



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

Catharina Nucci

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DO EXTRATO ETANÓLICO DOS
FRUTOS DA *Pterodon pubescens* Benth. NO CONTROLE DA
DOR AGUDA E CRÔNICA**

Florianópolis
2014

Catharina Nucci

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DO EXTRATO ETANÓLICO DOS
FRUTOS DA *Pterodon pubescens* Benth. NO CONTROLE DA
DOR AGUDA E CRÔNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos

Coorientador: Prof. Dr. Daniel Fernandes Martins

Florianópolis
2014

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

Nucci, Catharina

Potencial terapêutico do extrato etanólico dos frutos da *Pterodon pubescens* Benth. no controle da dor aguda e crônica / Catharina Nucci ; orientador, Adair Roberto Soares dos Santos ; coorientador, Daniel Fernandes Martins. - Florianópolis, SC, 2014.
179 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

Inclui referências

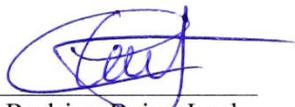
1. Neurociências. 2. *Pterodon pubescens*. 3. dor aguda. 4. dor crônica. 5. glutamato. I. Santos, Adair Roberto Soares dos. II. Martins, Daniel Fernandes. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. IV. Título.

CATHARINA NUCCI

**“POTENCIAL TERAPÊUTICO DO EXTRATO
ETANÓLICO DOS FRUTOS DA *PTERODON
PUBESCENS BENTH.* NO CONTROLE DA DOR AGUDA
E CRÔNICA”**

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

Florianópolis, 06 de março de 2014.



Prof. Rodrigo Bairy Leal
Coordenador do Curso

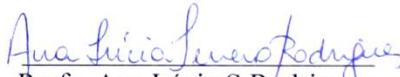
Banca Examinadora:



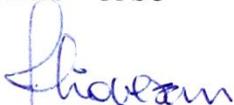
Prof. Adair Roberto Soares dos Santos
Orientador – UFSC



Prof. Alex Rafacho
Membro – UFSC



Profa. Ana Lúcia S. Rodrigues
Membro - UFSC



Profa. Anna Paula Piovezan
Membro externo à UFSC



Prof. Marcelo Maraschin
Membro - UFSC



Esta pesquisa é dedicada a todas as mulheres da Pastoral da Saúde de Florianópolis, em reconhecimento ao trabalho voluntário que prestam à sociedade.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a **Deus** pelo despertar da fé que torna tudo possível.

Gostaria de fazer um agradecimento e uma homenagem especial à minha mãe, **Ivanilda de Oliveira Nucci** (*in memoriam*), por ter sido esta mulher guerreira e determinada que tenho como exemplo de vida; por ter sempre me motivado a estudar, mesmo em uma família com tão poucos recursos e ambições. Também por ter me ensinado a ser forte, mesmo nos momentos mais difíceis, quando estava próxima de partir, me pedindo para continuar, pois seu grande sonho era me ver professora. Mãe, prometo não desapontá-la! Descanse em paz em sua nova jornada repleta de luz até que nós, suas filhas, possamos reencontrá-la.

A **todas as minhas irmãs**, Mônica, Michela, Sílvia e Mariela, por fazerem parte da minha vida, me apoiando e incentivando, mesmo sem entenderem absolutamente nada sobre a carreira acadêmica que escolhi seguir. Também as agradeço pelo carinho e risadas nos vários momentos de descontração desta “família buscapé”, à qual tenho muito orgulho de pertencer.

Ao meu marido, **Rene Juliano Martins**, um homem encantador, extremamente calmo, que consegue atenuar a minha agitação transmitindo paz. Sempre disposto a ajudar a todos ao seu redor. Companheiro e atencioso, fez parte deste trabalho do começo ao fim, me apoiando emocionalmente e tecnicamente! Te amo e te admiro muito!

A **todas as mulheres da Pastoral da Saúde de Florianópolis** pelo trabalho de amor e doação em prol da saúde da comunidade carente local. Agradeço, em especial, uma das organizadoras mais antigas, a **Celita** pela atenção, carinho e dedicação que sempre me deu. Uma pessoa iluminada, por quem tenho muita admiração e respeito e que contribuiu grandiosamente para minha formação como cidadã.

Ao meu orientador professor **Dr. Adair Roberto Soares dos Santos**, por ter acreditado em mim, possibilitando que eu me apropriasse de tantos conhecimentos no Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação (LANDI) da UFSC. Também gostaria de expressar a minha profunda gratidão pela ajuda e suporte emocional que o professor e sua esposa **Daniella Lima** deram com tanta sabedoria a mim e a minha família neste momento tão difícil de perda. Ainda, por me acolher junto à sua família durante o período da minha mudança para Campinas-SP.

Ao meu coorientador **Dr. Daniel Fernandes Martins** e sua esposa **Dra. Leidiane Mazzardo Martins**, dois anjos em minha vida. Expresso aqui minha imensa gratidão pela amizade e pela paciência com que me conduziram neste caminho do conhecimento no Laboratório de Neurociências Experimental (LaNex) da UNISUL. Agradeço também pela disposição e carinho nas tantas vezes que precisei de ajuda profissional e pessoal.

Aos professores **Alesio dos Passos** e **César Simionato** por despertarem minha paixão pelas plantas medicinais, o que, de certa forma, me incentivou a iniciar esta pesquisa.

A profa. **Dra. Andreza Fabro de Bem** pela confiança depositada e ajuda que me possibilitaram ingressar no mestrado.

A **Maria Célia Martins** e **Vivianne Chelio** por conseguirem os frutos de *Pterodon pubescens* junto ao Jardim Botânico de Brasília, viabilizando a realização da minha pesquisa.

Aos meus “paizinhos de coração”, **Marivalda e Luiz Fulco**, por estarem sempre presentes em minha vida me cobrindo de amor, incentivo e apoio.

A todo o pessoal do LANDI da UFSC, em especial a **Ana Paula Luiz, Daniela Secco, Igor Coelho, Deise Montrucchio** e **Marina Machado Córdova**, pela amizade, paciência e auxílio para expandir meus conhecimentos em toda a minha trajetória no laboratório.

A todo o pessoal do LaNex da UNISUL, em especial aos meus super amigos **Ana Paula Batisti** e **Thiago César Martins**, pela amizade repleta de tantos momentos especiais divididos entre conversas, brincadeiras, incentivos e ajuda mútua. Também a **Juliana Stramosk e Daniela Ludtke** pela amizade e ajuda inicial neste trabalho.

Ao **Leandro Flores, Ane Francyne Costa e Stephanie Syracuse** pela amizade, parceria e oportunidade de aprendizado com quem está aprendendo. Também pelas brincadeiras e risadas nos momentos de descontração entre os intervalos dos experimentos.

A todas as pessoas com as quais tive a oportunidade de realizar colaborações: **Leandro Flores, Andressa Souza, Aldo Sena, Dalila Venzke, Francieli Kanumfre de Carvalho e Fernanda da Rocha Lapa**. Aprendi muito com todos vocês!

À professora **Dra. Silvia Parcias**, por ter me iniciado neste caminho da Neurociência ainda na graduação, me concedendo a oportunidade de ser sua monitora na disciplina de Neuroanatomia para as turmas de medicina da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL) por quatro anos consecutivos. Esta experiência não só me despertou a paixão pela Neurociência, mas também me proporcionou

uma bagagem imprescindível para ingressar e conduzir meu mestrado com sucesso!

A todas as pessoas que fizeram parte da “**Família Anatômico**”: coordenador, técnico responsável, professores, monitores e estagiários do Laboratório de Anatomia Humana da UNISUL, nos quatro anos em que trabalhamos juntos. Pessoas especiais que levo em meu coração!

À professora **Dra. Rosane Porto Seleme Heinzen**, pela oportunidade de exercer estágio de docência em Neuroanatomia com as turmas de Medicina e Psicologia da UFSC, durante os meus dois anos de mestrado. Também, por ter me passado com tanta sabedoria, conhecimento profissional e pessoal no período em que trabalhamos juntas. Devo ressaltar que és um grande exemplo de didática em sala de aula, o que certamente somou e contribuirá muito para minha formação como professora.

Aos técnicos responsáveis pelo Laboratório de Anatomia Humana da UFSC, em especial a **Cristiane Meneghelli** e **Thiago Medeiros Rocha** pela amizade e exemplo de excelência de trabalho que levo em minha formação! Também pela ajuda e prontidão nas tantas vezes que precisei de auxílio técnico.

Aos funcionários da UFSC: **Nivaldo Manoel Vicente**, secretário exemplar da Pós-graduação em Neurociências, por sua eficiência e prontidão; **Dona Vilma** e **Sr. Carlos**, pela amizade e conversas nos momentos de café, ajudando a relaxar para retomar o trabalho.

Aos **camundongos**, por serem instrumentos fundamentais para minha pesquisa.

À **UFSC** e ao **Programa de Pós-Graduação em Neurociências** por todo o apoio.

À **CAPES** por financiar minha bolsa de mestrado.

A todos vocês...

MUITO OBRIGADA!

“Uma atitude decidida nos faz olhar para dentro de nós mesmos a fim de que possamos verificar se estamos nos movendo em direção às nossas metas ou se, descuidados, estamos nos afastando delas sem perceber”.

(Jael Coaracy - Psicóloga e Colunista)

RESUMO

A planta medicinal *Pterodon pubescens* tem sido tradicionalmente utilizada para tratamento de doenças reumáticas. O presente estudo teve como objetivo avaliar o perfil fitoquímico e o efeito antinociceptivo do extrato etanólico dos frutos de *Pterodon pubescens* (EPP) em modelos de dor aguda e crônica, bem como investigar o possível mecanismo adjacente a este efeito em camundongos. Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos Swiss machos e fêmeas adultos (25 a 35 g) com aproximadamente 2 meses de idade. A análise fitoquímica do extrato evidenciou a presença de dezesseis compostos, sendo nove sesquiterpenos e sete diterpenos com esqueleto vouacapano, boa quantidade de conteúdo fenólico com pouca quantidade de flavonoides. O EPP administrado 1 hora antes dos experimentos por via intragástrica (3-300 mg/kg, i.g.), mimetizando a via (oral) utilizada em seres humanos, promoveu redução da nocicepção de origem neurogênica (1ª fase) e inflamatória (2ª fase) induzida pela injeção intraplantar de formalina. O EPP (30 e 300 mg/kg, i.g.) também inibiu de forma significativa e dependente da dose a nocicepção induzida pela injeção intraplantar ou intratecal de glutamato. Ademais, o EPP (30 e 300 mg/kg, i.g.) também inibiu a resposta nociceptiva induzida pela injeção intratecal de agonistas glutamatérgicos do tipo ionotrópico (cainato e NMDA), e metabotrópico mGLUR 1 e 5 (pelo agonista trans-ACPD), bem como de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) e ativadores dos receptores de potencial transiente vanilóide-1 (TRPV1) e anquirina-1 (TRPA1), capsaicina e cinamaldeído, respectivamente. O tratamento agudo ou prolongado com o EPP diminuiu a hiperalgesia mecânica e térmica (calor e frio) causada pela cirurgia de incisão plantar (CIP – dor pós-operatória), e pela ligadura parcial do nervo isquiático (LPNI – dor neuropática); bem como a hiperalgesia mecânica no modelo animal de síndrome da dor complexa regional do tipo I (SDCR-I) induzida pela isquemia e reperfusão da pata (IRP), sem induzir efeito de tolerância ou mesmo interferir na atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto. Finalmente, a administração prolongada do EPP durante 10 dias não promoveu alterações macroscópicas nos órgãos vitais (fígado, coração, baço, rins e pulmões), nem de indicadores bioquímicos de lesão hepática (atividade das enzimas AST, ALT e GGT) e renal (concentrações séricas de creatinina, uréia e ácido úrico). Tomados em conjunto, os resultados do presente estudo demonstram que o efeito antinociceptivo do EPP se deve, em parte, pelo antagonismo da sinalização glutamatérgica,

reduzindo a ativação dos receptores de citocinas pró-inflamatórias e canais TRPV1 e TRPA1. Assim, os resultados do presente estudo suportam o uso popular da planta medicinal *Pterodon pubescens* por indicar que o EEPp possui eficácia e relativa segurança para o tratamento da dor aguda e crônica. Além disto, este estudo agrega novas evidências científicas e destaca o potencial da planta medicinal *Pterodon pubescens* no desenvolvimento de um fitoterápico.

Palavras-chave: *Pterodon pubescens*, dor pós-operatória, síndrome da dor complexa regional tipo I, dor neuropática, glutamato, TRPA1, TRPV1, camundongos.

ABSTRACT

The medicinal plant *Pterodon pubescens* has traditionally been used to treat rheumatic diseases. The present study aimed to evaluate the phytochemical profile and the analgesic effect of the ethanolic extract of fruits of *Pterodon pubescens* (EPP) in models of acute and chronic pain in mice, as well as to investigate the possible mechanism underlying this effect in mice. The experiments were conducted using 2-month-old adult (25 to 35 g) male and female Swiss mice. The phytochemical analysis of the extract showed the presence of sixteen compounds: nine sesquiterpenes and seven diterpenes with vouacapan skeleton, as well as a reasonable amount of phenolic content and a small amount of flavonoids. The EPP (3-300 mg/kg, i.g.) administered intragastrically, mimicking the (oral) route used in humans, reduced the neurogenic (first phase) and inflammatory (second phase) nociception induced by intraplantar formalin injection. Moreover, the EPP (30 and 300 mg/kg, i.g.) inhibited significantly, in a dose-dependent manner, the nociception induced by intraplantar or intrathecal injection of glutamate. Furthermore, EPP (30 and 300 mg/kg, i.g.) also inhibited the nociceptive response induced by intrathecal injection of ionotropic (kainate and NMDA) and metabotropic mGluR 1 and 5 (trans-ACPD) glutamate agonists, pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1 β), as well as activators of transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) and ankyrin-1 (TRPA1), capsaicin and cinnamaldehyde, respectively. The acute or long-term treatment with EPP reduced mechanical and thermal (heat and cold) hyperalgesia caused by plantar incision surgery (postoperative pain), and by partial sciatic nerve ligation (neuropathic pain), as well as mechanical hyperalgesia in an animal model of complex regional pain syndrome type I induced by ischemia-reperfusion injury in mouse paw, without inducing tolerance effect or even interfere in locomotor activity of animals in open field test. Finally, the daily administration of EPP for 10 days did not cause changes in the macroscopic observation of vital organs, such as liver, heart, spleen, kidney and lung, as well as biochemical indicators of liver injury (AST, ALT and GGT enzymes activities) and renal failure (serum creatinine, urea and uric acid). Taken together, the results of this study show that the antinociceptive effect of EPP is due, in part, to antagonism of glutamatergic signaling, reducing the activation of pro-inflammatory cytokines receptors and TRPV1 and TRPA1 channels. Thus, the results of this study support the popular use of medicinal plant *Pterodon pubescens* by indicating that the EPP has efficacy and relative safety

for the treatment of acute and chronic pain. Moreover, this study adds new scientific evidence and highlights the potential of medicinal plant *Pterodon pubescens* in the development of a phytotherapeutic.

Keywords: *Pterodon pubescens*, postoperative pain, complex regional pain syndrome, neuropathic pain, glutamate, TRPA1, TRPV1, mice.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fibras sensoriais aferentes primárias e suas características.	32
Figura 2 – Principais vias ascendentes da transmissão nociceptiva.	33
Figura 3 – Anatomia da via da dor.	35
Figura 4 – Receptores glutamatérgicos.	36
Figura 5 – O ciclo de glutamato-glutamina.	38
Figura 6 – Representação esquemática dos onze termo-TRPs de mamíferos, indicando a sensibilidade à temperatura de cada um.	40
Figura 7 – A ativação e sensibilização de canais iônicos TRPs em neurônios sensoriais após lesão.	41
Figura 8 – Formação de espécies reativas de oxigênio e mecanismos antioxidantes nos sistemas biológicos.	44
Figura 9 – Sinais clínicos de uma incisão nos pés.	47
Figura 10 – Sinais clínicos da síndrome da dor complexa regional em humanos.	50
Figura 11 – Modelos experimentais de dor neuropática.	53
Figura 12 – Sinais clínicos da ciatalgia.	54
Figura 13 – Comércio popular de plantas medicinais.	56
Figura 14 – Modificações a partir da estrutura do ácido salicílico.	58
Figura 15 – Metabolismo vegetal.	60
Figura 16 – Biossíntese de terpenos e esteroides.	61
Figura 17 – Morfologia das espécies do gênero <i>Pterodon</i>	63
Figura 18 – Estrutura fundamental dos diterpenos vouacapânicos.	64
Figura 19 – Camundongos Swiss.	69
Figura 20 – Administração por gavagem.	71
Figura 21 – Árvore e frutos da <i>Pterodon pubescens</i> Benth.	72
Figura 22 – Extrato etanólico de <i>Pterodon pubescens</i>	73
Figura 23 – Cromatógrafo gasoso com detector por espectrometria de massas.	74
Figura 24 – Espectrofotômetro.	75
Figura 25 – O aparato de campo aberto.	76
Figura 26 – Teste da Formalina.	78
Figura 27 – Aparato utilizado para mensuração do edema de pata.	78
Figura 28 – Teste do glutamato na pata.	79
Figura 29 – Avaliação por injeção intratecal.	81
Figura 30 – Padronização do cinamaldeído intratecal.	82
Figura 31 – Os diferentes estágios do procedimento cirúrgico de incisão plantar.	83

Figura 32 –Esquema cronológico das avaliações da dor pós-operatória.	84
Figura 33 –Pata de camundongos antes, durante e após a isquemia e reperfusão.....	85
Figura 34 –Esquema cronológico das avaliações da isquemia e reperfusão da pata.	86
Figura 35 –Ligadura parcial do nervo isquiático.....	87
Figura 36 –Esquema cronológico das avaliações da ligadura parcial do nervo isquiático.	88
Figura 37 –Teste de von Frey.....	90
Figura 38 –Placa quente-fria.....	91
Figura 39 –Perfil químico do extrato de <i>Pterodon pubescens</i> por CG-EM.....	96
Figura 40 –Efeito do tratamento agudo do EEPp sobre a atividade locomotora espontânea dos animais.	99
Figura 41 –EEPp reduz a nociceção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos.	100
Figura 42 –EEPp reduz a nociceção induzida pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos.....	101
Figura 43 –EEPp reduz a resposta nociceptiva provocada pela injeção intratecal de agonistas glutamatérgicos.	102
Figura 44 –EEPp reduz a resposta nociceptiva provocada pela injeção intratecal de citocinas pró-inflamatórias.....	103
Figura 45 –EEPp diminui a resposta nociceptiva provocada pela injeção intratecal de capsaicina e cinamaldeído.....	104
Figura 46 –EEPp diminui a hiperalgesia mecânica no modelo animal de dor pós-operatória induzida por CIP.	105
Figura 47 –EEPp reduz a hiperalgesia térmica (calor e frio) induzida pela CIP.....	106
Figura 48 –EEPp diminui a hiperalgesia mecânica no modelo animal de dor pós-isquemia crônica induzida pela IRP.	108
Figura 49 –EEPp reduz a hiperalgesia mecânica no modelo animal de dor neuropática induzida pela LPNI.....	110
Figura 50 –EEPp diminui a hiperalgesia térmica (calor e frio) induzida pela LPNI.	112
Figura 51 –Efeito do tratamento prolongado com o EEPp sobre a atividade locomotora dos animais após LPNI.....	113
Figura 52 –Efeito do extrato de <i>Pterodon pubescens</i> na eliminação do radical DPPH.....	115
Figura 53 –Provável mecanismo de ação do EEPp.	124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química do EEPp.	95
Tabela 2 – Dados espectrais do extrato de <i>Pterodon pubescens</i> determinado por CG-EM.	97
Tabela 3 – Conteúdo total de fenóis e de flavonoides do extrato de <i>Pterodon pubescens</i>	98
Tabela 4 – Efeito do extrato etanólico de <i>Pterodon pubescens</i> , em parâmetros de função hepática e renal de camundongos swiss, após LPNI.	114
Tabela 5 – Atividade antioxidante do extrato de <i>Pterodon pubescens</i>	116

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 5-HT – 5-hidroxitriptamina; serotonina
AINEs – anti-inflamatórios não esteroidais
AITC – Isotiocianato de alilo
AlCl₃ – Cloreto de alumínio
ALT – Alanina aminotransferase
AMPA – α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato
ANKTM1 – Proteína semelhante à anquirina com domínio transmembrana
Apaf-1 – Fator apoptótico ativador de protease-1
AST – Aspartato aminotransferase
ATP – Trifosfato de adenosina
BDNF – Fator neurotrófico derivado do encéfalo
BHT – Hidroxitolueno butilado
Ca²⁺ – íon cálcio
CAT – Catalase
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
CG-EM – Cromatógrafo gasoso com detector por espectrometria de massas
CGRP – Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CIP – Cirurgia de incisão plantar
CNBB – Conferência Nacional dos Bispos do Brasil
DAG – diacilglicerol
DI₅₀ – Doses necessárias para reduzir a resposta nociceptiva em 50%
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DNMT – DNA metiltransferase
DPIC – Dor pós-isquemia crônica
DPPH – 2,2-difenil-picril-hidrazil
E.P.M. – Erro padrão da média
EAAs – Ação de aminoácidos excitatórios
EAAT – Transportador de aminoácido excitatório (glutamato)
EDTA – Ácido etilendiaminotetracético
EEPp – Extrato etanólico de *Pterodon pubescens*
EROs – Espécies reativas de oxigênio
ERN – Espécies reativas de nitrogênio
Fe²⁺ – íon ferro II, ferroso
Fe³⁺ – íon ferro III, férrico
FeCl² – Cloreto de Ferro
FHPp – Fração hexânica de *Pterodon pubescens*

GDNF – Fator neurotrófico derivado da glia
GGT – gama-glutamil transferase
GLn – Glutamina
Glu – Glutamato
GPCR – Receptor acoplado a proteína G
GPX – Glutathione peroxidase
GSH – Glutathione
H – Hidrogênio
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
HEPp – Extrato hidroalcoólico de sementes *Pterodon pubescens*
iGLUR – Receptor glutamatérgico ionotrópico
i.g. – Intra gástrica
i.p. – Intraperitoneal
i.pl. – Intraplantar
i.t. – Intratecal
IASP – Associação Internacional para o Estudo da Dor
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL-10 – Interleucina 10
IL-1RA – Interleucina 1 ra
IL-1β – Interleucina-1 beta
IL-6 – Interleucina-6
IP₃ – Inositol trifosfato
IPP – Pirofosfato de isopentenilo
IR – Índice de retenção
IRP – Isquemia de reperfusão da pata
LANDI – Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação
LPNI – Ligadura parcial do nervo isquiático
mGLUR – Receptor glutamatérgico metabotrópico
mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro
NA – Noradrenalina
Na⁺ – íon sódio
Na²CO³ – Carbonato de sódio
NAC – N-acetilcisteína
NaCl – Cloreto de sódio
NADPH - Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NGF – Fator de Crescimento Neuronal
NMDA – N-metil-D-aspartato
NO – Óxido nítrico
NT-3 – Neurotrofina-3
O₂ – Oxigênio
OH – Hidroxila

OMS – Organização Mundial da Saúde
PCPA – p-clorofenilalanina éster metílico
PIP₂ – fosfatidilinositol bifosfato
PKC – Proteína cinase C
PNPIC – Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
RE – Retículo endoplasmático
SDCR – I - Síndrome da dor complexa regional tipo I
SDCR – Síndrome da dor complexa regional
SNC – Sistema nervoso central
SOD – Superóxido dismutase
SP – substância P
SUS – Sistema Único de Saúde
TNF- α – Fator de necrose tumoral-alfa
TR – Tempo de retenção
trans-ACPD – (\pm)-1-aminociclopentano-trans-1,3- ácido dicarboxílico
TRPA1 – Receptor de potencial transiente anquirina-1
TRPM8 – Receptor de potencial transiente melastina-8
TRPs – Receptores de potencial transiente
TRPV1 – Receptor de potencial transiente vanilóide-1
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO	29
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	31
2.1	DOR E NOCICEPÇÃO	31
2.2	NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA	36
2.3	RECEPTORES DE POTENCIAL TRANSITÓRIO – TRPS	39
2.3.1	O papel dos canais TRPV1.....	40
2.3.2	O papel dos canais TRPA1.....	42
2.4	ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E SEUS EFEITOS BIOLÓGICOS	43
2.5	DOR PÓS-OPERATÓRIA	46
2.5.1	Incisão plantar.....	48
2.6	DOR NEUROPÁTICA	48
2.6.1	Síndrome da dor complexa regional	50
2.6.2	Ligadura parcial do nervo isquiático	53
2.7	AS PLANTAS MEDICINAIS COMO FONTES DE FITOTERÁPICOS	56
2.7.1	Metabolismo vegetal secundário.....	59
2.8	O GÊNERO <i>Pterodon</i>	62
2.8.1	Atividade biológica da <i>Pterodon pubescens</i> Benth.	65
2.9	OBJETIVOS	68
2.9.1	Objetivo geral.....	68
2.9.2	Objetivos específicos	68
3	MATERIAL E MÉTODOS	69
3.1	ANIMAIS	69
3.2	DROGAS E REAGENTES	70
3.3	PREPARAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL: <i>Pterodon</i> <i>pubescens</i> Benth.	71
3.4	ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO DE <i>Pterodon</i> <i>pubescens</i> Benth.	73
3.4.1	Avaliação por CG-EM do EEPp.....	73
3.4.2	Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais	74
3.4.3	Determinação do conteúdo de flavonoides.....	75
3.5	AVALIAÇÃO LOCOMOTORA: TESTE DO CAMPO ABERTO (OPEN-FIELD).....	76
3.6	MODELOS DE NOCICEPÇÃO AGUDA	77
3.6.1	Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina .	77
3.6.2	Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato .	79

3.6.3	Nociceção induzida pela administração intratecal de aminoácidos excitatórios e citocinas pró-inflamatórias TNF-α e IL-1β	80
3.6.4	Nociceção induzida pela administração intratecal de capsaicina ou cinamaldeído	81
3.6.5	Incisão plantar (dor pós-operatória).....	82
3.7	MODELOS DE NOCICEÇÃO CRÔNICA	84
3.7.1	Dor pós-isquemia crônica (isquemia e reperfusão da pata)....	84
3.7.2	Ligadura parcial do nervo isquiático (dor neuropática).....	86
3.8	TESTES COMPORTAMENTAIS	88
3.8.1	Avaliação da hiperalgesia mecânica (von Frey).....	88
3.8.2	Análise do limiar sensorial térmico ao calor e ao frio (teste da placa fria e quente).....	90
3.9	ANÁLISE TOXICOLÓGICA PRELIMINAR: DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	91
3.10	ANÁLISE DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO EXTRATO DE <i>Pterodon pubescens</i> Benth	92
3.10.1	Captura de radicais livres usando DPPH.....	92
3.10.2	Determinação do poder redutor	93
3.10.3	Ensaio de atividade quelante de Fe²⁺	93
3.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	94
4	RESULTADOS	95
4.1	ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO DE <i>Pterodon Pubescens</i> Benth.....	95
4.1.1	Determinação do conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides.....	98
4.2	AVALIAÇÃO PRELIMINAR AGUDA DA ATIVIDADE LOCOMOTORA DOS ANIMAIS	98
4.3	EFEITO DO EEPp NA NOCICEÇÃO INDUZIDA PELA FORMALINA	99
4.4	EFEITO DO EEPp NA NOCICEÇÃO INDUZIDA PELO GLUTAMATO.....	100
4.5	EFEITO DO EEPp NA NOCICEÇÃO INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO INTRATECAL DE AGONISTAS GLUTAMATÉRGICOS OU DE CITOCINAS PRÓ- INFLAMATÓRIAS	101
4.6	EFEITO DO EEPp NA NOCICEÇÃO INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO INTRATECAL DE CAPSAICINA E CINAMALDEÍDO	103
4.7	EFEITO DO EEPp NA HIPERALGESIA MECÂNICA E TÉRMICA INDUZIDA PELA INCISÃO PLANTAR	104

4.7.1	Hiperalgisia mecânica (CIP)	104
4.7.2	Hiperalgisia térmica (CIP)	105
4.8	EFEITO DO EEP_p NA HIPERALGIESIA MECÂNICA INDUZIDA PELA DOR PÓS-ISQUEMIA CRÔNICA.....	106
4.8.1	Hiperalgisia mecânica (DPIC).....	106
4.9	EEP_p REDUZ HIPERALGIESIA MECÂNICA E TÉRMICA INDUZIDA PELA LPNI	109
4.9.1	Hiperalgisia mecânica (LPNI).....	109
4.9.2	Hiperalgisia térmica (LPNI).....	111
4.9.3	Avaliação da atividade locomotora após LPNI	113
4.10	EFEITO DO EEP_p SOBRE ALGUNS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	114
4.11	POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO EEP_p	115
5	DISCUSSÃO	117
6	CONCLUSÕES	137
7	PERSPECTIVAS	139
8	ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO RELACIONADO COM A DISSERTAÇÃO	141
	REFERÊNCIAS.....	142

1 APRESENTAÇÃO

O trabalho de pesquisa desta dissertação foi motivado por observações feitas na Pastoral da Saúde de Florianópolis, durante dois anos de estágio voluntário, onde a planta medicinal *Pterodon pubescens*, conhecida popularmente como sucupira, se mostrou eficaz para o tratamento de dores articulares crônicas, como gota, artrite reumatóide, artrose, bursite, lombalgia e osteoporose. A Pastoral da Saúde é uma das Pastorais Sociais da Conferência Nacional dos Bispos do Brasil (CNBB), com organização cívico-religiosa, sem fins lucrativos, de atuação em âmbito nacional e de referência internacional, comprometida em defender, preservar, cuidar e promover saúde em todo o território nacional.

Em 3 de maio de 2006, com a aprovação da portaria 971, da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), foi instituída a Resolução-RDC10/2010, que regula o uso de várias plantas medicinais para tratamento de saúde no SUS, por ser um recurso eficaz, de baixo custo, aceito culturalmente e de baixo risco. Estas medidas do Ministério da Saúde estimulam a redução dos gastos com medicamentos no setor público, além de incentivar a criação de vários hortos medicinais, chamados “Farmácias Vivas”, para auxílio no tratamento de saúde em comunidades carentes. Este papel vem sendo desenvolvido no Brasil, principalmente pelas Pastorais da Saúde.

A Arquidiocese de Florianópolis, junto à Pastoral da Saúde, há inúmeros projetos voltados para a fitoterapia. Um destes projetos, uma “Farmácia Viva” para o atendimento da comunidade carente local, foi desenvolvido pela Associação Vida Verde, a primeira sucursal da Pastoral da Saúde de Florianópolis, atuante desde 06/12/1995 na Paróquia São Francisco Xavier, localizada no bairro Monte Verde. Com o apoio da igreja e dos médicos do posto de saúde do bairro, o suporte dos professores César Simionato e Alesio dos Passos, e o auxílio de colaboradoras voluntárias, tanto da comunidade quanto de diversos cursos de graduação da área da saúde, a Pastoral da Saúde de Florianópolis busca resgatar e valorizar a sabedoria popular, fortalecendo o uso adequado das plantas medicinais e auxiliando a comunidade no processo de educação em saúde. Além disso, na “Farmácia Viva” da Pastoral da Saúde de Florianópolis é possível encontrar uma grande variedade de produtos naturais produzidos de forma artesanal por suas colaboradoras, como tinturas, pomadas, cremes

e géis, sabões e shampoos, xaropes, multimistura (suplementação alimentar) e óleo para dor de ouvido.

Desse modo, este trabalho desenvolvido no Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação (LANDI), no Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina vem contribuir, valorizar e dar embasamento científico ao uso popular da planta medicinal *Pterodon pubescens* no tratamento de dor crônica, feito empiricamente no Brasil há anos.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 DOR E NOCICEPÇÃO

O organismo possui diversos sistemas responsáveis pelo controle da homeostasia, dentre eles a dor tem papel de destaque, pois atua como um mecanismo de alerta do organismo, “informando” que algo pode ameaçar o bem-estar do indivíduo, retendo atenção do mesmo até que a sua causa seja identificada e controlada (WALL, 1999). Neste sentido, a dor é um parâmetro clínico importante para a detecção e avaliação de diversas doenças nos seres humanos.

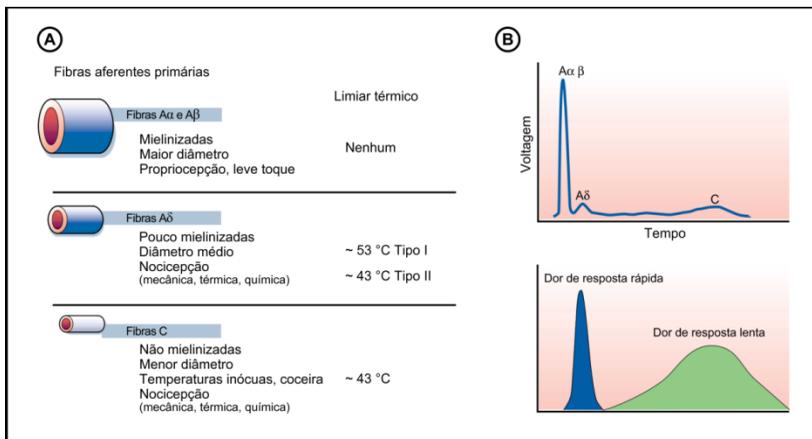
A dor foi definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor como sendo “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada com a lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal lesão” (LOESER; TREEDE, 2008). Entretanto, sua percepção é complexa e não envolve apenas a transdução de um estímulo nocivo, mas também processos emocionais e cognitivos no cérebro humano (JULIUS; BASBAUM, 2001). Assim, pode-se dizer que a dor é influenciada por fatores tanto fisiológicos quanto psicológicos e, por isso, em animais a avaliação é indireta, sendo verificado apenas o componente fisiológico da dor, denominado nocicepção (Tjølsen; Hole, 1997). No entanto, tornou-se uma convenção o uso do termo “dor” para humanos e animais.

A recepção do estímulo nociceptivo em nível periférico se dá por estruturas específicas situadas na camada mais superficial da pele (epiderme) e são chamadas de terminações nervosas livres, das fibras sensoriais, denominadas nociceptores. Os nociceptores estão localizados na porção terminal dos neurônios aferentes que estão amplamente distribuídos na pele, vasos sanguíneos, músculos, articulações e vísceras. Porém a maioria das informações nociceptivas vindas da periferia ao SNC é fornecida pela pele, pois a maior parte dos nociceptores está distribuída neste tecido. Assim, a pele atua como barreira corpórea a estímulos externos (KANDEL; SCHWARTZ; JESSEL, 2003).

As fibras que estão relacionadas com a detecção de estímulos nocivos são do tipo A δ e C, pouco ou não mielinizadas e de menor diâmetro, enquanto que as fibras do tipo A α e A β , mielinizadas e de maior diâmetro, são responsáveis pela detecção de estímulos mecânicos inócuos, estando relacionadas ao tato e propriocepção (Fig. 1A-B). Os nociceptores são receptores sensíveis a diferentes estímulos de caráter nocivo que incluem os térmicos, mecânicos ou químicos. No entanto, a

sinalização química é provavelmente a mais comum e a que apresenta diversas formas de geração de sinal nos neurônios sensoriais (BESSON; CHAOUCH, 1987; DRAY, 1997; BESSON, 1999; MILLAN, 1999; KANDEL; SCHWARTZ; JESSEL, 2003).

Figura 1 – Fibras sensoriais aferentes primárias e suas características.



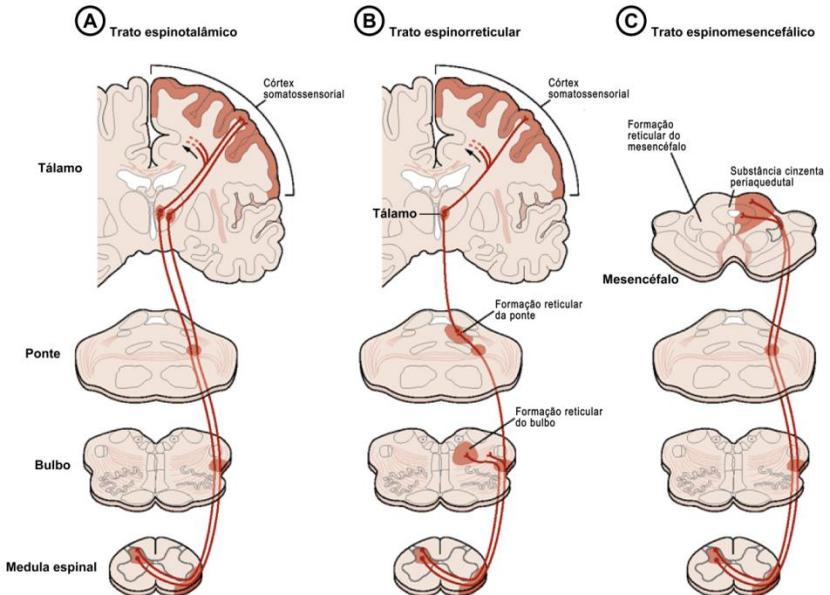
Diferentes tipos de fibras sensoriais detectam diferentes tipos de estímulos. Enquanto as fibras mielinizadas e de maior diâmetro (fibras Aα e Aβ) são responsáveis pela detecção de estímulos não nocivos, as fibras de menor diâmetro, pouco ou não mielinizadas (fibras Aδ e C, respectivamente) são responsáveis pela detecção de estímulos nocivos (A). A velocidade de condução está relacionada ao diâmetro da fibra (B), sendo as fibras do tipo Aδ responsáveis pela resposta rápida e as fibras do tipo C responsáveis pela resposta lenta. Fonte: Adaptado de Julius e Basbaum (2001).

Em termos de duração, um episódio de dor pode ser agudo ou crônico. Na dor aguda, ocorre ativação dos nociceptores em resposta a qualquer lesão tecidual. Se persistir mais que alguns dias ou semanas, então passa a ser considerada como dor crônica. (LOESER; MELZACK, 1999). As fibras Aδ possuem diâmetro médio, são mielinizadas e responsáveis pela detecção de estímulos associados à dor aguda (Fig. 1B). São ainda subdividas em Tipo I, as quais respondem tanto a estímulos químicos quanto mecânicos, com limiar de ativação térmico elevado (>50°C), e Tipo II, as quais apresentam menor limiar de ativação térmico (<43°C), porém elevado limiar de ativação mecânica. Já as fibras do tipo C, possuem pequeno diâmetro e não são mielinizadas, também são polimodais, ou seja, respondem tanto a

estímulos térmicos quanto mecânicos e químicos, porém apresentam uma menor velocidade de condução e estão associadas à dor secundária, lenta e difusa (Fig. 1B), geralmente associada a quadros de dor crônica (MILLAN, 1999; JULIUS; BASBAUM, 2001; BASBAUM et al., 2009).

O corno posterior da medula espinal funciona como uma estação de controle da transmissão nociceptiva. Nesta região, os neurônios sensoriais primários liberam mediadores como glutamato e substância P, transmitindo o sinal nociceptivo a neurônios de segunda ordem (ou neurônios sensoriais secundários), que por sua vez formam vias ascendentes que transmitem a informação a centros supraespinhais, como o tálamo e o córtex, onde ocorre a localização e a percepção da dor (MILLAN, 2002). As principais vias ascendentes da informação nociceptiva são os tratos espinotalâmico, espinoreticular, espinomesencefálico, cervicotalâmico e espino-hipotalâmico, sendo os três primeiros os maiores (Fig. 2 A-C).

Figura 2 – Principais vias ascendentes da transmissão nociceptiva.



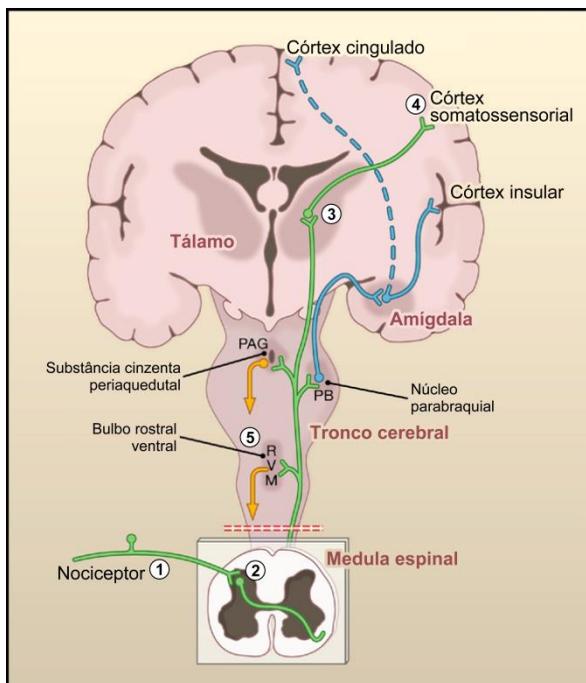
Representação das três maiores vias ascendentes que transmitem informações nociceptivas da medula espinal até centros superiores. O trato espinotalâmico é a mais proeminente via nociceptiva ascendente na medula espinal. Fonte: adaptado de Kandel, Schwartz e Jessel (2003).

No córtex essa informação conduz a percepção da dor e, conseqüentemente elabora uma resposta que pode ser retransmitida à medula espinal por meio de vias motoras descendentes (KANDEL; SCHWARTZ; JESSEL, 2003). O mecanismo descendente pode modular (aumentando ou diminuindo) a nocicepção por interação com vários elementos neuronais no corno posterior, tais como os próprios terminais das fibras aferentes primárias, neurônios de projeção, interneurônios excitatórios ou inibitórios e terminais de outras vias descendentes (Fig. 3). Ainda, outros neurônios de projeção envolvem o córtex cingulado e o insular, via conexões no tronco encefálico (núcleo parabraquial) e amígdala, que contribuem para o componente afetivo da experiência dolorosa (Fig. 3). Desta forma, o sistema descendente pode exercer tanto ações estimulatórias quanto inibitórias sobre a percepção de estímulos dolorosos, aumentando ou diminuindo a sensação de dor. Os mecanismos que regulam o controle descendente inibitório atenuam a liberação de mediadores pró-nociceptivos (ações pré-sinápticas) e, direta ou indiretamente (via interneurônios inibitórios), suprimem a excitação dos neurônios de projeção (ações pós-sinápticas) (MILLAN, 1999; 2002).

O mecanismo descendente inibitório (Fig. 3) depende do envolvimento de outros neurotransmissores, e dentre as principais vias de controle da dor destacam-se as vias noradrenérgica, serotonérgica, dopaminérgica, opióidérgica, canabinoidérgica e adenosinérgica, sendo que um mesmo neurotransmissor pode exercer tanto ações inibitórias quanto estimulatórias, dependendo do local onde é liberado e do tipo de receptor que irá interagir (MILLAN, 2002).

Da mesma forma que a dor aguda, a dor crônica também é causada por lesão ou patologia, podendo permanecer mesmo depois da recuperação do indivíduo (LOESER; MELZACK, 1999). No entanto, quando ocorre um significativo dano tecidual, a dor é geralmente mais persistente e acompanhada de inflamação. Nestas circunstâncias, geralmente ocorre um quadro de hipersensibilidade causado pela ativação e sensibilização dos nociceptores periféricos por mediadores químicos produzidos pela lesão tecidual e pela inflamação (DRAY, 1997). Dentre os problemas que comumente ocorrem em pacientes que apresentam dor com quadros de hipersensibilidade, pode-se citar a hiperalgesia (resposta aumentada a estímulos nocivos) e a alodinia (resposta dolorosa a estimulação inócua) (MILLAN, 1999).

Figura 3 – Anatomia da via da dor.



(1) Nociceptores aferentes primários conduzem informações nocivas para os neurônios de projeção dentro do corno posterior da medula espinal (2). A informação é transmitida para o tálamo (3) e posteriormente ao córtex somatossensorial (4), fornecendo informações sobre a localização e a intensidade do estímulo doloroso. Esta informação ascendente também acessa neurônios do bulbo e da substância cinzenta periaquedual do mesencéfalo que envolve os sistemas de retroalimentação descendente que regulam a saída do neurotransmissor da medula espinal (5). Fonte: adaptado de Basbaum e colaboradores (2009).

