



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA
CELULAR

AMANDA PÂMELA DOS SANTOS QUEIROZ

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DA
PELLUCIDINA A E ELUCIDAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO EM MODELOS *IN*
VIVO.**

BELÉM-PA

2016

Dados Internacionais de Catalogação- na-Publicação
(CIP)
Biblioteca do Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Queiroz, Amanda Pâmela dos Santos

Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da Pellucidina A e elucidação do mecanismo de ação em modelos in vivo / Amanda Pâmela dos Santos Queiroz ; Orientadora, Gilmara de Nazareth Tavares Bastos ; Cristiane do Socorro Ferraz Maia. - 2016.

85 f. : il.

Inclui bibliografia

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2016.

1. Peperomia – uso terapêutico. 2. Piperaceae - uso terapêutico. 3. Plantas medicinais - pesquisa. I. Bastos, Gilmara de Nazareth Tavares, orientadora. II. Maia, Cristiane do Socorro Ferraz, co-orientadora. III. Título.

CDD – 22 ed. 583.25

AMANDA PÂMELA DOS SANTOS QUEIROZ

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA
DA PELLUCIDINA A E ELUCIDAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO EM MODELOS
IN VIVO.**

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará para a obtenção do grau de mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Área de concentração: Neurociências.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Gilmara de Nazareth Tavares Bastos

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Cristiane do Socorro Ferraz Maia

BELÉM-PA

2016

AMANDA PÂMELA DOS SANTOS QUEIROZ

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DA PELLUCIDINA A E ELUCIDAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO EM MODELOS *IN VIVO*.

Defesa do trabalho de Mestrado submetido ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como pré-requisito para a obtenção do Grau de Mestre.

Banca examinadora:

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Gilamara de Nazareth Tavares Bastos
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará – UFPA.

Co-orientador (a): Prof.^a Dr.^a Cristiane do Socorro Ferraz Maia
Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará – UFPA.

Membro da Banca: Prof.^a Dr.^a Karen Renata Herculano Matos Oliveira
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará-UFPA.

Membro da Banca: Prof. Dr. Luís Antônio Loureiro de Maués
Universidade Federal do Pará-UFPA Campus de Altamira

Apresentado em: _____ / _____ / _____

Conceito: _____

BELÉM-PA

2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois mesmo não entendendo os caminhos ao qual ele me leva e tenho fé de que tudo é sempre para o meu bem-estar e evolução pessoal.

Aos meus pais, principalmente a minha mãe e irmãos pela paciência, carinho e apoio, sei que não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida. As pessoas queridas que estiveram comigo desde a infância D. Maria e a Michelle, que considero como uma irmã, por todo o apoio que sempre me deram.

Agradeço e muito aos meus amigos que me deram tanto apoio desde sempre, o Will, Luana, Menkell e aos novos amigos que fiz, mas que estão me dando um apoio descomunal em tudo, meus sonhos, expectativas e aturando aos meus dramas: a Fernanda, Jhulieth, Letícia, Jhonny, a Valéria e ao Gabriel principalmente, que mesmo estando longe me dão um imenso apoio. A todas as pessoas que colaboraram para eu ser a pessoa que sou hoje e me estimularam de forma positiva ou negativa a seguir os novos caminhos que pretendo.

A minha orientadora Gilmara Bastos, pela paciência na orientação, por ter me adotado, me dado esse desafio e por ter me ajudado a encontrar algo que gosto. As minhas colegas Karla e a Dayanne, a meus amigos Érica, Larissa e Neide e a todos os meus colegas de laboratório a Beth, Amanda, Gabriel, Maurício, Aline e Gustavo, todos são pessoas muito importantes nessa minha segunda família. Gostaria de agradecer especialmente ao prof. Luiz Antônio, que colaborou imensamente em minha formação acadêmica me ajudando a ser uma pessoa mais crítica, colaborando para o meu aprendizado.

Agradeço também a todas as dificuldades que apareceram nessa caminhada. Pois, me fizeram evoluir e muito, tanto intelectualmente quanto espiritualmente. Eu quero e vou continuar avançando, pois no final o que realmente importa são as tentativas e a forma como se consegue lidar com os erros. Muitas de minhas expectativas nesta jornada não foram cumpridas, muitos de meus sonhos começaram a ser mudados, mas espero que todas as minhas mudanças, sejam para uma pessoa melhor e para a minha evolução acadêmica. Afinal, novos passos estão por vir e eu espero ser capaz de segui-los sem medo.

Bem, agradeço a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a minha formação acadêmica, profissional e pessoal, muito obrigada!

RESUMO

A *Peperomia pellucida* (Piperaceae) é uma planta herbácea comumente encontrada nos continentes americano e asiático. Na Amazônia a espécie é conhecida pelo nome de erva-de-jabuti. Esta planta é utilizada, na medicina popular, para tratar uma vasta gama de sintomas e doenças, tais como conjuntivite, dor de cabeça, asma, úlcera gástrica, inflamação. Este estudo visou analisar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória dessa substância, assim como elucidar seu mecanismo de ação. Para todos os ensaios foram utilizados camundongos albinos suíços, machos (25 - 40 g), que foram inicialmente tratados com a pellucidina A nas doses de 0,5; 1 e 5 mg/kg (i.p.), submetidos a avaliação locomotora pelo ensaio de campo aberto e a modelos animais de dor aguda, como os testes de contorção abdominal induzida por ácido acético, testes da formalina e o ensaio da placa-quente. Em seguida, foi realizado o teste de contorção abdominal induzida por ácido acético para a elucidação do mecanismo de ação, no qual os animais foram tratados na dose padrão de 5 mg/kg (i.p.) e para análise anti-inflamatória do composto foi utilizado o modelo de granuloma induzido por pelotas de algodão, no qual os animais foram tratados na dose de 10 mg/kg (i.p.). O composto, não demonstrou alterar a deambulação dos animais em nenhuma das doses administradas. No ensaio de contorção a Pellucidina A conseguiu inibir em 43% o número de contorções abdominais na dose de 1 mg/kg, e 65% na dose 5 mg/kg. No teste da formalina, observou-se efeito antinociceptivo apenas dose de 5 mg/kg, com redução de 68% no tempo de lambida da pata do animal na fase inflamatória. Os animais tratados com a Pellucidina A e submetidos ao ensaio da placa-quente não demonstram possuir qualquer alteração em seu tempo de latência sobre a placa, apresentando uma resposta similar aos animais tratados apenas com a solução veículo. Para a elucidação do mecanismo de ação a Pellucidina A foi administrada na dose padrão de 5 mg/kg (i.p.) e associada com a Indometacina (5 mg/kg i.p.), o NS-398 (10 mg/kg i.p.), a cipro-heptadina (0,5 mg/kg i.p.), a naloxona (1mg/kg i.p.) e o L-NAME (5 mg/kg i.p.). A Pellucidina A manifestou uma ação sinérgica quando associada com cipro-heptadina e L-NAME, apresentando uma diminuição no padrão de contorções abdominais em 97% quando associado com a cipro-heptadina e 96% com L-NAME. Na análise da ação da Pellucidina A (10 mg/kg i.p.) no teste do granuloma induzido por pelotas de algodão, a Pellucidina A apresentou atividade anti-inflamatória, reduzido em 24% a formação de granuloma nos camundongos tratados. Os resultados obtidos corroboram com a hipótese de que a Pellucidina A apresenta atividade analgésica, possuindo ação periférica, capaz de interferir no processo inflamatório, atuando como um possível agonista glicocorticoide.

Palavras chave: Antinocicepção, *Peperomia pellucida*, Pellucidina A

ABSTRACT

The *Peperomia pellucida* (Piperaceae) is an herbaceous plant commonly found in the American and Asian continents. In the Amazon the species is known by the name of erva-de-jabuti. This plant is used in folk medicine to treat a wide range of symptoms and diseases such as conjunctivitis, headache, asthma, gastric ulcer, inflammation and arthritis. Pellucidin A is an isolated compound of the species *Peperomia pellucida* and this study aimed to analyze the antinociceptive and anti-inflammatory activity of this compound, as well as to elucidate its mechanism of action. For the assays, male albino mice (25-40 g) were used, which were initially treated with pellucidin A at the doses of 0.5; 1 and 5 mg / kg (i.p.) and subjected to locomotor evaluation by the open field test and animal models of acute pain, such as acetic acid-induced abdominal writhing tests, formalin tests and the hot plate test. The acetic acid-induced abdominal contortion test was realized to elucidate the mechanism of action in which the animals were treated at the standard dose of 5 mg/kg (i.p.) and for anti-inflammatory analysis of the compound was used model of granuloma induced by pellets of cotton, in which the animals were treated in the dose of 10 mg/kg (i.p.). The compound did not show capacity to change the ambulation of the animals at any of the administered doses. In the contortion test, pellucidin A was able to inhibit the number of abdominal writhings in 43% at the dose of 1 mg/kg, and 65% at the dose of 5 mg/kg. In the formalin test, an antinociceptive effect was observed at the dose of 5 mg/kg, with a 68% reduction in the lymph time of the animal's paw in the inflammatory phase, showing a similar response to Indomethacin used at a dose of 10 mg/kg as positive control for this phase. Animals treated with pellucidin A and subjected to the hot plate assay did not show any change in their latency time on the plate, showing a similar response to the animals treated just with the vehicle solution. For the elucidation of the action mechanism, the pellucidin A was administered at the standard dose of 5 mg/kg (i.p.) and associated with Indomethacin (5 mg/kg i.p.), NS-398 (10 mg/kg i.p.) cyproheptadine (0.5 mg/kg i.p.), naloxone (1 mg/kg i.p.) and L-NAME (5 mg/kg i.p.). The pellucidin A has shown a synergistic action when associated with cyproheptadine and L-NAME, with a decrease in the pattern of abdominal writhing by 97% when associated with cyproheptadine and 96% with L-NAME. In the analysis of the action of pellucidin A (10 mg/kg i.p.) in the granuloma test induced by cotton pellets, pellucidin A presented anti-inflammatory activity, reduced granuloma formation in 24% in the treated mice. The results confirm the hypothesis that pellucidin A presents analgesic activity capable of interfering in the inflammatory process, acting as a possible glucocorticoid agonist.

Key Words: Antinociception, *Peperomia pellucida*, Pellucidin A

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01:** Componentes do aferente periférico que transmite os estímulos externos e traduz para chegar ao terminal central e desencadear a primeira sinapse.....14
- Figura 02:** Via nociceptiva ascendente e suas projeções do tálamo ao córtex.....16
- Figura 03:** Algumas das áreas envolvidas no processamento da dor (matriz de dor) e centrais de modulação da dor.....17
- Figura 04:** Mecanismo de resposta inflamatória inicial a lesão ou infecção que propiciam a maior sensibilização nociceptiva.....23
- Figura 05:** Alguns dos receptores presentes no nociceptor, que colaboram para a sua sensibilização.....24
- Figura 06:** Distribuição pantropical da família Piperaceae.....32
- Figura 07:** Folhagem característica das plantas do gênero *Peperomia*: *Peperomia galloides*, *P. obtusifolia* e *P. blanda*, respectivamente.....34
- Figura 08:** Distribuição geográfica da *Peperomia pellucida* no Brasil em 2012.....36
- Figura 09:** Figura ilustrativa da espécie *Peperomia pellucida*.....37
- Figura 10:** Estrutura da pellucidina A.....38
- Figura 11:** Fluxograma dos ensaios nociceptivos.....45
- Figura 12:** Fluxograma da análise do mecanismo de ação da pellucidina A pelo ensaio de ácido acético a 0,6%.....48
- Figura 13:** Efeito da pellucidina A na atividade locomotora dos camundongos.....52

Figura 14: Efeito da pellucida A sobre a nocicepção induzida por injeção intraperitoneal de ácido acético 0,6%.....	53
Figura 15: Primeira fase da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina a 2,5 %.....	54
Figura 16: Segunda fase da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina a 2,5 %.....	55
Figura 17: Tempo de curso dos efeitos da pellucidina A sobre a nocicepção induzida pela placa-quente.....	56
Figura 18: Avaliação da ação da pellucidina A em associação com o bloqueador de ciclo-oxigenases, indometacina e o inibidor de COX2.....	57
Figura 19: Avaliação da ação da pellucidina A em associação com bloqueador histaminérgico H1, Cipro-heptadina.....	59
Figura 20: Avaliação da ação da pellucidina A em associação com bloqueador opióide, Naloxona.....	60
Figura 21: Avaliação da ação da pellucidina A em associação com o bloqueador de NO sintases, L-NAME.....	61
Figura 22: Efeito da pellucidina A na formação de granuloma induzido pelas pelotas de algodão, análise do peso úmido.....	62
Figura 23: Efeito da pellucidina A na formação de granuloma induzido pelas pelotas de algodão, análise do peso seco.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS

