáticas. Nos astrócitos, a ativação do receptor CCR2 pela quimiocina CCL2 promove a fosforilação da via ERK e induz a síntese e liberação de mediadores pró-inflamatórios, incluindo IL-1 β e CCL2 adicional. Nos neurônios, a ativação do receptor CCR2 além da ativação da ERK, que também resulta na liberação de mediadores pró-inflamatórios, causa alterações nos receptores de glutamato do tipo AMPA e NMDA, o que resulta em aumento da excitação neuronal. Além disso, a ativação do receptor CCR2 também provoca modulação de receptores GABA_A, causando sua inibição. Já na micróglia, a ativação do

receptor CCR2 promove proliferação e migração, bem como liberação de mediadores pró-inflamatórios. Contudo, apesar das evidências demonstradas até o momento, os mecanismos exatos pelo qual CCL2 modula a sensibilização central ainda são pouco claros (Gao e Gi, 2010; Old e Malcangio, 2012; Xie *et al.*, 2017).

1.5 Dor Pós-Operatória

Apesar dos diversos avanços na medicina, a dor pós-operatória aguda continua sendo um importante problema de saúde. Estudos demonstraram que aproximadamente 80% dos pacientes pós-operados apresentam dor moderada a grave, mesmo após o uso de potentes analgésicos, como opióides (Kehlet e Holte, 2001; Apfelbaum *et al.*, 2003). Dependendo do tipo de cirurgia, é possível que 10% a 50% dos indivíduos desenvolvam dor pós-operatória persistente (Kehlet *et al.*, 2006). De fato, tem sido demonstrado que a dor pós-cirúrgica crônica é uma das complicações mais graves e comuns. Além disso, estudos têm mostrado que o desenvolvimento de dor pós-operatória em mulheres ocorre numa proporção maior do que nos homens (Caumo *et al.*, 2002; Katz *et al.*, 2005; Reddi e Curran, 2015).

Após uma incisão cirúrgica, o tecido lesionado representa um exemplo típico de inflamação aguda. Sob condições normais, a cura do tecido lesionado é acompanhada por eventos sequenciais e sobrepostos, que envolvem hemostasia, inflamação, proliferação e remodelamento (Gurtner *et al.*, 2008). Durante a fase de inflamação, o tecido é caracterizado pelo recrutamento maciço de células do sistema imune, sendo que os neutrófilos representam as primeiras células desse sistema a chegarem no local da lesão, onde contribuem produzindo e liberando seus mediadores inflamatórios. De fato, o meio que circunda uma incisão contém quantidades elevadas de mediadores inflamatórios, como IL-1 β , IL-6, TNF- α , NGF e substância P, os quais desempenham um papel importante na indução e manutenção da dor. Além disso, já foi demonstrado que a inibição da produção e/ou ação desses mediadores reduz a hipersensibilidade causada após uma cirurgia (Safieh-Garabedian *et al.*, 1995; Wolf *et al.*, 2008; Amaya *et al.*, 2013; Leoni *et al.*, 2015).

As alterações no sistema nervoso central também contribuem para o desenvolvimento de dor persistente após uma cirurgia, trauma ou lesão nervosa (Crombie *et al.*, 1998; Baron *et al.*, 2010). Vários estudos têm demonstrado que tanto a sensibilização periférica quanto a sensibilização central contribuem com mudanças na plasticidade

sináptica após uma incisão cirúrgica, e estas ocorrem através de diversos mecanismos, incluindo a ativação de receptores excitatórios não-NMDA (AMPA/cainato) (Lee *et al.*, 2006), aumento de quimiocinas, tais como CXCL1 (Carreira *et al.*, 2013; Lopes *et al.*, 2016), CXCL12 (Luo *et al.*, 2016; Xing *et al.*, 2017) e citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , sendo que estas podem atuar diretamente através de seus receptores ou indiretamente pela síntese de prostaglandinas e NGF (Wolf *et al.*, 2008). Também já foi demonstrado na literatura que uma incisão cirúrgica pode induzir comportamento do tipo ansioso, uma vez que aumenta a expressão de proteína de ligação aos elementos de resposta de AMPc fosforilados (p-CREB) na amígdala, uma área cerebral relacionada ao humor e ao processamento da dor (Li *et al.*, 2010).

Por outro lado, apesar de uma compreensão crescente dos mecanismos subjacentes à dor pós-operatória e do uso de novas abordagens estratégicas, que incluem a introdução de novos guias, diretrizes e até mesmo esforços educacionais, o controle da dor pós-operatória ainda continua longe de ser totalmente satisfatório (Wu e Raja, 2011; Wardhan e Chelly, 2017). Atualmente, há uma grande quantidade de medicamentos disponíveis e utilizados no tratamento desse tipo de dor. Entre os mais comuns, estão os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs), anticonvulsivantes, opióides, inibidores de receptores NMDA e anestésicos locais. No entanto, estes medicamentos possuem eficácia limitada e, muitas vezes, são acompanhados de graves efeitos colaterais, como sangramento gastrointestinal, adicção, náuseas, vômito, coceira, depressão respiratória, sedação, toxicidade hepática e insuficiência renal (Dahl e Kehelet, 2006; Elliot *et al.*, 2006; Wu e Raja, 2011). Assim, agentes farmacológicos capazes de interromper os mecanismos da dor pós-operatória podem ser úteis no seu tratamento, bem como podem prevenir o estabelecimento de dor persistente após um procedimento cirúrgico.

Nesse sentido, modelos animais têm sido utilizados com o intuito de mimetizar as condições humanas e explorar os mecanismos atrelados ao seu desenvolvimento, a fim de encontrar alvos específicos que possam permitir o seu controle. Assim, Brennan e colaboradores (1996) desenvolveram o modelo de incisão plantar em ratos, sendo posteriormente adaptado por Pogatzki e Raja (2003) para camundongos. A incisão realizada neste modelo, da mesma forma que em humanos, provoca comportamento de dor espontânea em resposta à hiperalgesia desenvolvida e tem sido utilizada como uma ferramenta na busca de maior compreensão dos mecanismos relacionados a sua gênese (Richmond *et al.*, 1993)

1.6 Dor Neuropática

A dor neuropática é um tipo específico de dor crônica causada por lesão ou doença do sistema somatosensorial (Loeser e Treede, 2008). Essa condição caracteriza-se por ser um processo crônico, sem função biológica protetora, em que a sensação dolorosa é resultante de uma lesão no sistema nervoso periférico ou central. A dor neuropática representa uma das formas de dor persistente mais comuns e difíceis de serem tratadas, consistindo numa condição debilitante que afeta cerca de 7% a 10% da população mundial (Baron, 2009; van Hecke *et al.*, 2014), sendo prevalente principalmente no sexo feminino (Filligim *et al.*, 2009).

Uma das causas da elevada incidência de dor neuropática pode estar relacionada ao seu caráter multifacetado, uma vez que pode surgir como consequência de uma lesão nervosa mecânica (síndrome do túnel do carpo; hérnia de disco), doença metabólica (neuropatia diabética), doença viral (herpes zoster; vírus da imunodeficiência humana - HIV), neurotoxicidade (quimioterapia para o tratamento de câncer ou tuberculose), mecanismos inflamatórios e/ou imunológicos (esclerose múltipla), isquemia cerebral focal (síndrome talâmica) ou por múltipla disfunção do sistema de neurotransmissão (síndrome da dor complexa regional) (Zimmermann, 2001; van Hecke *et al.*, 2014).

Uma característica marcante da dor crônica é que estímulos nocivos não são necessários para desencadear dor, uma vez que esta pode se manifestar espontaneamente na ausência de qualquer estímulo externo (Woolf, 2010). Na prática clínica, também é comum pacientes diagnosticados com dor neuropática apresentarem hipersensibilidade aos estímulos mecânicos e térmicos (sobretudo ao frio) (Ma e Quirion, 2008; Obara *et al.*, 2013). Isso se deve ao fato de que durante o processo inflamatório (que envolve tanto o recrutamento de células do sistema imune quanto a liberação de seus mediadores), ocorre sensibilização tanto a nível periférico quanto central. Como consequência, ocorre plasticidade mal adaptativa a longo prazo, resultando em dor neuropática persistente (Costigan *et al.*, 2009; Ellis e Bennett, 2013).

Essas mudanças que ocorrem nos nociceptores torna os terminais periféricos sensibilizados e os axônios suficientemente hiperexcitáveis a ponto de gerar potenciais de ação espontâneos. Além disso, os corpos celulares tornam-se alvos de drásticas alterações na expressão e tráfego de proteínas, ao passo que as sinapses da medula espinal têm seu perfil de disparo e organização estrutural modificados. Alterações semelhantes àquelas que ocorrem na medula também podem ocorrer em estruturas

supraespinais e envolver tanto neurônios quanto células não-neuronais. Assim, todas essas alterações desencadeadas pela sensibilização central, provocam redução do limiar nociceptivo, bem como aumentam sua duração, amplitude e distribuição espacial (Costigan *et al.*, 2009; Latremoliere e Woolf, 2009; Woolf, 2010).

As células do sistema imune participam no processo de cronificação da dor principalmente pela liberação de seus mediadores pró-inflamatórios, com destaque para as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Estas citocinas podem mediar seus efeitos tanto por ação direta (através da ativação de seus receptores), quanto por ação indireta, induzindo a síntese de outros mediadores, como prostaglandinas (Pitchford e Levine, 1991; Sommer e Kress, 2004). Diversos estudos já evidenciaram que essas citocinas possuem um papel chave no estabelecimento e manutenção da dor neuropática (Leung e Cahill, 2010; Lees *et al.*, 2015) e que seu bloqueio, através do uso de anticorpos e de animais geneticamente modificados, é capaz de reduzir a dor neuropática. Assim, é evidente que estas citocinas representam importantes alvos terapêuticos (Woolf *et al.*, 1997; Honore *et al.*, 2006; Wolf *et al.*, 2006).

Outra importante contribuição para o desenvolvimento da dor neuropática é decorrente da ativação de receptores de potencial transitório (TRPs). Entre os TRPs, evidências crescentes apontam o receptor de potencial transitório anquirina tipo 1 (TRPA1) como o principal transdutor envolvido na dor (Andrade *et al.*, 2012; Nassini *et al.*, 2014). Este canal iônico é co-expresso com o receptor de potencial transitório vanilóide tipo 1 (TRPV1), em uma subpopulação de fibras sensoriais peptidérgicas, onde participa da resposta inflamatória estabelecida durante a dor neuropática (Obata *et al.*, 2005; Uta *et al.*, 2010; Sisignano *et al.*, 2012). Além disso, ambos os canais contribuem com o aumento da liberação de glutamato (Uta *et al.*, 2010), provocando aumento no disparo neuronal excitatório (pela liberação de glutamato no SNC e periférico) e, conseqüentemente, induzem reorganização da rede nociceptiva (Obara *et al.*, 2013).

Como conseqüência da excitotoxicidade glutamatérgica mediada pelos canais iônicos, ocorre ativação de células gliais (micróglia e astrócito), que por sua vez, dão início à cascatas de sinalização intracelular, envolvendo as vias de sinalização do fator nuclear kappa B (NF- κ B) e da proteína p38 MAPK. Estas vias são consideradas fatores chave para o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias adicionais, como TNF- α , IL-1 β , IL-6, que acabam contribuindo para o desenvolvimento e manutenção da dor neuropática (Watkins *et al.*, 2001; Yao *et al.*, 2016).

Contudo, apesar das inúmeras opções de medicamentos utilizadas em seu tratamento, seu controle é ainda representa um grande desafio. Isso se deve principalmente pelo fato de que as terapias disponíveis apresentam baixa eficácia e o uso prolongado frequentemente está associado a sérios efeitos colaterais ou mesmo torna os pacientes refratários ao tratamento, o que afeta a qualidade de vida e a produtividade destes indivíduos (Dworkin, *et al.*, 2010; Vranken, 2012). Dessa forma, é de grande relevância compreender os mecanismos subjacentes a dor neuropática, a fim de que novos e mais efetivos tratamentos possam ser utilizados no seu controle.

Atualmente, a literatura dispõe de diversos modelos animais que podem ser empregados no estudo da dor neuropática. Eles mimetizam diversas etiologias e estão associados a um extenso quadro de manifestações, semelhantes àqueles característicos das neuropatias periféricas encontradas em humanos (Sorkin e Yaksh, 2009). Além das vantagens de simular as condições patológicas de relevância clínica, esses modelos permitem a identificação de novos fármacos, ao mesmo tempo que mantêm os animais em boas condições de saúde, uma vez que não causam estresse excessivo ou perda de peso (Walker *et al.*, 1999).

1.7 Receptores de Potencial Transitório (TRPs)

Conforme descrito anteriormente, os neurônios sensoriais detectam os estímulos periféricos através dos nociceptores e os transmitem até o SNC na forma de impulsos elétricos. Contudo, para que isso aconteça, os terminais sensoriais expressam uma variedade de receptores e canais iônicos que, uma vez ativados, iniciam a transmissão da informação. Assim, danos teciduais, inflamação ou lesão nervosa são situações que levam a ativação dos nociceptores, direta ou indiretamente (Basbaum *et al.*, 2009).

Dentre os canais iônicos, tem sido extensivamente demonstrado na literatura que os receptores de potencial transitório (TRPs) desempenham um papel crucial na hipersensibilidade (térmica, química e mecânica) gerada durante o processo inflamatório ou lesão nervosa, sendo, portanto, considerados alvos promissores para o tratamento da dor inflamatória e neuropática em humanos (Pinheiro *et al.*, 2015; Salat e Filipek, 2015; Klafke *et al.*, 2016; Trevisan *et al.*, 2016).

De modo geral, os TRPs constituem uma superfamília de canais iônicos permeáveis a cátions, que se destacam dos demais por apresentar seletividade iônica, modo de ativação e funções fisiológicas distintas. A

superfamília é constituída por um grande grupo formado por 28 canais, que são divididos em 6 subfamílias: TRPC (Canônico), TRPV (Vanilóide), TRPM (Melastatina), TRPA (Anquirina), TRPP (Policistina) e TRPML (Mucolipina), e podem ser encontrados desde bactérias até plantas e animais superiores (Fig. 6) (Wu *et al.*, 2010; Moran *et al.*, 2011). Em humanos, esses canais são amplamente expressos em diferentes tipos celulares e, portanto, grande parte das células possuem diversas proteínas desses canais em sua superfície (Clapham, 2003).

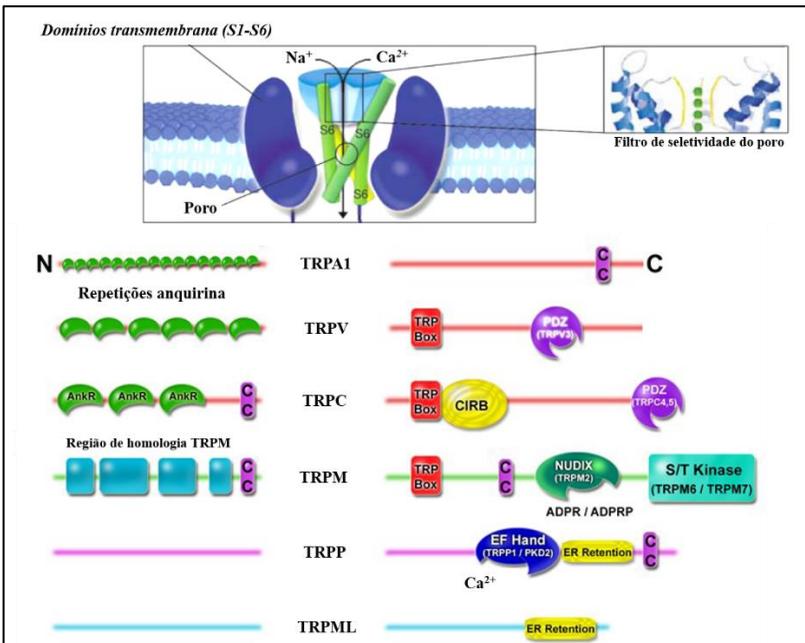


Figura 6. Subfamílias dos canais TRPs e seus domínios. Os TRPs são formados por 4 subunidades idênticas, cada uma contendo 6 domínios transmembrana (S1-S6), com um poro central e um filtro de seletividade entre os domínios S5 e S6. Todos os canais são do tipo não-seletivo aos íons Na⁺ e Ca²⁺, com exceção dos TRPM4 e TRPM5, que são monovalentes e dos canais TRPV5 e TRPV6, que são seletivos ao Ca²⁺. As regiões C e N terminal contêm diferentes elementos funcionais e estruturais como indicado para cada subfamília. TRP box (região de 6 aminoácidos); repetições anquirina (AnkR) com diferentes quantidades entre as subfamílias; Serina/Treonina quinase (S/T kinase) intrínseco para TRPM6 e TRPM7; Calmodulina e inositol trifosfato (CIRB) e TRPV, motivo de aminoácido ligado ao domínio PDZ; motivo de homologia NUDT9 de ligação a ribose ADP (NUDIX) ou ADPR-2'-fosfato (ADPRP); domínio canônico de ligação ao Ca²⁺ (EF Hand); Retenção de sinal do retículo endoplasmático (ER retention); As regiões de homologia nos canais TRPM8 possuem funções desconhecidas. Modificado de: Clapham, 2003.

Nos terminais periféricos dos neurônios sensoriais estes canais são importantes na detecção de estímulos externos nocivos e variações de temperatura, onde podem ser ativados pelo calor (TRPV1-TRPV4), frio (TRPM8, TRPA1), estimulação mecânica, osmótica (TRPA1, TRPV4), e baixo pH (TRPV1) (TRPA1) (Patapoutian *et al.*, 2009). Sob condições fisiológicas normais, estes canais estão envolvidos em diversas funções, como: liberação de neuropeptídeos, regulação do tônus vascular, manutenção da temperatura corpórea, motilidade gastrointestinal, controle da bexiga urinária e todos os aspectos sensoriais, incluindo: visão, audição, olfação, paladar, bem como percepção mecânica, térmica e detecção de estímulo nocivos. Além disso, também participam de estados patológicos, que incluem a dor e a inflamação (Nilius, 2007; Moran *et al.*, 2011).

Estudos recentes têm mostrado que estes canais contribuem para o desenvolvimento e/ou progressão dos sintomas de muitas doenças, como dor neuropática, hiperatividade da bexiga, asma, transtorno de ansiedade e prurido. Além disso, também possuem um papel bem compreendido na área da dor (Moran *et al.*, 2011).

1.8 TRPA1

O receptor de potencial transitório anquirina tipo 1 (TRPA1), assim nomeado por seu extenso domínio repetido de anquirina, é um canal de cátion não-seletivo, permeável ao Ca^{2+} , que desempenha um importante papel em estados fisiológicos e patológicos da dor. Estruturalmente, o canal é formado por 4 subunidades idênticas, cada uma contendo 6 domínios transmembrana (S1-S6), duas hélices entre os domínios S5 e S6 (na superfície extracelular), que formam uma constrição de regulação do influxo de Ca^{2+} , um domínio helicoidal do tipo TRP, que forma uma segunda constrição (logo abaixo da primeira) e dezesseis repetições anquirina na região N-terminal de cada subunidade, que promovem uma grande superfície citoplasmática de interação com agentes irritantes (Fig. 7). Acredita-se que a interação de ligantes moleculares com as repetições anquirina sejam as responsáveis por promover mudanças conformacionais, transmitidas através das estruturas de ligação entre S4 e S5, e assim permitam a ativação, com consequente abertura do canal (Clapham, 2015 e Paulsen *et al.*, 2015).

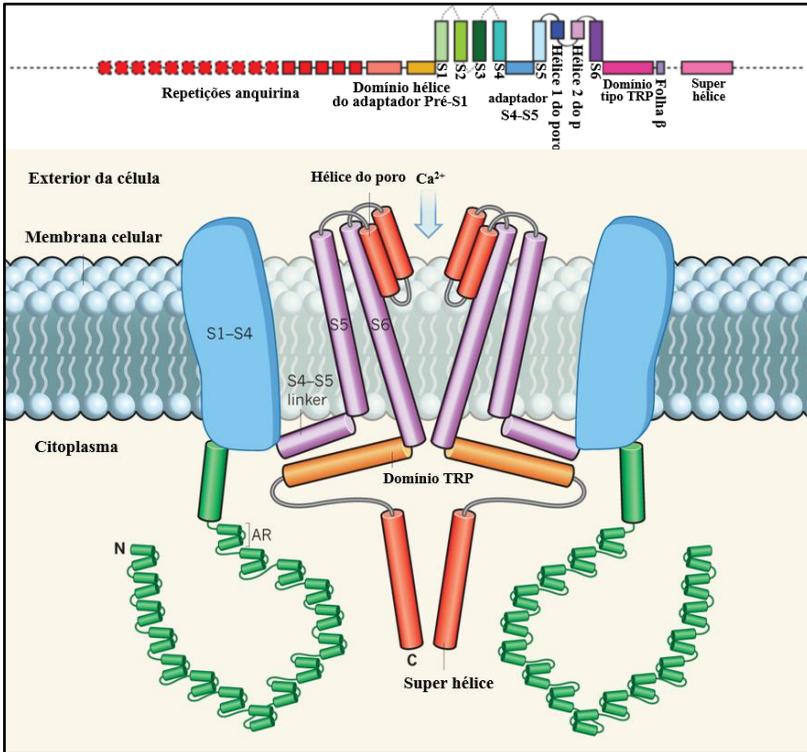


Figura 7. Estrutura do canal TRPA1. Os esquemas mostram as principais características do canal iônico TRPA1. O painel superior mostra um diagrama linear com os principais domínios da estrutura do canal TRPA1. No painel inferior, são mostradas 2 subunidades (embora o canal seja formado por 4). Cada subunidade contém 6 domínios transmembrana (S1-S6) como mostrado na figura. Duas hélices presentes no poro ligam os domínios S5 e S6 na superfície extracelular, onde uma constrição regula o influxo de Ca^{2+} . O domínio helicoidal TRP faz parte de uma segunda e menor constrição. Dezesseis repetições de anquirina (ARs) na extremidade amino-terminal (N) da subunidade cobrem a estrutura de super hélice na região carboxi-terminal (C). Adaptado de Clapham, 2015 e Paulsen *et al.*, 2015.

A ativação deste canal pode ocorrer pelo frio, em temperaturas abaixo de $17\text{ }^{\circ}\text{C}$, estímulos mecânicos e por um amplo espectro de substâncias químicas pungentes, como isotiocianatos (proveniente do óleo de mostarda e da raiz forte), cinamaldeído (proveniente da canela) e alicina (proveniente do alho), os quais possuem propriedades eletrofílicas de se ligarem de forma covalente aos resíduos de cisteína ou lisina presentes na região N-terminal do canal. Outros compostos químicos, como a formalina, também podem causar ativação direta do canal TRPA1 por induzirem lesão tecidual (McNamara *et al.*, 2007). Além disso, vários

mediadores pró-inflamatórios endógenos, como bradicinina, eicosanóides oxidados (PGA₂ e 15d-PGJ₂), produtos do estresse oxidativo (4-hidroxinonal) e Ca²⁺ também podem ativar diretamente canais TRPA1 e provocar dor (Bandell *et al.*, 2004; Bautista *et al.*, 2006; Trevisani *et al.*, 2007; Andersson *et al.*, 2008; Materazzi *et al.*, 2008; Patapoutian *et al.*, 2009; Lapoint e Altier, 2011; Sisignano *et al.*, 2012).

A ativação do canal TRPA1 promove o aumento do Ca²⁺ intracelular e induz a liberação de neuropeptídeos periféricos (substância P, CGRP), purinas e outros transmissores das terminações das fibras sensoriais, resultando em inflamação neurogênica e hipersensibilidade. Além disso, é válido ressaltar que o Ca²⁺ não representa apenas um segundo mensageiro que inicia eventos mediados pelo TRPA1, mas também age como um modulador direto da atividade deste canal (Bautista *et al.*, 2006; Lapointe e Altier, 2011).

O canal TRPA1 é o principal alvo durante o rápido aparecimento e manutenção do processo inflamatório. Muitos ativadores do TRPA1 são produzidos durante a inflamação como resultado da oxidação lipídica, formação de peróxido e estresse oxidativo (Nillius *et al.*, 2012). Além do papel periférico, como receptores para estímulos nocivos, várias evidências indicam que os canais TRPs, incluindo TRPV1 e TRPA1, desempenham um importante papel na modulação sináptica central. A ativação de TRPA1 espinal e outros canais, como TRPV1, por exemplo, localizados nos terminais aferentes pré-sinápticos também podem aumentar a liberação de glutamato e, assim, contribuir com o processo de sensibilização central (Uta *et al.*, 2010; Wrigley *et al.*, 2010). Portanto, diversas evidências apontam o canal TRPA1 como um importante alvo para o desenvolvimento de novos medicamentos com potencial analgésico.

1.9 Plantas Medicinais

A história das plantas medicinais está intimamente relacionada à história da própria humanidade (Ortega, 2006). Registros das primeiras civilizações, em todas as partes do mundo, tem revelado que um número considerável de medicamentos utilizado na medicina atual já havia sido utilizado desde os tempos antigos. Entre as evidências escritas, a mais antiga corresponde à laje de argila Suméria de Nagpur, na Índia, com aproximadamente 5.000 anos. A laje possui 12 receitas empregadas na preparação de vários tratamentos a partir da utilização de 250 plantas diferentes, algumas delas com alcalóides conhecidos, como a papoula -

Papaver somniferum (morfina e codeína), o meimendo - *Hyoscyamus niger* (escopolamina, hiosciamina e atropina) e o mandrake - *Mandragora officinarum* (hiosciamina, hioscina e apoatropina) (Petrovska, 2012).

Ao longo do tempo e com o início da formação das sociedades, o homem aprendeu a reconhecer e a classificar as plantas de acordo com as suas necessidades. Dessas necessidades, o uso de ervas e extratos obtidos de plantas passaram a ser considerados costumes, tradições ou escritos empregados na identificação de plantas e sua utilização no tratamento de doenças e alívio da dor. A partir daí, com a evolução dos sistemas de medicina à base de plantas (primeiramente baseado em plantas dentro de uma área local), tiveram início os sistemas de medicina tradicional, como ayurveda e a unani, no subcontinente indiano, a chinesa e a tibetana, em outras partes da Ásia, a americana nativa, na América do Norte, a amazônica, na América do Sul, além de vários sistemas locais na África (Mamedov, 2012).

Há registros do uso de plantas pelo homem desde a Grécia Antiga e acredita-se que a farmácia tenha sua origem a partir dos trabalhos de Hipócrates (460 a.C.), hoje considerado o “pai da medicina”. Teofrasto (287-370 a.C.) também fez grandes contribuições acerca das plantas e escreveu dois livros sobre a história (“*De Historia Plantarum*”) e a classificação (“*De Causis Plantarum*”) de mais de 500 espécies de plantas medicinais conhecidas em sua época. Teofrasto ressaltou ainda a importância de se adaptar ao aumento gradual das doses ao fazer o uso de medicamentos derivados de plantas possivelmente tóxicas. Devido a relevância de seus trabalhos, atualmente Teofrasto é considerado o “pai da botânica” (Phillipson, 2001; Petrovska, 2012; Saleem *et al.*, 2013).

Na história antiga, Dioscórides também se destaca por ser um importante escritor sobre as plantas medicinais. Conhecido como “pai da farmacognosia”, Dioscórides foi um médico militar e farmacognosista do Exército de Nero que estudou sobre plantas medicinais e escreveu a obra intitulada “*De Materia Medica*” (77 d.C.). Em sua obra clássica, ele ofereceu uma abundância de dados sobre as plantas medicinais e constituiu a base da “Matéria Médica” desde o século I até o século XVIII (Petrovska, 2012).

Até o final do século XVIII o homem ainda não havia isolado nenhum princípio ativo derivado de planta. Contudo, em 1804 ocorreu um fato que marcou o início do século XIX. Friedrich Sertürner (1783-1841) conseguiu isolar uma substância cristalina do ópio (um suco espesso extraído da papoula - *Papaver somniferum*), que ele denominou inicialmente de *principium somniferum*, por se tratar de uma substância farmacologicamente ativa quando administrada em animais.

Posteriormente, Sertürner substituiu a denominação por *morphium* (em homenagem ao Deus grego do sono - Morpheu), e em 1816, apresentou detalhes de sua investigação química e farmacológica. Mais tarde, em um editorial publicado em uma revista francesa que traduziu os trabalhos de Sertürner, Gay Lussac propôs a substituição de *morphium* por morfina, denominação que ficou consagrada até os dias atuais. Sertürner ficou então conhecido por isolar a morfina (o primeiro opióide purificado e administrado em doses mais precisas), e por estabelecer as bases de uma nova classe de fármacos, os alcalóides (Klockgether-Radke, 2002; Duarte, 2005; Wachtel-Galor e Benzie, 2011).

Outro marco importante caracteriza a descoberta e o isolamento da quinina a partir das cascas de cinchona (*Cinchona* spp) pelos cientistas franceses Pierre J. Pelletier (1788–1842) e Jean B. Caventou (1795–1887) no ano de 1820. Seus estudos tiveram início em 1817 e foi impulsionado pelo “mistério da quina”, uma árvore cujas cascas eram empregadas no tratamento da malária na região do Perú. Assim, o tratamento da malária foi encontrado antes de sua etiologia ter sido conhecida, uma vez que Charles Laveran, apenas em 1880 identificou pela primeira vez o parasita da malária, quando observou um esfregaço de sangue coletado na Argélia (Phillipson, 2001; Dhungat, 2015).

Em 1828, farmacologistas alemães isolaram a salicilina, um composto amarelo, cristalino e amargo, a partir das cascas da árvore do salgueiro (*Salix alba*). Em um período de 10 anos químicos franceses sintetizaram o ácido salicílico a partir da salicilina. Contudo, embora o ácido salicílico aliviasse a dor e a febre, seu sabor amargo e os efeitos colaterais sobre o trato gastrointestinal (particularmente vômitos), limitavam seu uso a longo-prazo. Foi então que em 1897, Felix Hoffman, um químico da empresa Bayer, sintetizou o ácido acetilsalicílico e desenvolveu uma droga mais eficaz e menos tóxica (Wick, 2012).

A partir de então, um considerável número de fármacos foi obtido a partir de outras plantas, como a digoxina, um estimulante cardíaco extraído da dedaleira (*Digitalis purpurea*) e a reserpina, uma droga antipsicótica e anti-hipertensiva extraída da *rauwolfia* (*Rauwolfia serpentina*) além de vários outros exemplos (Spencer, 2003; Wachtel-Galor, S.; Mamedov, 2012; Yadav *et al.*, 2012).

Assim, a ciência contemporânea reconheceu a ação efetiva e incluiu na terapia moderna uma gama de medicamentos de origem vegetal, conhecido por civilizações antigas e usado ao longo de milênios (Petrovska, 2012). Atualmente pelo menos 40% dos fármacos são derivadas de material vegetal (Rajasekaram *et al.*, 2013) e dados da OMS

(Organização Mundial de Saúde) indicam que cerca de 35 à 70 mil espécies de plantas já foram usados como medicamentos, uma valor correspondente à 14-28% das 250.000 espécies de plantas existentes a nível mundial (Mamedov, 2012).

A América Latina possui uma grande biodiversidade de espécies e uma rica tradição na utilização de plantas que tem sido praticada durante séculos (Brandão *et al.*, 2009). Somente o Brasil possui cerca de 20% das 267 mil espécies de plantas já classificadas (Barbosa, 2000). Além disso, estima-se que pelo menos 16% de todas as espécies de plantas do mundo esteja concentrada na região amazônica, motivo pelo qual o Brasil é considerado o detentor da maior biodiversidade do planeta. Outro ponto importante é que o país possui uma abundante diversidade cultural detentora de um enorme conhecimento empírico, que associado ao fracionamento e isolamento de substâncias naturais, representa uma fonte potencial na identificação de novos compostos que podem ser utilizados na clínica (Moreira *et al.*, 2006).

1.10 Óleos Essenciais

Segundo a Farmacopéia Européia, óleos essenciais são compostos extraídos de plantas aromáticas através de processos de hidrodestilação ou destilação a vapor, cujos constituintes podem ser encontrados em todas as estruturas da planta, sobretudo nas folhas, flores e frutos, tendo menor incidência em outras estruturas, tais como raízes, rizomas, lenhos, córtex ou sementes (Bizzo *et al.*, 2009; Sousa *et al.*, 2011). Esses compostos são formados por substâncias de baixo peso molecular, sendo constituídos principalmente por misturas de fenilpropanóides e terpenóides (especialmente monoterpenos e sesquiterpenos), bem como seus derivados oxigenados, como álcoois, aldeídos e acetonas (Coelho *et al.*, 2012).

De modo geral, os componentes dos óleos essenciais são agrupados em duas séries majoritárias, as quais são baseadas em suas características funcionais: a série aromática, constituída por derivados do fenilpropano (oriundos do metabolismo do ácido chiquímico) formados por reações de transaminação enzimática da fenilalanina, cujos derivados mais comuns são as cumarinas e alguns aldeídos aromáticos, e a série terpênica, que representa um grupo quantitativamente mais numeroso e qualitativamente mais variado, onde são encontrados os monoterpenos e os sesquiterpenos (Henriques *et al.*, 2009). Entre os terpenóides, os

monoterpenos são os constituintes mais abundantes, representando cerca de 90 % dos óleos essenciais (Sousa *et al.*, 2011).

Óleos essenciais são compostos que exibem uma grande variedade de atividades biológicas, motivo pelo qual são amplamente utilizados na medicina popular, além de também serem explorados nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos (Simões *et al.*, 2004). De fato, plantas aromáticas são utilizadas há séculos por diferentes culturas ao redor do mundo, o que justifica o crescente número de estudos clínicos e pré-clínicos empregando óleos essenciais e seus constituintes (Maggio *et al.*, 2016).

Esta classe de compostos tem atraído o interesse de muitos pesquisadores que investigam o seu potencial como medicamento, afim de que possam ser empregados no tratamento de diversas doenças. Atualmente, a literatura já dispõe de uma gama de substâncias bioativas que são sintetizadas a partir de compostos químicos encontrados em óleos essenciais e estudos farmacológicos têm sido fundamentais para fornecer o suporte científico às ações anti-inflamatória e analgésica exercidas por esses componentes (Ali *et al.*, 2012).

1.11 Família Piperaceae

A família Piperaceae, descrita por Paul Dietrich Giseke, é considerada uma das famílias mais primitivas das angiospermas (plantas que produzem sementes) e compreende um grupo amplamente distribuído nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (Parmar *et al.*, 1998; Dyer *et al.*, 2004). Atualmente é composta por 3.600 espécies, as quais encontram-se agrupadas em cinco gêneros, sendo *Piper* (1.000 spp.) e *Peperomia* (1.600 spp.) os gêneros mais representativos da família (Gutierrez *et al.*, 2013). As peperomias são, em sua maioria, ervas pequenas, suculentas e frequentemente epífitas, enquanto as pipers são lenhosas e assumem a forma de arbustos, lianas ou árvores de pequeno porte (Di Stasi e Hiruma-Lima, 2002; Dyer *et al.*, 2004).

As plantas pertencentes a esta família são morfologicamente uniformes, com folhas simples, alternadas e hastes articuladas com nós alargados (Chan e Wong, 2014). Em geral, são plantas aromáticas devido à presença de células produtoras de óleos voláteis em seus diversos tecidos (Dyer *et al.*, 2004). As inflorescências são distintas, com muitas flores pequenas, agrupadas em espigas eretas ou pendentes (Chan e Wong, 2014). As flores, embora pequenas, são vistosas, sem perianto, hermafroditas, geralmente verdes, esbranquiçadas ou amareladas e

raramente são encontradas na cor vermelha ou mais escura. Os frutos são drupáceos, carnosos ou secos e a polinização e a dispersão são feitas principalmente através do vento e morcegos, respectivamente (Ribeiro *et al.*, 1999).

Além da importância comercial, essa família representa uma rica fonte de substâncias com atividade biológica, especialmente as plantas do gênero *Piper*, onde se destacam espécies amplamente conhecidas, como a pimenta preta ou pimenta-do-reino (*P. nigrum*) e espécies medicinais de ampla utilização, como *P. betle*, *P. longum*, *P. angustifolium*, *P. cubeba*, *P. methysticum* e outras de grande importância em sistemas de medicina tradicionais, como a chinesa e a yurveda (Di Stasi e Hiruma-Lima, 2002).