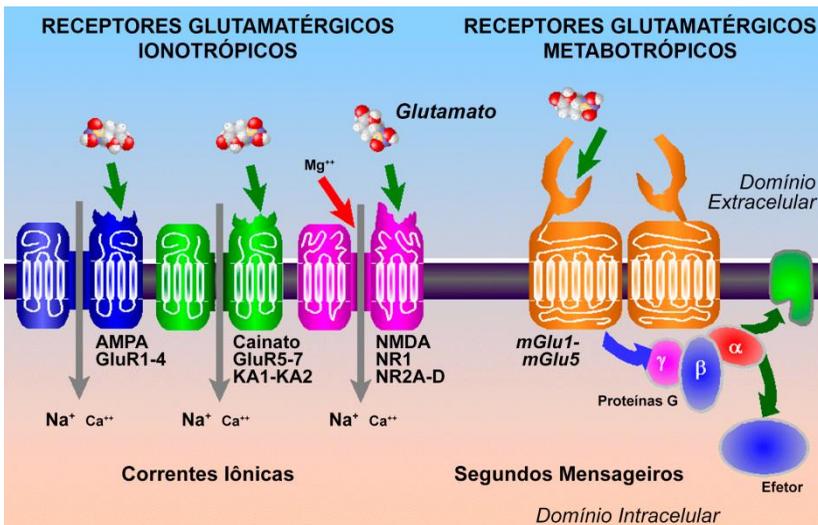
Além disso, uma excitabilidade anormal causada por inflamação ou lesão neuronal, normalmente pode decorrer do aumento da expressão ou da ativação de receptores (exemplo: receptores para glutamato e/ou receptores de potencial transiente – TRPs). Sendo assim, substâncias capazes de causar modificações seletivas destes processos podem dar origem a novos agentes analgésicos e anti-inflamatórios (PARSONS, 2001; BLEICH et al., 2003; MORAN et al., 2011; ANDRADE; MEOTTI; CALIXTO, 2012; PREMKUMAR; ABOOJ, 2013).

2.2 NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA

Dentre os mediadores nociceptivos, destaca-se o aminoácido excitatório glutamato (Fig. 4), sendo este extremamente importante por ser o neurotransmissor mais abundante do sistema nervoso central (SNC). O glutamato pode ser encontrado no encéfalo (incluindo estruturas ligadas à nocicepção), na medula espinal e periferia. Sua liberação ocorre em resposta a estímulos nociceptivos seguidos ou não de lesão tecidual (MILLER et al., 1988; SLUKA, WILLIS, 1998).

O glutamato ativa receptores glutamatérgicos ionotrópicos (iGluR), dos quais incluem os receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), alfa-amino-3-hidróxi-metilisoxazolepropionato (AMPA) e cainato, e receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGluR), que são acoplados a proteína G (Fig. 4) (HUDSPITH, 1997; GOUDET et al., 2009).

Figura 4 – Receptores glutamatérgicos.



O glutamato pode ativar tanto receptores glutamatérgicos ionotrópicos (iGluR), NMDA, AMPA e/ou cainato, quanto receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGluR), que são acoplados a proteína G. Fonte: adaptado de Salt (2014).

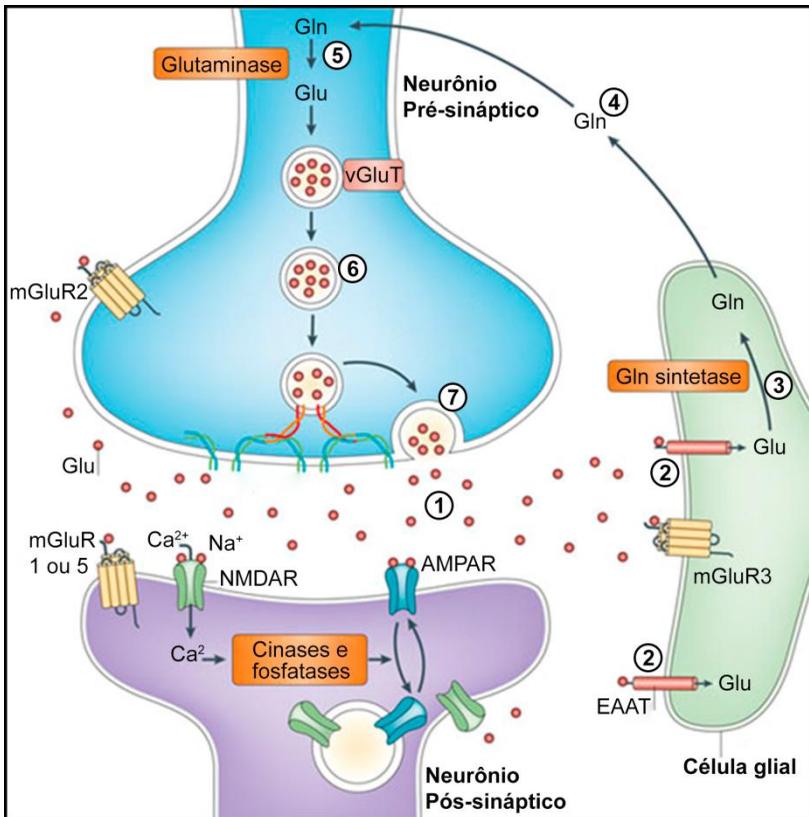
Os receptores ionotrópicos são canais iônicos que, quando o NMDA é ativado, permite o influxo de Ca^{2+} , e quando AMPA e cainato são ativados, permeiam principalmente o influxo de Na^+ e K^+ (Fig. 4). Os receptores AMPA e cainato são normalmente denominados não-NMDA e considerados como a mesma entidade (AMPA/cainato), já que biofisicamente são indistinguíveis (Fig. 4) (OZAWA, KAMIYA, TSUZUKI, 1998; YOUN, GERBER, SATHER, 2013).

A estimulação de fibras aferentes primárias promove a liberação de glutamato, que desencadeia potenciais sinápticos rápidos nos neurônios do corno posterior da medula espinal por meio da ativação de receptores ionotrópicos do tipo AMPA e NMDA. Agindo sobre os receptores do tipo AMPA, o glutamato é responsável pela transmissão sináptica rápida na primeira sinapse do corno posterior. Quando este neurotransmissor interage com os receptores do tipo NMDA ocorre uma resposta mais lenta (OZAWA, KAMIYA, TSUZUKI, 1998; BRENNER et al., 2004; KOHNO et al., 2008; YOUN, GERBER, SATHER, 2013).

A modulação da neurotransmissão glutamatérgica é realizada por células gliais (astrócitos) por meio de transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs), que atuam captando o excesso de glutamato da fenda sináptica, controlando assim, a excitabilidade neuronal. O glutamato liberado é convertido em glutamina, que é transportada de volta aos neurônios pré-sinápticos e, então, reconvertida em glutamato (Fig. 5). Em processos de dor crônica, a estimulação contínua e a liberação sustentada de glutamato podem resultar no desenvolvimento de um estado de hiperexcitabilidade de neurônios nociceptivos, que se manifesta clinicamente como hiperalgesia e a alodinia (GANGADHARAN; KUNER, 2013).

Fármacos capazes de antagonizar receptores glutamatérgicos (Fig. 5) constituem um alvo terapêutico em potencial para o controle da dor em várias espécies de mamíferos, incluindo os humanos (LUTFY et al., 1997; FERREIRA, SANTOS, CALIXTO, 1999; BLEICH et al., 2003; SHIMADA et al., 2013; YOUN, GERBER, SATHER, 2013). Neste sentido, a modulação da neurotransmissão glutamatérgica vem se destacando na promoção do efeito antinociceptivo de diversos terpenoides e extratos de plantas. Como exemplo, podemos citar o (-)-linalol, um monoterpene, o qual promove um acentuado efeito antinociceptivo contra a nocicepção induzida por glutamato em camundongos (BATISTA et al., 2008). Outro estudo demonstra que o triterpene 3β , 6β , 16β -trihidroxilup-20 (29)-eno apresenta ação antinociceptiva, envolvendo receptores ionotrópico (NMDA) e metabotrópico (LONGHI-BALBINOT et al., 2009).

Figura 5 – O ciclo de glutamato-glutamina.



Esta via constitui uma forma de “reciclagem” do neurotransmissor glutamato. O glutamato é lançado a partir de um terminal nervoso pré-sináptico por exocitose, processo ATP/ Ca^{2+} /dependente (1), e recolhido por transportadores de glutamato (EAAT) presentes em células gliais (2). No astrócito glutamina sintetase desintoxica glutamato, convertendo-o a glutamina (Gln) num processo dependente de ATP (3). A glutamina é subsequentemente liberada a partir das células da glia, por meio do transportador de glutamina e retomada pelos neurônios por meio de outro transportador de glutamina (4). Nos neurônios pré-sinápticos enzima glutaminase converte glutamina de volta ao glutamato (5). As vesículas sinápticas são conduzidas com glutamato através do citosol por meio de um transportador de glutamato vesicular (vGLUT) (6) até a membrana pré-sináptica, onde sofrerem exocitose (7) para novamente liberar glutamato na fenda sináptica. Fonte: adaptado de Popoli e colaboradores (2012).

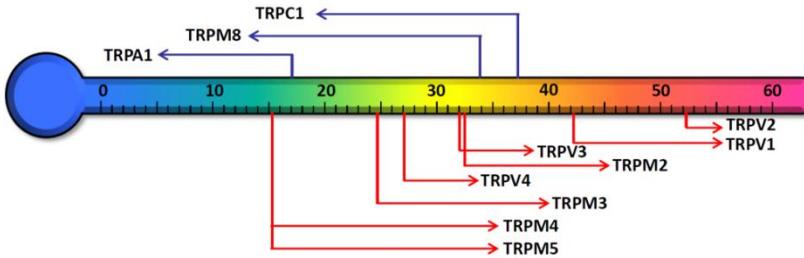
2.3 RECEPTORES DE POTENCIAL TRANSITÓRIO – TRPS

Os receptores de potencial transitório (TRPs, do inglês: *transient receptors potential*) constituem uma das maiores famílias de canais iônicos. Eles desempenham importante função na transdução sensorial, agindo como sensores fisiológicos a estímulos externos, sejam estímulos mecânicos, térmicos e químicos (BREDERSON; KYM; SZALLASI, 2013). Embora apresentem similaridade estrutural e na permeabilidade a cátions, os canais TRPs são altamente diferenciados uns dos outros, pela seletividade de íons, modos de ativação e função fisiológica. Ademais, os canais TRP além de desempenharem várias funções aferentes (transdução de estímulos químicos, mecânicos e térmicos), também estão envolvidos em funções eferentes, como por exemplo, controle do crescimento, diferenciação celular, termorregulação, vasoregulação e liberação de mediadores (WU; SWEET; CLAPHAM, 2010).

A família TRPs possui ampla distribuição tecidual e a maioria das células do organismo pode expressar pelo menos um membro da família (LEVINE, ALESSANDRI-HABER, 2007; WATANABE et al., 2008). Além disso, estes são subdivididos em seis famílias distintas (Fig. 6), baseado na sequência de aminoácidos, que incluem os receptores de anquirinas (TRPAs), os receptores vanilóides (TRPVs, 1-6), os receptores canônicos (TRPCs, 1-7), os receptores de melastatina (TRPMs, 1-8), os receptores de mucolipinas (TRPMLs, 1-3) e os receptores de policistinas (TRPPs, 1-3) (LEVINE, ALESSANDRI-HABER, 2007; NILIUS et al., 2007). Alguns estudos também mencionam a subfamília TRPN (NOMP, do inglês *No mechanopotential*), um canal sensível ao estímulo mecânico, porém atualmente, informações disponíveis sobre o genoma indicam que os mamíferos não têm ortólogos (similaridade genômica) para TRPN (WALKER, WILLINGHAM, ZUKER, 2000; NILIUS et al., 2007).

Dentre os diversos tipos de transdutores da informação nociceptiva, membros da família de TRPs (Fig. 6) têm sido descritos como importantes moduladores na transdução e na sensibilização em neurônios sensoriais aferentes primários. Dentre estes destacam-se o receptor de potencial transiente vanilóide-1 (TRPV1) e o receptor de potencial transitório anquirina subtipo 1 (TRPA1), que estão envolvidos na hipersensibilidade mecânica e térmica (ao calor e ao frio, respectivamente), presentes nos estados crônicos de dor (Fig. 6 e 7) (CORTRIGHT, KRAUSE, BROOM, 2007; BASBAUM et al., 2009; STUCKY et al., 2009; GANGADHARAN, KUNER, 2013).

Figura 6 – Representação esquemática dos onze termo-TRPs de mamíferos, indicando a sensibilidade à temperatura de cada um.

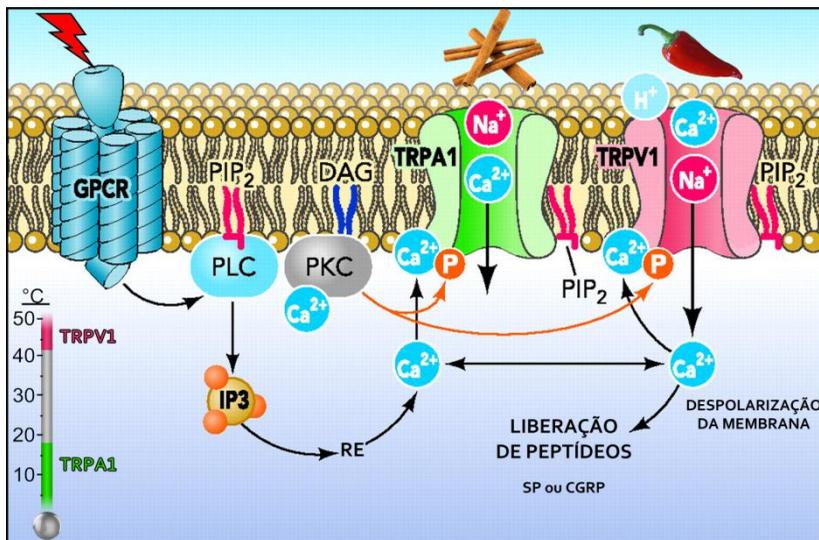


Nos mamíferos, uma classe de canais iônicos capazes de detectar grande variedade de temperaturas (de 0 a 60 °C), tem sido descritos. Estas máquinas termodinâmicas moleculares chamadas termo Receptor Potencial Transiente (termo-TRP) estão distribuídos pelas diferentes subfamílias de canal TRP com membros na subfamília TRPM (melastatina), onde TRPM2, TRPM3, TRPM4 e TRPM5 são ativados por calor, enquanto TRPM8 é ativado pelo frio. O TRPV (vanilóide) uma subfamília que contém quatro canais termo-TRP (TRPV1, TRPV2, TRPV3 e TRPV4), que são ativados pelo calor, e TRPA1 (ankirina) canal que é ativado por frio nocivo. Mais recentemente, um membro do TRPC (canônica) subfamília, TRPC5, foi identificado como um receptor de frio no intervalo de temperaturas de 37 a 25 °C. Fonte: Pertusa e colaboradores (2012).

2.3.1 O papel dos canais TRPV1

A família TRPV consiste de seis membros (TRPV1 a TRPV-6) (Fig. 6) (JORDT; JULIUS, 2002). O receptor de potencial transiente vanilóide-1 (TRPV1) foi clonado em 1997 (CATERINA et al., 1997), sendo previamente conhecido por receptor vanilóide tipo 1 (VR1) ou como receptor de capsaicina (SZOLCSANYI, 2004). Os TRPV1 são canais de cátions não-seletivos, com alta permeabilidade ao Ca^{2+} (Fig. 7), expressos nos terminais centrais e periféricos de neurônios sensoriais de pequeno diâmetro, principalmente as fibras do tipo C (pequeno diâmetro), e em terminais de fibras aferentes que se projetam para as lâminas superficiais do corno posterior da melula espinal, principalmente nas lâminas I e II (CATERINA et al., 1997; TOMINAGA et al., 1998; PREMKUMAR, ABOOJ, 2013). Estes canais podem também ter sua atividade potencializada por agentes pró-inflamatórios (Fig. 7) e sensibilizados por ATP, bradicinina, glutamato, histamina, serotonina e fatores tróficos como o fator de crescimento do nervo (NGF) e o fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) (PREMKUMAR; ABOOJ, 2013).

Figura 7 – A ativação e sensibilização de canais iônicos TRPs em neurônios sensoriais após lesão.



TRPA1 e TRPV1 são ativados e sensibilizados através de receptores acoplados a proteína G que ativam a fosfolipase C durante o processo inflamatório, incluindo os receptores de histamina, bradicinina, prostaglandinas, proteases, e fator de crescimento do nervo. Ca^{2+} intracelular é crucial para a ativação de TRPA1, mobilizado através da liberação dos estoques intracelulares ou através da abertura de canais TRPA1, ou, possivelmente, TRPV1. A fosforilação pela proteína cinase C (PKC) e outras cinases também afeta a atividade do canal TRP durante a inflamação. Níveis aumentados de Ca^{2+} desencadeiam a liberação de neuropeptídeos pró-inflamatórios, tais como, a SP (substância P) e CGRP (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina). Significado das abreviações e siglas da Figura 7: IP₃ (inositol trifosfato); PIP₂ (fosfatidilinositol bifosfato); DAG (diacilglicerol); GPCR (receptor acoplado a proteína G); P (fosfato); Ca^{2+} (íon cálcio); H^+ (hidrogênio); Na^+ (íon sódio); RE (retículo endoplasmático); PLC (fosfolipase C); PKC (proteína quinase C). Fonte: Adaptado de Bessac e colaboradores (2008).

Na captação de estímulos nociceptivos os receptores TRPV1 estão envolvidos na transdução de estímulos térmicos e químicos associados a diversas substâncias além da capsaicina como, por exemplo, a resinoferatoxina, forbol-12-miristato-13-acetato, produtos da via lipoxigenase, leucotrieno B₄, Forbol-12-fenilacetato-13-acetato-20-homovanilato. (CATERINA et al., 1997; GREEN; HAYES, 2004). Ademais, estes receptores podem ser ativados por fatores alterados no

microambiente neuronal, como o calor (temperatura acima de 43 °C) (Fig. 6 e 7) e/ou pH abaixo de 5,3 (CATERINA et al., 1997; CATERINA et al., 1999), e por estresse mecânico da membrana celular (LIEDTKE, 2007).

O controle da produção dos ligantes endógenos do TRPV1 ainda não está completamente elucidado, mas estudos têm demonstrado que em sítios pré-sinápticos, o TRPV1 pode modular liberação de neurotransmissores, como o glutamato (MARINELLI et al., 2002).

2.3.2 O papel dos canais TRPA1

O TRPA1 foi descrito anteriormente como ANKTM1 (do inglês, *Ankyrin-like Protein with Transmembrane Domains*) (JAQUEMAR, SCHENKER, TRUEB, 1999; STORY et al., 2003) e é o único membro da subfamília das anquirinas encontrado em mamíferos. Além disso, estes receptores são canais de cátions não seletivos, altamente permeáveis ao Ca^{2+} (Fig. 7) e são ativados por estímulos mecânicos e térmicos (abaixo de 17°C), principalmente o frio nocivo (Fig. 6 e 7) (STORY et al., 2003; DEL CAMINO et al., 2010), e por diversos produtos químicos que incluem: cinamaldeído (proveniente da canela) (Fig. 7), alicina (proveniente do alho), isotiocianato de alila (proveniente do óleo de mostarda), tetrahidrocanabinol, bradicinina (via receptor B2), formalina (um produto químico que é comumente usado para induzir dor experimental e é também um irritante respiratório perigoso) e icilina (um composto sintético que produz sensação de frio extremo). Quando eles são aplicados topicamente, muitos destes compostos causam dor em seres humanos (FANGER, DEL CAMINO, MORAN, 2010; MORAN et al., 2011). Adicionalmente, o TRPA1 também é ativado por vários compostos endógenos e produtos do estresse oxidativo (por exemplo, 4-hidroxinonenal, peróxido de hidrogênio e ainda por prostaglandinas do tipo ciclopentenona, como a 15-deoxi-prostaglandina J2 (15d-PGJ2) que são liberados após dano tecidual seguido de inflamação. Além disso, eles também podem não só ativar diretamente o TRPA1 como podem induzir comportamentos de dor em camundongos (TREVISANI et al., 2007; BESSAC et al., 2008; CRUZ-ORENGO et al., 2008; MORAN et al., 2011).

A maioria das fibras do tipo C e A δ que expressam TRPA1 também expressam TRPV1, demonstrando uma possível interação funcional. Além dos neurônios do gânglio sensorial do nervo espinal, os canais TRPA1 também são expressos no trato gastrointestinal, bexiga

urinária, coração e células imunes (STORY et al., 2003; KOBAYASHI et al., 2005; ANDRADE, MEOTTI, CALIXTO, 2012).

Nos mamíferos, o TRPA1 é amplamente expresso em neurônios sensoriais primários que medeiam o processo somatossensorial e a transmissão nociceptiva. Estudos têm descrito o papel de antagonistas TRPA1 no tratamento da dor inflamatória e neuropática (descrita no item 2.6) (EID et al., 2008; ANDRADE, MEOTTI, CALIXTO, 2012; NATIVI et al., 2013; TAKAISHI et al., 2013).

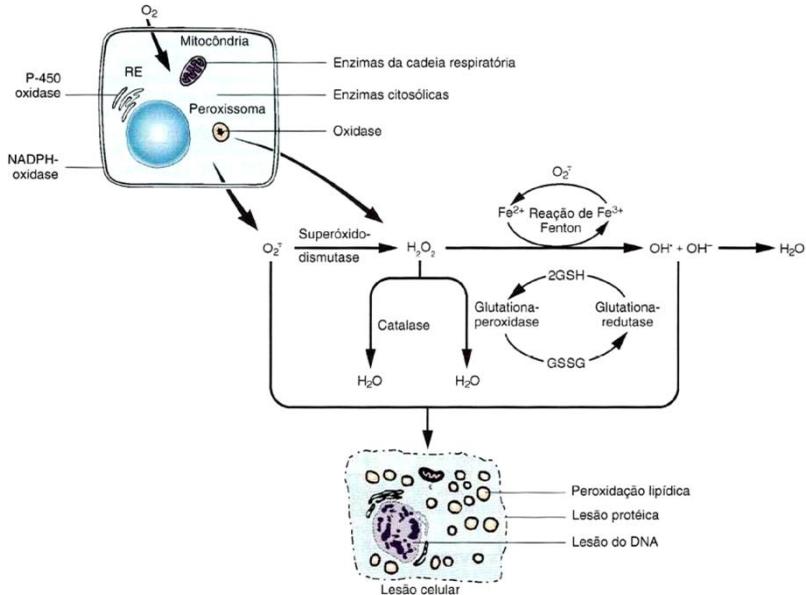
2.4 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E SEUS EFEITOS BIOLÓGICOS

A redução do oxigênio a água fornece a energia que permite a impressionante complexidade dos organismos superiores. Entretanto, este processo gera subprodutos altamente reativos, chamados de espécies reativas de oxigênio (EROs), que incluem radicais livres e espécies não radicalares. A geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) podem ocorrer por diversas formas, por exemplo, nas reações de redução-oxidação (redox) que ocorrem durante os processos metabólicos normais, como a respiração (Fig. 8), onde a maior parte do oxigênio consumido é reduzido à água na mitocôndria, mas aproximadamente 5% do oxigênio sofre redução incompleta, produzindo a ERO conhecida como radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). A partir deste, uma série de reações ocorre gerando compostos com capacidades reativas diferentes, que podem reagir de forma específica com algumas moléculas, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), uma molécula não radicalar. Porém, o mais reativo e danoso dos radicais livres formados, é o radical hidroxil $\cdot OH$, que reage de forma inespecífica com inúmeras moléculas (Fig. 8) (ELSBACH, WEISS, 1983; ROBBINS et al., 2000; HALLIWELL, BARRY, 2006; FRIDOVICH, 2013).

Além disso, os radicais livres podem ainda ser formados por reações químicas envolvendo espécies reativas de nitrogênio (ERN), de enxofre, pelas reações enzimáticas da ciclooxygenase, lipoxigenase e aldeído oxidase, pelas reações catalisadas por metais de transição como o ferro e o cobre, entre outras. Ademais outras situações também podem gerar EROs, como: na absorção de energia radiante (p. ex., luz ultravioleta, raios-X), pois a radiação ionizante pode hidrolizar a água em radicais livres hidroxil ($\cdot OH$) e hidrogênio (H); no metabolismo enzimático de substâncias químicas exógenas ou drogas (p.ex., tetracloreto de carbono); na presença de metais de transição (p.ex., ferro e cobre) que catalisam a formação de radicais livres; na presença de

óxido nítrico (NO), um mediador químico importante, que pode atuar como radical livre e também ser convertido em outras formas altamente reativas, como peroxinitrito (THOMAS et al., 1998; ROBBINS, COTRAN, KUMAR, 2000).

Figura 8 – Formação de espécies reativas de oxigênio e mecanismos antioxidantes nos sistemas biológicos.



O O_2 é convertido em superóxido ($O_2^{\bullet-}$) por enzimas oxidativas no retículo endoplasmático, mitocôndrias, membrana plasmática, peroxissomas e citosol. O $O_2^{\bullet-}$ é convertido em H_2O_2 por dismutação e, daí, em OH^{\bullet} pela reação de Fenton catalisada por Cu^{2+}/Fe^{3+} . O H_2O_2 também é derivado diretamente de oxidases nos peroxissomas. Outra ERO potencialmente lesiva não é mostrada: o oxigênio singlete. A resultante lesão por radicais livres dos lipídios (peroxidação), proteínas e DNA acarreta várias formas de lesão celular. O superóxido catalisa a redução do Fe^{3+} em Fe^{2+} , aumentando assim a geração de OH^{\bullet} pela reação de Fenton. As principais enzimas antioxidantes são a superóxido-dismutase, catalase e glutaciona-peroxidase. GSH, glutationa reduzida; GSSG, glutationa oxidada; NADPH, forma reduzida de fosfato de dinucleotídeo de adenina nicotinamida. Fonte: adaptado de Robbins, Cotran e Kumar (2000).

O conjunto de condições intra e extracelulares que leva ao desequilíbrio redox, com a geração exacerbada de EROs e/ou consequente diminuição dos agentes antioxidantes, é denominado de estresse oxidativo, e pode ocasionar dano a proteínas, lipídios e ao ácido desoxirribonucleico (DNA) (DAROGLU et al., 2002; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007; RAO, 2009). Para contrapor os efeitos das EROs, o organismo dispõe de diversos mecanismos de defesa antioxidante, sendo a catalase (CAT), a glutatona peroxidase (GPx) e a superóxido dismutase (SOD), as principais enzimas que neutralizam ou reduzem a ação das EROs, (Fig. 8). As vitaminas A e E, o ácido ascórbico (vitamina C), a glutatona (GSH), os oligoelementos (zinco, cobre, selênio etc), os flavonoides e outros compostos fenólicos (derivados de plantas) também atuam captando radicais livres (MCCORD, FRIDOVICH, 1969; SIES, 1993; HALLIWELL, BARRY, 2006). Além disso, está bem estabelecido que as atividades antioxidantes obtidas de determinados extratos de plantas são também atribuídas à sua capacidade de quelar íons de metais de transição, tais como, o Fe^{2+} e o cobre. O ferro e o cobre são tóxicos ao tecido animal, pois ambos podem catalisar a formação do radical hidroxil ($\cdot OH$) e este, por sua vez, desencadeia a peroxidação lipídica, causando danos celulares (Fig. 8) (ROBBINS et al., 2000; SHARPE et al., 2011; MA et al., 2012).

O excesso de ferro no organismo está relacionado com diversas doenças tromboticas. A hemocromatose e β -talassemia são doenças bem descritas a este respeito (ROBBINS et al., 2000; CAPPELLINI et al., 2006; FRANCHINI, 2006; ALLEN et al., 2008). Estudos recentes mostram que pacientes com hemocromatose ou hiperferritinemia são acometidos por profundas mudanças morfológicas nos eritrócitos e nas redes de fibrina. Assim, o tratamento com agentes quelantes de ferro, como o desferal e o clioquinol, ou com agentes de captura de radicais livres, como o salicilato e o selenito (que também podem agir quelando o ferro) é capaz de normalizar estas alterações (PRETORIUS et al., 2014). Ademais, Trachtenberg e colaboradores (2011) demonstraram uma ampla aderência ao tratamento com dois agentes quelantes de metal, a deferoxamina e o deferasirox, para o tratamento de talassemia.

Estudos têm demonstrado que as EROs também participam da fisiopatologia de doenças cardiovasculares, diabetes mellitus, cirrose hepática e alguns tipos de câncer (HALLIWELL, 2007; GORRINI, HARRIS, MAK, 2013; HSIEH, YANG, 2013), e é conhecido entre os mecanismos responsáveis pela morte neuronal nos distúrbios neurodegenerativos como, na doença de Parkinson ou na doença de

Alzheimer (CHATURVEDI, FLINT BEAL, 2013; SANTOS, et al., 2013; YAN, WANG, ZHU, 2013).

Dados da literatura indicam que as EROs também estão envolvidas na dor persistente, incluindo a dor neuropática e inflamatória (TAL, 1996; BRENNER et al., 2004; KIM et al., 2004; WANG et al., 2004; GAL et al., 2007; JANES et al., 2012). Por outro lado, vários sequestradores de EROs, incluindo fenil-Nt-butyl-nitrona (PBN), 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO), 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-N-oxi (TEMPOL) (TAL, 1996; KIM et al., 2004; SCHWARTZ et al., 2006; YOWTAK et al., 2006) e vitamina E (KIM et al., 2006), reduzem comportamentos de dor de várias etiologias. Além disso, o estresse oxidativo também participa do processo isquêmico devido a danos causados pela reperfusão nos tecidos após hipóxia, um exemplo disso é visto no quadro clínico da Síndrome da Dor Complexa Regional (CODERRE et al., 2004; CODERRE, BENNETT, 2010; CODERRE, 2011). A fim de neutralizar os danos causados pelas EROs no estresse oxidativo, Park e colaboradores (2013) demonstraram o efeito antialodínico de agentes antioxidantes, como a vitamina C e a vitamina E após DPIC em ratos.

2.5 DOR PÓS-OPERATÓRIA

A dor causada pela incisão é uma forma comum e singular de dor aguda, é um fenômeno frequente no pós-operatório podendo resultar em sofrimento e riscos desnecessários ao paciente (Fig. 9). Mais de 73 milhões de cirurgias são realizadas anualmente nos Estados Unidos de acordo com pesquisas demonstradas pelo Centro Nacional de Estatísticas em Saúde (NCHS, do inglês, National Center for Health Statistics), e até 75% dos pacientes sentem dor após o procedimento cirúrgico (SCHUG; LARGE, 1993; WARFIELD; KAHN, 1995; COUSINS; POWER; SMITH, 2000). No Brasil, o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2011) relata que o país é o segundo no ranking mundial de cirurgias plásticas, com mais de 1.7 mil anualmente, ou 71 operações estéticas por hora.

Um estudo australiano, estima que o encargo econômico no tratamento da dor crônica, que se desenvolve a partir da dor pós-operatória aguda, em indivíduos na faixa etária dos 30 anos, ao longo da vida, é de aproximadamente de um milhão de dólares (COUSINS; POWER; SMITH, 2000). Assim, a prevenção e o alívio eficaz da dor pós-operatória aguda podem melhorar os desfechos clínicos, evitando

complicações clínicas, bem como economizando recursos com saúde e melhorando a qualidade de vida do paciente (Fig. 9).

Figura 9 – Sinais clínicos de uma incisão nos pés.



A Figura 9 ilustra um exemplo de cirurgia que de forma geral tem um pós-operatório muito doloroso, gerando a chamada dor pós-operatória. Pois a região dos pés é uma zona de carga na marcha e na bipedestação (postura em pé), que após procedimento cirúrgico facilmente gera edema pronunciado e coloca o paciente em situação de dependência e afastamento do trabalho. Fonte: Huntley (2011).

Existem evidências de que a dor causada pela inflamação, lesão de nervos ou pela incisão estejam relacionadas a diferentes mecanismos fisiopatológicos, explicando porque muitas estratégias terapêuticas são eficazes somente em algumas formas de dor persistente (ZAHN; POGATZKI; BRENNAN, 2002). No entanto, os estudos do mecanismo neurobiológico da dor induzida pela incisão cirúrgica têm sido realizadas com base em achados experimentais em modelos animais (MARTINS et al., 2012, 2013a, 2013b; MORÉ et al., 2013).

Em dois estudos nacionais que avaliaram o estado de gestão e atitudes em relação à dor pós-operatória, o primeiro obteve uma amostra aleatória de 500 pacientes e mostrou que, dentre estes, 77% tinham apresentado dor após a cirurgia: 19% apresentaram dor leve, 49% dor moderada, 23% dor intensa, e 8% dor extrema (WARFIELD; KAHN, 1995). Similarmente, em outro estudo, Apfelbaum e colaboradores (2003) com uma amostra aleatória de 250 pacientes no total, verificaram que 82% dos pacientes apresentaram dor após a cirurgia, destes 13% apresentaram dor moderada, 47% dor moderada, 21% dor intensa, e 18% dor extrema. O percentual de pacientes com dor global aumentou

ligeiramente de um estudo para o outro, no entanto, em ambos os estudos em torno de 50% dos pacientes tinham dor moderada e a porcentagem de pacientes com dor extrema mais do que dobrou em comparação com os resultados de Warfield e Kahn (1995). Embora estes estudos tenham sido realizados aproximadamente há uma e duas décadas atrás, respectivamente, forneceram uma base para comparar a melhoria no tratamento da dor pós-operatória.

2.5.1 Incisão plantar

O modelo animal de incisão plantar mimetiza a dor pós-operatória em humanos (Fig. 9). Inicialmente foi desenvolvido por Brennan, Vandermeulen e Gebhart (1996) para ratos e adaptado para camundongos por Pogatzki e Raja (2003), sendo que da mesma forma que em humanos, a incisão cirúrgica no animal induz comportamento de dor espontânea em resposta a hiperalgesia desenvolvida (RICHMOND; BROMLEY; WOOLF, 1993).

A dor induzida pela incisão cirúrgica resulta de lesões da pele, fáscia, músculos e pequenas inervações desses tecidos, levando a inflamação e liberação de mediadores químicos (Fig. 9). Dentre estes, destacam-se a serotonina e a histamina que liberadas pelo processo de degranulação de mastócitos decorrente da incisão cirúrgica, sensibilizando terminais nociceptivos periféricos para estímulos térmicos e mecânicos (OLIVEIRA et al., 2011). Além disso, Pogatzki e Raja (2003) mostraram que fibras A- δ e fibras C são sensibilizadas pela incisão e a hipersensibilidade primária, que ocorre no local da incisão é provavelmente devido à sensibilização periférica, enquanto que a hipersensibilidade secundária observada no tecido não danificado, que cerca o local da incisão, é devido à sensibilização central (RICHMOND; BROMLEY; WOOLF, 1993).

2.6 DOR NEUROPÁTICA

De acordo com a IASP, a dor neuropática é desencadeada como consequência direta de lesão ou doença que afeta o sistema somatossensorial (LOESER; TREEDE, 2008). Em outras palavras, a dor neuropática resulta de lesão ou disfunção do sistema nervoso. A dor de origem neuropática tem incidência estimada na população mundial em torno de 1 a 3% (DWORKIN et al., 2003; IRVING, 2005), principalmente pelo fato de acompanhar um grande número de patologias e disfunções que incluem trauma, inflamação, doenças

metabólicas (por exemplo, diabetes), infecções (por exemplo, herpes zoster), tumores e doenças neurológicas primárias (BOUHASSIRA et al., 2008).

Além disso, a dor neuropática periférica pode ser induzida não apenas pela lesão direta de neurônios aferentes e seus ramos axonais, mas também indiretamente, pelo aumento na expressão e liberação de mediadores sintetizados por células gliais e imunes durante a degeneração walleriana distal à lesão do nervo. Tais mediadores incluem citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10), fatores neurotróficos como, fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), fator de crescimento neuronal (NGF), neurotrofina-3 (NT-3) e quimiocinas (CXCL1 e CXCL2/3), dentre outras (KLUSAKOVA; DUBOVY, 2009). Estes mediadores parecem estar envolvidos na iniciação de estados de dor neuropática além de serem capazes de influenciar diretamente a excitação dos neurônios aferentes e seus axônios (XIAO et al., 2002; SORKIN, YAKSH, 2009).

Clinicamente, a terapêutica da dor neuropática permanece desafiadora. A dor neuropática é geralmente crônica e incapacitante, sendo muitas vezes resistente ou pouco responsiva a anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e opioides, sendo que os considerados de primeira linha consistem em fármacos anticonvulsivantes, como a gabapentina ou carbamazepina, ou fármacos antidepressivos, como os antidepressivos tricíclicos ou inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina (MOULIN et al., 2007; SAARTO; WIFFEN, 2007; ATTAL et al., 2010). Entretanto, estes fármacos apresentam limitada eficácia e/ou significativos efeitos adversos que comprometem sua utilização por período prolongado (BARON, 2006). Assim, é de extrema importância a compreensão dos mecanismos patofisiológicos da dor neuropática para a descoberta de novos e efetivos alvos terapêuticos.

Atualmente, há uma grande variedade de modelos animais sendo utilizados para o estudo da dor neuropática associada a diversas etiologias e, relacionada a um quadro extenso de manifestações clínicas de neuropatias periféricas (SORKIN; YAKSH, 2009). Os modelos de dor neuropática geralmente representam condições patológicas mais relevantes clinicamente, podendo identificar fármacos potentes e efetivos, enquanto os animais permanecem em boa saúde geral, sem estresse excessivo, perda de peso ou mudanças comportamentais gerais (WALKER; FOX; URBAN, 1999).

2.6.1 Síndrome da dor complexa regional

A patogênese da Síndrome da Dor Complexa Regional (SDCR) (Fig. 10) ainda não está totalmente esclarecida, todavia é dividida em dois tipos: Tipo I (acontece depois de um trauma em uma extremidade corpórea, sem que ocorra lesão nervosa) e Tipo II (apresenta lesão nervosa, ainda que parcial) (FELIU; EDWARDS, 2010). A SDCR tipo I foi o foco deste estudo usando um modelo animal que mimetiza os sintomas observados em humanos (Fig. 10), o modelo de dor pós-iscemia crônica (DPIC).

Devido à falta de esclarecimento sobre a real causa e manutenção da SDCR, surgiram outros termos para designá-la, tais como: dor simpático-independente, vasospasmo traumático, distrofia pós-traumática, osteoporose pós-traumática, algodistrofia, entre outros. Foi somente em 1994 que um grupo designado pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) para revisar a nomenclatura, chegou ao consenso de SDCR. Essa definição teve por base a complexidade da síndrome, o fato de acometer primariamente uma região corporal e de que a dor é um componente essencial do quadro clínico (FELIU, EDWARDS, 2010; MAIHOFNER, SEIFERT, MARKOVIC, 2010).

Figura 10 – Sinais clínicos da síndrome da dor complexa regional em humanos.



(A) Diferença entre a mão esquerda de um paciente com acometimento de SDCR e da mão direita normal. (B) Diferença entre a perna direita, acometida com SDCR e da perna esquerda normal. Fonte: (A) Miguel Jr. (2013); (B) Otroka (2014).

Os cinco principais sinais e sintomas da SDCR são a dor, as alterações da sensibilidade, a disfunção do SNS, o edema, as alterações motoras e as alterações tróficas dos tecidos. Ela já foi descrita em todas as regiões do corpo recoberta por pele, incluindo a face e as genitálias (CHALKLEY; LANDER; ROWLINGSON, 1986), porém é mais frequente nas extremidades dos membros, possivelmente, porque essas regiões são mais expostas aos traumatismos (Fig. 10) e/ou microtraumas decorrentes de distúrbios osteo-musculares relacionados ao trabalho, fraturas e procedimentos cirúrgicos (CORDON, LEMONICA, 2002; MAIHOFNER, SEIFERT, MARKOVIC, 2010).

A SDCR é considerada relativamente rara, sendo que dados epidemiológicos mostram que na América do Norte existe uma taxa de incidência de 5,46/100000/ano, com uma taxa de prevalência calculada de 20,57/100000. Em um estudo realizado na Holanda encontrou uma taxa de incidência de 26,2/100000/ano (ALLEN, GALER, SCHWARTZ, 1999; SANDRONI et al., 2003; CODERRE, 2011). Na população geral, a incidência e a prevalência da SDCR, são maiores nas mulheres e nos adultos jovens. Veldman e colaboradores (1993) observaram em um estudo prospectivo envolvendo 829 casos novos sequenciais, que três mulheres são acometidas para cada homem. Nessa casuística a idade média foi de 42 anos, sendo que apenas 6% dos doentes tinham menos de 19 anos e 1% menos de 10 anos de idade.

Dentre as várias formas de tratamentos, o bloqueio simpático foi estabelecido como tratamento padrão durante anos, mas atualmente não é muito indicado. Neste sentido, são usadas formas não farmacológicas (fisioterapia, drenagem linfática, entre outros) e farmacológicas, incluindo principalmente anti-inflamatórios, por sua capacidade de reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias, bem como mediadores inflamatórios em geral (BETCHER, CASTEN, 1955; CHRISTENSEN, JENSEN, NOER, 1982; BADER, HELL, 2000; MAIHOFNER, SEIFERT, MARKOVIC, 2010).

2.6.1.1 Dor pós-isquemia crônica

Coderre e colaboradores (2004) descreveram um modelo animal que mimetiza a SDCR-I e é baseado em uma prolongada isquemia na pata do animal, seguida de reperfusão. Isquemia é a perda do suprimento sanguíneo por redução do fluxo arterial de um tecido, em que há comprometimento da oferta de substratos metabólicos, incluindo a glicose (ROBBINS et al., 2000). Reperfusão é quando o fluxo sanguíneo é restabelecido após um período de isquemia (EVORA et al., 1996). O

dano celular induzido após perfusão de um órgão isquêmico é denominado lesão de isquemia/reperfusão (I/R).

O modelo animal de isquemia e reperfusão da pata (IRP) gera a dor pós-isquemia crônica (DPIC) e primeiramente foi utilizado em ratos. Os animais submetidos à DPIC apresentam hiperemia e edema por um período de 2 a 4 horas após a reperfusão hipersensibilidade mecânica e térmica. A hipersensibilidade mecânica se inicia 8 horas após a reperfusão e permanece por até 4 semanas. Análises por microscopia óptica e eletrônica do nervo tibial, próximo ao local onde foi colocado o torniquete, não demonstraram sinais de dano nervoso. Por outro lado, os registros eletrofisiológicos de fibras individuais de axônios aferentes primários apresentam disparos espontâneos de fibras A β , A δ e C de 2 a 9 dias após a reperfusão (LAFERRIERE et al., 2008).

Diversos mecanismos encontram-se envolvidos na fisiopatogênese da lesão secundária à isquemia e reperfusão, o principal é a formação de espécies reativas do oxigênio. Durante a reperfusão, após poucas horas da estimulação dos receptores NMDA e influxo de Ca²⁺, ocorre a liberação de mediadores inflamatórios, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β) e óxido nítrico sintetase, os quais atraem e ativam células imunocompetentes, como microglia, astrócitos e leucócitos. As citocinas e a óxido nítrico sintetase, direta ou indiretamente, levam a geração de EROs e à formação de grandes quantidades de radicais livres, como óxido nítrico, ânion superóxido (O₂⁻) peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e peroxinitrito (ONOO⁻). Qualquer intervenção que atenuar o aumento de Ca²⁺ citosólico reduz a disfunção e morte celular (CHONG, LI, MAIESE, 2005; CODERRE, BENNETT, 2010).

Eisenberg e colaboradores (2008) encontraram aumento nos níveis de malondialdeído (MDA), um metabólito da peroxidação lipídica, na análise da saliva e do soro de pacientes com SDCR, além de aumento em parâmetros antioxidantes em comparação ao grupo de pacientes saudáveis. Este aumento das defesas antioxidantes pode ser devido um efeito compensatório frente ao estado oxidativo do meio. Além disto, estudos demonstraram níveis elevados de mediadores inflamatórios (IL-2, IL-6, IL-1 β , IL-8, TNF- α) no sangue e no exsudato presente nas bolhas formadas no membro afetado (GECHEV et al., 2002; EISENBERG et al., 2008). É importante ressaltar que *scavengers* (sequestrador) de radicais livres como o dimetilsulfóxido (DMSO), vitamina C e N-acetilcisteína (NAC), têm se mostrado eficazes na atenuação de sinais e sintomas da síndrome (ZUURMOND et al., 1996; ZOLLINGER et al., 1999; CODERRE, BENNETT, 2010).

2.6.2 Ligadura parcial do nervo isquiático

A dor neuropática pode ser induzida por lesão mecânica (secção; esmagamento ou compressão), química, metabólica ou imunológica dirigida ao nervo, gânglio ou medula espinal. A Figura 11 apresenta as lesões especificamente geradas por trauma físico do nervo periférico (KLUSAKOVA; DUBOVY, 2009).

Figura 11 – Modelos experimentais de dor neuropática.