ACC – Córtex Cingulado Anterior

AIES – Anti-Inflamatórios Esteroidais

AINES – Anti-Inflamatórios Não Esteroidais

Ca⁺² – Cálcio

COX – Ciclo - Oxigenase

COX1 – Ciclo – Oxigenase 1

COX2 – Ciclo – Oxigenase 2

DLF – Funículo Dorsolateral

DP, EP, FP e TP – Receptores Prostanóides

DRG – Gânglio da Raiz Dorsal

GC_s – Guanilato Ciclase Solúvel

GI – Trato gastrointestinal

GR – Receptor Glicorticóide

GMP_c – Guanosina Monofosfato Cíclica

IL – Interleucina

IL1 β – Interleucina 1 Beta

NF- κ β – Fator Nuclear Kappa B

NO – Óxido Nítrico

NOS – Óxido Nítrico Sintase

eNOS – Óxido Nítrico Sintase Endotelial

iNOS – Óxido Nítrico Sintase Induzida

nNOS – Óxido Nítrico Sintase Neural

LC – *Locus Coeruleus*

NADPH – Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo-Fostato-Hidrogênio

NGF – Fator de Crescimento Nervoso

NRM – Núcleo Magno da Rafe

PAG – Substância Cinzenta Pareaquedutal

PDGF – Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

PFE – Córtex Pré-Frontal

PGD₂ – Prostaglandina D tipo 2

PGE₂ – Prostaglandina E tipo 2

PGI₂ - Prostataciclina tipo 2

PG_S- Prostaglandinas

PPC – Córtex Parietal Posterior

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

RVM – Medula Ventromedial Rostral

SI – Cortéx Somatosensorial Primário

SII – Cortéx Somatosensorial Secundário

SMA – Área Motora Suplementar

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alfa

VLF – Funículo Ventrolateral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. DOR E NOCICEPÇÃO	13
1.2. TIPOS DE DOR.....	18
1.3. INFLAMAÇÃO E A SENSIBILIZAÇÃO NOCICEPTIVA.....	21
1.3.3. Mediadores inflamatórios	25
1.3.1.1. Autacóides.....	25
1.4. ANALGESIA: DROGAS UTILIZADAS	29
1.5. SISTEMÁTICA E DISTRIBUIÇÃO.....	32
1.5.1. Família: Piperaceae	32
1.5.2. O gênero: Peperomia	33
1.5.3. <i>Peperomia pellucida</i>	35
1.6. PELLUCIDINA A	38
2. OBJETIVOS	40
2.1. OBJETIVO GERAL	40
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
3. MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1. DROGAS E REAGENTES	41
3.2. ANIMAIS.....	41
3.3. PARAMETRO PARA AVALIAÇÃO LOCOMOTORA.....	41
3.3.1. Campo aberto	41
3.4. MODELOS EXPERIMENTAIS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA.....	42
3.4.1. Modelo de dor visceral: contorções abdominais induzidas por ácido acético	42
3.4.2. Modelo bifásico: nocicepção induzida pela formalina	43

3.4.3. Modelo supra-espinhal: nocicepção induzida pela placa-quente	44
3.5.ELUCIDAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO POR ÁCIDO ACÉTICO 0,6%.....	45
3.5.1. Via ciclo-oxigenases	46
3.5.2. Via histaminérgica	46
3.5.3. Via opióide	46
3.5.4. Via nitrérgica	46
3.6. MODELO DE INFLAMAÇÃO SUB-CRÔNICA: GRANULOMA INDUZIDO POR PELOTA DE ALGODÃO EM CAMUNDONGOS	49
3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
4. RESULTADOS	51
4.1. EFEITO DA PELLUCIDINA A NA ATIVIDADE LOCOMOTORA	51
4.2. EFEITO DA PELLUCIDINA A NA CONTORÇÃO ABDOMINAL INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO.....	52
4.4. EFEITO DA PELLUCIDINA A NA NOCICEPÇÃO TÉRMICA INDUZIDA PELA PLACA-QUENTE	55
4.5. ELUCIDAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DA PELLUCIDINA A PELO ENSAIO DO ÁCIDO ACÉTICO A 0,6%	56
4.5.1. Avaliação da pellucidina A na via das ciclo-oxigenases	56
4.5.2. Avaliação da pellucidina A nos receptores histaminérgicos h1	58
4.5.3. Avaliação da pellucidina A nos receptores opióides	59
4.5.4. Avaliação da pellucidina A na via nitrérgica	60
4.6. O EFEITO DA PELLUCIDINA A NA INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR PELOTAS DE ALGODÃO.....	61
5. DISCUSSÃO	64
6. CONCLUSÃO	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
APÊNDICE A	84

1. INTRODUÇÃO

1.1. DOR E NOCICEPÇÃO

Qualquer estímulo externo ao qual um indivíduo é exposto irá passar por um processamento sensorial, que envolve a captação e transdução desse sinal transmitido em informação sináptica e este estímulo quando nocivo pode causar uma lesão real ou potencial (KANDEL *et al.*, 2014). Todavia, um estímulo nocivo pode não necessariamente promover a dor (ALMEIDA *et al.*, 2004; FEIN, 2011).

Os fisiologistas distinguem a dor da nocicepção, no qual a dor seria a percepção de um estímulo aversivo, que requer a capacidade de abstração e elaboração de impulsos sensoriais, geralmente acompanhada da nocicepção (MILLAN, 1999; ALMEIDA *et al.*, 2004; FEIN *et al.*, 2011). Enquanto a nocicepção pode ser caracterizada como a transmissão de sinais que chegam ao sistema nervoso central (SNC) pela ativação de receptores sensoriais especializados, denominados nociceptores, que fornecem informações sobre a lesão tecidual ocasionada por estímulos nocivos (FEIN *et al.*, 2011).

O cérebro não possui a capacidade de reconhecer as informações nocivas advindas diretamente do corpo e para isso ele precisa dos nociceptores, que irão captar, traduzir e transmitir esta informação.

Para realizar sua função com eficácia os receptores nociceptivos, que constituem um número heterogêneo de células, possuem um limiar no qual ocorre o reconhecimento somente de estímulos de energia suficiente para potencialmente ou realmente danificar o tecido (WOOLF & MA, 2007; REICHLING *et al.*, 2013).

Os nociceptores (**Figura 1**) possuem quatro componentes principais que permitem sua funcionalidade: o terminal periférico, que captará os estímulos externos e iniciará o potencial de ação; o axônio, que conduz o potencial; o corpo da célula, que é considerado o centro metabólico do neurônio, responsável pela síntese de todas as proteínas neuronais e que mantém a integridade do neurônio; e por último o terminal central, situado no corno dorsal da medula espinhal (quando constituem os nervos espinhais), que promove a primeira sinapse no percurso sensorial do sistema nervoso central (WOOLF & MA, 2007).

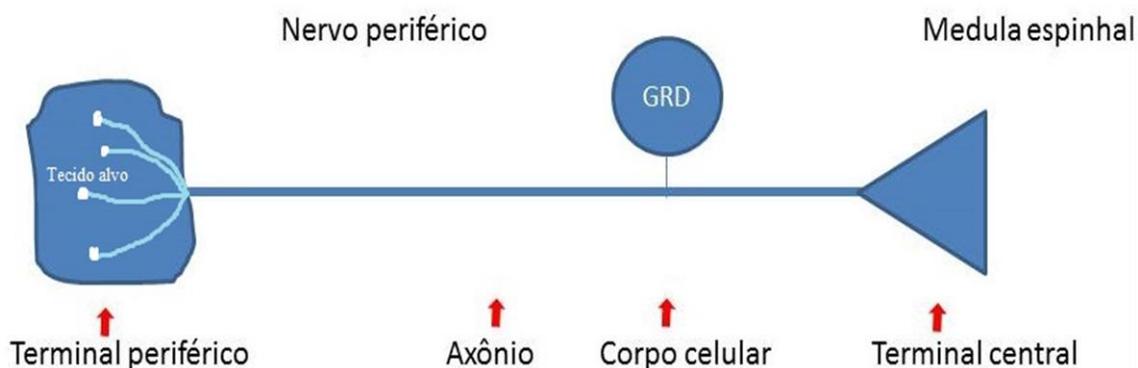


Figura 01. Componentes do aferente periférico, que recebe os estímulos externos e traduz para chegar ao terminal central e desencadear a primeira sinapse. Fonte: adaptado de WOOLF & MA, 2007.

Podemos diferenciar os nociceptores em fibras aferentes A δ e C. As fibras A δ são as fibras de dor aguda, de resposta rápida, com intensidade acentuada e latência curta, que é descrita como curta ou em pontada. São fibras que respondem a estímulos nociceptivos intensos o suficiente para atingir o limiar, ativadas por estímulos mecânicos, térmicos e químicos (KANDEL *et al.*, 2014). E as fibras C, são as que propagam as informações de uma maneira mais lenta, às vezes secundária a ação, e devido a isso são conhecidas como as fibras de dor lenta (KANDEL *et al.*, 2014).

As fibras A δ são classificadas em dois grupos. O primeiro é o Tipo I, correspondente às fibras de mecanorreceptores de elevado limiar, que respondem principalmente a estímulos mecânicos de alta intensidade e se ativam fracamente a estímulos térmicos ou químicos. E os do tipo II são representados por receptores mecanotérmicos, que respondem a temperaturas elevadas (45-53°C) e alguns receptores que respondem ao frio intenso (-15 °C) (ALMEIDA *et al.*, 2004).

As fibras C apresentam uma variedade de receptores, dentre eles os receptores termossensíveis, mecanorreceptores de baixo limiar e receptores específicos para substâncias algogênicas tais como acetilcolina, enzimas proteolíticas, serotonina, prostaglandinas, substância P e histamina (ALMEIDA *et al.*, 2004). Existe também uma quantidade de fibras C que possuem receptores de limiar mais elevado, estes respondem similarmente tanto a estímulos térmicos como

mecânicos ou são sensíveis a estímulos mecânicos, químicos e térmicos, sendo por essa razão, chamados de polimodais (ALMEIDA *et al.*, 2004). Além destes ainda existe uma classe de fibras C chamadas de receptores silenciosos, que são ativados na presença de processos inflamatórios, distensões ou isquemia (MILLAN, 1999; ALMEIDA *et al.*, 2004).

Os estímulos lesivos são “percebidos” e transmitidos pelas finas fibras aferentes mielinizadas A δ e fibras não mielinizadas C da periferia para as lâminas superficiais do corno dorsal da medula espinhal (HANSEN & MALCANGIO, 2013; KANDEL *et al.*, 2014). Essas fibras têm os seus corpos celulares presentes no gânglio da raiz dorsal (sensitivo), que ao se unirem com as raízes ventrais (motor) formam o nervo espinhal. Essas fibras aferentes sensitivas inervam a maior parte do corpo, incluindo órgãos internos, sendo que na cabeça seus corpos celulares se encontram nos gânglios do trigêmeo (WOOLF & MA, 2007; HANANI, 2012).

Quando um estímulo potencialmente lesivo é aplicado sobre uma determinada área sensitiva, ambas as fibras aferentes são ativadas concomitantemente, porém, dependendo da intensidade lesiva do estímulo, apenas as fibras C continuarão sendo estimuladas mesmo depois do agente causador do processo lesivo ter sido extinto (KANDEL *et al.*, 2014).

As mensagens nociceptivas são transmitidas da fibra para a medula espinhal e desta para o tálamo. Estas informações são transmitidas através de cinco vias ascendentes principais, os tratos: espinotalâmico, espinoreticular, espinoencefálico, cervico talâmico e espino-hipotalâmico (KANDEL *et al.*, 2014). Todos evocados pelas fibras nociceptivas, sendo o trato espinotalâmico a via mais proeminente dentre as vias, com axônios que cruzam a linha média da medula espinhal e ascendem na substância branca ântero-lateral até chegar aos núcleos talâmicos (GARLAND, 2012; STEIN, 2013; KANDEL *et al.*, 2014), como exemplificado na **(Figura 2)**.

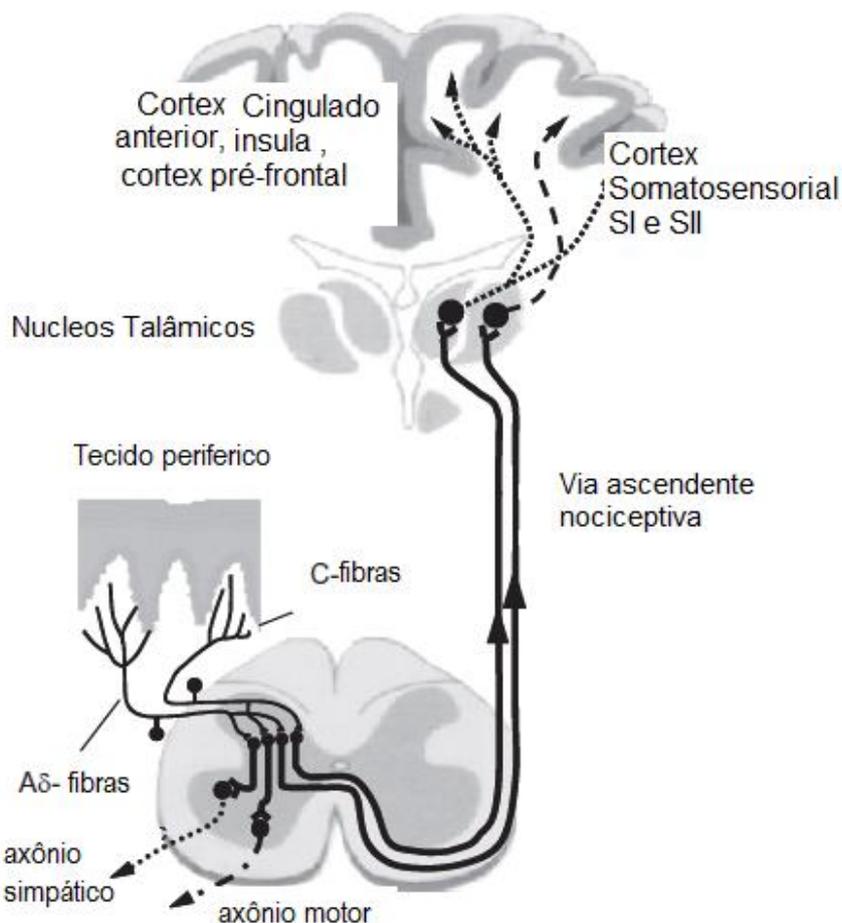


Figura 2: Via nociceptiva ascendente e suas projeções do tálamo ao córtex. Fonte: adaptado de STEIN, 2013.