1.12 Gênero *Piper*

O gênero *Piper* pertence à família Piperaceae e constitui umas das linhagens mais diversas das angiospermas basais (Jamarillo e Manos, 2001; Gutierrez *et al.*, 2013). É formado por mais de 1.000 espécies de distribuição pantropical, com maior incidência no Sul da Ásia (300 spp.) e nos trópicos americanos (700 spp.), como pode ser observado na figura 8 (Gutierrez *et al.*, 2013). Somente no Brasil há a ocorrência de cerca de 460 espécies, com pelo menos 300 delas sendo encontradas na região amazônica (Di Stasi e Hiruma-Lima, 2002).

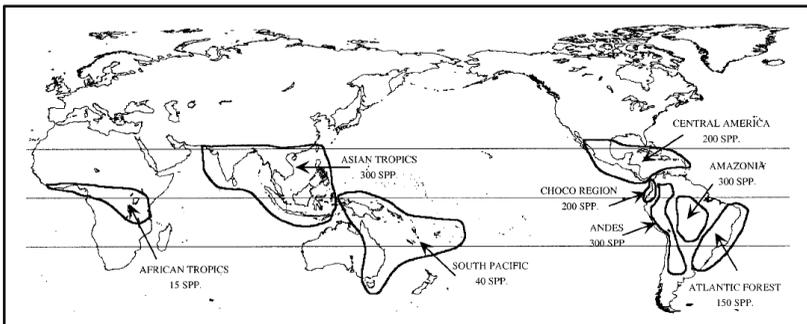


Figura 8. Distribuição geográfica do gênero *Piper*. O número de espécies é estimado para cada um dos centros de diversidade do grupo, assim o táxon pode ser regionalmente generalizado e ser representado mais de uma vez. Fonte: Jamarillo e Manos, 2001.

O gênero *Piper* possui grande importância econômica e medicinal, além de ser o gênero mais estudado e conhecido do ponto de vista químico pelos pesquisadores (Parmar *et al.*, 1997,1998).

Economicamente, embora poucas espécies sejam conhecidas por seu valor econômico, a pimenta preta (*P. nigrum*) representa a espécie responsável por movimentar a comercialização de uma das especiarias mais conhecidas e utilizadas no mundo (Meghwal e Goswami, 2013).

Na medicina tradicional, o gênero é renomado por suas propriedades medicinais e por isso tem sido amplamente explorado por diversos povos em várias regiões do mundo (Parmar *et al.*, 1997). Na Jamaica, *P. aduncum* e *P. hispidum* são utilizadas para tratar dores estomacais e como repelente de insetos. No Brasil e no México, *P. amalago* é usada para aliviar dores no peito e como agente anti-inflamatório. No sistema indígena de medicina da Índia, *P. sylvaticum* é empregada como antídoto eficaz contra o veneno de cobra, enquanto *P. chaba* é utilizada no tratamento de asma, bronquite, febre, dores abdominais, além de ser utilizada como estimulante. Na medicina tradicional chinesa *P. futokadsura* é utilizada no tratamento de asma, doenças artríticas e como agente inseticida. Na África, *P. guineense* (conhecida como pimenta preta do oeste africano) é amplamente utilizada no tratamento de bronquite, doenças gastrointestinais, doenças venéreas e reumatismo (Parmar *et al.*, 1997).

Por outro lado, apesar da grande diversidade encontrada no gênero, estima-se que apenas 112, de todas as espécies conhecidas, tenham sido investigadas fitoquimicamente. Estudos realizados com essas plantas já resultaram na descoberta de 667 compostos diferentes, os quais encontram-se na forma de alcalóides/amidas (190), lignanas (49), neolignanas (70), terpenos (97), propenilfenóis (39), esteróides (15), cavapironas (18), chalconas/dihidrochalconas (17), flavonas (16), flavononas (6), piperolida (4), além de outros 146 compostos que não são classificados como metabólitos secundários (Parmar *et al.*, 1997; Dyer *et al.*, 2004).

Os metabólitos secundários podem ser encontrados em todas as partes das plantas (folhas, caules, raízes, frutos e inflorescências) e possuem diversas ações biológicas, tais como: imunomoduladora (Majdalawieh e Carr, 2010), anti-inflamatória (Zakaria *et al.*, 2010), antinociceptiva (Rodrigues *et al.*, 2009), antipirética (Sireeratawong *et al.*, 2010), antifúngica (Koroishi *et al.*, 2008), citotóxica (Bezerra *et al.*, 2007), anti-tumoral (Bezerra *et al.*, 2006), gastroprotetora (Morikawa *et al.*, 2004), ansiolítica (Felipe *et al.*, 2007), antidepressiva (Xie *et al.*, 2011) e antídoto para picada de cobra (Núñez *et al.*, 2005).

Entre os metabólitos secundários, destaca-se o alcalóide piperina, principal constituinte pungente extraído de *P. nigrum* (Majeed e Prakash,

2000; Meghwal e Goswami, 2013), uma espécie que tem sido largamente utilizada no tratamento do alívio da dor, calafrios, reumatismo, gripe, dores musculares, resfriados, cansaço, febre, além de ser empregada para aumentar a circulação sanguínea e a produção de saliva, estimular o apetite e incentivar o peristaltismo (Meghwal e Goswami, 2013). Na medicina tradicional chinesa, a pimenta preta é utilizada no tratamento da epilepsia, fato que estimulou os pesquisadores chineses a sintetizar uma droga antiepiléptica conhecida como antiepilepserina, cujo princípio ativo é um análogo da piperina (Majeed e Prakash, 2000).

Outros estudos realizados com piperina têm demonstrado ação antioxidante (Vijayakumar *et al.*, 2004), anti-inflamatória (Bae *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2015), imunomodulatória (Pathak e Khandelwal, 2009), antidepressiva (Lee *et al.*, 2005), antimetastática (Pradeep e Kuttan, 2002), antitireóidiana (Panda e Kar, 2003), hepatoprotetora (Koul e Kapil, 1993), antiofídica (Shenoy *et al.*, 2013).

1.13 *Piper aleyreanum*

Piper aleyreanum C.DC é uma árvore de pequeno porte pertencente à família Piperaceae, de ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais das Américas do Norte e do Sul. No Brasil, tem maior incidência na região norte, especialmente na floresta amazônica, onde é popularmente conhecida como: “João brandinho”, “pimenta longa”, “pimenta longa da mata”, “pimenta de cobra” e usada na medicina tradicional como imunomodulador, analgésico, antiofídico e antidepressivo (Facundo *et al.*, 2012).

No campo da fitoquímica, estudos realizados por Facundo e colaboradores permitiram o isolamento e a caracterização de 6 constituintes, sendo 3 flavonas: galangina (3,5,7-trihidroxiflavona), crisina (5,7-dihidroxiflavona) e isalpinina (3,5-dihidroxi-7-metoxiflavona); 1 propiofenona (2-metoxi-4,5-metilenodioxipropiofenona); 1 esteróide (β -sitosterol) e 1 alcalóide indólico (3- γ , γ -dimetilalilindol) (Facundo e Morais, 2003; Facundo *et al.*, 2012).

Além dos constituintes fixos, estudos realizados com plantas coletadas em dois estados da região norte do país permitiram caracterizar os componentes químicos voláteis presentes no óleo essencial desta espécie. No estado de Rondônia foram identificados como compostos majoritários: transcariofileno (13,6%), limoneno (12,7%), muuroleno (10,3%) (Facundo, 2005), β -pineno (14.4%), isocariofileno (17.5%), β -cariofileno (18.6%) (Facundo *et al.*, 2007), óxido de cariofileno (11,5%), β -pineno (9,0%), espatulenol (6,7%) e canfeno (5,2%) (Lima *et al.*, 2012),

enquanto no estado do Pará foi observada a predominância dos constituintes: δ -elemeno (10,0%), β -elemeno (12,3%), germacreno D (13,0%) e biciclogermacreno (11,7%) (Andrade *et al.*, 2009), δ -elemeno (8,2%), β -elemeno (16,3%), germacreno D (6,9%) e biciclogermacreno (9,2%) (Da Silva *et al.*, 2014).

Apesar da grande diversidade de constituintes presentes nos óleos essenciais, poucos estudos relatam a atividade desses compostos. Entre os mais estudados, encontra-se o β -elemeno, o qual já demonstrou possuir diversas ações biológicas, tais como: redução da transmigração de monócitos causada pela redução da adesão das células à parede endotelial (Liu *et al.*, 2015), ação anti-inflamatória, mediada pela inibição da permeabilidade vascular, redução de mediadores pró-inflamatórios (óxido nítrico – NO, PGE₂, TNF- α , IL-6, IL-12 e IL-1 β) e regulação da via de sinalização do receptor do tipo *Toll* 4 (TLR4), incluindo p38 MAPK, JNK e NF- κ B (Patra *et al.*, 2016), redução da imunossupressão induzida pela rapamicina, através da reversão do desbalanço de linfócitos T_{reg}/Th₁₇ (Zhou *et al.*, 2016), redução da progressão da aterosclerose promovida pela redução da infiltração de macrófagos e liberação das citocinas TNF- α e IL-6 (Zhong *et al.*, 2015), redução da expressão citocinas IL-17, IL-6, IL-23, interferon gama (IFN- γ), inibição da infiltração de células inflamatórias e redução da perda axonal na medula espinal de camundongos com encefalomielite autoimune (Zhang *et al.*, 2010, 2011).

Em contrapartida, embora sejam conhecidos os efeitos farmacológicos de diversas espécies do gênero *Piper*, a literatura dispõe de poucos estudos referentes às propriedades terapêuticas desta espécie. Um desses estudos, realizados por Lima e colaboradores (2012) demonstraram que o óleo essencial de *Piper aleyreanum* exerce significativo efeito antinociceptivo em ambas as fases do teste da formalina, efeito anti-inflamatório no modelo de pleurisia induzida por carragenina e efeito gastroprotetor no modelo de lesão gástrica induzida por etanol. Da Silva e colaboradores (2014) mostraram ainda que o óleo essencial obtido dessa espécie também possui efeito antioxidante, antifúngico, além de forte e seletiva ação contra células tumorais (melanoma). Além disso, estudos prévios, também já demonstraram que o óleo essencial possui ação antiofídica contra o veneno da serpente *Bothrops jararaca* (Nascimento, 2014).

2. JUSTIFICATIVA

De acordo com a organização mundial de saúde (OMS), a dor aguda e crônica tem um impacto direto em pelo menos 20% da população mundial. Sabe-se que a dor é o sintoma mais importante, em termos de prevalência, e que está diretamente relacionado a consequências pessoais e econômicas. Somente nos Estados Unidos os custos anuais com dor crônica ultrapassam os 200 bilhões de dólares. E apesar do apreciável conhecimento adquirido no campo da dor, seu tratamento ainda continua sendo desafiador, sobretudo, em virtude dos sérios efeitos colaterais.

Assim, a busca por novas estratégias terapêuticas (mais seguras e eficazes), tem sido importante para a utilização de alternativas empregadas em seu controle, seja pela prática do exercício físico ou através de sessões de acupuntura, por exemplo. Contudo, o uso de medicamentos ainda representa o principal aliado empregado no seu tratamento e, nas plantas, podem ser encontradas fontes promissoras de substâncias que podem ter ação direta no controle da dor, sendo, portanto, uma rica fonte de substâncias com potencial terapêutico tanto para estados agudos quanto crônicos de dor.

Contudo, o potencial das plantas como fonte de novos medicamentos ainda é largamente inexplorado. Apesar da enorme diversidade biológica, apenas um pequeno percentual foi investigado quimicamente e a quantidade de estudos submetidos à triagens farmacológicas são ainda menores. Estima-se que apenas 17% das plantas tenham abordagens científicas, o que torna sua diversidade química e biológica uma fonte potencial para o desenvolvimento e utilização de novos produtos farmacêuticos.

Nesse sentido, o presente estudo visa estender o conhecimento das ações farmacológicas da espécie *Piper aleyreanum*. Apesar de ser pouco explorada do ponto de vista farmacológico, estudos têm mostrado que esta espécie representa uma fonte apreciável de metabólitos secundários com diversas ações biológicas. Aliado a isso, estudos de plantas do gênero *Piper* têm demonstrado que seus constituintes possuem forte ação analgésica e anti-inflamatória, dando um suporte adicional a presente abordagem. Além disso, já foi demonstrado o potencial da planta em questão em diferentes modelos animais. Assim, a continuidade nos estudos pode fornecer uma perspectiva favorável para uma melhor compreensão de seu mecanismo de ação, bem como fornecer subsídios para o possível desenvolvimento de um fitoterápico utilizado no tratamento da dor pós-operatória e neuropática.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

❖ Investigar o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do óleo essencial de *Piper aleyreanum* nos modelos de nocicepção aguda (dor pós-operatória) e crônica (dor neuropática) em camundongos, bem como o possível mecanismo de ação envolvido.

3.2 Objetivos Específicos

❖ Investigar o efeito antinociceptivo óleo essencial de *Piper aleyreanum* frente à agonistas do sistema glutamatérgico;

❖ Verificar se o tratamento com o óleo essencial de *Piper aleyreanum* está envolvido com mediadores inflamatórios, como IL-1 β e TNF- α ;

❖ Investigar a possível interação do óleo essencial de *Piper aleyreanum* com canais TRPs, como TRPA1 e TRPV1;

❖ Avaliar o efeito antinociceptivo do óleo essencial de *Piper aleyreanum* na dor crônica através do modelo de ligação parcial do nervo isquiático (LPNI);

❖ Investigar o possível efeito tóxico do óleo essencial de *Piper aleyreanum* a partir do tratamento prolongado utilizado no modelo da LPNI;

❖ Avaliar o efeito antinociceptivo do óleo essencial de *Piper aleyreanum* na dor inflamatória aguda através do modelo de dor pós-operatória;

❖ Investigar se o óleo essencial de *Piper aleyreanum* reduz a migração de células do sistema imune no modelo de dor pós-operatória;

❖ Avaliar a possível toxicidade exercida pelo óleo essencial de *Piper aleyreanum* em estudos *in vitro*;

❖ Investigar o possível envolvimento do óleo essencial de *Piper aleyreanum* na atividade do fator de transcrição NF- κ B;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Estudo Fitoquímico

4.1.1 Coleta e Identificação da Planta

A espécie *Piper aleyreanum* foi coletada em uma região de mata, situada na BR 319 (Km 15), sentido Humaitá/AM, em Porto Velho-Rondonia ($8^{\circ}43'11.6''S$ $63^{\circ}59'03.7''W$), no dia 31 de março de 2013. A identificação da espécie foi realizada pela Dr. J. Gomes, a partir da confecção de exsicata e o envio desta ao Herbário do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), onde encontra-se depositada sob o número 223303.

4.1.2 Extração do Óleo Essencial

A extração do óleo essencial de *Piper aleyreanum* (OEPa) foi realizada pela técnica de destilação por arraste à vapor, conforme metodologia descrita por Craveiro e colaboradores (1981). As partes aéreas frescas (folhas e hastes) da planta (5,0 kg) foram colocadas em um recipiente de vidro, por meio do qual foi passada uma corrente de vapor de água sob pressão. Os compostos voláteis da amostra foram arrastados pelo vapor e a mistura foi transportada para um condensador, onde os vapores retornaram ao estado líquido e foram coletados através um balão separador. Ao final do processo, o OEPa foi desidratado com sulfato de sódio anidro e a porcentagem de rendimento do óleo foi calculada com base no peso fresco da planta (0,1%).

4.1.3 Identificação dos Constituintes do Óleo Essencial

A análise do OEPa foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/EM), na central analítica da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), utilizando um cromatógrafo com detector seletivo de massas (MSD) da série 5975 (Agilent Technologies). Uma coluna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) foi usada com gás He como carreador no fluxo de 1 ml/min. As condições de temperatura da coluna do programa foram: 60-290 $^{\circ}C$ (3 $^{\circ}C$ /min) com isoterma a 290 $^{\circ}C$ por 5/min; temperatura do injetor a 260 $^{\circ}C$ e

temperatura do detector a 280 °C. O volume da amostra injetado foi de 1µl com fracionamento (Split) na razão de 1:10.

Os componentes do óleo foram identificados por comparação dos índices de retenção calculados (IR), espectros de massa obtidos por GC-EM e dados da literatura (Adams, 2007). Os valores dos IR dos componentes foram obtidos por co-injecção de uma mistura da série *n*-alcanos (C5-C30) e através da equação relatada por Van den Dool e Kratz (1963). A concentração final foi calculada utilizando as áreas de pico, individualmente para cada substância.

4.2 Estudo Farmacológico

4.2.1 Animais

Os experimentos foram realizados utilizando camundongos da espécie *Mus musculus*, linhagem Swiss Webster (25-35g) e C57BL/6 (20-25g), de ambos os sexos, com 8 a 10 semanas, fornecidos pelo biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis, Brasil) e camundongos da espécie *Mus musculus*, linhagem C57BL/6 (20-25g), de ambos os sexos, com 8 a 10 semanas, fornecidos pelo Laboratório Jackson para a *Queen's University* (Kingston, ON, Canadá). Os animais foram mantidos em câmaras isoladas contendo no máximo 6 animais por caixa, com ventilação e condições controladas de temperatura ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade (60% - 80%), sob ciclo de 12 horas claro-escuro (7 às 19 horas), com livre acesso a ração e água.

Para a realização dos testes comportamentais, os animais foram distribuídos homogeneamente entre os grupos e ambientados às condições laboratoriais durante pelo menos uma hora. Todos os experimentos comportamentais foram conduzidos de acordo com as normas de cuidado com animais de laboratório para investigação de dor experimental (Zimmermann, 1983). Além disso, todos os procedimentos empregados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (protocolo número 1606090317) e pelo *University Animal Care Committee* (UACC) da *Queen's University* (protocolo número).

4.2.2 Desenho Experimental

Para avaliar o efeito antinociceptivo central do OEPa sobre os neurônios sensoriais, inicialmente foi investigado o envolvimento do tratamento com o sistema glutamatérgico, citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) e canais TRPs (TRPA1 e TRPV1). Primeiramente foi escolhida a dose de 100 mg/kg (com base em dados prévios) e então foi testada a capacidade inibitória do OEPa utilizando testes de nocicepção aguda. No primeiro teste, foi investigada a capacidade do OEPa em reduzir a nocicepção provocada pela injeção intratecal de glutamato, uma vez que o sistema glutamatérgico está envolvido tanto em estados de dor aguda quanto crônica (Fig. 9). Posteriormente, foi avaliado o efeito do OEPa na nocicepção induzida pela administração intratecal de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β), as quais potencializam a citotoxicidade causada pelo glutamato e, desta forma, promovem hipersensibilidade (Fig. 9). Então, foi testada a capacidade inibitória do OEPa na nocicepção induzida pela ativação dos canais iônicos TRPA1 e TRPV1, uma vez que ambos são expressos nas fibras sensoriais, onde desempenham um papel crucial na percepção e transmissão do estímulo nociceptivo em estados de dor aguda e persistente (Fig. 9).

Após os testes de nocicepção aguda, foi utilizada a ligação parcial do nervo isquiático (LPNI) para avaliar a atividade antinociceptiva do OEPa em um modelo de dor neuropática. Primeiramente, foi realizada uma curva dose-resposta, utilizando o teste de von Frey como ferramenta para avaliar a hiperalgesia mecânica e o teste da placa quente/fria para avaliar a hiperalgesia térmica. Além disso, também foi utilizado uma estratégia de tratamento de duas vezes ao dia para observar se o tratamento com o OEPa apresentaria efeito cumulativo ou toxicidade pelo aumento do número de tratamentos. Ao final desses experimentos, os animais foram expostos ao teste de campo aberto, a fim de avaliar a atividade locomotora e sedativa do tratamento prolongado com OEPa. Então, os animais foram eutanasiados e submetidos à análise toxicológica (Fig. 10).

Com base nos dados obtidos foi empregado o modelo de dor pós-operatória para investigar a participação de células do sistema imune e do canal TRPA1 na ação antinociceptiva promovida pelo OEPa. Para isso, foram realizados testes comportamentais para avaliar a ação antinociceptiva do OEPa utilizando o teste de von Frey como ferramenta de avaliação. Ao final dos experimentos, foram coletados tecidos da pata e os gânglios das porções de L4 a L6, os quais foram submetidos à análise

de mRNA para investigar o efeito do OEPA sobre expressão de canais TRPA1 (Fig. 11). Em outro grupo de experimentos, foi realizado o mesmo procedimento cirúrgico a fim de coletar tecido da pata para avaliar se células do sistema imune estariam envolvidas na ação antinociceptiva promovida pelo tratamento com o OEPA (Fig. 11). Para isso, foi utilizada a técnica de citometria de fluxo com marcadores específicos para linfócitos, células mielóides, neutrófilos e macrófagos. Experimentos adicionais (*in vitro*) foram realizados com o intuito de testar a capacidade tóxica do OEPA sobre monócitos humanos (células THP-1), para que, posteriormente, fosse investigada a ação específica do tratamento sobre a via de ativação do fator de transcrição NF- κ B.

Com base nos dados obtidos, foram então realizadas abordagens farmacológicas para evidenciar o envolvimento da ação antinociceptiva do OEPA sobre o bloqueio de canais TRPA1. Para isso, foram utilizados experimentos de nocicepção aguda, utilizando o teste de nocicepção induzido pelo óleo de mostarda e pelo isotiocianato de alina (AITC), ambos agonistas dos canais TRPA1, de modo a demonstrar especificidade, e corroborar com os dados obtidos anteriormente no teste de nocicepção induzida por cinamaldeído. Em seguida, foi realizada uma curva dose-resposta, através da administração intraplantar do OEPA, com o intuito de investigar se o mesmo seria capaz de causar nocicepção *per se*, e assim, fosse empregada como agente algogênico, bem como doses que não causariam nocicepção *per se*, de modo que fossem utilizadas como tratamento local.

Dessa forma, foram realizados dois grupos de experimentos. No primeiro o OEPA foi empregado como tratamento local, e assim, foi investigada a ação específica sobre o canal TRPA1. Além disso, foi utilizado o agonista do canal TRPV1 para demonstrar que o efeito do tratamento atua de forma específica sobre canais TRPA1. Já no segundo experimento, o próprio OEPA foi utilizado como agente algogênico, para demonstrar, através do uso de antagonistas (HC-030031, antagonista TRPA1 e capsazepina, antagonista TRPV1), seu envolvimento com os receptor investigado.

Além disso, considerando que estudos recentes têm demonstrado que a ativação de canais TRPA1 provocam aumento na degranulação de mastócitos, experimentos adicionais foram realizados a fim de testar o efeito do OEPA na nocicepção provocada pela degranulação dessas células. Assim, sabendo que a histamina é um dos principais produtos liberados durante o processo de degranulação dos mastócitos, também foi investigada a ação do OEPA na nocicepção causada por esse mediador.

4.2.3 Drogas e Reagentes

No presente estudo foram utilizadas as seguintes substâncias: cloridrato de ácido L-glutâmico, cinamaldeído, cânfora, xilazina, cetamina, óleo de mostarda, isotiocianato de alila (AITC), histamina, HC-030031, capsazepina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA); ácido caínico (cainato), ácido (\pm)-1-aminociclopentano-trans-1,3-dicarboxílico (trans-ACPD), ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4 isoxazolpropionico (AMPA), ácido N-metil-D-aspartico (NMDA) e capsaicina (Tocris Bioscience, Ellisville, Missouri, EUA); Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), Interleucina-1 β (IL-1 β) (R&D Systems, Minneapolis, EUA); Isoflurano (Cristália, SP, Brasil); Para a realização da análise toxicológica foram utilizados kits comerciais específicos (Gold Analisa, Belo Horizonte - MG, Brasil). Todas as drogas foram dissolvidas em solução salina isotônica (0,9 % NaCl) com exceção do óleo de mostarda e do OEPA, que foram dissolvidos em solução salina e Tween 80 (1%) e do HC-030031, que foi diluído em 5% de DMSO. Os grupos controle foram tratados com veículo (salina + 1% de tween 80) ou (salina + 5% de DMSO) e os grupos OEPA foram tratados com doses de 10-100 mg/kg, pela via intraperitoneal (i.p.) ou intragástrica (i.g.), 30 e 60 min., respectivamente, antes dos testes. A administração intragástrica do OEPA ou veículo foi realizada com o volume de 10 ml/kg a fim de não exceder o limite da capacidade gástrica dos animais. Além disso, as concentrações de tween 80 (1%) e DMSO utilizadas (5%) não demonstraram qualquer efeito *per se*.

4.2.4 Testes Nociceptivos

4.2.4.1 *Nociceção induzida pela administração intratecal de agonistas glutamatérgicos e citocinas pró-inflamatórias*

A injeção intratecal (i.t.) foi realizada conforme método descrito por Hylden e Wilcox (1980), e teve como objetivo investigar o envolvimento de receptores do sistema glutamatérgico e das citocinas pró-inflamatórias (IL- β e TNF- α) no efeito antinociceptivo do OEPA a nível central. Camundongos Swiss foram tratados com OEPA (100 mg/kg, i.g.) ou veículo (10 ml/kg, i.g.) 1 hora antes da injeção intratecal. Os animais foram contidos manualmente e uma agulha de calibre 30, ligada a um tubo de polietileno com uma micro-seringa de 25 ml (Hamilton, Birmingham, Reino Unido) foi inserida através da pele e entre as

vértebras L5-L6, no espaço subaracnóide espinal. Cada injeção foi administrada por um período de 5 segundos e continha 5 µl de glutamato (aminoácido excitatório, 175 nmol/i.t.), trans-ACPD (agonista para receptores metabotrópicos de glutamato, 50 nmol/i.t.), NMDA (agonista seletivo para receptores glutamatérgicos ionotrópicos do subtipo NMDA, 450 pmol/i.t.), AMPA (agonista seletivo para receptores glutamatérgicos ionotrópicos do subtipo AMPA, 135 pmol/i.t.), cainato (agonista seletivo para receptores glutamatérgicos ionotrópicos do subtipo cainato, 110 pmol/i.t.), TNF- α (0,1 pg/i.t.) ou IL-1 β (1 pg/i.t.).

O movimento reflexo da cauda foi utilizado como indicativo de sucesso da administração. Após a injeção das diferentes substâncias, os camundongos foram observados individualmente em suportes transparentes de acrílico e o tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a região posterior do corpo foi quantificado e considerado como indicativo de nocicepção, conforme o tempo de ação demonstrado previamente para cada agonista: AMPA (1 min); glutamato (3 min); cainato (4 min); NMDA (5 min) e trans-ACPD, TNF- α e IL-1 β (15 min) (Fig. 9) (Figueredo *et al.*, 2011; Nucci-Martins *et al.*, 2015; Faqueti *et al.*, 2016).

4.2.4.2 Nocicepção induzida pela administração intratecal de agonistas TRPs

Para investigar o envolvimento de canais TRPs no efeito antinociceptivo do OEPa foi utilizada a injeção intratecal dos agonistas dos canais TRPV1 (capsaicina) e TRPA1 (cinamaldeído) conforme descrito anteriormente por Nucci e colaboradores (2015). Camundongos Swiss foram tratados com OEPa (100 mg/kg, i.g.) ou veículo (10 ml/kg, i.g.) 1 hora antes da injeção intratecal. Os animais receberam uma injeção intratecal de 5 µl de capsaicina (100 pmol/sítio) ou cinamaldeído (30 pmol/sítio) e a resposta nociceptiva foi avaliada por 5 e 30 minutos, respectivamente (Fig. 9B). Cânfora (7,6 mg/kg, s.c.), um antagonista TRPA1, foi administrado subcutaneamente 30 min. antes da injeção intratecal do cinamaldeído e utilizado como controle positivo (Fig. 9).

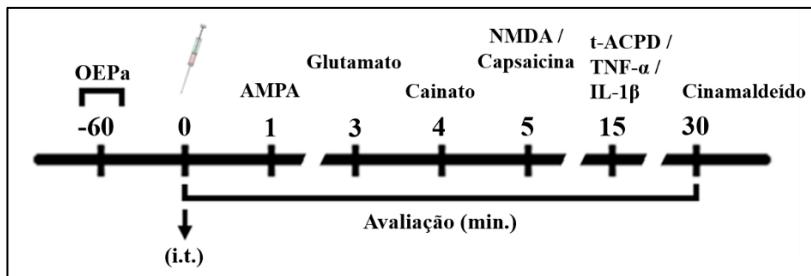


Figura 9. Representação esquemática e temporal dos testes comportamentais de nociceção espontânea induzido por diferentes agentes algônicos administrados pela via intratecal. O esquema mostra os testes de nociceção induzidos por diferentes agentes flogísticos administrados pela via intratecal e o tempo de avaliação empregado em cada teste. No esquema, -60 representa o tempo de tratamento dos animais antes da administração do agente flogístico e 0 representa o tempo de administração da injeção intratecal (i.t.). As avaliações do comportamento nociceptivo foram feitas de acordo com o tempo de ação para cada agonista: AMPA (1 min.); glutamato (3 min.); cainato (4 min.); NMDA e capsaicina (5 min.), trans-ACPD, TNF- α e IL-1 β (15 min.) e cinamaldeído (30 min.).

4.2.4.3 Nociceção induzida pela Ligação Parcial do Nervo Isquiático (Dor Neuropática)

A ligação parcial no nervo isquiático (LPNI) foi realizada conforme o método descrito por Malmberg e Basbaum (1998) e teve como objetivo investigar o efeito antinociceptivo do tratamento com OEPa em um modelo pré-clínico de neuropatia periférica. Camundongos Swiss foram previamente anestesiados com injeção intramuscular (1 ml/kg, i.m.) de xilazina (10 mg/kg) e cetamina (80 mg/kg). Após verificar a anestesia do animal, através do pinçamento da cauda e das pregas interdigitais, foi efetuada a tricotomia da coxa direita. Em seguida, foi realizada uma incisão curvilínea, iniciando acima e medialmente ao trocânter maior do fêmur, terminando próximo à fossa poplíteia, ao nível da inserção dos músculos ísquiotibiais.

A exposição do nervo isquiático ocorreu após a divulsão muscular (músculo biceps femoral). Com auxílio de um fio de sutura 8.0 foi realizada a ligação de aproximadamente $\frac{1}{3}$ a $\frac{1}{2}$ do diâmetro do nervo. Durante todo o procedimento cirúrgico os animais foram mantidos com anestésico inalatório isoflurano (1-2% em 100% de O₂). Os animais do grupo sham (falso-operado) tiveram o nervo exposto, contudo, este não foi amarrado. A incisão da pele foi reparada com 2 pontos de sutura feitos com fio polipropileno 6.0 não absorvível e a assepsia do local foi realizada com antisséptico (Povidine).

Após a cirurgia, os animais foram mantidos próximos à uma lâmpada até retornarem a deambular pela caixa, e posteriormente, foram levados de volta para o biotério do laboratório. O modelo foi utilizado para avaliar a hiperalgesia mecânica (filamento de von Frey, 0,6g) e térmica (placa quente/fria), a partir do 8º e 10º dia após a lesão, respectivamente, como mostra a figura 10.

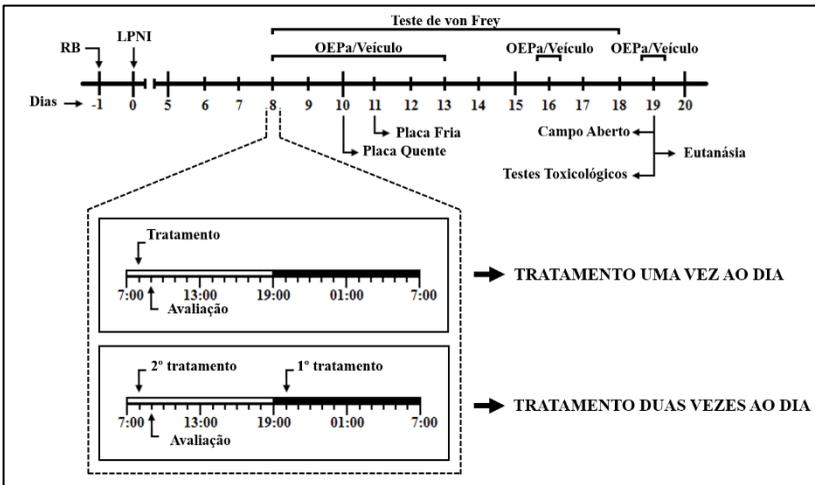


Figura 10. Representação esquemática e temporal dos testes (comportamentais e bioquímicos) realizados em animais submetidos à LPNI. O dia -1 representa o dia anterior a realização da LPNI, onde foi feita a caracterização da resposta basal dos animais. O dia 0 representa o dia em que foi realizada a LPNI. No 8º dia é mostrado o dia em que foram realizados os esquemas de tratamento e as avaliações dos animais após a LPNI. Do 8º ao 18º dia são mostradas as avaliações diárias de hiperalgesia mecânica (teste de von Frey), bem como os dias nos quais os animais foram tratados com OEPa (100 mg/kg, i.g.) ou veículo (10 ml/kg, i.g.). No 10º e 11º dia após a LPNI foram realizados os testes de hiperalgesia térmica ao calor e ao frio, respectivamente. O 19º representa o dia em que os animais foram tratados e submetidos ao teste do campo aberto, seguido de eutanásia e análise toxicológica (coleta de sangue e avaliação macroscópica de órgãos).

4.2.4.4 Nociceção induzida pela incisão plantar (Dor Pós-operatória)

A cirurgia de incisão plantar foi realizada conforme descrito previamente por Pogatzki e Raja (2003) e teve como objetivo investigar o efeito antinociceptivo do tratamento com OEPa em um modelo pré-clínico de dor pós-operatória. Camundongos C57BL/6 foram anestesiados com Isoflurano a 2% (mantido com O₂ a 100%), com o auxílio de uma máscara nasal. Após assepsia da pata traseira direita, foi realizada uma incisão longitudinal de 5 mm através da pele e fáscia da

superfície plantar, utilizando um bisturi de lâmina número 11. A incisão foi iniciada a 2 mm da extremidade proximal do calcanhar e estendida em direção aos dedos. O músculo plantar foi então elevado com o auxílio de uma pinça curva, mantendo a origem e a inserção do músculo intactas. Após a incisão, a pele foi suturada com um fio de sutura de polipropileno 8.0 não absorvível, e coberta com 10% de solução povidine-iodo®. Ao término do procedimento cirúrgico, os animais foram colocados de volta em suas caixas para recuperação do efeito da anestesia. O comportamento nociceptivo foi avaliado na pela alodínia e hiperalgisia mecânica, através do uso de filamentos de von Frey (0,16-2,0g), cerca de 1h após a realização do procedimento cirúrgico. Após a caracterização da resposta nociceptiva, os animais foram tratados com veículo (10 ml/kg, i.p.) e EOpa (100 mg/kg, i.g. ou i.p) e avaliados novamente 30 min. após o tratamento (Fig. 11).

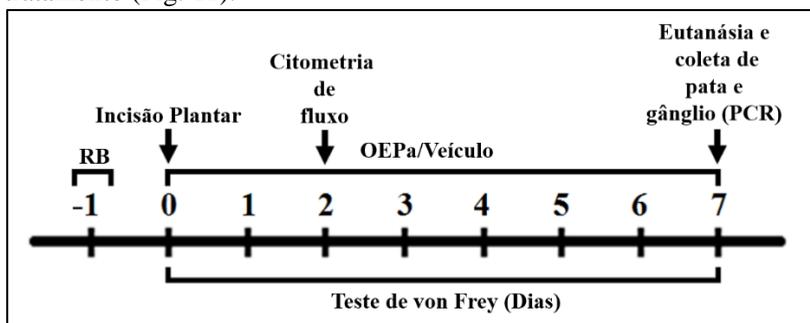


Figura 11. Representação esquemática e temporal dos testes realizados no modelo de incisão plantar. O tempo -1 representa a caracterização da resposta basal (RB). O tempo 0 representa o dia de realização da incisão plantar. Os tempos de 0 a 7 representam os dias em que os animais foram tratados e avaliados no teste de von Frey. No 7º dia os animais foram eutanasiados e o tecido ipsilateral a cirurgia (patas direitas), bem como os gânglios das porções L4 a L6 foram coletados para análise da expressão de canais TRPA1. Em outro grupo de experimento, os animais foram igualmente submetidos ao procedimento cirúrgico para coleta de tecido da pata ipsilateral a lesão, 2 dias após a realização da incisão plantar para análise por citometria de fluxo.