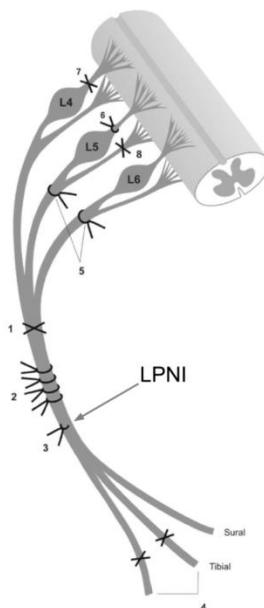
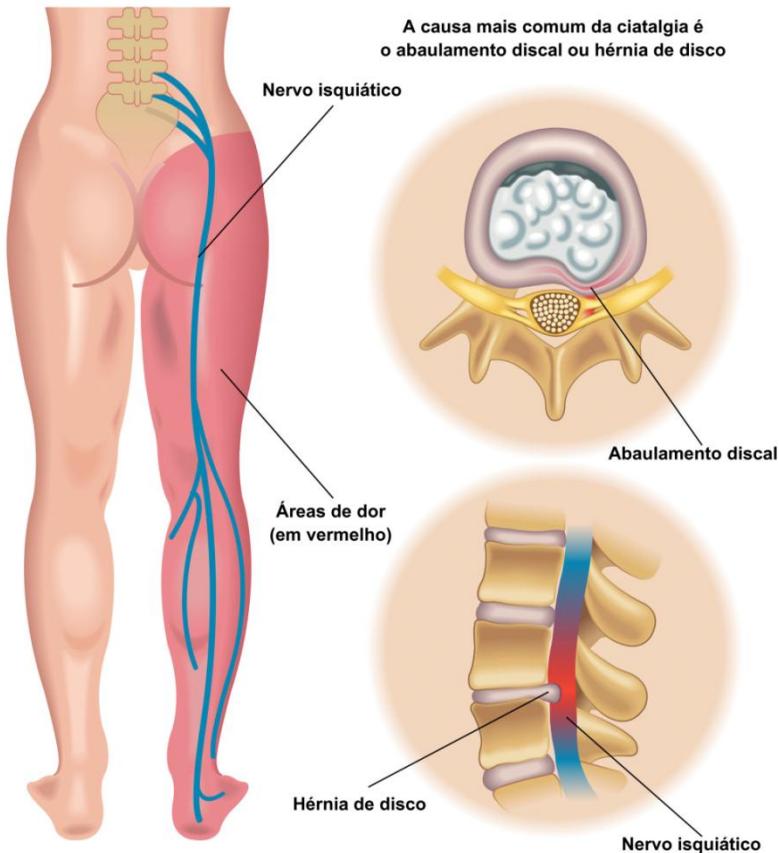


Ilustração esquemática dos modelos experimentais de dor neuropática, com base em danos às estruturas nervosas periféricas: (1) Transecção ou esmagamento do nervo isquiático (BOCCABELLA et al., 1964; WALL et al., 1979). (2) Lesão por constrição crônica (BENNETT; XIE, 1988). (3) *Ligadura parcial do nervo isquiático (SELTZER; DUBNER; SHIR, 1990). (4) Modelo de lesão do nervo poupado (DECOSTERD; WOOLF, 2000). (5) Ligadura dos nervos espinais L5/L6 (KIM, S. H.; CHUNG, 1992). (6) Constrição da raiz dorsal (TABO et al., 1999). (7) Rizotomia dorsal (LOMBARD et al., 1979). (8) Rizotomia Ventral (LI et al., 2002). Fonte: Adaptado de Klusakova e Dubovy (2009).

O isquiático é o maior nervo do corpo humano, abrangendo a sensibilidade do pé, a maior parte da perna, além de motricidade e propriocepção dos músculos posteriores da coxa, proximais da perna e

todos os músculos do pé (FONSECA et al., 2002; DOSANI et al., 2004). A chamada “ciatalgia” em humanos (Fig. 12), na verdade é um sintoma de outro problema. Na maioria das vezes, cerca de 90% das queixas, o motivo é uma hérnia de disco que, segundo dados do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), afeta cerca de cinco milhões de brasileiros.

Figura 12 – Sinais clínicos da ciatalgia.



Esquema ilustrando a região de inervação do nervo isquiático e a causa mais comum de ciatalgia, a hérnia de disco, que gera uma dor irradiada para pernas e pés. O paciente pode apresentar ainda sintomas como formigamento e dor na região do quadril, acompanhada de dormência e fraqueza que correm para as pernas e dedos. Fonte: adaptado de Shannon (2014).

A ciatalgia é um tipo de dor conhecida desde a Antiguidade, mas a sua relação com a hérnia discal (Fig. 12), só foi descoberta no início do século 20, quando Mixter e Barr (1934) a descreveram. O problema acontece quando o disco intervertebral é enfraquecido ou sobrecarregado, sofrendo pequenas fissuras e rompendo as fibras que o constituem. Isto faz com que o núcleo pulposo (que serve como amortecedor da coluna) ultrapasse seus limites e saia do disco, pressionando o nervo isquiático (Fig. 12). Em decorrência disto, há isquemia e fenômenos que sensibilizam o local, gerando dor (MIXTER, BARR, 1934; VROOMEN et al., 2002). A dor é acompanhada de dormência e fraqueza que se estendem para as pernas e dedos, o paciente pode apresentar ainda sintomas como formigamento e dor na região do quadril. Com o passar do tempo, o problema pode interferir na qualidade de vida, até mesmo limitando atividades rotineiras dos pacientes (DOSANI et al., 2004; KOBAYASHI, YOSHIZAWA, YAMADA, 2004). O tratamento convencional inclui analgésicos, anti-inflamatórios, relaxantes muscular, e em alguns casos, opióides ou antidepressivos tricíclicos, mas em muitos casos não são eficazes para o alívio da dor e ainda podem desenvolver efeitos adversos indesejáveis (NEGRELLI, 2001; CHONG, BAJWA, 2003; DRAY, 2008). Assim, dada a grande relevância clínica da dor neuropática que envolve lesão no nervo isquiático, tem sido estudado modelos animais que mimetizem os sintomas observados em humanos, como hiperalgesia mecânica e térmica (CHOI et al., 1994; MALMBERG, BASBAUM, 1998).

Estudos mostram que a prevalência de dor lombar crônica varia entre 9% e 21% e muitos autores consideram-na como a dor que mais provoca incapacidade e afastamentos do trabalho (WEBB et al., 2003; SA et al., 2008). Em conformidade com estes dados, recentemente um estudo avaliando a prevalência da dor lombar e ciática em uma amostra representativa de 674 adultos com idade acima de 20 anos, de uma população principalmente urbana (74,8% da amostra) no Mediterrâneo, demonstrou que um total de 266 (39,5%) pacientes relataram dor lombar e 166 (24,6 %) relataram ciática durante o período de 6 meses anteriores a pesquisa (KOROVESSIS et al., 2012).

Seltzer, Dubner e Shir (1990) demonstraram que o modelo de ligação parcial do nervo isquiático em ratos, produz uma síndrome altamente reprodutível, incluindo a diminuição em limiares nociceptivos mecânicos e térmicos, além de alterações prolongadas na expressão de neurotransmissores e receptores. O mesmo foi observado quando realizado em camundongos (MALMBERG; BASBAUM, 1998). O nervo isquiático de roedores é usado na maioria dos estudos que

envolvem lesão nervosa devido ao seu grande calibre, além de ser facilmente acessível e inervar a superfície plantar da pata posterior, um local conveniente para testes sensoriais (HOGAN, 2002).

2.7 AS PLANTAS MEDICINAIS COMO FONTES DE FÁRMACOS

A utilização de plantas medicinais para o tratamento, a cura e a prevenção de doenças é uma das formas mais antigas da prática medicinal da humanidade, sendo transmitido de forma empírica de geração em geração, desde plantas comestíveis ou de outras dotadas de maior ou menor toxicidade que, ao serem experimentadas no combate à doença, revelaram, embora empiricamente, o seu potencial curativo. Assim, a fitoterapia pode ser considerada como a forma de medicina mais antiga da humanidade (ALONSO, 1998). Ainda hoje, no Brasil, em regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, as plantas medicinais são muito comercializadas (Fig. 13).

Figura 13 – Comércio popular de plantas medicinais



O comércio popular de plantas medicinais é muito frequente, principalmente devido à dificuldade de acesso para atendimento médico, alto custo dos medicamentos sintéticos e a facilidade de obtenção das mesmas. Assim, a difusão do conhecimento popular permitiu que as plantas fossem positivamente selecionadas para sanar a necessidade de cura de determinadas enfermidades primárias. Fonte: Conniff (2012).

Ademais, os produtos naturais têm sido reconhecidos como fármacos efetivos para uma grande variedade de indicações terapêuticas (Fig. 13) (KOEHN, CARTER, 2005; MISHRA, TIWARI, 2011). Embora amplamente utilizadas na medicina popular em muitos países, muitas das plantas terapêuticas têm seus princípios ativos desconhecidos, sendo necessários estudos experimentais que visem demonstrar suas propriedades farmacológicas (MISHRA; TIWARI, 2011). Neste sentido, estudos etnobotânicos de registro de plantas, seus usos e formas terapêuticas por grupos humanos, tem oferecido a base para diversos outros estudos científicos, especialmente no campo da Fitoquímica e Farmacologia (SIMÕES, MARIOT, 2004; RISHTON, 2008).

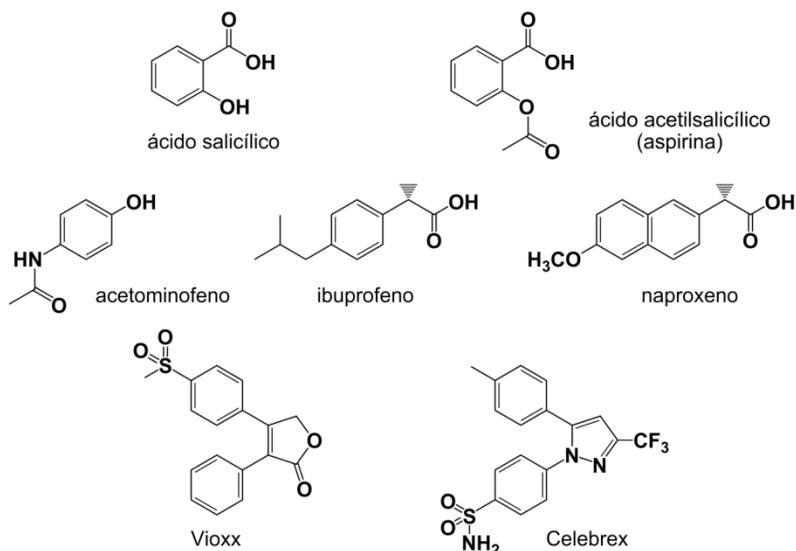
O uso de produtos naturais como fonte de inspiração aliado ao uso dos instrumentos da química medicinal é ainda uma estratégia bastante útil na prospecção de novas moléculas bioativas, devido sua elevada diversidade química, especificidade bioquímica, vasta capacidade de biossíntese e outras características que as tornam favoráveis para a descoberta de novos fármacos. Ademais, a descoberta de novos fármacos de origem vegetal é de relevante importância, devido ao surgimento de novas doenças e à tolerância dos agentes nocivos aos medicamentos atuais, além dos efeitos colaterais que muitas drogas sintéticas ainda apresentam (POLLIER; MOSES; GOOSSENS, 2011). Neste sentido, os compostos naturais podem tornar-se novamente os jogadores centrais no tratamento de doenças e na compreensão dos mecanismos da doença (CALIXTO et al., 2005; KOEHN, CARTER, 2005; RISHTON, 2008).

Como o Brasil é um país de clima tropical e apresenta grande biodiversidade (cerca de 20-22% das plantas e microrganismos do planeta), há um crescente interesse da indústria farmacêutica para a produção de agentes terapêuticos de origem natural (CALIXTO; SIQUEIRA JUNIOR, 2008). Atualmente, os esforços para a descoberta de novos fármacos são dirigidos no sentido de obter alternativas para superar a dependência externa. No Brasil, 84% dos fármacos são importados e 78% da produção brasileira de fármacos é realizada por empresas multinacionais (CALIXTO et al., 2005; CALIXTO, SIQUEIRA JUNIOR, 2008).

Um dos marcos no que concerne ao desenvolvimento de fármacos a partir de produtos naturais foi a descoberta dos salicilatos obtidos através de folhas e cascas de *Salix alba*. Através de estudos realizados no Instituto de Farmacologia de Munique, Johann A. Buchner isolou uma pequena quantidade do princípio ativo salicina no ano de 1828. Em

1860 foi descoberto o ácido salicílico (Fig. 14) por Hermann Kolbe e seus alunos, que começou a ser produzido em larga escala e amplamente comercializado posteriormente. Somente em 1898, Felix Hofmann conseguiu sintetizar o ácido acetilsalicílico, que foi registrado em 1899 como “aspirina” (Fig. 14). Hoje reconhecida mundialmente como potente analgésico/antitérmico/anti-inflamatório, que atua na inibição da atividade da ciclooxigenases e consequente inibição da produção de prostanoídes, como as prostaglandinas (SIMÕES, MARIOT, 2004; RISHTON, 2008).

Figura 14 – Modificações a partir da estrutura do ácido salicílico.



Evolução do ácido salicílico natural para a aspirina sintética e o subsequente desenvolvimento de vários medicamentos anti-inflamatórios não-esteroidais e de inibidores da cicloxigenase-2. Fonte: adaptado de Rishton (2008).

O ácido acetilsalicílico, modificado a partir do ácido salicílico, foi o primeiro fármaco usado como antipirético, e atualmente é consumido em grande escala por todo o mundo, como analgésico e antitérmico (HAAS, 1983; WALKER, 1995). A síntese do ácido salicílico pode ser considerada não apenas como a descoberta de um novo medicamento, a aspirina, porém como o estopim do desenvolvimento de uma área grande terapêutica, visto que vários outros medicamentos foram desenvolvidos através de modificações na estrutura do ácido salicílico

(Fig. 14) em busca de medicamentos com efeito terapêutico semelhante e com efeitos colaterais menos pronunciados (HAAS, 1983; WALKER, 1995; SIMÕES, MARIOT, 2004; RISHTON, 2008).

2.7.1 Metabolismo vegetal secundário

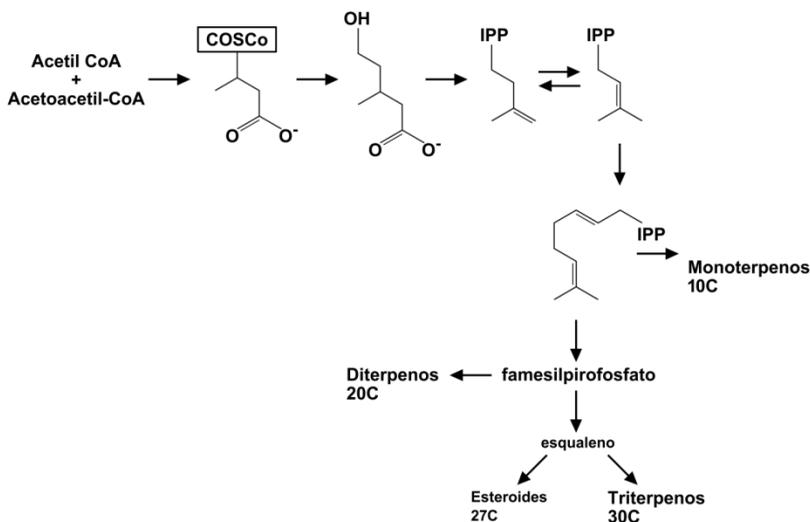
Dentre os estudos que abordam o metabolismo secundário das plantas, a descoberta da morfina é histórica. A morfina é um alcalóide natural extraído da planta *Papaver somniferum*, vulgarmente designada papoula do Oriente ou papoula dormideira, com alto poder analgésico usado para aliviar dores severas. Seu estudo se iniciou em 1806 com o isolamento da morfina por Friedrich Wilhelm Sertürner e a partir disso foram isoladas muitas outras substâncias, influenciando e direcionando muitas áreas da química orgânica, particularmente a sintética, analítica e a química farmacêutica (HARTMANN, 2007).

Todas as plantas produzem constituintes químicos, os quais fazem parte de suas atividades metabólicas normais (Fig. 15). Estes podem ser divididos em metabólitos primários (açúcares, aminoácidos, nucleotídeos e lipídeos; Fig 15), que estão envolvidos no crescimento, fotossíntese, reprodução e são encontrados em todas as plantas. Os metabólitos secundários possuem um papel ecológico, como atrativos de polinizadores, representando adaptações químicas ao estresse do meio ambiente, ou são responsáveis pela defesa química da planta contra microrganismos, insetos e predadores maiores, ou mesmo outras plantas (BUCHANAN et al., 2000). Apesar de nem todas as funções dos metabólitos secundários serem conhecidas, pode-se assumir que todos desempenham uma função vital para o bem-estar dos organismos. Dessa maneira, a fim de evitar um sentido pejorativo para descrever esse metabolismo, alguns autores referem-se aos seus metabólitos como produtos naturais de plantas, os quais fornecem a maioria das substâncias farmacologicamente ativas na produção de novos fármacos (BUCHANAN et al., 2000; DEWICK, 2009), como alcaloides, terpenos, flavonoides e esteroides (Fig. 15) com propriedades medicinais comprovadas (DI STASI, 1996). O homem utiliza muitos destes compostos secundários como alimentos de alto valor nutritivo (nutracêuticos), temperos, aromas e fragrâncias, óleos vegetais, resinas, inseticidas, matérias-primas agrícolas, bem como medicamentos e outros fins industriais, gerando produtos de alto valor em pequena quantidade quando comparados aos metabólitos primários (WAKSMUNDZKA-HAJNOS, SHERMA, KOWALSKA, 2008; TAIZ, ZEIGER, 2009).

classificação simples inclui três grupos principais (Fig. 15): (1) Terpenoides (originários da via do mevalonato, compostos quase que inteiramente de carbono e hidrogênio), (2) Fenólicos (originários de açúcares simples, contendo anéis benzênicos, hidrogênio, e oxigênio) e os (3) Compostos contendo nitrogênio ou também contendo enxofre (SIMÕES, MARIOT, 2004; TAIZ, ZEIGER, 2009). A origem dos metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose (Fig. 15), via dois intermediários principais, o ácido chiquímico e o acetato. O ácido chiquímico origina os aminoácidos aromáticos, precursores da maioria dos metabólitos secundários aromáticos (SIMÕES; MARIOT, 2004).

As principais substâncias isoladas do gênero *Pterodon* são terpenoides, os quais constituem a maior classe de metabólitos secundários. Diversas substâncias desta classe são, em geral, insolúveis em água e sintetizados a partir de acetilCoA, ou de intermediários glicolíticos e a biossíntese de terpenos e esteroides (Fig. 15 e 16) em plantas tem uma via comum, ramificando-se apenas nas etapas finais (Fig. 16) (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Figura 16 – Biossíntese de terpenos e esteroides.



A biossíntese de terpenos e esteroides nas plantas tem uma via comum, ramificando-se apenas nas etapas finais em diterpenos, esteroides e triterpenos, sintetizados pela acetilCoA a partir do metabolismo da glicose. IPP - pirofosfato de isopentenilo. Fonte: adaptado de Taiz e Zeiger (2009).

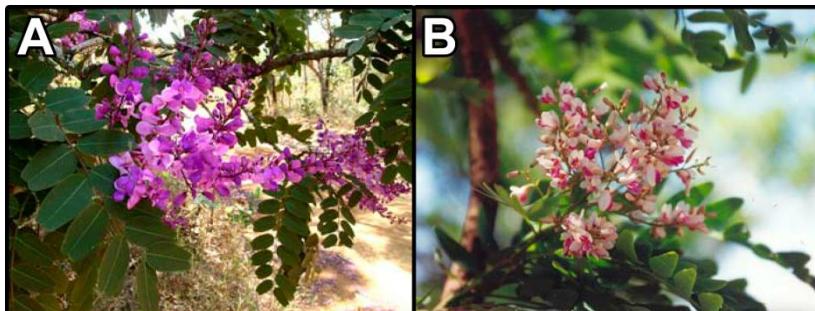
2.8 O GÊNERO *Pterodon*

A família Fabaceae, também chamada de Leguminosae, é a terceira maior família das Angiospermas, depois da Orchidaceae (orquídeas) e Asteraceae (margaridas, girassóis) (WOJCIECHOWSKI; MAHN; JONES, 2006). Possui grande distribuição (cosmopolita), incluindo cerca de 650 gêneros e aproximadamente 18.000 espécies (SOUZA; LORENZI, 2005). São plantas de hábito muito variado, desde grandes árvores das matas tropicais a arbustos e trepadeiras, vivendo em diferentes latitudes e altitudes (JOLY, 1993). A família Fabaceae e sua divisão em subfamílias distintas tem sido alvo de divergências entre os diferentes autores. Tradicionalmente, é reconhecida como uma família única, possuindo 4 subfamílias: Caesalpinioideae, Cercideae, Mimosoideae e Faboideae (Papilionoideae), sendo o gênero *Pterodon* pertencente a esta última (SOUZA; LORENZI, 2005).

A discrepância entre os autores vai além, da descrição da família Fabaceae, isto é visto também na descrição das espécies que compõem o gênero *Pterodon*, ocasionando confusão em relação à referência de seus nomes em diversas publicações da literatura. Parte dessa discrepância com relação ao número de espécies válidas de *Pterodon* está relacionada à delimitação das espécies *Pterodon emarginatus*, *P. polygalaeiflorus* e *P. pubescens*. Rocha, (2006) ressalta que Lewis (1987), em seu livro “Legumes da Bahia”, apresentou *P. pubescens* e *P. polygalaeiflorus* como sinônimos de *P. emarginatus* e desde esta publicação, apesar da mesma não se tratar de uma revisão do gênero, essas espécies têm sido tratadas de forma discrepante por autores diversos: ora como três táxons distintos, ora como dois, ora como apenas um.

Importantemente, um minucioso estudo foi feito por Rocha (2006), resolveu esta questão, utilizando marcadores moleculares do tipo RAPD (do inglês, *Random Amplified Polymorphic DNA*) e caracteres morfológicos para estudar a variação encontrada dentro de *P. emarginatus*. Os resultados obtidos, tanto para dados moleculares como para os morfológicos são concordantes e separam as duas formas (roxa e rósea) de *P. emarginatus* sensu Lewis. Assim, este estudo concluiu com as análises feitas, juntamente com dados anteriores e os fototipos dos três táxons, que *P. polygalaeiflorus* é sinonímia botânica de *P. emarginatus* Vog. e constitui a morfo roxa, já *P. pubescens* deve ser mantida como espécie distinta e constitui a morfo rósea (Fig. 17).

Figura 17 – Morfologia das espécies do gênero *Pterodon*.



A Figura 17 apresenta as duas morfologias mais comuns dentro do gênero *Pterodon*, sendo que as árvores que possuem suas flores com a morfo roxa (A) correspondem à espécie *P. emarginatus* Vog. e as que possuem flores com a morfo rósea (B) são da espécie *P. Pubescens* Benth. Fonte: adaptado de Rocha, (2006).

Neste sentido, temos que o gênero *Pterodon* é composto por 5 espécies distintas nativas do cerrado brasileiro: *P. abruptus*, *P. apparicioi*, *P. emarginatus*, *P. macrophyllus* e *P. Pubescens*. O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) declararam no Inventário da Biodiversidade do Bioma Cerrado, que este é o segundo maior bioma brasileiro, perdendo apenas para a Amazônia e ocupa uma área de 2 milhões de km², que corresponde a 25% do território nacional (RESENDE; GUIMARÃES, 2007).

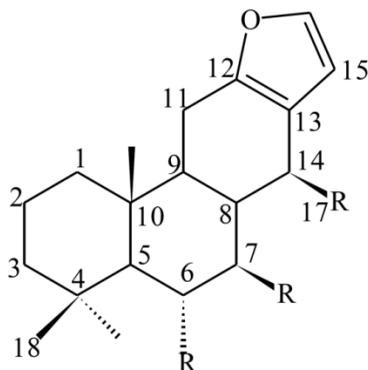
De forma geral o gênero *Pterodon* compreende a espécies arbóreas aromáticas de 8-20 m de altura, que possuem características próprias de terrenos secos e arenosos do cerrado. A espécie vegetal *P. pubescens* (Fig. 17) apresenta uma distribuição mais ao sul, nos Estados de São Paulo, Triângulo Mineiro (MG), Distrito Federal, sul do Estado de Goiás, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso. Por outro lado, a *P. emarginatus* (Fig. 17) se distribui mais ao norte, Distrito Federal, centro-norte de Goiás, Bahia e Maranhão. No Distrito Federal, *P. pubescens* distribui-se mais ao sul, (cidade de Brasília, Guará, Taguatinga, Ceilândia e Gama) e *P. emarginatus* mais a norte (Planaltina), não sendo encontradas populações mistas dessas duas espécies (ROCHA, 2006).

Ademais, as espécies do gênero *Pterodon* são conhecidas por diferentes nomes populares de acordo com a região onde são encontradas, tais como: sucupira, sucupira-branca, faveiro, fava-de-sucupira, fava-de-santo-inácio e sucupira-lisa. Sua dispersão é irregular

e descontínua, ocorrendo em agrupamentos densos com populações puras. Suas flores variam de cores que vão do rosa claro (quase esbranquiçado) ao roxo dependendo da espécie. A maturação dos frutos se dá quando a planta está praticamente despida da folhagem, permanecendo, entretanto, na árvore por mais algum tempo. Os frutos são vagens tipo sâmara (pterocarpo) arredondadas, indeiscentes e aladas, contendo uma única semente fortemente protegida dentro de uma cápsula fibro-lenhosa e envolvida externamente por uma substância oleosa amarga numa estrutura esponjosa como favos de mel. Multiplica-se apenas por sementes (FERREIRA et al., 2001; LORENZI, 2002; ROCHA, 2006; LORENZI, DE ABREU MATOS, 2008).

Entretanto, algumas das propriedades farmacológicas das espécies de *Pterodon* conhecidas popularmente têm sido comprovadas cientificamente e seus efeitos biológicos têm sido estudados simultaneamente com a caracterização química. As principais substâncias isoladas desta espécie são os diterpenos com esqueleto vouacapânicos (Fig. 18), estruturas pertencentes ao grupo dos terpenos, ou terpenoides, os quais constituem a maior classe de metabólitos secundários (NUNAN et al., 1982; DUARTE, FERREIRA-ALVES, NAKAMURA-CRAIG, 1992; COELHO et al., 2005).

Figura 18 – Estrutura fundamental dos diterpenos vouacapânicos.



Estrutura molecular do esqueleto vouacapânico e seus radicais (R). Fonte: Mahajan e Monteiro (1973).

Os estudos fitoquímicos com espécies do gênero *Pterodon* também revelam a presença de alcalóides triterpenoides nas cascas (BUSTAMANTE et al., 2010), isoflavonas e triterpenos nos caules (MARQUES et al., 1998; DE MORAES et al., 2012) e diterpenos (Fig.

18) (MAHAJAN, MONTEIRO, 1973; DUARTE, FERREIRA-ALVES, NAKAMURA-CRAIG, 1992; DUARTE et al., 1996; DE OMENA et al., 2006; KING-DIAZ et al., 2006; EUZEBIO et al., 2009; GALCERAN et al., 2011) no óleo do fruto. Além disso, Santos e colaboradores (2010) demonstraram a presença de esteroides nas folhas.

Devido às suas propriedades farmacológicas, os frutos deste gênero (erroneamente chamados de sementes) são comumente comercializados em mercados populares (Fig. 13) (EVANGELISTA et al., 2007; DUTRA et al., 2009b). Devido à ação anti-inflamatória dos frutos, é popularmente utilizado a infusão ou extratos alcoólicos dos frutos para dores na coluna, dor de garganta, doenças reumáticas, e até mesmo como tônico (fortificante) e depurativo (CARVALHO, 2004; EUZEBIO et al., 2009).

Dentre algumas outras atividades biológicas já estudadas neste gênero encontram-se: quimioprolifática contra *Schistosoma mansoni* (KATZ et al., 1993), antiproliferativa, sendo citotóxica para várias linhagens de células cancerosas testadas (DUTRA et al., 2012), cicatrizante (DUTRA et al., 2009c), antinociceptiva (DUARTE, FERREIRA-ALVES, NAKAMURA-CRAIG, 1992; DUARTE et al., 1996; DUTRA et al., 2008), anti-inflamatória (CARVALHO et al., 1999; GALCERAN et al., 2011; DE MORAES et al., 2012; VELOZO et al., 2013), antiespasmódica (LEONHARDT et al., 2010), antimicrobiana (DUTRA et al., 2009a; DE TOLEDO et al., 2011) e leishmanicida (DUTRA et al., 2009a). Além disso, plantas do gênero *Pterodon* parecem apresentar um potencial antioxidante (PAULA et al., 2005; DUTRA, LEITE, BARBOSA, 2008). No entanto, o principal uso popular está relacionado ao efeito antiartrítico que parece se encontrar na fração oleosa desses frutos (PIO CORRÊA, 1984; CARVALHO, 2004).

Dentre alguns dos mecanismos endógenos que podem estar envolvidos na atividade antinociceptiva da espécie *Pterodon polygalaeflorus* Benth., Duarte, Ferreira-Alves e Nakamura-Craig (1992) demonstraram um possível envolvimento opioide e, em 1996, foi apresentada uma participação, pelo menos em parte, por meio da ativação do sistema catecolaminérgico (DUARTE et al., 1996).

2.8.1 Atividade biológica da *Pterodon pubescens* Benth.

As investigações sobre a planta medicinal *Pterodon pubescens* (Fig. 17) foram iniciadas em 1967 a partir do isolamento do sesquiterpeno 14,15-epoxigeraniol do óleo essencial do fruto de

P. Pubescens, que mostrou ser um eficiente agente quimioprolifático na esquistossomose (MORS et al., 1967), motivando os estudos com as espécies do gênero *Pterodon*. Em seguida, foram isolados isoflavonas (BRAZ-FILHO; GOTTLIEB; VIEGAS ASSUMPCÃO, 1971), furanos diterpenoides (FASCIO et al., 1976). Recentemente, Miranda e colaboradores (2013) demonstraram a presença de dois esteroides (β -sitosterol, estigmasterol) nas folhas. Contudo, a literatura descreve claramente que diterpenos vouacapânicos (Fig. 18) são os compostos majoritários desta espécie vegetal, sendo identificados a partir do extrato etanólico (NUCCI et al., 2012) ou de frações do extrato (COELHO et al., 2005; SPINDOLA et al., 2009; HOSCHEID et al., 2012) de *Pterodon pubescens*. Adicionalmente, alguns estudos demonstram a presença do sesquiterpeno geranilgeraniol (MENNA-BARRETO et al., 2008; SPINDOLA et al., 2010; SPINDOLA et al., 2011).

Dentre as atividades biológicas já estudadas nesta espécie foi demonstrada a ação quimioprolifática contra *Schistosoma mansoni* (SANTOS-FILHO et al., 1987; DIAS FDA et al., 1995). Calixto e colaboradores (2007) demonstraram a atividade antiplaquetária do geranilgeraniol extraído de sementes da *P. pubescens*, relacionando este efeito à inibição da ciclooxigenase na cascata de coagulação sanguínea. Além disso, vários estudos vêm demonstrando uma atividade anticâncer da *P. pubescens*. Vieira e colaboradores (2008) demonstraram, em um ensaio preliminar, a atividade antiproliferativa do extrato bruto etanólico das sementes da *Pterodon* contra uma linhagem de melanoma humano. Spindola e colaboradores (2009) descreveram a atividade antiproliferativa contra diversas linhagens tumorais de furanoditerpenos obtidos da *P. pubescens*. Spindola e colaboradores (2010) também analisaram o efeito dos compostos isolados geranilgeraniol e ácido $6\alpha,7\beta$ -dihidroxivouacapan-17 β -oico, mostrando que os mesmos agem em sinergismo e não apresentam atividade relevante quando testados isoladamente, sugerindo que o efeito anti-inflamatório da *Pterodon pubescens* é devido a esta interação entre os princípios ativos presentes no extrato. Pereira e colaboradores (2010) demonstraram que o extrato da semente de *Pterodon pubescens* promove parada do ciclo celular em células leucêmicas por desregulação da ciclina D1 e dos níveis de ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) E2. Pereira e colaboradores (2011) também mostraram o efeito indutor de apoptose da subfração terpênica de *P. pubescens* em células leucêmicas K562 através da modulação da expressão de genes envolvidos no processo de apoptose, fator apoptótico ativador de protease-1 (Apaf-1) e DNA metiltransferase (DNMT). Finalmente, Pereira e colaboradores (2012) sugeriram que a ação anti-

leucêmica da subfração SF5 da *P. pubescens* está relacionada com a inibição de ERKs, NF-kB e vias de sinalização c-myc, resultando em redução da expressão de mRNA de ciclina E2 e parada do ciclo celular na fase G1.

No estudo da dor e da inflamação foi observado que, o extrato hidroalcoólico das sementes de *P. pubescens* apresentou efeito antiartrítico, confirmando o principal uso popular, em um modelo experimental de artrite induzida por colágeno II (SABINO et al., 1999a; COELHO et al., 2001; COELHO, SABINO, DALMAU, 2004). Ainda, apresenta efeito imunomodulatório (COELHO; SABINO; DALMAU, 2004), sem indução de toxicidade subaguda (COELHO et al., 2001) ou de toxicidade aguda (SABINO et al., 1999b). Além disso, Silva e colaboradores (2004) demonstraram que o óleo extraído das sementes de *P. pubescens* exibe potente atividade antiedematogênica sobre o edema de orelha induzido pelo óleo de cróton. Coelho e colaboradores (2005) ressaltam que a ação antinociceptiva do extrato hidroalcoólico das sementes de *P. pubescens*, no modelo de formalina e de constrição abdominal induzida de ácido acético, em camundongos, pode ser atribuída à presença de derivados vouacapânicos. Também, Cardoso e colaboradores (2008) determinaram atividade supressora de linfócitos T e B, relacionado à atividade anti-inflamatória do extrato etanólico. Recentemente, Hoscheid e colaboradores (2012) mostraram que a administração de doses crescentes da fração hexânica de *Pterodon pubescens* (FHPp) apresenta atividade anti-inflamatória e isenta de toxicidade nos modelos de pleurisia induzida pela carragenina e de artrite induzida por CFA, em ratos.

Quanto à investigação dos mecanismos de ação, Spindola e colaboradores (2011) demonstraram, pelo teste de ácido acético, que a ação antinociceptiva do diterpeno 6α , 7β -dihidroxivouacapan 17β -oico (isolado de *Pterodon pubescens*), não ocorreu em animais previamente tratados com cloridrato de p-clorofenilalanina metil éster (PCPA, inibidor de síntese 5-HT), sugerindo que o mecanismo de ação pode estar relacionado com a síntese e/ou liberação de serotonina. No entanto, os mecanismos subjacentes ao efeito antinociceptivo da planta medicinal *Pterodon pubescens* ainda não são totalmente compreendidos.

Este trabalho busca fortalecer e valorizar o uso popular, ampliando as avaliações sobre a atividade antinociceptiva da espécie vegetal *Pterodon pubescens* e o mecanismo de ação envolvido neste efeito, contribuindo com mais informações sobre a eficácia e segurança necessárias para o desenvolvimento de novos fármacos.

2.9 OBJETIVOS

2.9.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil fitoquímico e o efeito antinociceptivo do extrato etanólico dos frutos da *Pterodon pubescens* Benth. em modelos experimentais de dor aguda e crônica, bem como o seu mecanismo de ação, em camundongos.

2.9.2 Objetivos específicos

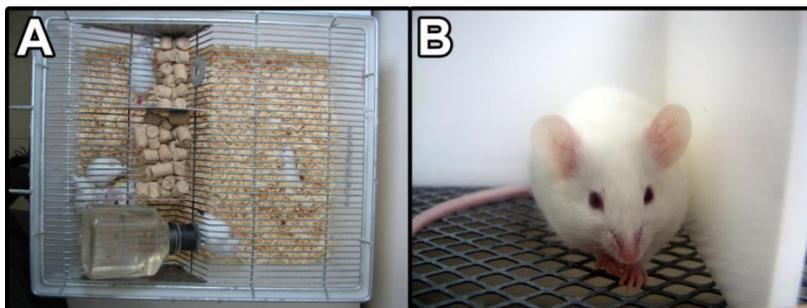
- 1) Analisar o perfil fitoquímico do EEPp;
- 2) Avaliar o efeito antinociceptivo do EEPp em modelos de dor aguda e crônica em camundongos;
- 3) Analisar o envolvimento do sistema glutamatérgico, de citocinas pró-inflamatórias e de canais TRPV1 e TRPA1 no efeito antinociceptivo do EEPp em camundongos;
- 4) Avaliar parâmetros bioquímicos de toxicidade do EEPp em camundongos;
- 5) Investigar o potencial antioxidante do EEPp.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos Swiss machos e fêmeas adultos (2 meses de idade), pesando entre 25-35 g (Fig. 19), provenientes do Biotério Central da UFSC, mediante aprovação dos protocolos experimentais pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) desta mesma Universidade (protocolo PP00745). Uma vez recebidos do Biotério Central, os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Neurobiologia da Dor e da Inflamação (LANDI), com temperatura controlada de 22 ± 2 °C, em ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas às 6:00 h) e com água e ração *ad libidum*. Em biotério próprio os animais foram separados pelo sexo e de acordo com seus grupos experimentais (lesionados/tratados). Mantidos em câmaras com circulação de ar (Alesco), em gaiolas de polipropileno medindo 41 x 34 x 16 cm de diâmetro (Fig. 19), com tampa superior revestida por barras de aço inox, contendo um frasco de polipropileno com água (500 ml) e espaço adequado para armazenamento da ração. O número de animais foi limitado a 15 por caixa, proporcionando um alojamento cômodo exigido para esta espécie. Nos dias de experimento, os animais foram mantidos no laboratório para ambientação por pelo menos 1 hora antes da realização dos experimentos, sendo que os experimentos descritos foram realizados de acordo com as normas éticas para o estudo da dor com animais de laboratório (ZIMMERMANN, 1983).

Figura 19 – Camundongos Swiss



(A) Gaiola de polipropileno onde os animais são acomodados. (B) Camundongo Swiss com aproximadamente 2 meses de idade. Fonte: Elaborado pela autora (2014).

3.2 DROGAS E REAGENTES

As seguintes substâncias foram utilizadas: formalina (LabSynth, Diadema, Brasil); cloridrato de ácido L-glutâmico, cinamaldeído, cânfora, xilazina, cetamina, carbonato de sódio, acetato de potássio, cloreto de alumínio, ferrozina (3-(2-piridil)-5,6-difenil-1, 2,4-triazina- p, ácido monossódico hidrato de sal p'-dissulfônico), 2 2-difenil-1-picrilhidrazilo, ferrocianeto de potássio e reagente de Folin Ciocalteu (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); Hidrato de cloral (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil); Isoflurano (Cristália, SP, Brasil); ácido gálico, quercetina, ácido ascórbico, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), BHT (hidroxitolueno butilado) e cloreto férrico (Merck, Alemanha). Para a determinação de parâmetros bioquímicos 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 EEPp, que foi dissolvido em solução salina e Tween 80 (5% de modo a não influenciar na atividade exercida pelo extrato). Além disso, os grupos controles receberam pré-tratamento intragástrico com o veículo usado para diluir o EEPp (solução salina com 5 % de Tween 80). A administração intragástrica com o EEPp ou veículo, bem como a administração subcutânea por cânfora (controle positivo do teste de cinamaldeído) foram realizadas com volume de 10 ml/kg. O EEPp foi administrado 1 hora antes dos experimentos por via intragástrica, para mimetizar a via (oral) popularmente utilizada em seres humanos (Fig. 20).

Figura 20 – Administração por gavagem.



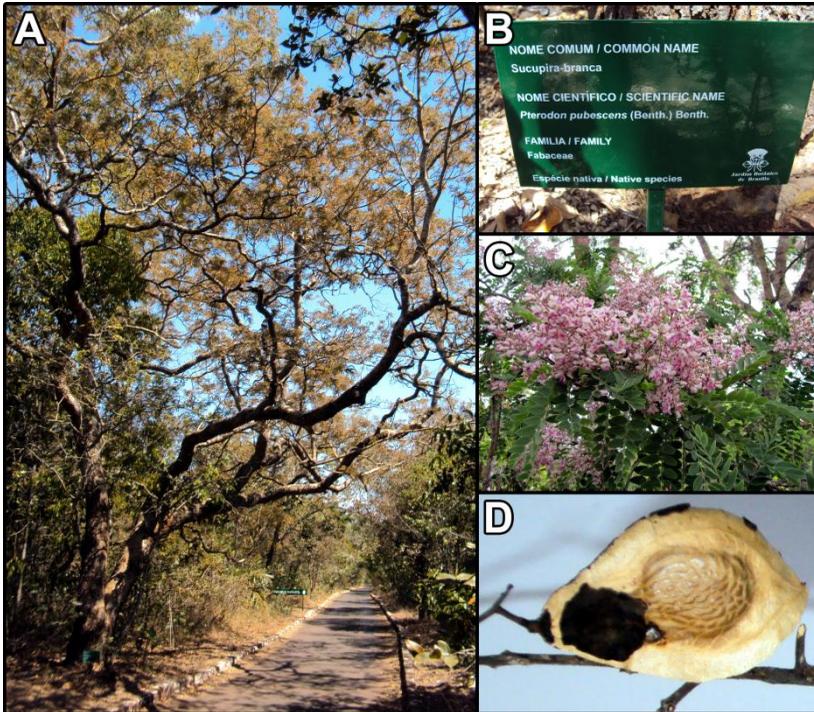
O extrato dos frutos de *Pterodon pubescens* foi administrado por via intragástrica, para mimetizar a via (oral) popularmente utilizada em seres humanos. Fonte: Elaborado pela autora (2014).

3.3 PREPARAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL: *Pterodon pubescens* Benth.

Para o presente estudo foram feitas duas coletas dos frutos de um único exemplar da árvore da espécie *Pterodon pubescens* Benth, localizado no Jardim Botânico de Brasília (Fig. 21), nas datas de 22/08/2011 e 08/09/2012. As árvores desta espécie vegetal, localizadas no Jardim Botânico de Brasília, foram alvo do minucioso estudo botânico feito por Rocha (2006).

A árvore está localizada na trilha de asfalto do Jardim Botânico de Brasília, aproximadamente a 1 km da portaria principal, à esquerda (15°52'1,01" S; 47°49'45,65" O), conforme mostra a Figura 21. Os frutos coletados foram identificados pelo Dr. Rafael Trevisan (Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina - Florianópolis) e o espécime utilizado foi catalogado sob nº 33.761 no Herbário FLOR da Universidade.

Figura 21—Árvore e frutos da *Pterodon pubescens* Benth.



(A) Árvore de *Pterodon pubescens* localizada no Jardim Botânico de Brasília – DF. (B) Placa de identificação botânica localizada na frente da árvore. (C) Foto da árvore obtida na época de floração. (D) Frutos de *Pterodon pubescens* colhidos desta árvore. Fonte: Elaborado pela autora (2014).

O extrato etanólico foi preparado semelhante ao produzido pela Pastoral da Saúde de Florianópolis que é na forma de tintura. Brevemente, os frutos (com semente) de *Pterodon pubescens* (200 g) foram triturados e submetidos à maceração com álcool de cereais (2 litros) em temperatura ambiente, com poucos períodos de agitação (2 vezes ao dia), por 30 dias. Em seguida, o extrato foi filtrado e o solvente foi evaporado em evaporador rotativo sob pressão e temperatura reduzida como descrito anteriormente pelo nosso grupo (NUCCI et al., 2012). O resultado deste processo foi um óleo viscoso, castanho e perfumado (PEREIRA et al., 2010), denominado extrato etanólico de *Pterodon pubescens* (EPP) (Fig. 22). O rendimento final obtido foi de 47,93 g de extrato, aproximadamente 25%.

Figura 22 – Extrato etanólico de *Pterodon pubescens*.



O resultado do processo de extração do EEPp é um óleo viscoso, castanho e perfumado (Pereira et al., 2010). Fonte: Elaborado pela autora (2014).

3.4 ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO DE *Pterodon pubescens* Benth.

3.4.1 Avaliação por CG-EM do EEPp

A análise do extrato foi realizada por meio de um cromatógrafo gasoso da Agilent 5975 com detector por espectrometria de massa (CG-EM) (Fig. 23). Foi utilizada uma coluna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) e as condições da análise foram as seguintes: gás carreador: He, (1 mL/min.); temperatura da coluna programada de 60-290 °C (3 °C/min) com isoterma a 290 °C por 5/min; temperatura do injetor em 260 °C e temperatura do detector em 280 °C. Razão de split de 1:10. Para a detecção foi aplicada a técnica de impacto eletrônico a 70 eV. As amostras foram diluídas em clorofórmio (5%) e foi injetado 1µl da solução para análise no CG-EM. A concentração dos componentes do extrato foi calculada utilizando as áreas individuais dos picos de cada componente. Cada componente foi identificado pela comparação dos espectros de massas obtidos com os dados descritos na literatura (ADAMS, 1995). Os índices de retenção (IR) foram calculados através da co-injeção de uma mistura de n-alcenos de série (C5 - C30), usando a equação descrita por Vandendool e Kratz (1963).

O perfil fitoquímico das duas coletas da planta medicinal *Pterodon pubescens* foi confirmado por nosso grupo por meio da análise de CG-EM, sendo então comparado com a literatura e com dados prévios obtidos em nosso grupo (NUCCI et al., 2012). O efeito antinociceptivo dos dois extratos foi testado e comparado no teste preliminar de formalina. Em ambas as comparações (perfil fitoquímico e

efeito antinociceptivo) o EEPp apresentou resultados similares, mostrando que o extrato tem boa reprodutibilidade.