A partir dos núcleos talâmicos, a informação nociceptiva é retransmitida se estendendo para várias regiões corticais, subcorticais e tronco cerebral (**Figura 3**), sendo estes o córtex pré-frontal, córtex cingulado anterior, córtex somatosensorial primário (SI) e secundário (SII), córtex ínsular, amígdala, hipotálamo, substância cinzenta periaquedutal, medula ventromedial rostral, funículo dorso-lateral, ponte, cerebelo, área motora suplementar, área pré-motora, putâmen e *locus coeruleus*, o hipotálamo e gânglios da base (DOGRUL *et al.*, 2012; STEIN, 2013).

Nas regiões da ínsula e córtex cingulado anterior ocorre uma intensa atividade quando os nociceptores são ativados por estímulos nocivos e a estimulação nessas regiões do cérebro está associada com a experiência subjetiva da dor (GARLAND, 2012). Afinal, a dor humana não deixa de ser uma interpretação consciente e subjetiva da entrada nociceptiva que é influenciada por diversos fatores sendo eles cognitivos, neurofisiológicos e ambientais (MAYHEW *et al.*, 2013).

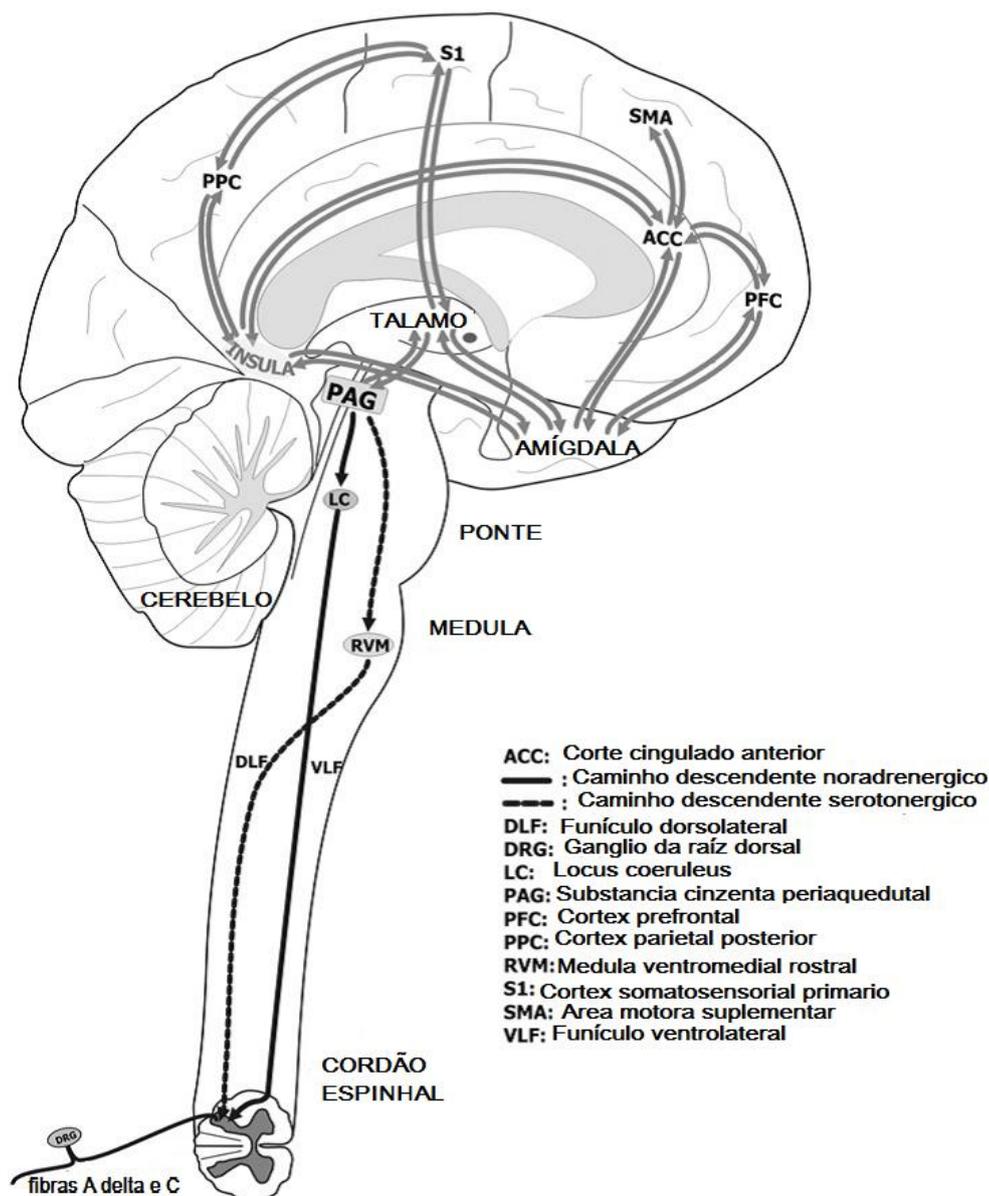


Figura 3: Algumas das áreas envolvidas no processamento da dor (matriz de dor) e centrais de modulação da dor. Fonte: Adaptado de DOGRUL *et al.*, 2012.

É no corno dorsal da medula espinhal que se sucede a primeira sinapse dos neurônios de primeira ordem com os de segunda ordem na via nociceptiva, sendo também o local onde ocorre uma complexa interação entre os mecanismos estimulatórios e inibitórios que modulam este processo, compreendendo neurônios excitatórios e interneurônios inibitórios, assim como mecanismos inibitórios que envolvem tratos descendentes de centros superiores (STEEDS, 2013).

As principais regiões cerebrais envolvidas nesta modulação inibitória descendente estão no tronco cerebral: a substância cinzenta periaquedutal (PAG) o núcleo magno da rafe (NRM) e o *Locus Coeruleus* (LC) (DOGRUL *et al.*, 2009; STEEDS, 2013).

A estimulação elétrica da PAG gera profunda analgesia, podendo gerar o bloqueio inclusive dos reflexos de retirada mediados de modo espinhal, que costumam surgir para evitar maior dano tecidual pelo estímulo nocivo. Poucos dos neurônios desta região se projetam para o corno dorsal da medula espinhal, mas muitos dos neurônios presentes na PAG estimulam a excitabilidade dos neurônios serotoninérgicos presentes na medula ventromedial e rostral do bulbo, tendo como principal via o NRM que projeta suas fibras através do funículo dorsolateral (DLF) estendendo as projeções serotoninérgicas pela medula espinhal, assim como os neurônios noradrenérgicos no LC que se projetam pelo funículo ventrolateral (VLF), estes são os principais responsáveis pelas conexões inibitórias nociceptiva descendentes dos neurônios presentes no corno dorsal (DOGRUL *et al.*, 2009; DOGRUL *et al.*, 2012; VILLARINHO *et al.*, 2013; KWON *et al.*, 2014).

Como visto, a estimulação dos nociceptores provocará primeiramente uma resposta ascendente, que poderá desencadear respostas descendentes modulatórias. Assim, a persistência do estímulo doloroso faz com que a nocicepção (ou dor) seja determinada pelo equilíbrio entre os fatores pró-nociceptivos e anti-nociceptivos acionados (HANSEN & MALCANGIO, 2013).

1.2. TIPOS DE DOR

Existem na literatura várias definições para dor, porém nenhuma delas é capaz de abranger todas as formas em que esta sensação se manifesta. De maneira simplificada, as manifestações dolorosas podem ser classificadas de acordo com a sua duração, origem e localização. Levando-se em consideração apenas a duração, a dor pode ser classificada em dor transitória, aguda ou crônica (MORAIS, 2010).

A dor transitória é promovida por um estímulo de alta intensidade que produz uma sensação de dor somatotopicamente limitada, que cessa mediante a remoção do estímulo nocivo, sendo causada por estímulos de natureza não lesiva, porém desconfortáveis (XU & YAKSH, 2011), estímulos esses como um “beliscão”, por exemplo, que dependendo da intensidade poderia ir de desconfortável a doloroso, porém, quando removido o estímulo a sensação que seria despertada pela ação também cessaria.

A dor aguda é caracterizada por ser uma resposta natural a um estímulo lesivo que excitou os nociceptores, sendo de curta duração e desaparecendo antes mesmo do tecido ter sido restaurado (MELZACK & LOESER, 1999).

A dor crônica é descrita como uma dor que persiste de uma forma que acaba por desconectar-se de sua causa inicial (KWON *et al.*, 2014; KALLENBORN-GERHARDT *et al.*, 2013; REICHLING *et al.*, 2013). Formando um grupo heterogêneo de pacientes, geralmente ela é causada por inflamação, lesão no tecido ou nervo (neuropática), câncer ou ainda surgindo após procedimentos cirúrgicos (DEUMENS *et al.*, 2013).

Quanto a sua origem (fisiológica ou patológica) a dor pode ser classificada em nociceptiva, neurogênica, neuropática e inflamatória (MORAIS, 2010).

A dor nociceptiva é o tipo mais comum de dor, tem como função a manutenção da integridade fisiológica, atuando como forma de advertência ao organismo, sinalizando dano tecidual real ou eminente, definida como sendo de característica adaptativa e promove a excitação das fibras A δ e C (NICKEL *et al.*, 2012).

Um exemplo de dor nociceptiva é a relacionada aos receptores térmicos, que seriam acionados por altas ou baixas temperaturas e promoveriam uma sensação de “queimação” na pele, isso ocorre devido à excitação direta das fibras C principalmente, que respondem mais rapidamente a este tipo de estímulo, promovendo a estimulação e uma resposta de reação para evitar uma possível ou maior lesão tecidual (ALMEIDA *et al.*, 2004).

Na dor neurogênica a interrupção da atividade elétrica neuronal normal é uma característica eminente, isso é resultado da agressão à estrutura neural, podendo vir ou não acompanhada da injúria do tecido não neural (GOINS *et al.*, 2012), se não for tratada adequadamente isto pode evoluir para dor neuropática, por isso na literatura elas estão estreitamente relacionadas, muitas vezes caracterizadas como iguais, mas a dor neuropática possui uma natureza mais persistente e mal adaptada, devido a intensa sinalização das unidades neuroimunes, gerando mudanças na neuroplasticidade do nociceptor (CALVO *et al.*, 2012; KWON *et al.*, 2014).

A dor neuropática muitas vezes é causada por uma resposta inflamatória intensa de natureza infecciosa ou não infecciosa, pode ser provocada ainda em consequência de doenças neurodegenerativas e outras patologias (GAO & JI, 2010). Também pode promover uma resposta somatosensorial anormal, podendo afetar o

SNP ou o SNC. Sendo caracterizada por apresentar uma dor espontânea com respostas excessivas aos estímulos dolorosos (Hiperalgisia) e ou estímulos inócuos (alodinia), dores intensas e de difícil tratamento (GAO & JI, 2010; OLD & MALCANGIO, 2012).

Existem várias pesquisas que abordam diferentes modelos animais com o objetivo da indução da dor neuropática, podendo então indicar de forma mais concisa a relação entre os mecanismos do sistema imune na zona central e o sistema nervoso periférico, desempenhando um papel importante na manutenção da dor, principalmente na contribuição para propensão neuropática (KOBAYASHI *et al.*, 2012).

A dor inflamatória é a dor advinda do processo inflamatório, desencadeado pela lesão ou infecção, pois quando o tecido é danificado, numerosos mediadores químicos são liberados (MORAIS, 2010). Neste micro-ambiente cria-se uma “sopa inflamatória” no local da lesão, o que sensibiliza os nociceptores. Os mediadores inflamatórios são produzidos por células imunitárias presentes na circulação ou por células residentes no local da lesão. Mediadores como: a prostaglandinas (PGs), histamina, serotonina, acetilcolina, bradicinina, fator de crescimento neuronal, citocinas e quimiocinas. Algumas destas substâncias ativam diretamente ou modificam a atividade dos nociceptores, contribuindo para a hipersensibilidade e dor espontânea (ABBADIE, 2005).

Quanto a localização, a dor pode ser classificada em somatosensorial (somática) ou visceral (MORAIS, 2010).

A dor somática é referida como dor músculo-esquelética, podendo ser dividida em somática superficial e profunda. A dor somática superficial é relacionada à estimulação que afeta a pele e o tecido celular subcutâneo. São dores bem definidas e bem localizadas, podendo ser de origem mecânica, térmica ou química e geralmente com caráter de queimação. Quando a dor somática é profunda, se localiza mais nos músculos esqueléticos, tendões, ligamentos e fâscias, caracterizada por uma sensação profunda e mal definida (similar a visceral) (COVIAN, 1965).