4.2.4.5 Nocicepção induzida pela administração intraplantar de óleo de mostarda

A injeção intraplantar (i.p.) de óleo de mostarda foi realizada conforme descrito anteriormente, com pequenas modificações (Martin *et al.*, 2017), e teve como objetivo corroborar o envolvimento de canais TRPA1 no efeito antinociceptivo do OEPa a nível periférico. Camundongos C57BL/6 foram tratados com OEPa (100 mg/kg, i.p.) ou

veículo (10 ml/kg, i.p.) 30 minutos antes da injeção de óleo de mostarda (1%) na superfície ventral da pata posterior direita. Imediatamente após a administração do agente algogênico os camundongos foram colocados individualmente em suportes transparentes de acrílico e o tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata foi quantificado e considerado como indicativo de nocicepção durante o período de 20 minutos (Fig. 12).

4.2.4.6 Nocicepção induzida pela administração intraplantar de isotiocianato de alila

A injeção intraplantar (i.p.) de isotiocianato de alila (AITC) foi realizada conforme descrito anteriormente (Zhao *et al.*, 2012), e teve como objetivo corroborar o envolvimento de canais TRPA1 no efeito antinociceptivo do OEPA a nível periférico. Camundongos C57BL/6 foram tratados com OEPA (100 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.) 30 minutos antes da injeção de AITC (0,1%) na superfície ventral da pata posterior direita. Imediatamente após a administração do agente algogênico os camundongos foram colocados individualmente em suportes transparentes de acrílico e o tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata foi quantificado e considerado como indicativo de nocicepção durante o período de 20 minutos (Fig. 12). O edema da pata foi mensurado antes e depois da injeção i.pl. de AITC com o auxílio de um micrômetro digital e foi expresso como a diferença entre a espessura da pata antes e depois do desafio com AITC (Pigatto *et al.*, 2016).

4.2.4.7 Nocicepção induzida pela administração intraplantar de OEPA

A injeção intraplantar (i.p.) de OEPA teve como objetivo investigar se o mesmo apresentaria efeito nociceptivo. Para isso, camundongos Swiss receberam OEPA (1 a 100 µg/pata) ou veículo (20 µl/pata) na superfície ventral da pata posterior direita. Imediatamente após a administração do OEPA ou veículo os camundongos foram colocados individualmente em suportes transparentes de acrílico e o tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata foi quantificado e considerado como indicativo de nocicepção durante período de 60 minutos, os quais foram contabilizados em intervalos de cada 5 min., após a injeção do OEPA.

4.2.4.8 Nociceção induzida pela administração intraplantar do composto 48/80

A injeção intraplantar (i.p.) do composto 48/80 foi realizada conforme descrito anteriormente (Jesse *et al.*, 2007), e teve como objetivo investigar o envolvimento de produtos liberados por mastócitos no efeito antinociceptivo do OEPA a nível periférico. Camundongos C57BL/6 foram tratados com OEPA (100 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.) 30 minutos antes da injeção do composto 48/80 (10 µg/pata) na superfície ventral da pata posterior direita. Imediatamente após a administração do agente algogênico os camundongos foram colocados individualmente em suportes transparentes de acrílico e o tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata foi quantificado e considerado como indicativo de nociceção durante o período de 60 minutos (Fig. 12).

4.2.4.9 Nociceção induzida pela administração intraplantar de histamina

A injeção intraplantar (i.p.) de histamina foi realizada conforme descrito anteriormente (Jesse *et al.*, 2007), e teve como objetivo investigar o envolvimento da histamina no efeito antinociceptivo do OEPA a nível periférico. Camundongos C57BL/6 foram tratados com OEPA (100 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.) 30 minutos antes da injeção da histamina (100 nmol/pata) na superfície ventral da pata posterior direita. Imediatamente após a administração do agente algogênico os camundongos foram colocados individualmente em suportes transparentes de acrílico e o tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata foi quantificado e considerado como indicativo de nociceção durante período de 60 minutos (Fig. 12).

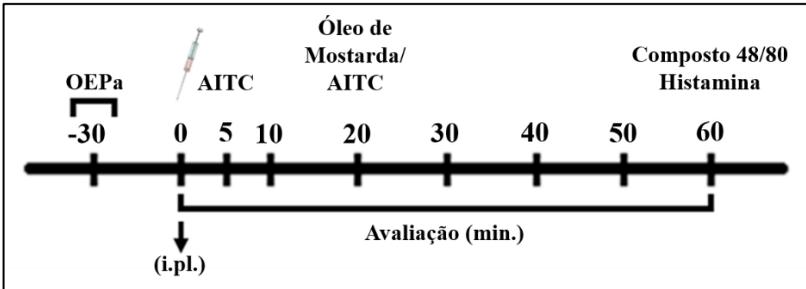


Figura 12. Representação esquemática e temporal dos testes comportamentais de nociceção espontânea induzida por diferentes agentes algogênicos administrados pela via intraplantar. O esquema mostra os testes de nociceção induzidos por diferentes agentes flogísticos administrados pela via intraplantar e o tempo de avaliação para cada agonista. No esquema, -30 representa o tempo de tratamento dos animais antes da administração dos agentes flogísticos; 0 representa o tempo de administração da injeção intraplantar (i.pl.) e 5, 20 e 60 representam os tempos de avaliação da resposta nociceptiva causada pela administração dos diferentes agentes flogísticos.

4.2.5 Testes Comportamentais

4.2.5.1 Avaliação da hipersensibilidade mecânica (von Frey)

O teste de von Frey foi utilizado para avaliar a hipersensibilidade mecânica nos modelos de nociceção induzida pela incisão plantar e ligação parcial do nervo isquiático. A hiperalgesia mecânica foi avaliada como descrito anteriormente por Nucci e colaboradores (2012). Camundongos Swiss (LPNI) ou C57BL/6 (incisão plantar) foram aclimatados em aparatos individuais ($9 \times 7 \times 11 \text{ cm}^3$) sob uma plataforma ($70 \times 40 \text{ cm}$) com malha de metal de 6 mm, elevada para permitir o acesso à superfície ventral das patas traseiras. A pata traseira direita foi estimulada com uma pressão constante de 0.4 g (incisão plantar) ou 0.6 g (ligação parcial do nervo isquiático) pelo filamento de von Frey (VFF) (Stoelting, Chicago, EUA). A frequência de resposta de 10 aplicações foi utilizada como o comportamento nociceptivo. Os resultados foram expressos como a porcentagem da resposta (retirada rápida da pata, sacudida, lambida ou mordida da pata estimulada). No dia anterior à avaliação, os animais foram submetidos ao teste para caracterizar a resposta de perfil basal. Foram selecionados apenas os animais que apresentaram uma taxa de resposta de cerca de 20 %. No dia da avaliação, os animais foram pré-tratados com OEPa (100 mg/kg) ou veículo (10 ml/kg) 30 minutos (quando administrado pela via i.p.) ou 60 minutos (quando administrado pela via i.g.) antes dos testes. O efeito

antinociceptivo foi avaliado inicialmente em um decurso temporal (curva dose-resposta) e teve como objetivo a escolha da melhor dose que seria utilizada no tratamento diário, realizado do 1º ao 7º dia (incisão plantar) e do 8º ao 18º dia (LPNI) (Fig. 10 e 11, respectivamente).

A alodínia mecânica foi avaliada como descrito anteriormente por Ghasemlou e colaboradores (2015). O limiar mecânico foi medido através de monofilamentos de von Frey e definido como o peso do filamento mínimo necessário para obter pelo menos cinco respostas (retirada rápida da pata, sacudida, lambida ou mordida da pata estimulada) em um total de 10 aplicações. Camundongos C57BL/6 foram tratados com OEPa (100 mg/kg) ou veículo (10 ml/kg) 30 minutos (quando administrado pela via i.p.) ou 60 minutos (quando administrado pela via i.g.) antes dos testes.

4.2.5.2 Avaliação da hiperalgesia térmica (placa quente/fria)

A hiperalgesia térmica foi realizada de acordo com o método descrito por Bennett e Xie (1988), com pequenas modificações, a fim de investigar o envolvimento dos canais iônicos TRPV1 (sensível ao calor) e TRPA1 (sensível ao frio) no efeito antinociceptivo do OEPa. Camundongos Swiss foram colocados em aparatos de acrílico transparentes (7 x 9 x 11 cm³) sobre a superfície elevada da placa quente/fria (Mod. AVS-CQF). A hiperalgesia térmica ao calor foi realizada no teste da placa quente (48 ± 1° C), com tempo de corte de 60s, e a hiperalgesia térmica ao frio foi realizada no teste da placa fria (10 ± 1° C), com tempo de corte de 120s. Camundongos Swiss foram tratados com OEPa (100 mg/kg) ou veículo (10 ml/kg, i.g.) 60 minutos antes e a hiperalgesia foi avaliada pela latência de retirada pata traseira direita (Fig. 10). Os tempos de corte foram escolhidos com base em estudos anteriores a fim de não provocar lesão tecidual (Simões *et al.*, 2017).

4.2.5.3 Avaliação da atividade locomotora (campo aberto)

A atividade locomotora foi realizada no teste do campo aberto, conforme descrito anteriormente (Nucci *et al.*, 2012) e teve como intuito excluir a ação de efeitos inespecíficos do OEPa sobre a atividade locomotora dos animais. O aparato consiste em uma arena de madeira (40 x 40 x 60 cm), com o piso dividido em 12 quadrantes iguais. O número de cruzamentos foi contabilizado durante o período de 6 minutos e considerado apenas quando o animal permaneceu com as quatro patas em

cada quadrante. Camundongos Swiss foram tratados com OEPA (100 mg/kg, i.g.) ou veículo (10 ml/kg, i.g.) e o teste foi realizado no 19º dia após a LPNI, uma hora após o tratamento (Fig. 10).

4.2.6 Ensaios Bioquímicos, Moleculares e Imunológicos

4.2.6.1 Teste de citotoxicidade (Ensaio azul de tripan)

O teste do azul de tripan foi utilizado com o intuito de avaliar a citotoxicidade do OEPA por meio da diferenciação de células viáveis e não viáveis. O teste baseia-se na capacidade do corante em penetrar nas células que apresentam membrana celular rompida ou funcionalmente danificada, tornando possível a distinção das células integras (com aparência translúcida) daquelas inviáveis (com coloração azulada), a partir da visualização em microscópio óptico. Assim, as células da linhagem THP-1 (monócitos humanos) foram mantidas em meio de cultura (RPMI contendo 10% de soro fetal bovino) a 37 °C com 5% de CO₂, na concentração de 1x10⁶ células/ml. As células foram incubadas por 24h com o OEPA, nas concentrações de 0,1; 0,01; 0,001% (em triplicata) e o efeito citotóxico foi avaliado pela análise de coloração por azul de tripan na concentração final de 0,2%. O número de células foi determinado pela contagem de células viáveis (vivas) em uma câmara de Neubauer e o percentual das células de cada poço foi determinado pela seguinte equação: % células viáveis = (CVC/TC) x 100, onde CVC = células viáveis contadas e TC = total de células contadas (células coradas e não coradas) (Correa *et al.*, 2009).

4.2.6.2 Extração de RNA e PCR Quantitativa em Tempo Real

A análise da expressão de TRPA1 foi realizada como descrito anteriormente (Silva *et al.*, 2017). Resumidamente, os camundongos foram anestesiados e o tecido da pata ipsilateral à incisão plantar foi coletado e imediatamente congelado em gelo seco e estocado em freezer (-80 °C) até a extração do RNA. O RNA foi extraído usando reagente de isolamento de RNA (TRIzol, Sigma-Aldrich, MO, EUA). A quantificação do RNA total foi mensurada em espectrofotômetro, com razão de absorção de comprimento de onda (260/280 nm) entre 1,8 e 2,0 para todas as amostras. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando o kit de síntese de cDNA (iScript, BioRad, CA, EUA). Subsequentemente, o PCR quantitativo (PCRq) foi realizado utilizando

iniciadores específicos para os genes TRPA1 e Gapdh de camundongo, em aparelho CFX96 de PCR em tempo real (BioRad, CA, EUA) com Sistema de fluorescência *SYBR Green* (BioRad, CA, EUA). Os dados foram analisados com o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, conforme descrito anteriormente, e expresso em relação as amostras coletadas nos grupos de animais *naive*. Os pares de *primers* para o gene TRPA1 e Gapdh foram os seguintes:

- TRPA1 *forward*: 5'-TGCTGCAGAAAAAATCAAGTTGA-3';
- TRPA1 *reverse*: 5'-CCTTGGCTGAGAAGAACTTTACACT-3';
- Gapdh *forward*: 5'-GGGTGTGAACAACGAGAAAT-3';
- Gapdh *reverse*: 5'-CCTTCCACAATGCCAAAGTT-3'.

4.2.6.3 Atividade NF- κ B

A mensuração da atividade NF- κ B foi realizada em células THP-1 Xblue - monócitos humanos transfectados de forma estável com um repórter que expressa o gene da fosfatase alcalina secretada (SEAP), gene este que fica sob controle de um promotor induzível pelos fatores de transcrição NF- κ B e AP-1. Após estimulação, NF- κ B e AP-1 são ativados e subsequentemente, a secreção de SEAP é promovida. O método foi realizado como descrito anteriormente (Ahmad *et al.*, 2014). As células foram incubadas com o OEPA, nas concentrações de 0,1; 0,01; 0,001% (em triplicata) ou foram previamente tratadas com éster de forbol (PMA), para diferenciação em macrófagos e, posteriormente, pré-tratadas com o OEPA nas mesmas concentrações (0,1; 0,01; 0,001%, em triplicata). Em seguida, foi realizado o desafio com LPS (100 ng/ml), um lipopolissacarídeo que induz a ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B), por 24h a 37°. Os níveis de SEAP foram detectados no meio condicionado após 4h de incubação do sobrenadante com meio Quanti-blue (InvivoGen, San Diego, CA, USA), em leitor de placa de ELISA (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática) com comprimento de onda de 650 nm.

4.2.6.4 Citometria de fluxo

A análise da infiltração/recrutamento de células do sistema imune foi realizada como descrito anteriormente (Ghasemlou *et al.*, 2015). Resumidamente, o tecido da pata ipsilateral à incisão plantar foi coletado e digerido em solução salina balanceada com hepes (HBSS) contendo uma mistura de 1 mg/mL de

colagenase IV e 2,4 U/mL Dispase II (Roche Applied Sciences) pelo período de 90 min. em uma estufa mantida a 37 °C. Após a digestão, as células foram trituradas por pipeta, lavadas com HBSS e 0,5% de albumina de soro bovino (BSA) e filtradas através de uma malha de 70 µm. Em seguida, as células foram bloqueadas com anticorpo anti-CD16/CD32 para camundongo na concentração de 1:10 e mantidas em gelo durante 5 minutos. Posteriormente, as células foram incubadas com uma mistura dos seguintes anticorpos, diluídos na razão de 1:200: anti-CD11b-PE, anti-Ly6G-PERCP, anti-F480-APC e anti-CD45-FITC. A citometria de fluxo foi realizada em aparelho FACS Calibur (Becton Dickinson) equipada com laser de hélio e argônio e os dados foram analisados usando o software FlowJo (TreeStar).

Para análise da viabilidade celular das células THP-1 Xblue foi utilizado o marcador DRAQ7 (marcador de morte celular). As células (THP-1 Xblue) foram incubadas com o OEPA, nas concentrações de 0,1; 0,01; 0,001% (em triplicata) ou foram previamente tratadas com éster de forbol (PMA), para diferenciação em macrófagos e, posteriormente, pré-tratadas com o OEPA nas mesmas concentrações (0,1; 0,01; 0,001%, em triplicata). Em seguida, foi realizado o desafio com LPS (100 ng/ml) e 24h após a incubação foi realizado o teste de viabilidade celular. Para isso, o marcador DRAQ7 foi diluído no meio de cultura (RPMI) na concentração final de 3µM. O corante foi incubado por 10 min. a temperatura ambiente e a citometria de fluxo foi realizada em aparelho FACS Calibur (Becton Dickinson) equipada com laser de hélio e argônio. Os dados foram analisados usando o software FlowJo (TreeStar).

4.2.6.5 Análise toxicológica

A investigação do perfil de segurança do OEPA foi realizada conforme descrito anteriormente (Cruz *et al.*, 2009). Resumidamente, camundongos Swiss submetidos a PNL ou procedimento sham foram tratados com veículo (10 ml/kg, i.g.) ou EOPA (100 mg/kg, i.g., 1x ou 2x/dia), do 8º a 19º após a lesão. Uma hora após a última administração, os camundongos foram submetidos ao teste de campo aberto e, em seguida, anestesiados com isoflurano e eutanasiados por decapitação. O sangue foi coletado, transferido para tubos de Eppendorf de 1,5 ml e centrifugado a 4,000x g por 10 min a 23 °C. O soro coletado, foi então testado para determinar a atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e gama-glutamiltransferase (GGT), as quais foram utilizadas como indicadores de

lesão hepática, ao passo que os níveis séricos de creatinina, uréia e ácido úrico foram utilizados como indicadores de lesão renal. Além disso, órgãos, incluindo: coração, pulmão, fígado, rim e baço foram excisados, pesados e cuidadosamente examinados por observação macroscópica em relação à aparência geral, forma, consistência e cor.

4.3 Análise Estatística

Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) e apresentaram distribuição normal após terem sido submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Portanto, as avaliações de hipersensibilidade mecânica foram realizadas pela análise de variância ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni para múltiplas comparações. Os demais experimentos foram analisados por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni ou Teste-t de Student quando apropriado. Em todas as análises, os valores de P foram considerados estatisticamente significativos apenas quando inferior a 0,05 ($P < 0,05$). Para todos os cálculos estatísticos foi utilizado o software GraphPad Prism versão 5.01 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

5. RESULTADOS

5.1 Identificação dos constituintes químicos do OEPA

A partir da análise de CG-EM do OEPA foram identificados 42 compostos, representando 95,6% do conteúdo total do óleo essencial (Tabela 1). Os monoterpenos: canfeno (4,1%), β -pineno (5,1%) e p-cimeno (3,8%) e os sesquiterpenos: β -elemeno (8,8%), (E)-cariofileno (6,6%), cis- β -guaieno (29,3%) e trans-calameno (6,4%) foram os compostos majoritários e representam 64,1% deste conteúdo (Tabela 2).

A identificação dos componentes foi realizada por comparação dos índices de retenção (IR) calculados, dados dos espectros de massa obtidos por CG-EM e dados da literatura (Tabela 2, Fig. 13) (Adams, 2007).

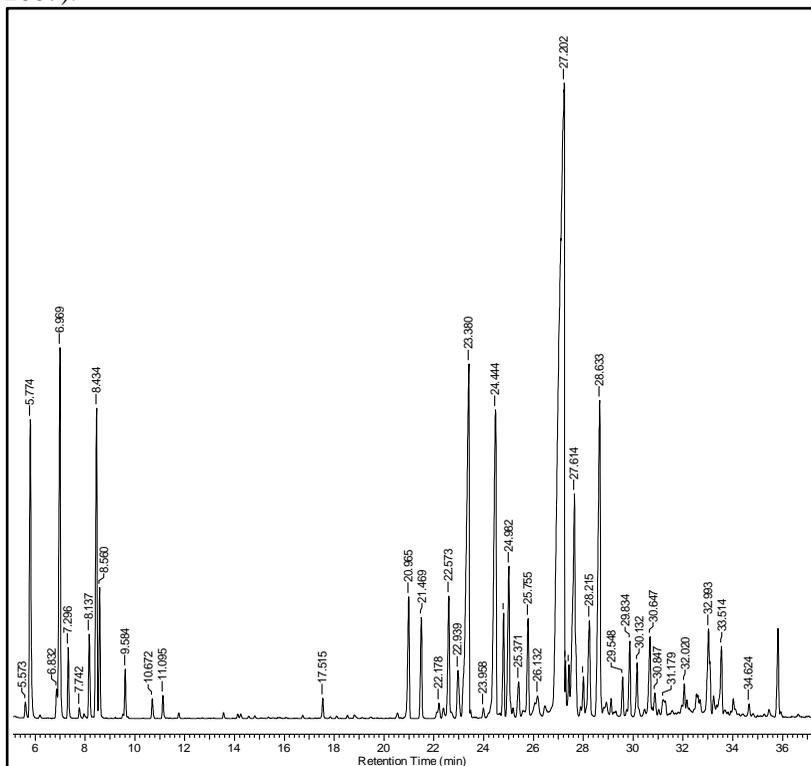


Figura 13. Perfil cromatográfico do óleo essencial de *Piper aleyreanum* obtido por CG-EM. Os picos representam os monoterpenos (tR entre 5.774-17.515) e sesquiterpenos (tR entre 20.965 - 34.624), conforme é mostrado em detalhes na tabela 2.

Tabela 2. Constituintes químicos do óleo essencial de *Piper aleyreanum*.

Pico	Constituinte	tR	IR ^{Calc.}	IR ^{Lit.}	(%)
1	Canfeno	5.774	958	946	4,141
2	Sabineno	6.832	983	969	0,367
3	α -fencheno	5.573	953	945	0,197
4	β -pineno	6.969	986	974	5,131
5	Mirceno	7.296	994	988	0,751
6	α -felandreno	7.742	1005	1002	0,123
7	α -terpineno	8.137	1016	1014	1,011
8	<i>p</i> -cimeno	8.434	1025	1020	3,854
9	Limonenol	8.560	1029	1024	1,359
10	γ -terpineno	9.584	1057	1054	0,51
11	Terpinoleno	10.672	1088	1086	0,231
12	Linalol	17.515	1256	1254	0,243
13	δ -elemeno	20.965	1337	1335	1,822
14	α -cubebeno	21.469	1349	1345	1,35
15	Ciclosativeno	22.178	1366	1369	0,217
16	α -copaeno	22.573	1375	1374	1,717
17	β -bourboneno	22.939	1384	1387	0,872
18	β -elemeno	23.380	1394	1389	8,856
19	α -gurjuneno	23.958	1408	1409	0,124
20	(E)-cariofileno	24.444	1420	1417	6,657
21	β -Gurjuneno	24.776	1428	1431	1,321
22	γ -elemeno	24.982	1434	1434	2,4
23	aromadendreno	25.371	1438	1439	0,108
24	α -humuleno	25.755	1453	1452	1,353
25	<i>cis</i> -muurolo-(14),5-dieno	26.132	1462	1465	0,427
26	<i>cis</i> - β -guaieno	27.202	1489	1492	29,367
27	Valenceno	27.260	1491	1496	0,31
28	Epizonareno	27.391	1494	1501	0,47
29	α -bulneseno	27.614	1506	1509	5,239
30	γ -cadineno	28.232	1515	1513	1,822
31	<i>trans</i> -calameno	28.656	1526	1521	6,426
32	α -cadineno	29.102	1538	1537	0,178
33	Elemol	29.548	1550	1548	0,472
34	Germacreno B	29.834	1557	1559	1,015
35	(E)-nerolidol	30.132	1565	1561	0,778
36	Espatuleno	30.647	1578	1577	1,141
37	Óxido de cariofileno	30.847	1583	1582	0,341
38	Carotol	31.179	1592	1594	0,265
39	1,10-di- <i>epi</i> - cubenol	32.020	1615	1618	0,32
40	<i>epi</i> - α -cadinol	32.993	1642	1638	1,269
41	α -Cadinol	33.514	1655	1652	0,901
42	Kusinol	34.624	1686	1679	0,15
TOTAL					95,606

^a tR – Tempo de retenção (min) de um programa de temperatura linear.

^b IR^{Calc.} – Índice de retenção calculado para cada composto.

^c IR^{Lit.} – Índice de retenção obtido da literatura.

^d % - Abundância relativa do pico da área de integração.

5.2 Efeito do OEPA na nociceção espontânea induzida pela administração intratecal de agonistas glutamatérgicos

Os resultados apresentados na figura 14 mostram a investigação da ação antinociceptiva do OEPA com o envolvimento central de agonistas glutamatérgicos. Como pode ser observado, o tratamento com OEPA (100 mg/kg, i.g.) reduziu significativamente o comportamento nociceptivo induzido pela administração intratecal de glutamato, com inibição de $94 \pm 5\%$ (Figura 14A). Além disso, o tratamento com OEPA também foi efetivo em reduzir o comportamento nociceptivo induzido pela administração intratecal de AMPA (Fig. 14B) e cainato (Fig. 14C), com inibições de $60 \pm 12\%$, $92 \pm 4\%$, respectivamente. Por outro lado, o tratamento não teve qualquer efeito sobre a nociceção induzida pela administração de NMDA (Fig. 14D) ou trans-ACPD (Fig. 14E).

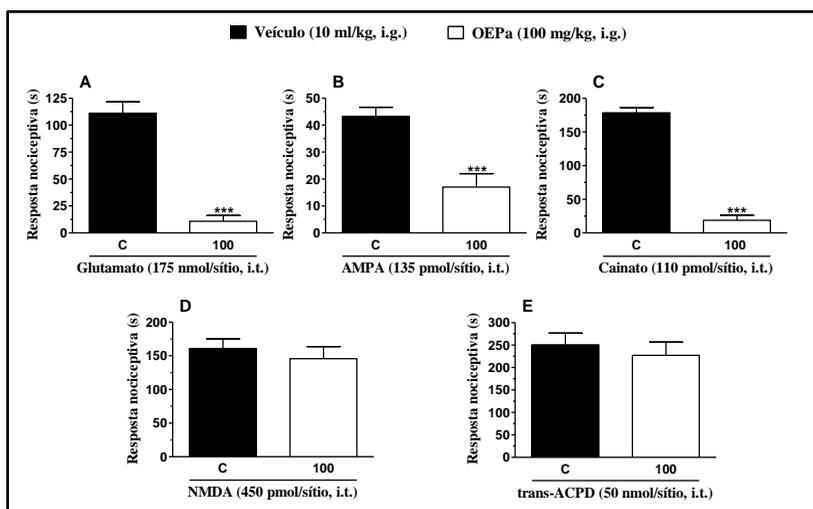


Figura 14. OEPA reduz a resposta nociceptiva provocada pela injeção intratecal de agonistas glutamatérgicos. Camundongos Swiss (fêmeas) foram tratados com o OEPA (100 mg/kg, i.g.) ou veículo (10 ml/kg, i.g.) e o comportamento nociceptivo foi avaliado após a administração intratecal de glutamato (painel A), AMPA (painel B), cainato (painel C), NMDA (painel D) e trans-ACPD (painel E). Cada coluna representa a média de 8-10 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os asteriscos (*) denotam os níveis de significância, quando comparado com o grupo controle (***) $P < 0,001$). A significância estatística foi determinada com Teste-t de Student.

5.3 Efeito do OEPA na nociceção espontânea induzida pela administração intratecal de citocinas pró-inflamatórias

Foi investigado o envolvimento central de citocinas pró-inflamatórias na ação antinociceptiva do OEPA (Figura 15). O tratamento com OEPA (100 mg/kg, i.g.) reduziu significativamente o comportamento nociceptivo induzido pela administração intratecal de IL-1 β , com inibição de $99 \pm 11\%$ (Fig. 15B). No entanto, o tratamento não foi efetivo em reduzir a nociceção induzida pela administração intratecal de TNF- α (Fig. 15A).

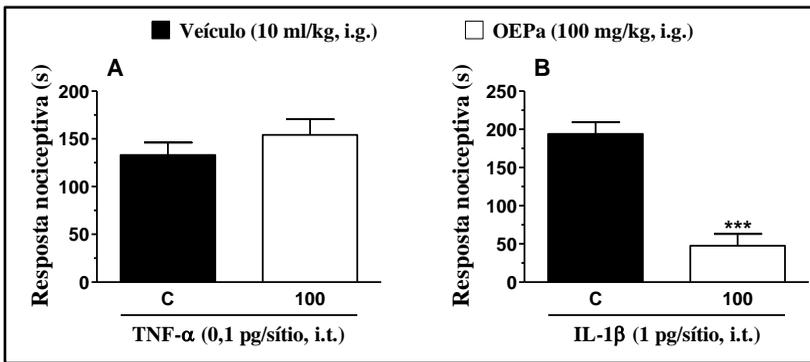


Figura 15. OEPA reduz a resposta nociceptiva provocada pela injeção intratecal da citocina pró-inflamatória IL-1 β . Camundongos Swiss (fêmeas) foram tratados com o OEPA (100 mg/kg, i.g.) ou veículo (10 ml/kg, i.g.) e o comportamento nociceptivo foi avaliado após a administração intratecal de TNF- α (painel A) e IL-1 β (painel B). Cada coluna representa a média de 8-10 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os asteriscos (*) denotam os níveis de significância, quando comparado com o grupo controle (***) $P < 0,001$). A significância estatística foi determinada com Teste-t de Student.

5.4 Efeito do OEPA na nociceção espontânea induzida pela administração intratecal de agonistas de canais TRPs

A figura 16 mostra o envolvimento central de canais TRPs no efeito antinociceptivo do OEPA. O tratamento com OEPA (100 mg/kg, i.g.) reduziu significativamente a nociceção induzida pela administração intratecal de cinamaldeído (ativador TRPA1), com inibição de $79 \pm 23\%$ (Fig. 16B). Cânfora foi utilizada como controle positivo e reduziu 100% a nociceção induzida pela administração de cinamaldeído. No entanto, o OEPA não foi efetivo em reduzir a nociceção causada pela administração intratecal de capsaicina (ativador TRPV1) (Fig. 16A).

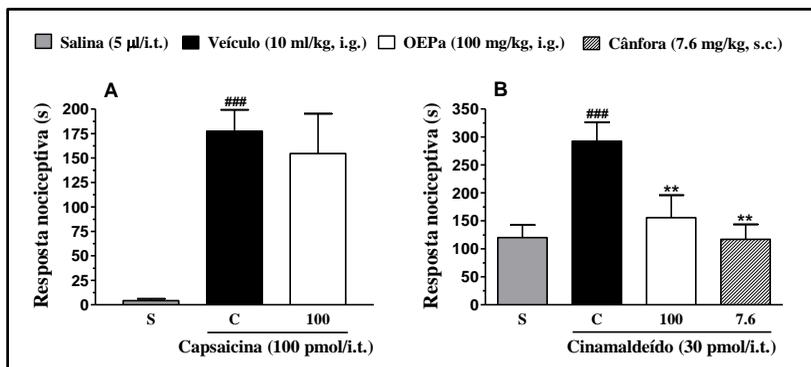


Figura 16. OEPa reduz a resposta nociceptiva induzida pela injeção intratecal de agonista TRPA1. Camundongos Swiss (fêmeas) foram tratados com o OEPa (100 mg/kg, i.g.) ou veículo (10 ml/kg, i.g.) e o comportamento nociceptivo foi avaliado após a administração intratecal de capsaicina (painel A) e cinamaldeído (painel B). Cada coluna representa a média de 8-10 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os asteriscos (*) denotam os níveis de significância, quando comparado com o grupo controle (** $P < 0,01$). As cerquilhas (#) indicam diferenças significativas do grupo controle, quando comparado com o grupo salina (### $P < 0,001$). A significância estatística foi determinada com ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni.

5.5 Efeito do OEPa na hiperalgesia mecânica e térmica induzida pela lesão parcial do nervo isquiático (LPNI)

5.5.1 Hiperalgesia mecânica (LPNI)

O modelo de ligação parcial do nervo isquiático (LPNI) foi utilizado para avaliar a ação do OEPa na hiperalgesia (térmica e mecânica) e investigar os possíveis efeitos de tolerância e toxicidade pelo tratamento prolongado com OEPa (1 e 2x/dia).

É bem estabelecido na literatura que a LPNI provoca o desenvolvimento acentuado de hiperalgesia mecânica no lado ipsilateral a lesão a partir do 8º dia, quando comparado com os animais que não são submetidos à cirurgia (Naive) ou aos que são submetidos a um falso procedimento cirúrgico (Sham), os quais mantêm a frequência de resposta no teste de von Frey em níveis basais (Figs. 17 A e B; 18 A e B).

Os resultados apresentados na figura 17 mostram que o tratamento agudo realizado **uma vez ao dia** com OEPa (10-100 mg/kg, i.g.) reduziu significativamente a hiperalgesia mecânica induzida pela LPNI por até 4 h após uma única administração (Fig. 17C). A dose de 100 mg/kg, i.g. foi a mais efetiva e apresentou inibição de $70 \pm 12\%$, uma hora após o tratamento (Fig. 17C), sendo, portanto, definida como a dose que

seria empregada nos tratamentos diários de uma e duas vezes ao dia. Por sua vez, o tratamento de **duas vezes ao dia** reduziu a hiperalgesia mecânica por até 8h, dobrando o tempo de efeito do tratamento quando comparado com uma única dose. A inibição causada pelo tratamento de duas vezes ao dia foi de $65 \pm 9\%$, e foi avaliada uma hora após a administração do segundo tratamento (Fig. 18C).

O tratamento diário de **1x ao dia** foi realizado do 8º ao 13º dia após a LPNI e apresentou significativa redução da hiperalgesia mecânica com inibições de 70 ± 12 a 100% (Fig. 17D). No 14º dia o tratamento foi suspenso por ainda apresentar efeito do dia anterior. O efeito cumulativo se manteve por até 48h e apresentou inibição de $47 \pm 11\%$ após a última avaliação realizada no 15º dia (Fig. 17D). No 16º dia, quando o efeito do tratamento foi abolido e os animais voltaram a responder ao estímulo mecânico, os animais foram novamente tratados e, surpreendentemente, apresentaram 100% de inibição da hiperalgesia mecânica após o tratamento. Além disso, outro efeito cumulativo foi observado e se manteve por mais 24h, causando inibição de $54 \pm 15\%$ após a última avaliação realizada no 17º dia (Fig. 17D).

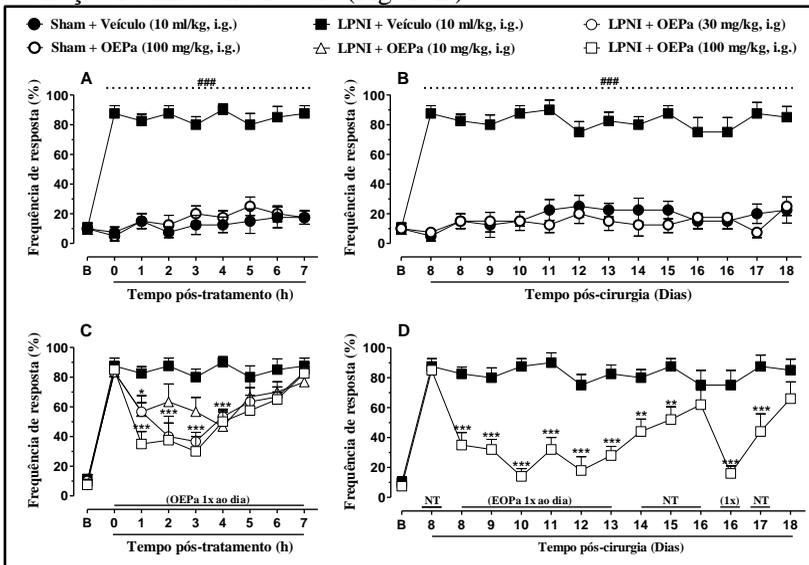


Figura 17. OEPa administrado 1x ao dia reduz hiperalgesia mecânica no modelo animal de dor neuropática induzida pela LPNI. Os gráficos da parte superior representam a dinâmica da hiperalgesia nos animais com LPNI (veículo) ao longo de horas (Painel A) ou dias (Painel B) em relação aos animais não operados (Sham + veículo e Sham + OEPa 100 mg/kg, i.g.). O efeito do tratamento com OEPa (100 mg/kg, i.g., 1x/dia) foi avaliado na hiperalgesia mecânica induzida pela LPNI após a administração aguda (Painel C) e prolongada (Painel D). Cada ponto representa a média dos valores obtidos a partir de 8 animais e as linhas verticais indicam E.P.M. Os

asteriscos (*) denotam os níveis de significância, quando comparado com o grupo controle (LPNI + veículo) (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$). As cerquilhas (#) indicam diferenças significativas do grupo controle, quando comparado com os grupos sham (sham + veículo e sham + OEPa) (### $P < 0,001$). A significância estatística foi determinada com ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni. B: limiar basal de retirada da pata. NT: não tratado.