Figura 23 – Cromatógrafo gasoso com detector por espectrometria de massas.



Cromatógrafo gasoso da Agilent 5975 com detector por espectrometria de massas (CG-EM), usado para verificar o perfil químico do extrato de *Pterodon pubescens*. Fonte: Elaboração dos autores (2014).

3.4.2 Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais

Para quantificação do conteúdo de compostos fenólicos totais foi utilizado um espectrofotômetro (Perkin Elmer Lambda S) (Fig. 24), pelo método de Folin-Ciocalteu (GHASEMI, GHASEMI, EBRAHIMZADEH, 2009; NABAVI et al., 2009). As amostras do extrato (500 μ l de diferentes diluições) foram misturadas com reagente de Folin-Ciocalteu (5 ml, 01:10 diluída com água destilada) e armazenadas durante 5 min., depois foram adicionados carbonato de sódio (Na_2CO_3) aquoso (4 ml, 1 M). A mistura foi deixada em repouso durante 15 minutos e os fenóis foram determinados por um espectrofotômetro de UV-VIS a 725 nm. A curva de calibração foi construída usando solução de ácido gálico (como padrão), nas concentrações de 0, 50, 100, 150, 200 e 250 mg/ml de soluções de ácido gálico em metanol: água (50:50, v/v), para comparação ($y = 5,60X - 21,83$; $R^2 = 0,9999$). Para o valor do “branco”, utilizou-se uma solução preparada conforme descrito acima, porém, sem a presença da amostra.

O aparecimento da coloração azul-escuro é o indicativo da presença de compostos fenólicos na amostra testada. Todos os testes foram realizados em triplicata. O teor de compostos fenólicos totais foi expresso em equivalente de ácido gálico, ou seja, mg EAG/g de EEPp.

Figura 24 – Espectrofotômetro.



Espectrofotômetro *Perkin Elmer Lambda S*, utilizado para os ensaios que avaliaram DPPH (2,2-difenil-picril-hidrazil), poder redutor e atividade quelante do Fe^{2+} . Fonte: Elaboração dos autores (2014).

3.4.3 Determinação do conteúdo de flavonoides

Para quantificação do conteúdo total de flavonoides foi utilizado um espectrofotômetro (Perkin Elmer Lambda S) (Fig. 24), pelo método colorimétrico usando cloreto de alumínio, conforme descrito por Nabavi e colaboradores (2008). Resumidamente, 500 μ l de solução do extrato em metanol foi misturado separadamente com 1,5 ml de metanol, 100 μ l de cloreto de alumínio a 10%, 100 μ l de acetato de potássio a 1 M e 2,8 ml de água destilada, e deixadas à temperatura ambiente durante 30 min. A absorbância da mistura reacional foi medida a 415 nm no espectrofotômetro. Como branco, foi utilizada uma solução preparada conforme o procedimento acima, sem a adição da solução de cloreto de alumínio ($AlCl_3$). O aparecimento de coloração verde é indicativo da presença de flavonoides. O conteúdo total de flavonoides foi calculado usando quercetina (como padrão) a partir de uma curva de calibração. A curva de calibração foi obtida através da preparação de soluções de quercetina em concentrações de 12,5 a 100 mg/ml em metanol, para comparação ($y = 10,57X - 2,29$; $R^2 = 0,9999$). Os testes foram feitos em triplicata. O teor de flavonoides foi expresso em equivalentes de

quercetina, ou seja, em mg EQ/g de EEPp. R= 74,48 mg EQ/ g de extrato.

3.5 AVALIAÇÃO LOCOMOTORA: TESTE DO CAMPO ABERTO (OPEN-FIELD)

O teste do campo aberto foi realizado a fim de excluir a possibilidade de que a ação antinociceptiva do EEPp poderia estar relacionada com efeitos inespecíficos, tanto em nível central quanto periférico, sobre a atividade locomotora dos animais. O comportamento dos animais foi verificado conforme descrito previamente (RODRIGUES et al., 2002; NUCCI et al., 2012). O aparato de avaliação consiste de uma arena circular de PVC medindo 62 cm de diâmetro por 29,5 altura. O piso da arena é dividido em quadrantes semelhantes (Fig. 25), e o número de cruzamentos atravessados com todas as patas, foi contado cumulativamente durante 6 minutos. Os camundongos foram submetidos ao teste de campo aberto em uma avaliação após tratamento único (agudo), e outra após o término do tratamento prolongado no modelo de dor neuropática (LPNI). Na avaliação aguda, os camundongos foram tratados com EEPp (30-600 mg / kg, ig) ou veículo (10 ml/kg, i.g.) 1 hora antes do teste. A avaliação conduzida com os animais submetidos à LPNI e que receberam o tratamento prolongado com EEPp (300 mg/kg, i.g.) ou veículo (10 ml/kg, i.g.) foram analisados no 19º dia pós-cirurgia, 1 hora após a última administração.

Figura 25 – O aparato de campo aberto.



Arena circular de PVC dividida em quadrantes para avaliação da atividade locomotora no teste do campo aberto. Fonte: Elaborado pela autora (2014).

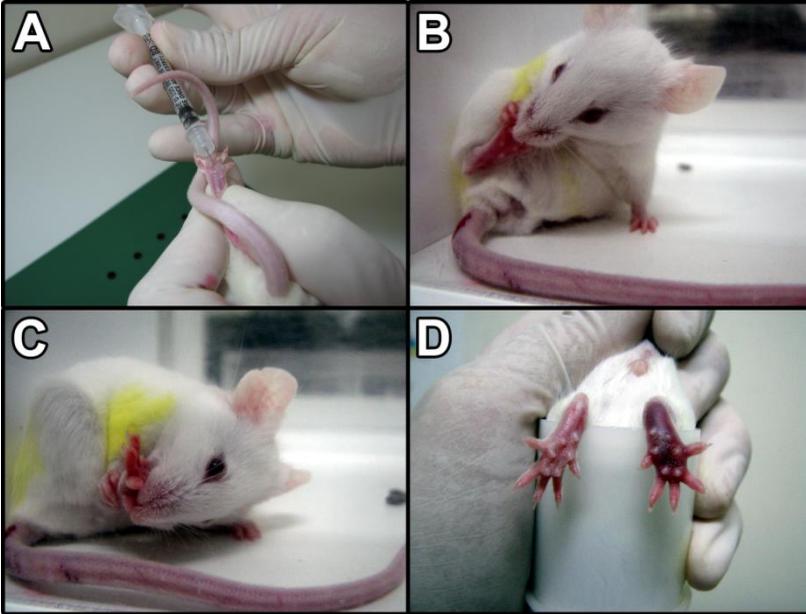
3.6 MODELOS DE NOCICEPÇÃO AGUDA

3.6.1 Nociceção induzida pela injeção intraplantar de formalina

Para verificar o efeito antinociceptivo agudo do EEPp foi utilizado o teste de nociceção, induzida pela injeção intraplantar de formalina, utilizando camundongos Swiss machos (Fig. 26). Esse modelo permite evidenciar duas fases de nociceção: a primeira (F1) ocorre durante os primeiros 5 minutos após a injeção da formalina (origem neurogênica); a segunda (F2) ocorre entre 15 e 30 min após a injeção, representando a resposta tônica à dor, acompanhada de uma resposta inflamatória relacionada com a liberação de mediadores químicos da inflamação. O procedimento utilizado foi similar ao descrito anteriormente (HUNSKAAR; HOLE, 1987; MARTINS et al., 2011). Brevemente, os animais receberam 20 µl de formalina a 2,5% (0,92% de formaldeído) ou salina na região ventral da pata posterior direita, respectivamente (Fig. 26). Após a injeção de formalina os animais foram colocados, individualmente, em um funil de vidro, ao lado de um espelho para facilitar a observação. O tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com formalina foi cronometrado, sendo esse tempo considerado como indicativo de nociceção (Fig. 26). Os animais foram tratados com solução contendo EEPp por via intragástrica (i.g) (1-300 mg/kg) uma hora antes da realização dos experimentos. Os grupos controles foram tratados com solução de salina (10 ml/kg, i.g.).

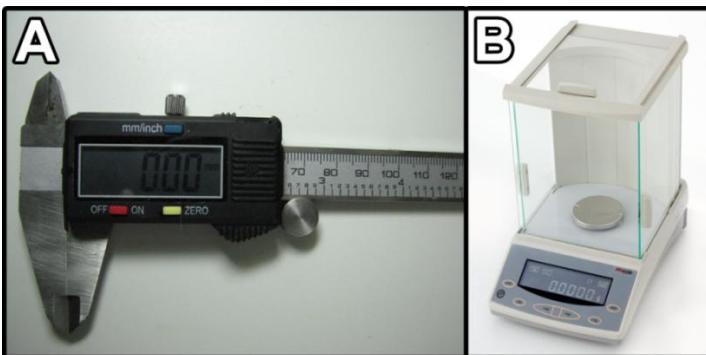
Ao final do tempo de observação, foi realizada a verificação do edema através da medição por paquímetro (Fig. 27). Nesta última foi utilizado um paquímetro universal da marca Starrett (modelo: 125MEB-6/150) para medir a espessura imediatamente proximal a linha média na superfície plantar do animal. Logo após, os animais foram eutanasiados e as patas posteriores foram retiradas imediatamente proximais a articulação tíbio-tarsal e pesadas em uma balança analítica (Fig. 27) para quantificação do edema induzido pela injeção intraplantar de formalina. A diferença de peso (mg) entre as patas direita (injetada com formalina) e esquerda (injetada com salina) foi considerado como índice do edema. Este método foi realizado para confirmação da avaliação anterior (edema avaliado por paquímetro).

Figura 26 – Teste da Formalina.



(A) Injeção intraplantar de formalina. (B) Resposta nociceptiva de lambida da pata injetada. (C) Resposta nociceptiva de mordida da pata injetada. (D) edema e rubor causado pela injeção intraplantar de formalina. Fonte: Elaborado pela autora (2014).

Figura 27 – Aparato utilizado para mensuração do edema de pata.



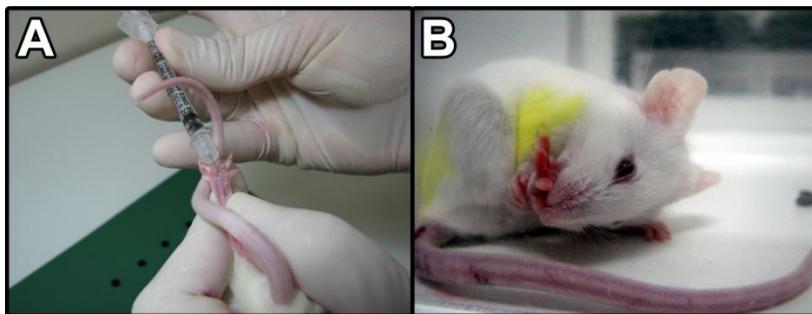
(A) Paquímetro universal da marca Starrett (modelo: 125MEB-6/150) para medir a espessura imediatamente proximal a linha média na superfície plantar do animal. (B) Balança analítica para quantificação do edema pelo peso da pata. Fonte: Elaborado pela autora (2014).

3.6.2 Nociceção induzida pela injeção intraplantar de glutamato

O sistema glutamatérgico é um dos mais importantes sistemas de neurotransmissores envolvidos na estimulação e manutenção da nociceção e da antinociceção, tanto em nível periférico quanto central (FUNDYTUS, 2001; RIEDEL; NEECK, 2001). Além disso, a injeção i.pl. de glutamato induz a estimulação direta dos neurônios nociceptivos, causando assim a liberação de vários mediadores inflamatórios e neuropeptídeos, também envolvidos na transmissão nociceptiva (DANBOLT, 2001; BEIRITH, SANTOS, CALIXTO, 2002; 2003).

Sendo assim, o modelo da nociceção induzida pela injeção intraplantar de glutamato foi empregado com o objetivo de evidenciar a possível interação periférica do sistema glutamatérgico na ação antinociceptiva do EEPp. Para isto, foram utilizados camundongos Swiss fêmeas e os animais foram pré-tratados com EEPp pela via intragástrica (30 e 300 mg/kg, i.g.), 1 hora, antes da injeção intraplantar (i.pl.) de 20 µl de uma solução pH ajustado (pH 7,4) de glutamato (20 µmol/pata) (Fig. 28), de acordo com o método descrito anteriormente (BEIRITH, SANTOS, CALIXTO, 2002; MEOTTI, COELHO IDOS, SANTOS, 2010). O grupo controle recebeu veículo pela via intragástrica (10 ml/kg, i.g.). Após a injeção de glutamato, os camundongos foram observados em funis de vidro individuais e o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada, durante 15 minutos, foi quantificado e considerado como indicativo de nociceção (Fig. 28).

Figura 28 – Teste do glutamato na pata.



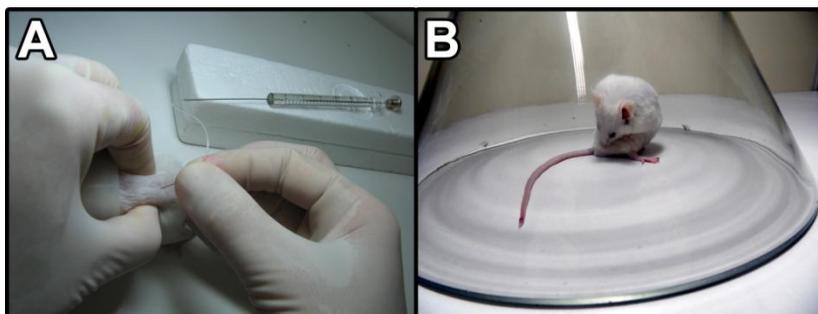
(A) Injeção intraplantar de glutamato. (B) Resposta nociceptiva provocada pela injeção de glutamato na pata. Fonte: Elaborado pela autora (2014).

3.6.3 Nociceção induzida pela administração intratecal de aminoácidos excitatórios e citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β

Este modelo se presta ao estudo de fármacos que atuam sobre o sistema glutamatérgico em nível central. A fim de obter informações adicionais sobre a possibilidade dos receptores glutamatérgicos estarem envolvidos no mecanismo antinociceptivo do EEPp, nesta série de experimentos, o efeito do EEPp foi avaliado na nociceção induzida pela injeção intratecal (Fig. 29) de agonistas glutamatérgicos em camundongos, de acordo com o método descrito anteriormente (URCA, RAIGORODSKY, 1988; SAKURADA et al., 1990; BRAMBILLA et al., 1996; BOXALL et al., 1998). Para isto, foram utilizados camundongos Swiss fêmeas e a resposta nociceptiva foi induzida pela injeção intratecal de 5 μ l de cada uma das drogas: agonistas glutamatérgicos (o aminoácido excitatório, 175 nmol/i.t.), trans-ACPD (agonista para receptores de glutamato metabotrópicos mGLUR 1 e 5, 50 nmol/i.t.), NMDA (agonista seletivo do subtipo NMDA para receptores ionotrópicos glutamatérgicos, 450 pmol/i.t.), cainato (agonista seletivo do subtipo cainato para receptores ionotrópicos glutamatérgicos, 110 pmol/i.t.), o AMPA (agonista seletivo do subtipo AMPA para receptores glutamatérgicos ionotrópicos, 135 pmol/i.t.). As doses dos agonistas glutamatérgicos foram pré-determinadas com base em experimentos realizados em nosso laboratório (GADOTTI et al., 2006; LONGHI-BALBINOT et al., 2009; BAGGIO et al., 2010; MARTINS et al., 2011). Para avaliar o envolvimento das citocinas pró-inflamatórias no mecanismo de ação antinociceptivo do EEPp, os animais receberam injeção intratecal de 5 μ l de TNF- α (0,1 pg/sítio) e IL-1 β (1 pg/sítio). As doses das citocinas foram pré-determinadas com base em experimentos realizados em nosso laboratório (MARTINS et al., 2011; GADOTTI et al., 2012). As injeções foram administradas em camundongos em estado de vigília (sem utilização de anestésico) utilizando o método descrito por Hylden e Wilcox (1980). Brevemente, os animais foram mantidos manualmente, e uma agulha de calibre 30 G ligada a um tubo de polietileno com uma micro-seringa de 25 μ l (Hamilton, Birmingham, Reino Unido) foi inserida através da pele e entre as vértebras L5-L6, no espaço subaracnóide espinal (Fig. 29). Cada injeção foi administrada por um período de 5 segundos e o movimento do reflexo da cauda foi considerado como indicativo de sucesso de administração. Após a injeção das diferentes substâncias, os camundongos foram observados em funis de vidro individuais e o tempo

em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a região posterior do corpo foi quantificado e considerado como indicativo de nocicepção (Fig. 29), durante os períodos apropriados para cada substância: glutamato (3 min); NMDA (5 min); AMPA (1 min); cainato (4 min) e trans- ACPD, TNF- α e IL-1 β (15 min). Os animais foram pré-tratados com EEPp (30 ou 300 mg/kg) ou veículo (10 ml/kg) intragastricamente (i.g.) 1 hora antes dos experimentos.

Figura 29 – Avaliação por injeção intratecal.



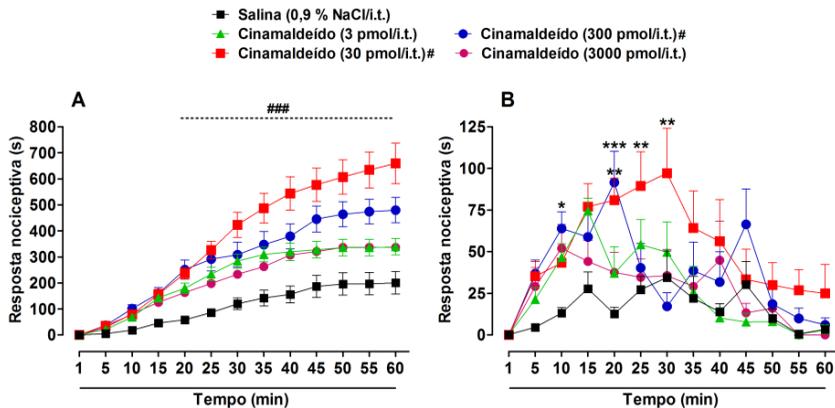
(A) Injeção intratecal. (B) Resposta nociceptiva característica da injeção intratecal, onde o animal lambe e/ou morde toda a região inferior do corpo (abaixo do nível onde foi aplicada a injeção). A injeção intratecal foi utilizada para avaliação de alguns possíveis mecanismos centrais que podem estar envolvidos no efeito antinociceptivo do EEPp, como agonistas glutamatérgicos, citocinas pró-inflamatórias e ativadores dos canais TRPV1 e TRPA1. Fonte: Elaborado pela autora (2014).

3.6.4 Nocicepção induzida pela administração intratecal de capsaicina ou cinamaldeído

Para avaliar o possível envolvimento do TRPV1 no efeito antinociceptivo do EEPp, foram utilizados camundongos Swiss fêmeas, esses animais receberam injeção intratecal (Fig. 29) com um ativador específico deste canal, a capsaicina, na dose de 100 pmol/sítio e a resposta nociceptiva foi avaliada por 5 minutos, como anteriormente descrito por Sakurada e colaboradores (1996). Além disso, para avaliar o possível envolvimento do TRPA1, nosso grupo realizou um trabalho de padronização de tempo e dose para avaliação da nocicepção induzida pelo cinamaldeído por via intratecal, em camundongos (Fig. 30). Previamente foi demonstrado que a injeção intratecal de cinamaldeído induz comportamento nociceptivo em ratos (KLAFKE et al., 2012).

Neste sentido, a padronização foi feita a partir de uma curva dose-resposta 3-3000 pmol/sítio, onde o comportamento nociceptivo foi avaliado de 5 em 5 minutos, por 1 hora (Fig. 30). Com os resultados obtidos, foram escolhidos a melhor dose e tempo, a fim de evidenciar o comportamento nociceptivo. Assim, a dose utilizada foi de 30 pmol/sítio e os animais foram avaliados por 30 minutos após a injeção (Fig. 30). A quantidade de tempo (em segundos) em que o animal passou mordendo ou lambendo a região inferior à área injetada foi tomada como indicativo de nocicepção após a injeção intratecal de 5 µl de cada uma das drogas (Fig. 29).

Figura 30 – Padronização do cinamaldeído intratecal



Os animais receberam injeção intratecal de salina ou cinamaldeído (ativador TRPA1) e o nocicepção foi avaliada cumulativamente por até 1 hora (A) ou a diferença da resposta foi registrada a cada 5 minutos (B). Cada coluna representa a média de 10 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M.. Os asteriscos (*) denotam a significância, quando comparado com o grupo controle salina (* $P < 0,05$; * $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$). As cerquilhas (#) indicam diferenças significativas dos grupos que receberam as concentrações de 30 e 300 pmol de cinamaldeído intratecal, quando comparado com o grupo controle salina (### $P < 0,001$). A significância estatística foi determinada com ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni. Fonte: Elaborado pela autora (2014).

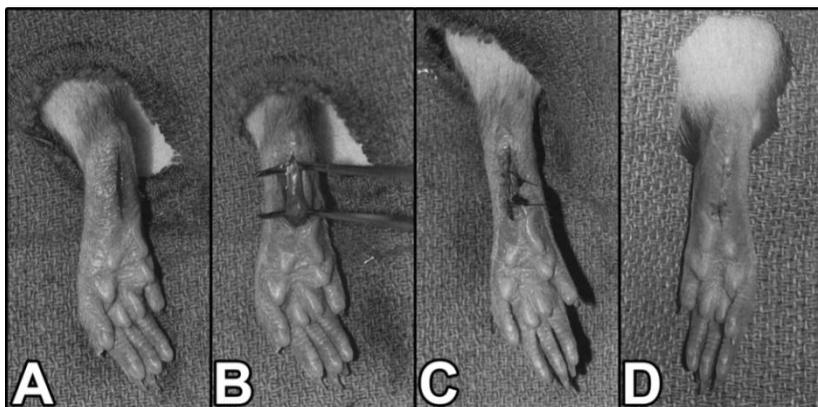
3.6.5 Incisão plantar (dor pós-operatória)

A dor pós-operatória foi induzida por uma cirurgia de incisão plantar (CIP) em camundongos (Fig. 31), como descrito previamente por Pogatzki e Raja (2003). Para isto, foram utilizados camundongos Swiss machos e os animais foram anestesiados com 1–2% de Isoflurano

a 100% de O₂, administrado por meio de uma máscara nasal. Após a preparação estéril da pata traseira direita, foi realizada uma incisão longitudinal de 5 mm através da pele e fáscia da superfície plantar, usando um bisturi com lâmina número 11. A incisão foi iniciada a 2 mm da extremidade proximal do calcanhar em direção aos dedos. O músculo plantar foi elevado com uma pinça, mantendo a origem e inserção do músculo intacto. Após a incisão, a pele foi suturada com um fio de sutura de polipropileno 6.0 não absorvível, e coberta com 10% de solução povidine-iodo® (Fig. 31) (NUCCI et al., 2012; CIDRAL-FILHO et al., 2013; MARTINS et al., 2013a).

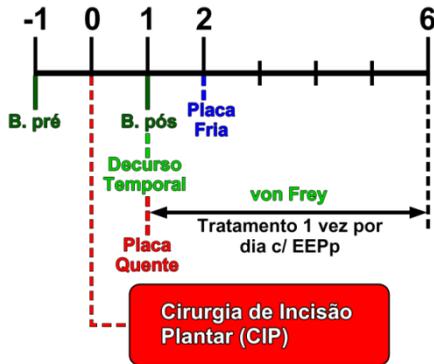
Os animais do grupo controle para a cirurgia foram submetidos a um falso procedimento (grupo Sham – falso operado) cirúrgico, que consiste apenas na aplicação da anestesia. Após os procedimentos os animais permaneceram em suas gaiolas para recuperação. As suturas foram removidas no 2^o dia pós-operatório. O comportamento nociceptivo foi verificado por meio da avaliação da hiperalgesia mecânica e térmica dos animais, a partir de 24 horas após CIP (descrição detalhada no item 3.7.1 e 3.7.2, bem como na Fig. 32).

Figura 31 – Os diferentes estágios do procedimento cirúrgico de incisão plantar.



Os diferentes estágios do procedimento cirúrgico de incisão plantar, segundo Brennan, Vandermeulen e Gebhart (1996). A: incisão longitudinal de 5 mm feita através da pele e fáscia iniciando a 0,5 cm da extremidade proximal do calcanhar se estendendo pela linha média do pé; B: O músculo plantar é elevado sendo realizada uma incisão longitudinal; C: Depois da hemostase a incisão é suturada; D: Cicatrização, 5 dias após a incisão. Fonte: adaptado de Brennan, Vandermeulen e Gebhart (1996).

Figura 32 – Esquema cronológico das avaliações da dor pós-operatória.



A hiperalgesia mecânica, induzida por dor pós-operatória, foi avaliada a partir de 24 horas após a cirurgia de incisão plantar (CIP). Primeiramente foi realizada uma avaliação do efeito antinociceptivo do EEPp (0,1-100 mg/kg., i.g) no decurso temporal. Depois um tratamento diário com o EEPp (100 mg/kg., i.g.), durante 6 dias consecutivos (1^o ao 6^o dia) após a CIP. A hiperalgesia térmica ao calor e ao frio foi avaliada no 1^o e 2^o dias pós-operatório, respectivamente. Fonte: Elaborado pela autora (2014).

3.7 MODELOS DE NOCICEPÇÃO CRÔNICA

3.7.1 Dor pós-isquemia crônica (isquemia e reperfusão da pata)

A dor pós-isquemia crônica (DPIC) é desenvolvida após 3 horas de isquemia e reperfusão da pata (IRP), e é descrita como um modelo animal de síndrome da dor complexa regional do tipo I (SDCR-I) (Fig. 33). A IRP foi realizada conforme descrito previamente por Millecamps e colaboradores (2010). Para isto, foram utilizados camundongos Swiss machos. Para realização da isquemia, os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de hidrato de cloral (7%, 0,6 ml/kg) (QUINTAO et al., 2006; NUCCI et al., 2012; MARTINS et al., 2013c). Após a verificação do estado de consciência do animal, foi colocado, um anel elástico com 1,2 mm de diâmetro interno (Elástico Ligadura 000-1237 marca: Uniden), no maléolo medial de modo a fazer um torniquete na pata posterior direita (Fig. 33) dos animais. Para facilitar o deslizamento do elástico, a pata foi introduzida numa ponteira de pipeta de 1000 µl cortada na extremidade maior, obtendo 4 mm de diâmetro. O animal foi mantido sob anestesia com reforços de 20% da dose inicial

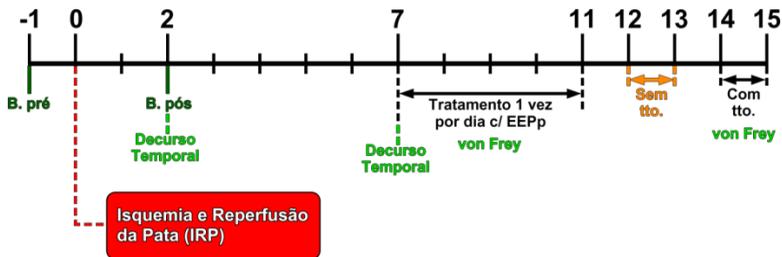
por três horas e então o anel foi cortado, permitindo a reperfusão da pata. Os animais do grupo Sham (falso-operado) receberam exatamente o mesmo procedimento com a anestesia, porém, o anel elástico foi cortado de modo a envolver o tornozelo sem obstruir o fluxo sanguíneo da pata traseira direita. Após a isquemia, os animais permaneceram próximos a uma lâmpada até voltarem a deambular pela caixa, retornando para o biotério do laboratório. O comportamento nociceptivo foi verificado por meio da avaliação da hiperalgesia mecânica dos animais, a partir do 2^o dia após DPIC (descrição detalhada no item 3.7.1, bem como na Fig. 34).

Figura 33 – Pata de camundongos antes, durante e após a isquemia e reperfusão.



A Figura acima ilustra a pata dos camundongos antes, durante e após a isquemia e reperfusão (IR). A: antes da exposição ao torniquete; B: durante a isquemia, quando a pata se apresenta cianótica e fria, mostrando hipóxia tecidual; C: cinco minutos após a isquemia a pata se mostra ingurgitada com sangue e edematosa, refletindo uma hiperemia reativa intensa; D: quatro dias após a reperfusão, a hiperemia e o edema ainda estão presentes, e a pele da pata parece ressecada. Fonte: adaptado de Bratti (2011).

Figura 34 – Esquema cronológico das avaliações da isquemia e reperfusão da pata.



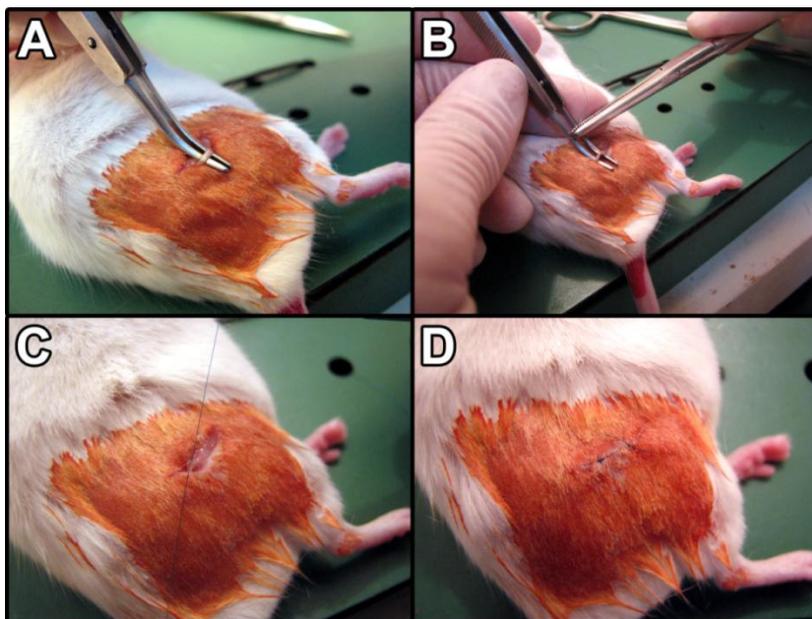
A hiperalgesia mecânica, induzida por DPIC, um modelo animal de síndrome da dor complexa regional tipo-1. Primeiramente foi realizada uma avaliação do efeito antinociceptivo do EEPp (0,1-100 mg/kg., i.g) no decorso temporal, no 2^o (início da fase inflamatória) e 7^o (início da fase neuropática) dias pós-isquemia. Depois um tratamento prolongado com o EEPp (100 mg/kg., i.g.), durante 5 dias consecutivos (7^o ao 11^o dia) após a IRP. O tratamento foi interrompido 12^o dia e reiniciado 14^o dia após IRP e continuou até o 15^o dia. Fonte: Elaborado pela autora (2014).

3.7.2 Ligadura parcial do nervo isquiático (dor neuropática)

Para a realização da ligadura parcial no nervo isquiático (LPNI) foi utilizado camundongos Swiss fêmeas e seguido o procedimento descrito por Malmberg e Basbaum (1998) (Fig. 35). Resumidamente, os camundongos foram anestesiados com uma injeção intramuscular (1 ml/kg, i.m) de xilazina (10 mg/kg) e cetamina (80 mg/kg). Após a verificação do estado de consciência do animal (através da ausência de resposta ao pinçamento da pata e/ou da cauda), efetuou-se a tricotomia na área que foi operada (coxa direita). Em seguida, fez-se uma incisão medial e curvilínea na coxa direita do animal. A exposição do nervo isquiático foi realizada após a divulsão muscular (músculo bíceps femoral). Foi utilizado um fio de sutura de polipropileno 8.0 não absorvível, para amarrar firmemente $\frac{1}{3} - \frac{1}{2}$ do nervo isquiático direito (Fig. 35). Logo após foi feita a sutura da pele usando um fio de sutura de polipropileno 6.0 não absorvível e a assepsia no local foi feita com uma solução de 10% povidine-iodo®. Os animais do grupo Sham (falso-operado) passaram por todo procedimento cirúrgico, porém o nervo isquiático foi exposto, mas não foi ligado. A incisão da pele foi suturada e esterilizada com solução de iodo. Imediatamente após a cirurgia, os animais foram mantidos em uma sala quente até a recuperação completa

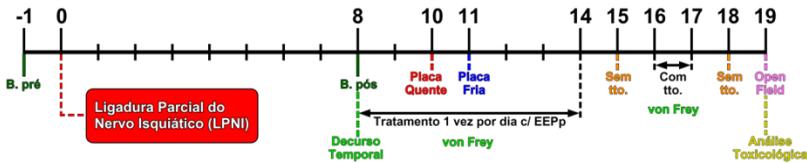
da anestesia (MAZZARDO-MARTINS et al., 2012; CORDOVA et al., 2013). Uma vez que todos os animais voltaram a deambular dentro da caixa, eles foram levados de volta para o biotério do laboratório. O comportamento nociceptivo foi verificado por meio da avaliação da hiperalgesia mecânica, a partir do 8º dia após LPNI, e térmica, a partir do 10º dia após LPNI. Esta descrição está detalhada no item 3.7.1 e 3.7.2, bem como na Fig. 36.

Figura 35 – Ligadura parcial do nervo isquiático.



(A) Após anestesia, foi feita a tricotomia, uma incisão medial e curvilínea na coxa direita do animal e a divulsão do músculo bíceps femoral, assim o nervo isquiático foi exposto. (B) Foi utilizado um fio de sutura 8-0 para ligar $\frac{1}{3} - \frac{1}{2}$ do nervo isquiático direito. (C) O nervo foi ligado com dois nós. (D) Foi realizada a sutura da pele com dois pontos e dois nós. Fonte: Elaborado pela autora (2014).

Figura 36 – Esquema cronológico das avaliações da ligadura parcial do nervo isquiático.



A hiperalgesia mecânica induzida pela ligadura parcial do nervo isquiático foi avaliada a partir do 8^o dia pós-cirurgia. Primeiramente foi realizada uma avaliação do efeito antinociceptivo do EEPp (30-300 mg/kg, i.g.) no decurso temporal. Depois foi feito um tratamento prolongado com o EEPp (300 mg/kg, i.g.), durante 7 dias consecutivos (8^o ao 14^o dia) após LPNI, e interrompido no 15^o dia. Em seguida, o tratamento foi reiniciado no 16^o dia e continuou até o 17^o dia. A hiperalgesia térmica ao calor e ao frio foi avaliada no 10^o e 11^o dias pós-cirurgia, respectivamente. No 19^o dia foi feito o teste do campo aberto (*Open-field*) e logo após retirado o sangue dos animais para posterior análise toxicológica. Fonte: Elaborado pela autora (2014).

3.8 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.8.1 Avaliação da hiperalgesia mecânica (von Frey)

A frequência de resposta frente a um estímulo mecânico foi avaliada como descrito por Bortalanza e colaboradores (2002), utilizando monofilamentos de von Frey (Fig. 37). A frequência de retirada da pata para 10 aplicações do filamento de von Frey (0,4 g – CIP e DPIC) e (0,6 g – LPNI) (VFH, Stoelting, Chicago, USA), foi o valor percentual utilizado como indicativo de resposta. No dia anterior as cirurgias os animais foram submetidos ao teste para caracterização da resposta basal. Apenas os animais que apresentaram uma porcentagem de resposta em torno de 20% foram selecionados. O teste foi aplicado utilizando uma plataforma de (70 x 40 cm), que consiste em uma tela de arame com malha de 6 mm (Fig. 37). Para facilitar a aplicação do filamento na superfície ventral da pata posterior, os animais foram colocados individualmente em uma câmara de observação feita em acrílico (9 x 7 x 11 cm), sem fundo e coberta com tampa, posicionada sobre a plataforma (PITCHER; HENRY, 2004). O filamento foi aplicado na pata posterior direita (operada), atendendo alguns critérios como: aplicação feita perpendicularmente à superfície plantar, com pressão suficiente para proporcionar a curvatura do filamento, obtendo-se assim pressão total; os animais foram avaliados quando as quatro

patas estavam acomodadas sobre a tela; a resposta de retirada foi considerada quando o animal removeu totalmente a pata da tela de apoio (Fig. 37).

Para verificar a resposta de potência e duração das doses do EEPp frente à hiperalgesia mecânica nos experimentos com às cirurgias, foram realizadas curvas de dose-resposta, utilizando doses e dias específicos para cada modelo e observado o decurso temporal do efeito antinociceptivo do EEPp. Depois de determinada a melhor dose em cada modelo estudado, foi feito um tratamento diário, com duração específica para cada modelo, para investigar o desenvolvimento de um possível efeito cumulativo e/ou de tolerância do EEPp.

No modelo de dor pós-operatória, o decurso temporal foi realizado 24 horas após a incisão da pata. O tratamento com o EEPp foi feito nas doses 0,1-100 mg/kg., i.g., e avaliado nos tempos de 1, 2, 3 e 4 horas após o tratamento. O tratamento diário foi feito com EEPp (100 mg/kg, i.g.), durante 6 dias consecutivos (1^o ao 6^o dia) após a CIP (Fig. 32).

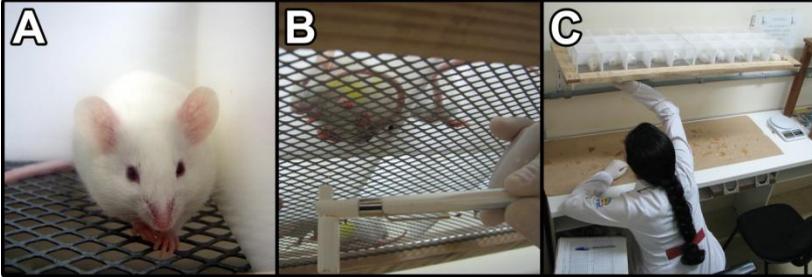
No modelo de dor pós-isquemia crônica (DPIC) o decurso temporal foi realizado nos 2^o e 7^o dias após o procedimento de isquemia. O tratamento com o EEPp foi feito nas doses 0,1-100 mg/kg., i.g., e avaliado nos tempos de 1, 2, 3 e 4 horas após o tratamento. O tratamento diário foi feito com EEPp (100 mg/kg, i.g.), durante 5 dias consecutivos (7^o ao 11^o dia após IRP). O tratamento foi interrompido 12^o dia e reiniciado no 14^o dia após IRP e continuou até o 15^o dia (Fig. 34).

No modelo de dor neuropática, o decurso temporal foi realizado no 8^o dia após a ligadura. O tratamento com o EEPp foi feito nas doses 30, 100 ou 300 mg/kg, i.g. e avaliado nos tempos de 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 horas após o tratamento. O tratamento diário foi feito com EEPp (300 mg/kg, i.g.) durante 7 dias consecutivos (8^o ao 14^o dia) após LPNI, e interrompido no 15^o dia. Em seguida, o tratamento foi reiniciado no 16^o dia e continuou até o 17^o dia. As doses utilizadas no modelo de LPNI tiveram uma escala diferente, em comparação aos outros dois modelos de cirurgia empregados neste estudo, com dose mais alta (300 mg/kg, i.g.) para investigar se havia interferência na atividade locomotora do animal, bem como um possível efeito tóxico no final do tratamento prolongado com esta dose (Fig. 36).

A hiperalgesia mecânica foi avaliada antes e 1 hora depois de cada tratamento intragástrico (oral), realizados uma vez por dia em todos os modelos estudados: na dor pós-operatória (CIP), dor pós-isquemia crônica (DPIC) e na dor neuropática (LPNI). Em todos os

modelos, os animais do grupo controle receberam apenas veículo (solução salina diluída com 5 % de Tween 80, 10 ml/kg, i.g.).

Figura 37 – Teste de von Frey.



(A) Animais em ambientação na plataforma de von Frey, que consiste em uma tela de arame com malha de 6 mm. (B) Utilização do monofilamento de von Frey na avaliação da hiperalgesia mecânica nos animais. A aplicação foi feita perpendicularmente à superfície plantar do animal, com pressão suficiente para proporcionar a curvatura do filamento. A resposta de retirada foi considerada quando o animal removeu totalmente a pata da tela de apoio. (C) Visão ampla da plataforma de von Frey e do ambiente de avaliação. Fonte: Elaborado pela autora (2014).

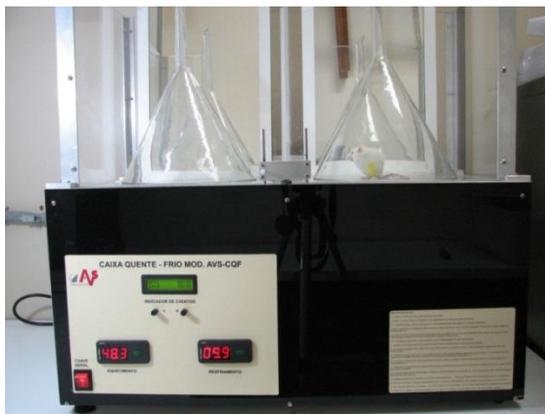
3.8.2 Análise do limiar sensorial térmico ao calor e ao frio (teste da placa fria e quente)

Para estabelecer o possível envolvimento dos canais iônicos TRPV1 (sensível ao calor) e TRPA1 (sensível ao frio) no efeito antinociceptivo do EEPp, foram feitos os testes da placa quente e fria, respectivamente (Fig. 38).

Nas avaliações da hiperalgesia térmica ao calor e ao frio em camundongos foi utilizada a placa quente/fria (AVS – CQF, Brasil) conforme descrito por Bennett e Xie (1988), com pequenas modificações do método. Os animais foram ambientados na sala de experimentação por 1 hora antes do teste. Os camundongos foram colocados individualmente sobre a placa, contidos por um cilindro de acrílico (40 cm de altura por 20 cm de diâmetro) (Fig. 38). Para analisar a hiperalgesia térmica ao calor, os camundongos foram colocados sobre uma placa quente ($48 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) e o tempo de corte para este teste foi de 60 s, a fim de evitar danos teciduais. Para analisar a hiperalgesia térmica ao frio, os camundongos foram colocados sobre placa fria ($10 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) e o tempo de corte para este teste foi de 120 s (NUCCI et al., 2012).

Em todas as avaliações os camundongos foram tratados com EEPp 1 hora antes dos testes, sendo que no modelo de incisão plantar, o tratamento foi feito com a dose de 100 mg/kg, i.g. e no modelo de ligadura, 300 mg/kg, i.g., respeitando as doses utilizadas no tratamento diário das respectivas cirurgias. A hiperalgesia foi avaliada pela latência de retirada da pata traseira direita. O comportamento nociceptivo foi testado a partir de 24 horas após CIP (Fig. 32) e do 10^o dia após LPNI (Fig. 36).

Figura 38 – Placa quente-fria.



Aparelho usado para fazer as avaliações de hiperalgesia ao calor e ao frio nos modelos animais de dor pós-operatória e de ligadura parcial do nervo isquiático. Fonte: Elaborado pela autora (2014).

3.9 ANÁLISE TOXICOLÓGICA PRELIMINAR: DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Os animais submetido ao modelo de LPNI que receberam tratamento prolongado com EEPp (300 mg/kg, i.g.) ou veículo (10 ml/kg, i.g.) foram avaliados no 19^o dia, 1 hora após a última administração do EEPp e veículo, no modelo do campo aberto (Open-field). Os camundongos foram individualmente anestesiados com isoflurano e sacrificados por decapitação. O sangue foi recolhido e transferido para tubos eppendorf de 1,5 ml, centrifugado a 4000 g durante 10 minutos, a 23 °C e, em seguida o soro obtido foi congelado para futura avaliação com marcadores bioquímicos de função hepática e renal. Além disso, alguns órgãos nobres como o fígado, o coração, o baço, o rim e o pulmão foram retirados para avaliação macroscópica

como cor, textura e peso (CRUZ et al., 2006; WALKER et al., 2013). Os parâmetros bioquímicos analisados foram a atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e gama-glutamil transferase (GGT), e as concentrações séricas de creatinina, uréia e ácido úrico através da utilização de kits comerciais específicos, conforme descrito por Tietz (1995), Burger e colaboradores (2005) e Wintola, Sunmonu e Afolayan (2011).

3.10 ANÁLISE DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO EXTRATO DE *Pterodon pubescens* Benth

A mensuração do potencial antioxidante do EEPp é necessário, pois são os agentes antioxidantes os responsáveis por minimizar diversas disfunções, atuando contra a formação de radicais livres e a consequente geração de EROs, na homeostase tiólica, na manutenção do balanço redox da célula e na defesa contra agentes eletrofílicos (SIES, 1993; ROVER JÚNIOR et al., 2001). Desta forma, a partir de um equilíbrio entre as defesas antioxidantes e os efeitos tóxicos das EROs em biomoléculas, é possível manter o metabolismo e o funcionamento celular inalterados (HALLIWELL, BARRY, 2006).