A dor visceral é caracterizada por ser mais mal localizada e difusa, antes se julgava ter uma relação estreita com a dor inflamatória, sendo classificada até mesmo como igual, mas atualmente se tem a concepção de que a dor visceral possui um mecanismo mais complexo que vai além da promovida pela liberação de

mediadores inflamatórios que estimulam os nociceptores presentes nas vísceras (KLAUMANN *et al.*, 2008).

Existem também, nociceptores presentes nas vísceras que demonstraram ser mais sensíveis à distensão de órgãos na cavidade da parede muscular que ao dano tecidual, isquemia ou inflamação (KLAUMANN *et al.*, 2008). Afinal, os aferentes sensoriais que inervam os órgãos viscerais não são formados por um grupo homogêneo de aferentes de sinalização para a dor visceral no SNC (MEYMANDI & KEYHANFAR, 2013).

Na dor visceral de origem exclusivamente inflamatória ocorre à excitação de fibras C silenciosas presente na região visceral, fibras estas que não respondem a qualquer estímulo, mas são evocadas na presença de inflamação ou dano tecidual eminente, pois são estimuladas pela liberação de vários mediadores inflamatório no local lesionado (MILLAN, 1999).

Em vista disso, para uma análise mais detalhada são propostos vários tipos de ensaios envolvendo modelos de dor visceral de origem inflamatória, onde são utilizados agentes químicos injetados nas vísceras para induzir uma colite ou peritonite. Embora em sentido restrito estes modelos inflamatórios não possam ser considerados verdadeiros modelos para dor visceral funcional não patológica em humanos, mas a hiperalgesia manifestada pelos animais pode se assemelhar de perto a natureza da dor observada nos pacientes (SENGUPTA, 2009). Nestes tipos de ensaios comportamentais normalmente é avaliado a capacidade de um novo tratamento ou substância testada possuir ação terapêutica na promoção da analgesia (JOHNSON *et al.*, 2016).

1.3. INFLAMAÇÃO E A SENSIBILIZAÇÃO NOCICEPTIVA

A inflamação é uma resposta adaptativa essencial para a sobrevivência e manutenção natural do organismo contra lesões/estresse tecidual e agentes patogênicos, ela possui um mecanismo de complexa interação entre células do sistema imunológico e mediadores moleculares (SYAM *et al.*, 2014). Esse processo pode ser dividido em agudo e crônico, sendo diferenciados pelo tempo de duração do processo e pelo tipo de infiltrado presente (SILVA *et al.*, 2014).

A inflamação aguda é a resposta rápida do organismo em reação ao agente indutor da inflamação (lesão/estresse tecidual ou agente patogênico), liberando mediadores moleculares que irão alterar o estado funcional dos tecidos afetados. Essa fase aguda é caracterizada por possuir uma curta duração e um infiltrado celular rico em macrófagos, neutrófilos e proteínas plasmáticas (ROCHA, 2011).

Enquanto a inflamação crônica é caracterizada por possuir uma característica mais persistente do estímulo irritante, promovendo a destruição do tecido e formação de fibrose, com infiltração de células mononucleares aos quais incluem macrófagos, linfócitos e plasmócitos (células produtoras de anticorpos) (ROCHA, 2011).

A resposta inicial da inflamação provocada pela injúria será fornecida pelos macrófagos e mastócitos presentes no local do tecido lesionado. Durante a evolução da resposta inflamatória aguda, os neutrófilos do sangue periférico são as primeiras células que respondem e chegam ao local da injúria, seguido por outras células mononucleares (GARCÍA-RAMALLO *et al.*, 2012; KIGUSHI *et al.*, 2012). A infiltração dessas células imunes em resposta à lesão conduz à subsequente produção e a secreção de mediadores pró-inflamatórios, que estão envolvidos na inflamação e remodelação do tecido associada com a estimulação do nervo (TAKAHASHI *et al.*, 2011) (**figura 4**).

Como o ambiente extracelular que circunda o nociceptor é importante para a geração da dor, após uma lesão são liberados vários mediadores inflamatórios, produzidos por células do sistema imunitário, que podem sensibilizar os nociceptores, e fatores neurotróficos, que além de serem importantes para o bom funcionamento e manutenção dos neurônios podem também contribuir para o desenvolvimento da dor, quando presente em níveis elevados (REICHLING *et al.*, 2013).

Em uma lesão do nervo periférico, por exemplo, as células imunes residentes no local e células gliais associadas ao nervo, como as de Schwann, são ativadas e células do sistema imune presentes na circulação são recrutadas e invadem a lesão no sistema nervoso periférico (KIGUSHI *et al.*, 2010).

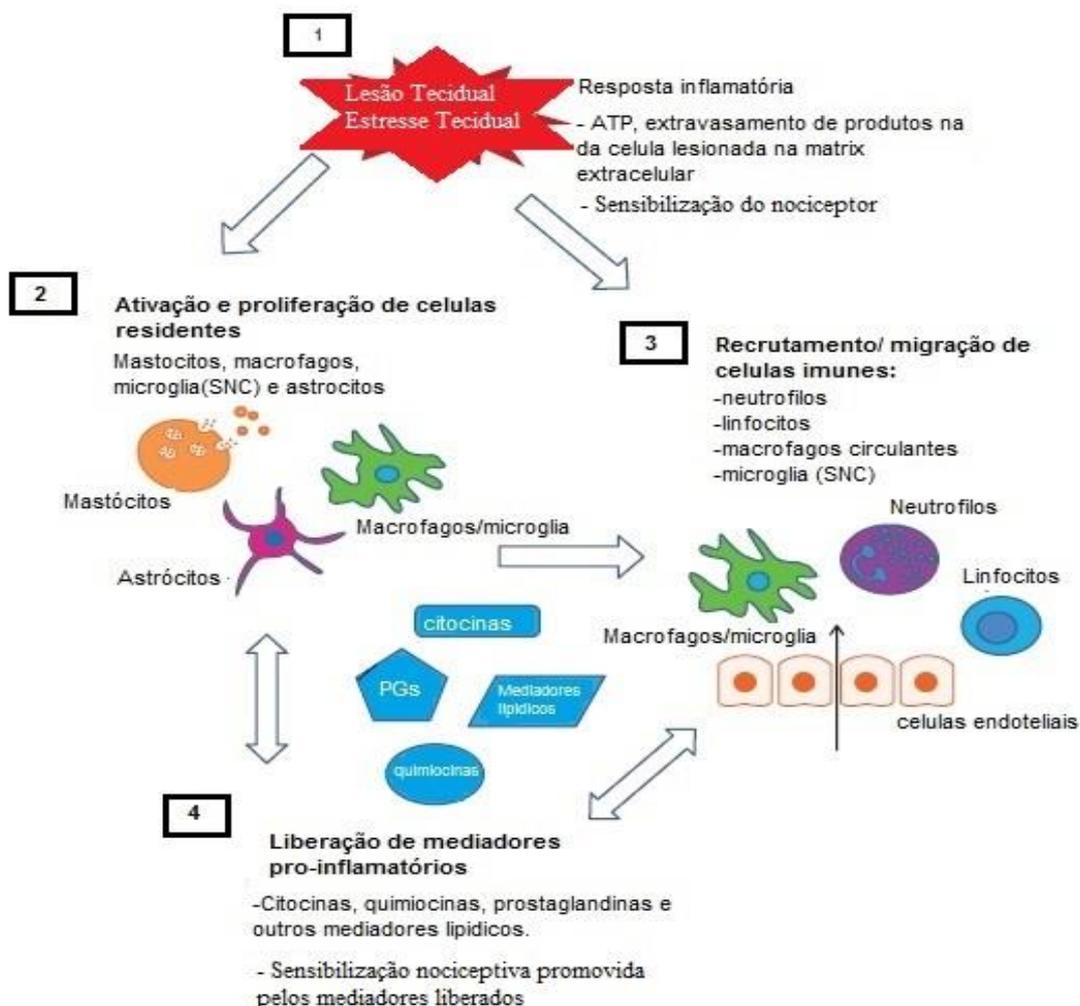


Figura 4: Diagrama esquemático que representa um resumo das fases da resposta inflamatória e consequente sensibilização nociceptiva. 1- A lesão inicial promove o extravasamento extracelular do material contido nas células do tecido agredido, promovendo a resposta imune através da ativação de receptores que respondem lesão/estresse tecidual ou a padrões moleculares associados a agentes patogênicos. 2- Isto induz a proliferação e ativação das células imunes residentes no local da lesão, células como os mastócitos, macrófagos e neutrófilos, além de liberar mediadores inflamatórios como as citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos que promovem o 3- Recrutamento e migração das células imunes, como neutrófilos, macrófagos e linfócitos T (este apenas 7 dias depois do início do processo inflamatório), que estão presentes na circulação e proximidades do tecido lesionado e ocorre também a facilitação de seu deslocamento para o local da injúria. 4- As células imunes ativadas liberam mediadores pró-inflamatórios que irão manter a resposta inflamatória e sensibilizar os nociceptores presentes no local da lesão, promovendo assim, a hiperalgesia primária, que é a que ocorre no local lesionado e propiciando a hiperalgesia secundária, que ocorre ao redor do tecido. Fonte: adaptado de Ellis & Bennet, 2013.

No SNC a microglia e os astrócitos espinhais serão ativados por excitação dos aferentes primários, estas células liberam moléculas pró-inflamatórias no corno dorsal da medula espinhal após a lesão do nervo periférico, promovendo a sensibilização central (KIGUSHI *et al.*, 2012).

Enquanto no SNP, os leucócitos circulantes recrutados, acumulam-se nas proximidades dos nervos danificados, devido a atração promovida pelas moléculas

inflamatórias liberadas pelas células imunes residentes (KIGUSHI *et al.*, 2012), que liberam várias quimiocinas, fatores de crescimento e citocinas, aumentando a sensibilidade e promovendo a inflamação aguda (SHAMASH, REICHERT & ROTSHENKER, 2002; KIGUCHI, *et al.*, 2010).

Uma ampla variedade de agentes endógenos de sensibilização é liberada pelas células imunitárias neste processo: bradicinina, leucotrienos, lipídios bioativos (eicosanóides, diacilglicerol, lisofosfolípidos, esfingolípídeos), neurotransmissores (aminoácidos excitatórios, neurocininas, a serotonina, a noradrenalina, a histamina) e fatores de crescimento (fator de crescimento nervoso, o NGF) (NICKEL *et al.*, 2012), muitos deles irão colaborar para o aumento da sensibilização dolorosa, através de sua ação sinérgica alterando diretamente a sensibilização dos neurônios, ligando-se simultaneamente a receptores presentes no nociceptor e alterando a atividade de canais iônicos presentes no mesmo (**Figura 5**), promovendo maior excitabilidade neural. (LINHART, OBREJA & KRESS, 2003).

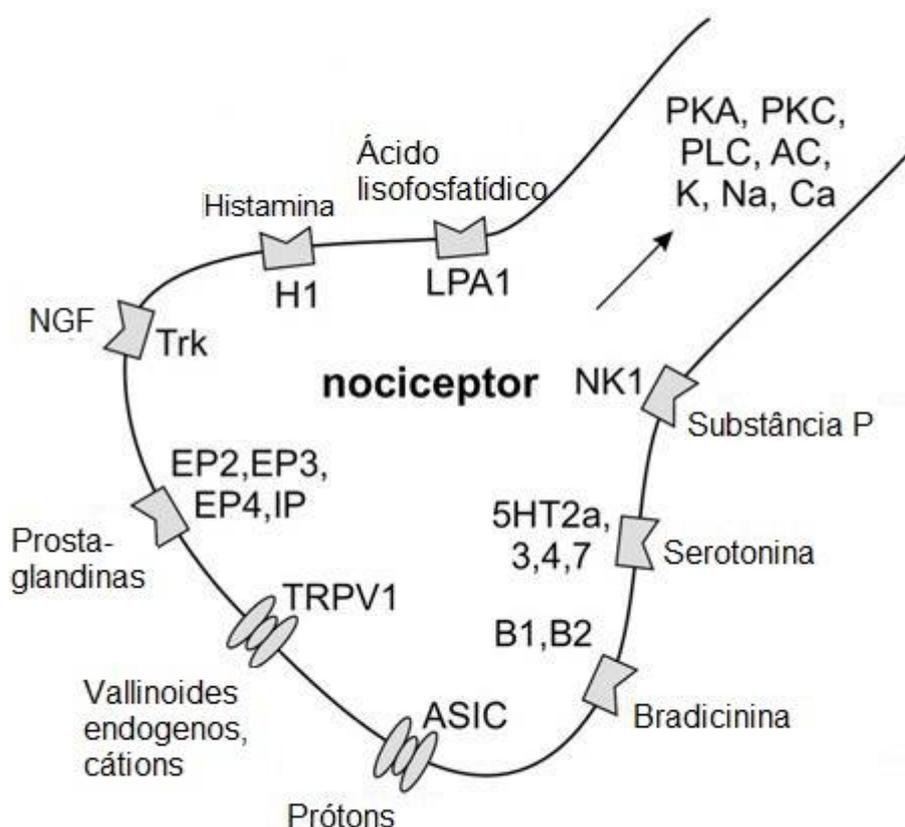


Figura 5: Alguns dos receptores presentes no nociceptor, que colaboram para a sua sensibilização. Fonte: Adaptado de NICKEL *et al.*, 2012.

1.3.3. Mediadores inflamatórios

Na ocorrência de um dano tecidual eminente, um conjunto de alterações na excitabilidade do sistema nervoso periférico e central irá estabelecer uma dor espontânea e hipersensibilidade dolorosa reversível no local do tecido inflamado e região circundante (KOBAYASHI *et al.*, 2012).