Similar ao tratamento diário de uma vez ao dia, o tratamento com OEPa administrado **2x ao dia** também reduziu de forma significativa a hiperalgesia mecânica induzida pela LPNI, com inibições de 65 ± 9 a $96 \pm 9\%$ (Fig. 18D). No 14º dia após a LPNI, o tratamento de 2x ao dia igualmente apresentou efeito cumulativo e se manteve por 24h, causando uma redução expressiva da hiperalgesia, com inibição de $90 \pm 8\%$ após a última administração. No 15º quando o efeito não pôde mais ser observado, este foi restaurado e causou $81 \pm 9\%$ de inibição da hiperalgesia mecânica. No dia seguinte, 16º dia após LPNI, foi observado um novo efeito cumulativo do tratamento do dia anterior, com inibição de $85 \pm 10\%$ (Fig. 18D). Além disso, os grupos naive (não mostrado) e sham (tratados com veículo, 10 ml/kg, i.g., 1x/dia ou OEPa 100 mg/kg, i.g., 1x/dia), mantiveram a frequência de resposta em níveis basais ao longo de todos os experimentos (Fig. 17 A e B; Fig. 18 A e B).

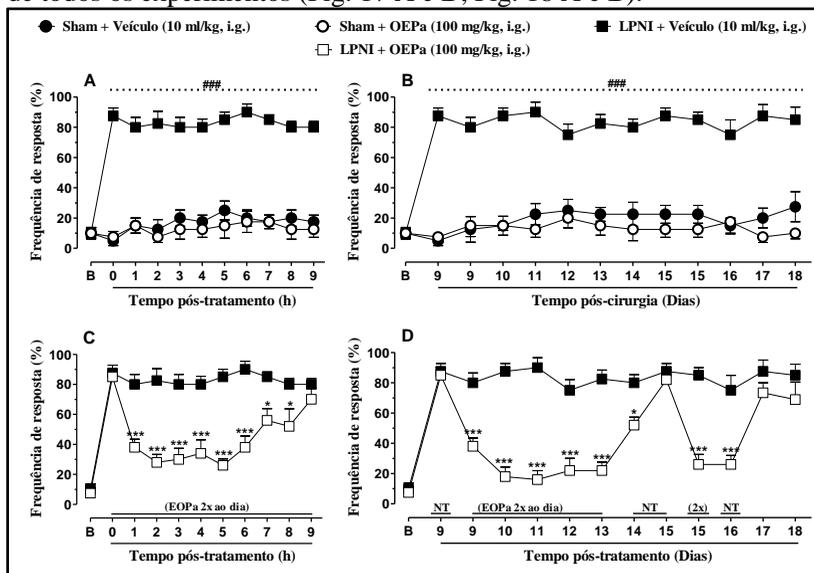


Figura 18. OEPa administrado 2x ao dia reduz hiperalgesia mecânica no modelo animal de dor neuropática induzida pela LPNI. Os gráficos da parte superior representam a dinâmica da hiperalgesia nos animais com LPNI (veículo) ao longo de horas (Painel A) ou dias (Painel B) em relação aos animais não operados (Sham + veículo e Sham + OEPa 100 mg/kg, i.g.). O efeito do tratamento com OEPa (100 mg/kg, i.g., 2x/dia) foi avaliado na hiperalgesia mecânica induzida

pela LPNI após a administração aguda (Painel C) e prolongada (Painel D). Cada ponto representa a média dos valores obtidos a partir de 8 animais e as linhas verticais indicam E.P.M. Os asteriscos (*) denotam os níveis de significância, quando comparado com o grupo controle (LPNI + veículo) (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$). As cerquilhas (#) indicam diferenças significativas do grupo controle, quando comparado com os grupos sham (sham + veículo e sham + OEPA) (### $P < 0,001$). A significância estatística foi determinada com ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. B: limiar basal de retirada da pata. NT: não tratado.

5.5.2 Hiperalgisia térmica (LPNI)

As avaliações de hiperalgisia térmica foram realizadas 10 dias após a LPNI. Os resultados da figura 19 mostram que a LPNI causa redução no tempo de latência de retirada da pata dos animais expostos à estímulo térmico (quente ou frio), quando comparado àqueles animais que não sofreram lesão (Sham). No entanto, o tratamento dos animais com OEPA (100 mg/kg, i.g.), foi capaz de reduzir de forma significativa a hiperalgisia térmica tanto ao calor quanto ao frio. Na hiperalgisia ao calor (Fig. 19A), as latências de retirada da pata foram de $158 \pm 21\%$, $116 \pm 24\%$ e $98 \pm 11\%$, nos grupos LPNI + OEPA (100 mg/kg, i.g., 1x/dia), LPNI + OEPA (100 mg/kg, i.g., 2x/dia) e Sham + OEPA (100 mg/kg, i.g.), respectivamente. Na hiperalgisia térmica ao frio, as latências de retirada da pata foram de $107 \pm 16\%$, $78 \pm 16\%$ e $110 \pm 15\%$ nos grupos LPNI + OEPA (100 mg/kg, i.g., 1x/dia), LPNI + OEPA (100 mg/kg, i.g., 2x/dia) e Sham + OEPA (100 mg/kg, i.g.), respectivamente (Fig. 19B). Dessa forma, é possível observar que o OEPA (100 mg/kg, i.g.), administrado uma ou duas vezes ao dia, foi capaz de reverter completamente a hiperalgisia térmica induzida pela LPNI aos estímulos quente e frio.

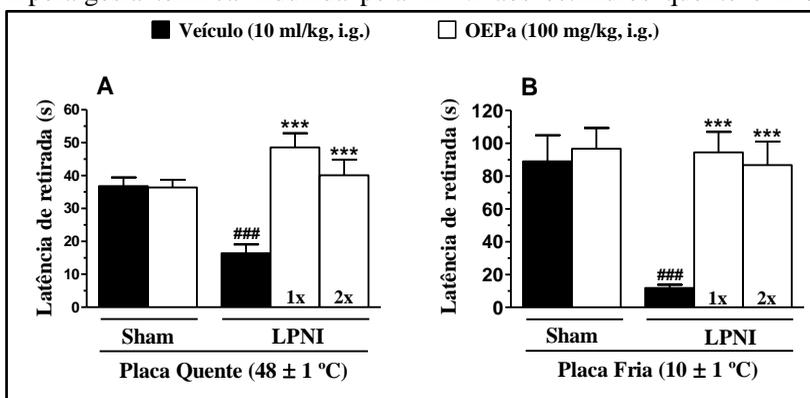


Figura 19. OEPA reduz hiperalgisia térmica no modelo animal de dor neuropática induzida pela LPNI. O tratamento com OEPA reduziu a hiperalgisia térmica ao calor (Painel A) e ao frio (Painel B), conforme avaliações realizadas no 10º e 11º dia após LPNI,

respectivamente. Cada coluna representa a média dos valores obtidos a partir de 8 animais e as linhas verticais indicam E.P.M. Os asteriscos (*) denotam os níveis de significância (** $P < 0,001$), quando comparado com o grupo LPNI+Veículo e as cerquilhas (#) indicam diferenças significativas (### $P < 0,001$), quando comparado com o grupo Sham+Veículo. A significância estatística foi determinada com ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni.

5.6 Avaliação da atividade locomotora

Os resultados apresentados na figura 20 mostram que o tratamento prolongado com o OEPA na dose de 100 mg/kg, i.g., administrado 1 ou 2x ao dia, não alterou a atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto, quando comparado ao grupo controle (veículo 10 ml/kg, i.g.), sugerindo que o OEPA não induz perda e/ou comprometimento das funções motoras.

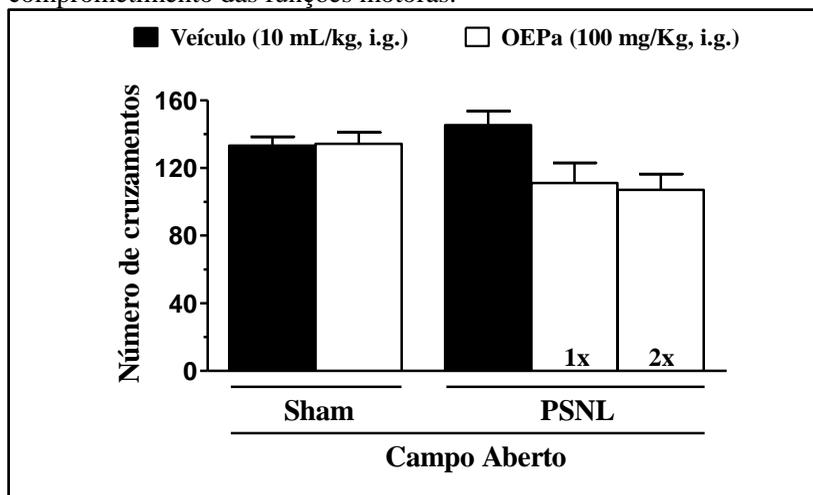


Figura 20. OEPA não altera a atividade locomotora de animais neuropáticos. O tratamento prolongado com o OEPA (100 mg/kg, i.g., 1 ou 2x ao dia) não afeta a atividade locomotora dos animais no teste de campo aberto, quando comparado aos animais que receberam somente veículo. Cada coluna representa a média dos valores obtidos a partir de 8 animais e as linhas verticais indicam E.P.M.

5.7 Efeito do OEPA sobre marcadores de lesão hepática e renal

Para investigar se o tratamento prolongado com OEPA (100 mg/kg, i.g.) promoveu efeito danoso em algum órgão, no 19º dia após a LPNI, foi feita a coleta de soro plasmático para análise bioquímica, onde foram avaliadas as atividades de enzimas e metabólitos utilizados como

marcadores de função hepática e renal (Tabela 3). Além disso, também foi realizada análise macroscópica (forma, cor e textura) de órgãos como fígado, coração, rim, pulmão, baço e linfonodo mesentérico dos animais com LPNI tratados com OEPA ou veículo. Na tabela 2, os dados mostram que o tratamento com OEPA (100 mg/kg, i.g.), administrado 1 ou 2 vezes ao dia, não alterou os parâmetros bioquímicos ou macroscópicos dos órgãos, quando comparados com os animais que receberam somente veículo (10 ml/kg, i.g.). Os níveis séricos dos indicadores de lesão hepática (AST e ALT, U/L) e renal (creatinina, uréia e ácido úrico, mg/dL) não foram alterados de forma significativa pelo tratamento diário com o OEPA, quando comparados com os animais tratados apenas com veículo (Tabela 4). Entretanto, houve uma redução significativa dos níveis séricos de GGT nos animais tratados com o OEPA quando comparado com animais tratados com veículo (Tabela 2). Assim, estes dados demonstraram que o OEPA não induziu perda e/ou comprometimento das funções dos órgãos avaliados.

Tabela 3. Efeito do óleo essencial de *Piper aleyreanum* sobre marcadores de função hepática e renal de camundongos Swiss após LPNI.

Parâmetro	Naive	Veículo	<i>Piper aleyreanum</i> (mg/kg, i.g.)			
			100 (1x)	100 (2x)	Sham (1x)	Sham
AST (U/L)	54.23 ± 9.03	56.32 ± 3.64	57.67 ± 4.76	64.95 ± 7.58	53.26 ± 7.46	57.96 ± 7.72
ALT (U/L)	35.43 ± 9.09	42.66 ± 8.65	25.85 ± 4.22	24.89 ± 2.30	64.97 ± 12.69	42.36 ± 8.99
GGT (U/L)	95.97 ± 5.06	96.23 ± 5.50	17.62 ± 4.51	*** 31.43 ± 11.51 ***	66.41 ± 3.72	* 109.70 ± 7.66
Creatinina (mg/dL)	2.01 ± 0.38	1.37 ± 0.22	2.92 ± 0.46	2.19 ± 0.70	2.60 ± 0.22	2.16 ± 0.65
Uréia (mg/dL)	26.84 ± 0.94	27.97 ± 1.99	22.79 ± 2.08	25.98 ± 2.40	23.98 ± 1.77	34.61 ± 2.73
Ác. úrico (mg/dL)	2.12 ± 0.29	2.79 ± 0.37	2.55 ± 0.26	3.01 ± 0.56	2.95 ± 0.53	2.91 ± 0.54

Valores médios de 8 animais representam a média ± E.P.M. ***p < 0.001 vs grupo controle (LPNI + veículo). ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni.

5.8 Efeito do OEPA na hipersensibilidade mecânica induzida pela incisão plantar

5.8.1 Hipersensibilidade mecânica (incisão plantar)

Com base nos dados obtidos nos experimentos anteriores, foi utilizado o modelo de incisão plantar, um modelo que mimetiza a dor pós-

operatória, para avaliar a ação do OEPA sobre a hiperalgesia, bem como investigar a ação do tratamento sobre células do sistema imune e sobre a expressão de canais TRPA1.

A incisão plantar foi caracterizada por intensa hiperalgesia mecânica nos animais submetidos ao procedimento cirúrgico, a qual foi observada pelo aumento na frequência de resposta e pela redução do limiar mecânico, frente à aplicação do filamento von Frey (0,16–2g) na pata ipsilateral a lesão. Uma hora após a realização do procedimento cirúrgico os animais foram submetidos a avaliação da hipersensibilidade mecânica e, em seguida, tratados para avaliar a ação decurso-temporal do tratamento OEPA (100 mg/kg) pela via intragástrica (Figs. 21 e 22) e intraperitoneal (Figs. 23 e 24).

Quando camundongos machos foram tratados com o OEPA (100 mg/kg) pela via i.g. não apresentaram redução significativa na frequência de resposta nem reestabelecimento do limiar mecânico (Fig. 21). Já nas fêmeas, apesar de não ter havido diferença significativa no limiar mecânico, apresentaram diferenças significativas na frequência de resposta do 2º ao 5º dia de tratamento, com reduções de $50 \pm 11\%$ a $63 \pm 17\%$ (Fig. 22D).

Quando os animais foram tratados pela via i.p., tanto machos quanto fêmeas exibiram reduções significativas da hiperalgesia e alodínia nas avaliações de decurso temporal, realizada cerca de 2 horas após ao procedimento cirúrgico (Figs. 23 e 24). Como pode ser observado na figura 23, o tratamento dos camundongos machos com OEPA (100 mg/kg, i.p.) aumentou o limiar dos animais em $93 \pm 8\%$ e $42 \pm 9\%$ em relação ao grupo controle, 30 e 60 minutos, respectivamente, após o tratamento (Fig. 23A). O tratamento também foi eficaz em reduzir a frequência de resposta em $87 \pm 5\%$ e $47 \pm 9\%$, 30 e 60 minutos, respectivamente, após o tratamento (Fig. 23B). Nos dias seguintes à lesão, os animais foram igualmente tratados com OEPA (100 mg/kg, i.p.) e avaliados 1h após o tratamento e se manteve eficaz em reduzir tanto a alodínia, com reestabelecimento do limiar variando de $50 \pm 7\%$ a $87 \pm 8\%$ (Fig. 23C), quanto a hiperalgesia, com redução da frequência de resposta entre $59 \pm 5\%$ e $84 \pm 5\%$ (Fig. 23D).

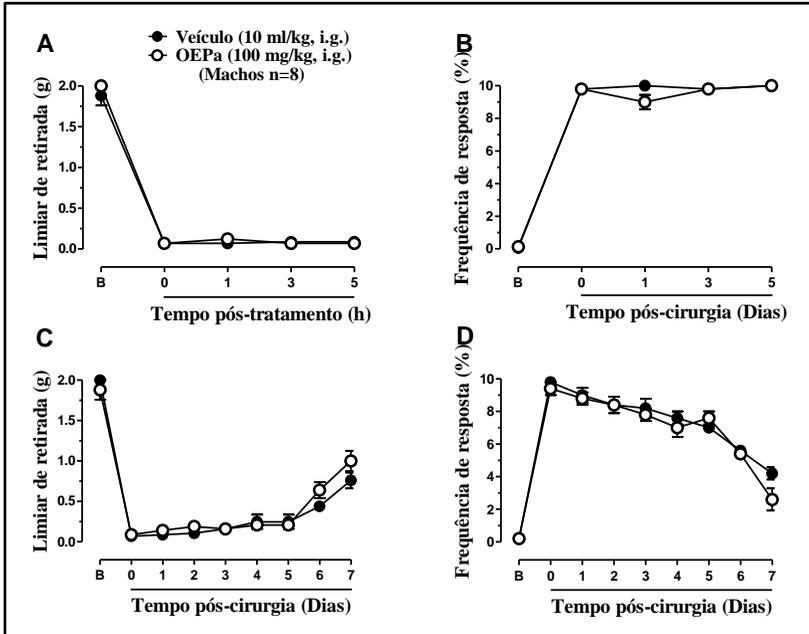


Figura 21. Efeito do OEPA (pela via intragástrica) na hipersensibilidade causada pela incisão plantar. Camundongos C57BL/6 (machos) foram tratados com o OEPA (100 mg/kg, i.g.) ou veículo (10 ml/kg, i.g.) 2 horas após a realização do procedimento cirúrgico (Painéis A e B) ou diariamente do 1º ao 7º após a lesão (painéis C e D). A alodínia (Painéis A e C) e a hiperalgesia mecânica (Painéis B e D) foram avaliadas 1h após administração de cada tratamento. Cada coluna representa a média de 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. B: resposta basal.

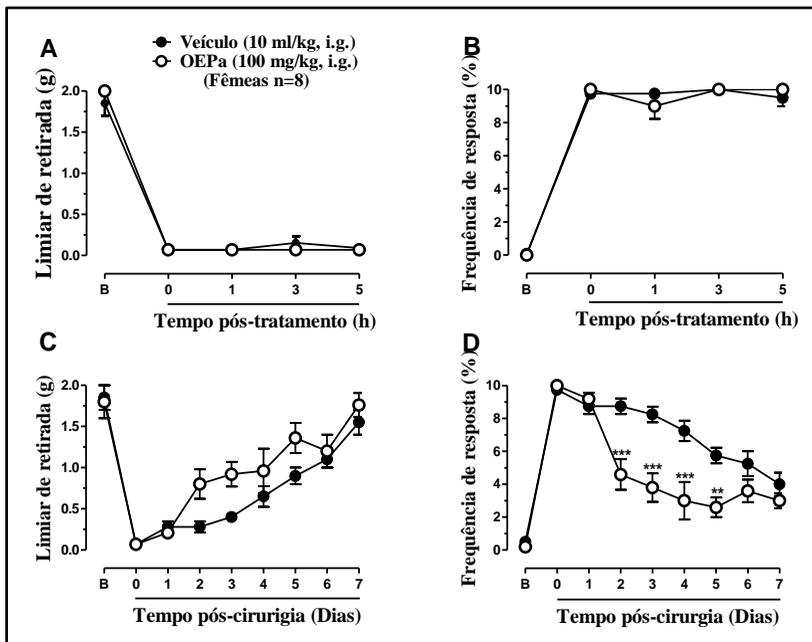


Figura 22. Efeito do OEPA (pela via intragástrica) na hipersensibilidade causada pela incisão plantar. Camundongos C57BL/6 (fêmeas) foram tratados com o OEPA (100 mg/kg, i.g.) ou veículo (10 ml/kg, i.g.) 2 horas após a realização do procedimento cirúrgico (Painéis A e B) ou diariamente do 1º ao 7º após a lesão (painéis C e D). A alodínia (Painéis A e C) e a hiperalgesia mecânica (Painéis B e D) foram avaliadas 1h após administração de cada tratamento. Cada coluna representa a média de 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os asteriscos (*) denotam os níveis de significância, quando comparado com o grupo controle (**P<0,01 e ***P<0,001). A significância estatística foi determinada com ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni. B: resposta basal.

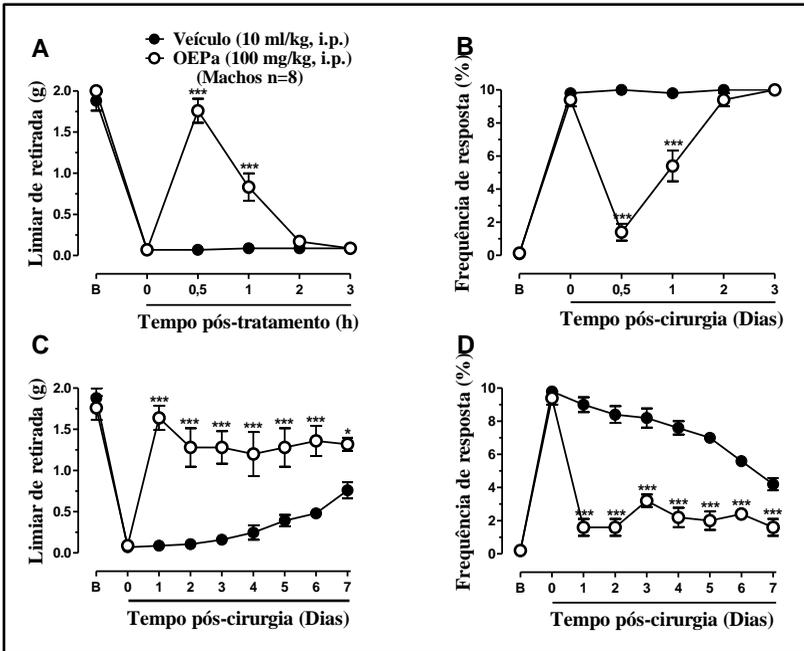


Figura 23. Efeito do OEPa (pela via intraperitoneal) na hipersensibilidade causada pela incisão plantar. Camundongos C57BL/6 (machos) foram tratados com o OEPa (100 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.) 2 horas após a realização do procedimento cirúrgico (Painéis A e B) ou diariamente do 1º ao 7º após a lesão (painéis C e D). A alodínia (Painéis A e C) e a hiperalgesia mecânica (Painéis B e D) foram avaliadas 1h após administração de cada tratamento. Cada coluna representa a média de 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os asteriscos (*) denotam os níveis de significância, quando comparado com o grupo controle (* $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$). A significância estatística foi determinada com ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni. B: resposta basal.

A figura 24 mostra que o tratamento dos camundongos fêmeas com OEPa (100 mg/kg, i.p.), foi semelhante ao tratamento dos machos, e aumentou o limiar dos animais para $71 \pm 10\%$ e $56 \pm 8\%$ em relação ao grupo controle, 30 e 60 minutos, respectivamente, após o tratamento (Fig. 24A). O tratamento também foi eficaz em reduzir a frequência de resposta em $93 \pm 1\%$ e $77 \pm 8\%$, 30 e 60 minutos, respectivamente, após o tratamento (Fig. 24B). Nos dias seguintes à lesão, os animais foram igualmente tratados e avaliados 1h após o tratamento com o OEPa (100 mg/kg, i.p.), o qual manteve-se eficaz em reduzir tanto a alodínia, com reestabelecimento do limiar variando de $52 \pm 7\%$ a $87 \pm 8\%$ (Fig. 24C), quanto a hiperalgesia, com redução da frequência de resposta entre $67 \pm 14\%$ e $89 \pm 7\%$ (Fig. 24D).

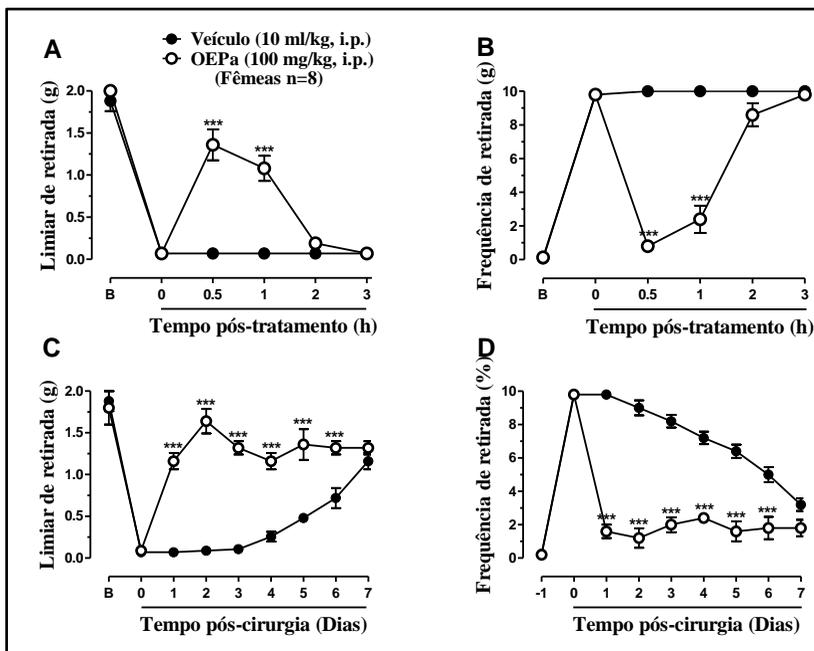


Figura 24. Efeito do OEPA (pela via intraperitoneal) na hipersensibilidade causada pela incisão plantar. Camundongos C57BL/6 (fêmeas) foram tratados com o OEPA (100 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.) 2 horas após a realização do procedimento cirúrgico (Painéis A e B) ou diariamente do 1º ao 7º após a lesão (painéis C e D). A hiperalgesia e alodínia mecânica foram avaliadas 1h após administração de cada tratamento. Cada coluna representa a média de 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os asteriscos (*) denotam os níveis de significância, quando comparado com o grupo controle (***) $P < 0,001$). A significância estatística foi determinada com ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni. B: resposta basal.

5.8.2 Expressão gênica de canais TRPA1 (incisão plantar)

Para verificar se o tratamento com OEPA (100 mg/kg, i.p.) causa alteração da expressão de canais TRPA1, foi realizada análise da expressão relativa de mRNA do gene que codifica o canal TRPA1. Para isso foram coletados tecidos periféricos (pata) e centrais (gânglios das raízes dorsais – L4-L6), 7 dias após a cirurgia de incisão plantar. Os resultados apresentados na figura 25 mostram que o procedimento cirúrgico aumentou cerca de 100 vezes a expressão destes receptores na pata, sem que, no entanto, fossem observadas diferenças significativas da expressão nos gânglios. Além disso, o OEPA (100 mg/kg, i.p.) não afetou de forma significativa a expressão destes canais na pata ou nos gânglios nos animais que receberam tratamento.

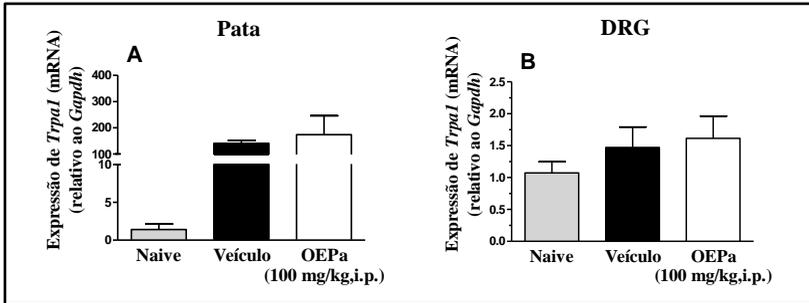


Figura 25. OEPA não altera a expressão periférica ou central de canais TRPA1 no modelo de incisão plantar. O tratamento prolongado com o OEPA (100 mg/kg, i.p.) não altera a expressão de canais TRPA1 na pata (Painel A) ou nos gânglios das raízes dorsais (L4-L6) ipsilateral a lesão (Painel B). Cada coluna representa a média dos valores obtidos a partir de 8 animais e as linhas verticais indicam E.P.M.

5.8.3 Migração de células do sistema imune (incisão plantar)

Para verificar se o tratamento com OEPA (100 mg/kg) administrado pela via intragástrica (i.g.) ou intraperitoneal (i.p.) altera o perfil do infiltrado celular inflamatório, foram realizados experimentos de citometria de fluxo 2 dias após a incisão plantar de camundongos C57BL/6. Os resultados mostram que o tratamento dos animais com OEPA (100 mg/kg) pela via intragástrica não afeta a migração celular (Figs. 26-29), porém, quando administrado pela via intraperitoneal reduziu de forma significativa a migração de leucócitos ($13 \pm 3\%$) (Fig. 27), especificamente nas populações de macrófagos ($72 \pm 7\%$) (Fig. 28) e neutrófilos ($37 \pm 6\%$) (Fig. 29).

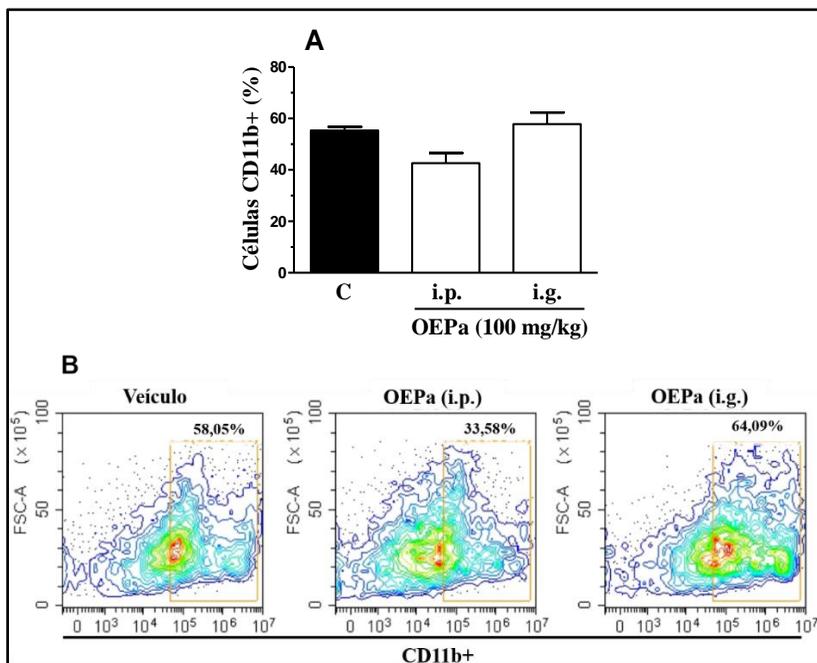


Figura 26. Efeito do OEPA na migração de células mielóides no modelo de incisão plantar. O painel A mostra a representação gráfica da frequência de células mielóides (células CD11b⁺) na pata de camundongos 2 dias após a incisão plantar. O painel B mostra o *dotplot* representativo da migração de células mielóides para o tecido lesionado.

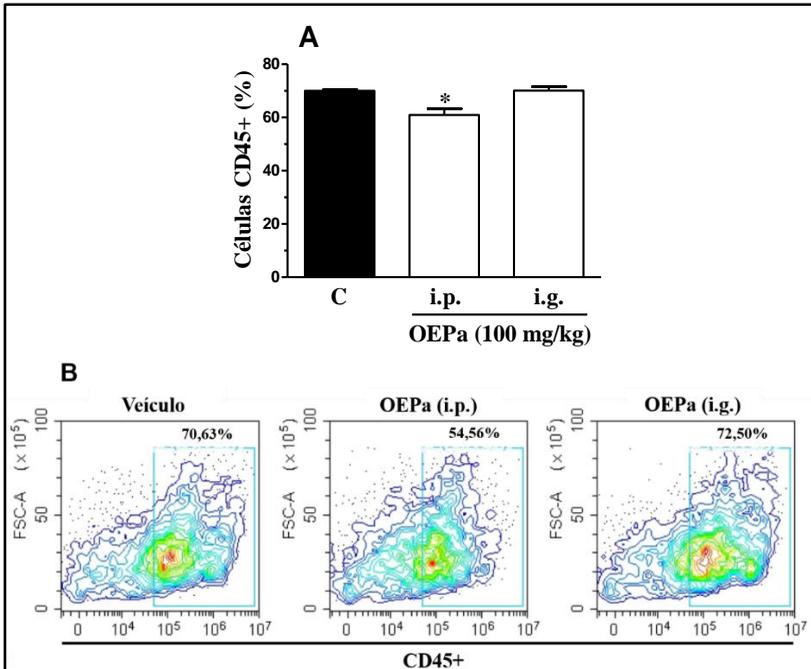


Figura 27. Efeito do OEPA na migração de leucócitos no modelo de incisão plantar. Os painéis A e B mostram a representação gráfica da frequência e o *dotplot* representativo, respectivamente, da migração de leucócitos (células CD45⁺) na pata de camundongos 2 dias após a incisão plantar. Os asteriscos denotam os níveis de significância, quando comparado com o grupo controle (*P<0,05). A significância estatística foi determinada com ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni.

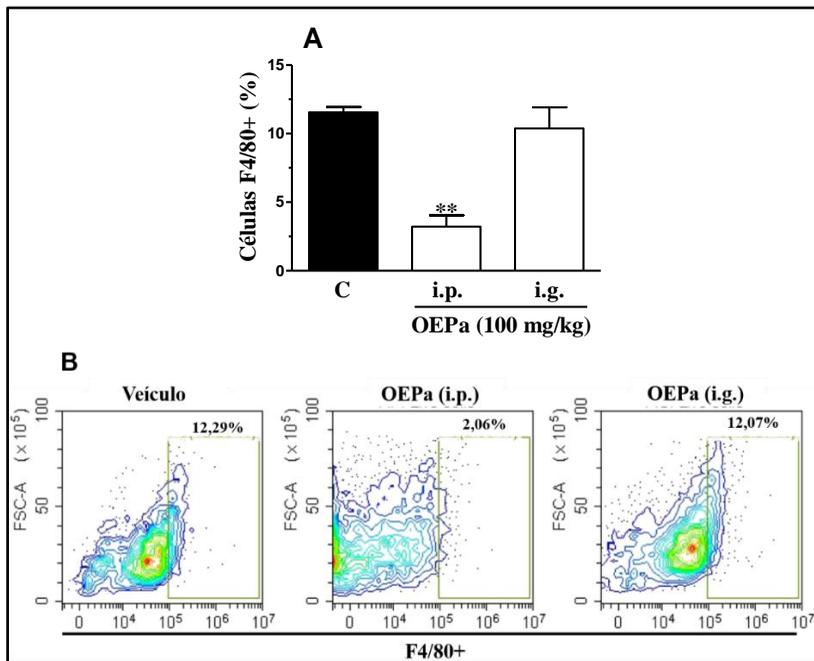


Figura 28. Efeito do OEPa na migração de macrófagos no modelo de incisão plantar. Os painéis A e B mostram a representação gráfica da frequência e o *dotplot* representativo, respectivamente, da migração de macrófagos (células F4/80⁺) na pata de camundongos 2 dias após a incisão plantar. Os asteriscos denotam os níveis de significância, quando comparado com o grupo controle (**P<0,01). A significância estatística foi determinada com ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni.

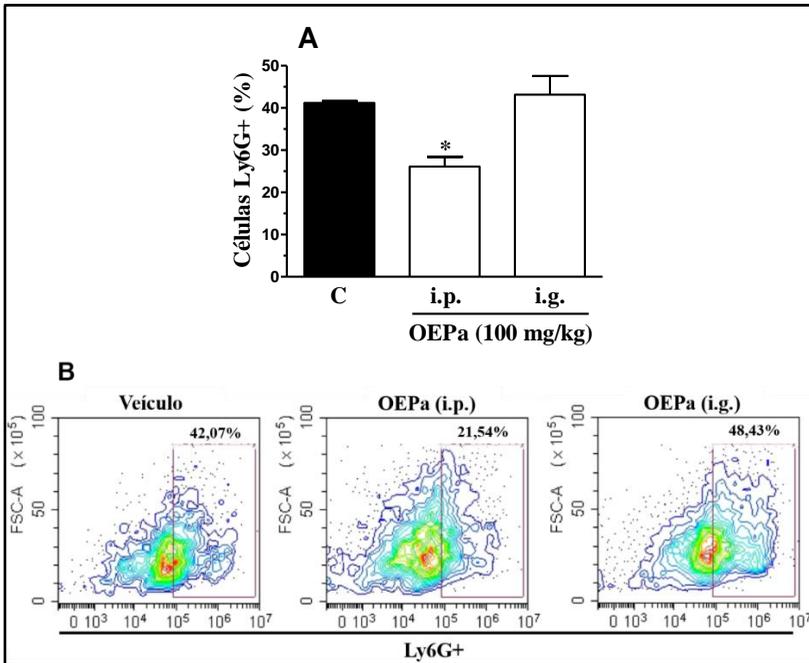


Figura 29. Efeito do OEPA na migração de neutrófilos no modelo de incisão plantar. Os painéis A e B mostram a representação gráfica da frequência e o *dotplot* representativo, respectivamente, da migração de neutrófilos (células Ly6G⁺) na pata de camundongos 2 dias após a incisão plantar. Os asteriscos denotam os níveis de significância, quando comparado com o grupo controle (*P<0,05). A significância estatística foi determinada com ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni.

5.9 Efeito do OEPA na nocicepção espontânea induzida pelo óleo de mostarda

Os resultados apresentados na figura 30 demonstram que o OEPA (100 mg/kg, i.p.), foi capaz de inibir significativamente a nocicepção causada pela administração intraplantar de óleo de mostarda (1%), em animais C57BL/6 de ambos os sexos quando comparados com seus respectivos grupos controle. Nos animais machos a inibição foi de $72 \pm 9\%$, ao passo que nas fêmeas essa inibição foi de $97 \pm 2\%$. Além disso, é possível observar que houve diferença significativa de maneira dependente do sexo, sendo mais pronunciado o efeito do tratamento nas fêmeas.