3.10.1 Captura de radicais livres usando DPPH

Para realização do ensaio de determinação da atividade antioxidante utilizando o radical livre DPPH (2,2-difenil-picril-hidrazil), foi utilizado um espectrofotômetro (Perkin Elmer Lambda S) (Fig. 24), pelo método descrito por Foti, Daquino e Geraci (2004) e Villano e colaboradores (2007), com algumas modificações. O ensaio consiste em fazer uma solução metanólica de DPPH 0,004% preparada momentos antes do uso e de soluções de diferentes concentrações de compostos isolados ou extrato bruto de planta (500; 250; 125; 62,5; 31,25 µg/ml). A mistura de 2 ml de solução de DPPH com 1 ml de solução do composto ou extrato, foi agitada e após 30 minutos, foi realizada a leitura em um espectrofotômetro a 517 nm, comparando-se esta leitura ao branco, que consiste na solução de DPPH na ausência do composto ou extrato. A porcentagem de atividade antioxidante foi dada pela fórmula $(A_o - A_i / A_o) \times 100$, onde, A_o e A_i correspondem à absorbância da solução na ausência e presença do composto ou extrato, respectivamente. O gráfico da porcentagem de decréscimo na absorbância do DPPH em função da concentração do composto fornece

a EC_{50} , que corresponde à concentração de EEPp necessária para causar 50% de atividade antioxidante.

3.10.2 Determinação do poder redutor

Para a análise da atividade antioxidante através da determinação do potencial redutor, foi utilizado um espectrofotômetro (Perkin Elmer Lambda S) (Fig. 24), pelo método de Price e Butler (1977) e Waterman e Mole (1994), com adaptações. Neste teste foram preparadas, em triplicata, misturas reacionais compostas por 100 μ l do extrato a uma concentração de 1000 ppm, neste foi adicionado 8,5 ml de água deionizada. Subsequentemente, foram adicionados 1 ml de solução de cloreto férrico ($FeCl_3$) a 0,1 M, e depois de 3 minutos, 1 ml de ferricianeto de potássio a 0,08 M. Após 15 minutos foram feitas as leituras das absorbâncias em espectrofotômetro de UV-VIS a 720 nm. O aparecimento da cor azul da Prússia é indicativo de extrato com potencial de atividade redutora. Como branco foi usada uma solução preparada de acordo com o procedimento acima, sem a adição do EEPp. Foi realizada uma curva de calibração usando soluções padrão de ácido ascórbico (como padrão), para comparação ($y = 2,33X + 39,63$; $R^2 = 0,9999$). O potencial redutor do extrato foi expresso em equivalente de ácido ascórbico, mg EAA/g de EEPp.

3.10.3 Ensaio de atividade quelante de Fe^{2+}

Para o ensaio de atividade quelante do Ferro II (Fe^{2+}), foi utilizado um espectrofotômetro (Perkin Elmer Lambda S) (Fig. 24), como descrito anteriormente por Wang e colaboradores (2008). As soluções do extrato bruto (1 ml) em diferentes concentrações foram misturadas de forma homogênea com 50 μ l cloreto de ferro ($FeCl_2$) (2 mM), adicionando-se 200 μ l de solução ferrozina (5 mM). As misturas foram agitadas e deixadas em repouso à temperatura ambiente durante 20 min. Os valores de absorbância (Amostra) das misturas foram medidas em 562 nm em espectrofotômetro. A atividade de quelação utilizando ferrozina como agente de coloração, torna a solução rósea, de acordo com a quantidade de ferro disponível em solução. Assim, quanto menor a quelação de íons pelo extrato, maior o número de íons disponíveis para reação com a ferrozina e maior será a absorbância observada. O metanol foi utilizado como controle (Branco). O Na_2EDTA foi utilizado como padrão. Para determinação da taxa quelante do Fe^{2+} (%) = $100 \times [(Branco - Amostra) / Branco]$.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para verificação da normalidade e homocedasticidade dos dados foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. Todos os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). No teste de formalina foi calculada a DI_{50} (doses do EEPp necessárias para reduzir a resposta nociceptiva em 50%, quando comparados ao grupo controle), que foi expressa como a média geométrica acompanhada pelo limite de confiança de 95% e os valores foram determinados por regressão não-linear. As avaliações da hiperalgesia mecânica nos três modelos cirúrgicos (CIP, DPIC, LPNI) foram realizadas pela análise de variância ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni, para múltiplas comparações. Todos os outros experimentos foram analisados por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls, exceto no teste do AMPA (agonista glutamatérgico) que foi analisado pelo Teste- t de Student. Em todas as análises, os valores de P foram considerados estatisticamente significantes, 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).

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO DE *Pterodon Pubescens* Benth

A análise GC-MS do EEPp mostrou duas regiões distintas, onde foi possível identificar dois grupos de componentes, nove sesquiterpenos na região com tempo de retenção (TR) entre 20,914 e 28,495 min, totalizando 29% dos compostos do EEPp (Tabela 1), dos quais três mostraram maior concentração (E-cariofileno, γ -muuroleno e biciclogermacreno) e sete diterpenos vouacapanos na região com TR entre 51,109 e 64,258 min., totalizando 55% dos compostos do EEPp (Tabela 1), onde quatro deles mostraram maior concentração (6 α -acetoxivouacapano, 6 α ,7 β -dimetoxivouacapan-17-eno, 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapano e 6 α ,7 β -diacetoxivouacapano), representando um total de dezesseis compostos presentes no EEPp (Tabela 1 e Fig. 39).

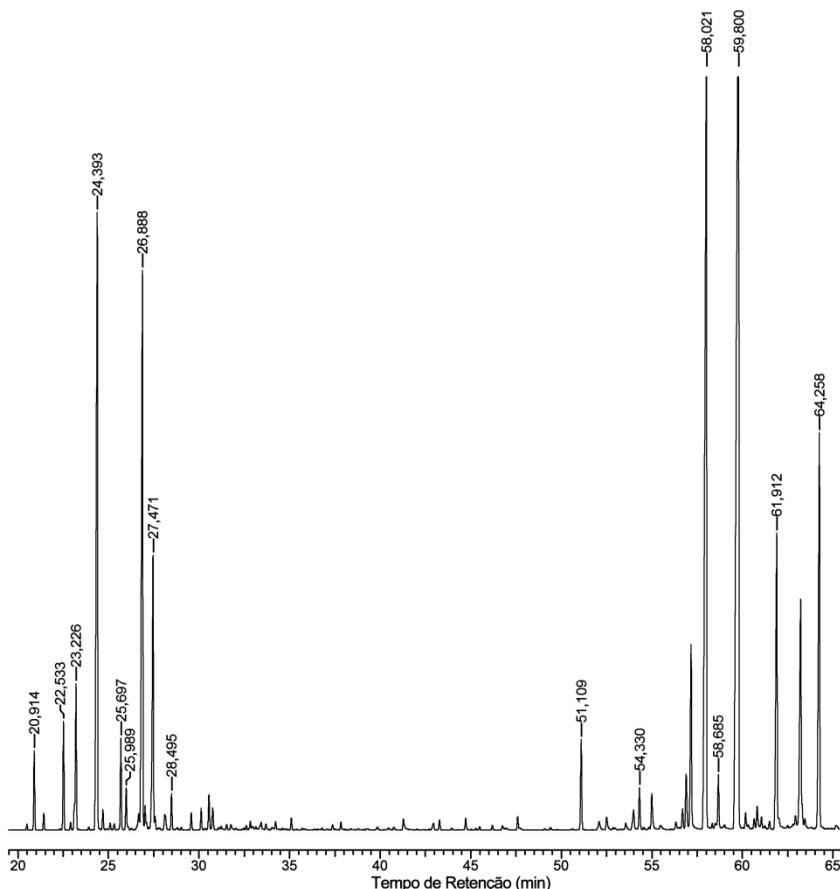
Tabela 1 – Composição química do EEPp.

	Componente	Tempo de retenção (min)	IR*	Concentração (%)	
sesquiterpenos	δ -elemeno (1)	20,914	1336	0,9	29%
	α -copaeno (2)	22,533	1375	1,3	
	β -elemeno (3)	23,226	1391	1,7	
	(E)-cariofileno (4)	24,393	1420	10,1	
	α -humuleno (5)	25,697	1453	1,1	
	alloaromadendreno (6)	25,989	1459	0,5	
	γ -muuroleno (7)	26,888	1482	8,8	
	biciclogermacreno (8)	27,471	1497	3,9	
	δ -cadineno (9)	28,495	1523	0,4	
diterpenos	vouacapano (10)	51,109	2198	1,2	55%
	6 α -hidroxivouacapan-7,17 β -lactona (11)	54,330	2312	0,6	
	6 α -acetoxivouacapano (12)	58,021	2450	16,3	
	Acido 6 α -hidroxivouacapan- β 17-oico (13)	58,685	2477	0,7	
	6 α ,7 β -dimetoxivouacapan-17-eno (14)	59,800	2504	25,2	
	6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapano (15)	61,912	2522	4,8	
6 α ,7 β -diacetoxivouacapano (16)	64,258	2542	6,2		

Pela análise de CG-EM foi possível identificar nove sesquiterpenos na região com tempo de retenção (TR) entre 20,914 e 28,495 min, e sete diterpenos vouacapanos na região com TR entre 51,109 e 64,258 min. *Índice de retenção (IR). Fonte: Elaboração dos autores (2014).

A identificação dos componentes foi possível através dos índices de retenção (IR) calculados (Tabela 1 e 2 / Fig.39) e por comparação aos dados dos espectros de massa obtidos por GC-MS e os dados da literatura (Tabela 2) (ADAMS, 1995). As substâncias identificadas no extrato de *Pterodon pubescens* e suas respectivas porcentagens são apresentados na Tabela 1 e os dados espectrais do extrato de *Pterodon pubescens* determinado por CG-EM estão apresentados na Tabela 2.

Figura 39 – Perfil químico do extrato de *Pterodon pubescens* por CG-EM.



Região de sesquiterpenos (TR entre 20,914 e 28,496) e região de diterpenos vouacapanos (TR entre 51,120 - 64,235) Fonte: Elaboração dos autores (2014).

Tabela 2 – Dados espectrais do extrato de *Pterodon pubescens* determinado por CG-EM.

Tempo de retenção	Dados espectrais (m/z)
20,914	121 (100); 204 (1,2); 189 (8,4); 161 (15,6); 147 (4,8); 136 (20,5); 107 (40,9); 93 (57,8); 91 (28,9); 79 (27,7); 67
22,533	161 (100); 204 (19,3); 189 (6,0); 147 (6,0); 133 (12,0); 119 (96,4); 105 (84,3); 93 (42,2); 81 (18,1); 69 (6,0); 55
23,226	93 (100); 204 (1,2); 189 (36,1); 175 (8,4); 161 (38,6); 147 (53,0); 133 (36,1); 121 (48,2); 107 (68,7); 81 (90,4); 67
24,393	133 (100); 204 (9,7); 189 (24,4); 175 (12,2); 161 (42,7); 147 (32,9); 120 (47,5); 105 (60,9); 93 (97,5); 79 (69,5); 69
25,697	93 (100); 204 (7,2); 189 (3,6); 161 (8,4); 147 (20,5); 136 (3,6); 121 (30,1); 107 (16,8)
25,989	91 (100); 204 (48,2); 189 (33,7); 175 (8,4); 147 (60,2); 133 (74,7); 119 (63,8); 105 (90,3); 91 (96,4); 79 (68,7); 69
26,888	161 (100); 204 (15,7); 189 (1,2); 147 (6,0); 133 (16,9); 119 (24,1); 105 (47,0); 91 (39,7); 81 (24,7); 67 (9,6); 55
27,471	121 (100); 204 (18,1); 189 (9,6); 161 (25,3); 147 (6,0); 136 (18,1); 107 (48,2); 93 (65,1); 79 (30,1); 67 (14,4); 55
28,495	161 (100); 204 (55,4); 189 (19,3); 159 (8,4); 145 (7,2); 134 (54,2); 119 (55,4); 105 (44,6); 91 (28,9); 81 (16,8); 69
51,109	108 (100); 286 (72,3); 271 (18,1); 253 (1,2); 211 (1,2); 183 (1,2); 177 (14,5); 133 (10,8); 85 (26,5); 71 (37,3); 57
54,330	132 (100); 330 (6,0); 284 (1,2); 270 (69,9); 227 (4,8); 199 (3,6); 185 (7,2); 137 (10,8); 91 (25,3); 69 (10,8)
58,021	147 (100); 344 (9,6); 301 (3,6); 284 (18,1); 269 (7,2); 256 (1,2); 199 (1,2); 171 (3,6); 131 (14,5); 108 (9,6); 91 (6,0);
58,685	271 (100); 330 (93,9); 284 (1,2); 253 (1,2); 201 (2,4); 177 (36,1); 152 (13,2); 131 (42,2); 121 (18,1); 105 (12,1); 95
59,800	108 (100); 344 (72,3); 288 (12,5); 269 (18,1); 213 (1,2); 199 (10,8); 157 (18,1); 133 (20,5); 79 (9,6); 53 (7,2)
61,912	147 (100); 360 (38,6); 285 (20,5); 211 (10,8); 197 (27,7); 108 (60,2); 69 (27,7); 133 (66,3); 81 (26,5); 53 (21,7)
64,258	282 (100); 446 (1,20); 402 (12,0); 342 (1,2); 300 (1,2); 211 (7,2); 197 (72,3); 157 (25,3); 145 (21,7); 133 (43,4);

Os valores na tabela demonstram o tempo de retenção de cada componente do EEPp, obtidos por GC-MS. Os valores dos espectros de massa demonstram as porcentagens de cada pico e a fragmentação de cada componente do extrato. Fonte: Elaboração dos autores (2014).

4.1.1 Determinação do conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides

O conteúdo fenólico foi calculado usando uma curva de calibração de ácido gálico e o conteúdo de flavonoides foi calculado utilizando uma curva de calibração de quercetina. Os resultados são apresentados na Tabela 3. Numa análise quantitativa, observou-se que dos compostos fenólicos presentes no EEPp, apenas 6,67 % são flavonoides. Apesar da quantidade de flavonoides ser modesta, já é bem descrito na literatura que compostos polifenólicos, tais como flavonoides, ácidos fenólicos e taninos são considerados os principais contribuintes para a atividade antioxidante de plantas medicinais, frutas e legumes (PEREIRA et al., 2009).

Tabela 3 – Conteúdo total de fenóis e de flavonoides do extrato de *Pterodon pubescens*.

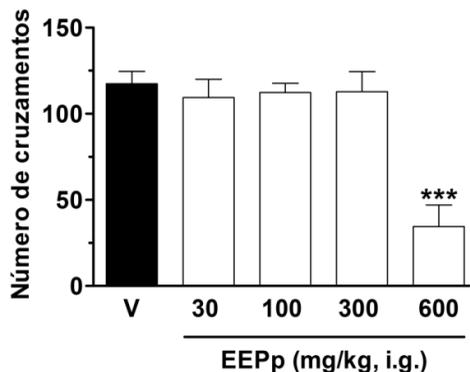
Amostra	Conteúdo de fenóis totais ¹	Conteúdo de flavonóides totais ²
Extrato de <i>Pterodon pubescens</i>	678,2 ± 02,3	45,2 ± 0,1

1. Resultados em mg de ácido gálico/g de EEPp. 2. Resultados em mg de quercetina/g de EEPp. Cada valor é a média ± E.P.M. de três medições independentes. Fonte: Elaboração dos autores (2014).

4.2 AVALIAÇÃO PRELIMINAR AGUDA DA ATIVIDADE LOCOMOTORA DOS ANIMAIS

A avaliação preliminar da atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto foi realizada em camundongos saudáveis que não foram submetidos a nenhum tipo de procedimento nocivo. Os resultados apresentados na Figura 40 mostram que a administração intragástrica aguda do EEPp, nas doses de até 300 mg/kg, não alterou a atividade locomotora dos animais, quando comparado ao grupo controle (veículo 10 ml/kg, i.g.). Já a dose de 600 mg/kg no tratamento agudo, alterou significativamente a locomoção dos animais em relação ao grupo controle, apresentando inibição de 71 ± 11%. Assim, esta dose não foi utilizada nas avaliações experimentais. As médias ± E.P.M. para o número de cruzamentos na avaliação (aguda) foram de 117 ± 7 para o grupo controle e 109 ± 11; 112 ± 5; 113 ± 12, 35 ± 12 para os grupos tratados com EEPp: 30, 100, 300 ou 600 mg/kg, respectivamente (Fig. 40). Sugerindo que o EEPp não induz perda e/ou comprometimento das funções motoras quando administrado em doses até 300 mg/kg em camundongos.

Figura 40 – Efeito do tratamento agudo do EEPp sobre a atividade locomotora espontânea dos animais.

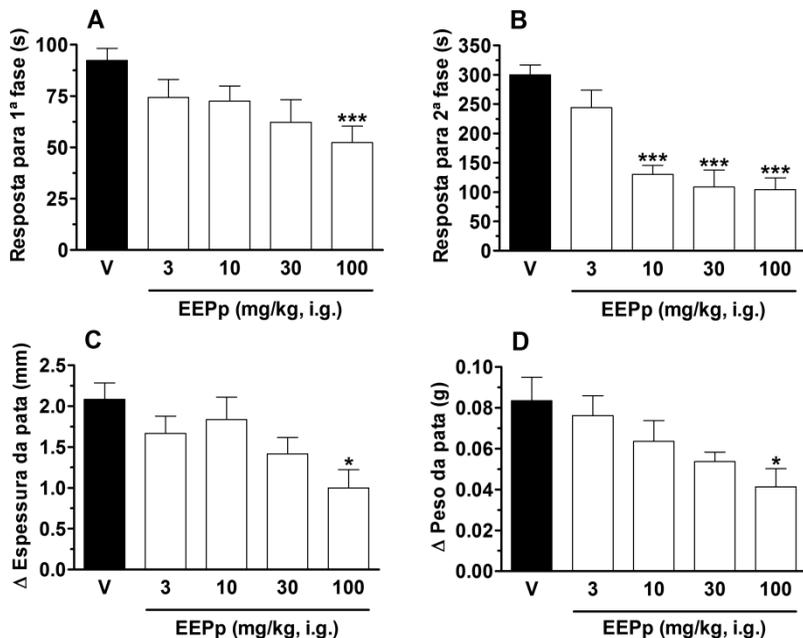


Efeito do tratamento agudo com o EEPp (30-300 mg/kg, i.g.) sobre a atividade locomotora dos animais no teste de campo aberto, quando comparado aos camundongos que receberam somente veículo. Cada coluna representa a média dos valores obtidos a partir de 8 animais e as linhas verticais indicam E.P.M. Os asteriscos (*) denotam os níveis de significância, quando comparado ao grupo controle (***) $P < 0,001$). A significância estatística foi determinada com ANOVA de uma via seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls. Fonte: Elaborado pela autora (2014).

4.3 EFEITO DO EEPp NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA FORMALINA

Os resultados apresentados na Figura 41 demonstram que o EEPp (3-300 mg/kg), administrado por gavagem intragástrica (i.g.), foi capaz de inibir significativamente a nocicepção de origem neurogênica (primeira fase) e inflamatória (segunda fase), induzida pela formalina quando comparados ao grupo controle. As inibições observadas foram de $43 \pm 9\%$ na dose de 100 mg/kg para a primeira fase (Fig. 41A) e $57 \pm 5\%$, $64 \pm 10\%$ e $65 \pm 7\%$ na dose de 10, 30 e 100 mg/kg, e para a segunda fase (Fig. 41B), respectivamente, quando comparado com o grupo controle. Os valores calculados de DI_{50} para estes efeitos foram: 9,9 (9,4-10,3) mg/kg. Além disso, o EEPp na dose de 100 mg/kg também foi capaz de reduzir o edema de pata induzido por formalina, com inibições de $52 \pm 11\%$ (espessura da pata, Fig 41C), $50 \pm 11\%$ (peso da pata, Fig. 41D) em relação ao grupo controle, respectivamente. Sugerindo que o EEPp apresenta importante efeito na dor inflamatória.

Figura 41 – EEPp reduz a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos.



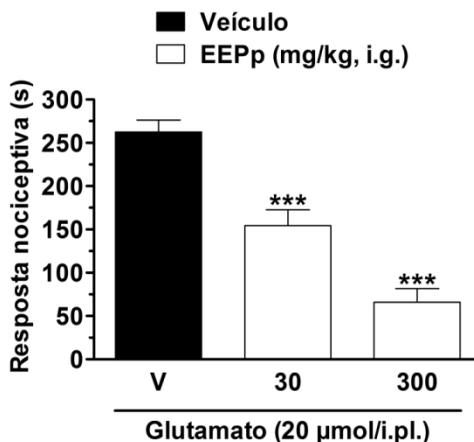
Os animais foram tratados com o EEPp nas doses de 3-300 mg/kg (colunas abertas) ou veículo (controle: V, barra fechada), 1 hora antes por via intragástrica e depois receberam uma injeção intraplantar de formalina 2,5%. A nocicepção foi avaliada na primeira (A) e segunda (B) fases, dor de origem neurogênica e inflamatória, respectivamente. O edema foi avaliado através da mensuração da espessura da pata (C) e do peso da pata (D). 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 (* $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$). A significância estatística foi determinada com ANOVA de uma via seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls. Fonte: Elaborado pela autora (2014).

4.4 EFEITO DO EEPp NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELO GLUTAMATO

Os resultados apresentados na Figura 42 mostram que o tratamento sistêmico dos animais com o EEPp (30 e 300 mg/kg, i.g.) inibe de forma significativa e dependente da dose a nocicepção induzida pela injeção de 20 $\mu\text{mol/i.pl.}$ de glutamato, sugerindo que o EEPp

apresenta importante efeito terapêutico para o tratamento da dor induzida por glutamato. As inibições observadas são de $41 \pm 7\%$ e $75 \pm 6\%$ para as doses de 30 e 300 mg/kg, respectivamente.

Figura 42 – EEPp reduz a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos.



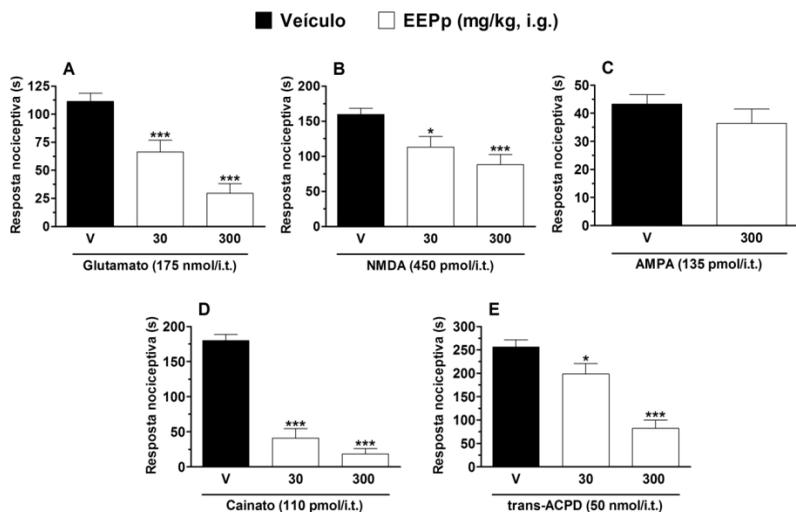
Os animais foram tratados com o EEPp nas doses de 3 e 300 mg/kg (colunas abertas) ou veículo (controle: V, barra fechada), por via intragástrica, 1 hora antes de receberem uma injeção intraplantar de glutamato e a nocicepção foi avaliada. Cada coluna representa a média de 8 - 10 animais e as linhas verticais 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 ANOVA de uma via seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls. Fonte: Elaborado pela autora (2014).

4.5 EFEITO DO EEPp NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO INTRATECAL DE AGONISTAS GLUTAMATÉRGICOS OU DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS

Foi investigado diretamente o envolvimento central de agonistas glutamatérgicos (Fig. 43) e citocinas pró-inflamatórias (Fig. 44) na ação antinociceptiva do EEPp. O tratamento com o EEPp (30 e 300 mg/kg, i.g.) reduz significativamente o comportamento nociceptivo (lamber/morder) induzido pela injeção intratecal de glutamato, apresentando inibições de $51 \pm 9\%$ e $74 \pm 8\%$ (Fig. 43A), NMDA ($29 \pm 9\%$ e $45 \pm 9\%$; Fig. 43B), cainato ($77 \pm 7\%$ e $90 \pm 4\%$; Fig. 43D) e de

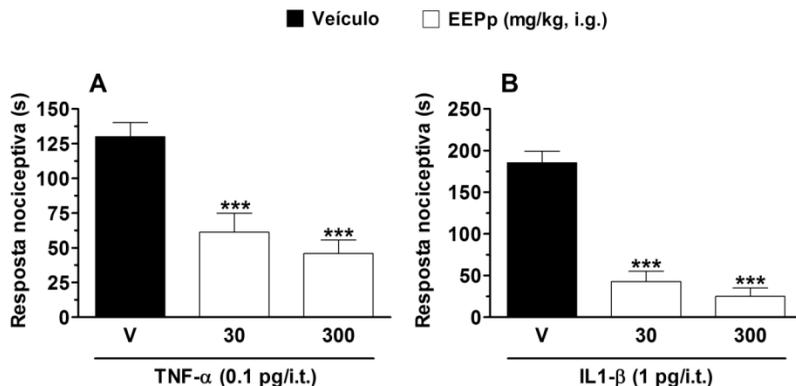
trans-ACPD ($22 \pm 9\%$ e $68 \pm 7\%$; Fig. 43E), respectivamente. Em contraste, o EEPp na dose de 300 mg/kg não foi capaz de reduzir de forma significativa a nociceção induzida por AMPA (Fig. 43C). O EEPp (30 e 300 mg/kg, i.g.) também inibiu as respostas do comportamento nociceptivo (lamber/morder) induzido pela injeção intratecal do TNF- α ($53 \pm 11\%$ e $65 \pm 8\%$; Fig. 44A) e IL-1 β ($77 \pm 7\%$ e $87 \pm 5\%$; Fig. 44B), respectivamente.

Figura 43 – EEPp reduz a resposta nociceptiva provocada pela injeção intratecal de agonistas glutamatérgicos.



Os animais foram tratados com o EEPp nas doses de 3 e 300 mg/kg (colunas abertas) ou veículo (controle: V, barra fechada), por via intragástrica, 1 hora antes de receberem uma injeção intratecal de agonistas glutamatérgicos. O comportamento nociceptivo foi avaliado frente ao glutamato (A), NMDA (B), AMPA (C), cainato (D) e trans-ACPD (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 (* $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$). A significância estatística foi determinada com ANOVA de uma via seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls, exceto pelo teste do AMPA que foi analisado pelo Teste- t de Student. Fonte: Elaborado pela autora (2014).

Figura 44 – EEPp reduz a resposta nociceptiva provocada pela injeção intratecal de citocinas pró-inflamatórias.

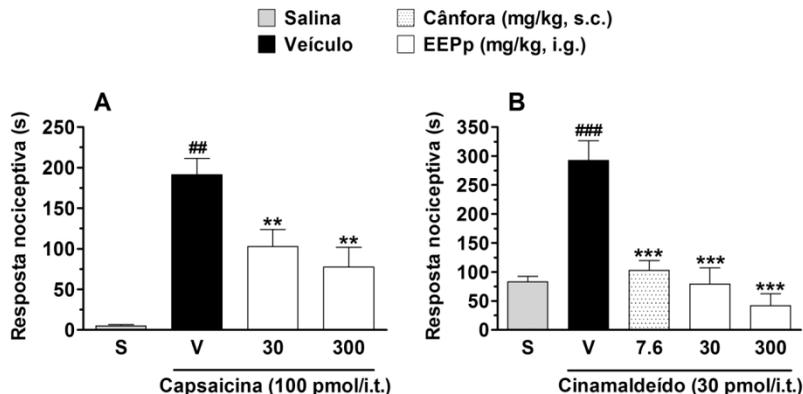


Os animais foram tratados com o EEPp nas doses de 3-300 mg/kg (colunas abertas) ou veículo (controle: V, colunas fechadas), por via intragástrica, 1 hora antes de receberem uma injeção intratecal de citocinas pró-inflamatórias. O comportamento nociceptivo foi avaliado frente ao TNF- α (A) e IL-1 β (B). 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 por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls. Fonte: Elaborado pela autora (2014).

4.6 EFEITO DO EEPp NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO INTRATECAL DE CAPSAICINA E CINAMALDEÍDO

Foi investigado diretamente o envolvimento central dos canais TRPs na ação antinociceptiva do EEPp (Fig. 45). O tratamento com EEPp (30 e 300 mg/kg, i.g.) reduziu as respostas do comportamento nociceptivo (lamber/morder) induzido pela injeção intratecal capsaicina (ativador TRPV1), com inibições de $47 \pm 11\%$ e $61 \pm 13\%$, respectivamente (Fig. 45A). O EEPp também reduziu as respostas do comportamento nociceptivo (lamber/morder) induzido pelo cinamaldeído (ativador TRPA1) com inibição de 100% para ambas as doses, 30 e 300 mg/kg (Fig. 45B). Da mesma forma, o controle positivo cânfora produziu inibição de $90 \pm 8\%$ da resposta causada pela injeção intratecal de cinamaldeído (Fig. 45B).

Figura 45 – EEPp diminui a resposta nociceptiva provocada pela injeção intratecal de capsaicina e cinamaldeído.



Os animais foram tratados com o EEPp nas doses de 3-300 mg/kg (colunas abertas), veículo (controle: V, colunas fechadas), por via intragástrica (1 hora antes) ou com cânfora na dose de 7.6 mg/kg (colunas abertas pontilhadas), por via subcutânea (30 min antes), de receberem uma injeção intratecal de capsaicina ou cinamaldeído. O comportamento nociceptivo foi avaliado frente ao capsaicina – ativador TRPV1 (A) e cinamaldeído – ativador TRPA1 (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 (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$). As cerquilhas (#) indicam diferenças significativas do grupo controle, quando comparado com o grupo salina (## $P < 0,01$ e ### $P < 0,001$). A significância estatística foi determinada com ANOVA de uma via seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls. Fonte: Elaborado pela autora (2014).

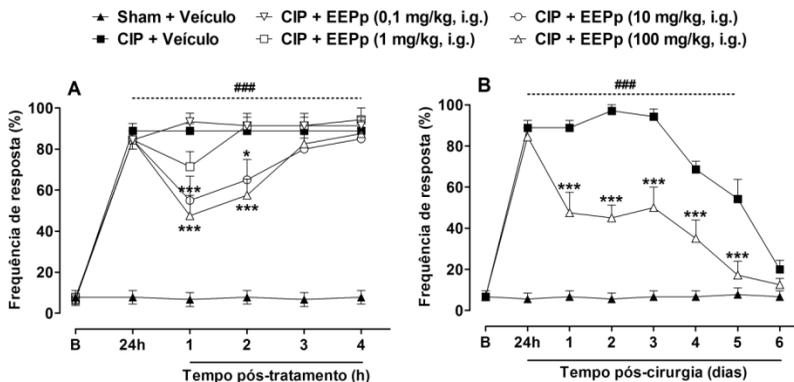
4.7 EFEITO DO EEPp NA HIPERALGESIA MECÂNICA E TÉRMICA INDUZIDA PELA INCISÃO PLANTAR

4.7.1 Hiperalgesia mecânica (CIP)

Os resultados apresentados na Figura 46 mostram que o EEPp (0,1-100 mg/kg) administrado por via intragástrica (i.g.), causou inibição significativa da nociceção induzida pela cirurgia de incisão plantar (CIP), quando comparado ao grupo controle. O efeito foi mantido por 2 horas após o tratamento com as doses de 10 e 100 mg/kg. As inibições observadas na 1ª hora após o tratamento foram $41 \pm 14\%$ e $50 \pm 12\%$ para as doses de 10 e 100 mg/kg, respectivamente (Fig. 46A). Quando administrado diariamente (uma vez por dia) por 6 dias, o EEPp

(100 mg/kg, i.g.) reduziu significativamente a nocicepção mecânica causada pela CIP e a inibição máxima (80 ± 15%) observada foi no 5º dia após CIP (Fig. 46B). Sugerindo que o EEPp apresenta importante efeito terapêutico para o tratamento da dor pós-operatória.

Figura 46 – EEPp diminui a hiperalgesia mecânica no modelo animal de dor pós-operatória induzida por CIP.

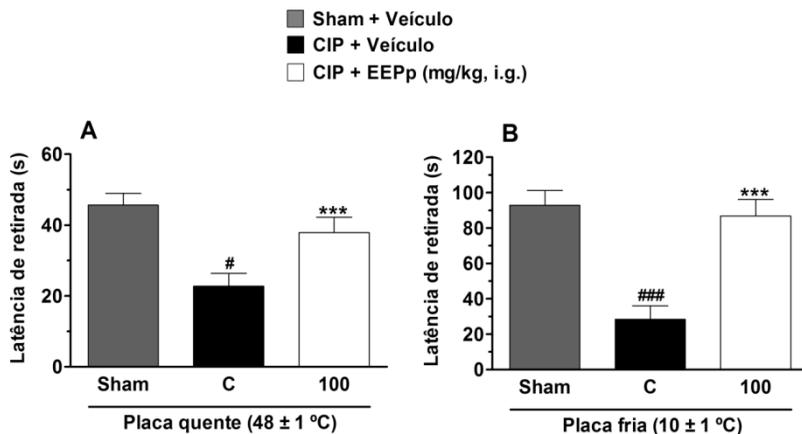


Efeito do tratamento com o EEPp (0,1-100 mg/kg, i.g.) no modelo de dor pós-operatória, induzida pela CIP. Decurso temporal (A) e tratamento diário (B) com o EEPp sobre a hiperalgesia mecânica em camundongos. Cada ponto representa a média dos valores obtidos em 8-10 animais e as linhas verticais indicam E.P.M. Os asteriscos (*) denotam os níveis de significância, quando comparado com o grupo controle (* $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$). As cerquilhas (#) indicam diferenças significativas do grupo controle, quando comparado com o grupo sham (### $P < 0,001$). A significância estatística foi determinada com ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni. B: limiar basal de retirada da pata. Fonte: Elaborado pela autora (2014).

4.7.2 Hiperalgesia térmica (CIP)

Os resultados da Figura 47 mostram que a CIP induz uma diminuição na latência de retirada da pata ao estímulo térmico (calor e frio) em comparação aos camundongos não lesionados, 24 horas após CIP. O pré-tratamento intragástrico com o EEPp (100 mg/kg) reduziu a hiperalgesia térmica induzida pela incisão e a latência de resposta aumentou em 66 ± 19% e 90 ± 15%, para as avaliações de calor e frio, respectivamente (Fig. 47 A-B). Estes resultados sugerem que o EEPp apresenta importante efeito terapêutico para o tratamento da hiperalgesia térmica (sensível ao calor e ao frio) induzida pela CIP.

Figura 47 – EEPp reduz a hiperalgesia térmica (calor e frio) induzida pela CIP.



Efeito do tratamento com o EEPp (100 mg/kg, i.g.) sobre a hiperalgesia térmica 24 horas após CIP em camundongos. A hiperalgesia ao calor e ao frio foram avaliadas 1 hora após o tratamento intragástrico com EEPp (A e B, respectivamente). Cada coluna representa a média dos valores obtidos a partir de 8-10 animais e as linhas verticais indicam E.P.M.. As colunas grafite correspondem aos animais sham (falso-operados) e as colunas fechadas indicam o valor do grupo controle (V), ambos tratados com veículo (10 ml/kg, i.g.). As colunas abertas correspondem aos animais tratados com EEPp (100 mg/kg., i.g.). Os asteriscos (*) denotam os níveis de significância, quando comparado com o grupo controle (* $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$). As cerquilhas (#) indicam diferenças significativas do grupo controle, quando comparado com o grupo sham (# $P < 0,05$ e ### $P < 0,001$). A significância estatística foi determinada com ANOVA de uma via seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls. Fonte: Elaborado pela autora (2014).

4.8 EFEITO DO EEPp NA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELA DOR PÓS-ISQUEMIA CRÔNICA

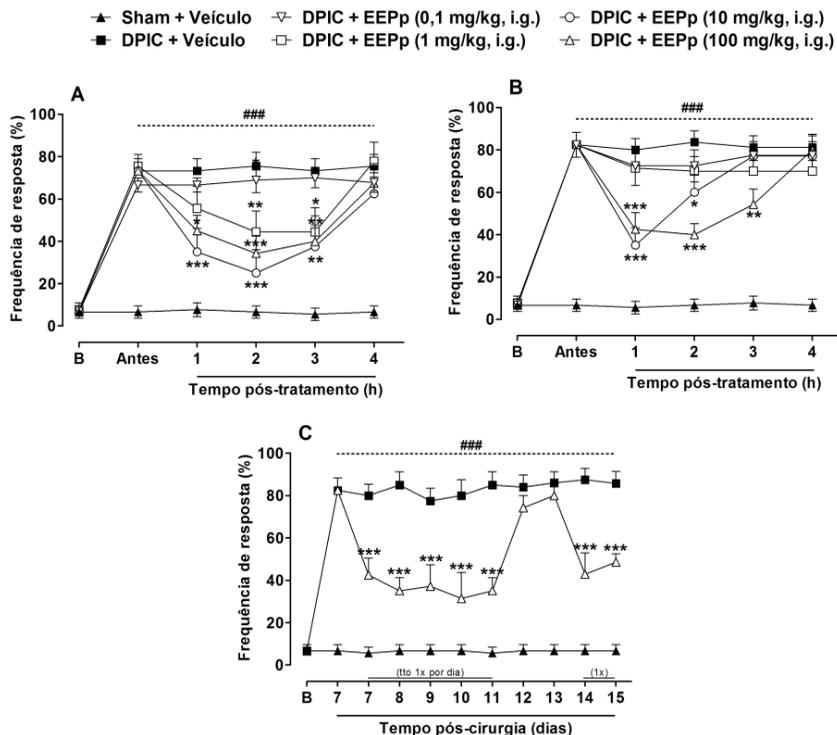
4.8.1 Hiperalgesia mecânica (DPIC)

Os resultados apresentados na Figura 48 mostram que o EEPp (0,1-100 mg/kg) administrado via intragástrica (i.g.) causou uma inibição significativa da hiperalgesia mecânica induzida pela isquemia e reperfusão da pata (IRP), isso ocorreu tanto na fase inflamatória (2^o dia, Fig. 48A) quanto na fase neuropática (7^o dia, Fig. 48B), quando comparado ao grupo controle. Observou-se também que o efeito anti-

hiperalgésico do EEPp no 2^o e 7^o dia, pós-isquemia/reperfusão, se manteve por 3 horas após o tratamento com as doses de 10 e 100 mg/kg no 2^o dia, e na dose de 100 mg/kg no 7^o dia, respectivamente (Fig.48 A-B). As inibições observadas na 1^a hora após o tratamento foram $58 \pm 17\%$ e $43 \pm 11\%$ para as doses de 10 e 100 mg/kg, respectivamente, no 2^o dia. Além disso, no 7^o dia as inibições de $60 \pm 11\%$ e $50 \pm 11\%$ para as doses de 10 e 100 mg/kg, foram observadas na 1^a hora após o tratamento. Notamos que embora a dose de 10 mg/kg apresentou maior inibição na 1^a hora após o tratamento, no 2^o e 7^o dia após IRP, foi a dose de 100 mg/kg que manteve o efeito anti-hiperalgésico constante por até 3 horas após tratamento, no 7^o dia após IRP. Neste período já está instalada a fase mais crônica desta lesão, que é o foco do nosso estudo neste modelo.

No tratamento prolongado, o EEPp (100 mg/kg, i.g.) foi administrado diariamente por 5 dias e as avaliações foram sempre feitas 1 hora após o tratamento. O tratamento reduziu significativamente a hiperalgesia mecânica e a inibição máxima ($66 \pm 17\%$) observada foi no 10^o dia após IRP (Fig. 48C). Quando o tratamento foi interrompido, os camundongos imediatamente exibiram o restabelecimento da hiperalgesia mecânica, mostrando que não houve efeito cumulativo com as administrações diárias ou alteração do liminar sensorial. Além disso, no 14^o dia o tratamento foi reiniciado e, mais uma vez, foi observado uma significativa inibição da hiperalgesia mecânica (inibição de $55 \pm 13\%$; Fig. 48C). Ao final das avaliações foi possível concluir também que as administrações diárias com o EEPp (100 mg/kg, i.g.) não causaram tolerância, tendo em vista que o efeito do EEPp não foi alterado ao longo do tratamento prolongado (Fig. 48C). Sugerindo que o EEPp apresenta importante efeito terapêutico para o tratamento da síndrome da dor complexa regional tipo-I.

Figura 48 – EEPp diminui a hiperalgesia mecânica no modelo animal de dor pós-isquemia crônica induzida pela IRP.



Efeito do tratamento com o EEPp na dor pós-isquemia crônica (DPIC), um modelo animal de síndrome de dor complexa regional tipo I, induzida por isquemia e reperfusão da pata posterior direita. Resultados do 2^o dia (A) e do 7^o dia (B) do decurso temporal (*decurso temporal*) do efeito antinociceptivo do EEPp (0,1-100 mg/kg, i.g.) sobre a hiperalgesia mecânica. O gráfico C mostra o efeito da administração prolongada do EEPp (100 mg/kg., i.g.) na hiperalgesia mecânica. Cada ponto representa a média dos valores obtidos em 8-10 animais e as linhas verticais mostram o E.P.M. Os asteriscos (*) denotam os níveis de significância, quando comparado com o grupo controle (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$). As cerquilhas (#) indicam diferenças significativas do grupo controle, quando comparado com o grupo sham (### $P < 0,001$). A significância estatística foi determinada com ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni. B: limiar basal de retirada da pata. Fonte: Elaborado pela autora (2014).

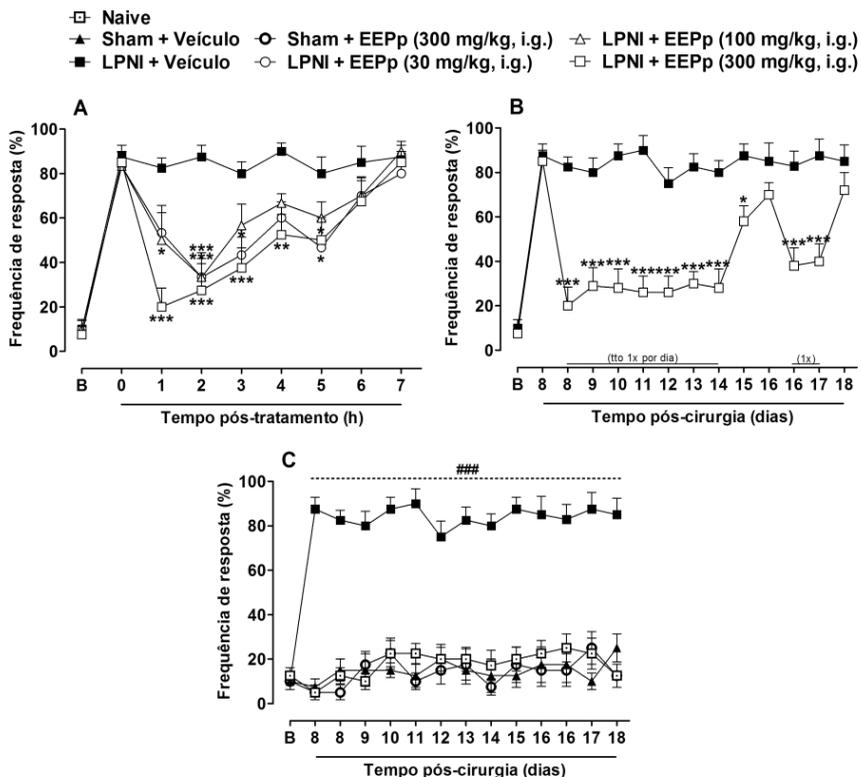
4.9 EEPp REDUZ HIPERALGESIA MECÂNICA E TÉRMICA INDUZIDA PELA LPNI

4.9.1 Hiperalgia mecânica (LPNI)

A lesão do nervo produz um desenvolvimento acentuado da hiperalgia mecânica do lado ipsilateral após 8 dias da LPNI, observado nos grupos controle (LPNI + veículo 10 ml/kg, i.g.) e LPNI + EEPp (30, 100 ou 300 mg/kg, i.g.) que foram submetidos à cirurgia (Fig. 49). No entanto, o grupo que não foi submetido à cirurgia (Naive) ou os que foram submetidos a um falso procedimento cirúrgico (grupos Sham e Sham + EEPp) mantiveram a frequência de resposta em níveis basais em todas as avaliações (Fig. 49C). Assim, o EEPp (300 mg/kg, i.g.) não foi capaz de alterar o limiar sensorial *per se* (Fig. 49C).