Para a realização desse processo diferentes tipos celulares são recrutados induzindo uma produção altamente regulada de vários autacóides, que agem como mediadores pró- e anti-inflamatórios, sendo estes: citocinas como o TNF- α , interleucinas (IL) -1 β , IL-6 e IL-10, NO, prostaglandinas, histamina, o fator de ativação de plaquetas (PAF), serotonina, outros derivados do ácido araquidônico (SILVA *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Isto colabora para a permeabilidade vascular, migração ativa de células do sangue, e a passagem de constituintes do plasma em resposta natural ao tecido prejudicado e como resultado da lesão ocorre também sensibilização nociceptiva, o inchaço e o eritema (ABDALA *et al.*, 2014). Afinal, a sinalização entre os sistemas sensoriais e o sistema imunológico é bi-direcional (CALVO *et al.*, 2012).

1.3.1.1. Autacóides

As prostaglandinas produzidas têm propriedades anti e pró-inflamatórias semelhantes aos de citocinas e elas desempenham um papel importante na resposta inflamatória sistêmica à infecção, lesão de tecido e traumas (HVAS *et al.*, 2014). Ligam-se aos receptores na superfície que se acoplam às proteínas G, vários desses de receptores de prostanóides foram descritos na literatura, como os DP, EP, FP, IP e TP receptores. No qual, os receptores EP e IP são considerados muito importantes na dor inflamatória, pois a prostaglandina E2 (PGE₂), que é um poderoso vasodilatador e sensibilizador nociceptivo, tem sua síntese aumentada na inflamação e este substrato eicosanóide se liga principalmente aos receptores EP, mas em concentrações elevadas (processo inflamatório) se liga com receptores IP (MEVES, 2006).

As prostaglandinas são sintetizadas a partir do ácido araquidônico, presente na bicamada fosfolipídica da membrana de uma variedade de células inflamatórias residentes e recrutadas para o local e pelas células do próprio tecido lesionado, por

duas isoenzimas das ciclo-oxigenases (COX), a COX-1 e COX-2 (PARK & LEE, 2005).

Embora essas enzimas possuam o mecanismo catalítico idêntico, a COX-1 desempenha funções homeostáticas, tais como a manutenção da mucosa gástrica normal, influenciando o fluxo sanguíneo renal e a agregação de plaquetas e a COX-2 mesmo sendo 60% similar a COX-1, tem sua síntese regulada de forma diferente sendo considerada uma isoforma fundamentalmente induzida por processo inflamatório (PARK & LEE, 2005; LAHERA, 2009; FEITOSA *et al.*, 2010).

Dentre as prostaglandinas sintetizadas pelas COXs a PGE₂, a protaciclina (PGI₂) e a prostaglandina D2 (PGD₂), são os de maior importância na modulação da resposta pró-inflamatória e sensibilização nociceptiva (NICOLSON *et al.*, 2007). São poderosos vasodilatadores, sensibilizadores e atuam sinérgicamente com outros mediadores que são liberados como a histamina (liberada principalmente por mastócitos), que também é um vasodilatador e a serotonina (derivada das plaquetas, mastócitos e células endoteliais) que é um potente sensibilizador nociceptivo (MEVES, 2006).

Além disso, a PDE₂ e PGI₂ possuem efeito sobre canais catiônicos, induzindo a hipersensibilidade mesmo sem o estímulo doloroso, diminuindo o limiar de disparo e conseqüentemente aumentando o número de potenciais de ação que são evocados (MEVES, 2006).

A PDE₂ e a serotonina liberadas no dano tecidual interagem para na sensibilização dos neurônios nociceptivos, acoplando suas vias de sinalização, potencializando a indução de aumentos na concentração de Ca²⁺ intracelular (LINHART, OBREJA & KRESS, 2003), aumentando a condutância de Na⁺ e diminuindo a condutância de K⁺, colaborando para a facilitação da despolarização do terminal axonal e promovendo a liberação de neurotransmissores excitatórios como o glutamato (MILLAN, 1999).

Seguindo um caminho similar, porém não menos importante, a síntese e liberação de óxido nítrico (NO) compartilha uma série de semelhanças com as prostaglandinas (PGs), sendo ambos liberados simultaneamente e em grande quantidade na inflamação (MOLLACE *et al.*, 2005).

O óxido nítrico (NO) é um radical, cuja via clássica para a sua síntese envolve a transformação da L-arginina (aminoácido semi-essencial) em um intermediário, a NG-hidroxi-L-arginina, sendo necessária a presença de nicotinamida-adenina-

dinucleotídeo-fostato-hidrogênio (NADPH) e Ca^{2+} , para em seguida, com mais NADPH e O^2 , seja efetuada a formação de L-citrulina e NO, esta transformação é catalisada pelas isoformas indutíveis ou constitutivas de NO sintase (NOS), estando presente em vários processos fisiológicos e patológicos em mamíferos, sendo produzido por diversos tipos celulares (GENOVESE *et al.*, 2013).

Devido à sua penetração intracelular sem a necessidade de intermediários membranosos, o organismo utiliza o NO em funções fisiológicas em que é necessária uma resposta rápida (FILHO & ZILBERSTEIN, 2000).

A NOS possui três isoformas com efeitos biológicos diversos e interagem diretamente com suas moléculas-alvo (BAKER *et al.*, 2009), que interferem na resposta celular e na sinalização do SNP e SNC. O NO sintetizado por iNOS é estimulado pelas citocinas presentes na inflamação e age interferindo no sistema imunitário, enquanto o NO produzido pela eNOS é um mediador solúvel de vasodilatação, promovendo o relaxamento da musculatura lisa endotelial e facilitando a migração de células inflamatórias para o local da inflamação e o NO sintetizado pela nNOS é cálcio/calmodulina dependente e interfere principalmente na transmissão sináptica (MOLLACE *et al.*, 2005).

As funções do NO que já foram descobertas ainda são bem complexas e antagônicas, por possuir capacidade de ser benéfica ou potencialmente tóxica, dependendo da concentração ou depuração tecidual (FILHO & ZILBERSTEIN, 2000). Por isso, se faz importante à pesquisa com os inibidores de sua síntese, tais como o NG-monometil-L-arginina (L-NMMA), NG-nitro-L-arginina (L-NNA) e o NG-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME). Estes inibidores têm grande importância na pesquisa dos prováveis efeitos do NO nos tecidos, uma vez que a substituição do substrato habitual (L-arginina) pelos análogos irá inibir a produção de NO e seus efeitos consequentes (FILHO & ZILBERSTEIN, 2000).

Outro autacóide de extrema importância para o processo inflamatório é a histamina, sendo um mediador responsável pela sensação de dor imediata, denominada de “reação de hipersensibilidade imediata”, esta reação é causada por reações de antígeno-anticorpo em um tecido que foi sensibilizado, assim como a ativação da imunidade inata, devido ao processo inflamatório eminente (MATSUI *et al.*, 2015).

Esse mediador pertence à classe das aminas biogênicas e é sintetizada a partir do aminoácido histidina, sob a ação da L-histidina decarboxilase (HDC), a qual

contém piridoxal fosfato (vitamina B6) (CRIADO *et al.*, 2010). A liberação da histamina é iniciada com influxo de Ca^{+2} em células como mastócitos, basófilos, plaquetas, neutrófilos, macrófagos e outros, promovida pela ativação destas células, devido ao processo inflamatório, colaborando para liberação vesicular deste mediador (CRUVINEL *et al.*, 2010).

Após sua liberação ocorre um aumento no influxo de Ca^{+2} das células imunitárias ainda inativas, além de propiciar sua ativação, a histamina promove também o recrutamento e migração das células imunitárias para o local da lesão/inflamação, ajuda nas mudanças fisiológicas promovidas pela inflamação, como vasodilatação e mudanças na permeabilidade vascular, também colabora para a produção de citocinas e quimiocinas, tudo isso mediado por receptores histaminérgicos ativados pela histamina (CRUVINEL *et al.*, 2010; CRIADO *et al.*, 2010; GALEOTTI *et al.*, 2013). E a PGE_2 , que também é induzida pela inflamação, colabora para a maior sensibilização do DRG para a histamina (NICOLSON *et al.*, 2007; ESKANDARI *et al.* 2015).

Existem 4 subtipos de receptores hitaminérgicos diferentes acoplados a proteína G (HR1; HR2; HR3; HR4). Dentre seus receptores, o H1 está positivamente relacionado com o aumento do Ca^{+2} intracelular e indução da produção de óxido nítrico (MILLAN, 1999).

O receptor hitaminérgico H1 ativa a hidrólise do fosfatidilinositol mediada pela proteína G, resultando em um aumento do trifosfato de inositol. Os receptores H1 são expressos primariamente nas células endoteliais vasculares e nas células musculares lisas e são os principais receptores ativados nas reações inflamatórias e alérgicas. As respostas teciduais específicas à estimulação dos receptores H1 estão relacionadas com a formação de edema, broncoconstrição e a sensibilização das terminações nervosas aferentes primárias. Estes receptores também estão envolvidos na modulação do ciclo circadiano e com o estado de vigília (GOLAN, 2009).

Um possível mecanismo de ação para o efeito da inibição dos receptores H1 sobre o acúmulo de células inflamatórias e sua ativação nos tecidos é sua capacidade de suprimir a ativação do fator nuclear kappa B ($\text{NF-}\kappa\text{B}$), que é um fator de transcrição onipresente que se liga às regiões promotoras de muitos genes reguladores da produção de citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão. Por

isso bloqueadores de H1 como a cipro-heptadina promovem diminuição das respostas inflamatórias e alérgicas (CRIADO *et al.*, 2010).

Tabela 1- Mediadores inflamatórios, tabela modificada de MORI, 2010.

Mediador Inflamatório	Ação sobre os nociceptor	Características e Efeitos
Substância P	Ativação e/ou sensibilização	Hiperálgia direta e indireta por atuação em receptores NK-1, sinergismo com o glutamato.
Prostaglandinas	Sensibilização e/ou Ativação	Hiperálgia em modelos de dor inflamatória e neuropática sensível aos inibidores da ciclooxigenase.
NO	Sensibilização	Indução de analgesia ou hiperálgia, dependente da concentração.
Bradicinina	Ativação e/ou sensibilização	Hiperálgia mediada por receptores B2 constitutivos e B1 induzidos pela inflamação, além do aumento da síntese de outros mediadores em modelos de dor aguda e crônica (neuropática). Sensibilização de receptores TRPV1.
NGF (fator de crescimento neural)	Sensibilização	Modulação da expressão gênica de nociceptores, sensibilização de receptores TRPV1.
Citocinas pró-inflamatórias: Interleucina (IL)-1, IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral (TNF)	Sensibilização	Hiperálgia em modelos de dor aguda inflamatória e crônica (neuropática).
Histamina	Sensibilização	Sensibilização direta dos nociceptores em doses elevadas e tem parte de sua indução e potencial de sensibilização nos neurônios do DRG promovida por PDE ₂ .
Serotonina	Sensibilização	Indução de analgesia ou hiperálgia, dependente da concentração e local, sendo SNP ou SNC.

1.4. ANALGESIA: DROGAS UTILIZADAS

Várias estratégias são utilizadas no controle da dor, variando de acordo com a gravidade do processo doloroso. As formas mais comuns de tratamento envolvem a utilização de analgésicos que oferecem desde uma capacidade mais fraca, como os anti-inflamatórios (esteroidais e não esteroidais), a medicamentos mais fortes como

os analgésicos opióides e outros fármacos que irão exercer efeito direto no processamento central da dor (KING *et al.*, 2013).

Dentre todas as classes de fármacos analgésicos os anti-inflamatórios são os mais comumente comercializados, muitas vezes utilizados sem a necessidade de prescrição médica por apresentarem um efeito analgésico fraco, caracterizado por promover analgesia devido a sua capacidade de interferir no processo inflamatório.

Os anti-inflamatórios são divididos em dois tipos, os anti-inflamatórios não esteroidais e os esteroidais (RANG, 2011).

A utilização de anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) para analgesia é frequente, eles agem se ligando ao sítio de isoleucina na COX-1 e ao sítio de valina na COX-2, competindo com o ácido araquidônico em ambos os sítios das Ciclooxigenases, agindo de forma não seletiva e impedindo a produção de prostaglandinas e outros eicosanóides (KUMER & COELHO, 2002; PARK & LEE, 2005). Todavia, um de seus principais efeitos adversos é a formação de lesões na mucosa gástrica, justamente por impedir a produção de eicosanóides constitutivos mediados principalmente pela COX-1 (RANG, 2011).

Com isso, pesquisas envolvendo a inibição apenas da COX-2, os chamados coxibes, pareciam apresentar uma nova perspectiva. Entretanto, estudos feitos com os bloqueadores específicos de COX-2 demonstraram que os coxibes possuem efeitos adversos mais graves que os inibidores inespecíficos da COXs, sendo capazes de promover embolia, alteração na regulação renal e problemas cardíacos (KUMER & COELHO, 2002).

Enquanto a classe dos anti-inflamatórios esteroidais (AIES), que são os corticóides e seus derivados, representa uma classe de fármacos que é mais comumente empregada no tratamento de doenças inflamatórias, agindo como imunossupressor, antialérgico e anti-inflamatório. No entanto, a sua capacidade de suprimir a cascata inflamatória é capaz de suscitar a analgesia (GOES *et al.*, 2014).