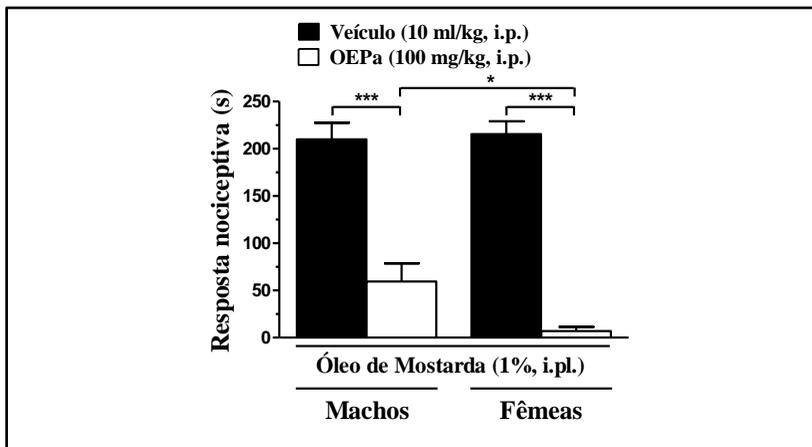


Figura 30. OEPa reduz a resposta nociceptiva provocada pela injeção intraplantar do óleo de mostarda, um agonista TRPA1. Camundongos C57BL/6 de ambos os sexos foram tratados com o OEPa (100 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.) e o comportamento nociceptivo foi avaliado após a administração intraplantar de óleo de mostarda (1%). Cada coluna representa a média de 5 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os asteriscos (*) denotam os níveis de significância, quando comparado com o grupo controle (* $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$), ou entre os grupos tratados (machos e fêmeas). A significância estatística foi determinada com Teste-t de Student.

5.10 Efeito do OEPa na nocicepção espontânea induzida pela administração intraplantar de isotiocianato de alila (AITC)

Os resultados apresentados na figura 31 mostram o efeito do OEPa na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de isotiocianato de alila (AITC). Camundongos C57BL/6 de ambos os sexos foram tratados com OEPa (10-1000 mg/kg) ou veículo (10 ml/kg), pela via intraperitoneal (i.p.) ou intragástrica (i.g.), 30 e 60 min. antes, respectivamente, da administração intraplantar de AITC (0,1%). Como mostrado nos painéis A e B, o tratamento dos animais (machos e fêmeas) com OEPa pela via i.g. foi efetivo apenas nas doses de 300 e 1000 mg/kg, com inibições de $90 \pm 13\%$ e 100% (machos) e $67 \pm 9\%$ e $89 \pm 5\%$ (fêmeas), respectivamente. Com base nos resultados obtidos, foram calculadas as respectivas doses inibitórias de 50% (DI₅₀) para machos - DI₅₀= 200 mg/kg (142-282) e fêmeas - DI₅₀=238 mg/kg (174-324). Quando os animais foram tratados com o OEPa pela via i.p. foi possível observar redução significativa da nocicepção apenas nas doses de 30 e 100 mg/kg, com inibições de $69 \pm 7\%$ e 100% (machos) e $38 \pm 8\%$ e $91 \pm 12\%$ (fêmeas), respectivamente. As doses inibitórias de 50% foram de

24 mg/kg (18,58-31,08), nos machos e 36,09 mg/kg (25,5-51,0), nas fêmeas. A dose de 100 mg/kg, administrada pela via i.g, assim como sua dose equivalente de 10 mg/kg, administrada pela via i.p., não apresentaram nenhum efeito em machos ou fêmeas.

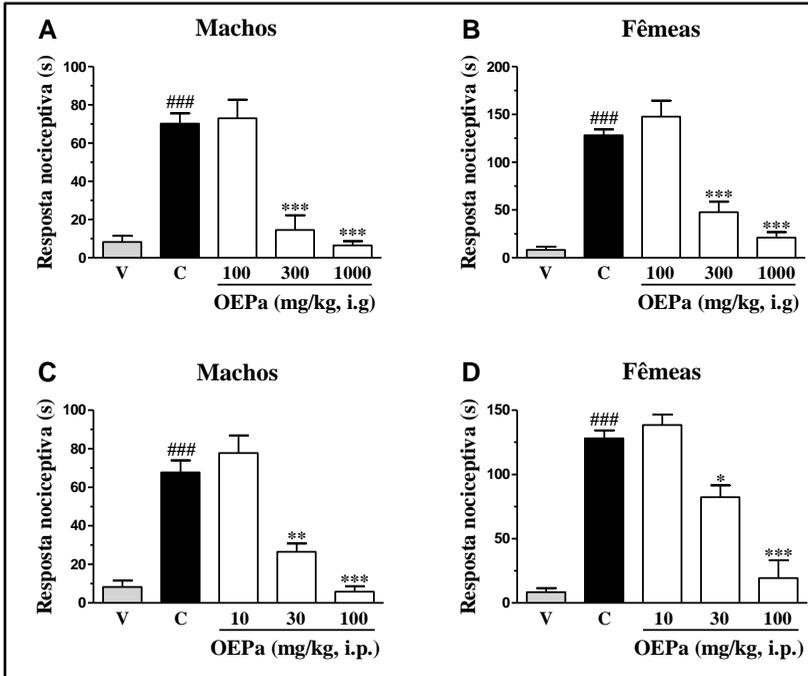


Figura 31. OEPa reduz a resposta nociceptiva provocada pela injeção intraplantar de isotiocianato de alila (AITC), um agonista TRPA1. Camundongos C57BL/6 machos (painéis A e B) e fêmeas (painéis C e D) foram tratados com o OEPa (10-1000 mg/kg) ou veículo (10 ml/kg) pelas vias intragástrica (i.g.) ou intraperitoneal (i.p.) e o comportamento nociceptivo foi avaliado após a administração intraplantar de isotiocianato de alila (AITC). Cada coluna representa a média de 5 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os asteriscos (*) denotam os níveis de significância, quando comparado com o grupo controle (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$) e as cerquilhas (#) indicam diferenças significativas (### $P < 0,001$), quando comparado com o grupo veículo. A significância estatística foi determinada com ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni.

5.11 Efeito do OEPa no edema induzido pela administração intraplantar de isotiocianato de alila (AITC)

Os resultados apresentados na figura 32 mostram o efeito do OEPa na atividade edematogênica causada pela injeção intraplantar de isotiocianato de alila (AITC). Camundongos C57BL/6 de ambos os sexos

foram tratados com OEPa (10-1000 mg/kg) ou veículo (10 ml/kg), pela via intraperitoneal (i.p.) ou intragástrica (i.g.), 30 e 60 min. antes, respectivamente, da administração intraplantar de AITC (0,1%). Como mostrado nos painéis A e B, nenhuma das doses foi efetiva em reduzir o edema dos animais (machos e fêmeas) com o tratamento do OEPa administrado pela via intragástrica. Por outro lado, quando os animais foram tratados com o OEPa pela via intraperitoneal, houve diminuição significativa do edema na dose de 100 mg/kg, com reduções de 100% tanto nos animais machos quanto nas fêmeas.

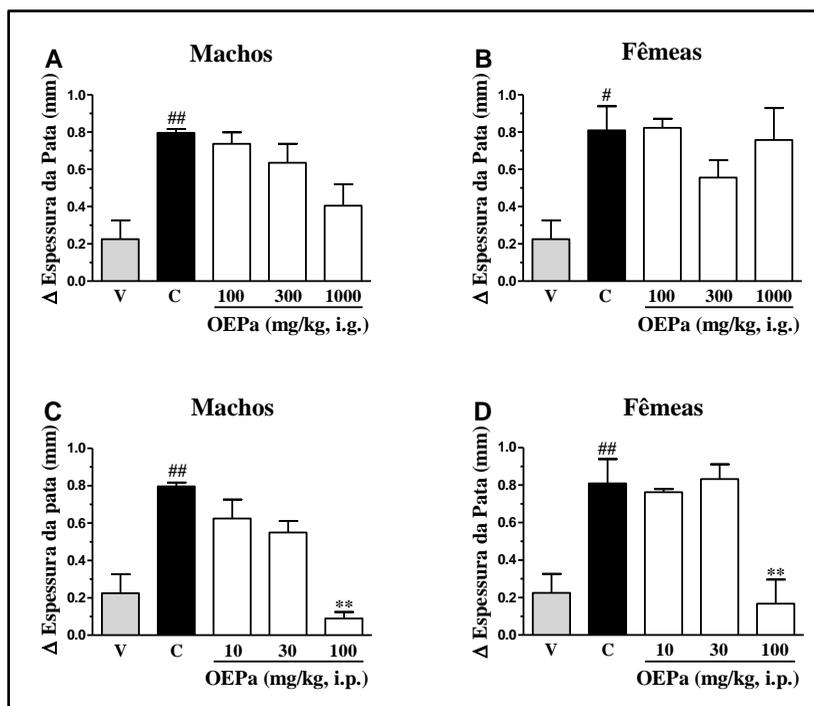


Figura 32. OEPa reduz edema provocado pela injeção intraplantar de isotiocianato de alila. Camundongos C57BL/6 machos (painéis A e B) e fêmeas (painéis C e D) foram tratados com o OEPa (10-1000 mg/kg) ou veículo (10 ml/kg) pelas vias intragástrica (i.g.) ou intraperitoneal (i.p.) e o edema foi mensurado 30 min. após a administração intraplantar de isotiocianato de alila (AITC). Cada coluna representa a média de 5 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os asteriscos (*) denotam os níveis de significância, quando comparado com o grupo controle (**P<0,01) e as cerquilhas (#) indicam diferenças significativas quando comparado com o grupo veículo (#P<0,05 e ##P<0,01). A significância estatística foi determinada com ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni.

5.12 Nociceção induzida pela administração intraplantar de OEPA

Para verificar se o OEPA seria capaz de causar efeito nociceptivo *per se* foi realizada uma curva dose-resposta pelo período de 60 minutos, contabilizando-se o comportamento nociceptivo (lambida e/ou mordida da pata) em intervalos de cada 5 minutos (Dados não mostrados). Com base nos dados obtidos, foi possível observar que o OEPA (nas doses de 30 e 100 $\mu\text{g/pata}$) apresentou efeito nociceptivo, com maior significância da resposta no intervalo de 10 minutos após sua administração. Assim, as doses de 30 e 100 $\mu\text{g/pata}$ foram consideradas algogênicas, ao passo que as doses de 0,1-10 $\mu\text{g/pata}$ não apresentaram diferenças significativas do grupo controle, e portanto, foram consideradas doses não-algogênicas, como mostra a figura 33.

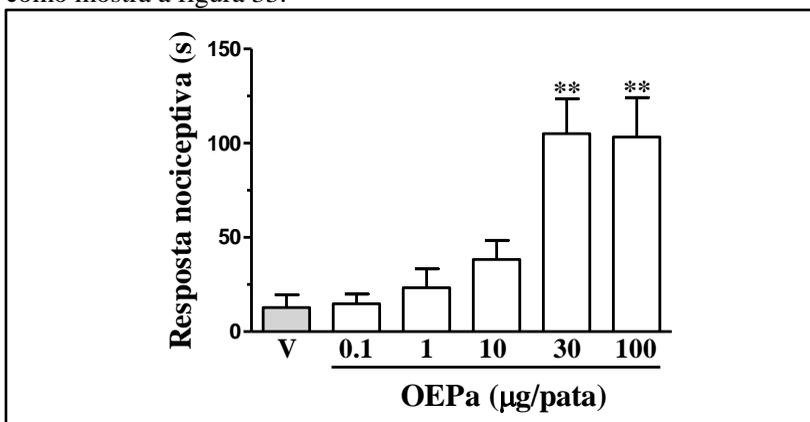


Figura 33. Curva dose-resposta da ação nociceptiva provocada pela injeção intraplantar de OEPA. Camundongos Swiss (fêmeas) foram tratados com o OEPA (0,1-100 $\mu\text{g/pata}$) ou veículo (20 $\mu\text{l/pata}$) e o comportamento nociceptivo foi avaliado por 10 minutos após a administração intraplantar de OEPA. Cada coluna representa a média de 4 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os asteriscos (*) denotam os níveis de significância, quando comparado com o grupo veículo (** $P < 0,01$). A significância estatística foi determinada com ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni.

5.13 Envolvimento do OEPA com canais TRPA1

Para demonstrar que o efeito antinociceptivo do OEPA está envolvido com canais TRPA1, estratégias farmacológicas foram utilizadas para evidenciar esta hipótese. Primeiramente, as doses de 1 e 10 $\mu\text{g/pata}$ foram utilizadas para investigar a ação local do OEPA na nociceção causada pelos agonistas dos canais TRPV1 (capsaicina) e TRPA1 (AITC), figura 34, painéis A e B, respectivamente. Em seguida,

o OEPA (30 $\mu\text{g/pata}$) foi utilizado como agente algogênico e os antagonistas dos canais TRPV1 (capsazepina) e TRPA1 (HC-030031) foram utilizados para demonstrar a seletividade do tratamento (Fig. 34C). Os dados mostram que nenhuma das doses utilizadas foi capaz de reduzir a nocicepção causada pela capsaicina (Fig. 34A). Porém, quando o AITC foi utilizado como agente algogênico, o tratamento com OEPA (10 $\mu\text{g/pata}$), reverteu de forma significativa este efeito, com inibição de $89 \pm 18\%$ (Fig. 34B). Além disso, quando o OEPA foi empregado como agente nociceptivo, apenas o antagonista do canal TRPA1 (HC-030031) foi capaz de reduzir a nocicepção induzida, com inibição de $70 \pm 1\%$ (Fig. 34C). Em conjunto, esses dados demonstram o envolvimento do OEPA com os canais TRPA1.

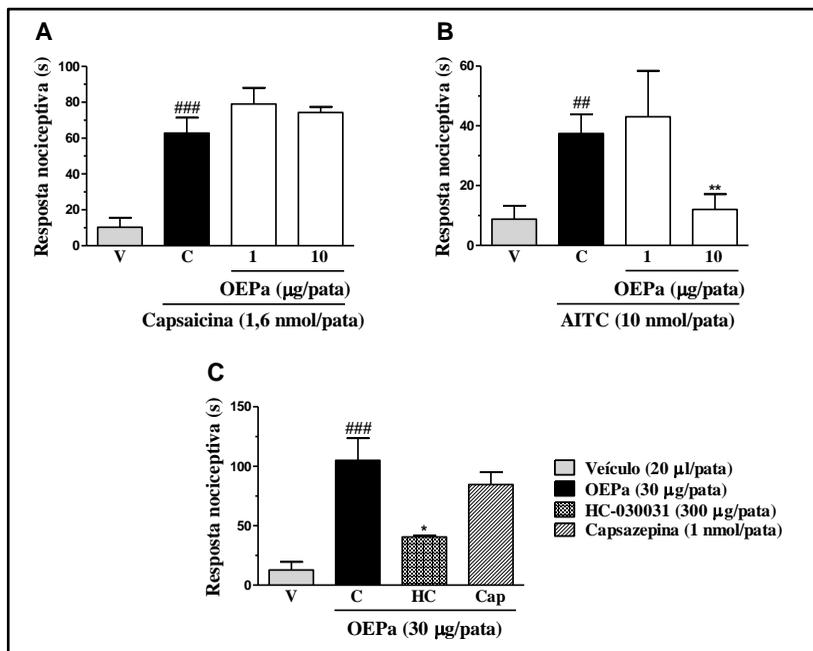


Figura 34. Evidências farmacológicas do envolvimento do OEPA com canais TRPA1. Camundongos Swiss (fêmeas) foram tratados com OEPA (1-10 $\mu\text{g/pata}$), capsazepina (antagonista TRPV1 – 1 nmol/pata), HC-030031 (antagonista TRPA1 – 300 $\mu\text{g/pata}$) ou veículo (20 $\mu\text{l/pata}$) 10 minutos antes da administração intraplantar de capsaicina – 1,6 nmol/pata (painel A), AITC – 10 nmol/pata (painel B) ou OEPA – 30 $\mu\text{g/pata}$ (painel C). Cada coluna representa a média de 4 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os asteriscos (*) denotam os níveis de significância, quando comparado com o grupo controle (OEPA + veículo) (* $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$). As cerquilhas (#) indicam diferenças significativas do grupo controle, quando comparado com o grupo veículo (### $P < 0,001$ e ### $P < 0,01$). A significância estatística foi determinada com ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni.

5.14 Efeito do OEPA na nociceção espontânea induzida pelo composto 48/80 e histamina

Os resultados apresentados na figura 35 mostram que o OEPA (100 mg/kg, i.p.), foi capaz de reduzir significativamente a nociceção causada pela administração intraplantar do composto 48/80 (10 µg/pata), um ativador de mastócitos, com inibição de $98 \pm 1\%$ (Fig. 35A). Além disso, o tratamento também foi efetivo em reduzir a nociceção causada pela administração intraplantar da histamina (100 nmol/pata), um dos produtos liberados pela degranulação de mastócitos, com inibição de $97 \pm 2\%$ (Fig. 35B).

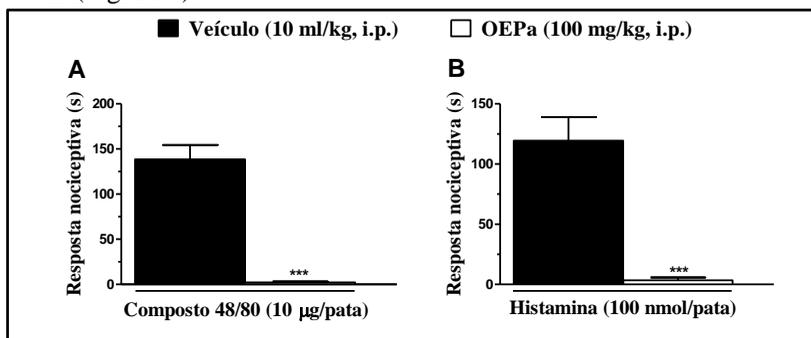


Figura 35. OEPA reduz a resposta nociceptiva provocada pela injeção intraplantar do composto 48/80 e da histamina. Camundongos Swiss (fêmeas) foram tratados com o OEPA (100 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.) e o comportamento nociceptivo foi avaliado após a administração intraplantar do composto 48/80 (10 µg/pata) e histamina (100 nmol/pata). Cada coluna representa a média de 5 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os asteriscos (*) denotam o nível de significância, quando comparado com o grupo controle (***) $P < 0,001$). A significância estatística foi determinada com Teste-t de Student.

5.15 Efeito do OEPA sobre a viabilidade celular pelo método azul de tripan

Para investigar o possível efeito tóxico do OEPA sobre monócitos humanos da linhagem THP-1, foi realizada uma curva dose-resposta nas concentrações de 0,1 – 0,001%. A viabilidade celular foi avaliada através do método azul de tripan e o óleo mineral foi utilizado como controle negativo, uma vez que não possui efeito nas células e concentrações utilizadas (dados prévios). Como mostra a figura 36, nenhuma das concentrações do OEPA empregadas causou efeito tóxico sobre as células

THP-1 e, portanto, foram utilizadas para a investigar a ação do tratamento com OEPA sobre a atividade do fator nuclear kappa B (NF-κB).

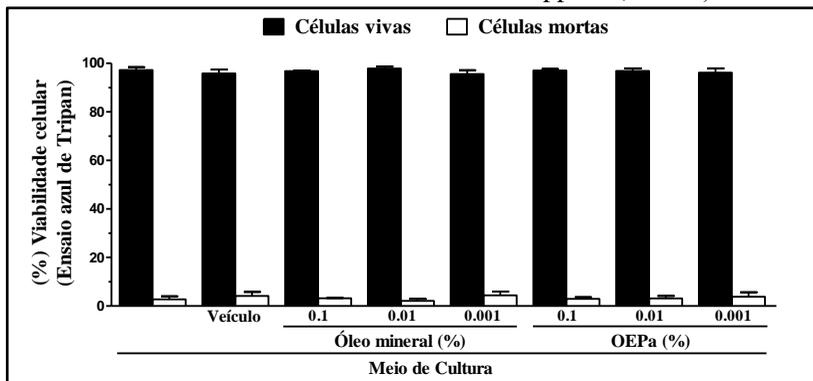


Figura 36. Curva dose-resposta do OEPA sobre a viabilidade de células THP-1. O gráfico mostra o efeito da viabilidade de células THP-1 antes e depois dos tratamentos realizados com veículo (álcool 5%), óleo mineral (0,1-0,001%) e OEPA (0,1-0,001%).

5.16 Efeito do OEPA sobre a atividade NF-κB

Para investigar se o efeito antinociceptivo do OEPA está envolvido com alterações na transcrição gênica, foi avaliada a atividade NF-κB em duas populações de células humanas da linhagem THP-1 XBlue: monócitos e macrófagos (células THP-1 XBlue previamente estimuladas com PMA). Para isso, as duas populações de células foram previamente tratadas com OEPA ou óleo mineral nas concentrações de 0,1 a 0,001%, e em seguida, foi realizado o desafio com LPS, um ativador da via NF-κB. Como mostra a figura 37, nenhuma atividade intrínseca é observada antes do desafio com LPS (100 ng/ml). Quando o LPS é adicionado ao meio, é induzida a atividade NF-κB das células, e nenhum efeito é observado pelo tratamento com óleo mineral. Contudo, a concentração de 0,1% do OEPA reduziu de forma significativa a atividade do NF-κB, com inibição de $88 \pm 1\%$ e $87 \pm 2\%$, para monócitos e macrófagos, respectivamente.

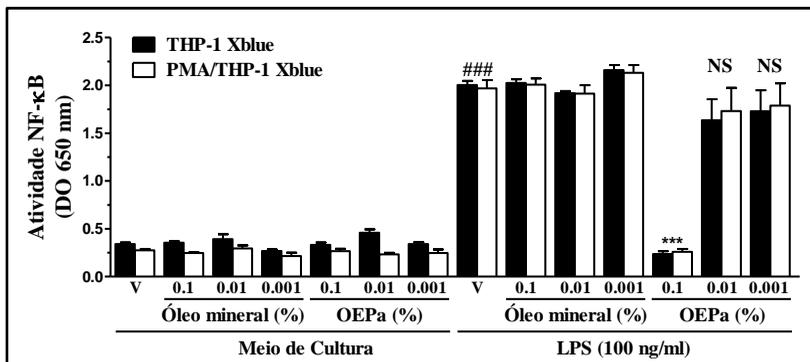


Figura 37. Efeito do OEPA na atividade do fator nuclear kappa B. O gráfico mostra o efeito da atividade NF-κB de células THP-1 Xblue antes e depois dos tratamentos com veículo (álcool 5%), óleo mineral (0,1-0,001%) e OEPA (0,1-0,001%). Os asteriscos (*) denotam os níveis de significância (** $P < 0,001$), quando comparado com o grupo veículo + LPS e as cerquilhas (#) indicam diferenças significativas (### $P < 0,001$), quando comparado com o grupo veículo. A significância estatística foi determinada com ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni.

5.17 Efeito do OEPA sobre a viabilidade celular por análise de citometria de fluxo

Para descartar a possibilidade de um resultado falso-positivo, foi realizado o ensaio de viabilidade celular por análise de citometria de fluxo, utilizando DRAQ7, um marcador de morte celular. Como mostra a figura 38, a concentração de 0,1% do OEPA provocou a morte de 75 a 80% das células (monócitos e macrófagos), respectivamente, antes do desafio com LPS. Nas concentrações de 0,01 e 0,001% não houve diferenças significativas quando comparadas com o grupo veículo. Portanto, a redução da atividade NF-κB provocada pela concentração de 0,1% pode ter sido causada pela morte prévia das células, sugerindo que o tratamento não possui efeito sobre a atividade do NF-κB.

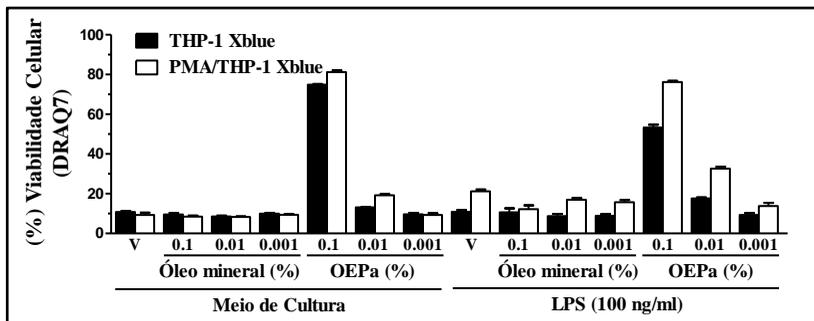


Figura 38. Efeito do OEPa sobre a viabilidade de células THP-1. O gráfico mostra o efeito da viabilidade de células THP-1 Xblue antes e depois dos tratamentos realizados com veículo (álcool 5%), óleo mineral (0,1-0,001%) e OEPa (0,1-0,001%).

6. DISCUSSÃO

É indiscutível que a dor possui um papel fisiológico de grande relevância, uma vez que é responsável por garantir a integridade física do organismo frente a estímulos potencialmente danosos. Contudo, a dor também pode representar um sintoma associado a diversos estados patológicos que, quando persistem, podem levar a quadros de dor crônica. Assim, a dor perde seu caráter protetor e torna-se uma condição patológica que afeta a capacidade produtiva e reduz drasticamente a qualidade de vida dos indivíduos acometidos.

Estudos mostram que somente nos Estados Unidos a dor crônica afeta 78 milhões de pessoas e pelo menos outros 75 milhões de europeus. Para muitos desses pacientes, a falta de controle da dor crônica está relacionada principalmente a tolerabilidade dos medicamentos, haja visto que seus efeitos colaterais são muitas vezes piores do que os sintomas da própria doença. Dessa forma, diversos institutos de saúde têm exposto a necessidade por medicamentos que sejam capazes de agir em múltiplos locais e, assim, possam ser mais eficazes no tratamento da dor crônica, dada a complexidade envolvida na transmissão neuronal (Pang *et al.*, 2012).

Nesse sentido, diversas pesquisas têm focado na busca por substâncias que demonstrem maior eficácia e menores efeitos adversos, de modo que possam ser empregados no tratamento e na prevenção do estabelecimento da persistência da dor. Assim, princípios ativos derivados de plantas constituem alvos atraentes, uma vez que representam uma rica fonte de compostos com enorme potencial para a descoberta de novos medicamentos (Harvey *et al.*, 2015).

Desse modo, partindo do potencial efeito antinociceptivo e anti-inflamatório de espécies do gênero *Piper*, aliado aos efeitos benéficos do uso popular e das ações já demonstradas para o óleo essencial da espécie *Piper aleyreanum*, o presente trabalho se propôs a investigar o potencial efeito farmacológico do óleo essencial de *Piper aleyreanum* em modelos de dor inflamatória (dor pós-operatória) e neuropática (lesão periférica do nervo), bem como o possível mecanismo de ação envolvido.

As primeiras abordagens realizadas foram de caráter fitoquímico, e teve como objetivo inicial caracterizar os constituintes químicos presentes no óleo essencial da planta. A análise do OEPa por CG/MS identificou a presença de 42 compostos, os quais representam 95,6% do conteúdo total do óleo, que se distribuem na forma de mono (17,9%) e sesquiterpenos (77,6%).

Apesar de estudos anteriores já terem demonstrado que a composição química do óleo essencial desta espécie é constituída principalmente por compostos terpênicos (Facundo, 2005; Facundo *et al.*, 2007; Andrade *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2012; Da Silva *et al.*, 2014), esta é a primeira vez que é relatada a presença do sesquiterpeno *cis*- β -guaiano no óleo essencial de *Piper aleyreanum*. Além disso, a quantidade desse composto foi superior as anteriormente relatadas para outros compostos majoritários do óleo essencial desta planta, cujos percentuais não excederam 20%, enquanto o *cis*- β -guaiano apresentou uma predominância de 29,36% do conteúdo total, o que representa cerca de 1/3 dos constituintes químicos presente no óleo essencial desta planta.

O sesquiterpeno *cis*- β -guaiano também pode ser encontrado em altas concentrações no óleo essencial de outras espécies como *Hypericum hircinum* (29,3%) (Quassinti *et al.*, 2013) e *Xanthium strumarium* (34,2%) (Sharifi-Rad *et al.*, 2015). Além disso, os efeitos antioxidante e anticarcinogênico (Quassinti *et al.*, 2013), bem como as atividades antibacteriana e antifúngica (Sharifi-Rad *et al.*, 2015) exercidas pelos óleos essenciais destas plantas, podem estar relacionados a presença deste composto.

Por outro lado, apesar da quantidade do sesquiterpeno *cis*- β -guaiano ser elevada no óleo essencial de algumas plantas, não existem estudos na literatura com o composto de forma isolada. Portanto, as atividades relatadas nestes estudos podem ser decorrentes da ação específica de uma substância ou do efeito sinérgico dos compostos que compõem o óleo essencial de cada planta. Evidências da interação sinérgica entre compostos terpênicos já foi demonstrada por estudos realizados por Singh e colaboradores (2012), que mostraram que a associação de canfeno com geraniol na proporção 1:1 é capaz de prevenir a hepatotoxicidade induzida por nimesulida.

Estudos realizados com o óleo essencial de *Piper aleyreanum* também já mostraram que os compostos terpênicos nele presentes são responsáveis pelas ações antinociceptiva e anti-inflamatória em roedores (Lima *et al.*, 2012). Da Silva e colaboradores (2014) mostraram ainda que os constituintes do OEPA exercem significativo efeito antioxidante e citotóxico contra células de melanoma humano. Além disso, também já foi demonstrado o OEPA inibe a nocicepção espontânea e reduz a hiperalgesia (mecânica e térmica) provocada pelo veneno da serpente *Bothrops jararaca* na pata de camundongos (Nascimento, 2014).

Estudos anteriores já haviam demonstrado que o OEPA é capaz de reduzir tanto a fase neurogênica (primeira fase) quanto a fase inflamatória (segunda fase) do teste da formalina (um modelo clássico de

investigação de fármacos com ação analgésica e anti-inflamatória), e que este efeito não tem envolvimento direto com o sistema opióide (Lima *et al.*, 2012). Portanto, a primeira estratégia farmacológica utilizada neste estudo foi investigar o envolvimento do OEPa com o sistema glutamatérgico, uma vez que os receptores ativados por esse neurotransmissor representam os principais alvos da neurotransmissão excitatória do SNC de mamíferos (Wallace *et al.*, 2012).

É bem estabelecido na literatura que a injeção intratecal de glutamato não só ativa os neurônios da medula espinal como também os sensibiliza, causando um comportamento de dor imediata que é observado em camundongos pelo ato de lambar e/ou morder a parte posterior do corpo (Baggio *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2011). No presente estudo, foi demonstrado que o tratamento pela via oral com OEPa reduziu de forma expressiva a resposta nociceptiva provocada pela injeção intratecal de glutamato, sugerindo que o sistema glutamatérgico está envolvido na ação antinociceptiva do OEPa.

Para investigar quais receptores estariam envolvidos na ação antinociceptiva do OEPa, foram realizadas administrações intratecais de agonistas dos receptores ionotrópicos (AMPA, cainato e NMDA) e metabotrópicos (trans-ACPD). Os resultados mostram que o tratamento oral com OEPa inibiu de forma seletiva receptores do tipo não-NMDA (AMPA e cainato), sem alterar a resposta provocada pelos agonistas de NMDA e trans-ACPD, indicando que o efeito do OEPa seja mediado, pelo menos em parte, pelo sistema glutamatérgico através dos receptores AMPA e cainato.

Esses resultados são grande relevância, uma vez que estes receptores estão envolvidos na transmissão excitatória rápida (através da modulação do processamento de estímulos nociceptivos), na plasticidade sináptica do SNC e no processo de sensibilização central em estados de dor persistente (Burnashev *et al.*, 1992; Hollmann *et al.*, 1994; Tao *et al.*, 2010). Além disso, já foi demonstrado que o bloqueio de receptores AMPA reduz o desenvolvimento de hiperalgesia térmica induzida por lesão nervosa (Mao *et al.*, 1992).

Ainda como investigação preliminar foi avaliado o efeito do OEPa sobre a ação de duas citocinas chave no processo de intensificação do processo nociceptivo, TNF- α e IL-1 β (Sachs *et al.*, 2002). Já foi demonstrado que ambas as citocinas aumentam as correntes excitatórias induzidas por AMPA e NMDA em lâminas superficiais de neurônios do corno dorsal da medula espinal, mostrando que estas citocinas desempenham um papel importante no aumento da transmissão sináptica

e da atividade neuronal (Kawasaki *et al.*, 2008). Estudos também demonstram que várias vias, diretas e indiretas, ligam citocinas pró-inflamatórias com nociceção e/ou hiperalgesia, fazendo com que essas proteínas sejam consideradas elementos chave na indução e manutenção da dor (Winkelstein *et al.*, 2001; Russell *et al.*, 2009).

Diversas evidências mostram ainda que o aumento da síntese e liberação de TNF- α e IL-1 β após ativação de células gliais (como astrócitos e micróglia) é fundamental para promover o estabelecimento e manutenção da dor neuropática. Além disso, quando são administrados antagonistas dos receptores destas citocinas, é possível observar redução da hiperalgesia causada pela lesão nervosa (Moalem e Tracey, 2006; Austin e Moalem-Taylor, 2010; Ji *et al.*, 2013; Tsuda *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2014). Os dados aqui apresentados mostram que o tratamento com OEPA também reduziu acentuadamente a nociceção causada pela injeção intratecal de IL-1 β , embora não tenha alterado o comportamento nociceptivo induzido pelo TNF- α , sugerindo que o efeito do OEPA seja mediado por interações com o receptor IL-1.

O passo seguinte foi investigar a ação do OEPA na nociceção induzida por agonistas de canais TRPs, haja visto que ambos estão envolvidos tanto na dor aguda (neurogênica) quanto na dor crônica (neuropática) (Salat e Filipek, 2015). Mais uma vez o tratamento com OEPA apresentou um caráter seletivo, reduzindo a resposta nociceptiva induzida pela administração intratecal de cinamaldeído (um agonista TRPA1), sem alterar a resposta induzida pela capsaicina (um agonista TRPV1). Assim, demonstra-se que o tratamento com OEPA desempenha ação antinociceptiva por atuar de forma seletiva sobre canais TRPA1.

Com base em estudos anteriores e nos resultados obtidos, o efeito antinociceptivo do OEPA pode ser atribuído, pelo menos em parte, ao bloqueio das ações exercidas por mediadores inflamatórios. Estes mediadores, incluindo, prostaglandinas, bradicinina, histamina, fatores de crescimento e citocinas pró-inflamatórias, também são liberados durante uma lesão periférica do nervo, onde contribuem para o desenvolvimento e manutenção da dor neuropática (Moalem e Tracey, 2006). Dessa forma, para investigar o efeito antinociceptivo adicional do OEPA, foi utilizado um modelo pré-clínico de neuropatia.

Foi observado que tanto a administração aguda quanto prolongada do OEPA reduziram significativamente a hiperalgesia mecânica induzida pela LPNI em camundongos, com ação por até 4h, quando tratados uma vez ao dia ou 8h quando tratado duas vezes ao dia, sendo que em ambos os casos demonstraram efeito significativo uma hora após a sua administração aguda. Esse efeito foi evidente não apenas

durante os dias de tratamento dos animais como também dias após a interrupção da sua administração, demonstrando que o OEPA é capaz de manter seu efeito de maneira cumulativa a partir do tratamento repetido. Além disso, quando o efeito do tratamento cumulativo foi perdido e os animais voltaram a sentir dor, o OEPA foi capaz de causar novamente redução expressiva da hiperalgesia, demonstrando, assim, que não induz tolerância pelo tratamento prolongado nem causa qualquer alteração sensorial dos animais.

Além da hiperalgesia mecânica, também foi avaliada a hiperalgesia térmica, uma vez que a hipersensibilidade aos estímulos térmicos é um sintoma bem caracterizado de dor inflamatória e neuropática tanto em humanos quanto em animais utilizados em modelos experimentais (Planells-Cases *et al.*, 2005; Irwin, 2011). Como demonstrado, o modelo de LPNI foi capaz de reduzir o tempo de latência da retirada da pata dos animais tanto no teste da placa quente (hiperalgesia ao calor) quanto no teste da placa fria (hiperalgesia ao frio). O tratamento com OEPA, por sua vez, novamente foi capaz de reduzir a hipersensibilidade à ambos os estímulos, reestabelecendo o limiar dos animais para valores semelhantes aos basais.