O tratamento agudo com EEPp (30 mg/kg, i.g.) reduziu significativamente hiperalgia mecânica na 2^a, 3^a e 5^a hora após a sua administração. No entanto, a dose de 100 mg/kg apresentou um efeito menor, diminuindo a hiperalgia mecânica apenas na primeira e segunda hora após a administração do EEPp. Já a dose de 300 mg/kg, foi a mais eficaz, uma vez que produziu um intenso efeito anti-hiperalgésico em 1 hora ($95 \pm 10\%$ inibição máxima) após o tratamento e o efeito se manteve constante por até 5 horas (Fig. 49A). O tratamento diário foi estendido do 8^o ao 14^o dia após a LPNI, produzindo significativa redução da hiperalgia mecânica, com média de inibição entre $73 \pm 12\%$ e $95 \pm 10\%$ (Fig. 49B). É importante ressaltar que o tratamento foi interrompido no 15^o dia devido a um efeito cumulativo ($44 \pm 10\%$) de até 24 horas após o último tratamento com o EEPp. Finalmente, foi reiniciado (16^o e 17^o dia) e, novamente o EEPp mostrou-se efetivo em reduzir a hiperalgia mecânica induzida pela LPNI (Figura 49B). Além disto, conforme demonstrado anteriormente, o tratamento diário e prolongado com o EEPp não promoveu o desenvolvimento de tolerância (Fig. 49B). Sugerindo que o EEPp apresenta importante efeito terapêutico para o tratamento da dor neuropática.

Figura 49 – EEPp reduz a hiperalgesia mecânica no modelo animal de dor neuropática induzida pela LPNI.

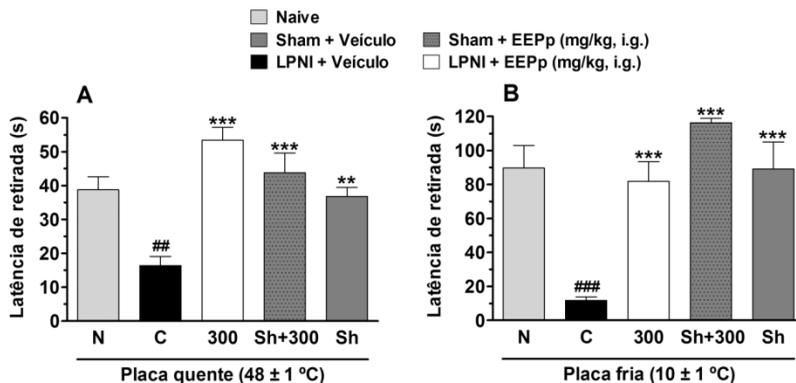


Efeito do tratamento com o EEPp na dor neuropática, induzida pela LPNI. Decurso temporal do efeito anti-hiperalgésico agudo do EEPp (30, 100 e 300 mg/kg, i.g.) na hiperalgesia mecânica (A). A administração prolongada do EEPp (300 mg/kg, i.g.) sobre a hiperalgesia mecânica (B) em camundongos. Cada ponto 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 (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$). As cerquilhas (#) indicam diferenças significativas do grupo controle, quando comparado com o grupo naive, sham e sham-operados (### $P < 0,001$). A significância estatística foi determinada com ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni. B: limiar basal de retirada da pata. Fonte: Elaborado pela autora (2014).

4.9.2 Hiperalgisia térmica (LPNI)

As avaliações da hiperalgisia térmica foram feitas a partir do 10^o dia pós-cirurgia. Os resultados apresentados na Figura 50 mostram que a LPNI induziu uma diminuição na latência de retirada da pata ao estímulo térmico (calor e frio) em comparação aos camundongos não lesionados. No entanto, o pré-tratamento com o EEPP (300 mg/kg, i.g.) reduziu a hiperalgisia térmica induzida pela LPNI. Como resultado da avaliação de calor, as latências de retirada da pata foram $165 \pm 17\%$, $122 \pm 26\%$ e $91 \pm 12\%$ para os grupos LPNI + EEPP (300 mg/kg, i.g.), sham + EEPP (300 mg/kg, i.g.) e sham + veículo (10 ml/kg, i.g.), respectivamente (Fig. 50A). Como resultado da avaliação da hiperalgisia ao frio, as latências de retirada da pata foram de $90 \pm 15\%$, $134 \pm 3\%$ e $99 \pm 21\%$ para os grupos, LPNI + EEPP (300 mg/kg, i.g.), sham + EEPP (300 mg/kg, i.g.) e os grupos sham + veículo (10 ml/kg, i.g.), respectivamente (Fig. 50B). Assim, foi possível observar que o EEPP (300 mg/kg, i.g.) foi capaz de reverter completamente a hiperalgisia térmica ao calor e ao frio induzida pela LPNI (Fig. 50 A-B). Sugerindo que o EEPP apresenta importante efeito terapêutico para o tratamento da hiperalgisia térmica (sensível ao calor e ao frio) induzida pela LPNI.

Figura 50 – EEPp diminui a hiperalgesia térmica (calor e frio) induzida pela LPNI.

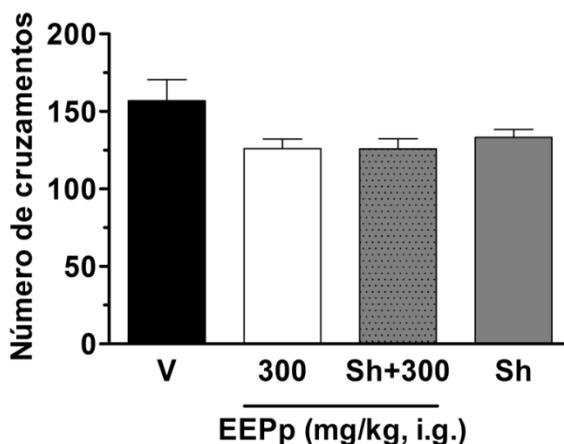


Efeito do EEPp na hiperalgesia térmica a partir do 10^o dia após a cirurgia LPNI em camundongos. A hiperalgesia ao calor e ao frio foram avaliadas 1 hora após o tratamento intragástrico com EEPp (A e B, respectivamente). Cada coluna representa a média dos valores obtidos a partir de 8 animais e as linhas verticais indicam E.P.M.. As colunas fechadas indicam o valor do grupo controle (V) e as colunas grafite correspondem aos animais que receberam um falso procedimento cirúrgico, chamados de sham (Sh), ambos tratados com veículo (10 ml/kg, i.g.). As colunas grafite pontilhadas representam os valores do grupo sham que recebeu o EEPp (Sh+EEPp) e as colunas abertas correspondem aos animais tratados com o extrato; ambos receberam o EEPp na dose de 300 mg/kg, por via intragástrica. As colunas cinza claro indicam os valores dos grupos naive. Os asteriscos (*) denotam os níveis de significância, quando comparado ao grupo controle (**P<0,01 e ***P<0,001). As cerquilhas (#) indicam diferenças significativas do grupo controle, quando comparado ao grupo naive (##P<0,01 e ###P<0,001). A significância estatística foi determinada com ANOVA de uma via seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls. Fonte: Elaborado pela autora (2014).

4.9.3 Avaliação da atividade locomotora após LPNI

Os resultados apresentados na Figura 51 mostram que a administração intragástrica prolongada do EEPp após LPNI, na dose de 300 mg/kg, não alterou a atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto, quando comparado ao grupo controle (veículo 10 ml/kg, i.g.). Na avaliação prolongada (pós-LPNI), as médias \pm E.P.M. para o número de cruzamentos foram de 157 ± 14 para o grupo controle e 126 ± 6 ; 126 ± 7 ou 133 ± 5 para o grupo tratado com EEPp (300 mg/kg, i.g.); Sham + EEPp (300 mg/kg, i.g.) ou veículo Sham + (10 ml/kg, i.g.), respectivamente (Fig. 51). Sugerindo que o EEPp (300 mg/kg) não induz perda e/ou comprometimento das funções motoras após 10 dias de tratamento em camundongos.

Figura 51 – Efeito do tratamento prolongado com o EEPp sobre a atividade locomotora dos animais após LPNI.



Efeito do tratamento prolongado com o EEPp (300 mg/kg, i.g.) sobre a atividade locomotora dos animais no teste de campo aberto, quando comparado aos camundongos que receberam somente veículo após LPNI. Cada coluna representa a média dos valores obtidos a partir de 8 animais e as linhas verticais indicam E.P.M. A significância estatística foi determinada com ANOVA de uma via seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls. Fonte: Elaborado pela autora (2014).

4.10 EFEITO DO EEPp SOBRE ALGUNS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Para investigar se o tratamento prolongado com EEPp (300 mg/kg) promove alguma alteração funcional de órgãos importantes, o soro foi coletado para análise da atividade de algumas enzimas e de metabólitos indicadores de função hepática e renal (Tabela 4). Além disto, foi realizada a análise macroscópica como cor, textura e peso de alguns órgãos vitais como fígado, coração, baço, rins e pulmões dos animais com LPNI tratados com EEPp ou veículo. Os dados apresentados na Tabela 4 mostram que o tratamento prologado dos animais, por 10 dias com o EEPp (300 mg/kg, i.g.), não promoveu nenhuma alteração tanto no comportamento geral dos animais, quanto nos parâmetros bioquímicos ou macroscópicos dos órgãos, quando comparados com os animais que receberam somente veículo (10 ml/kg, i.g.). Os níveis de séricos de indicadores de lesões hepáticas (atividade de AST e ALT, IU/ml) e de indicadores de lesões renais (concentração séricas de creatinina, uréia e ácido úrico, mg/dL) não foram modificados de forma significativa pelo tratamento diário com o EEPp, quando comparados com os animais tratados com veículo (Tabela 4). Observou-se apenas uma diminuição da atividade da GGT em animais tratados com o EEPp em relação a animais tratados com veículo (Tabela 4), o que pode indicar um possível efeito hepatoprotetor, porém, seriam necessários ensaios futuros para confirmação desta hipótese. Assim, estes dados sugerem que o EEPp não promove perda e/ou comprometimento das funções dos órgãos avaliados neste estudo.

Tabela 4 – Efeito do extrato etanólico de *Pterodon pubescens*, em parâmetros de função hepática e renal de camundongos swiss, após LPNI.

Parâmetros	Naive	Veículo	<i>Pterodon pubescens</i> (mg/kg, i.g.)		
			300	Sham + 300	Sham
AST (U/L)	54,2 ± 9,0	56,3 ± 3,6	63,0 ± 6,3	62,5 ± 8,1	58,0 ± 7,7
ALT (U/L)	35,4 ± 9,1	42,7 ± 8,6	49,0 ± 5,7	46,1 ± 7,2	42,4 ± 9,0
GGT (U/L)	96,0 ± 5,1	96,2 ± 5,5	14,7 ± 6,7***	44,2 ± 7,9***	109,7 ± 7,7
Creatinina (mg/dL)	2,0 ± 0,4	1,4 ± 0,2	1,9 ± 0,3	1,6 ± 0,5	2,2 ± 0,6
Uréia (mg/dL)	26,8 ± 1,0	28,0 ± 2,0	32,7 ± 3,6	33,0 ± 1,8	34,6 ± 2,7
Ácido úrico (mg/dL)	2,1 ± 0,3	2,8 ± 0,4	3,0 ± 0,3	3,3 ± 0,4	2,9 ± 0,5

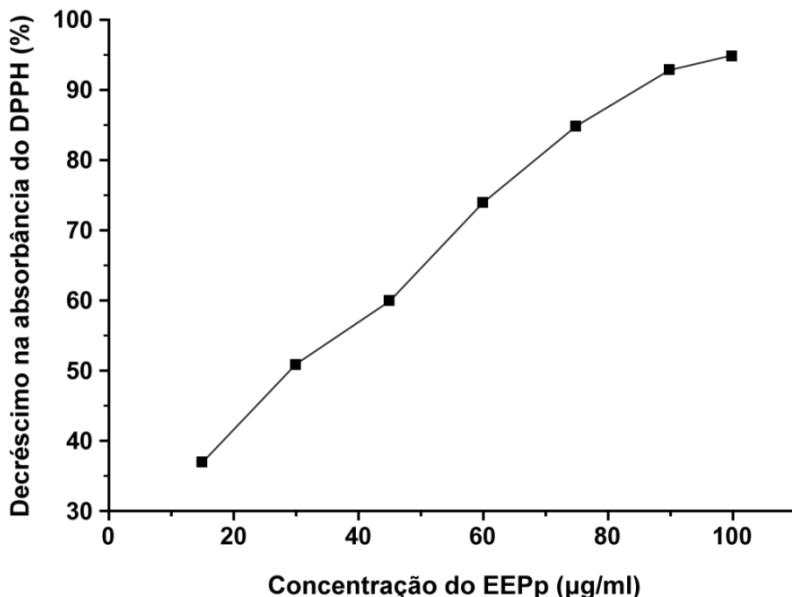
Os valores médios de 8 animais representam a média ± E.P.M. ***P<0,001 vs grupo controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste Student-Newman-Keuls). Fonte: Elaborado pela autora (2014).

4.11 POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO EEPp

Para avaliar a capacidade antioxidante do extrato de *Pterodon pubescens*, três ensaios complementares foram realizados: DPPH, poder de redução e de quelante de metal.

A Figura 52 mostra a porcentagem de inibição do DPPH por extrato de *Pterodon pubescens*, em diferentes concentrações. A capacidade da amostra testada para eliminar DPPH foi avaliada com base nos seus valores de EC_{50} que foram inversamente relacionados com as suas capacidades antioxidantes. Os valores de EC_{50} obtidos neste estudo estão listados na Tabela 5. O extrato de *Pterodon pubescens* apresentou atividade relevante, considerando a complexidade da matriz correspondente ao extrato da planta. Os valores obtidos para o EEPp estão próximas aos padrões que são usados com atividade antioxidante reconhecida.

Figura 52 – Efeito do extrato de *Pterodon pubescens* na eliminação do radical DPPH.



Efeito do EEPp na eliminação do radical livre DPPH, em diferentes concentrações. A quantidade de antioxidante exigida para diminuir a concentração inicial de DPPH• para 50% (concentração eficaz ou EC_{50}) indica a atividade antioxidante do extrato. Fonte: Elaboração dos autores (2014).

O ensaio do poder de redução mede a capacidade doadora de elétrons de antioxidantes, utilizando o método de redução de ferricianeto de potássio (PRASAD et al., 2009). Nossos resultados demonstram que o EEPp analisado apresentou excelente potencialidade de redução (Tabela 5), sendo que o valor encontrado para mensurar a atividade do extrato foi melhor que os dos padrões utilizados, rutina e BHT (VLADIMIR-KNEZEVIC et al., 2011).

Além disso, as atividades antioxidantes dos extratos de plantas são também atribuídas à sua capacidade de quelar íons de metais de transição, tais como os de Fe^{2+} , conhecido como um potente indutor de peroxidação lipídica, possuindo a capacidade de mover elétrons individuais por permitir a formação e propagação de muitas reações radicais, mesmo começando com radicais relativamente não reativos (GUO et al., 1996; LOPES, SCHULMAN, HERMES-LIMA, 1999; ABOUL-ENEIN et al., 2003; SHAHIDI, LIYANA-PATHIRANA, WALL, 2006). Quantitativamente, o composto ferrozine, usado para o teste de quelante de metal, pode formar complexos com Fe^{2+} . Na presença de agentes quelantes, a formação do complexo é interrompida resultando em uma diminuição na cor vermelha do complexo. Assim, a medição da redução da intensidade da cor no comprimento de onda 562 nm permite estimar a atividade quelante de metal do quelante coexistente (GULCIN, 2006). Os valores de EC_{50} obtidos neste estudo estão listados na Tabela 5. O EEPp demonstrou uma excelente capacidade de quelar Fe^{2+} , e demonstrou ser o mais ativo dos dois padrões utilizados, rutina e BHT, e apenas 3 vezes menos potente do que o mais ativo dos padrões EDTA, sugerindo que o EEPp apresenta elevada atividade antioxidante.

Tabela 5 – Atividade antioxidante do extrato de *Pterodon pubescens*.

Amostra	Poder redutor (mg EAA/g) ¹	Atividade quelante de metal (EC_{50} µg/ml)	Atividade sequestradora de DPPH (EC_{50} µg/ml)
Extrato de <i>P. pubescens</i>	1878,2 ± 02,3	13,4 ± 0,4	23,5 ± 0,2
Rutina	1622,1 ± 11,8	41,3 ± 0,2	2,8 ± 0,2
BHT	1641,9 ± 14,2	20,6 ± 0,3	6,7 ± 0,2
EDTA	-----	4,6 ± 0,1	-----

1. Resultados em mg de ácido ascórbico/g de EEPp. Valores expressos como média ± E.P.M. Fonte: Elaboração dos autores (2014).

5 DISCUSSÃO

O alívio da dor é atualmente visto como um direito humano básico, sendo não somente uma questão clínica, mas também algo ético que envolve todos os profissionais de saúde, na preocupação com a qualidade de vida do paciente (COUSINS; POWER; SMITH, 2000). Atualmente, a procura por novas substâncias que possam ser aplicadas na melhoria da qualidade de vida de pacientes com dor, continua sendo um dos grandes alvos da medicina moderna com o objetivo de tentar desenvolver substâncias que sejam capazes de atenuá-la ou suprimí-la, ou mesmo a descoberta de fármacos com eficácia semelhante, ou maior que aqueles usados na terapêutica atual, mas com menor incidência de efeitos colaterais (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006; DRAY, 2008). Dessa forma, o estudo de novas substâncias com potencial analgésico é fundamental no incremento de novos recursos que auxiliem no manejo do que é considerado o quinto sinal vital.

De acordo com Calixto (2000), apesar dos grandes avanços na medicina, os produtos naturais, principalmente os metabólitos secundários originados de plantas, contribuíram decisivamente para a terapêutica moderna e para importante conhecimento sobre mecanismos relacionados com o processo de transmissão e o tratamento da dor, como a caracterização dos tipos de receptores e dos ligantes endógenos envolvidos no processo nociceptivo.

As plantas sempre desempenharam, e continuam a desempenhar um papel fundamental na manutenção da vida humana, pelo fornecimento de alimentos, energia térmica e medicamentos (ALONSO, 1998). Calixto (2003) ressalta que o Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, estimada em cerca de 20% do número total de espécies do planeta. Esse imenso patrimônio genético, já escasso nos países desenvolvidos, tem na atualidade valor econômico-estratégico inestimável em várias atividades, mas é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos onde reside sua maior potencialidade. Campo este que vem sido bem aceito pela população mundial, pois segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 80% desta população recorrem às medicinas tradicionais para atender suas necessidades primárias de assistência médica (VENDRUSCOLO; MENTZ, 2006).

A abordagem etnofarmacológica é de grande importância, pois combina informações adquiridas nas comunidades locais que fazem uso da flora medicinal com estudos fitoquímicos e/ou farmacológicos. Desta forma, a planta medicinal *Pterodon pubescens* Benth., uma árvore nativa da região central do Brasil, popularmente conhecida como "sucupira-

branca" ou "faveira", parece ser uma opção terapêutica para a dor persistente, pois esta espécie vegetal tem sido usada há muitas décadas na medicina popular brasileira por suas atividades farmacológicas anti-inflamatórias, analgésicas e antirreumáticas (PIO CORRÊA, 1984; COELHO et al., 2001; CARVALHO, 2004).

Dentre os metabólitos secundários produzidos pela planta medicinal *Pterodon pubescens*, é amplamente relatado na literatura a presença de diterpenos voucapanos (BRAZ-FILHO, GOTTLIEB, VIEGAS ASSUMPCÃO, 1971; FASCIO et al., 1976; SILVA et al., 2004; COELHO et al., 2005; VIEIRA et al., 2008; SPINDOLA et al., 2009; HOSCHEID et al., 2012). O EEPp apresentou um perfil fitoquímico semelhante ao descrito anteriormente pelo nosso grupo (NUCCI et al., 2012). Assim, foram identificados a partir da análise GC-EM sete diterpenos voucapano, sendo o 6 α -acetoxivouacapano; 6 α , 7 β -dimetoxivouacapan-17-eno e 6 α , 7 β -diacetoxivouacapano são os compostos majoritários deste extrato. No entanto, difere do estudo anterior pela presença do componente de δ -elemeno e a ausência dos diterpenos voucapanos 18 α -hidroxivouacapan- β 7,17-lactona e 6 α -acetoxivouacapan-17-eno. Além disso, entre os compostos identificados, nove sesquiterpenos são semelhantes ao relatado na literatura sobre plantas do gênero *Pterodon* por Santos e colaboradores (2010) (α -capaeno, β -elemeno, (E)-cariofileno, α -humuleno alloaromadendreno, γ -muuroleno, biciclogermacreno, acifilleno e δ -cadineno) e Dutra e colaboradores (2009b) (δ -elemeno, β -elemeno, E-cariofileno, α -humuleno, γ -muuroleno, germacreno-D, biciclogermacreno, espatulenol, óxido de cariofileno e cis farnesil-etilo). Entre os sesquiterpenos identificados no extrato, γ -muuroleno e (E)-cariofileno são os compostos majoritários. Claramente, a literatura demonstra que a presença destes diterpenos com esqueleto voucapan são os responsáveis pelo efeito anti-inflamatório (NUNAN et al., 1982; SABINO et al., 1999a; COELHO et al., 2001; HOSCHEID et al., 2013) e antinociceptivo (COELHO et al., 2005; SPINDOLA et al., 2010; NUCCI et al., 2012) da planta medicinal *Pterodon pubescens*.

Além disso, tem sido demonstrado que o extrato hidroalcoólico das sementes de *Pterodon pubescens* (HEPp), administrado por via oral, inibe eficazmente o edema e dor causados pela artrite induzida por colágeno (SABINO et al., 1999a) e pelo índice artrítico (COELHO et al., 2001), apresentando assim efeito antiartrítico, fortalecendo o uso popular desta planta. Outros estudos demonstraram que plantas do gênero *Pterodon* também possuem um potencial antioxidante (DUTRA; LEITE; BARBOSA, 2008).

Os resultados do presente estudo ampliam os dados da literatura sobre a ação antinociceptiva da planta medicinal *Pterodon pubescens* demonstrando pela primeira vez que o EEPp, administrado por via oral, inibe eficazmente a hiperalgesia mecânica e térmica no modelo animal de dor pós-operatória e de dor neuropática, bem como a hiperalgesia mecânica no modelo animal da síndrome da dor complexa regional do tipo I, no modelo de dor experimental em camundongos. Também fornece evidências inéditas sobre o envolvimento do sistema glutamatérgico no efeito antinociceptivo do EEPp.

Spindola e colaboradores (2010) analisaram o efeito dos compostos isolados geranilgeraniol e o ácido 6 α ,7 β -dihidroxiouacapan-17 β -oico, administrados intraperitonealmente, mostrando que os mesmos agem em sinergismo e não apresentam atividade relevante quando testados sozinhos, sugerindo que o efeito anti-inflamatório da *Pterodon pubescens* seja devido a presença deles no extrato e possivelmente a um efeito sinérgico. Neste sentido, o presente estudo optou por usar o extrato bruto desta planta, também porque é a forma usada empiricamente pela população. Os mesmos autores também iniciaram a investigação do possível mecanismo de ação envolvido no efeito antinociceptivo desses compostos, demonstrando o envolvimento periférico de receptores vanilóides VR1 (TRPV1) e receptores para glutamato. Ademais, Spindola e colaboradores (2011) verificaram que o efeito antinociceptivo dos compostos majoritários isolados da *Pterodon pubescens* se deva a síntese ou liberação de serotonina, principalmente via receptores 5-HT₃. Já está bem estabelecido na literatura que as vias serotoninérgicas são implicadas na modulação do controle descendente da dor, podendo estimular e/ou inibir a sensação dolorosa (MARKS et al., 2009). No entanto, o mecanismo envolvido neste efeito ainda permanece pouco compreendido.

Para a realização de um *screening* inicial utilizou-se o modelo da formalina. Este é um modelo clássico e preliminar no estudo de fármacos com ação analgésica e antiinflamatória, por gerar uma dor intensa produzida pela injeção intraplantar da solução de formaldeído. A análise deste teste é dividida em duas fases, sendo que a primeira é caracterizada pela estimulação direta dos neurônios nociceptivos, podendo ser suprimida pela administração de analgésicos de ação central, como por exemplo, morfina, petidina e codeína (HUNSKAAR; HOLE, 1987; ROCHA et al., 2008). Já a segunda fase pela liberação de mediadores pró-inflamatórios, tais como prostaglandinas, histamina, serotonina, somatostatina, bradicinina (SHIBATA et al., 1989; MALMBERG, YAKSH, 1992), bem como estimulação dos receptores

opioides periféricos (OLUYOMI, HART, SMITH, 1992) e TRPA1 (MCNAMARA et al., 2007). Assim, a segunda fase é inibida por AINEs, glicocorticoides e analgésicos de ação central (OHKUBO et al., 1990; DOAK, SAWYNOK, 1997; PARADA et al., 2001).

Neste sentido, a literatura demonstra que extratos e frações extraídos de plantas do gênero *Pterodon* são capazes de inibir ambas as fases, neurogênica e inflamatória, observadas no teste de formalina (COELHO et al., 2005; GALCERAN et al., 2011). Corroborando esses dados, também foi encontrado o mesmo perfil no presente estudo. O EEPp causou significativa antinocicepção, de forma dependente da dose, quando administrado por via oral, contra ambas as fases, neurogênica (fase inicial – F1) e inflamatória (fase final – F2) da dor causada pela injeção intraplantar de formalina. Também, o EEPp atenuou parcialmente, mas significativamente, a formação do edema associado com a fase final da resposta a formalina (NUCCI et al., 2012). Como citado anteriormente, esse resultado observado provavelmente deva-se interação dos compostos presentes no extrato de *Pterodon pubescens* que atuam em sinergismo (Spindola et al., 2010), sugerindo assim, que o EEPp atua inibindo componentes neurogênicos, bem como inflamatórios (citocinas/quimiocinas) durante um processo nociceptivo.

O presente investigou se uma possível inibição do mecanismo estimulatório central, via neurotransmissão glutamatérgica, pode contribuir para o efeito antinociceptivo da *Pterodon pubescens* (Fig. 53A). Nosso interesse em investigar os receptores de glutamato, se deve ao fato de que eles são os principais mediadores da neurotransmissão excitatória no sistema nervoso central de mamíferos (TRAYNELIS et al., 2010). Dados da literatura demonstram que a injeção intratecal de glutamato ativa e sensibiliza diretamente os neurônios na medula espinal, promovendo um comportamento da dor imediata (morder e lamber) (BATISTA et al., 2008; BAGGIO et al., 2010; MARTINS et al., 2011). Este fenômeno pode estar relacionado com a indução de liberação de glutamato e substância P a partir de terminais nervosos centrais e indiretamente pela liberação de citocinas pró-inflamatórias (Fig. 53C), facilitando e/ou prolongando-a a instalação de quadros como a hiperalgesia e alodinia. Kleinschnitz e colaboradores (2004) reforça que o bloqueio do receptor de NMDA, reduz significativamente a expressão de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β após constrição do nervo isquiático. Ademais, diversos estudos de fármacos com ação antinociceptiva, tanto periférica quanto central, demonstram uma interação com mecanismos dependentes dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos ou metabotrópicos (SCHEIDT et al., 2002; ROSA et al.,

2005; BATISTA et al., 2008; FREITAS et al., 2009). Este fato confirma não somente a participação dos receptores NMDA, mas também dos outros subtipos de receptores glutamatérgicos no processo nociceptivo (Fig. 53). Também, outro estudo, realizado por Fisher; Coderre (1996) sugeriu uma interação dos receptores metabotrópicos com os receptores NMDA na nocicepção induzida pela formalina. Estes dados reforçam nossos achados anteriores, no teste de formalina, que nos indicam que o sistema glutamatérgico poderia estar implicado no efeito antinociceptivo induzido pelo EEPp.

Embora o mecanismo exato subjacente ao efeito antinociceptivo da planta medicinal *Pterodon pubescens* permaneça ainda pouco compreendido, é possível que a inibição periférica e central do sistema glutamatérgico possa contribuir para este efeito (Fig. 53A). Essa observação é reforçada por resultados prévios da literatura que demonstram que um diterpeno vouacapano majoritário, isolado desta planta foi capaz de inibir a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato (Spindola et al., 2010). Assim, para verificar se o extrato bruto também produziria o mesmo efeito, neste estudo foi reproduzido o teste de glutamato na pata e também obtivemos o mesmo perfil de resultado (Fig. 53B). Neste sentido, partimos para investigação dos mecanismos de ação central. Em nossos resultados demonstramos que o EEPp reduz a resposta nociceptiva induzida pela injeção intratecal de agonistas glutamatérgicos ionotrópicos (NMDA, cainato) e metabotrópico mGLUR 1 e 5 (pelo agonista trans-ACPD), em camundongos (Fig. 53C).

Em conjunto, nossos resultados sugerem a importância dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos no efeito antinociceptivo da EEPp e indicam pela primeira vez, que o extrato pode atuar como um antagonista glutamatérgico espinal (Fig. 53C). Estudos mostram que a liberação de glutamato é a forma mais importante para controlar a excitação dos neurônios no corno posterior da medula espinal, como resultado de impulsos que chegam em fibras nociceptivas. Está bem estabelecido (HILL, 2001) que a ativação do receptor NMDA induz despolarização prolongada, sendo que este mecanismo pós-receptor envolve a ativação de proteínas cinases, mobilização de Ca^{2+} intracelular, indução dos genes e ainda a produção de mediadores nociceptivos e/ou inflamatórios, tais como prostaglandinas e óxido nítrico. Classicamente, o glutamato atua por meio de receptores ionotrópicos AMPA para produzir uma despolarização rápida, o que elimina o íon Mg^{2+} do poro do canal do receptor de NMDA (Fig. 53C) (HILL, 2001). Porém, dados da literatura demonstram que os receptores

Cainato também têm uma potente atividade despolarizante em fibras da raiz dorsal da medula espinhal (Agrawal; Evans, 1986) o qual surge a partir de uma sub-população de neurônios do gânglio da raiz dorsal que expressam predominantemente receptores cainato em vez de receptores AMPA ou NMDA (Huettner, 1990), isto demonstra a importância dos receptores cainato na transmissão nociceptiva. Além disso, os receptores para AMPA e NMDA (LIU et al., 1994; LEE et al., 2002) ou os receptores cainato localizados no terminal pré-sináptico do neurônio sensorial primário, no corno posterior da medula espinal, regulam a liberação de glutamato vesicular (Fig. 53C) (KERCHNER et al., 2001).

Os resultados do presente estudo sobre as avaliações do sistema glutamatérgico, demonstraram que o EEPp só não foi capaz de reduzir a nocicepção induzida pela injeção intratecal de AMPA, mostrando uma especificidade do mecanismo de ação da planta sobre este sistema. Neste sentido, estes dados sugerem a influência da inibição do sistema glutamatérgico no efeito antinociceptivo do EEPp, e que este efeito se deva em parte, pelo bloqueio dos receptores ionotrópicos NMDA e cainato e metabotrópicos mGLUR 1 e 5 (por meio do agonista trans-ACPD). Assim, sua ação no neurônio pré-sináptico inibe a liberação de neurotransmissores excitatórios, prevenindo a hiperexcitabilidade do neurônio pós-sináptico. Ademais, a ação do EEPp pode ser no neurônio pós-sináptico, reduzindo a frequência de despolarização deste neurônio, bem como uma possível diminuição da ativação das vias de sinalização intracelular responsáveis pela sensibilização neuronal, como ativação de proteínas cinases. Além disso, estas duas ações ainda podem ocorrer de forma sinérgica inibindo a transmissão nociceptiva no corno posterior da medula espinal (Fig. 53A e C).

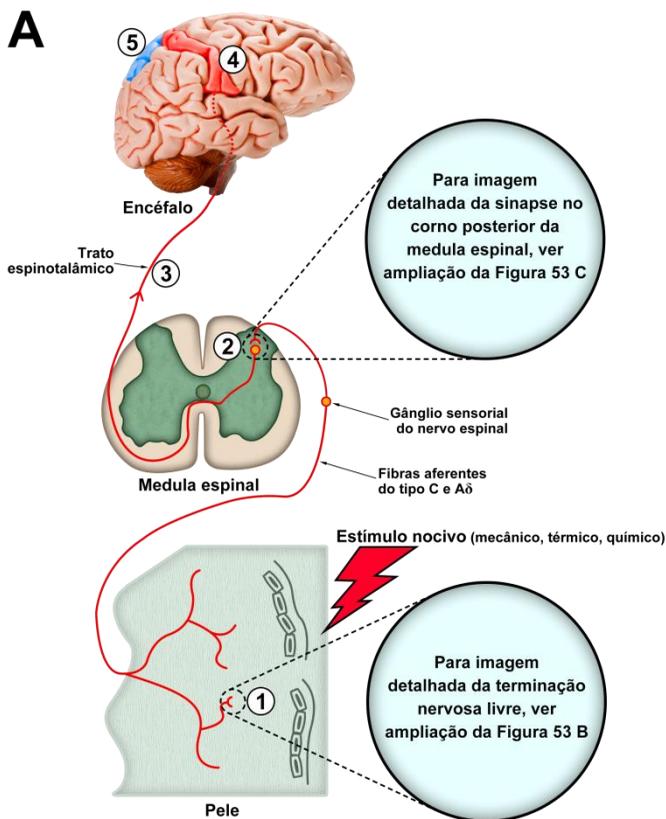
Está estabelecido que o TRPA1 é um canal de cátions não-seletivo, expresso nas fibras C e A δ que também expressam TRPV1, que demonstra uma possível interação funcional desses canais. De fato, 97% dos neurônios que expressam TRPA1 também expressam TRPV1, enquanto apenas 30% de fibras expressando TRPV1 também expressam TRPA1 (STORY et al., 2003; KOBAYASHI et al., 2005; JULIUS, 2013). Pode-se então sugerir que os canais TRPA1 e TRPV1 são importantes para a excitação neuronal levando a liberação de neuropeptídeos inflamatórios e ao aumento da sensibilidade dolorosa. Ambos os canais também são ativados pela liberação de agentes inflamatórios a partir de células não neuronais (como queratinócitos, mastócitos, dentre outras) na área da lesão do tecido (Fig. 53B) (HUANG, ZHANG, MCNAUGHTON, 2006; BAUTISTA, PELLEGRINO, TSUNOZAKI, 2013). Curiosamente, as evidências

genéticas e farmacológicas fazem do TRPA1 um alvo preferencial para o desenvolvimento de medicamentos anti-inflamatórios que podem ser usado em condições agudas e crônicas (ANDRADE, MEOTTI, CALIXTO, 2012; BAUTISTA, PELLEGRINO, TSUNOZAKI, 2013).

Mcnamara e colaboradores (2007) ressaltam que o TRPA1 é o principal local onde a formalina interage para produzir a dor característica do teste da formalina “*in vivo*”. Estes autores demonstraram que o formol excita neurônios sensoriais ativando diretamente TRPA1, um canal de cátions que desempenha um papel muito importante na dor inflamatória. No mesmo estudo foi mostrado que a formalina induziu influxo de cálcio nas células que expressam canais TRPA1, sendo estas respostas atenuadas por um antagonista seletivo de TRPA1, o HC-030031. Assim, considerando os dados da literatura descritos anteriormente sobre o papel dos canais TRPV1 e TRPA1 na dor, os nossos resultados obtidos no teste de formalina, principalmente em relação à inibição na fase inflamatória, bem como um estudo prévio que demonstra que a *Pterodon pubescens* reduz a nocicepção causada pela injeção intraplantar de capsaicina (ativador TRPV1) na pata (Spindola et al., 2010), o presente estudo foi investigar o envolvimento central de canais TRPA1 e TRPV1 no efeito antinociceptivo do EEPp.

Estudos têm demonstrado que a ativação do sistema glutamatérgico pode modular positivamente a função dos receptores TRPV1, como por exemplo, o grupo de receptores para glutamato do tipo metabotrópico I (mGLUR 1 e 5), estão envolvidos no aumento da sensibilidade térmica pelo aumento da função do TRPV1 (Fig. 53B) (HU; BHAVE; GEREAU, 2002). Outros estudos sugerem que os agonistas seletivos para o receptor de TRPA1, isotiocianato de alilo (AITC) e cinamaldeído modulam a transmissão glutamatérgica em subpopulações de neurônios na lâmina I e II do corno posterior da medula espinal (WRIGLEY; JEONG; VAUGHAN, 2009), sendo que estes agonistas atuam aumentando a transmissão sináptica excitatória, levando a liberação de glutamato na fibra nervosa terminal (Fig. 53 C) (KOSUGI et al., 2007). Em conjunto, nossos resultados e os dados da literatura, permitem sugerir que a injeção intratecal de cinamaldeído e capsaicina ativa diretamente os neurônios na lâmina I e II do corno dorsal da medula espinal, que expressam os receptores de TRPA1 e TRPV1, podendo contribuir para maior liberação de glutamato na fenda sináptica. Em contrapartida, o tratamento por via oral com EEPp leva a um bloqueio dos termo-canais TRPV1 e TRPA1, o que pode colaborar com o efeito antinociceptivo do extrato (Fig. 53B e C).

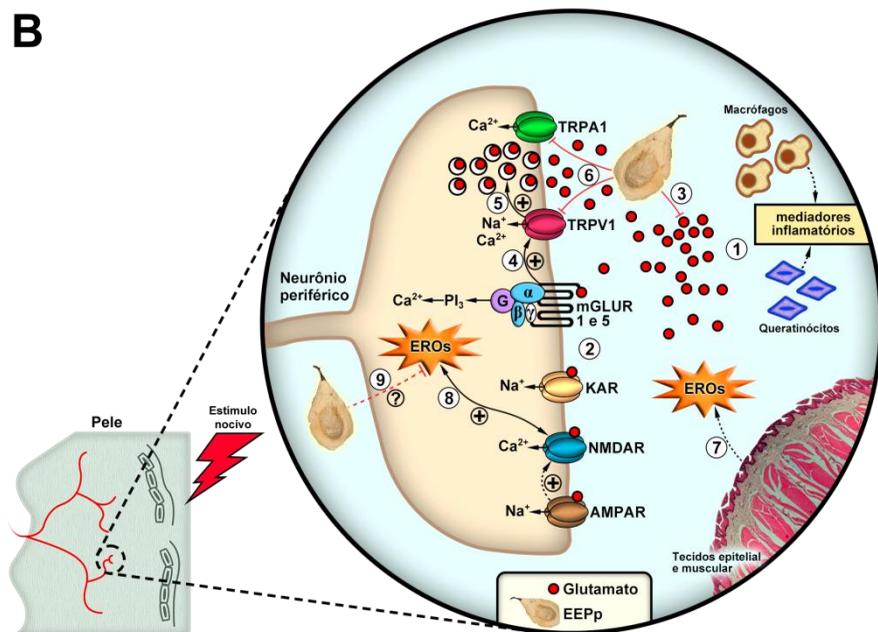
Figura 53 – Provável mecanismo de ação do EEPp.



A lesão tecidual e/ou inflamação promovida por estímulos nocivos (mecânico térmico e/ou químico) na periferia induz a produção de mediadores químicos como o glutamato, entre outros, que ativa e sensibiliza nociceptores periféricos (1), transmitindo o sinal nociceptivo pelas fibras sensoriais primárias até o corno posterior da medula espinal (2). Nesta região, a liberação sustentada de glutamato pode gerar quadros de hipersensibilidade, que se manifesta clinicamente como alodinia e hiperalgesia. Também, é no corno posterior da medula espinal que ocorrem as sinapses com os neurônios de segunda ordem (ou neurônios sensoriais secundários), que por sua vez formam vias ascendentes (3) que transmitem a informação a centros supraespinais, como o tálamo e o córtex cerebral, onde primeiramente ocorre a sensação e localização da dor no córtex somatossensorial, área primária das sensibilidades gerais no giro pós-central (4), depois a percepção da dor na área secundária das sensibilidades gerais, no giro parietal superior (5). Fonte: Elaborado pela autora (2014); Criação e arte por Rene Juliano Martins (2014).

Figura 53 (continuação) – Provável mecanismo de ação do EEPp.

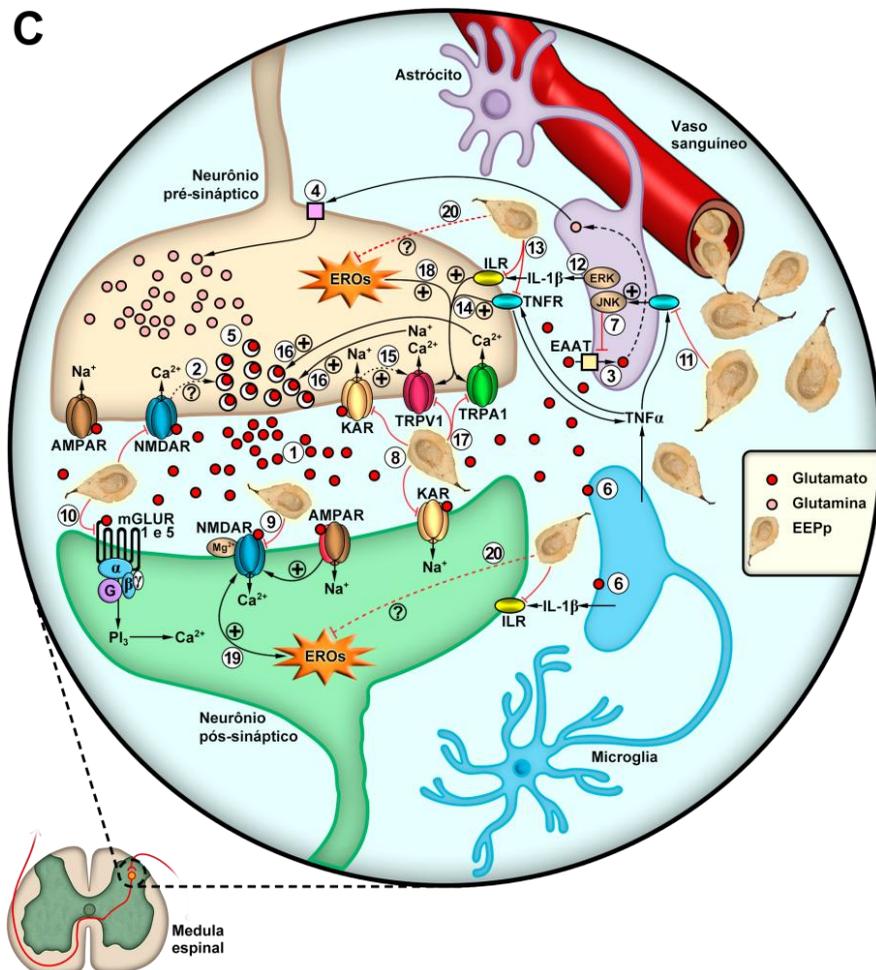
B



Visão ampliada dos eventos que ocorrem em uma terminação nervosa livre após estímulo nocivo e/ou tratamento com EEPp. (1) Após lesão e/ou inflamação células não-neuronais (ex. macrófagos e queratinócitos) estimulam a liberação de glutamato pela terminação do neurônio periférico. (2) O glutamato liberado estimula receptores glutamatérgicos periféricos. (3) O EEPp (30 e 300 mg/kg, i.g.) inibiu de forma significativa e dependente da dose a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato. (4) Receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGLUR 1 e 5) estimulam a função do TRPV1. (5) TRPV1 estimula a liberação de glutamato vesicular. (6) O EEPp (300 mg/kg, i.g.) reduziu a hiperalgesia térmica, ao calor e ao frio, após CIP e LPNI, sugerindo uma inibição dos termo-canais TRPV1 e TRPA1, respectivamente. (7) Após procedimento de IRP ocorre um aumento na produção de EROs pelo tecido epiteliais e muscular. (8) EROs levam a estimulação do receptor glutamatérgico NMDA. (9) EEPp tem capacidade antioxidante, o que pode auxiliar no efeito antinociceptivo mostrado no modelo de SDCR-I, por reduzir EROs na periferia. Fonte: Elaborado pela autora (2014); Criação e arte por Rene Juliano Martins (2014); Baseado em Gangadharan e Kuner (2013).

Figura 53 (continuação) – Provável mecanismo de ação do EEPp.