Os glicocorticóides possuem sua ação através da supressão de cascatas inflamatórias, quer através de uma supressão direta do processo inflamatório ou por melhorar os mecanismos anti-inflamatórios. (HAMEED AND JOSEPH, 2012; MIENKE *et al.*, 2014). Entretanto, o uso prolongado de glicocorticoides pode levar a efeitos colaterais como o ganho de peso, enfraquecimento dos ossos, síndrome de cushing, supressão da resposta inflamatória a infecções e lesões, hiperglicemia e outros (RANG, 2011).

Em vista disso, a procura de novos compostos com potencial terapêutico eficaz e com o mínimo de efeitos colaterais se faz necessária, apresentando novas perspectivas terapêuticas para o controle e até mesmo extinção da dor, pois, essa busca ainda é uma tarefa desafiadora e tem um impacto substancial na qualidade de vida dos pacientes (FINNERUP, 2013). E nesta procura temos a exploração de tratamentos eficientes a partir de medicamentos advindos de plantas, que engloba uma ampla gama de conhecimentos, que englobam aspectos agrônômicos, botânicos, químicos, farmacológicos e toxicológicos (BRANDÃO *et al.*, 2010).

Muitas plantas ainda têm sua atividade medicinal pouco explorada, representando ainda uma importante fonte para novas identificações moleculares, principalmente por elas apresentarem capacidade de produzir constituintes de difícil obtenção. Estima-se que apenas 6% das aproximadamente 300.000 espécies de plantas existentes (supõe-se que há muito mais que isso) tenham sido investigadas sistematicamente e farmacologicamente, e destas apenas cerca de 15% fitoquimicamente (CRAGG AND NEWMAN, 2013).

A maior parte das pesquisas ainda envolve a utilização de extratos e na maioria das vezes necessita-se da utilização de altas doses do extrato para se obter o resultado esperado, podendo gerar efeitos colaterais indesejados, devido a associação dos vários componentes presentes na planta. Por isso, o processamento e isolamento dos princípios ativos de uma planta se fazem necessários, pois assim pode-se analisar de forma mais apurada a sua capacidade farmacológica. Avaliar sua eficácia biológica sem a associação com os outros componentes da planta e em muitos casos é possível até mesmo determinar o seu mecanismo de ação (SAAD *et al.*, 2009).

O estudo para avaliação de substâncias isoladas se faz importante, pois existem compostos que no uso indiscriminado podem promover efeitos tóxicos, mas existem também compostos que podem vir a servir como protótipos para a síntese de novos medicamentos com atividades biológicas e terapêuticas similares ou melhores do que os presentes atualmente no mercado, ou ainda podem ser ligeiramente modificados de modo a torná-los mais eficazes ou menos tóxicos (SPONCHIADO *et al.*, 2015). E nessa busca, as abordagens em modelos animais para a comparação com os problemas clínicos apresentados pelos seres humanos possibilita a progressão na investigação de possíveis agentes potenciais terapêuticos para o tratamento da dor (SIKANDAR *et al.*, 2013).

1.5. SISTEMÁTICA E DISTRIBUIÇÃO

1.5.1. *Família: Piperaceae*

Pertencente a ordem Piperales, a família Piperaceae supera todas as outras famílias da ordem Piperales e quaisquer outras famílias de plantas “angiospermas basais”, por ter o maior e mais rico número de espécies angiospermas registradas, somando aproximadamente 4.300 espécies, o que compreende cerca de 1,7% da diversidade de plantas angiospermas no mundo (WANKE *et al.*, 2006; SAMAIN *et al.*, 2011).

As plantas desta família são compreendidas em arbustos, lianas, epífitas, ervas e pequenas árvores. Diversos estudos avaliaram os princípios ativos de suas plantas, confirmando a atividade biológica de várias espécies pertencentes à Piperaceae (RUIZ *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2014).

Compreendendo cinco gêneros, *Verhuellia*, *Peperomia*, *Piper*, *Manekia* e *Zippelia*, que são abundantemente distribuídos pelos continentes americano e asiático (SANTOS *et al.*, 2014). Entretanto, as plantas dessa família também se fazem presentes em outros continentes por causa de sua preferência por climas de regiões tropicais, como mostra a (figura 6). (SANTOS *et al.*, 2001).

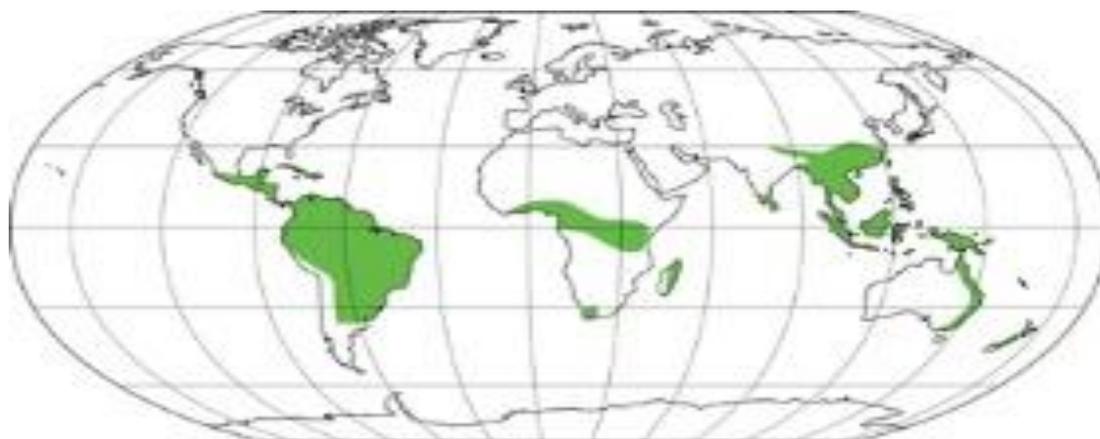


Figura 6: Distribuição pantropical da família Piperaceae. Fonte: Laboratório de Sistemática de Plantas Vasculares. Disponível em: <http://www.thecompositaehut.com>.

A Piperaceae tem os gêneros *Peperomia* e *Piper* como os mais ricos em espécies registradas, estes também são pertencentes à subfamília Piperoidae (SAMAIN *et al.*, 2009). São gêneros estreitamente relacionados, pois além de

compartilharem limites geográficos semelhantes, possuem a capacidade de crescer sob condições de pouca luz e com a disponibilidade de água variável (HORNER, 2012).

Esta família possui uma ampla distribuição no Brasil, ocorrendo em todo o país e com maior riqueza de espécies na floresta Atlântica e Amazônica. Com cerca de 450 espécies encontradas no país, pertencentes aos gêneros *Manekia*, *Peperomia* e *Piper* (JUNIOR *et al.*, 2013).

1.5.2. O gênero: *Peperomia*

As *Peperomias sp.* apresentam cerca de 1.500 - 1.700 espécies registradas atualmente, cuja a distribuição pode ocorrer em regiões tropicais de qualquer continente, mas elas são mais diversamente distribuídas no neotrópico, que possui cerca de 90% de suas espécies, sendo encontradas pelo Sudeste da Ásia, África, Austrália e Nova Zelândia (WANKE *et al.*, 2006; MATHIEU *et al.*, 2008; ZANOTTI *et al.*, 2012).

Estas plantas florescem em ambientes úmidos, de climas tropicais e subtropicais, crescendo principalmente em áreas que promovam sombra nestes ambientes. Com capacidade de crescer a uma altura que varia de 15 a 45 cm, sendo menos frequente em florestas secas e savanas (CARVALHO-SILVA *et al.*, 2013; OOI *et al.*, 2012).

Este gênero é botanicamente caracterizado por suas folhas suaves, carnudas e em forma de coração (**figura 7**), caules suculentos, raízes superficiais e flores diminutas, possuindo sementes minúsculas que crescem gradativamente inerentes sobre os picos de cordão (OOI *et al.*, 2012), possuindo uma taxa tanto de plantas epífitas quanto terrestres (CARVALHO-SILVA *et al.*, 2013).

Provavelmente todas as espécies apresentam um tecido adaxial, tecido que seria relativo a “escamas” podendo possuir uma epiderme múltipla (pluriestratificada) ou com hipoderme em multicamadas. As duas tendências na estrutura da folha dessas plantas estão correlacionados com a adaptação às condições climáticas tendo como principal função a reserva de água (PINO *et al.*, 2012).



Figura 7: Folhagem característica das plantas do gênero *Peperomia*: 1- *Peperomia galloides*, 2- *Peperomia obtusifolia* e 3- *Peperomia blanda*. Fonte: The Garden of Vila PortoMare. Disponível em: <http://vpmgardens.blogspot.com.br/>.

Esse gênero é utilizado popularmente na culinária e ornamentação, e devido a sua fácil reprodutibilidade, estas espécies são facilmente encontradas e cultivadas. Muitas dessas plantas são utilizadas também na medicina popular para o trato de diversas doenças (SANTOS *et al.*, 2014) e já possuem ação medicinal comprovada, através de estudos realizados com algumas de suas espécies.

Existem estudos onde se observou em muitas plantas desse gênero a presença de cromenos, (BATISTA *et al.*, 2012), uma classe especial de secolignanas (compostos derivado da rota biossintética dos fenilpropanoides) conhecidas como peperominas A, B, C e E, além de possuir também flavonóides e lignanas tetrahidrofuranas, que demonstraram atividades biológicas importantes, como atividade citotóxica para células cancerígenas, potenciais anti-HIV e atividade anti-inflamatória (FELIPPE *et al.*, 2011; NWOKOCHA *et al.*, 2012; OOI *et al.*, 2012; SALAZAR & KATO, 2012; WANG *et al.*, 2014) e antiangiogênica (LIN *et al.*, 2011).

Assim como, arilpropanóides com atividade antibacteriana (OOI *et al.*, 2012), lignanamidas com atividade antitumoral (LI, TONG & HUANG, 2012), fitoesteróis (campesterol e estigmasterol), policetídeo (como os meroterpenos) com atividade antiangiogênica, que serviriam para evitar a alimentação de células cancerosas pela criação de novos vasos (WANG *et al.*, 2012) e xantonas, conhecidas por ter ação anti-inflamatória.

Outros estudos também foram realizados com óleos essenciais da *Peperomia* sp. e demonstraram a presença de mono- e sesquiterpenos, α -humulenos, acetato (E)-neronidol e (Z)-neronidol e fenilpropanol oxigenado. Na espécie *Peperomia pellucida* observou-se atividade anti-inflamatória, analgésica, antipirética e antimicrobiana (PINHEIRO *et al.*, 2011).

A maioria dos óleos essenciais estudados da *Peperomia sp.* possuem em sua composição a presença de fenóis, que vão desde os mais simples aos mais complexos, como os taninos e antraquinonas, que possuem atividade antimicrobiana e antifúngica, estes óleos também possuem flavonóides, flavonas e principalmente as C- e O-flavonas, que podem apresentar atividades anti-inflamatória, antioxidante e antiviral (FELIPPE *et al.*, 2011).

Para a espécie *Peperomia serpens*, Pinheiro e colaboradores (2011), demonstraram a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória com o óleo essencial desta planta. E também para os extratos das espécies *P. vulcânica*, *P. fernandopoiiana* (MBAH *et al.*, 2012) e *P. galioides* (LANGFIELD *et al.*, 2004), já foi comprovado os potenciais antimicrobiano e antifúngico destas plantas. Dentre todas as espécies com atividades biológicas pesquisadas a *Peperomia pellucida* é a espécie cujas atividades biológicas são mais frequentemente estudadas.

1.5.3. *Peperomia pellucida*

A *Peperomia pellucida* possui uma ampla distribuição no Brasil (**figura 8**), sendo frequentes nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, toda a região Centro-oeste, Bahia, Pernambuco, Ceará, Pará, Amapá, Amazonas, Roraima e Acre (GUIMARÃES *et al.*, 2012). Popularmente conhecida nestas regiões como "coraçõzinho", "língua de sapo", "erva-de-vidro", e "erva-de-jabuti" (ARRIGONI-BLANK *et al.*, 2004).