Atualmente é bem estabelecido que canais TRPs atuam como sensores de temperatura, sendo que os canais TRPA1 representam os principais transdutores de estímulos relacionados ao frio nocivo (Story *et al.*, 2003). Esses canais podem ser ativados por temperaturas abaixo de 17 °C (TRPA1) e quando sensibilizados, desempenham um importante papel no desenvolvimento de hipersensibilidade térmica e mecânica associada a condições patológicas (Bandell *et al.*, 2004; Eid *et al.*, 2008; Pinheiro *et al.*, 2015).

Por outro lado, apesar dos canais TRPA1 serem amplamente aceitos como receptores para uma gama de produtos irritantes, controvérsias referentes a sua percepção ao frio tem sido amplamente discutidas. Contudo, estudos recentes mostraram que este canal é um mediador chave da hipersensibilidade ao frio provocada por condições patológicas, como dor inflamatória e neuropática (Del Camino *et al.*, 2010).

Diversas abordagens já foram realizadas para demonstrar esse envolvimento, incluindo deleção genética (animais *knockout*) e antagonistas farmacológicos (HC-030031), mostrando que estes canais estão envolvidos com a hipersensibilidade térmica ao frio, tanto após uma inflamação aguda quanto após uma lesão nervosa (Clapham, 2002; Obata *et al.*, 2005; Kwan *et al.*, 2006; Koivisto *et al.*, 2014). Corroborando com

estes achados, também já foi demonstrado que o estímulo frio potencializa a ativação dos canais TRPA1 seguida da administração de isotiocianato de alila e 4-hidroxinonenal, reforçando que a hipersensibilidade provocada é mediada por TRPA1 em condições inflamatórias (Petrus *et al.*, 2007; Del Camino *et al.*, 2010; Da Costa *et al.*, 2010).

Os resultados aqui apresentados estão de acordo com dados da literatura e mostram que o tratamento com OEPA é capaz de reduzir a hiperalgia térmica ao frio em um modelo de dor neuropática. Desse modo, os resultados da LPNI reforçam os dados encontrados nos experimentos de nociceção aguda, indicando o possível envolvimento de canais TRPA1 no efeito antinociceptivo do OEPA.

Por outro lado, embora o limiar dos animais tenha sido reestabelecido pelo tratamento com o OEPA no teste da placa quente, não foram observadas diferenças significativas do comportamento nociceptivo induzido pela capsaicina (um agonista específico de canais TRPV1). Assim, parece que o efeito do tratamento com OEPA não envolve uma ação direta com canais TRPV1. Essas diferenças podem ser decorrentes do fato de que os canais TRPA1 são co-expressos com canais TRPV1, de modo que a ação do OEPA sobre os canais TRPA1 possam afetar indiretamente a ação dos canais TRPV1, haja visto que ambos os canais possuem uma relação sinérgica e/ou condicional na percepção de estímulos térmicos (Nozadze *et al.*, 2016). Outro ponto importante é que o OEPA pode exercer ação analgésica central, e portanto, ser responsável pelo aumento no tempo de resposta no teste da placa quente.

Para confirmar que as ações do tratamento com o OEPA não foram decorrentes de ações inespecíficas, foi realizada uma análise comportamental dos animais para verificar, além de analgesia, outros efeitos, como relaxamento muscular e sedação. Em ambas as situações, o comportamento do animal pode ser alterado e caracterizar um viés na proposta do estudo. Dessa forma, foi utilizado o teste de campo aberto para verificar se possíveis efeitos inespecíficos estariam relacionados ao tratamento com OEPA.

O teste de campo aberto é um teste bem caracterizado na literatura, que pode ser utilizado tanto na avaliação de efeitos inespecíficos sobre a atividade locomotora, como na avaliação de agentes farmacológicos com potencial ansiolítico (Choleris *et al.*, 2001). Os resultados apresentados mostram que o tratamento prolongado com OEPA, administrado uma ou duas vezes ao dia, não alterou a atividade locomotora dos animais. Assim, o OEPA parece não estar associado com qualquer efeito motor, uma vez que não afeta a capacidade ambulatoria

dos animais, demonstrando que os efeitos do OEPA não são decorrentes de ações inespecíficas.

Apesar das plantas medicinais apresentarem atividades biológicas benéficas aos humanos, o potencial tóxico dessas substâncias não deve ser descartado (Rosidah *et al.*, 2009; Almança *et al.*, 2011). Dessa forma, foi investigado o possível efeito tóxico decorrente do tratamento prolongado com OEPA em animais com neuropatia periférica. Entre um dos parâmetros bioquímicos foram analisados os níveis séricos das enzimas hepáticas AST, ALT e GGT. É bem estabelecido na literatura que o aumento dos níveis séricos dessas enzimas, como consequência de alteração da permeabilidade celular hepática, necrose ou lesão celular, representa um bom indicador de lesão causada no fígado (Upur *et al.*, 2009).

É válido ressaltar que ALT é considerada um indicador de hepatotoxicidade mais sensível, pois constitui uma enzima limitada ao fígado, enquanto AST pode ser encontrada em diversos tecidos, como coração, pulmão, músculo esquelético e rins, assim como a enzima GGT, que apesar de ser abundante nos hepatócitos, também é encontrada nos rins e no pâncreas (Al-Habori, 2002).

Assim, a análise dos parâmetros bioquímicos mostrou que os níveis séricos de indicadores de lesão hepática (AST e ALT, UI/mL), bem como os de lesão renal (conteúdo de creatinina, uréia e ácido úrico, mg/dL) não foram modificados, com exceção da GGT, que apresentou uma redução significativa nos animais tratados com OEPA.

Além de alterações plasmáticas, a exposição a substâncias potencialmente tóxicas pode ainda provocar outras alterações, como aumento no peso de órgãos internos, por exemplo (Teo *et al.*, 2002). Portanto, foram feitas análises macroscópicas a fim de verificar se o tratamento com OEPA promove alteração de parâmetros como peso, forma e cor de órgãos como o coração, pulmões, fígado, rins e baço. As análises mostraram que não houve diferenças entre os pesos dos órgãos examinados, nem alterações macroscópicas características, como aparência, forma, cor e tamanho, corroborando com os dados encontrados na análise bioquímica.

Contudo, sabe-se que uma comparação direta entre os “efeitos tóxicos” produzidos em humanos e animais de laboratório é inadequada, uma vez que eles apresentam diferenças farmacocinéticas de biotransformação, absorção e excreção, o que leva a consequentes diferenças nos parâmetros farmacocinéticos, como meia-vida, liberação e biodisponibilidade, além da produção de diferentes metabólitos. Portanto,

as consequências produzidas pela administração oral de um produto podem ser manifestadas de formas diferentes em várias espécies (Abass *et al.*, 2009).

Com base nos resultados obtidos, o passo seguinte foi investigar o efeito antinociceptivo do OEPa em um modelo de dor inflamatória aguda. Nesse contexto, a dor pós-operatória é uma característica comum em pacientes que foram submetidos a uma cirurgia. Esse tipo de dor causa sofrimento, perda de independência e frequentemente afeta a qualidade de vida de cerca de 80% dos pacientes que passam por procedimentos cirúrgicos, sendo que deste percentual, pelo menos 75% dos pacientes relatam sentir dor moderada a severa (Apfelbaum *et al.*, 2003; Gan *et al.*, 2014).

O modelo de dor pós-operatória, diferente de outros tipos de dor induzida por inflamação convencional, como CFA (adjuvante completo de Freund) e LPS (lipopolissacarídeo), por exemplo, a dor é provocada diretamente por lesões na pele, fáscia, músculos e pequenos nervos que fazem a inervação desses tecidos (Zahn e Brennan, 1999; Zahn *et al.*, 2002). Além disso, o modelo de dor pós-operatória é um modelo animal bem estabelecido na literatura que mimetiza a dor pós-operatória em humanos (Brennam *et al.*, 1996; Pogatski e Raja, 2003).

Sabe-se que, quando não é controlada de forma adequada, a dor afeta a qualidade de vida e a recuperação do paciente, além de aumentar os riscos de complicações pós-cirúrgicas e desenvolvimento de dor pós-operatória persistente (Gan *et al.*, 2014). De fato, tem sido demonstrado na literatura que o procedimento cirúrgico é uma das causas mais frequentes de dor crônica em pacientes que buscam atendimento de dor nas clínicas (Reddi e Curran, 2015).

O controle da dor pós-operatória ainda representa um grande desafio, sobretudo pelo fato de que os tratamentos disponíveis apresentam eficácia limitada (Chou *et al.*, 2016). As terapias são baseadas principalmente no uso de tratamentos farmacológicos, como anti-inflamatórios não-esteroidais, opióides, gabapentina e pregabalina (Wu e Raja, 2011). Contudo, na maioria das vezes o tratamento é acompanhado de sérios efeitos adversos, como náuseas, sedação, tolerância, dependência, entre outros. Anti-inflamatórios não-esteroidais, por exemplo, embora sejam bastante utilizados, sabe-se que se utilizado a longo prazo, provoca efeitos secundários indesejáveis, sendo que os efeitos sobre o trato gastrointestinal representam os mais graves (Blower *et al.*, 1997; Harned e Sloan, 2016).

Com relação aos mecanismos periféricos da dor pós-operatória, há evidências de que a liberação de mediadores inflamatórios induza a

ativação e sensibilização dos nociceptores, provocando dor espontânea e hipersensibilidade no local da lesão (Verri *et al.*, 2006). Estes mediadores incluem tanto aqueles que são liberados pelos leucócitos ativados e/ou infiltrados (citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e lipídios), quanto aqueles que são liberados das células que foram danificadas (ATP, prótons e compostos reativos como hidroxinonenais) (Miller *et al.*, 2009; Grace *et al.*, 2014).

Em meio ao processo inflamatório, os neutrófilos representam as primeiras células a serem recrutadas, atuando por meio da liberação de seus mediadores inflamatórios na tentativa de conter a lesão ou infecção (Kolaczowska e Kuberski, 2013). A infiltração de neutrófilos também induz o recrutamento de monócitos que se diferenciam em macrófagos no local da lesão. Por sua vez, os mediadores produzidos pelos macrófagos ativados sensibilizam os nociceptores, resultando na geração e manutenção da dor inflamatória (Ren e Dubner, 2010).

Contudo, sabe-se que em uma ferida estéril (incisão cirúrgica), as armas utilizadas pelos neutrófilos para matar possíveis patógenos podem causar significativo dano tecidual, e conseqüentemente, um atraso no processo de recuperação do tecido, além de provocar formação excessiva de cicatrizes (Wilgus *et al.*, 2013). Estudos em modelos animais sugerem que os neutrófilos são células dispensáveis durante o processo de reparo das feridas que não possuem risco de infecção, uma vez que a ação dessas células acaba sendo prejudicial, já que impede a reepitelização ou mesmo aumenta a produção de tecido cicatricial. Dessa forma, a atividade de substâncias antimicrobianas e proteases não específicas para patógenos derivadas de neutrófilos, podem causar um dano maior e potencialmente atrasar o processo de reparo (Dovi *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 2003). Além disso, o recrutamento contínuo de neutrófilos, assim como o acúmulo apoptótico dessas células, podem prolongar a inflamação e contribuir para o desenvolvimento de crônificação da inflamação (Gutierrez-Fernandez *et al.*, 2007; Khanna *et al.*, 2010).

Estudos também têm mostrado que os neutrófilos são responsáveis pela hiperalgesia provocada pela inflamação decorrente da lesão cirúrgica e que este mecanismo envolve a participação de mediadores inflamatórios, como PGE₂ (Renner *et al.*, 2016). Além disso, tem sido evidenciado que o recrutamento dessas células depende de cascatas de sinalização que envolvem a quimiocina CXCL1 e seu receptor CXCR1/2, sugerindo que o bloqueio da migração de neutrófilos pela

sinalização CXCL1-CXCR1/2 pode ser um alvo atraente no controle da dor pós-operatória (Cunha *et al.*, 2008; Teng *et al.*, 2017).

Estudos mostram ainda que a ativação de receptores glutamatérgicos periféricos do tipo AMPA e cainato provocam alodínia e hiperalgesia mecânica, ao passo que a administração de antagonistas, especificamente para os receptores AMPA aliviam a dor inflamatória (Lee *et al.*, 2006; Gangadharan *et al.*, 2011). De fato, receptores de glutamato são amplamente expressos na membrana de neurônios pós-sinápticos espinais e, portanto, podem controlar e modular a resposta nociceptiva durante a primeira sinapse (Bardoni, 2013).

Os receptores AMPA e cainato também são expressos em estruturas supra-espinais que conduzem informação nociceptiva e, portanto, podem inibir a transmissão nociceptiva em sítios supra-espinais que respondem a esses estímulos. Além disso, podem contribuir com as vias supra-espinais descendentes que influenciam na transmissão da dor, uma vez que os antagonistas desses receptores podem inibir o comportamento nociceptivo nos animais, em parte por causar o bloqueio desses receptores a nível supra-espinal (Xu *et al.*, 1993; Dougherty *et al.*, 1996; Nishiyama *et al.*, 1999; Guan *et al.*, 2002).

Várias evidências têm demonstrado que a ativação de células gliais (astrócitos e micróglia), desempenham um importante papel no desenvolvimento e manutenção da sensibilização central. Esse processo ocorre, pelo menos em parte, como resultado do aumento da fosforilação da via p38 MAPK, e conseqüente aumento da produção das citocinas TNF- α e IL-1 β , sobretudo após ativação da micróglia. Essas citocinas, por sua vez, potencializam a excitotoxicidade mediada pelo glutamato, tanto através de mecanismos diretos (pelo aumento da expressão de receptores AMPA nas sinapses) quanto indiretos (pela inibição do transporte de glutamato nos astrócitos) (Fu *et al.*, 2006; Pickering *et al.*, 2005; Olmos e Lladó, 2014).

Corroborando com esses achados, já foi demonstrado que o bloqueio farmacológico da via p38 MAPK, preveniu a alodínia mecânica induzida pela incisão plantar e reduziu os níveis de p38 fosforilada no corno dorsal da medula (Wen *et al.*, 2009). Esse estudo sugere ainda que a via de ativação p38 na micróglia pode oferecer um modo de prevenir a dor pós-operatória por inibir a sensibilização central dirigida pela micróglia, uma vez que a hiperatividade de neurônios do corno dorsal da medula possui um papel crítico no desenvolvimento da dor persistente (Ji *et al.*, 2003).

Os dados aqui apresentados estão de acordo com a literatura e mostram que o tratamento com OEPa é capaz de reduzir tanto a

hiperalgesia quanto a alodínia mecânica no modelo de dor pós-operatória. Estudos realizados por Lima e colaboradores demonstraram ainda que o tratamento com OEPa reduz de maneira dose-dependente a migração de neutrófilos no modelo de pleurisia induzida por carragenina. Os dados da citometria de fluxo, demonstram ainda que esse efeito pode ser atribuído, pelo menos em parte, a redução da migração celular de neutrófilos, corroborando com achados anteriores. Além disso, o OEPa também reduz significativamente a migração de monócitos, uma vez que os níveis de macrófagos no tecido foram substancialmente reduzidos.

É importante ressaltar ainda que o tratamento de camundongos da linhagem C57BL/6 (de ambos os sexos) não apresentaram redução da alodínia mecânica quando tratados pela via intragástrica. Por outro lado, quando foram tratados pela via intraperitoneal, tanto os machos quanto as fêmeas exibiram reduções significativas da alodínia e hiperalgesia mecânica causada pela incisão plantar. Para testar a hipótese de que essas diferenças seriam decorrentes da metabolização de primeira passagem que ocorre no fígado, foi realizada uma curva dose-resposta do tratamento com OEPa no teste de nocicepção aguda induzida pelo isotiocianato de alila (AITC).

Os resultados mostraram que as doses mais altas do tratamento com OEPa (300 e 1000 mg/kg), administrados pela via intragástrica, reduziram de maneira dose-dependente a nocicepção induzida pelo AITC. Além disso, as doses equivalentes (30 e 100 mg/kg), administradas pela via intraperitoneal, apresentaram um perfil semelhante. Assim, foi demonstrado que as diferenças entre as doses e as vias de administração, dependem diretamente da metabolização hepática do OEPa em animais C57BL/6. Esses dados corroboram com dados da literatura, que mostram que existem diferenças intra-específicas significativas de enzimas hepáticas envolvidas na metabolização de compostos xenobióticos nas linhagens Swiss Webster e C57BL/6 (Al-Salmly, 2002).

Outra diferença observada neste estudo refere-se ao limiar nociceptivo apresentado por machos e fêmeas da linhagem C57BL/6 no teste de nocicepção induzida por AITC. Quando comparados em relação ao sexo, os animais machos apresentaram hiperalgesia muito maior em relação as fêmeas. Contudo, pode ser que essas diferenças sejam decorrentes de estresse, uma vez que estudos já mostram que o estresse induz hiperalgesia em animais machos, sem alterar o limiar das fêmeas (Gamaro *et al.*, 1998; Gamaro *et al.*, 2014).

Assim, considerando o efeito antinociceptivo do OEPa no modelo de nocicepção aguda induzida pelo cinamaldeído, sua capacidade

de reduzir a hipersensibilidade mecânica nos modelos de inflamação aguda (incisão plantar) e neuropatia (ligação do nervo isquiático), e levando em consideração que os canais TRPs estão envolvidos na hipersensibilidade associada aos processos inflamatórios agudos e crônicos. O próximo passo foi demonstrar o efeito do tratamento com OEPA no envolvimento com esses canais.

Para testar essa hipótese, foram realizados experimentos utilizando abordagens farmacológicas e antagonistas dos canais TRPA1 (HC-030031) e TRPV1 (capsazepina), a fim de evidenciar esse possível envolvimento. Inicialmente foi utilizado o óleo de mostarda, e posteriormente o AITC (seu principal princípio ativo), para demonstrar o efeito antinociceptivo do OEPA com diferentes agonistas do canal TRPA1. Os resultados confirmaram que o OEPA é capaz de reduzir acentuadamente a nocicepção induzida pelo óleo de mostarda e pelo AITC, corroborando com os testes realizados com cinamaldeído administrado pela via intratecal (Nucci-Martins *et al.*, 2015).

Com base nos resultados obtidos, foi desenhado um experimento para verificar se o OEPA seria capaz de causar nocicepção *per se* quando administrado localmente na pata de camundongos. Os resultados mostraram que, quando administrado em doses mais altas (30 e 100 µg/pata), o óleo possui efeito algogênico, ao passo que doses mais baixas (0,1-10 µg/pata) não apresentam diferenças significativas em relação ao grupo controle tratado com veículo.

Com base nesses achados, foi realizada uma abordagem farmacológica para demonstrar que o efeito antinociceptivo do OEPA está envolvido diretamente com canais TRPA1. Inicialmente, foi investigado se o tratamento local da pata com OEPA seria capaz de reduzir a nocicepção induzida pela capsaicina (agonista TRPV1) e AITC (agonista TRPA1). Os resultados mostraram que a dose de 10 µg/pata reduz de forma acentuada a nocicepção causada pelo AITC, mas não é capaz de alterar o comportamento nociceptivo induzido pela capsaicina, corroborando com os testes realizados anteriormente.

Para demonstrar que o OEPA atua especificamente sobre canais TRPA1 foram utilizados os antagonistas dos canais TRPA1 (HC-030031) e TRPV1 (capsazepina) na nocicepção induzida por OEPA. Os resultados mostraram que o tratamento local com HC-030031 (antagonista do canal TRPA1) reduziu de forma significativa a nocicepção provocada pelo OEPA, ao passo que o tratamento com capsazepina (antagonista do canal TRPV1) não causou nenhuma alteração da nocicepção quando comparada ao grupo controle. Esses resultados demonstram que o tratamento

realizado com OEPA atua de forma específica sobre canais TRPA1 e descartam o envolvimento com canais TRPV1.

Estudos têm demonstrado ainda que a ativação de TRPA1 induz hiperalgesia inflamatória e edema através de mecanismos que dependem de interações neuro-imunes envolvendo a degranulação de mastócitos e, consequentemente, da liberação de seu principal mediador, histamina (Andrade *et al.*, 2008; Hox *et al.*, 2013; Perin-Martins *et al.*, 2013). Desse modo, foram realizados experimentos para testar o envolvimento do OEPA com a nocicepção induzida por mastócitos e histamina. Os resultados demonstraram que o tratamento com OEPA reduziu de forma expressiva a nocicepção induzida tanto pela degranulação de mastócitos quanto pela própria histamina, demonstrando que o efeito antinociceptivo do OEPA também envolve interações com mastócitos e seus subprodutos.

Experimentos adicionais foram realizados *in vitro* para verificar se o OEPA seria capaz de provocar alterações na atividade do NF- κ B, haja visto que a ativação desse fator resulta na indução da expressão e secreção de citocinas, causando forte resposta pró-inflamatória (Bryant *et al.*, 2010). Para isso, monócitos humanos da linhagem THP-1 foram inicialmente utilizados para verificar o possível efeito citotóxico da aplicação do OEPA diretamente sobre essas células. Os resultados mostraram que o tratamento não apresentou efeito tóxico em nenhuma das concentrações utilizadas (0,1 – 0,001%).

Para verificar a ação específica do tratamento sobre a atividade do NF- κ B foram então utilizadas células da linhagem THP-1 Xblue, uma vez que estas possuem um marcador que permite avaliar a atividade intrínseca do NF- κ B após ativação com LPS. Os resultados mostraram que o LPS induziu a atividade do NF- κ B e, surpreendentemente, a concentração de 0,1% do OEPA foi efetiva em reduzir a atividade deste fator nuclear, uma vez que o óleo mineral, utilizado como controle negativo, não apresentou qualquer efeito.

Contudo, para descartar a possibilidade de um resultado falso-positivo, foi realizada uma análise mais precisa com um marcador de morte celular DRAQ7 para análise através de citometria de fluxo. Os resultados mostraram que a contração de 0,1% do OEPA, na verdade apresentou efeito citotóxico, e a redução da atividade NF- κ B pode ter sido decorrente da morte celular provocada pelo tratamento prévio. Dessa forma, parece que o OEPA não possui atividade direta sobre este fator de transcrição, considerando que as concentrações mais baixas não tiveram qualquer efeito sobre a redução da atividade desse fator, o que permite

inferir que seus efeitos sejam decorrentes de uma ação específica com os receptores, como IL-1 e TRPA1, por exemplo.

Dessa forma, os resultados aqui apresentados demonstram que o OEPA possui efeito antinociceptivo em modelos pré-clínicos de nocicepção aguda, bem como em um importante modelo de dor crônica (neuropatia periférica). O mecanismo exato pelo qual o OEPA promove seus efeitos ainda não é totalmente compreendido. Contudo, os resultados deste estudo corroboram com dados da literatura e demonstram que o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do óleo essencial de *Piper aleyreanum* é mediado, pelo menos em parte, pelo bloqueio de receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo não-NMDA (AMPA e cainato), da citocina pró-inflamatória IL-1 β , e canais TRPA1, bem como através de interações neuro-imunes, envolvendo mastócitos, neutrófilos e macrófagos.

Em conjunto, os resultados apresentados neste estudo indicam que o OEPA pode representar um importante e potente alvo terapêutico para o desenvolvimento de novos tratamentos de dor aguda e crônica. Contudo, estudos adicionais são necessários para aprofundar seu mecanismo de ação, bem como fornecer subsídios para a realização de triagens clínicas controladas.

7. CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que o tratamento com óleo essencial de *Piper aleyreanum* após a lesão do nervo isquiático reduziu de maneira expressiva a dor neuropática, sem causar tolerância, efeitos tóxicos ou mesmo inespecíficos, como sedação e relaxamento muscular. Também foi demonstrado que após uma incisão plantar, o tratamento é eficaz em reduzir a hiperalgesia e alodínia mecânica.

Embora o mecanismo exato pelo qual o OEPA promova seus efeitos não sejam totalmente conhecidos, os dados aqui apresentados demonstram que o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do óleo essencial de *Piper aleyreanum* é mediado, pelo menos em parte, pelo bloqueio de receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo não-NMDA (AMPA e cainato), da citocina pró-inflamatória IL-1 β , e canais TRPA1, bem como através de interações neuro-imunes, envolvendo mastócitos, neutrófilos e macrófagos.

Em síntese, os resultados aqui apresentados fornecem subsídios científicos para o uso do óleo essencial de *Piper aleyreanum* no tratamento da dor pós-operatória e neuropática, através de interações neuro-imunes que contribuem para o estabelecimento da sensibilização periférica e central.

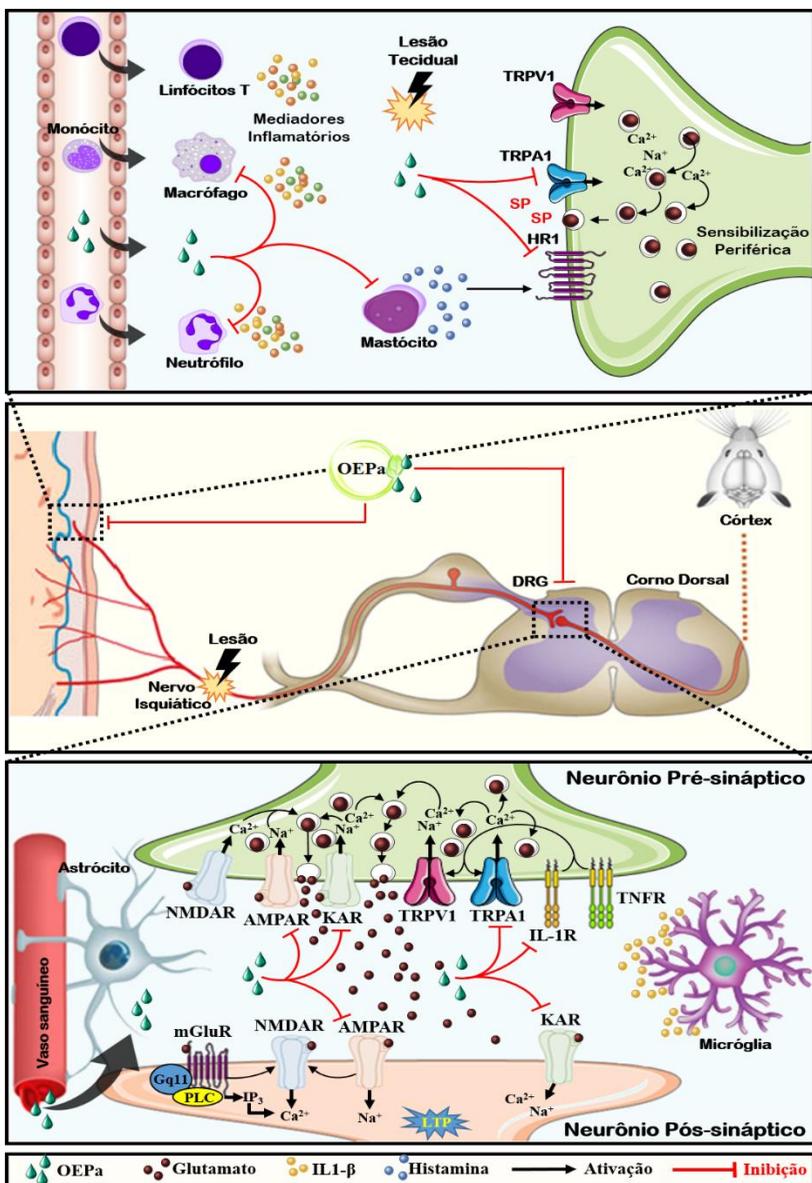


Figura 38. Representação esquemática do possível mecanismo de ação envolvido no efeito antinociceptivo do óleo essencial de *Piper aleyreanum*. O esquema mostra que um dano tecidual causa inflamação e atrai células do sistema imune para o local da lesão, como macrófagos, neutrófilos e células T. As células infiltradas e as células residentes liberam vários mediadores inflamatórios, incluindo citocinas pró-inflamatórias, bradicinina, prostaglandina,

protons, ATP, fatores de crescimento e quimiocinas, os quais sensibilizam o terminal sensorial. Como resultado do aumento da atividade do nociceptor ocorre o processo de sensibilização periférica. Lesões nervosas também podem provocar respostas exageradas ao estímulo doloroso, e consequentemente aumentar a atividade na medula espinal (sensibilização central). Durante esse processo, a liberação de glutamato é aumentada na fenda sináptica e provoca a ativação dos seus receptores (ionotrópicos e metabotrópicos) em ambos os lados da fenda sináptica (pré e pós-sináptica). A superativação dos neurônios aferentes primários também induz a ativação de células não-neuronais, especialmente células da micróglia, que por sua vez, aumentam a síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α and IL-1 β . Quando essas citocinas se ligam aos seus receptores neuronais elas estimulam a atividade dos canais TRPA1 e TRPV1, contribuindo para o aumento da liberação de glutamato na fenda sináptica. No entanto, o tratamento com OEPa é capaz de mediar interações neuro-imunes, sobretudo através da redução da migração celular (monócitos/macrófagos e neutrófilos) e da redução da atividade de mastócitos. Além disso, é capaz de inibir a atividade da IL-1 β e de receptores glutamatérgicos não-NMDA (AMPA e cainato) no corno dorsal da medula, bem como é capaz de inibir a atividade de canais TRPA1 tanto a nível periférico quanto central.

Elaboração e criação: Leandro Flores do Nascimento.

REFERÊNCIAS

- Abass, K.; Reponen, P.; Mattila, S.; Pelkonen, O. Metabolism of carbosulfan I. Species differences in the *in vitro* biotransformation by mammalian hepatic microsomes including human. *Chem-Biol Inter.* 181: 210-219, 2009.
- Adams, R.P. Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography Mass Spectroscopy. 4. ed. Illinois: Allured Publishing Corporation, Carol Stream, pp. 804, 2007.
- Ahmad, R.; Shihab, P.K.; Jasem, S.; Behbehani, K. FSL-1 induces MMP-9 production through TLR-2 and NF- κ B/AP-1 signaling pathways in monocytic THP-1 cells. *Cell Physiol Biochem.* 34: 929-942, 2014.
- Al-Habori, M.; Al-Aghbari, A.; Al-Mamary, M.; Baker, M. Toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves: a long term feeding experiment in animals. *J Ethnopharmacol.* 83: 209–217, 2002.
- Ali, T.; Javan, M.; Sonboli, A.; Semnani, S. Evaluation of the antinociceptive and anti-inflammatory effects of essential oil of *Nepeta pogonosperma* Jamzad et Assadi in rats. *Daru.* 20: 48, 2012.
- Almança, C.C.; Saldanha, S.V.; Sousa, D.R.; Trivilin, L.O.; Nunes, L.C.; Porfírio, L.C.; Marinho, B.G. Toxicological evaluation of acute and sub-chronic ingestion of hydroalcoholic extract of *Solanum cernuum* Vell. in mice. *J Ethnopharmacol.* 138: 508-512, 2011.
- Almeida, R.N.; Agra, M.F.; Maior, F.N.S.; De Sousa, D.P. Essential oils and their constituents: anticonvulsant activity. *Molecules*, 16, 2726–2742, 2011.
- Al-Salmy, H.S. Inter-strain variability in aldehyde oxidase activity in the mouse. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 132: 341-347, 2002.
- Amaral, J.F.; Silva, M.I.; Neto, M.R.; Neto, P.F.; Moura, B.A.; de Melo, C.T.; Araújo, F.L.; Sousa, D.P.; Vasconcelos, P.F.; Vasconcelos, S.M.; Sousa, F.C. Antinociceptive effect of the monoterpene R-(+)-limonene in mice. *Biol Pharm Bull.* 30: 1217–1220, 2007.

Amaya, F.; Izumi, Y.; Matsuda, M.; Sasaki, M. Tissue injury and related mediators of pain exacerbation. *Curr Neuropharmacol.* 11: 592-7, 2013.

Anderson, D.A.; Gentry, C.; Moss, S.; Bevan, S. Transient receptor potential a1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *J Neurosci.* 28: 2485-2494, 2008.

Andrade, E.L.; Luiz, A.P.; Ferreira, J.; Calixto, J.B. Pronociceptive response elicited by TRPA1 receptor activation in mice. *Neurosci.* 152: 511-520, 2008.

Andrade, E.L.; Meoti, F.C.; Calixto, J.B. TRPA1 antagonists as potential analgesic drugs. *Pharmacol Therapeut.* 133: 189–204, 2012.

Apfelbaum, J.L.; Chen, C.; Mehta, S.S.; Gan, T.J. Postoperative pain experience: Results from a national survey suggest postoperative pain continues to be undermanaged. *Anesth Analg.* 97: 534-540, 2003.

Apkarian, A.V.; Bushnell, M.C.; Treede, R.D.; Zubieta, J.K. Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *Eur J Pain.* 9: 463-484, 2005.

Artuc, M.; Hermes, B.; Steckelings, U.M.; Grutzkau, A.; Henz, B.M. Mast cells and their mediators in cutaneous wound healing active participants or innocent bystanders? *Exp Dermatol.* 8: 1-16, 1999.

Austin, P.J.; Moalem-Taylor, G. The neuro-immune balance in neuropathic pain: Involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines. *J Neuroimmunol.* 229: 26–50, 2010.

Bae, G.S.; kim, M.S.; Jung, W.S.; Seo, S.W.; Yun, S.W.; Kim, S.G.; Park, R.K.; Kim, E.C.; Song, H.J.; Park, S.J. Inhibition of lipopolysaccharide-induced inflammatory responses by piperine. *Eur J Pharmacol.* 642: 154–162, 2010.

Baggio, C.H.; Freitas, C.S.; Martins, D.F.; Mazzardo, L.; Smiderle, F.R.; Sasaki, G.L.; Iacomini, G.; Marques, M.C.A.; Santos, A.R.S. Antinociceptive Effects of (1/3),(1/6)-Linked β -Glucan Isolated From *Pleurotus pulmonarius* in Models of Acute and Neuropathic Pain in Mice:

Evidence for a Role for Glutamatergic Receptors and Cytokine Pathways. *J Pain*. 11: 965-971, 2010.

Bandell, M.; Story, G.M.; Hwang, S.W.; Viswanath, V.; Eid, S.R.; Petrus, M.J.; Earley, T.J.; Patapoutian, A. Noxious cold ion channel *trpa1* report is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron*. 41: 849–857, 2004.

Barbosa, F. A moderna biotecnologia e o desenvolvimento da Amazônia. *Cad Cienc Tec*. 17: 43-79, 2000.

Bardoni, R. Role of Presynaptic Glutamate Receptors in Pain Transmission at the Spinal Cord Level. *Current Neuropharmacol*. 11: 477-483, 2013.

Baron, R. Neuropathic pain: a clinical perspective. *Handb Exp Pharmacol*. 194: 3-30, 2009.

Baron, R.; Binder, A.; Wasner, G. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *Lancet Neurol*. 9: 807–19, 2010.

Barrot, M. Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neurosc*. 211: 39-50, 2012.

Bars, D.; Gozariu, M.; Cadden, S.W. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev*. 53: 597–652, 2001.

Basbaum, A.I.; Bautista, D.M.; Scherrer, G.; Julius, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*. 139: 267–284, 2009.

Basbaum, A.I.; Jessell, T. The Perception of Pain. In: Kandel, E.R.; Schwartz, J.; Jessell, T.; editors. *Principles of Neuroscience*. New York: Appleton and Lange. 472-491, 2000.

Basbaum, A.I.; Woolf, C.J. Pain. *Curr Biol*. 9: 429-431, 1999.

Baser, K.H.C. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *Current Pharmaceutical Design*. 14: 3106–3119, 2008.

Bautista, D.M.; Jordt, S.E.; Nikai, T.; Tsuruda, P.R.; Read, A.J.; Poblete, J.; Yamoah, E.N.; Basbaum, A.I.; Julius, D. TRPA1 Mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell*. 124: 1269–1282, 2006.

Bennett, C.E.; Burnett, D.A.; Greenlee, W.J. Knutson, C.E.; Korakas, P.; Li, C. Fused tricyclic mGluR1 antagonists for the treatment of neuropathic pain. *Bioorgan Med Chem Lett*. 22: 1575–1578, 2012.

Bennett, G.J.; Xie, Y.K. A peripheral mono neuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*. 33: 87–107, 1988.