C



Visão ampliada dos eventos que ocorrem a nível espinal após estímulo nocivo e/ou tratamento EEPp. (1) A liberação de glutamato na fenda sináptica ativam receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos pré e pós-sinápticamente. (2) NMDA estimula a liberação de glutamato vesicular. (3) Glutamato é recaptado pelo EAAT e convertido a glutamina no astrócito. (4) Glutamina é transportada do astrócito para o neurônio pré-sináptico. (5) Glutamina é convertida à glutamato e vesiculado no neurônio pré-sináptico. (6) Glutamato liberado na fenda sináptica estimula a microglia, liberando $TNF-\alpha$ e $IL-1\beta$. (7) $TNF-\alpha$ liberado pela microglia estimula JNK no astrócito, inibindo EAAT, que consequentemente vai levar a um acúmulo de glutamato na fenda

sináptica e à hipersensibilidade neuronal. (8) O EEPp (30 e 300 mg/kg, i.g.) inibiu de forma significativa e dependente da dose a nocicepção induzida pela injeção intratecal de agonistas glutamatérgicos do tipo ionotrópico cainato (9) e NMDA, e (10) metabotrópico (mGLUR 1 e 5). (11) O EEPp pode agir inibindo o receptor para TNF- α no astrócito, isto acarreta uma redução na ativação da JNK, desinibindo o EAAT, aumentando a recaptação de glutamato da fenda sináptica e diminuindo a excitação neuronal. (12) A estimulação da ERK no astrócito aumenta a liberação de IL-1 β . (13) O EEPp (30 e 300 mg/kg, i.g.) inibiu de forma significativa e dependente da dose a nocicepção induzida pela injeção intratecal de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β . (14) A estimulação dos receptores para citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β aumentam a função do TRPV1 e TRPA1. (15) Ativação do receptor cainato estimula o receptor TRPV1. (16) TRPV1 e TRPA1 aumentam a liberação de glutamato vesicular. (17) O EEPp (30 e 300 mg/kg, i.g.) inibiu de forma significativa e dependente da dose a nocicepção induzida pela injeção intratecal de ativadores dos canais TRPV1 e TRPA1, capsaicina e cinamaldeído, respectivamente. (18) EROs aumentam a liberação espontânea de glutamato em terminais pré-sinápticos através da ativação de canais TRPV1 e TRPA1. (19) EROs presentes em processos de dores crônicas/neuropática aumentam a função do receptor NMDA. (20) O EEPp tem potencial antioxidante, podendo inibir a geração de EROs nos neurônios do corno posterior da medula espinal. Fonte: Elaborado pela autora (2014); Criação e arte por Rene Juliano Martins (2014); Baseado em Gangadharan e Kuner (2013).

O mecanismo preciso pelo qual o EEPp promove os seus efeitos ainda não está totalmente esclarecido, mas é importante ressaltar que este estudo mostra que este efeito pode ser mediado, pelo menos em parte, pelo antagonismo da sinalização glutamatérgica, reduzindo a ativação dos receptores de citocinas pró-inflamatórias e canais TRPV1 e TRPA1. Desta forma, o conjunto de resultados apresentados nesta dissertação fornece evidências inéditas na literatura sobre o mecanismo que envolve as propriedades analgésicas do extrato dos frutos de *Pterodon pubescens*. Somado ao fato de que esta espécie vegetal já é utilizada empiricamente no tratamento de dor crônica, levou-nos a investigar o efeito do EEPp em modelos de dor aguda e crônica relevantes clinicamente, como exemplo de dor aguda, a dor pós-operatória e, de dor crônica, a síndrome da dor complexa regional do tipo I e a LPNI.

Várias abordagens têm sido utilizadas para reduzir a dor pós-operatória, incluindo a administração de opióides sistêmicos e AINEs, infusão peridural ou raquidiana de anestésicos locais, e bloqueio do nervo periférico. Sugere-se também que a inibição da recaptação de noradrenalina (NA) e serotonina (5-HT) (milnaciprano) na medula

espinal inibe a dor pós-operatória (OBATA et al., 2010). De acordo com estes resultados, estudos anteriores usando o teste de ácido acético demonstraram o envolvimento serotoninérgico na ação antinociceptiva da *Pterodon pubescens* (SPINDOLA et al., 2011). Assim investigamos a ação antinociceptiva do EEPp no modelo de dor pós-operatória.

Neste relevante modelo, foram encontrados resultados muito interessantes, os quais demonstram que o tratamento oral agudo ou prolongado com o EEPp reduz, de forma significativa, a hiperalgesia mecânica no modelo de dor pós-operatória em camundongos (Fig. 53A). Além disso, este efeito anti-hiperalgésico agudo durou até 2 horas quando analisados na hiperalgesia mecânica da pata com incisão. Brennan, Vandermeulen e Gebhart (1996) ressaltam que este modelo animal de dor pós-operatória mimetiza a dor pós-operatória em humanos. Assim, o modelo incisão plantar também pode ser útil para prever efeitos analgésicos no pós-operatório de agentes de investigação.

Dados da literatura destacam que os neurotransmissores liberados por estímulos nocivos podem contribuir para o aumento da excitabilidade após lesão cirúrgica. Há muito tempo, vem sendo dada uma atenção especial para a ação de aminoácidos excitatórios (EAAs), como o glutamato (MELZACK; KATZ; CODERRE, 1992). Vários resultados foram obtidos a partir de experimentos realizados com o modelo de dor pós-operatória usando antagonistas dos receptores de EAAs espinais (ZAHN; BRENNAN, 1998; ZAHN; UMALI; BRENNAN, 1998). Assim, a ativação de receptores não-NMDA, AMPA e cainato espinais medeiam comportamento de dor e o tratamento intratecal com antagonista não-NMDA reduz o limiar de retirada da pata, que se desenvolve após uma incisão, atingindo valores próximos aos da pré-cirurgia (ZAHN; UMALI; BRENNAN, 1998). Na cirurgia, após a lesão de tecidos e inflamação, os nociceptores são sensibilizados de modo que uma ligeira estimulação torna-se dolorosa (Fig. 53A). Na dor pós-operatória, a sensibilização de fibras do tipo C e A δ ocorre na mesma intensidade do estímulo mecânico. Tem sido sugerido que o canal TRPV1 é importante para a geração de hiperalgesia térmica após a incisão (POGATZKI-ZAHN et al., 2005). Assim, visto que o EEPp pode inibir canais TRPV1 e, assim diminuir significativamente a nociceção causada pela CIP, avaliamos a hiperalgesia térmica neste modelo. Nossos resultados corroboram com os dados da literatura e demonstram que o EEPp retornou a latência de retirada da pata quase em valores de pré-cirurgia.

O segundo modelo escolhido para avaliação do efeito antinociceptivo do EEPp, foi o modelo de DPIC que mimetiza a SDCR-I

em humanos. A literatura demonstra que esta síndrome grave, incapacitante e dolorosa que pode ocorrer em uma extremidade após um trauma ou lesão. Os sinais clínicos incluem estímulos espontâneos e evocados de dor, edema, distúrbios vasomotores e sudomotores, disfunção motora e alterações tróficas sem evidência de lesão do nervo periférico (STANTON-HICKS et al., 1995; CORDON; LEMONICA, 2002). O modelo experimental de SDCR-I produzido por IRP em ratos ou camundongos é capaz de imitar sintomas importantes observados em pacientes com neuropatia periférica e são empregados na pesquisa comportamental (CODERRE et al., 2004; MILLECAMPs et al., 2010). A SDCR-I causa enorme sofrimento ao indivíduo acometido e como discutido anteriormente, a fisiopatologia desta síndrome ainda não foi completamente esclarecida. Além disso, o tratamento farmacológico ainda não está bem estabelecido, sendo baseado no uso de anti-inflamatórios, *scavengers* de radicais livres, opioides e fármacos gabaérgicos (ZUURMOND et al., 1996; ZOLLINGER et al., 1999; CODERRE, BENNETT, 2010). Neste contexto, a busca por novas substâncias para o tratamento de SDCR-I torna-se importante e necessário.

Neste sentido, os resultados obtidos em nosso laboratório demonstram, pela primeira vez, que o tratamento (oral) sistêmico, agudo ou prolongado, com o EEPp foi eficaz em reduzir a hiperalgesia mecânica induzida por IRP. Levando em conta que a SDCR-I em humanos, tem um breve período sensível aos medicamentos anti-inflamatórios e morfina, e um período posterior semelhante para pacientes com dor neuropática, na qual é desenvolvida uma resistência a estes tratamentos. Pode-se supor um potencial clínico do EEPp como um fitoterápico anti-inflamatório e antineuropático eficaz no tratamento da SDCR-I. No presente estudo demonstrou-se que o EEPp foi capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica no segundo dia pós-IRP (período agudo) e sétimo dia após a IRP (início do período crônico deste modelo). Neste modelo, a ação anti-hiperalgésica do EEPp durou até 3 horas após tratamento. A terapia com EEPp também foi eficaz em reduzir significativamente a hiperalgesia mecânica dos animais, em todos os dias do tratamento prolongado, sem produzir efeito cumulativo e/ou de tolerância.

Outro modelo muito relevante abordado em nosso trabalho foi o modelo de dor neuropática induzido pela LPNI. Basbaum e colaboradores (2009) enfatizam que, dentre as condições crônicas e debilitantes de dor, talvez a mais comumente experienciada é a dor lombar ou isquiática. Outros estudos indicam que a lesão causada pela

LPNI induz a nociceção crônica e a liberação de múltiplos mediadores inflamatórios e nociceptivos, que por sua vez aumentam a sensibilidade das vias sensoriais periféricas e centrais (BASBAUM, 1999; CHU et al., 2005). O envolvimento das vias glutamatérgicas nas mudanças plásticas e reorganização da rede nociceptiva espinal tem sido relatado após lesão do nervo (JI; WOOLF, 2001). Assim, o aumento do glutamato e citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL-1 β no corno posterior da medula espinal contribui para a sensibilização neuronal (BAGGIO et al., 2010; CORDOVA et al., 2013). Em consonância com isso, Kleinschnitz e colaboradores (2004) demonstraram que os receptores NMDA modulam a expressão de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL-1 β , em modelos de lesão do nervo periférico. Este processo ocorre através da abertura direta de canais iônicos, por ativação de mediadores intracelulares, além de indução de óxido nítrico, bradicinina e PGE2. Estes eventos estão envolvidos na transmissão e manutenção da dor crônica (JI, WOOLF, 2001; JI, STRICHARTZ, 2004; SOMMER, KRESS, 2004).

Modelos experimentais de neuropatia produzidos pela lesão do nervo isquiático em animais mimetizam sintomas observados em humanos com lesão do nervo e esses modelos são amplamente utilizados na pesquisa comportamental (BENNETT, XIE, 1988; CIDRAL-FILHO et al., 2011; MAZZARDO-MARTINS et al., 2012; CORDOVA et al., 2013). Dessa forma, os sinais comportamentais que representam diferentes componentes da dor neuropática foram examinados neste trabalho: a hiperalgesia mecânica e térmica (Fig. 53A). Os resultados do presente estudo demonstram que o tratamento agudo com o EEPp diminui a hiperalgesia mecânica induzida pela LPNI, evidente logo após 1 hora de tratamento, durando por até 5 horas pós-tratamento. Além disso, o tratamento prolongado com EEPp diminuiu significativamente a hiperalgesia mecânica causada pela LPNI em camundongos, apresentando efeito cumulativo de 24 horas no 15^o dia após a ligadura. É importante mencionar também que o efeito anti-hiperalgésico do EEPp não foi suscetível à tolerância, pois o EEPp manteve sua eficácia quando administrado repetidamente.

Tem sido demonstrado que os canais de TRPV1 e TRPA1 desempenham um papel chave na sensibilização central em relação à hipersensibilidade mecânica e térmica (ECKERT, JULIUS, BASBAUM, 2006; MAZARIO, BASBAUM, 2007; DA COSTA et al., 2010), e na capacidade de detectar temperaturas frias ou quentes (abaixo de 17 °C ou acima de 43 °C), particularmente as temperaturas nocivas (Fig. 53B e C) (CATERINA et al., 1997; CATERINA et al., 1999;

CATERINA et al., 2000; OBATA et al., 2005). Considerando que todos estes modelos escolhidos para avaliar o potencial clínico do EEPp na dor causam sensibilização central, tem envolvimento central com os termo-canais TRPV1 e TRPA1 (Fig. 53C) além de gerarem hiperalgesia térmica (calor e ao frio), avaliamos a hiperalgesia térmica no tratamento prolongado do EEPp, no modelo agudo (dor pós-operatória) e no crônico (dor neuropática). Corroborando os dados da literatura, nossos resultados mostram claramente que o EEPp é capaz de reduzir a hiperalgesia térmica, ao calor e ao frio, em ambos os modelos. Assim, os resultados da CIP e da LPNI reforçam os dados encontrados nos experimentos agudos, indicando o possível envolvimento de canais de TRPV1 e TRPA1 no efeito analgésico do extrato (Fig. 53B).

Ao analisar o comportamento dos animais em modelos de nocicepção, faz-se necessário também excluir a possibilidade de que o extrato estudado esteja agindo não somente como analgésico, mas também como relaxante muscular ou depressor do sistema nervoso central, causando alterações não específicas sobre a atividade locomotora dos animais. Em ambos os casos, o comportamento do animal pode encontrar-se alterado, como por exemplo, no ato de lambar a pata, caracterizando um viés no estudo. Diante disso, foi realizado o teste do campo aberto para excluir a possibilidade de alguma dessas interferências na ação antinociceptiva do EEPp.

A literatura demonstra que medicamentos como benzodiazepínicos e outros ansiolíticos diminuem o comportamento exploratório do animal (ONAIVI et al., 1992; RODRIGUES et al., 2002; HAZIM et al., 2014). Em contrapartida, nossos resultados demonstram que em ambos os tratamentos, agudo (única administração) e/ou prolongado (pós-LPNI) com o EEPp nas doses de 30-300 mg/kg, não afetou a atividade locomotora dos camundongos. Por outro lado, o tratamento agudo com uma dose de 600 mg/kg afetou a ação locomotora dos animais. Assim, esta dose não é interessante, pois parece não ser segura para ser utilizada na clínica e por isto não foi utilizada nos testes. A este respeito, Coderre e Van Empel (1994) mostraram que as doses de diversos antagonistas do receptor de NMDA, tais como MK-801, que produzem efeitos antinociceptivos significativos, também resultam em alterações da coordenação motora. Portanto, parece possível que os efeitos que prejudicam a motricidade de antagonistas do receptor NMDA, podem influenciar no efeito antinociceptivo dos medicamentos. Assim, o efeito que prejudica a motricidade de antagonistas do receptor de NMDA é produzido concomitantemente com antinocicepção, sendo que os dois efeitos não podem ser separados, sugerindo que os

antagonistas do receptor NMDA podem ter um intervalo terapêutico limitado. Os dados deste estudo reforçam a ideia de que o EEPp pode ser um antagonista glutamatérgico, especialmente via receptor NMDA, mas com base nos resultados do teste do campo aberto podemos notar que em contraste com dado reportado por MK-801, com doses mais elevadas do EEPp (até 300 mg/kg) ele é capaz de produzir um efeito antinociceptivo significativo, sem causar qualquer disfunção motora detectável. Neste sentido, o EEPp com doses até 300 mg/kg tem um potencial analgésico interessante para tratar algésias, sem causar sedação no sistema nervoso central.

Para investigar um possível efeito tóxico do EEPp na dose de 300 mg/kg, foi realizada uma análise toxicológica com os animais que receberam o tratamento prolongado do extrato após as avaliações da LPNI. Nossos resultados revelaram que os indicadores de lesão hepática (atividade de AST e ALT, UI/mL) e indicadores de lesão renal (concentrações séricas de creatinina, uréia e ácido úrico, mg/dL) não foram modificados. Além disso, depois de 10 sessões de tratamento, os animais não apresentaram qualquer alteração no comportamento geral, bem como na observação macroscópica de alguns órgãos vitais como o fígado, o coração, o baço, os rins e os pulmões. Estes resultados indicam que o tratamento diário apresentou boas condições de segurança e eficácia. Assim, os resultados deste estudo ampliam as conclusões de estudos anteriores, os quais mostram que a administração de extratos e frações obtidos a partir da planta medicinal *Pterodon pubescens* parecem não apresentar efeitos tóxicos importantes (SABINO et al., 1999b; COELHO et al., 2001; HOSCHEID et al., 2013).

Outro parâmetro analisado em nosso estudo foi o potencial antioxidante do EEPp. A literatura demonstra o sistema nervoso apresenta características que o tornam particularmente suscetível ao estresse oxidativo (Fig. 53 B e C). As altas concentrações de ferro em algumas regiões e o grande consumo de oxigênio são algumas dessas características. Também, o tecido nervoso é constituído de uma grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados e, dessa forma, é alvo considerável da lipoperoxidação mediada por radicais livres (Fig. 53B e C) (WARNER, SHENG, BATINIC-HABERLE, 2004; DUGAN, KIM-HAN, 2006).

Além disso, estudos mostram que espécies reativas de oxigênio (EROs) também estão criticamente envolvidas na geração de dor em várias condições dolorosas, incluindo dor neuropática persistente (KHALIL, KHODR, 2001; CHUNG, 2004; KIM et al., 2004; SINISCALCO et al., 2007). Isto pode ser devido ao envolvimento de

EROs na sensibilização central (Fig. 53C) (KIM et al., 2006; PARK et al., 2006; LEE et al., 2007). Recentemente, Nishio e colaboradores (2013) demonstraram que EROs aumentam a liberação espontânea de glutamato em terminais pré-sinápticos em neurônios do gânglio espinal através da ativação de canais TRPV1 e TRPA1 (Fig. 53C). Assim, a ativação excessiva destes canais iônicos por EROs pode induzir sensibilização central na medula espinal e resultar em dor crônica. No entanto, os agentes antioxidantes são muito eficazes no alívio da hiperalgesia mecânica e térmica (TAL, 1996; LEE et al., 2007). Também tem sido descrito que a isquemia e reperfusão causa um aumento na produção de EROs (Fig. 53B) e na produção de citocinas pró-inflamatórias, levando a uma disfunção microvascular nos tecidos adjacentes (CODERRE, BENNETT, 2010; CODERRE, 2011). Em contrapartida, recentemente, Park e colaboradores (2013), demonstraram que a administração intraperitoneal de vitamina C e E reduziram a hiperalgesia mecânica induzida por dor pós-isquemia crônica (IRP) em ratos. Também, já está bem estabelecido na literatura que as atividades antioxidantes dos extratos também são atribuídas à sua capacidade de quelar íons de metais de transição, tais como os de ferro e cobre, que têm sido propostos como catalisadores para a formação inicial de EROs (Fig. 53B) (SHAHIDI; LIYANA-PATHIRANA; WALL, 2006).

O ferro é um catalisador importante de reações de radicais oxidativos e promove a formação do radical hidroxila, do ânion superóxido e da molécula peróxido de hidrogênio. O efeito estimulador do radical hidroxila na peroxidação lipídica levou a especulações de que o ferro livre pode promover diretamente a inflamação e, que os agentes quelantes de ferro podem ter propriedades anti-inflamatórias úteis (ROBBINS, COTRAN, KUMAR, 2000; FRANCHINI, 2006). Esta hipótese foi testada em modelos animais de inflamação aguda e crônica com um agente quelante de ferro específico, a desferrioxamina, que se mostrou eficaz em doses de 100 e 200 mg/kg administradas por via intraperitoneal (BLAKE et al., 1983). No ensaio do poder de redução, os compostos mais antioxidantes convertem a forma de oxidação do ferro (Fe^{+3}) em cloreto férrico para ferroso (Fe^{+2}). A principal estratégia para evitar a geração de EROs que está associada com a catálise redox de metal ativo envolve a quelação de íons metálicos. Os agentes quelantes podem estabilizar íons metálicos pró-oxidantes em sistemas vivos por complexação dos mesmos (SHAHIDI; LIYANA-PATHIRANA; WALL, 2006). Além disso, o poder de redução está geralmente associado com a presença de redutores que exercem ação antioxidante, quebrando a cadeia de radicais livres. Também, os redutores podem

reduzir os intermediários oxidados de processos de peroxidação lipídica, de modo que eles podem atuar como antioxidantes primários e secundários.

A limpeza (*clearance*) do radical DPPH é considerada do ponto de vista metodológico, um dos mais fáceis, reprodutivos e precisos métodos na avaliação da atividade antioxidante dos sucos de frutas, extratos vegetais e compostos puros, tais como flavonoides e terpenoides (SZABO et al., 2007). Entre os compostos naturais que exibem uma boa atividade antioxidante, estão os compostos fenólicos, tais como os flavonoides, ácidos fenólicos, antocianinas dentre outros. Ademais, a atividade antioxidante dos polifenóis pode ser atribuída às suas propriedades redox, que lhes permitem agir como agentes doadores de hidrogênio, por sua capacidade de quelar metais, ou por sua capacidade para inibir algumas enzimas envolvidas na geração de radicais, tais como isoformas diferentes do citocromo P450, lipoxigenases, cicloxigenase e xantina oxidase (PEREIRA et al., 2009). Com isso, apesar dos nossos resultados demonstrarem que o EEPp tem uma quantidade reduzida de flavonoides em sua composição, Halliwell e Gutteridge (2007) ressaltam que uma substância antioxidante é capaz de diminuir ou inibir a oxidação, ainda que presente em baixas concentrações em relação ao seu substrato.

Assim, considerando os dados da literatura, descritos anteriormente, que reportam a ocorrência de um aumento da produção de EROs após processos de dores crônicas de origem inflamatória e/ou neuropática, somados aos nossos resultados que demonstram boa capacidade antioxidante do EEPp, podemos sugerir que o fato de agir como antioxidante pode também contribuir para o efeito antinociceptivo do extrato. As análises com o EEPp mostraram bons resultados por três diferentes métodos de avaliação da atividade antioxidante, o que garante resultados mais confiáveis, demonstrando que o EEPp possui composição com compostos fenólicos, inclusive de flavonoides, tem boa capacidade quelante, em reduzir o Fe^{3+} a Fe^{2+} e de capturar o radical, reduzindo-o a hidrazina.

Pelo exposto, os nossos resultados demonstram que EEPp produz efeito antinociceptivo em modelos pré-clínicos de nocicepção aguda e em modelos relevantes de nocicepção crônica (síndrome da dor complexa regional do tipo I e lesão traumática do nervo isquiático, LPNI). O mecanismo exato pelo qual EEPp promove seus efeitos ainda não é totalmente compreendido. No entanto, nossos resultados fortalecem os dados existentes na literatura até o momento por demonstrar que este efeito pode ser mediado, pelo menos em parte, pelo

bloqueio dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos (NMDA e cainato) e metabotrópicos mGLUR 1 e 5 (pelo agonista trans-ACPD), reduzindo a ativação dos receptores de citocinas pró-inflamatórias e canais TRPV1 e TRPA1 (Fig. 53B e C). Destacamos também que o fato do EEPp, ter características antioxidantes também contribui para o efeito analgésico da planta medicinal *Pterodon pubescens*. Tomados em conjunto, os nossos resultados indicam que EEPp pode apresentar importante e potente efeito terapêutico para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da dor aguda e crônica. Estudos adicionais são necessários para aprofundar o mecanismo de ação deste extrato, bem como fornecer subsídios para realização de ensaios clínicos controlados.

6 CONCLUSÕES

Resumidamente, as seguintes observações baseiam as conclusões deste trabalho:

- 1) O extrato dos frutos da *Pterodon pubescens* apresenta compostos fenólicos e flavonoides (6,67%) e uma composição rica em sesquiterpenos e diterpenos com esqueleto vouacapano, sendo 6 α -acetoxivouacapano, 6 α ,7 β -dimetoxivouacapan-17-eno, 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapano e 6 α ,7 β -diacetoxivouacapano os compostos majoritários;
- 2) O EEPp foi capaz de reduzir a nocicepção (dor) aguda e crônica em camundongos.
- 3) O efeito antinociceptivo do EEPp se deve, em parte, pelo bloqueio dos receptores glutamatérgicos do tipo ionotrópico (NMDA e cainato) e metabotrópico (mGLUR 1 e 5), além da inibição da sinalização mediada por citocinas pró-inflamatórias e por canais iônicos do tipo TRPV1 e TRPA1;
- 4) A administração diária do EEPp durante 10 dias não promoveu alterações macroscópicas de órgãos vitais (fígado, coração, baço, rins e pulmões), bem como de parâmetros bioquímicos no sangue, indicadores de toxicidade.
- 5) O EEPp apresenta boa atividade antioxidante avaliada por diferentes métodos que refletem a sua habilidade de reduzir o Fe³⁺ a Fe²⁺, complexar átomos de ferro e ainda doar átomos de hidrogênio para reduzir o radical livre DPPH à hidrazina.

Desta forma, o conjunto de resultados apresentados nesta dissertação fornece evidências inéditas na literatura sobre as propriedades analgésicas do extrato dos frutos de *Pterodon pubescens*. Ademais, podemos sugerir que o EEPp apresenta boa eficácia e relativa segurança para o tratamento da dor aguda e crônica, destacando o potencial terapêutico da planta medicinal *Pterodon pubescens* no desenvolvimento de um fitoterápico, especialmente para o tratamento da dor persistente. Assim, este estudo agrega novas evidências científicas e valoriza o uso popular desta espécie vegetal.

7 PERSPECTIVAS

- ✓ Aprofundar o estudo sobre os mecanismos de ação do EEPp, para outras moléculas endógenas que são diretamente relacionadas com o estado de dor aguda e crônica, dosando por exemplo a concentração na medula espinal das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α ; IL-1 β e IL-6) e anti-inflamatórias (IL-1RA e IL-10) no modelo de LPNI;
- ✓ Fazer análises bioquímicas *in vivo* para demonstrar mais claramente a função antioxidante do EEPp na dor, verificando por exemplo a concentração e atividade de agentes antioxidantes endógenos (SOD, CAT, GPx) entre outros;
- ✓ Avaliar através de um tratamento prologando (3 meses) com o EEPp as possíveis alterações toxicológicas em órgãos nobres e no sangue;
- ✓ Ampliar os estudos sobre a atividade analgésica do EEPp usando modelo experimental de artrite crônica, onde se faz o principal uso popular da planta;
- ✓ Utilizar drogas que inibem os receptores glutamatérgicos, bem como, TRPV1 e TRPA1, a fim de elucidar melhor o potencial terapêutico (potência e eficácia) do EEPp nestas vias discutidas no presente trabalho;
- ✓ Para aprofundar o estudo do mecanismo de ação do efeito antinociceptivo do EEPp, outras abordagens podem ser feitas no sentido de investigar outros mecanismos envolvidos no controle (ex: participação de canais de potássio) ou na indução da dor (ex: ativação de PKA e PKC, bem como outros mediadores inflamatórios, como bradicinina, prostaglandina e histamina);
- ✓ Investigar farmacologicamente os efeitos de uma fração enriquecida de compostos fenólicos da planta;
- ✓ Importantemente, extrapolando o estudo para humanos, levando em conta que a *Pterodon pubescens* é uma planta medicinal nativa do Brasil e já é utilizado há muito tempo pela população, seria interessante fazer um estudo em populações que já fazem uso desta espécie vegetal, a fim de encontrar indícios bioquímicos que elucidem cientificamente sua ação analgésica.

8 ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO RELACIONADO COM A DISSERTAÇÃO



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jep



Oleaginous extract from the fruits *Pterodon pubescens* Benth induces antinociception in animal models of acute and chronic pain

Catharina Nucci^a, Leidiane Mazzardo-Martins^b, Juliana Stramosk^c, Lizandra C. Brethanha^d,
Moacir G. Pizzolatti^d, Adair R.S. Santos^b, Daniel F. Martins^{a,b,c,*}

^a Curso de Naturologia Aplicada, Unidade de Articulação da Saúde, Universidade do Sul de Santa Catarina, Pedra Branca, Palhoça, SC, Brazil

^b Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Trindade, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil

^c Curso de Fisioterapia, Unidade de Articulação da Saúde, Universidade do Sul de Santa Catarina, Pedra Branca, Palhoça, SC, Brazil

^d Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Trindade, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil

REFERÊNCIAS

ABOUL-ENEIN, A., M. et al. Antioxidant Activity of Algal Extracts on Lipid Peroxidation. **Journal of Medical Sciences**, v. 3, n. 1, p. 87, 2003.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 1st. Carol Stream, Illinois, USA: Allured Publishing Corporation, 1995. 469 ISBN 0931710421.

AGRAWAL, S.G., EVANS, R.H. The primary afferent depolarizing action of kainate in the rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 87, n. 2, p. 345–355, 1986.

ALLEN, G.; GALER, B. S.; SCHWARTZ, L. Epidemiology of complex regional pain syndrome: a retrospective chart review of 134 patients. **Pain**, v. 80, n. 3, p. 539-44, abr. 1999.

ALLEN, K. J. et al. Iron-overload-related disease in HFE hereditary hemochromatosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 3, p. 221-30, fev. 2008.

ALMEIDA, F. R. C.; OLIVEIRA, F. S. Avaliação de drogas analgésicas de ação central. In: ALMEIDA, R. N. (Ed.). **Psicofarmacologia: Fundamentos Práticos**. 1. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. cap. 17, p.179-188. ISBN 9788527711111.

ALONSO, J. R. **Tratado de fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas**. 1. Buenos Aires: ISIS Ediciones, 1998. 1039 ISBN 9789879718100.

ANDRADE, E. L.; MEOTTI, F. C.; CALIXTO, J. B. TRPA1 antagonists as potential analgesic drugs. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 133, n. 2, p. 189-204, fev. 2012.

APFELBAUM, J. L. et al. Postoperative pain experience: results from a national survey suggest postoperative pain continues to be undermanaged. **Anesthesia & Analgesia**, v. 97, n. 2, p. 534-40, table of contents, ago. 2003.

ATTAL, N. et al. EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision. **European Journal of Neurology**, v. 17, n. 9, p. 1113-e88, set. 2010.

BADER, J. P.; HELL, D. [Psychic pain as a symptom of depression. Phenomenology and neurobiology]. **Fortschritte Der Neurologie Psychiatrie**, v. 68, n. 4, p. 158-68, abr. 2000.

BAGGIO, C. H. et al. 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. **Journal of Pain**, v. 11, n. 10, p. 965-71, out. 2010.

BARON, R. Mechanisms of disease: neuropathic pain--a clinical perspective. **Nature Clinical Practice Neurology**, v. 2, n. 2, p. 95-106, fev. 2006.

BASBAUM, A. I. Spinal mechanisms of acute and persistent pain. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, v. 24, n. 1, p. 59-67, jan-fev. 1999.

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

BATISTA, P. A. et al. Evidence for the involvement of ionotropic glutamatergic receptors on the antinociceptive effect of (-)-linalool in mice. **Neuroscience Letters**, v. 440, n. 3, p. 299-303, ago. 2008.

BAUTISTA, D. M.; PELLEGRINO, M.; TSUNOZAKI, M. TRPA1: A gatekeeper for inflammation. **Annual Review of Physiology**, v. 75, p. 181-200, 2013.

BEIRITH, A.; SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Research**, v. 924, n. 2, p. 219-28, jan. 2002.

BEIRITH, A.; SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B. The role of neuropeptides and capsaicin-sensitive fibres in glutamate-induced nociception and paw oedema in mice. **Brain Research**, v. 969, n. 1-2, p. 110-6, abr. 2003.

BENNETT, G. J.; XIE, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, v. 33, n. 1, p. 87-107, abr. 1988.

BESSAC, B. F. et al. TRPA1 is a major oxidant sensor in murine airway sensory neurons. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 5, p. 1899-910, maio 2008.

BESSON, J. M. The neurobiology of pain. **Lancet**, v. 353, n. 9164, p. 1610-5, maio 1999.

BESSON, J. M.; CHAOUCH, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. **Physiological Reviews**, v. 67, n. 1, p. 67-186, jan. 1987.

BETCHER, A. M.; CASTEN, D. F. Reflex sympathetic dystrophy: criteria for diagnosis and treatment. **Anesthesiology**, v. 16, n. 6, p. 994-1003, nov. 1955.

BLAKE, D. R. et al. Effect of a specific iron chelating agent on animal models of inflammation. **Annals of The Rheumatic Diseases**, v. 42, n. 1, p. 89-93, fev. 1983.

BLEICH, S. et al. Glutamate and the glutamate receptor system: a target for drug action. **International Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 18, n. Suppl 1, p. S33-40, set. 2003.

BOCCABELLA, A. V. et al. Influence of Hormones on Recovery of Electrical Activity of Crushed Sciatic Nerves in Hypophysectomized Rats. **Proceedings of The Society For Experimental Biology and Medicine**, v. 117, p. 800-3, dez. 1964.

BORTALANZA, L. B. et al. Anti-allodynic action of the tormentic acid, a triterpene isolated from plant, against neuropathic and inflammatory persistent pain in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 453, n. 2-3, p. 203-8, out. 2002.

BOUHASSIRA, D. et al. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. **Pain**, v. 136, n. 3, p. 380-7, jun. 2008.

BOXALL, S. J. et al. mGluR activation reveals a tonic NMDA component in inflammatory hyperalgesia. **Neuroreport**, v. 9, n. 6, p. 1201-3, abr. 1998.

BRAMBILLA, A. et al. Pharmacological characterization of AMPA-induced biting behaviour in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 305, n. 1-3, p. 115-7, jun. 1996.

BRATTI, T. **Caracterização comportamental, bioquímica e farmacológica e efeito da natação sobre o modelo experimental da síndrome da dor complexa regional tipo I em camundongos**. 2011. 107 Dissertação de Mestrado, UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

BRAZ FILHO, R.; GOTTLIEB, O. R.; VIEGAS ASSUMPCÃO, R. M. The isoflavones of *Pterodon pubescens*. **Phytochemistry**, v. 10, n. 11, p. 2835-2836, nov. 1971.

BREDESON, J. D.; KYM, P.R.; SZALLASI, A. Targeting TRP channels for pain relief. **European Journal of Pharmacology**, v. 716, p. 61-76, mar. 2013.

BRENNAN, T. J.; VANDERMEULEN, E. P.; GEBHART, G. F. Characterization of a rat model of incisional pain. **Pain**, v. 64, n. 3, p. 493-501, mar. 1996.

BRENNER, G. J. et al. Peripheral noxious stimulation induces phosphorylation of the NMDA receptor NR1 subunit at the PKC-dependent site, serine-896, in spinal cord dorsal horn neurons. **European Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 2, p. 375-84, jul. 2004.

BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. **Ciências farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí, SC: Ed. da UNIVALI, 2003. 239 ISBN 9788586447778.

BUCHANAN, B. B. et al. Natural Products (Secondary Metabolites). In: CROTEAU, R.;KUTCHAN, T. M., *et al* (Ed.). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Rockville, MD: American Society of plant physiologists, 2000. p.1250-1318. ISBN 0943088399.

BURGER, C. et al. Acute and subacute toxicity of the hydroalcoholic extract from *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (Asteraceae) in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 2, p. 370-3, 2005.

BUSTAMANTE, K. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto da casca da sucupira branca (*Pterodon emarginatus* Vogel)–Fabaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 12, n. 3, p. 341-345, 2010.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 2, p. 179-89, fev. 2000.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.

CALIXTO, J. B. et al. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 106, n. 2, p. 179-208, maio 2005.

CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA JUNIOR, J. M. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 78, n. 1, p. 98-106, 2008.

CALIXTO, N. O. et al. Antiplatelet activity of geranylgeraniol isolated from *Pterodon pubescens* fruit oil is mediated by inhibition of cyclooxygenase-1. **Planta Médica**, v. 73, n. 5, p. 480-3, maio 2007.

CAPPELLINI, M. D. et al. A phase 3 study of deferasirox (ICL670), a once-daily oral iron chelator, in patients with beta-thalassemia. **Blood**, v. 107, n. 9, p. 3455-62, maio 2006.

CARDOSO, C. C. et al. Suppression of T and B cell responses by *Pterodon pubescens* seeds ethanolic extract. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 19, p. 2308-13, out. 2008.

CARVALHO, J. C. et al. Anti-inflammatory activity of the crude extract from the fruits of *Pterodon emarginatus* Vog. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, n. 2, p. 127-33, fev. 1999.

CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto, SP: Tecmedd, 2004. 480 ISBN 9788586653087.

CATERINA, M. J. et al. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. **Science**, v. 288, n. 5464, p. 306-13, abr. 2000.

CATERINA, M. J. et al. A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. **Nature**, v. 398, n. 6726, p. 436-41, abr. 1999.

CATERINA, M. J. et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, n. 6653, p. 816-24, out. 1997.

CHALKLEY, J. E.; LANDER, C.; ROWLINGSON, J. C. Probable reflex sympathetic dystrophy of the penis. **Pain**, v. 25, n. 2, p. 223-5, maio 1986.

CHATURVEDI, R. K.; FLINT BEAL, M. Mitochondrial diseases of the brain. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 63, p. 1-29, out. 2013.

CHOI, Y. et al. Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. **Pain**, v. 59, n. 3, p. 369-76, dez. 1994.

CHONG, M. S.; BAJWA, Z. H. Diagnosis and treatment of neuropathic pain. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 25, n. 5 Suppl, p. S4-S11, maio 2003.

CHONG, Z. Z.; LI, F.; MAIESE, K. Oxidative stress in the brain: novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease. **Progress in Neurobiology**, v. 75, n. 3, p. 207-46, fev. 2005.

CHRISTENSEN, K.; JENSEN, E. M.; NOER, I. The reflex dystrophy syndrome response to treatment with systemic corticosteroids. **Acta Chirurgica Scandinavica**, v. 148, n. 8, p. 653-5, 1982.

CHU, Y. C. et al. Effect of genetic knockout or pharmacologic inhibition of neuronal nitric oxide synthase on complete Freund's adjuvant-induced persistent pain. **Pain**, v. 119, n. 1-3, p. 113-23, dez. 15 2005.

CHUNG, J. M. The role of reactive oxygen species (ROS) in persistent pain. **Molecular Interventions**, v. 4, n. 5, p. 248-50, out. 2004.

CIDRAL-FILHO, F. J. et al. Manual acupuncture inhibits mechanical hypersensitivity induced by spinal nerve ligation in rats. **Neuroscience**, v. 193, p. 370-6, out. 2011.

CIDRAL-FILHO, F. J. et al. Light-emitting diode therapy induces analgesia in a mouse model of postoperative pain through activation of peripheral opioid receptors and the L-arginine/nitric oxide pathway. **Lasers in Medical Science**, jul. 2013.

CODERRE, T. J. Complex regional pain syndrome: what's in a name? **Journal of Pain**, v. 12, n. 1, p. 2-12, jan. 2011.

CODERRE, T. J.; BENNETT, G. J. A hypothesis for the cause of complex regional pain syndrome-type I (reflex sympathetic dystrophy): pain due to deep-tissue microvascular pathology. **Pain Medicine**, v. 11, n. 8, p. 1224-38, ago. 2010.

CODERRE, T. J.; VAN EMPEL, I. The utility of excitatory amino acid (EAA) antagonists as analgesic agents. I. Comparison of the antinociceptive activity of various classes of EAA antagonists in mechanical, thermal and chemical nociceptive tests. **Pain**, v. 59, n. 3, p. 345-52, dez. 1994.

CODERRE, T. J. et al. Chronic post-ischemia pain (CPIP): a novel animal model of complex regional pain syndrome-type I (CRPS-I; reflex sympathetic dystrophy) produced by prolonged hindpaw ischemia and reperfusion in the rat. **Pain**, v. 112, n. 1-2, p. 94-105, nov. 2004.

COELHO, L. P. et al. Antinociceptive properties of ethanolic extract and fractions of *Pterodon pubescens* Benth. seeds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, n. 1-2, p. 109-16, abr. 2005.

COELHO, M. G. P. et al. Subacute toxicity evaluation of a hydroalcoholic extract of *Pterodon pubescens* seeds in mice with collagen-induced arthritis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, n. 2-3, p. 159-64, out. 2001.

COELHO, M. G. P.; SABINO, K. C.; DALMAU, S. R. Immunomodulatory effects of sucupira (*Pterodon pubescens*) seed infusion on collagen-induced arthritis. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 22, n. 2, p. 213-8, mar.-abr. 2004.

CONNIFF, R. **Looking for the next Viagra (Save the Planet-5)**. 2012. Disponível em: <<http://bit.ly/1kNKeSG>>. Acesso em: 11 fev. 2014

CORDON, F. C. O.; LEMONICA, L. Complex regional pain syndrome: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, diagnostic tests and therapeutic proposals. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, n. 5, p. 618-627, 2002.

CORDOVA, M. M. et al. Polysaccharide glucomannan isolated from *Heterodermia obscurata* attenuates acute and chronic pain in mice. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 2058-64, fev. 15 2013.

CORTRIGHT, D. N.; KRAUSE, J. E.; BROOM, D. C. TRP channels and pain. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1772, n. 8, p. 978-88, ago. 2007.

COUSINS, M. J.; POWER, I.; SMITH, G. 1996 Labat lecture: pain--a persistent problem. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, v. 25, n. 1, p. 6-21, jan-fev. 2000.

CRUZ-ORENGO, L. et al. Cutaneous nociception evoked by 15-delta PGJ2 via activation of ion channel TRPA1. **Molecular Pain**, v. 4, p. 30, 2008.

CRUZ, R. C. B. et al. Toxicity evaluation of *Cucurbita maxima* seed extract in mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 44, n. 4, p. 301-303, jun. 2006.

DA COSTA, D. S. et al. The involvement of the transient receptor potential A1 (TRPA1) in the maintenance of mechanical and cold hyperalgesia in persistent inflammation. **Pain**, v. 148, n. 3, p. 431-7, mar. 2010.

DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. **Progress in Neurobiology**, v. 65, n. 1, p. 1-105, set. 2001.

DE MORAES, W. F. et al. Triterpenes involved in the anti-inflammatory effect of ethanolic extract of *Pterodon emarginatus* Vogel stem bark. **Journal of Natural Medicines**, v. 66, n. 1, p. 202-7, jan. 2012.

DE OMENA, M. C. et al. Larvicidal diterpenes from *Pterodon polygalaeiflorus*. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 6, n. 2, p. 216-22, Summer 2006.

DE TOLEDO, C. E. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities of medicinal plants of the Brazilian cerrado, using Brazilian cachaca as extractor liquid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 420-5, jan. 2011.

DECOSTERD, I.; WOOLF, C. J. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. **Pain**, v. 87, n. 2, p. 149-58, ago. 2000.

DEL CAMINO, D. et al. TRPA1 contributes to cold hypersensitivity. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 45, p. 15165-74, nov. 2010.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 3. Chichester, West Sussex, UK: John Wiley & Sons Ltd., 2009. 546 ISBN 9780470742792.

DI STASI, L. C. Química de Produtos Naturais. In: DI STASI, L. C. (Ed.). **Plantas Mediciniais: Arte e Ciência: Um Guia de Estudo Interdisciplinar**. São Paulo: UNESP Editora, 1996. p.109-127. ISBN 9788571391178.

DIAS FDA, L. et al. Genotoxicity of the natural cercaricides "sucupira" oil and eremanthine in mammalian cells in vitro and in vivo. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 26, n. 4, p. 338-44, 1995.

DIZDAROGLU, M. et al. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 32, n. 11, p. 1102-15, jun. 2002.

DOAK, G. J.; SAWYNOK, J. Formalin-induced nociceptive behavior and edema: involvement of multiple peripheral 5-hydroxytryptamine receptor subtypes. **Neuroscience**, v. 80, n. 3, p. 939-49, out. 1997.

DOSANI, A. et al. Unusual presentation of sciatica in a 14-year-old girl. **Injury**, v. 35, n. 10, p. 1071-2, out. 2004.

DRAY, A. Peripheral Mediators of Pain. In: DICKENSON, A. H.; BESSON, J. M. R., *et al* (Ed.). **The Pharmacology of Pain**. Verlag, Berlin: Springer, v.130, 1997. p.21-41. ISBN 9783540627852.

DRAY, A. Neuropathic pain: emerging treatments. **British Journal of Anaesthesia**, v. 101, n. 1, p. 48-58, jul. 2008.

DUARTE, I. D.; FERREIRA-ALVES, D. L.; NAKAMURA-CRAIG, M. Possible participation of endogenous opioid peptides on the mechanism involved in analgesia induced by vouacapan. **Life Sciences**, v. 50, n. 12, p. 891-7, 1992.

DUARTE, I. D. et al. Evidence of the involvement of biogenic amines in the antinociceptive effect of a vouacapan extracted from *Pterodon polygalaeflorus* Benth. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 55, n. 1, p. 13-8, dez. 1996.

DUGAN, L.; KIM-HAN, J. S. Hypoxic-ischemic brain injury and oxidative stress. In: BRADY, S. T.; SIEGEL, G. J., *et al* (Ed.). **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. 7**: Academic Press, 2006. p.559-573. ISBN 9780080472072.

DUTRA, R. C. et al. Antimicrobial and leishmanicidal activities of seeds of *Pterodon emarginatus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2A, p. 429-435, 2009a.

DUTRA, R. C. et al. Antiulcerogenic and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Pterodon emarginatus* seeds. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, n. 2, p. 243-50, fev. 2009b.

DUTRA, R. C.; LEITE, M. N.; BARBOSA, N. R. Quantification of phenolic constituents and antioxidant activity of *Pterodon emarginatus* Vogel seeds. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 4, p. 606-14, abr. 2008.

DUTRA, R. C. et al. Chemical composition and cytotoxicity activity of the essential oil of *Pterodon emarginatus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n. AHEAD, p. 0-0, 2012.

DUTRA, R. C. et al. Efeito Cicatrizante das Sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel em Modelos de Úlceras Dérmicas Experimentais em Coelho. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 3, p. 375-82, 2009c.

DUTRA, R. C. et al. Anti-nociceptive activity of the essential oil and fractions of *Pterodon emarginatus* Vogel seeds. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 6, p. 865-870, 2008.

DWORKIN, R. H. et al. Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. **Archives of Neurology**, v. 60, n. 11, p. 1524-34, nov. 2003.