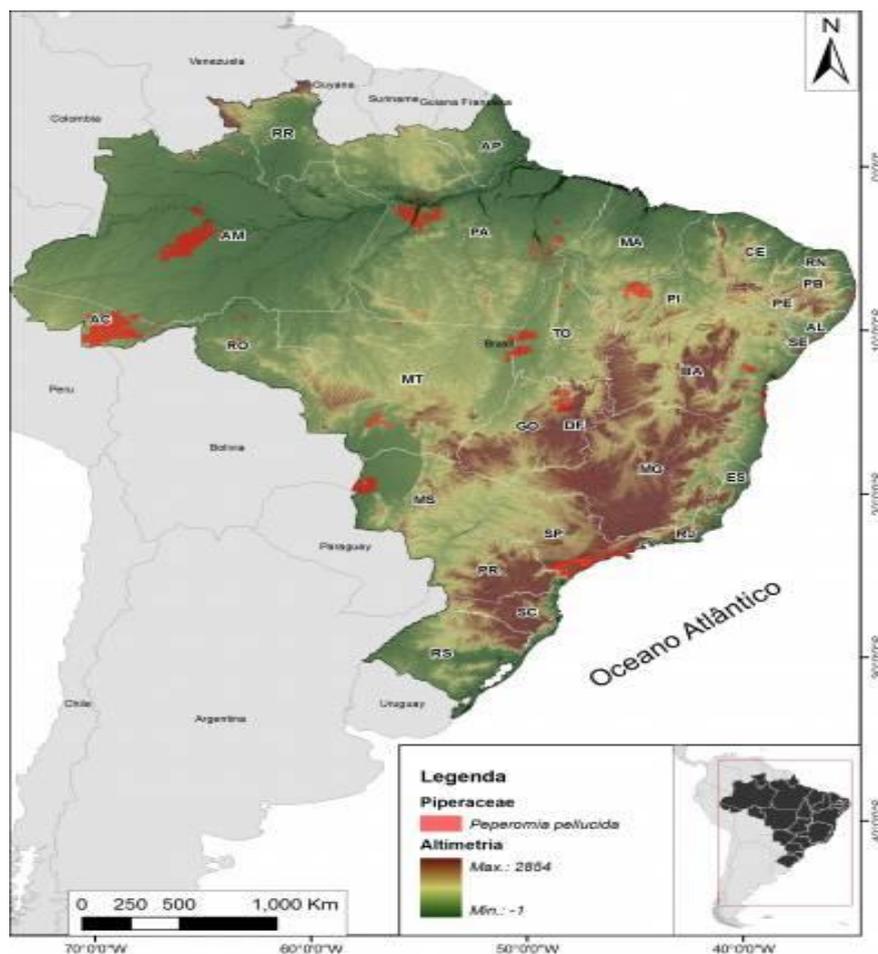


Figura 8: Distribuição geográfica da *P. pellucida* no Brasil em 2012. Fonte: Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em: <http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/>.

Na medicina popular, a espécie *Peperomia pellucida* (figura 9) é utilizada para tratar processos dolorosos diferentes, como cefaléia e dor reumática e também como tratamento de asma, úlceras gástricas, redução do índice de colesterol no sangue, conjuntivite, furúnculos, abscessos, fadiga, auxilia na terapia de hipertensão e disfunção renal, além de ser usada, por inteiro, como emoliente (ARRIGONI-BLANK *et al.*, 2004; NWOKOCHA *et al.*, 2012; OOI *et al.*, 2012).

No âmbito científico existem estudos comprovando sua eficácia farmacológica, como em estudos feito por Nogueira e colaboradores (2013), no qual utilizaram o extrato etanólico da espécie, demonstrando um efeito positivo deste extrato na estimulação de osteoblastos, acelerando o processo de recuperação de fraturas ósseas.



Figura 9: Figura ilustrativa da espécie *Peperomia pellucida*. Fonte: Jungle key. Disponível em: <http://www.junglekey.fr/>.

Estudos anteriores também confirmaram o efeito antimicrobiano desta espécie contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (MENDES *et al.*, 2011). A decocção das suas folhas é recomendada por suas propriedades anti-inflamatórias e analgésicas, particularmente contra a gripe, a tosse e asma. Arrigoni-Blank e colaboradores (2004), utilizando o extrato aquoso da planta, comprovaram cientificamente a atividade anti-inflamatória e analgésica da *P. pellucida* e através do ensaio do edema de pata induzido por ácido araquidônico demonstraram que o extrato atua interferindo na síntese de prostaglandinas.

Enquanto, NWOKOCHA e colaboradores (2012), demonstraram a ação hipotensiva do extrato aquoso da *P. pellucida*, promovendo bradicardia e vasorelaxamento em anéis aórticos de ratos pelo ensaio de banho órgãos. Neste ensaio o extrato foi associado com a atropina (antagonista competitivo não seletivo da acetilcolina), o propranolol (anti-hipertensivo), a mepiramina (antagonista do receptor histamínico H1) e o L-NAME (um inibidor não seletivo das enzimas NO sintase) e os resultados deste estudo sugeriram que a ação hipotensiva do extrato está relacionada com mecanismos dependentes de óxido nítrico.

Dentre os poucos estudos que envolvem os componentes isolados dessa espécie, Xu e colaboradores (2006), isolaram 11 compostos de seu extrato etanólico, dentre eles 5 novos compostos, sendo eles: 2 secolignanas, 2 lignanas tetrahidrofuranas e um hidronaftaleno altamente metilado. E na avaliação do potencial bioativo para atividade citotóxica contra as linhagens celulares HL-60, MCF-7 e HeLa, 2 desses compostos demonstraram ser eficazes.

Em um recente estudo como o de Rojas-Martínez e colaboradores (2013), avaliaram e comprovaram o efeito gastroprotetor dos extratos hexânico e diclorometânico da *P. pellucida* contra úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos. Sendo, então, o extrato de diclorometano que possuiu melhor efeito, onde foi fracionado em 5 frações e 4 deles apresentaram ação gastroprotetora considerável, sugerindo que a *P. pellucida* possui mais do que um composto ativo.

1.6. PELLUCIDINA A

Embora a espécie *Peperomia pellucida* tenha uma ampla utilização popular e possua estudos que comprovem a eficácia biológica de seus extratos, ainda existem poucas substâncias que foram isoladas desta planta, substâncias essas como a pellucidina A (**figura 10**).

A pellucidina A é um composto dimérico, cujo nome IUPAC é benzene, 1,1'-[(1R,2S)-1,2-cyclobutanedilyl] bis [2,4,5-trimethoxy-, rel- (9Cl) e sua via de biossíntese ainda não foi totalmente definida. A substância foi isolada da espécie *P. pellucida* por Bayma e colaboradores (2000), onde foi demonstrada a forma de coleta e padronização do método de isolamento da pelludina A.

A antiga via de biossíntese proposta para a pellucidina A envolvia a perda de CO₂ de duas lignanas, mas a presença do ArC2 (anel aromático ligado a dois carbonos) sintetizado a partir do 2,4,5-trimetoxi-estireno presente na *P. pellucida*, sugere uma outra possibilidade, onde a pellucidina A possa ser um tipo de derivado intermediário do 2,4,5-trimetoxi-estireno, acreditando-se que a pellucidina A é formada por uma enzima estereoespecífica que medeia o acoplamento redutivo de duas unidades de 2,4,5-trimetóxi-estireno (Bayma *et. al.*, 2000).

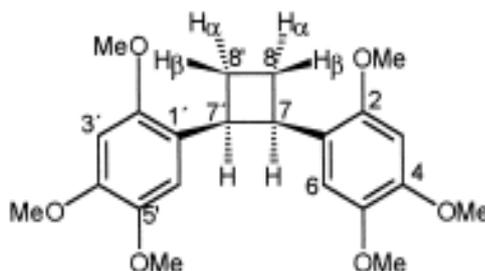


Figura 10: Estrutura da pellucidina A. Fonte: Bayma *et al.*, 2000.

Este composto ainda não possui informações sobre as suas possíveis atividades biológicas e por isso a avaliação de sua bioatividade se faz necessária, para que assim possa se determinar suas possíveis aplicabilidades terapêuticas e no futuro, talvez, até viabilizar a sua utilização farmacêutica como uma droga de atividade analgésica ou para outras aplicabilidades.

O intuito deste estudo é primordialmente avaliar a atividade antinociceptiva da pellucidina A e na procura de novas drogas de atividade antinociceptiva ou até mesmo sedantes, os modelos de indução da dor aguda se fazem eficientes, pois medem as respostas comportamentais de animais saudáveis expostos a estímulos nocivos, sendo extremamente úteis e mais comumente utilizados para este tipo de avaliação (WALKER, FOX & URBAN, 1999).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da pellucidina A e elucidar o mecanismo de ação em modelos *in vivo*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o efeito da pellucidina A no desempenho locomotor dos animais pelo ensaio de campo aberto;
- Investigar a atividade antinociceptiva da pellucidina A pelo modelo de ácido acético a 0,6%;
- Avaliar a atividade antinociceptiva da pellucidina A em modelo de nocicepção induzida por formalina a 2,5%;
- Analisar a atividade antinociceptiva da pellucidina A em modelo de nocicepção térmica induzida pela placa-quente;
- Elucidar o mecanismo de ação da pellucidina A pelo modelo de ácido acético a 0,6%;
- Investigar a ação anti-inflamatória da pellucidina A em modelo de granuloma induzido por pelotas de algodão.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. DROGAS E REAGENTES

A morfina, indometacina, naloxona, diazepam, NS-398, cipro-heptadina, anlodipino, escopolamina, foram adquiridos de companhias com comprovada certificação de qualidade. O L-NAME, foi adquirido na Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO-E.U.A.). A formalina foi adquirida da Merck Sharp & Dohme, o ácido acético glacial foi adquirido do Merck e os outros reagentes foram adquiridos de companhias com comprovada certificação de qualidade.

A pellucidina A é uma substância purificada, que foi extraída da planta *Peperomia pellucida*, e foi cedida pela Prof.^a Dr.^a Mara Arruda do Laboratório Central de Extração. A pellucidina A foi diluída em PBS (1mg/1ml) e administrada nos animais por via intraperitoneal.

3.2. ANIMAIS

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos suíços adultos machos (25-40g), obtidos no biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará. Os animais foram alojados em gaiolas, 4 animais por gaiola, e mantidos sob condições controladas de temperatura (25°C) e ciclo de claro/escuro de 12h: a fase clara iniciando-se às 6h e terminando às 18h, com livre acesso a água e ração, até a realização dos ensaios, antes dos testes os animais foram deixados em jejum por um período de 6 horas.

O estudo foi devidamente submetido ao comitê de ética em pesquisas com animais da Universidade Federal do Pará, projeto foi aprovado pelo comitê e o número do parecer é CEUA-UFGA Nº 5671030216.

3.3. PARAMETRO PARA AVALIAÇÃO LOCOMOTORA

3.3.1. Campo aberto

O teste de campo aberto pode ser utilizado para avaliar drogas de atividade ansiolíticas ou sedantes (PRUT & BELZUNG, 2003).

Para a realização deste ensaio foi utilizado um aparelho que consistia em uma arena de madeira quadrada (100 cm x 100 cm x 20 cm), com paredes internas pintadas de preto. O piso da arena de madeira foi dividido igualmente em 25 quadrados marcados por linhas brancas. No teste, cada grupo com n= 6 animais, no qual cada camundongo foi colocado individualmente no canto esquerdo da arena, de onde lhe foi permitido a livre exploração do ambiente. O número de cruzamentos das linhas e as bipedestações que o animal realizou foram contabilizados durante um período de teste de 5 minutos. A arena foi limpa com álcool depois da ocupação de cada animal. A pellucidina A foi administrada na dose de 0,5, 1 e 5 mg/kg, por via intraperitoneal 30 minutos antes do ensaio, assim como o controle positivo, diazepam, que foi administrado na dose de 2 mg/kg intraperitonealmente e o controle no qual foi administrado apenas o veículo em que a Pellucidina A foi solubilizada (PBS 10 ml/kg i.p.).

3.4. MODELOS EXPERIMENTAIS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

3.4.1. Modelo de dor visceral: contorções abdominais induzidas por ácido acético

O teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético a 0,6% é um modelo de dor aguda, induzida pela inflamação provocada na região intraperitoneal, este modelo geralmente é utilizado para triagem de substâncias com atividade antinociceptiva, que podem agir tanto a nível periférico como central.

O ensaio consiste na administração intraperitoneal de um agente que irrita as membranas serosas e provoca um comportamento muito estereotipado no camundongo, caracterizado por contrações abdominais, movimentos do corpo como um todo (em particular das patas traseiras), torção dos músculos dorsoabdominal e uma redução da atividade motora (LE BARS *et al.*, 2001). Estes comportamentos são considerados reflexos, sendo uma evidência da dor visceral.

O teste foi realizado como anteriormente descrito por Koster e colaboradores (1959). A Pellucidina A foi administrada nas doses de 0,5, 1 e 5 mg/kg, por via intraperitoneal 30 minutos antes da administração do ácido acético a 0,6 % nos

camundongos (n=6). Assim como os animais do controle, (PBS 10 ml/kg i.p.) e a indometacina, utilizada na dose de 5 mg/kg (i.p.) como controle positivo.

A diminuição do número de contorções abdominais no ensaio foi considerada indicativa de resposta antinociceptiva. Ao final do ensaio os animais foram eutanasiados de acordo com os procedimentos exigidos pelo CEUA-UFPA.

3.4.2. Modelo bifásico: nocicepção induzida pela formalina

O teste de formalina foi realizado tal como descrito por Corrêa e colaboradores (1996). Este é considerado um modelo de dor aguda que envolve estrutura somática, pois a pele que é estimulada. Uma solução de formalina a 2,5% é injetada na superfície intraplantar da pata dos camundongos e provoca um comportamento doloroso que pode ser avaliado em uma escala, onde o parâmetro medido é o número de lambidas ou mordidas realizada pelo animal em sua pata por uma determinada unidade de tempo, que é medido em segundos.

O ensaio possui uma característica bifásica bem delimitada, consistindo em uma primeira fase (0-5 minutos após a injeção) conhecida como fase neurogênica e a segunda fase (15-30 minutos após a aplicação da formalina), denominada de fase inflamatória.

Os grupos (n = 6) foram tratados com pellicidina A nas doses de 0,5, 1 e 5 mg/kg. No grupo controle foi aplicado um volume semelhante de veículo (PBS 10 ml/kg). Foram realizados controles positivos com a indometacina (5 mg/kg i.p.) e morfina (4 mg/kg, s.c.), para cada fase do ensaio.