Bezerra, D.P.; Castro, F.O.; Alves, A.P.; Pessoa, C.; Moraes, M.O.; Silveira, E.R.; Lima, M.A.; Elmiro, F.J.; Costa-Lotufo, L.V. *In vivo* growth-inhibition of Sarcoma 180 by piplartine and piperine, two alkaloid amides from *Piper*. *Brazilian J Med Biol Res*. 39: 801–807, 2006.

Bezerra, D.P.; Militão, G.C.G.; Castro, F.O.; Pessoa, C.; Moraes, M.O.; Silveira, E.R.; Lima, M.A.S.; Elmiro, F.J.M.; Costa-Lotufo, L.V. Piplartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways. *Toxicol in Vitro*. 21: 1–8, 2007.

Binshtok, A.M.; Wang, H.; Zimmermann, K.; Amaya, F.; Vardeh, D.; Shi, L.; Brenner, G.J.; Ji, R.R.; Bean, B.P.; Woolf, C.J.; Samad, T.A. Nociceptors are interleukin-1beta sensors. *J Neurosci*. 28:14062-73, 2008.

Bizzo, H.R.; Hovell, A.M.C.; Rezende, C.M. Óleo essencial no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Química Nova*. 32: 588–594, 2009.

Blower, A.L.; Brooks, A.; Fenn, G.C.; Hill, A.; Pearce, M.Y.; Morant, S.; Bardhan, K.D. Emergency admissions for upper gastrointestinal disease and their relation to NSAID use. *Aliment Pharmacol Therap*. 11: 283–291, 1997.

Boukhatem, M.N.; Kameli, A.; Ferhat, M.A.; Saidi, F.; Mekarnia, M. Rose geranium essential oil as a source of new and safe anti-inflammatory drugs. *Libyan J Med*. 8: 22520, 2013.

Brandão, M.G.L.; Cosenza, G.P.; Graef, C.F.F.; Junior, N.L.N.; Monte-Mór, R.L.M. Traditional uses of American plant species from the 1st edition of Brazilian Official Pharmacopoeia. *Braz J Pharmacognosy*. 19: 478-487, 2009.

Brennan, T.J.; Vandermeulen, E.P.; Gebhart, G.F. Characterization of a rat model of incisional pain. *Pain*. 64: 493-501, 1996.

Broughton, G, 2nd.; Janis, J.E.; Attinger, C.E. Wound healing: an overview. *Plast Reconstr Surg*. 117: 1e-S-32e-S, 2006.

Bryant, C.E.; Spring, D.R.; Gangloff, M.; Gay, N.J. The molecular basis of the host response to lipopolysaccharide. *Nature*. 8: 8–14, 2010.

Burnashev, N.; Monyer, H.; Seeburg, P.H.; Sakmann, B. Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. *Neuron*. 8: 189–198, 1992.

Calixto, J.B. Efficacy, safety, quality, control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz J Med Biol Res*. 33: 179-189, 2000.

Calvino, B.; Grilo, R. M. Central pain control. *Joint Bone Spine*. 73: 10–16, 2006.

Carreira, E.U.; Carregaro, V.; Teixeira, M.M.; Moriconi, A.; Aramini, A.; Verri, W.A. Jr.; Ferreira, S.H.; Cunha, F.Q.; Cunha, T.M. Neutrophils recruited by CXCR1/2 signalling mediate post-incisional pain. *Eur J Pain*. 17: 654-663, 2013.

Caumo, W.; Schmidt, A.P.; Schneider, C.N.; Bergmann, J.; Iwamoto, C.W.; Adamatti, L.C.; Bandeira, D.; Ferreira, M.B. Preoperative predictors of moderate to intense acute postoperative pain in patients undergoing abdominal surgery. *Acta Anaesthesiol Scand*. 46: 1265–1271, 2002.

Chan, E.W.C.C.; Wong, S.K. Phytochemistry and Pharmacology of three *Piper* Species: An Update. *IJP*. 1: 534-544, 2014.

Choleris, E.; Thomas, A.W.; Kavaliers, M.; Prato, F.S. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neurosci Biobehav Rev.* 25: 235-260, 2001.

Chou, R.; Gordon, D.B.; de Leon-Casasola, O.A.; Rosenberg, J.M.; Bickler, S.; Brennan, T.; Carter, T.; Cassidy, C.L.; Chittenden, E.H.; Degenhardt, E.; Griffith, S.; Manworren, R.; McCarberg, B.; Montgomery, R.; Murphy, J.; Perkal, M.F.; Suresh, S.; Sluka, K.; Strassels, S.; Thirlby, R.; Viscusi, E.; Walco, G.A.; Warner, L.; Weisman, S.J.; Wu, C.L. Management of Postoperative Pain: A Clinical Practice Guideline From the American Pain Society, the American Society of Regional Anesthesia and Pain Medicine, and the American Society of Anesthesiologists' Committee on Regional Anesthesia, Executive Committee, and Administrative Council. *J Pain.* 17: 131-157, 2016.

Clapham, D.E. Hot and Cold TRP Ion Channels. *Science.* 295: 2228-2229, 2002.

Clapham, D.E. Structural biology: Pain-sensing TRPA1 channel resolved. *Nature.* 520: 439-441, 2015.

Clapham, D.E. TRP channels as cellular sensors. *Nature.* 426: 517-524, 2003.

Clark, A.K.; Yip, P.K.; Malcangio, M. The liberation of fractalkine in the dorsal horn requires microglial cathepsin S. *J Neurosci.* 29: 6945-6954, 2009.

Clark, A.K.; Malcangio, M. Fractalkine/CX3CR1 signaling during neuropathic pain. *Front Cell Neurosci.* 8: 121, 2014.

Coelho, J.P.; Crostino, A.F.; Matos, P.G.; Rauter, A.P.; Nobre, B.P.; Mendes, R.L.; Barroso, J.G.; Mainar, A.; Urieta, J.S.; Fareleira, J.M.N.A.; Sovová, H.; Palavra, A.F. Extraction of Volatile Oil from Aromatic Plants with Supercritical Carbon Dioxide: Experiments and Modeling. *Molecules.* 17: 10550-10573, 2012.

Correa, G.T.; Veranio, G.A.; Silva, L.E.; Hirata, Junior, R.; Coil, J.M.; Scelza, M.F. Cytotoxicity evaluation of two root canal sealers and a

commercial calcium hydroxide paste on THP1 cell line by Trypan Blue assay. *J Appl Oral Sci.* 17: 457-461, 2009.

Costigan, M.; Scholz, J.; Woolf, C.J. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu Rev Neurosci.* 32:1-32, 2009.

Coull, J.A.; Beggs, S.; Boudreau, D.; Boivin, D.; Tsuda, M.; Inoue, K.; Gravel, C.; Salter, M.W.; De Koninck, Y. BDNF from microglia causes the shift in neuronal an ion gradient under lying neuropathic pain. *Nature.* 438: 1017-1021, 2005.

Cox, J.J.; Reimann, F.; Nicholas, A.K.; Thornton, G.; Roberts, E.; Springell, K.; Karbani, G.; Jafri, H.; Mannan, J.; Raashid, Y.; Al-Gazali, L.; Hamamy, H.; Valente, E.M.; Gorman, S.; Williams, R.; McHale, D.P.; Wood, J.N.; Gribble, F.M.; Woods, C.G. An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature.* 444: 894-898, 2006.

Craveiro, A.A.; Queiroz, D.C. Óleos Essenciais e Química Fina. *Química Nova.* 16: 224-228, 1993.

Crombie, I.K.; Davies, H.T.; Macrae, W.A. Cut and thrust: antecedent surgery and trauma among patients attending a chronic pain clinic. *Pain.* 76: 167-171, 1998.

Cross, S.A. Pathophysiology of pain. *Mayo Clin Proc.* 69: 375-383, 1994.

Cruz, R.C.B.; C.D.; Meurer, E.J.Silva, C.Schaefer, A.R.S.Santos, A.B.Cruz, V.Cechinel, Toxicity evaluation of *Cucurbita maxima* seed extract in mice. *Pharm Biol.* 44 301-303, 2009.

Cunha, T.M.; Verri, W.A. Jr.; Schivo, I.R.; Napimoga, M.H.; Parada, C.A.; Poole, S.; Teixeira, M.M.; Ferreira, S.H.; Cunha, F.Q. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. *J Leukoc Biol.* 83: 824-832, 2008.

D'Mello, R.; Dickenson, A.H. Spinal cord mechanisms of pain. *Br J Anaesth.* 101: 8-16, 2008.

Da Costa, D.S.M.; Meotti, F.C.; Andrade, E.L.; Leal, P.C.; Motta, E.M.; Calixto, J.B. The involvement of the transient receptor potential A1 (TRPA1) in the maintenance of mechanical and cold hyperalgesia in persistent inflammation. *Pain*. 148: 431–437, 2010.

Da Silva, J.K.R.; Pinto, L.C.; Burbano, R.M.R.; Montenegro, R.C.; Guimarães, E.F.; Andrade, E.H.A.; Maia, J.G.S. Essential oils of Amazon *Piper* species and their cytotoxic, antifungal, antioxidant and anti-cholinesterase activities. *Ind Crops and Prod*. 58: 55–60, 2014.

Dahl, J.B.; Kehlet, H. Treatment of postoperative pain--a status report. *Ugeskr Laeger*. 168: 1986-1988, 2006.

Del Camino, D.; Murphy, S.; Heiry, M.; Barrett, L.B.; Earley, T.J.; Cook, C.A.; Petrus, M.J.; Zhao, M.; D'amours, M.; Deering, N.; Brenner, G.J.; Costigan, M.; Hayward, N.J.; Chong, J.A.; Fanger, C.M.; Woolf, C.J.; Patapoutian, A.; Moran, M.M. TRPA1 contributes to cold hypersensitivity. *J Neurosci*. 30: 15165-15174, 2010.

Di Stasi, L.C.; Hiruma-Lima, C.A. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. Ed. UNESP, São Paulo, SP. 148-155, 2002.

Dougherty, P.M.; Li, Y.J.; Lenz, F.A.; Rowland, L.; Mittman, S. Evidence that excitatory amino acids mediate afferent input to the primate somatosensory thalamus. *Brain Res* 728:267-273, 1996

Dovi, J.V.; He, L.K.; DiPietro, L.A. Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. *J Leukoc Biol*. 73: 448-455, 2003.

Dray, A. Inflammatory mediators of pain. *Br J Anaesth*. 75: 125–131, 1995.

Dray, A.; Perkins, M. E. Bradykinin and inflammatory pain. *Trends Neurosci*. 16: 99-104, 1993.

Drenth, J.P.; Waxman, S.G. Mutations in sodium-channel gene SCN9A cause a spectrum of human genetic pain disorders. *J Clin Invest*. 117: 3603-3609, 2007.

Duarte, D.F. Uma Breve História do Ópio e dos Opióides. *Rev Bras Anesthesiol*. 55: 135-146, 2005.

Dubin, A.E.; Patapoutian, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest.* 120: 3760-3772, 2010.

Dudai, N.; Weinstein, Y.; Krup, M.; Rabinski, T.; Ofir, R. Citral is a new inducer of caspase-3 in tumor cell lines. *Planta Medica.* 71: 484-488, 2005.

Duymus, H.G.; Çiftçi, A.; Yildirim, U.; Demirci, B.; Kirimer, N. The cytotoxic activity of *Vitex agnus castus* L. Essential oils and their biochemical mechanisms. *Industrial Crops and Products.* 55: 33-42, 2014.

Dworkin, R.H.; O'Connor, A.B.; Audette, J.; Baron, R.; Gourlay, G.K. Haanpää, M.L.; Kent, J.L.; Krane, E.J.; Lebel, A.A.; Levy, R.M.; Mackey, S.C.; Mayer, J.; Miaskowski, C.; Raja, S.N.; Rice, A.S.; Schmader, K.E.; Stacey, B.; Stanos, S.; Treede, R.D.; Turk, D.C.; Walco, G.A.; Wells, C.D. Recommendations for the Pharmacological Management of Neuropathic Pain: An Overview and Literature Update. *Mayo Clin Proc.* 85: S3-14, 2010.

Dyer, L.A.; Richards, J.; Dodson, C.D.; Isolation, Synthesis, and Evolutionary Ecology of *Piper* Amides. Cap:7, p.117-139. In: Deyer, L.A.; Pamar, A.D.N. *Piper: A Model Genus for Studies of Phytochemistry, Ecology, and Evolution.* USA: Klumer academic/Plenum publishers, 405 p. 2004.

Eid, S.R.; Crown, E.D.; Moore, E.L.; Liang, H.A.; Choong, K.C.; Dima, S.; Henze, D.A.; Kane, S.A.; Urban, M.O. HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathy-induced mechanical hypersensitivity. *Mol Pain.* 4: 48, 2008.

Elliott, R.A.; Hooper, L.; Payne, K.; Brown, T.J.; Roberts, C.; Symmons, D. Preventing non-steroidal anti-inflammatory drug-induced gastrointestinal toxicity: are older strategies more cost-effective in the general population? *Rheumatology (Oxford).* 45: 606-613, 2006.

Ellis, A.; Bennett, D.L. Neuroinflammation and the generation of neuropathic pain. *Br J Anaesth.* 111: 26-37, 2013.

Facundo, V.A.; Balico, L.J.; Lima, D.K.S.; Santos, A.R.; Morais, S.M.; Da Silva, G.V.; Militão, J.S.L.T. Non-substituted B-ring flavonoids and

an indole alkaloid from *Piper aleyreanum* (Piperaceae). *Biochem Systemat Ecol.* 45: 206–208, 2012.

Facundo, V.A.; Ferreira, S.A.; Morais, S.M. Essential Oils of *Piper dumosum* Rudge and *Piper aleyreanum* C.DC (Piperaceae) from Brazilian Amazonian Forest. *The J Essential Oil Resear.* 19: 165-166, 2007.

Facundo, V.A.; Morais, S.M. Constituents of *Piper aleyreanum* (Piperaceae). *Biochem System Ecol.* 31: 111–113, 2003.

Facundo, V.A. Plantas utilizadas no tratamento da Malária. Universidade Federal de Rondônia. Porto Velho, p.267, 2001. In: Relatório de Pesquisa. Amazônia: Ci & Desenv.; Belém, v.1, n.1, Jul/dez. 271-276, 2005.

Faqueti, L.G.; Briuedes, V.; Halabalaki, M.; Skaltsounis, A.L.; Nascimento, L.F.; Barros, W.M.; Santos, A.R.; Biavatti, M.W. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of standardized extract of polymethoxyflavones from *Ageratum conyzoides*. *J Ethnopharmacol.* 194: 369-377, 2016.

Felipe, F.C.B.; Sousa Filho, J.T.; Souza, L.E.O.; Silveira, J.A.; Uchoa, D.E.A.; Silveira, E.R.; Pessoa, O.D.L.; Viana, G.S.B. Piplartine, an amide alkaloid from *Piper tuberculatum*, presents anxiolytic and antidepressant effects in mice. *Phytomed.* 14: 605-612, 2007.

Fernandes, E.S.; Fernandes, M.A.; Keeble, J.E. The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves. *Brit J Pharmacol.* 166: 510–521, 2012.

Figueredo, S.M.; Do Nascimento, F.P.; Freitas, C.S.; Baggio, C.H.; Soldi, C.; Pizzolatti, M.G.; De Ibarrola, M.C.; De Arrua, R.L.; Santos, A.R. Antinociceptive and gastroprotective actions of ethanolic extract from *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera. *J Ethnopharmacol.* 135: 603-609, 2011.

Fillingim, R.B.; King, C.D.; Ribeiro-Dasilva, M.C.; Rahim-Williams, B.; Riley, J.L. 3rd. Sex, gender, and pain: a review of recent clinical and experimental findings. *J Pain.* 10: 447-85, 2009.

Fu, D.; Guo, Q.; Ai, Y.; Cai, H.; Yan, J.; Dai, R. Glial activation and segmental upregulation of interleukin-1beta (IL-1beta) in the rat spinal cord after surgical incision. *Neurochem Res.* 31: 333-340, 2006.

Gamaro, G.D.; Torres, I.L.; Laste, G.; Fontella, F.; Silveira, P.P.; Manoli, L.P.; Frantz, F.; Eickhoff, F.; Dalmaz, C. Gender-dependent effect on nociceptive response induced by chronic variable stress. *Physiol Behav.* 135: 44-48, 2014.

Gamaro, G.D.; Xavier, M.H.; Denardin, J.D.; Pilger, J.A.; Ely, D.R.; Ferreira, M.B.; Dalmaz, C. The effects of acute and repeated restraint stress on the nociceptive response in rats. *Physiol Behav.* 63: 693-697, 1998.

Gan, T.J.; Habib, A.S.; Miller, T.E.; White, W.; Apfelbaum, J.L. Incidence, patient satisfaction, and perceptions of postsurgical pain: Results from a US national survey. *Curr Med Res Opin.* 30: 149-160, 2014.

Gangadharan, V.; Wang, R.; Ulzhöfer, B.; Luo, C.; Bardoni, R.; Bali, K.K.; Agarwal, N.; Tegeder, I.; Hildebrandt, U.; Nagy, G.G.; Todd, A.J.; Ghirri, A.; Häussler, A.; Sprengel, R.; Seeburg, P.H.; MacDermott, A.B.; Lewin, G.R.; Kuner, R. Peripheral calcium-permeable AMPA receptors regulate chronic inflammatory pain in mice. *J Clin Invest.* 121: 1608-23, 2011.

Gao, Y.J.; Ji, R.R. Chemokines, neuronal-glia interactions, and central processing of neuropathic pain. *Pharmacol Ther.* 126: 56-68, 2010.

Geppetti, P.; Tramontana, M.; Santicoli, P.; Del Bianco, E.; Giuliani, S.; Maggi, C.A. Bradykinin-induced release of calcitonin gene-related peptide from capsaicin-sensitive nerves in guinea-pig atria: mechanism of action and calcium requirements. *Neuroscience.* 38: 687-92, 1990.

Ghasemlou, N.; Chiu, I.M.; Julien, J.P.; Woolf, C.J. CD11b+Ly6G-myeloid cells mediate mechanical inflammatory pain hypersensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 112: E6808-17, 2015.

Grace, P.M.; Hutchinson, M.R.; Maier, S.F.; Watkins, L.R. Pathological pain and the neuroimmune interface. *Nat Rev Immunol.* 14: 217–231, 2014.

Guan, Y.; Terayama, R.; Dubner, R.; Ren, K. Plasticity in excitatory amino acid receptor-mediated descending pain modulation after inflammation. *J Pharmacol Exp Ther.* 300: 513-520, 2002.

Gulluce, M.; Sokmen, M.; Daferera, D.; Agar, G.; Ozkan, H.; Kartal, N.; Polissiou, M.; Sokmen, A.; Sahin, F. In vitro antibacterial, antifungal and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis*. *L. J. Agric Food Chem.* 51: 3958–3965, 2003.

Gupta, R.A.; Motiwala, M.N.; Dumore, N.G.; Danao, K.R.; Ganjare, A.B. Effect of piperine on inhibition of FFA induced TLR4 mediated inflammation and amelioration of acetic acid induced ulcerative colitis in mice. *J Ethnopharmacol.* 164: 239-46, 2015.

Gurtner, G.C.; Werner, S.; Barrandon, Y.; Longaker, M.T. Wound repair and regeneration. *Nature.* 453, 314–321, 2008.

Gutierrez, R.M.P.; Gonzales, A.M.N.; Hoyo-Vandillo, C. Alkaloids from *Piper*: A Review of its Phytochemistry and Pharmacology. *Mini Rev Med Chem.* 13: 163-193, 2013.

Gutierrez-Fernandez, A.; Inada, M.; Balbin, M.; Fueyo, A.; Pitiot, A.S.; Astudillo, A.; Hirose, K.; Hirata, M.; Shapiro, S.D.; Noel, A.; Werb, Z.; Krane, S.M.; Lopez-Otin, C.; Puente, X.S. Increased inflammation delays wound healing in mice deficient in collagenase-2 (MMP-8). *FASEB J.* 21: 2580, 2007.

Hajhashemi, V.; Sajjadi, S.E.; Zomorodkia, M. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Bunium persicum* essential oil, hydroalcoholic and polyphenolic extracts in animal models. *Pharm Biol.* 2: 146–151, 2011.

Hamburger, M.; Hostettmann, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry.* 30: 3864-3874, 1991.

- Hamilton SG, McMahon SB. ATP as a peripheral mediator of pain. *J Auton Nerv Syst.* 81: 187–94, 2000.
- Harned, M.; Sloan, P. Safety concerns with long-term opioid use. *Expert Opin Drug Saf.* 15: 955-962, 2016.
- Harris, J.A.; Corsi, M.; Quartaroli, M.; Arban, R.; Bentivoglio, M. Upregulation of spinal glutamate receptors in chronic pain. *Neuroscience.* 74: 7–12, 1996.
- Harvey, A.L.; Edrada-Ebel, R.; Quinn, R.J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nat Rev Drug Discov.* 14: 111-129, 2015.
- Heinricher, M.M.; Tavares, I.; Leith, J.L.; Lumb, B.M. Descending control of nociception: specificity, recruitment and Plasticity. *Brain Res Rev.* 60: 214–225, 2009.
- Henriques, A.T.; Pires, C.A.S.; Apel, M.A. Óleos Essenciais: Importancia e Perspectivas terapeuticas. Cap.9, p.219-256. In: YUNES, R.A & FILHO, V.C. Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia. Ed UNIVALE, 2 ed.319 p.Itajaí, SC, 2009.
- Honore, P.; Wade, C.L.; Zhong, C.; Harris, R.R.; Wu, C.; Ghayur, T.; Iwakura, Y.; Decker, M.W.; Faltynek, C.; Sullivan, J.; Jarvis, M.F. Interleukin-1 α gene-deficient mice show reduced nociceptive sensitivity in models of inflammatory and neuropathic pain but not post-operative pain. *Behav Brain Res.* 167: 355–364, 2006.
- Hollmann, M.; Heinemann, S. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci.* 17: 31–108, 1994.
- Hox, V.; Vanoirbeek, J.A.; Alpizar, Y.A.; Voedisch, S.; Callebaut, I.; Bobic, S.; Sharify, A.; De Vooght, V.; Van Gerven, L.; Devos, F.; Liston, A.; Voets, T.; Vennekens, R.; Bullens, D.M.; De Vries, A.; Hoet, P.; Braun, A.; Ceuppens, J.L.; Talavera, K.; Nemery, B.; Hellings, P.W. Crucial role of transient receptor potential ankyrin 1 and mast cells in induction of nonallergic airway hyperreactivity in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 187: 486-493, 2013.

Huang, J.; Zhang, X.; Mcnaughton, P.A. Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia. *Curr Neuropharmacol.* 4: 197-206, 2006.

Hunt, S.P.; Mantyh, P.W. The molecular dynamics of pain control. *Nat Rev Neurosci.* 2: 83-91, 2001.

Hylden, J.K.L.; Wilcox, G.L. Intrathecal morphine in mice: a new technique. *Eur J Pharmacol.* 67: 313– 316, 1980.

Irwin, M.R. Inflammation at the Intersection of Behavior and Somatic Symptoms. *Psychiatr Clin North Am.* 34: 605-620, 2011.

Jang, J.H.; Kim, D.-W.; Nam, T.Sang.; Paik, K.SE.; Leem.; J.W. Peripheral glutamate receptors contribute to mechanical hyperalgesia in a neuropathic pain model of the rat. *Neuroscience.*128: 169–176, 2004.

Jamarillo, A.; Manos, P.S. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (piperaceae). *Am J Bot.* 88: 706–716, 2001.

Jesse, C.R.; Savegnago, L.; Nogueira, C.W. Role of nitric oxide/cyclic GMP/K+ channel pathways in the antinociceptive effect caused by 2,3-bis(mesitylseleno) propenol. *Life Sciences* 81: 1694–1702, 2007.

Ji, R.R.; Berta, T.; Nedergaard, M. Glia and pain: is chronic pain a gliopathy? *Pain.* 154: S10–S28, 2013.

Ji, R.R.; Kohno, T.; Moore, K.A.; Woolf, C.J. Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *Trends Neurosci.* 26: 696-705, 2003.

Ji, R.R.; Xu, Z.Z.; Gao, Y.J. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. *Nat Rev Drug Discov.* 13: 533-548, 2014.

Julius, D.; Basbaum, A.I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature.* 413: 203-210, 2001.

Kandel, E.R.; Schwartz, J.H.; Jessell, T.M. *Principles of Neural Science*, 5th ed. McGraw-Hill, New York, 2014.

Katz J, Poleshuck EL, Andrus CL, et al. Risk factors for acute pain and its persistence following breast cancer surgery. *Pain*. 119: 16–25, 2005.

Kawamata, M.; Omote, K. Involvement of increased excitatory amino acids and intracellular Ca^{2+} concentration in the spinal dorsal horn in an animal model of neuropathic pain. *Pain*. 68: 85–96, 1996.

Kawasaki, Y.; Zhang, L.; Cheng, J.K.; Ji, R.R. Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. *J Neurosci*. 28: 5189–5194, 2008.

Kehlet, H.; Holte, K. Effect of postoperative analgesia on surgical outcome. *Br J Anaesth*. 87: 62-72, 2001.

Kehlet, H.; Jensen, T.S.; Woolf, C.J. Persistent postsurgical pain: risk factors and prevention. *Lancet*. 367: 1618-25, 2006.

Keller AF, Beggs S, Salter MW, De Koninck Y. Transformation of the output of spinal lamina I neurons after nerve injury and microglia stimulation underlying neuropathic pain. *Mol Pain*. 3: 27, 2007.

Khanna, S.; Biswas, S.; Shang, Y.; Collard, E.; Azad, A.; Kauh, C.; Bhasker, V.; Gordillo, G.M.; Sem, C.K.; Roy, S. Macrophage dysfunction impairs resolution of inflammation in the wounds of diabetic mice. *PLoS One*. 5: e9539, 2010.

Khiyari, M.E.A.; Kasrati, A.; Jamali, C.A.; Zeroual, S.; Markouk, M.; Bekkouche, k. Chemical composition, antioxidant and insecticidal properties of essential oils from wild and cultivated *Salvia aucheri* subsp. blancoana (Webb & Helder), an endemic, threatened medicinal plant in Morocco. *Ind Crops and Prod*. 57: 106–109, 2014.

Kitahata, L.M. Pain pathways and transmission. *Yale J Biol Med*. 66: 437-442, 1993.

Klafke, J.Z.; Da Silva, M.A.; Trevisan, G.; Rossato, M.F.; Da Silva, C.R.; Guerra, G.P.; Villarinho, J.G.; Rigo, F.K.; Dalmolin, G.D.; Gomez, M.V.; Rubin, M.A.; Ferreira J. Involvement of the glutamatergic system in the

nociception induced intrathecally for a TRPA1 agonist in rats. *Neurosci.* 222: 136–146, 2012.

Klafke, J.Z.; da Silva, M.A.; Rossato, M.F.; de Prá, S.D.; Rigo, F.K.; Walker, C.I.6; Bochi, G.V.; Moresco, R.N.; Ferreira, J.; Trevisan, G. Acute and chronic nociceptive phases observed in a rat hind paw ischemia/reperfusion model depend on different mechanisms. *Pflugers Arch.* 468: 229-41, 2016.

Klockgether-Radke, A.P.F.W. Sertürner and the discovery of morphine. 200 years of pain therapy with opioids. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther.* 37: 244-249, 2002.

Koivisto, A.; Chapman, H.; Jalava, N.; Korjamo, T.; Saarnilehto, M.; Lindstedt, K.; Pertovaara, A. TRPA1: a transducer and amplifier of pain and inflammation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 114: 50-55, 2014.

Kolaczowska, E.; Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 13: 159–175, 2013.

Koroishi, A.M.; Foss, S.R.; Cortez, D.A.; Ueda-Nakamura, T.; Nakamura, C.V.; Dias Filho, B.P. *In vitro* antifungal activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* against dermatophytes. *J Ethnopharmacol.* 117: 270-277, 2008.

Kosugi, M.; Nakatsuka, T.; Fujita, T.; Koruda, Y.; Kumamoto, E. Activation of TRPA1 Channel Facilitates Excitatory Synaptic Transmission in Substantia Gelatinosa Neurons of the Adult Rat Spinal Cord. *The J Neurosci.* 27: 4443– 4451, 2007.

Kotan, R.; S.Kordali, S.; Cakir, A. Screening of antibacterial activities of twenty-one oxygenated monoterpenes. *Zeitschrift fur Naturforschung.* 62: 507–513, 2007.

Koul, I.B.; Kapil, A. Evaluation of the liver protective potential of piperine, an active principle of black and long peppers. *Planta Med.* 59: 413,1993.

Kuner, R. Central mechanisms of pathological pain. *Nature Medicine.* 16: 1258-1266, 2010.

Kwan, K.Y.; Allchorne, A.J.; Vollrath, M.A.; Christensen, A.P.; Zhang, D.S.; Woolf, C.J.; Corey, D.P. TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron*. 50: 277-289, 2006.

Lapoint, T.M.; Altier, C. The role of TRPA1 in visceral inflammation and pain. *Channels*. 5: 525-529, 2011.

Latremoliere, A.; Woolf, C.J. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain*. 10: 895–926, 2009.

Lee, S.A.; Hong, S.S.; Han, X.H.; Hwang, J.S.; Oh, G.J.; Lee, K.S. Piperine from the fruits of *Piper longum* with inhibitory effect on monoamine oxidase and antidepressant-like activity. *Chem Pharm Bull*. 53: 832-5, 2005.

Lee, H.J.; Pogatzki-Zahn, E.M.; Brennan, T.J. The effect of the AMPA/kainate receptor antagonist LY293558 in a rat model of postoperative pain. *J Pain*. 7: 768-777, 2006.

Lees, J.G.; Fivelman, B.; Duffy, S.S.; Makker, P.G.; Perera, C.J.; Moalem-Taylor, G. Cytokines in Neuropathic Pain and Associated Depression. *Mod Trends Pharmacopsych*. 30: 51-66, 2015.

Leite-Almeida, H.; Cerqueira, J.J.; Wei, H.; Ribeiro-Costa, N.; Anjos-Martins, H.; Sousa, N.; Pertovaara, A.; Almeida, A. Differential effects of left/right neuropathy on rats' anxiety and cognitive behavior. *Pain*. 153: 2218-2225, 2012.

Lennertz, R.C.; Kossyeva, E.A.; Smith, A.K.; Stucky, C.L. TRPA1 Mediates Mechanical Sensitization in Nociceptors during Inflammation. *Plos One*. 7: e43597.

Leoni, G.; Neumann, P.-A.; Sumagin, R.; Denning, T.L.; Nusrat, A. Wound repair: role of immune–epithelial interactions. 8: 959-968, 2015.

Leung, L.; Cahill, C.M. TNF-alpha and neuropathic pain-a review. *J Neuroinflammation*. 7: 27, 2010.

Levine, J.D.; Fields, H.L.; Basbaum, A.L. Peptides and the Primary Afferent Nociceptor. *J Neurosci.* 13: 2273-2286, 1993.

Li, C.Q.; Zhang, J.W.; Dai, R.P.; Wang, J.; Luo, X.G.; Zhou, X.F. Surgical incision induces anxiety-like behavior and amygdala sensitization: effects of morphine and gabapentin. *Pain Res Treat.* 2010: 705874, 2010.

Liang, Y. F.; Haake, B.; Reeh, P. W. Sustained sensitization and recruitment of rat cutaneous nociceptors by bradykinin and a novel theory of its excitatory action. *J Physiol.* 532: 229-239, 2001.

Lima, D.K.S.; Ballico, L.J.; Lapa, F.R.; Gonçalves, H.P.; De Souza, L.M.; Iacomini, M.; Werner, M.F.P.; Baggio, C.H.; Pereira, I.T.; Mota, L. Evaluation of the antinociceptive, anti-inflammatory and gastric antiulcer activities of the essential oil from *Piper aleyreanum* C.DC in rodents. *J Ethnopharmacol.* 142, 274-282, 2012.

Linley, J.E.; Rose, K.; Ooi, L.; Gamper, N. Understanding inflammatory pain: ion channels contributing to acute and chronic nociception. *Eur J Physiol.* 459: 657-669, 2010.

Liu, M.; Mao, L.; Daoud, A.; Hassan, W.; Zhou, L2.; Lin, J.; Liu, J.; Shang, J. β -elemene inhibits monocyte-endothelial cells interactions via reactive oxygen species/MAPK/NF- κ B signaling pathway in vitro. *Eur J Pharmacol.* 766: 37-45, 2015.

Loeser, J.D.; Treede, R.D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain.* 137: 473-477, 2008.

Lopes, A.H.; Brandolini, L.; Aramini, A.; Bianchini, G.; Silva, R.L.; Zaperlon, A.C.; Verri, W.A. Jr.; Alves-Filho, J.C.; Cunha, F.Q.; Teixeira, M.M.; Allegretti, M.; Cunha, T.M. DF2755A, a novel non-competitive allosteric inhibitor of CXCR1/2, reduces inflammatory and post-operative pain. *Pharmacol Res.* 103: 69-79, 2016.

Lu, Y.; Jiang, B.C.; Cao, D.L.; Zhang, Z.J.; Zhang, X.; Ji, R.R.; Gao, Y.J. TRAF6 upregulation in spinal astrocytes maintains neuropathic pain by integrating TNF- α and IL-1 β signaling. *Pain.* 155: 2618-2629, 2014.

Luo, X.; Wang, X.; Xia, Z.; Chung, S.K.; Cheung, C.W. CXCL12/CXCR4 axis: an emerging neuromodulator in pathological pain. *Rev Neurosci.* 27: 83–92, 2016.

Ma, W.; Quirion, R. Does COX2-dependent PGE2 play a role in neuropathic pain? *Neurosci Lett.* 437: 165-169, 2008.

Mabberley, D.J. *The plant-book. A portable dictionary of the higher plants.* Cambridge University Press. 1997.

Maggio, A.; Rosselli, S.; Bruno, M. Essential oils and pure volatile compounds as potential drugs in Alzheimer's disease therapy: An updated review of the literature. *Curr Pharm Des.* 22: 4011-4027, 2016.

Mahmoud, T.; Gairola, S. Traditional knowledge and use of medicinal plants in the Eastern Desert of Egypt: a case study from Wadi El-Gemal National Park. *J Med Plant Stud.* 1: 10-17, 2013.

Majdalawieh, A.F.; Carr, R.I. *In vitro* investigation of the potential immunomodulatory and anti-cancer activities of black pepper (*Piper nigrum*) and cardamom (*Elettaria cardamomum*). *J Med Food.* 13: 371–381, 2010.

Majeed, M.; Prakash, L. The Medicinal uses of pepper. *Internat Pepper News.* 25: 23–31, 2000.

Malinin, A.; Oshrine, B.; Serebruany, V. Treatment with selective serotonin reuptake inhibitors for enhancing wound healing. *Med Hypotheses.* 63: 103–109, 2004.

Malmberg, A.B.; Basbaum, A.I. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. *Pain.* 76: 215-22, 1998.

Malmberg, A.; Brandon, E.P.; Idzerda, R. I.; Liu, H.; McKnight, S.; Basbaum, A. Diminished inflammation and nociceptive pain with preservation of neuropathic pain in mice with a targeted mutation of the type i regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J Neuro.* 17: 7462–7470, 1997.

Malmberg, A.B.; Chen, C.; Tonegawa, S.; Basbaum, A.I. Preserved acute pain and reduced neuropathic pain in mice lacking PKC γ . *Science*. 278: 279–283, 1997.

Mamedov, N. Medicinal Plants Studies: History, Challenges and Prospective. *Med Aromat Plants*. 2012: 1-8, 2012.

Mamedov, N. Medicinal Plants Studies: History, Challenges and Prospective. *Med Aromat Plants*. 1:8, 2012.

Mao, J.; Price, D.D.; Hayes, R.L.; Lu, J.; Mayer, D.J. Differential roles of NMDA and non-NMDA receptor activation in induction and maintenance of thermal hyperalgesia in rats with painful peripheral mononeuropathy. *Brain Res*. 598: 271–278, 1992.

Martin P, D'Souza D, Martin J, Grose R, Cooper L, Maki R, and McKercher SR: Wound healing in the PU.1 null mouse-tissue repair is not dependent on inflammatory cells. *Curr Biol*. 13: 1122-1128, 2003.