ECKERT, W. A., 3RD; JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Differential contribution of TRPV1 to thermal responses and tissue injury-induced sensitization of dorsal horn neurons in laminae I and V in the mouse. **Pain**, v. 126, n. 1-3, p. 184-97, dez. 15 2006.

EID, S. R. et al. HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathy-induced mechanical hypersensitivity. **Molecular Pain**, v. 4, p. 48, 2008.

EISENBERG, E. et al. Serum and salivary oxidative analysis in Complex Regional Pain Syndrome. **Pain**, v. 138, n. 1, p. 226-32, ago. 2008.

ELSBACH, P.; WEISS, J. A reevaluation of the roles of the O₂-dependent and O₂-independent microbicidal systems of phagocytes. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 5, n. 5, p. 843-53, set.-out. 1983.

EUZEBIO, F. P. et al. Effect of 6 alpha,7 beta-dihydroxyvouacapan-17 beta-oic acid and its lactone derivatives on the growth of human cancer cells. **Bioorganic Chemistry**, v. 37, n. 3, p. 96-100, jun. 2009.

EVANGELISTA, G. L. et al. Essential oil of *Pterodon polygalaeflorus* inhibits electromechanical coupling on rat isolated trachea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 3, p. 515-22, fev. 2007.

EVORA, P. R. B. et al. Atualização: Lesão de isquemia e reperfusão. Aspectos fisiopatológicos e a importância da função endotelial. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 4, n. 66, p. 239, 1996.

FANGER, C. M.; DEL CAMINO, D.; MORAN, M. M. TRPA1 as an analgesic target. **The Open Drug Discovery Journal**, v. 2, p. 63-69, 2010.

FASCIO, M. et al. Diterpenoid Furans from *Pterodon* Species. **Phytochemistry**, v. 15, n. 1, p. 201-203, 1976.

FELIU, M. H.; EDWARDS, C. L. Psychologic factors in the development of complex regional pain syndrome: history, myth, and evidence. **Clinical Journal of Pain**, v. 26, n. 3, p. 258-63, mar.-abr. 2010.

FERREIRA, J.; SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B. The role of systemic, spinal and supraspinal L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway in thermal hyperalgesia caused by intrathecal injection of glutamate in mice. **Neuropharmacology**, v. 38, n. 6, p. 835-42, jun. 1999.

FERREIRA, R. A. et al. Morfologia da semente e de plântulas e avaliação da viabilidade da semente de sucupira-branca (*Pterodon pubescens* Benth.-Fabaceae) pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 1, p. 108-115, 2001.

FISHER, K.; CODERRE, T. J. The contribution of metabotropic glutamate receptors (mGluRs) to formalin-induced nociception. **Pain**, v. 68, n. 2-3, p. 255-63, dez. 1996.

FONSECA, N. M. et al. Abordagem simplificada do nervo ciático por via posterior, no ponto médio do sulco glúteo-femoral, com uso de neuroestimulador. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, p. 764-73, 2002.

FOTI, M. C.; DAQUINO, C.; GERACI, C. Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH(*) radical in alcoholic solutions. **Journal of Organic Chemistry**, v. 69, n. 7, p. 2309-14, abr. 2004.

FRANCHINI, M. Hereditary iron overload: update on pathophysiology, diagnosis, and treatment. **American Journal of Hematology**, v. 81, n. 3, p. 202-9, mar. 2006.

FREITAS, C. S. et al. Involvement of glutamate and cytokine pathways on antinociceptive effect of *Pfaffia glomerata* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, n. 3, p. 468-72, abr. 2009.

FRIDOVICH, I. Oxygen: how do we stand it? **Medical Principles and Practice**, v. 22, n. 2, p. 131-7, 2013.

FUNDYTUS, M. E. Glutamate receptors and nociception: implications for the drug treatment of pain. **CNS Drugs**, v. 15, n. 1, p. 29-58, jan. 2001.

GADOTTI, V. M. et al. Diacerein decreases visceral pain through inhibition of glutamatergic neurotransmission and cytokine signaling in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 102, n. 4, p. 549-54, out. 2012.

GADOTTI, V. M. et al. Contribution of spinal glutamatergic receptors to the antinociception caused by agmatine in mice. **Brain Research**, v. 1093, n. 1, p. 116-22, jun. 2006.

GALCERAN, C. B. et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of 6 α ,7 β -dihydroxy-vouacapan-17 β -oic acid isolated from *Pterodon emarginatus* Vog. fruits. **Inflammopharmacology**, v. 19, n. 3, p. 139-43, jun. 2011.

GANGADHARAN, V.; KUNER, R. Pain hypersensitivity mechanisms at a glance. **Disease Models & Mechanisms**, v. 6, n. 4, p. 889-95, jul. 2013.

GAO X. et al. Reactive oxygen species (ROS) are involved in enhancement of NMDA-receptor phosphorylation in animal models of pain. **Pain**, v. 131, p. 262-271, 2007.

GECHEV, T. et al. Hydrogen peroxide protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, n. 4, p. 708-14, abr. 2002.

GHASEMI, K.; GHASEMI, Y.; EBRAHIMZADEH, M. A. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 22, n. 3, p. 277-81, jul. 2009.

GORRINI, C.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 12, p. 931-47, dez. 2013.

GOUDET, C. et al. Metabotropic receptors for glutamate and GABA in pain. **Brain Research Reviews**, v. 60, n. 1, p. 43-56, abr. 2009.

GREEN, B. G.; HAYES, J. E. Individual differences in perception of bitterness from capsaicin, piperine and zingerone. **Chemical Senses**, v. 29, n. 1, p. 53-60, jan. 2004.

GULCIN, I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). **Toxicology**, v. 217, n. 2-3, p. 213-20, jan. 2006.

GUO, Q. et al. Studies on protective mechanisms of four components of green tea polyphenols against lipid peroxidation in synaptosomes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1304, n. 3, p. 210-22, dez. 13 1996.

HAAS, H. History of antipyretic analgesic therapy. **American Journal of Medicine**, v. 75, n. 5A, p. 1-3, nov. 1983.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 312-322, 2006.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? **Biochemical Journal**, v. 401, n. 1, p. 1-11, jan. 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4. New York: Oxford University Press, 2007. 888 ISBN 9780198568698.

HARTMANN, T. From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22-24, p. 2831-46, nov.-dez. 2007.

HAZIM, A. I. et al. Anxiolytic-like effects of mitragynine in the open-field and elevated plus-maze tests in rats. **Journal of Physiological Sciences**. jan. 2014.

HILL, R. G. Molecular basis for the perception of pain. **Neuroscientist**, v. 7, n. 4, p. 282-92, ago. 2001.

HOGAN, Q. Animal pain models. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, v. 27, n. 4, p. 385-401, jul.-ago. 2002.

HOSCHEID, J. et al. Inhibitory Effect of the Hexane Fraction of the Ethanolic Extract of the Fruits of *Pterodon pubescens* Benth in Acute and Chronic Inflammation. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 272795, 2013.

HOSCHEID, J. et al. Determination by GC-MS-SIM of furanoditerpenes in *Pterodon pubescens* Benth.: development and validation. **Talanta**, v. 100, p. 372-6, out. 2012.

HSIEH, H. L.; YANG, C. M. Role of Redox Signaling in Neuroinflammation and Neurodegenerative Diseases. **Biomed Research International**, v. 2013, p. 484613, 2013.

HU, H. J.; BHAVE, G.; GEREAU, R. W. T. Prostaglandin and protein kinase A-dependent modulation of vanilloid receptor function by metabotropic glutamate receptor 5: potential mechanism for thermal hyperalgesia. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 17, p. 7444-52, set. 2002.

HUANG, J.; ZHANG, X.; MCNAUGHTON, P. A. Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia. **Current Neuropharmacology**, v. 4, n. 3, p. 197-206, jul. 2006.

HUDSPITH, M. J. Glutamate: a role in normal brain function, anaesthesia, analgesia and CNS injury. **British Journal of Anaesthesia**, v. 78, n. 6, p. 731-47, jun. 1997.

HUETTNER, J.E. Glutamate receptor channels in rat DRG neurons: activation by kainate and quisqualate and blockade of desensitization by Con A. **Neuron**, v. 5, n. 3, p. 255-266, 1990.

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

HUNTLEY, L. **Morton's Neuroma** - Home and Lifestyle Remedies. 2011. Disponível em: <<http://bit.ly/1dhfTvT>>. Acesso em: 12 fev. 2014.

HYLDEN, J. L.; WILCOX, G. L. Intrathecal morphine in mice: a new technique. **European Journal of Pharmacology**, v. 67, n. 2-3, p. 313-6, out. 1980.

IRVING, G. A. Contemporary assessment and management of neuropathic pain. **Neurology**, v. 64, n. 12 Suppl 3, p. S21-7, jun. 2005.

JANES K., NEUMANN W. L., SALVEMINI D. Anti-superoxide and anti-peroxynitrite strategies in pain suppression. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v. 1822, n. 5, p. 815-821, maio 2012.

JAQUEMAR, D.; SCHENKER, T.; TRUEB, B. An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 11, p. 7325-33, mar. 1999.

Ji, R. R.; STRICHARTZ, G. Cell signaling and the genesis of neuropathic pain. **Science Signaling**, v. 2004, n. 252, p. reE14, set. 2004.

Ji, R. R.; WOOLF, C. J. Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. **Neurobiology of Disease**, v. 8, n. 1, p. 1-10, fev. 2001.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1993. 777

JORDT, S. E.; JULIUS, D. Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers. **Cell**, v. 108, n. 3, p. 421-30, fev. 2002.

JULIUS, D. TRP channels and pain. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 29, p. 355-84, 2013.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-10, set. 2001.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M. **Princípios da Neurociência**. 4. São Paulo: Manole, 2003. 1412 ISBN 9788520412817.

KATZ, N. et al. [Chemoprophylactic activity on Schistosomiasis mansoni of soaps containing essential oil from the fruits of *Pterodon pubescens*]. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 35, n. 2, p. 183-91, mar.-abr. 1993.

KERCHNER, G. A. et al. Presynaptic kainate receptors regulate spinal sensory transmission. **Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 1, p. 59-66, jan. 2001.

KHALIL, Z.; KHODR, B. A role for free radicals and nitric oxide in delayed recovery in aged rats with chronic constriction nerve injury. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 4, p. 430-9, ago. 2001.

KIM, H. K. et al. Analgesic effect of vitamin E is mediated by reducing central sensitization in neuropathic pain. **Pain**, v. 122, n. 1-2, p. 53-62, maio 2006.

KIM, H. K. et al. Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. **Pain**, v. 111, n. 1-2, p. 116-24, set. 2004.

KIM, S. H.; CHUNG, J. M. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. **Pain**, v. 50, n. 3, p. 355-63, set. 1992.

KING-DIAZ, B. et al. A diterpene gamma-lactone derivative from *Pterodon polygalaeflorus* Benth. as a photosystem II inhibitor and uncoupler of photosynthesis. **Zeitschrift Fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences**, v. 61, n. 3-4, p. 227-33, mar.-abr. 2006.

KLAFKE, J. Z. et al. Involvement of the glutamatergic system in the nociception induced intrathecally for a TRPA1 agonist in rats. **Neuroscience**, v. 222, p. 136-46, out. 2012.

KLEINSCHNITZ, C. et al. The extent of cytokine induction in peripheral nerve lesions depends on the mode of injury and NMDA receptor signaling. **Journal of Neuroimmunology**, v. 149, n. 1-2, p. 77-83, abr. 2004.

KLUSAKOVA, I.; DUBOVY, P. Experimental models of peripheral neuropathic pain based on traumatic nerve injuries - an anatomical perspective. **Annals of Anatomy**, v. 191, n. 3, p. 248-59, jun. 2009.

KOBAYASHI, K. et al. Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with A δ /C-fibers and colocalization with Trk receptors. **Journal of Comparative Neurology**, v. 493, n. 4, p. 596-606, dez. 26 2005.

KOBAYASHI, S.; YOSHIZAWA, H.; YAMADA, S. Pathology of lumbar nerve root compression. Part 2: morphological and immunohistochemical changes of dorsal root ganglion. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 22, n. 1, p. 180-8, jan. 2004.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 3, p. 206-20, mar. 2005.

KOHNO, T. et al. Bradykinin enhances AMPA and NMDA receptor activity in spinal cord dorsal horn neurons by activating multiple kinases to produce pain hypersensitivity. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 17, p. 4533-40, abr. 2008.

KOROVESSIS, P. et al. Low back pain and sciatica prevalence and intensity reported in a Mediterranean country: ordinal logistic regression analysis. **Orthopedics**, v. 35, n. 12, p. e1775-84, dez. 2012.

KOSUGI, M. et al. Activation of TRPA1 channel facilitates excitatory synaptic transmission in substantia gelatinosa neurons of the adult rat spinal cord. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 16, p. 4443-51, abr. 2007.

LAFERRIERE, A. et al. Cutaneous tactile allodynia associated with microvascular dysfunction in muscle. **Molecular Pain**, v. 4, p. 49, 2008.

LEE, C. J. et al. Functional expression of AMPA receptors on central terminals of rat dorsal root ganglion neurons and presynaptic inhibition of glutamate release. **Neuron**, v. 35, n. 1, p. 135-46, jul. 2002.

LEE, I. et al. The role of reactive oxygen species in capsaicin-induced mechanical hyperalgesia and in the activities of dorsal horn neurons. **Pain**, v. 133, n. 1-3, p. 9-17, dez. 15 2007.

LEONHARDT, V. et al. Antispasmodic effects of essential oil of *Pterodon polygalaeiflorus* and its main constituent beta-caryophyllene on rat isolated ileum. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 24, n. 6, p. 749-58, dez. 2010.

LEVINE, J. D.; ALESSANDRI-HABER, N. TRP channels: targets for the relief of pain. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1772, n. 8, p. 989-1003, ago. 2007.

LEWIS, G. P. **Legumes of Bahia**. Royal Botanic Gardens, Kew, 1987.

LI, L. et al. Effect of lumbar 5 ventral root transection on pain behaviors: a novel rat model for neuropathic pain without axotomy of primary sensory neurons. **Experimental Neurology**, v. 175, n. 1, p. 23-34, maio 2002.

LIEDTKE, W. Role of TRPV ion channels in sensory transduction of osmotic stimuli in mammals. **Experimental Physiology**, v. 92, n. 3, p. 507-12, maio 2007.

LIU, H. et al. Evidence for presynaptic N-methyl-D-aspartate autoreceptors in the spinal cord dorsal horn. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America**, v. 91, n. 18, p. 8383-7, ago. 1994.

LOESER, J. D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **Lancet**, v. 353, n. 9164, p. 1607-9, maio 1999.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 473-7, jul. 2008.

LOMBARD, M. C. et al. Deafferentation hypersensitivity in the rat after dorsal rhizotomy: a possible animal model of chronic pain. **Pain**, v. 6, n. 2, p. 163-74, abr. 1979.

LONGHI-BALBINOT, D. T. et al. Spinal antinociception evoked by the triterpene 3β , 6β , 16β -trihydroxylup-20(29)-ene in mice: evidence for the involvement of the glutamatergic system via NMDA and metabotropic glutamate receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 623, n. 1-3, p. 30-6, nov. 2009.

LOPES, G. K.; SCHULMAN, H. M.; HERMES-LIMA, M. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1472, n. 1-2, p. 142-52, out. 1999.

LORENZI, H. J. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 4. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002. 368 ISBN 9788586714146.

LORENZI, H. J.; DE ABREU MATOS, F. J. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2008. 544 ISBN 9788586714283.

LUTFY, K. et al. Antinociceptive effects of NMDA and non-NMDA receptor antagonists in the tail flick test in mice. **Pain**, v. 70, n. 1, p. 31-40, mar. 1997.

MA, Y. et al. Chelating agents for the treatment of systemic iron overload. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 17, p. 2816-27, 2012.

MAHAJAN, J. R.; MONTEIRO, M. B. New diterpenoids from *Pterodon emarginatus* Vog. **Journal of The Chemical Society-Perkin Transactions 1**, v. 5, p. 520-5, 1973.

MAIHOFNER, C.; SEIFERT, F.; MARKOVIC, K. Complex regional pain syndromes: new pathophysiological concepts and therapies. **European Journal of Neurology**, v. 17, n. 5, p. 649-60, maio 2010.

MALMBERG, A. B.; BASBAUM, A. I. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. **Pain**, v. 76, n. 1-2, p. 215-22, maio 1998.

MALMBERG, A. B.; YAKSH, T. L. Antinociceptive actions of spinal nonsteroidal anti-inflammatory agents on the formalin test in the rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 263, n. 1, p. 136-46, out. 1992.

MARINELLI, S. et al. Capsaicin activation of glutamatergic synaptic transmission in the rat locus coeruleus in vitro. **The Journal of Physiology**, v. 543, n. Pt 2, p. 531-40, set. 2002.

MARKS, D. M. et al. Serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors for pain control: premise and promise. **Current Neuropharmacology**, v. 7, n. 4, p. 331-6, dez. 2009.

MARQUES, D. D. et al. Isoflavonoids and triterpenoids isolated from *Pterodon polygalaeflorus*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 9, p. 295-301, maio 1998.

MARTINS, D. F. et al. Peripheral and spinal activation of cannabinoid receptors by joint mobilization alleviates postoperative pain in mice. **Neuroscience**, v. 255, p. 110-121, dez. 2013a.

MARTINS, et al. Ankle Joint Mobilization Affects Postoperative Pain Through Peripheral and Central Adenosine A1 Receptors. **Physical Therapy**, v. 93, p. 401-412, 2013b.

MARTINS, D. F. et al. High-intensity swimming exercise reduces neuropathic pain in an animal model of complex regional pain syndrome type I: evidence for a role of the adenosinergic system. **Neuroscience**, v. 234, p. 69-76, mar. 2013c.

MARTINS, D. F., et al. Ankle Joint Mobilization Decreases Hypersensitivity by Activation of Peripheral Opioid Receptors in a Mouse Model of Postoperative Pain. **Pain Medicine**, v. 13, p. 1049-1058, 2012.

MARTINS, D. F. et al. The antinociceptive effects of AR-A014418, a selective inhibitor of glycogen synthase kinase-3 beta, in mice. **Journal of Pain**, v. 12, n. 3, p. 315-22, mar. 2011.

MAZARIO, J.; BASBAUM, A. I. Contribution of substance P and neurokinin A to the differential injury-induced thermal and mechanical responsiveness of lamina I and V neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 4, p. 762-70, jan. 2007.

MAZZARDO-MARTINS, L. et al. Glycogen synthase kinase 3-specific inhibitor AR-A014418 decreases neuropathic pain in mice: evidence for the mechanisms of action. **Neuroscience**, v. 226, p. 411-20, dez. 2012.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049-55, nov. 1969.

MCNAMARA, C. R. et al. TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America**, v. 104, n. 33, p. 13525-30, ago. 2007.

MELZACK, R.; KATZ, J.; CODERRE, T. J. Methods of postoperative pain control. **Cah Anesthesiol**, v. 40, n. 5, p. 309-15, 1992.

MENNA-BARRETO, R. F. et al. Anti-Trypanosoma cruzi activity of *Pterodon pubescens* seed oil: geranylgeraniol as the major bioactive component. **Parasitology Research**, v. 103, n. 1, p. 111-7, jun. 2008.

MEOTTI, F. C.; COELHO IDOS, S.; SANTOS, A. R. The nociception induced by glutamate in mice is potentiated by protons released into the solution. **Journal of Pain**, v. 11, n. 6, p. 570-8, jun. 2010.

MIGUEL JR., A. **Dor ombro e braço - Atrofia de Sudeck / Síndrome Dolorosa Complexa Regional (SDCR)**. jul/2013 2013. Disponível em: <<http://bit.ly/1pgEKji>>. Acesso em: 11 fev. 2014.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, v. 57, n. 1, p. 1-164, jan. 1999.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, v. 66, n. 6, p. 355-474, abr. 2002.

MILLECAMPS, M. et al. Role of peripheral endothelin receptors in an animal model of complex regional pain syndrome type 1 (CRPS-I). **Pain**, v. 151, n. 1, p. 174-83, out. 2010.

MILLER, K. E. et al. Organization of glutamate-like immunoreactivity in the rat superficial dorsal horn: light and electron microscopic observations. **Synapse**, v. 2, n. 1, p. 28-36, 1988.

MIRANDA, M. L. D. et al. Sesquiterpenos e outros constituintes das folhas de *Pterodon pubescens* Benth (Leguminosae). **Química Nova**, v. XY, p. 1-4, 2013, No prelo.

MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: an evolving role in future drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4769-807, out. 2011.

MIXTER, W. J.; BARR, J. S. Rupture of the intervertebral disc with involvement of the spinal canal. **The New England Journal of Medicine**, v. 211, n. 5, p. 210-4, 1934.

MORAN, M. M. et al. Transient receptor potential channels as therapeutic targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 8, p. 601-20, ago. 2011.

MORÉ, A. O. et al. Caffeine at Moderate Doses Can Inhibit Acupuncture-Induced Analgesia in a Mouse Model of Postoperative Pain. **Journal of Caffeine Research**, v. 3, p. 143-148, 2013.

MORS, W. B. et al. Chemoprophylactic agent in schistosomiasis: 14,15-epoxygeranylgeraniol. **Science**, v. 157, n. 3791, p. 950-1, ago. 1967.

MOULIN, D. E. et al. Pharmacological management of chronic neuropathic pain - consensus statement and guidelines from the Canadian Pain Society. **Pain Research & Management**, v. 12, n. 1, p. 13-21, Spring 2007.

NABAVI, S. M. et al. In vitro antioxidant activity of *Phytolacca americana* berries. **Pharmacologyonline**, v. 1, p. 81-88, 2009.

NABAVI, S. M. et al. Determination of antioxidant activity, phenol and flavonoid content of *Parrotia persica* Mey. **Pharmacologyonline**, v. 2, p. 560-567, 2008.

NATIVI, C. et al. A TRPA1 antagonist reverts oxaliplatin-induced neuropathic pain. **Scientific Reports**, v. 3, p. 2005, 2013.

NEGRELLI, W. F. Hérnia discal: Procedimentos de tratamento. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 9, p. 39-45, 2001.

NILIUS, B. et al. Transient receptor potential cation channels in disease. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 1, p. 165-217, jan. 2007.

NISHIO, N. et al. Reactive oxygen species enhance excitatory synaptic transmission in rat spinal dorsal horn neurons by activating TRPA1 and TRPV1 channels. **Neuroscience**, v. 247, p. 201-12, set. 2013.

NUCCI, C. et al. Oleaginous extract from the fruits *Pterodon pubescens* Benth induces antinociception in animal models of acute and chronic pain. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 1, p. 170-8, ago. 2012.

NUNAN, E. A. et al. Furane Diterpenes with Anti-Inflammatory and Pro-Inflammatory Activity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 15, n. 6, p. 450-450, 1982.

OBATA, H. et al. Monoamine-dependent, opioid-independent antihypersensitivity effects of intrathecally administered milnacipran, a serotonin noradrenaline reuptake inhibitor, in a postoperative pain model in rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 334, n. 3, p. 1059-65, set. 2010.

OBATA, K. et al. TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 9, p. 2393-401, set. 2005.

OHKUBO, T. et al. Roles of substance P and somatostatin on transmission of nociceptive information induced by formalin in spinal cord. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 252, n. 3, p. 1261-8, mar. 1990.

OLIVEIRA, S. M. et al. Involvement of mast cells in a mouse model of postoperative pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 672, n. 1-3, p. 88-95, dez. 2011.

OLUYOMI, A. O.; HART, S. L.; SMITH, T. W. Differential antinociceptive effects of morphine and methylnorphine in the formalin test. **Pain**, v. 49, n. 3, p. 415-8, jun. 1992.

ONAIVI, E. S. et al. Comparison of behavioral and central BDZ binding profile in three rat lines. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 43, n. 3, p. 825-31, nov. 1992.

OTROKA. **Síndrome de dor regional complexa**. 2014. Disponível em: <nt.estiga.com/sindrome-de-dor-regional-complexa-4>. Acesso em: 10 fev. 2014.

OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Progress in Neurobiology**, v. 54, n. 5, p. 581-618, abr. 1998.

PARADA, C. A. et al. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. **Neuroscience**, v. 102, n. 4, p. 937-44, 2001.

PARK, E. S. et al. Levels of mitochondrial reactive oxygen species increase in rat neuropathic spinal dorsal horn neurons. **Neuroscience Letters**, v. 391, n. 3, p. 108-11, jan. 2006.

PARK, J. M. et al. Antiallodynic effects of vitamin C and vitamin E in chronic post-ischemia pain rat model. **Korean Journal of Anesthesiology**, v. 65, n. 5, p. 442-8, nov. 2013.

PARSONS, C. G. NMDA receptors as targets for drug action in neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 429, n. 1-3, p. 71-8, out. 2001.

PAULA, F. B. et al. Protective action of a hexane crude extract of *Pterodon emarginatus* fruits against oxidative and nitrosative stress induced by acute exercise in rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, p. 17, 2005.

PEREIRA, D. M. et al. Phenolics: From Chemistry to Biology. **Molecules**, v. 14, n. 6, p. 2202-2211, jun. 2009.

PEREIRA, M. F. et al. Terpenic subfraction of *Pterodon pubescens* induces apoptosis of K562 leukemic cells by modulating gene expression. **Oncology Reports**, v. 25, n. 1, p. 215-21, jan. 2011.

PEREIRA, M. F. et al. Terpenic fraction of *Pterodon pubescens* inhibits nuclear factor kappa B and extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 activation and deregulates gene expression in leukemia cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, p. 231, 2012.

PEREIRA, M. F. et al. *Pterodon pubescens* seed extract induces the cell cycle arrest of leukemic cells by deregulating cyclin D1 and E2 mRNA levels. **Oncology Letters**, v. 1, n. 3, p. 533-536, maio 2010.

PERTUSA, M. et al. Mutagenesis and Temperature-Sensitive Little Machines. In: MISHRA, R. (Ed.). **Biochemistry, Genetics and Molecular Biology**. Valparaíso: Universidad de Santiago de Chile, 2012. cap. 11, (Mutagenesis). ISBN 978-953-51-0707-1.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984. 646

PITCHER, G. M.; HENRY, J. L. Nociceptive response to innocuous mechanical stimulation is mediated via myelinated afferents and NK-1 receptor activation in a rat model of neuropathic pain. **Experimental Neurology**, v. 186, n. 2, p. 173-97, abr. 2004.

POGATZKI-ZAHN, E. M. et al. Heat hyperalgesia after incision requires TRPV1 and is distinct from pure inflammatory pain. **Pain**, v. 115, n. 3, p. 296-307, jun. 2005.

POGATZKI, E. M.; RAJA, S. N. A mouse model of incisional pain. **Anesthesiology**, v. 99, n. 4, p. 1023-7, out. 2003.

POLLIER, J.; MOSES, T.; GOOSSENS, A. Combinatorial biosynthesis in plants: a (p)review on its potential and future exploitation. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 12, p. 1897-916, nov. 2011.

POPOLI, M. et al. The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 13, p. 22-37, jan. 2012.

PRASAD, K. N. et al. Flavonoid contents and antioxidant activities from Cinnamomum species. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 10, n. 4, p. 627-632, out. 2009.

PREMKUMAR, L. S.; ABOOJ, M. TRP channels and analgesia. **Life Sciences**, v. 92, n. 8-9, p. 415-24, mar. 2013.

PRETORIUS, E. et al. Profound morphological changes in the erythrocytes and fibrin networks of patients with hemochromatosis or with hyperferritinemia, and their normalization by iron chelators and other agents. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e85271, 2014.

PRICE, M. L.; BUTLER, L. G. Rapid Visual Estimation and Spectrophotometric Determination of Tannin Content of Sorghum Grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 25, n. 6, p. 1268-1273, 1977.

QUINTAO, N. L. et al. Long-lasting neuropathic pain induced by brachial plexus injury in mice: Role triggered by the pro-inflammatory cytokine, tumour necrosis factor alpha. **Neuropharmacology**, v. 50, n. 5, p. 614-20, abr. 2006.

RAO, K. S. Free radical induced oxidative damage to DNA: relation to brain aging and neurological disorders. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 46, n. 1, p. 9-15, fev. 2009.

RESENDE, M. D. L. F.; GUIMARÃES, L. D. L. Inventários da biodiversidade do bioma Cerrado: biogeografia de plantas. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro, 14p, 2007.**

RICHMOND, C. E.; BROMLEY, L. M.; WOOLF, C. J. Preoperative morphine pre-empts postoperative pain. **Lancet**, v. 342, n. 8863, p. 73-5, jul. 1993.

RIEDEL, W.; NEECK, G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. **Zeitschrift Fur Rheumatologie**, v. 60, n. 6, p. 404-15, dez. 2001.

RISHTON, G. M. Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present day issues. **American Journal of Cardiology**, v. 101, n. 10A, p. 43D-49D, maio 2008.

ROBBINS, S. L. et al. **Patologia Estrutural e Funcional**. 6. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1251 ISBN 9788527706360.

ROCHA, D. M. S. **Aspectos taxonomicos, geneticos e reprodutivos de *Pterodon pubescens* (Benth.) Benth. e *P. emarginatus* Vog. (Leguminosae, Dipteryxaceae)**. 2006. Tese de Doutorado, UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

ROCHA, F. F. et al. Evaluation of antinociceptive and antiinflammatory effects of *Croton pullei* var. *glabrior* Lanj.(Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 344-349, 2008.

RODRIGUES, A. L. et al. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. **Life Sciences**, v. 70, n. 12, p. 1347-58, fev. 2002.

ROSA, K. A. et al. Evidence for the involvement of glutamatergic system in the antinociceptive effect of ascorbic acid. **Neuroscience Letters**, v. 381, n. 1-2, p. 185-8, jun. 2005.

ROVER JÚNIOR, L. et al. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, p. 112-119, fev. 2001.

SA, K. N. et al. Chronic pain and gender in Salvador population, Brazil. **Pain**, v. 139, n. 3, p. 498-506, out. 2008.

SAARTO, T.; WIFFEN, P. J. Antidepressants for neuropathic pain. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 4, p. CD005454, 2007.

SABINO, K. C. et al. Successful treatment of collagen-induced arthritis in mice with a hydroalcohol extract of seeds of *Pterodon pubescens*. **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 7, p. 613-5, nov. 1999a.

SABINO, K. C. et al. In vitro and in vivo toxicological study of the *Pterodon pubescens* seed oil. **Toxicology Letters**, v. 108, n. 1, p. 27-35, jul. 1999b.

SAKURADA, T. et al. The effects of substance P analogues on the scratching, biting and licking response induced by intrathecal injection of N-methyl-D-aspartate in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 101, n. 2, p. 307-10, out. 1990.

SAKURADA, T. et al. Involvement of nitric oxide in spinally mediated capsaicin- and glutamate-induced behavioural responses in the mouse. **Neurochemistry International**, v. 29, n. 3, p. 271-8, set. 1996.

SALT, T. **Properties of Glutamate Receptors**. Neurotransmitters in Sensory Systems, London, 2006. Disponível em: <<http://bit.ly/1gPoWmN>>. Acesso em: 16 fev. 2014.

SANDRONI, P. et al. Complex regional pain syndrome type I: incidence and prevalence in Olmsted county, a population-based study. **Pain**, v. 103, n. 1-2, p. 199-207, maio 2003.

SANTOS, A. P. et al. Composição química, atividade antimicrobiana do óleo essencial e ocorrência de esteroides nas folhas de *Pterodon emarginatus* Vogel, Fabaceae. **Revista Brasileira De Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 891-896, dez. 2010.

SANTOS FILHO, D. et al. [Chemoprophylactic activity of soaps containing essential oil from the fruit of *Pterodon pubescens* in schistosomiasis mansoni]. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82 Suppl 4, p. 343-5, 1987.

SANTOS, R. X. et al. Mitochondrial DNA oxidative damage and repair in aging and Alzheimer's disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 18, p. 2444-57, jun. 2013.

SCHEIDT, C. et al. Evidence for the involvement of glutamatergic receptors in the antinociception caused in mice by the sesquiterpene drimaniol. **Neuropharmacology**, v. 43, n. 3, p. 340-7, set. 2002.

SCHUG, S. A.; LARGE, R. G. Economic considerations in pain management. **Pharmacoeconomics**, v. 3, n. 4, p. 260-7, abr. 1993.

SCHWARTZ E. et al. Oxidative stress in the spinal cord plays an important role in capsaicin-induced hyperalgesia. **Neuroscience Abstract**, v. 551, p. 21, 2006.

SELTZER, Z.; DUBNER, R.; SHIR, Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. **Pain**, v. 43, n. 2, p. 205-18, nov. 1990.

SHAHIDI, F.; LIYANA-PATHIRANA, C. M.; WALL, D. S. Antioxidant activity of white and black sesame seeds and their hull fractions. **Food Chemistry**, v. 99, n. 3, p. 478-483, 2006.

SHANNON, J. C. **Pain Relief with Essential Oils: Sciatica, Muscle, and Joints**. 2014. Disponível em: <<http://bit.ly/1pgERvp>>. Acesso em: 18 fev. 2014.

SHARPE, P. C. et al. Synthetic and natural products as iron chelators. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 5, p. 591-607, 2011.

SHIBATA, M. et al. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, v. 38, n. 3, p. 347-52, set. 1989.

SHIMADA, A. et al. Headache and mechanical sensitization of human pericranial muscles after repeated intake of monosodium glutamate (MSG). **Journal of Headache and Pain**, v. 14, n. 1, p. 2, dez. 2013.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, n. 2, p. 213-9, jul. 1993.

SILVA, M. C. et al. Acute and topic anti-edematogenic fractions isolated from the seeds of *Pterodon pubescens*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, n. 1, p. 135-41, jan. 2004.

SIMÕES, C. M. O.; MARIOT, A. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. Porto Alegre / Florianópolis: Ed. Universidade-UFRGS / Ed. da UFSC, 2004. 1102 ISBN 9788570256829.

SINISCALCO, D. et al. Role of reactive oxygen species and spinal cord apoptotic genes in the development of neuropathic pain. **Pharmacological Research**, v. 55, n. 2, p. 158-66, fev. 2007.

SLUKA, K. A.; WILLIS, W. D. Increased spinal release of excitatory amino acids following intradermal injection of capsaicin is reduced by a protein kinase G inhibitor. **Brain Research**, v. 798, n. 1-2, p. 281-6, jul. 1998.

SOMMER, C.; KRESS, M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. **Neuroscience Letters**, v. 361, n. 1-3, p. 184-7, maio 2004.

SORKIN, L. S.; YAKSH, T. L. Behavioral models of pain states evoked by physical injury to the peripheral nerve. **Neurotherapeutics**, v. 6, n. 4, p. 609-19, out. 2009.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática – Guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2005. ISBN 9788586714214.

SPINDOLA, H. M. et al. Furanoditerpenes from *Pterodon pubescens* Benth with Selective in vitro Anticancer Activity for Prostate Cell Line. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 3, p. 569-U241, 2009.

SPINDOLA, H. M. et al. Antinociceptive effect of geranylgeraniol and 6 α ,7 β -dihydroxyvouacapan-17 β -oate methyl ester isolated from *Pterodon pubescens* Benth. **BMC Pharmacology**, v. 10, p. 1, 2010.

SPINDOLA, H. M. et al. Geranylgeraniol and 6 α ,7 β -dihydroxyvouacapan-17 β -oate methyl ester isolated from *Pterodon pubescens* Benth.: Further investigation on the antinociceptive mechanisms of action. **European Journal of Pharmacology**, v. 656, n. 1-3, p. 45-51, abr. 2011.

STANTON-HICKS, M. et al. Reflex sympathetic dystrophy: changing concepts and taxonomy. **Pain**, v. 63, n. 1, p. 127-33, out. 1995.

STORY, G. M. et al. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. **Cell**, v. 112, n. 6, p. 819-29, mar. 2003.

STUCKY, C. L. et al. Roles of transient receptor potential channels in pain. **Brain Research Reviews**, v. 60, n. 1, p. 2-23, abr. 2009.

SZABO, M. R. et al. Improved DPPH determination for antioxidant activity spectrophotometric assay. **Chemical Papers**, v. 61, n. 3, p. 214-216, 2007.

SZOLCSANYI, J. Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology. **Neuropeptides**, v. 38, n. 6, p. 377-84, dez. 2004.

TABO, E. et al. Behavioral manifestations of neuropathic pain and mechanical allodynia, and changes in spinal dorsal horn neurons, following L4-L6 dorsal root constriction in rats. **Pain**, v. 80, n. 3, p. 503-20, abr. 1999.

TADANO, T. et al. Induction of nociceptive responses by intrathecal injection of interleukin-1 in mice. **Life Sciences**, v. 65, n. 3, p. 255-61, 1999.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819 ISBN 8536316144.

TAKAISHI, M. et al. Inhibitory effects of monoterpenes on human TRPA1 and the structural basis of their activity. **Journal of Physiological Sciences**, out. 2013.

TAL, M. A novel antioxidant alleviates heat hyperalgesia in rats with an experimental painful peripheral neuropathy. **Neuroreport**, v. 7, n. 8, p. 1382-4, maio 1996.

THOMAS, S. et al. Factors affecting the DNA damaging activity of superoxide and nitric oxide. **Mutation Research**, v. 402, n. 1-2, p. 77-84, jun. 1998.

TIETZ, N. W. **Clinical Guide to Laboratory Tests**. 3. Philadelphia, PA, USA: WB Saunders Co., 1995. 1096 ISBN 072165035X.

TJØLSEN, A.; HOLE, K. Animal Models of Analgesia. In: DICKENSON, A. H.; BESSON, J. M. R., *et al* (Ed.). **The Pharmacology of Pain**. Verlag, Berlin: Springer, v.130, 1997. p.1-20. ISBN 9783540627852.

TOMINAGA, M. et al. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. **Neuron**, v. 21, n. 3, p. 531-43, set. 1998.

TRACHTENBERG, F. et al. Iron chelation adherence to deferoxamine and deferasirox in thalassemia. **American Journal of Hematology**, v. 86, n. 5, p. 433-6, maio 2011.

TRAYNELIS, S. F. et al. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. **Pharmacological Reviews**, v. 62, n. 3, p. 405-96, set. 2010.

TREVISANI, M. et al. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America**, v. 104, n. 33, p. 13519-24, ago. 2007.

URCA, G.; RAIGORODSKY, G. Behavioral classification of excitatory amino acid receptors in mouse spinal cord. **European Journal of Pharmacology**, v. 153, n. 2-3, p. 211-20, ago. 1988.

VANDENDOOL, H.; KRATZ, P. D. A Generalization of the Retention Index System Including Linear Temperature Programmed Gas-Liquid Partition Chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, v. 11, p. 463-71, ago. 1963.

VELDMAN, P. H. et al. Signs and symptoms of reflex sympathetic dystrophy: prospective study of 829 patients. **Lancet**, v. 342, n. 8878, p. 1012-6, out. 1993.

VELOZO, L. S. et al. *Pterodon polygalaeflorus* essential oil modulates acute inflammation and B and T lymphocyte activation. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 41, n. 3, p. 545-63, 2013.

VENDRUSCOLO, G. S.; MENTZ, L. A. Levantamento etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais por moradores do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia, Série Botânica**, v. 61, p. 83-103, 2006.

VIEIRA, C. R. et al. Antiproliferative activity of *Pterodon pubescens* Benth. seed oil and its active principle on human melanoma cells. **Phytomedicine**, v. 15, n. 6-7, p. 528-32, jun. 2008.

VILLANO, D. et al. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. **Talanta**, v. 71, n. 1, p. 230-5, jan. 2007.

VLADIMIR-KNEZEVIC, S. et al. Antioxidant activities and polyphenolic contents of three selected *Micromeria* species from Croatia. **Molecules**, v. 16, n. 2, p. 1454-70, 2011.

VROOMEN, P. C. et al. Diagnostic value of history and physical examination in patients suspected of lumbosacral nerve root compression. **Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry**, v. 72, n. 5, p. 630-4, maio 2002.

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. **Thin Layer Chromatography in Phytochemistry**. Boca Raton, FL: CRC Press - Taylor & Francis Group, 2008. 896 ISBN 9781420046786.

WALKER, C. I. et al. Antinociceptive effect of *Mirabilis jalapa* on acute and chronic pain models in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, n. 3, p. 685-93, out. 2013.

WALKER, J. S. NSAID: an update on their analgesic effects. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 22, n. 11, p. 855-60, nov. 1995.

WALKER, K.; FOX, A. J.; URBAN, L. A. Animal models for pain research. **Molecular Medicine Today**, v. 5, n. 7, p. 319-21, jul. 1999.

WALKER, R. G.; WILLINGHAM, A. T.; ZUKER, C. S. A *Drosophila* mechanosensory transduction channel. **Science**, v. 287, n. 5461, p. 2229-34, mar. 2000.

WALL, P. D. Introduction to the fourth edition. In: WALL, P. D. e MELZACK, R. (Ed.). **Textbook of Pain**. 4. London: Churchill Livingstone, 1999. p.1-8. ISBN 9780443062520.

WALL, P. D. et al. Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa. **Pain**, v. 7, n. 2, p. 103-11, out. 1979.

WANG, J. et al. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, n. 2, p. 127-32, mar. 2008.

WANG Z. Q. et al. A newly identified role for superoxide in inflammatory pain. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 309, p. 869-878, 2004.

WARFIELD, C. A.; KAHN, C. H. Acute pain management. Programs in U.S. hospitals and experiences and attitudes among U.S. adults. **Anesthesiology**, v. 83, n. 5, p. 1090-4, nov. 1995.

WARNER, D. S.; SHENG, H.; BATINIC-HABERLE, I. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. **Journal of Experimental Biology**, v. 207, n. Pt 18, p. 3221-31, ago. 2004.

WATANABE, H. et al. TRP channel and cardiovascular disease. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 118, n. 3, p. 337-51, jun. 2008.

WATERMAN, P. G.; MOLE, S. **Analysis of Phenolic Plant Metabolites (Ecological Methods and Concepts)**. 1. Wiley-Blackwell, 1994. 248 ISBN 0632029692.

WEBB, R. et al. Prevalence and predictors of intense, chronic, and disabling neck and back pain in the UK general population. **Spine (Phila Pa 1976)**, v. 28, n. 11, p. 1195-202, jun. 2003.

WINTOLA, O. A.; SUNMONU, T. O.; AFOLAYAN, A. J. Toxicological evaluation of aqueous extract of *Aloe ferox* Mill. in loperamide-induced constipated rats. **Human & Experimental Toxicology**, v. 30, n. 5, p. 425-31, maio 2011.

WOJCIECHOWSKI, M. F.; MAHN, J.; JONES, B. **Fabaceae: legumes**. Versão de 14 jun. 2006 em The Tree of Life Web Project. Disponível em: <<http://tolweb.org/Fabaceae/21093>>. Acesso em: 14 fev. 2014.

WRIGLEY, P. J.; JEONG, H. J.; VAUGHAN, C. W. Primary afferents with TRPM8 and TRPA1 profiles target distinct subpopulations of rat superficial dorsal horn neurones. **British Journal of Pharmacology**, v. 157, n. 3, p. 371-80, jun. 2009.

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. **Pharmacology**. Rev. 62, 381-404, 2010.

XIAO, H. S. et al. Identification of gene expression profile of dorsal root ganglion in the rat peripheral axotomy model of neuropathic pain. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America**, v. 99, n. 12, p. 8360-5, jun. 2002.

YAN, M. H.; WANG, X.; ZHU, X. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 62, p. 90-101, set. 2013.

YOUN, D. H.; GERBER, G.; SATHER, W. A. Ionotropic glutamate receptors and voltage-gated Ca(2)(+) channels in long-term potentiation of spinal dorsal horn synapses and pain hypersensitivity. **Neural Plasticity**, v. 2013, p. 654257, 2013.

YOWTAK J. et al. Reactive oxygen species in a mouse model of neuropathic pain. **Neuroscience Abstract**, v. 644, p. 11, 2006.

ZAHN, P. K.; BRENNAN, T. J. Lack of effect of intrathecally administered N-methyl-D-aspartate receptor antagonists in a rat model for postoperative pain. **Anesthesiology**, v. 88, n. 1, p. 143-56, jan. 1998.

ZAHN, P. K.; POGATZKI, E. M.; BRENNAN, T. J. Mechanisms for pain caused by incisions. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, v. 27, n. 5, p. 514-6, set.-out. 2002.

ZAHN, P. K.; UMALI, E.; BRENNAN, T. J. Intrathecal non-NMDA excitatory amino acid receptor antagonists inhibit pain behaviors in a rat model of postoperative pain. **Pain**, v. 74, n. 2-3, p. 213-23, fev. 1998.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, n. 2, p. 109-10, jun. 1983.

ZOLLINGER, P. E. et al. Effect of vitamin C on frequency of reflex sympathetic dystrophy in wrist fractures: a randomised trial. **Lancet**, v. 354, n. 9195, p. 2025-8, dez. 1999.

ZUURMOND, W. W. et al. Treatment of acute reflex sympathetic dystrophy with DMSO 50% in a fatty cream. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v. 40, n. 3, p. 364-7, mar. 1996.