Martin, L.J.; Smith, S.B.; Khoutorsky, A.; Magnussen, C.A.; Samoshkin, A.; Sorge, R.E.; Cho, C.; Yosefpour, N.; Sivaselvachandran, S.; Tohyama, S.; Cole, T.; Khuong, T.M.; Mir, E.; Gibson, D.G.; Wieskopf, J.S.; Sotocinal, S.G.; Austin, J.S.; Meloto, C.B.; Gitt, J.H.; Gkogkas, C.; Sonenberg, N.; Greenspan, J.D.; Fillingim, R.B.; Ohrbach, R.; Slade, G.D.; Knott, C.; Dubner, R.; Nackley, A.G.; Ribeiro-da-Silva, A.; Neely, G.G.; Maixner, W.; Zaykin, D.V.; Mogil, J.S.; Diatchenko, L. Epiregulin and EGFR interactions are involved in pain processing. *J Clin Invest*. 127: 3353-3366, 2017.

Martins, D.F.; Mazzardo-Martins, L.; Gadotti, V.M.; Nascimento, F.P.; Lima, D.A.; Speckhann, B.; Favretto, G.A.; Bobinski, F.; Cargnin-Ferreira, E.; Bressan, E.; Dutra, R.C.; Calixto, J.B.; Santos, A.R. Ankle joint mobilization reduces axonotmesis-induced neuropathic pain and glial activation in the spinal cord and enhances nerve regeneration in rats. *Pain*. 152: 2653-2661, 2011.

Materazzi, S.; Nassini, R.; Andrè, E.; Campi, B.; Amadesi, S.; Trevisani, M.; Bunnett, N.W.; Patacchini, R.; Geppetti, P. Cox-dependent fatty acid metabolites cause pain through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105: 12045-12050, 2008.

McGaraughty, S.; Chu, K.L.; Perner, R.J.; Didomenico, S.; Kort, M.E.; Kym, P.R. TRPA1 modulation of spontaneous and mechanically evoked firing of spinal neurons in uninjured, osteoarthritic, and inflamed rats. *Mol Pain*. 6: 14, 2010.

McMahon, S.B.; Bennett, D.L.H.; Bevan, S. Inflammatory mediators and modulators of pain. *Wall and Melzack's Textbook of Pain* (Elsevier/Churchill Livingstone, Philadelphia), Vol 5, pp 49–72, 2006.

McNamara, C.R.; Mandel-Brehm, J.; Bautista, D.M.; Siemens, J.; Deranian, K.L.; Zhao, M.; Hayward, N.J.; Chong, J.A.; Julius, D.; Moran, M.M.; Fanger, C.M. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104: 13525-13530, 2007.

Meghwal, M.; Goswami, T. *Piper nigrum* and piperine: An update. *Phytother Res*. 27: 1121–1130, 2013.

Millan, M.J. Descending control of pain. *Prog. Neurobiol*. 66: 355-474, 2002.

Millan, M.J. The induction of pain: an integrative review. *Prog. Neurobiol*. 57: 1-164, 1999.

Miller, R.J.; Jung, H.; Bhangoo, S.K.; White, F.A. Cytokine and chemokine regulation of sensory neuron function. *Handbook Exp Pharmacol*. 194: 417–449, 2009.

Milligan, E.D.; Watkins, L.R. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat Rev Neurosci*. 10: 23–36, 2009.

Moalem G, Tracey DJ. Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain Res Rev*. 51: 240–264, 2006.

Moran, M.M.; McAlexander, M.A.; Bíró, T.; Szallasi, A. Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*. 10: 601-620, 2011.

Moreira, A.C.; Müller, A.C.A.; Junior, N.P.; Antunes, A.M.S. Pharmaceutical patents on plant derived materials in Brazil: Policy, law and statistics. *World Patent Information*. 28: 34–42, 2006.

Morikawa, T.; Matsuda, H.; Yamaguchi, I.; Pongpiriyadacha, Y.; Yoshikawa, M. New amides and gastroprotective constituents from the fruit of *Piper chaba*. *Planta Medica*. 70: 152–159, 2004.

Morioka, N.; Zhang, F.F.; Nakamura, Y.; Kitamura, T.; Hisaoka-Nakashima, K.; Nakata, Y. Tumor necrosis factor-mediated downregulation of spinal astrocytic connexin43 leads to increased glutamatergic neurotransmission and neuropathic pain in mice. *Brain Behav Immun*. 49: 293–310, 2015.

Nakamura, M.; Nishiwaki, Y.; Sumitani, M.; Ushida, T.; Yamashita, T.; Konno, S.; Taguchi, T.; Toyama, Y. Investigation of chronic musculoskeletal pain (third report): with special reference to the importance of neuropathic pain and psychogenic pain. *J Orthop Sci*. 19: 667–675, 2014.

Nascimento, L.F. Efeito antinociceptivo do óleo essencial de *Piper aleyreanum* C.DC. (Piperaceae) na hiperalgesia induzida pelo veneno da serpente *Bothrops jararaca* (Viperidae). 2014. [Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental)]. Porto Velho: Fundação Universidade Federal de Rondônia, 2014.

Nassini, R.; Materazzi, S.; Benemei, S.; Geppetti, P. The TRPA1 channel in inflammatory and neuropathic pain and migraine. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 176: 1–43, 2014.

Navickiene, H.M.D.; Alécio, A.C.; Kato, M.J.; Bolzani, V.S.; Young, M.C.M.; Cavalheiro, A.J.; Furlan, M. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochem*. 55: 621–626, 2000.

Nillius, B. TRP channels in disease. *Biochem Biophys Acta*. 1772, 805–812, 2007.

Nillius, B.; Appendino, G.; Owsianik, G. The transient receptor potential channel TRPA1: from gene to pathophysiology. *Pflugers Arch*. 464: 425–458, 2012.

Nishio, N.; Taniguchi, W.; Sugimura, Y.K.; Takiguchi, N.; Yamanaka, M.; Kiyoyuki, Y.; Yamada, H.; Miyazaki, N.; Yoshida, M.; Nakatsuka, T. Reactive Oxygen Species Enhance Excitatory Synaptic Transmission

In Rat Spinal Dorsal Horn Neurons By Activating TRPA1 And TRPV1 Channels. *Neuroscience*. 247: 201–212, 2013.

Nishiyama, T.; Gyermek, L.; Lee, C.M.; Kawasaki-Yatsugi, S.; Yamaguchi, T. The systemically administered competitive AMPA receptor antagonist, YM872, has analgesic effects on thermal or formalin-induced pain in rats. *Anesth Analg*. 89: 1534-1537, 1999.

Nozadze, I.; Tsiklauri, N.; Gurtskaia, G.; Tsagareli, M.G. Role of thermo TRPA1 and TRPV1 channels in heat, cold, and mechanical nociception of rats. *Behav Pharmacol*. 27: 29-36, 2016.

Nucci, C.; Mazzardo-Martins, L.; Stramosk, J.; Brethanha, L.; Pizzolatti, M.G.; Santos, A.R.S.; Martins, D.F. Oleaginous extract from the fruits *Pterodon pubescens* Benth induces antinociception in animal models of acute and chronic pain. *J Ethnopharmacol*. 143: 170-178, 2012.

Nucci-Martins, C.; Martins, D.F.; Nascimento, L.F.; Venzke, D.; Oliveira, A.S.; Frederico, M.J. Silva, F.R.; Brighente, I.M.; Pizzolatti, M.G.; Santos, A.R. Ameliorative potential of standardized fruit extract of *Pterodon pubescens* Benth on neuropathic pain in mice: Evidence for the mechanisms of action. *J Ethnopharmacol*. 175: 273-286, 2015.

Núñez, V.; Castro, V.; Murillo, R.; Ponce-Soto, L.A.; Merfort, I.; Lomonte, B. Inhibitory effects of *Piper umbellatum* and *Piper peltatum* extracts towards myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops* snake venoms: Isolation of 4-nerolidylcatechol as active principle. *Phytochem*. 66: 1017–1025, 2005.

Obara, I.; Goulding, S.P.; Hu, J.H.; Klugman, M.; Worley, P.F.; Szumlanski, K.K. Nerve injury-induced changes in Homer/glutamate receptor signaling contribute to the development and maintenance of neuropathic pain. *Pain*. 154: 1932-1945, 2013.

Obata, K.; Katsura, H.; Mizushima, T.; Yamanaka, H.; Kobayashi K.; Dai, Y.; Fukuoka, T.; Tokunaga, A.; Tominaga, M.; Noguchi, K. TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. *J Clin Invest*. 115: 2393–401, 2005.

Olausson H, Cole J, Rylander K, McGlone F, Lamarre Y, Wallin BG, Kramer H, Wessberg J, Elam M, Bushnell MC, et al. Functional role of unmyelinated tactile afferents in human hairy skin: sympathetic response and perceptual localization. *Exp Brain Res* 2008; 184:135–140.

Old, E.A.; Malcangio, M. Chemokine mediated neuron-glia communication and aberrant signalling in neuropathic pain states. *Curr Opin Pharmacol.* 12: 67-73, 2012.

Olmos, G.; Lladó, J. Tumor necrosis factor alpha: a link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators Inflamm.* 2014: 861231, 2014.

Ortega, F. Medicinal plants in the evolution of therapeutics - a case of applied ethnopharmacology. In : Elisabetsky, E.; Etkin, N.L.(Eds.). *Ethnopharmacol.* Oxford, UK: Eolss Publishers.160–184, 2006.

Osikowicz, M.; Mika, J.; Przewlocka, B. The glutamatergic system as a target for neuropathic pain relief. *Exp Physiol.* 98: 372–384, 2013.

Ossipov, M.H.; Dussor, G.O.; Porreca, F. Central modulation of pain. *J Clin Invest.* 120: 3779-3787, 2010.

Dhungat, J.V. Caventou, Pelletier & - History Of Quinine. *J Assoc Physicians India.* 63 (3): 58, 2015.

Palecek, J.; Neugebauer, V.; Carlton, S.M.; Iyengar, S.; Willis, W.D. The effect of a kainate GluR5 receptor antagonist on responses of spinothalamic tract neurons in a model of peripheral neuropathy in primates. *Pain.* 111, 151–161, 2004.

Panda, S.; Kar, A. Piperine lowers the serum concentrations of thyroid hormones, glucose and hepatic 5'D activity in adult male mice. *Horm Metab Res.* 35: 523, 2003.

Pang, M.H.; Kim, Y.; Jung, K.W.; Cho, S.; Lee, D.H. Foundation review: A series of case studies: practical methodology for identifying antinociceptive multi-target drugs. *Drug Discov Today.* 17: 425-434, 2012

Parmar, V.S.; Jain, S.C.; Bisht, K.S.; Rajni, J.; Amitabh.P.; Tyagi, J.O.D.; Prasad, A.K.; Wengel, J.; Olsen, C.E.; Boll, P.M. Phytochemistry of the Genus *Piper*. *Phytochemistry*. 46: 591-673, 1997.

Parmar, V.S.; Jain, S.C.; Gupta, S.; Talwar, S.; Rajwanshi, V.Kumar, R.; Azim, A.; Malhotra, S.; Kumar, N.; Jain, R.; Sharma, N.K.; Tyagi, O.M.D.; Lawrie, S.J.; Errington, W.; Howarth, O.; Olsen, C.E.; Singh, S.K.; Wengel, J. Polyphenols and alkaloids from *Piper* species. *Phytochem*. 38: 1069–1078, 1998.

Patapoutian, A.; Tate, S.; Woolf, C.L. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. *Nat Rev Drug Discov*. 8: 55–68, 2009.

Pathak, N.; Khandelwal, S. Immunomodulatory role of piperine in cadmium induced thymic atrophy and splenomegaly in mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 28: 52–60, 2009.

Patra, S.; Muthuraman, M.S.; Meenu, M.; Priya, P.; Pemaiah, B. Anti-inflammatory effects of royal poinciana through inhibition of toll-like receptor 4 signaling pathway. *Int Immunopharmacol*. 34: 199-211, 2016.

Paulsen, C.E.; Armache, J.P.; Gao, Y.; Cheng, Y.; Julius, D. Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms. *Nature*. 520: 511–517, 2015.

Payyappallimana, U. Role of Traditional Medicine in Primary Health Care: An Overview of Perspectives and Challenges. *Yoko J Soc Sci*. 14: 724-743, 2010.

Peddareddygari, L.R.; Oberoi, K.; Grewal, R.P. Congenital Insensitivity to Pain: A Case Report and Review of the Literature. *Case Rep Neurol Med*. 2014: 141953, 2014.

Perin-Martins, A.; Teixeira, J.M.; Tambeli, C.H.; Parada, C.A.; Fischer, L. Mechanisms underlying transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1)-mediated hyperalgesia and edema. *J Peripher Nerv Syst*. 1:62-74, 2013.

Petrovska, B.B. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogn Rev.* 6: 1-5, 2012.

Petrus, M.; Peier, A.M.; Bandell, M.; Hwang, S.W.; Huynh, T.; Olney, N.; Jegla, T.; Patapoutian, A. A role of TRPA1 in mechanical hyperalgesia is revealed by pharmacological inhibition. *Mol Pain.* 3: 40–47, 2007.

Phillips, M.L.; Gregory, L.J.; Cullen, S.; Coen, S.; Ng, V.; Andrew, C.; Giampietro, V.; Bullmore, E.; Zelaya, F.; Amaro, E.; Thompson, D.G.; Hobson, A.R.; Williams, S.C.; Brammer, M.; Aziz, Q. The effect of negative emotional context on neural and behavioural responses to oesophageal stimulation. *Brain.* 126: 669–84, 2013.

Phillipson, J.D. Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry* 56: 237-243, 2001.

Pickering, M.; Cumiskey, D.; O'Connor, J.J. Actions of TNF-alpha on glutamatergic synaptic transmission in the central nervous system. *Exp Physiol.* 90: 663-670, 2005.

Pigatto, G.R.; Coelho, I.S.; Aquino, R.S.; Bauermann, L.F.; Santos, A.R.S. Light-Emitting Diode Phototherapy Reduces Nocifensive Behavior Induced by Thermal and Chemical Noxious Stimuli in Mice: Evidence for the Involvement of Capsaicin-Sensitive Central Afferent Fibers. *Mol Neurobiol.* 54: 3205-3218, 2017.

Pinheiro, F.V.; Villarinho, J.G.; Silva, C.R.; Oliveira, S.M.; Pinheiro, K.V.; Petri, D.; Rossato, M.F.; Guerra, G.P.; Trevisan, G.; Antonello, R.M.; Geppetti, P.; Ferreira, J.; André, E. The involvement of the TRPA1 receptor in a mouse model of sympathetically maintained neuropathic pain. *Eur J Pharmacol.* 747: 105-113, 2015.

Pitchford, S.; Levine, J.D. Prostaglandins sensitize nociceptors in cell culture. *Neurosci Lett.* 132: 105-108, 1991.

Planells-Cases, R.; García-Sanz, N.; Morenilla-Palao, C.; Ferrer-Montiel, A. Functional aspects and mechanisms of TRPV1 involvement in neurogenic inflammation that leads to thermal hyperalgesia. *Pflugers Arch.* 451: 151-159, 2005.

- Pogatzki, E.M.; Raja, S.N. A mouse model of incisional pain. *Anesthesiol.* 99: 1023-1027, 2003.
- Pollard, M. Ionotropic glutamate receptor-mediated responses in the rat primary somatosensory cortex evoked by noxious and innocuous cutaneous stimulation in vivo. *Exp Brain Res.* 131: 282-292, 2000.
- Pradeep, C.R.; Kuttan, G. Effect of piperine on the inhibition of lung metastasis induced by B16F-10 melanoma cells in mice. *Clin Exp Metastasis.* 19: 703, 2002.
- Pultrini, A.M.; Galindo, L.A.; Costa, M. Effects of the essential oil from *Citrus aurantium* L. in experimental anxiety models in mice. *Life Sci.* 78, 1720-1725, 2006.
- Quassinti, L.; Lupidi, G.; Maggi, F.; Sagratini, G.; Papa, F.; Vittori, S.; Bianco, A.; Bramucci, M. Antioxidant and antiproliferative activity of *Hypericum hircinum* L. subsp. *majus* (Aiton) N. Robson essential oil. *Nat Prod Res.* 27: 862-868, 2013.
- Quintans-Júnior, L.; Moreira, J.C.; Pasquali, M.A.; Rabie, S.M.; Pires, A.S.; Schröder, R.; Rabelo, T.K.; Santos, J.P.; Lima, P.S.; Cavalcanti, S.C.; Araújo, A.A.; Quintans, J.S.; Gelain, D.P. Antinociceptive activity and redox profile of the monoterpenes (+)-camphene, *p*-cymene, and geranyl acetate in experimental models. *Toxicol.* 2013: 459530, 2013.
- Rajasekaram, D.; Palombo, E.A.; Yeo, T.C.; Lim, S.L.D.; Lee Tu, C. Identification of Traditional Medicinal Plant Extracts with Novel Anti-Influenza Activity. *Plos One.* 8: e79293, 2013.
- Reddi, D.; Curran, N. Chronic pain after surgery: pathophysiology, risk factors and prevention. *Postgrad Med J.* 90: 222-2227, 2014.
- Ren, K; Dubner, R. Interactions between the immune and nervous systems in pain. *Nat Med.* 16: 1267-1276, 2010.
- Renner, B.; Walter, G.; Strauss, J.; Fromm, M.F.; Zacher, J.; Brune, K. Preoperative administration of etoricoxib in patients undergoing hip replacement causes inhibition of inflammatory mediators and pain relief. *Eur J Pain.* 16: 838-48, 2012.

Ribeiro, J.E.L.S.; Hopkins, M.J.G.; Vicentini, A.; Sothers, C.A.; Costa, M.A.S.; Brito, J.M.; Souza, M.A.D.; Lohrman, L.G.; Assunção, P.A.C.L.; Silva, C.F.; Mesquita, M.; Rocópio, L.C. Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Manaus: INPA.1999.

Richmond, C.E.; Bromley, L.M.; Woolf, C.J. Preoperative morphine pre-empted postoperative pain. *Lancet*. 342: 73-75, 1993.

Riedel, W.; Neeck, G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. *Z Rheumatol*. 60: 404-415, 2001.

Rodrigues, R.V.; Lanznaster, D.; Longhi Balbinot, D.T.; Gadotti, V.M.; Facundo, V.A, Santos, A.R.S. Antinociceptive effect of crude extract, fractions and three alkaloids obtained from fruits of *Piper tuberculatum*. *Biol Pharm Bull*. 32: 1809-1812, 2009.

Rosidah, N.; Yam, M.F.; Sadikun, A.; Ahmad, M.; Akowuah, G.A.; Asmawi, M.Z. Toxicology evaluation of standardized methanol extract of *Gynura procumbens*. *J Ethnopharmacol*. 123: 244-249, 2009.

Ruddell, R.G.; Oakley, F.; Hussain, Z.; Yeung, I.; Bryan-Lluka, L.J.; Ramm, G.A. A role for serotonin (5-HT) in hepatic stellate cell function and liver fibrosis. *Am J Pathol*. 169: 861-876, 2006.

Russell, F.A.; Fernandes, E.S.; Courade, J.P.; Keeble, J.E.; Brain, S.D. Tumour necrosis factor alpha mediates transient receptor potential vanilloid 1-dependent bilateral thermal hyperalgesia with distinct peripheral roles of interleukin-1beta, protein kinase C and cyclooxygenase-2 signalling. *Pain*. 142: 264-274, 2009.

Russo, C.M.; Brose, W.G. Chronic pain. *Ann Rev Med*. 49: 123-133, 1998.

Sachs, D.; Cunha, F.Q.; Poole, S.; Ferreira, S.H. Tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1beta and interleukin-8 induce persistent mechanical nociceptor hypersensitivity. *Pain*. 96: 89-97, 2002.

Safieh-Garabedian, B.; Poole, S.; Allchorne, A.; Winter, J.; Woolf, C.J. Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase

in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol.* 115: 1265–1275, 1995.

Salat, K.; Filipek, B. Antinociceptive activity of transient receptor potential channel TRPV1, TRPA1, and TRPM8 antagonists in neurogenic and neuropathic pain models in mice. *J Zhejiang Univ Sci B.* 16: 167-178, 2015.

Saleem, H.; Anjum, S.M.M.; Awan, A.B.; Ahmed, J.; Raza, M.A.; Hanif, S.; *et al.* A Short History of Evolution of Indigenous Plants and Medicine System. *J Pharm Alternat Med.* 2: 2222-5668, 2013.

Sah, D.W.; Ossipo, M.H.; Porreca, F. Neurotrophic factors as novel therapeutics for neuropathic pain. *Nat Rev Drug Discov.* 2: 460-472, 2003.

Samy, R.P.; Manikandan, J.; Al Qahtani, M. Evaluation of aromatic plants and compounds used to fight multidrug resistant infections. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013: 525613, 2013

Santos, F.A.; Rao, V.S.N. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-Cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. *Phytoter Res.* 14: 240–244, 2000.

Schaible, H-G; Richter, F. Pathophysiology of pain. *Langenbecks Arch Surg.* 389: 237-243, 2004.

Scholz, J.; Woolf, C.J. Can we conquer pain? *Nat Neurosci. Suppl:* 1062-1067, 2002.

Scholz, J.; Woolf, C.J. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat Neurosc.* 10: 1361-1368, 2007.

Schweinhardt, P.; Bushnell, M.C. Pain imaging in health and disease--how far have we come? *J Clin Invest.* 120: 3788-3797, 2010.

Sharifi-Rad, J.; Hoseini-Alfatemi, S.M.; Sharifi-Rad, M.; Sharifi-Rad, M.; Iriti, M.; Sharifi-Rad, M.; Sharifi-Rad, R.; Raeisi, S. Phytochemical compositions and biological activities of essential oil from *Xanthium strumarium* L. *Molecules.* 20: 7034-7047, 2015.

Shavit, Y.; Fridel, K.; Beilin, B. Postoperative pain management and proinflammatory cytokines: animal and human studies. *J Neuroimmune Pharmacol.* 1: 443-51, 2006.

Shenoy, P.A.; Nipate, S.S.; Sonpetkar, J.M.; Salvi, N.C.; Waghmare, A.B.; Chaudhari, P.D. Anti-snake venom activities of ethanolic extract of fruits of *Piper longum* L.(Piperaceae) against Russell's viper venom: characterization of piperine as active principle. *J of Ethnopharmacol.* 147: 373–382, 2013.

Silva, J.K.R.; Girard, C.K.T.; Andrade, E.H.; Guimarães, E.F.; Maia, J.G.S. Polifenóis totais e capacidade antioxidante de extratos de espécies de *Piper* (Piperaceae) com ocorrência na Serra de Carajás, PA. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). Disponível em: <<http://sec.sbq.org.br/cdrom/32ra/resumos/T1259-1.pdf>>. Acesso em: 11 de março de 2016.

Silva, J.R.; Lopes, A.H.; Talbot, J.; Cecilio, N.T.; Rossato, M.F.; Silva, R.L.; Souza, G.R.; Silva, C.R.; Lucas, G.; Fonseca, B.A.; Arruda, E.; Alves-Filho, J.C.; Cunha, F.Q.; Cunha, T.M. Neuroimmune-Glia Interactions in the Sensory Ganglia Account for the Development of Acute Herpetic Neuralgia. *J Neurosci.* 37: 6408-6422, 2017.

Simmons, R.M.A.; Webster, A.A.; Kalra, A.B.; Iyengar, S. Group II mGluR receptor agonists are effective in persistent and neuropathic pain models in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 73: 419–427, 2002.

Simões, C.M.O.; Shenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. Farmacognosia da planta do medicamento. Porto Alegre: UFGS, Florianópolis: UFSC, 2004.

Simões, R.R.; Coelho, I.S.; Zambenedetti, A.; Frederico, M.J.S.; Silva, F.R.M.; Morel, A.F.; Zanchet, E.M.; Santos, A.R.S. Ameliorative potential of standardized extract of *Condalia buxifolia* Reissek in attenuating the postoperative pain: evidence for the inhibition of AMPA and kainate in the Spinal Cord. *UK J Pharmaceutic Biosci.* 5: 24-39, 2017.

Singh, B.K.; Tripathi, M.; Chaudhari, B.P.; Pandey, P.K.; Kakkar, P. Natural terpenes prevent mitochondrial dysfunction, oxidative stress and

release of apoptotic proteins during nimesulide-hepatotoxicity in rats. PLoS One. 7: e34200, 2012.

Sireeratawong, S.; Vannasiri, S.; Sritiwong, S.; Itharat, A.; Jaijoy, K. Anti-inflammatory, anti-nociceptive and antipyretic effects of the ethanol extract from root of *Piper sarmentosum* Roxb. J Med Assoc Thai. 93: S1–S6, 2010.

Sisignano, M.; Park, C.K.; Angioni, C.; Zhang, D.D. von Hehn, C.; Cobos, E.J.; Ghasemlou, N. 5,6-EET Is Released upon Neuronal Activity and Induces Mechanical Pain Hypersensitivity via TRPA1 on Central Afferent Terminals. J Neurosci. 32: 6364–6372, 2012.

Sommer, C.; Kress, M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. Neurosci Lett. 361: 184–187, 2004.

Sorkin, L.S.; Yaksh, T.L. Behavioral models of pain states evoked by physical injury to the peripheral nerve. Neurotherap. 6: 609–619, 2009.

Sousa, D.P. Analgesic-like Activity of essential oils constituents. Molecules. 16: 2233–2252, 2011.

Spencer, A.P. Digoxin in heart failure. Crit Care Nurs Clin North Am. 15: 447–452, 2003.

Story, G.M.; Peier, A.M.; Reeve, A.J.; Eid, S.R.; Mosbacher, J.; Hricik, T.R.; Earley, T.J.; Hergarden, A.C.; Andersson, D.A.; Hwang, S.W.; McIntyre, P.; Jegla, T.; Bevan, S.; Patapoutian, A. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. Cell. 112: 819–829, 2003.

Tao, Y.X. Dorsal horn alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor trafficking in inflammatory pain. Anesthesiol. 112: 1259–1265, 2010.

Teo, S.; Stirling, D.; Thomas, S.; Hoberman, A.; Kiorpes, A.; Khetani, V.A. 90-day oral gavage toxicity study of d-methylphenidate and d,l-methylphenidate in Sprague-Dawley rats. Toxicol. 179: 183–196, 2002.

Tominaga, M.; Caterina, M.J. Thermosensation and Pain. *J Neurobiol.* 61: 3-12, 2004.

Trevisan, G.; Benemei, S.; Materazzi, S.; De Logu, F.; De Siena, G.; Fusi, C.; Fortes Rossato, M.; Coppi, E.; Marone, I.M.; Ferreira, J.; Geppetti, P.; Nassini, R. TRPA1 mediates trigeminal neuropathic pain in mice downstream of monocytes/macrophages and oxidative stress. *Brain.* 5: 1361-1377, 2016.

Trevisani, M.; Siemens, J.; Materazzi, S.; Bautista, D.M.; Nassini, R.; Campi, B. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104: 13519-13524, 2007.

Tsuda, M.; Beggs, S.; Salter, M.W. Inoue, K. Microglia and intractable chronic pain. *Glia.* 61: 55–61, 2013.

Upur, H.; Amat, N.; Blazekovic, .B Talip, A. Protective effect of *Cichorium glandulosum* root extract on carbon-tetrachloride induced and galactosamine-induced hepatotoxicity in mice. *Food Chem Toxicol.* 47: 2022-2030, 2009.

Uta, D.; Furue, H.; Pickering, A.E.; Rashid, M.H.; Mizuguchi-Takase, H.; Katafuchi, T.; Imoto, K.; Yoshimura, M. TRPA1-expressing primary afferents synapse with specific morphological subtypes of substantia gelatinosa neurons in the adult rat spinal cord. *Eur J Neurosci.* 31: 1960–1973, 2010.

Van den Doll, H.; Kratz, P.D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J chromatograp.* 11: 463–471, 1963.

van Hecke, O.; Austin, S.K.; Khan, R.A.; Smith, B.H.; Torraine, N. Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies. *Pain.* 155: 654–662, 2014.

Verri Jr, W.A.; Cunha, T.M.; Parada, C.A.; Poole, S.; Cunha, F.Q.; Ferreira, S.H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? *Pharmacol Ther.* 112: 116–138, 2006.

Vijayakumar, R.S.; Surya, D.; Nalini, N. Antioxidant efficacy of black pepper (*Piper nigrum* L.) and piperine in rats with high fat diet induced oxidative stress. *Redox Rep.* 9: 105–110, 2004.

Vranken, J.H. Elucidation of pathophysiology and treatment of neuropathic pain. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem.* 12: 304-314, 2012.

Wachtel-Galor, S.; Benzie, I.F.F. Herbal Medicine: An Introduction to Its History, Usage, Regulation, Current Trends, and Research Needs. In: Benzie IFF, Wachtel-Galor S, editors. *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects.* 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2011. Chapter 1.

Walker, K.; Fox, A.J.; Urban, L.A. Animal models for pain research. *Mol Med Today.* 5: 319-321, 1999.

Wallace, K.S.; Lam, V.; Schettler, J. NGX426, an oral AMPA-Kainate antagonist, is effective in human capsaicin-induced pain and hyperalgesia. *Pain Med.* 13: 1601–1610, 2012.

Wang, H.; Zuo, D.; He, B.; Qiao, F.; Zhao, M.; Wu, Y. Conditioned fear stress combined with single-prolonged stress: A new PTSD mouse model. *Neuro Res.* 73: 142-152, 2012.

Wang, S.; Dai, Y.; Fukuoka, T.; Yamanaka, H.; Kobayashi, K.; Obata, K.; Cui, X.; Tominaga, M.; Noguchi, K. Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain. *Brain.* 131: 1241–1251, 2008.

Wang, Z.; Yuan, Y.; Xie, K.; Tang, X.; Zhang, L.; Ao, J.; Li, N.; Zhang, Y.; Guo, S.; Wang, G. PICK1 regulates the expression and trafficking of AMPA receptors in remifentanyl-induced hyperalgesia. *Anesth Analg.* 123: 771-781, 2016.

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.* 6: 2065, 2017.

Watkins, L.R.; Milligan, E.D.; Maier, S.F. Glial activation: a driving force for pathological pain. *Trends Neurosci.* 24: 450-455, 2001.

Wen, Y.R.; Suter, M.R.; Ji, R.R.; Yeh, G.C.; Wu, Y.S.; Wang, K.C.; Kohno, T.; Sun, W.Z.; Wang, C.C. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal microglia contributes to incision-induced mechanical allodynia. *Anesthesio*. 110: 155-165, 2009.

Wick, J.Y. Aspirin: a history, a love story. *Consult Pharm*. 27: 322-329, 2012.

Wilgus, T.A.; Roy, S.; McDaniel, J.C. Neutrophils and wound repair: positive actions and negative reactions. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2: 379-388, 2013.

Winkelstein, B.A.; Rutkowski, M.D.; Sweitzer, S.M.; Pahl, J.L.; DeLeo, J.A. Nerve injury proximal or distal to the DRG induces similar spinal glial activation and selective cytokine expression but differential behavioral responses to pharmacologic treatment. *J Comp Neurol*. 439, 127-139, 2001.

Woolf, C.J.; Allchorne, A.; Safieh-Garabedian, B.; Poole, S. Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumour necrosis factor alpha. *Br J Pharmacol*. 121: 417-424, 1997.

Wolf, G.; Gabay, E.; Tal, M.; Yirmiya, R.; Shavit, Y. Genetic impairment of interleukin-1 signaling attenuates neuropathic pain, autotomy, and spontaneous ectopic neuronal activity, following nerve injury in mice. *Pain*. 120: 315-324, 2006.

Wolf, G.; Livshits, D.; Beilin, B.; Yirmiya, R.; Shavit, Y. Interleukin-1 signaling is required for induction and maintenance of postoperative incisional pain: Genetic and pharmacological studies in mice. *Brain Behav Immun*. 22: 1072-1077, 2008.

Woolf, C.J. Central sensitization: Implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain*. 152: 2-15, 2011.

Woolf, C.J. What is this thing called pain? *J Clin Invest*. 120: 3742-3744, 2010.

Woolf, C.J.; Ma, Q. Nociceptors: noxious stimulus detectors. *Neuron*. 55: 353-364, 2007.

Wrigley, P.J.; Jeong, H.J.; Vaughan, C.W. Dissociation of μ - and δ -opioid inhibition of glutamatergic synaptic transmission in superficial dorsal horn. *Mol Pain*. 6: 71, 2010.

Wu, C.L; Raja, S.N. Treatment of acute postoperative pain. *Lancet*. 377: 2215–2225, 2011.

Wu, L.J.; Sweet, T.B.; Clapham, D.E. International union of basic and clinical pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family. *Pharmacol Rev*. 62: 381–404, 2010.

Xie, H.; Yan, M.C.; Jin, D.; Liu, J.J.; Yu, M.; Dong, D.; Cai, C.C.; Pan, S.L. Studies on antidepressant and antinociceptive effects of ethyl acetate extract from *Piper laetispicum* and structure–activity relationship of its amide alkaloids. *Fitoterapia*. 82: 1086–1092, 2011.

Xie, R.G.; Gao, Y.J; Park, C.K.; Lu, N.; Luo, C.; Wang, W.T.; Wu, S.X.; Ji, R.R. Spinal CCL2 Promotes central sensitization, long-term potentiation, and inflammatory pain via CCR2: further insights into molecular, synaptic, and cellular mechanisms. *Neurosci Bull*. 34: 13-21, 2017.

Xing, F.; Kong, C.; Bai, L.; Qian, J.; Yuan, J.; Li, Z.; Zhang, W.; Xu, J.T. CXCL12/CXCR4 signaling mediated ERK1/2 activation in spinal cord contributes to the pathogenesis of postsurgical pain in rats. *Mol Pain*. 13:1744806917718753, 2017.

Xu, X.J.; Hao, J.X.; Seiger, A.; Wiesenfeld-Hallin, Z. Systemic excitatory amino acid receptor antagonists of the alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor and of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor relieve mechanical hypersensitivity after transient spinal cord ischemia in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 267: 140-144, 1993.

Yadav, V.; Jayalakshmi, S.; Singla, R.K. Traditional Systems of Medicine: Now & Forever. *Pharm Sci*. 3: WMC003299, 2012.

Yao, Y.; Tan, Y.H.; Light, A.R.; Mao, J.; Yu, A.C.; Fu, K.Y. Alendronate Attenuates Spinal Microglial Activation and Neuropathic Pain. *J Pain*. 17: 889-903, 2016.

Zahn, P.; Pogatzki-Zahn, E.; Brennan, T. Spinal administration of MK-801 and NBQX demonstrates NMDA independent dorsal horn sensitization in incisional pain. *Pain*. 114: 499–510, 2005.

Zahn, P.K.; Brennan, T.J. Primary and secondary hyperalgesia in a rat model for human postoperative pain. *Anesthesiol*. 90: 863–872, 1999.

Zahn, P.K.; Pogatzki, E.M.; Brennan, T.J. Mechanisms for pain caused by incisions. *Reg Anesth Pain Med*. 27: 514–516, 2002.

Zakaria, Z.A.; Patahuddi, H.; Mohama, A.S.; Israf, D.A.; Sulaiman. M.R. *In vivo* anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of the aqueous extract of the leaves of *Piper sarmentosum*. *J Ethnopharmacol*. 128: 42–48, 2010.

Zhang, R.; Tian, A.; Shi, X.; Yu, H.; Chen, L. Downregulation of IL-17 and IFN-gamma in the optic nerve by beta-elemene in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Int Immunopharmacol*. 10: 738-743, 2010.

Zhang, R.; Tian, A.; Zhang, H.; Zhou, Z.; Yu, H.; Chen, L. Amelioration of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by β -elemene Treatment is Associated with Th17 and Treg Cell Balance. *J Mol Neurosci*. 44: 31–40, 2011.

Zhao, M.; Isami, K.; Nakamura, S.; Shirakawa, H.; Nakagawa, T.; Kaneko, S. Acute cold hypersensitivity characteristically induced by oxaliplatin is caused by the enhanced responsiveness of TRPA1 in mice. *Mol Pain*. 8:55, 2012.

Zimmermann, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*. 16: 109-110, 1983.

Zimmermann, M. Pathobiology of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol*. 429: 23–37, 2001.

Zhou, J.; He, L.L.; Ding, X.F.; Yuan, Q.Q.; Zhang, J.X.; Liu, S.C.; Chen, G. Combinatorial Antitumor Effect of Rapamycin and β -Elemene in Follicular Thyroid Cancer Cells. *Biomed Res Int.* 2016: 6723807, 2016.

Zhong, Y.; Liu, J.; Huo, W.M.; Duan, W.L.; Wang, X.; Shang, J. β -Elemene reduces the progression of atherosclerosis in rabbits. *Chin J Nat Med.* 13: 415-420, 2015.