Todos os grupos foram tratados 30 min antes da injeção de formalina, somente a morfina foi feita administração subcutânea 15 minutos antes, devido sua alta lipofilicidade.

Uma redução significativa do tempo que os camundongos levaram para lamber a pata após a aplicação da formalina foi considerado indicativo de atividade antinociceptiva. Após o ensaio os animais foram devidamente eutanasiados seguindo o protocolo proposto pelo CEUA-UFPA.

3.4.3. Modelo supra-espinhal: nocicepção induzida pela placa-quente

Na placa-quente o estímulo nocivo é promovido pela indução térmica do nociceptor, onde o camundongo é introduzido em um espaço cilíndrico aberto com piso constituído por uma placa metálica que é aquecida a 55 ± 0.5 °C. Os animais submetidos a esta temperatura constante produzem dois componentes comportamentais que podem ser medidos através do tempo de reação ao estímulo térmico, que são o lamber da pata e o salto, ambas são consideradas respostas supra-espinhalmente integradas (MacDonald *et al.*, 1946). O tempo de latência é o tempo medido em segundos para a manifestação da reação do animal sobre a placa.

Os camundongos foram testados de acordo com o método descrito por MacDonald e colaboradores (1946). Os grupos de camundongos (n=6) foram tratados com pellucidina A (0,5, 1 e 5 mg/kg, i.p.), um grupo foi tratado com a morfina (10 mg/kg s.c.), para controle positivo e o grupo controle recebeu um volume semelhante de veículo (PBS 10 ml/kg i.p.).

Cada animal foi testado um dia antes do ensaio sem utilização de qualquer tipo de droga que pudesse promover interferência em sua resposta basal (latência basal) e foram utilizados apenas os animais que responderam a placa no tempo máximo de 15 segundos.

O experimento foi realizado durante 2 horas, em intervalos de 30 min (0, 30, 60, 90 e 120 min) e o tempo de corte para a latência do animal foi de 30s. Um aumento significativo do tempo de latência dos camundongos sobre a placa aquecida foi considerado indicativo de atividade antinociceptiva. Após o ensaio os animais foram devidamente eutanasiados seguindo o protocolo proposto pelo CEUA-UFPA.

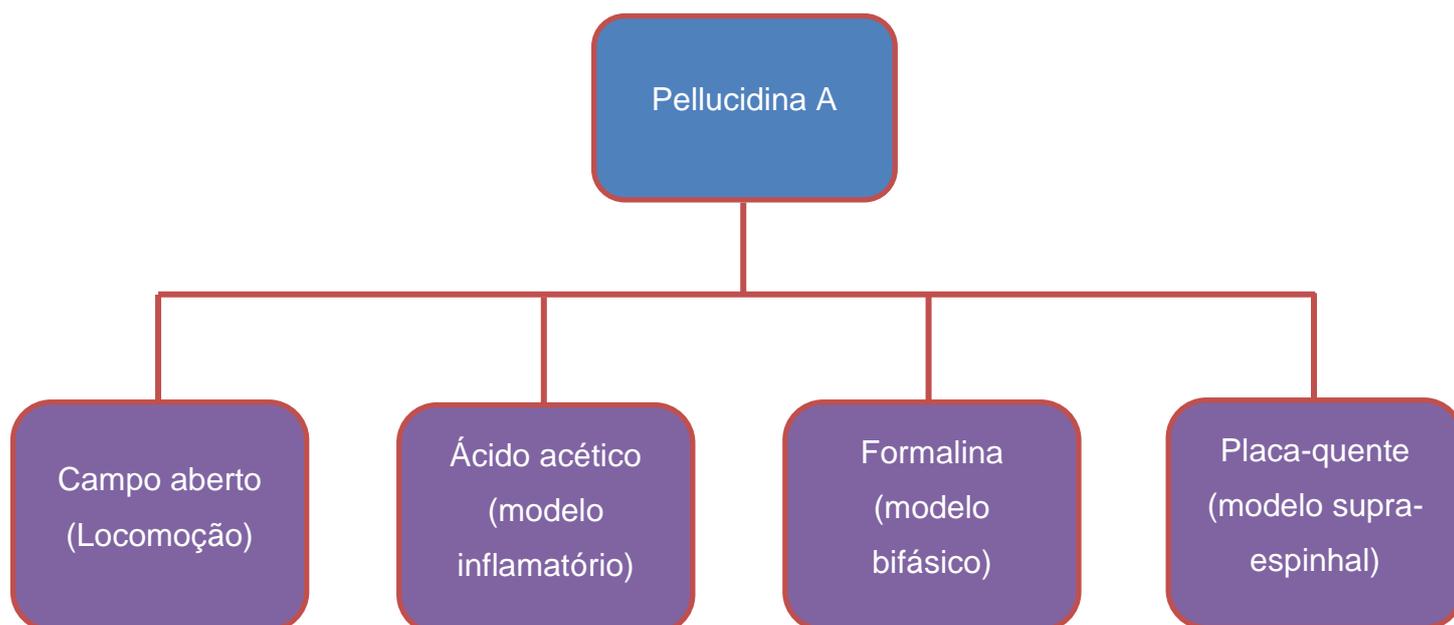


Figura 11: Fluxograma dos ensaios nociceptivos.

3.5.ELUCIDAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO POR ÁCIDO ACÉTICO 0,6%

Os grupos (n=4) realizados foram:

GRUPO 1: CONTROLE (VEÍCULO)

GRUPO 2: ANTAGONISTA

GRUPO 3: PELLUCIDINA A

GRUPO 4: ANTAGONISTA + PELLUCIDINA A

Para este ensaio foram utilizados bloqueadores: opióide, histamínico, nitrérgico e das ciclo-oxigenases, administrados 45 minutos antes do ácido acético a 0,6% e a pellucidina A (5 mg/kg) foi aplicada 30 minutos antes, todos por via intraperitoneal. No grupo da associação da pellucidina A com os antagonistas, o bloqueador foi administrado primeiro, 15 minutos antes da pellucidina A. Todas as drogas foram aplicadas por via intraperitoneal, para que 30 minutos depois fosse aplicado o ácido acético no peritônio. O grupo veículo (PBS 5 ml/kg) foi submetido às mesmas condições de administração do grupo da associação dos bloqueadores com a pellucidina A, onde foi administrado o PBS e 15 minutos depois a solução veículo foi novamente aplicada, para após 30 minutos ser administrado o ácido acético a 0,6% por via intraperitoneal.

3.5.1. Via ciclo-oxigenases

Para avaliar se a pellucidina A é capaz de interferir na via das ciclo-oxigenases foi realizado análise da associação da pellucidina A com a indometacina, que é um inibidor não seletivo de Ciclo-oxigenases e com um inibidor seletivo da COX2, o N-[2-(cyclohexyloxy)-4-nitrophenyl] methanesulfonamide (NS-398). A indometacina foi administrada na dose de 5 mg/kg (i.p.) e o NS-398 foi administrado na dose de 10 mg/kg, todos aplicados por via intraperitoneal e na associação de cada um desses bloqueadores com a pellucidina A as aplicações foram realizadas na mesma dose e via de administração proposta.

3.5.2. Via histaminérgica

Será feito também associação da pellucidina A (5 mg/kg i.p.) com a cipro-heptadina na dose de 0,5 mg/kg (i.p.). Como a cipro-heptadina é um agente bloqueador da ação histaminérgica em receptores H1, avaliaremos se a cipro-heptadina é capaz de interferir na ação antinociceptiva da pellucidina A. Este ensaio seguiu o mesmo delineamento dos ensaios anteriores.

3.5.3. Via opióide

A naloxona é um conhecido bloqueador de receptores opióides, utilizaremos este fármaco para avaliar a possibilidade de ação da pellucidina A em receptores opióides, que estão presentes tanto a nível periférico como central. Foi utilizado o mesmo delineamento dos ensaios anteriores. A naloxona foi utilizada na dose de 1mg/kg (i.p.) e a pellucidina A na dose de 5 mg/kg (i.p.).

3.5.4. Via nitrérgica

Para a avaliação da possível ação da pellucidina A nas respostas promovidas pelo NO, principalmente o oxido nítrico produzido pelo NOS neural e o induzível, que são os de maior concentração no processo inflamatório, provocado pela aplicação do ácido acético no peritônio do animal, será utilizado um inibidor não seletivo de

óxido nítrico, o L-NAME na dose de 5 mg/kg aplicado pela via intraperitoneal, utilizando o mesmo delineamento dos outros ensaios.

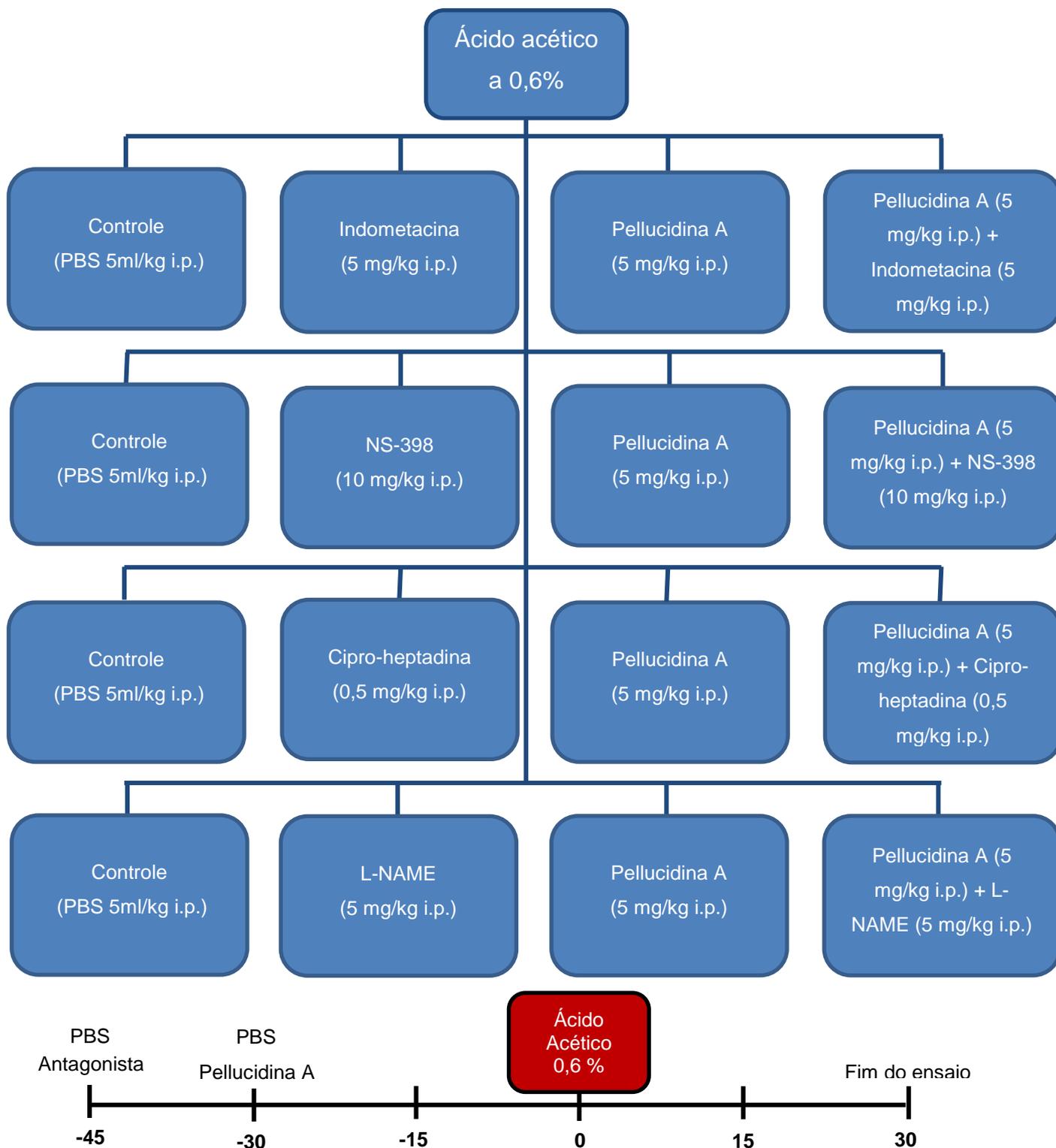


Figura 12: Fluxograma da análise do mecanismo de ação da pellucidina A pelo ensaio de ácido acético a 0,6%.

3.6. MODELO DE INFLAMAÇÃO SUB-CRÔNICA: GRANULOMA INDUZIDO POR PELOTA DE ALGODÃO EM CAMUNDONGOS

Existem atualmente vários modelos experimentais usados para testar a atividade anti-inflamatória de novas substâncias. Ensaio como o granuloma induzido por pelota de algodão são caracterizados como um modelo sub-crônico de inflamação. Neste teste, pelotas de algodão são inseridas na região dorsal de camundongos e se mede a formação do tecido granulomatoso no decorrer de cerca de 7 dias de tratamento (ARAGÃO,2008).

Este ensaio foi realizado de acordo com Miri e colaboradores (2015). As pelotas de algodão foram autoclavadas e em seguida implantadas via subcutânea na região dorsal dos camundongos, cada animal recebeu uma pelota de algodão com o peso equivalente a 20 mg, sendo eles separados em 4 grupos (n= 5 em cada grupo): o grupo SHAM não recebeu nenhum tratamento, sendo realizado apenas o procedimento cirúrgico da inserção do algodão, um grupo foi tratado apenas com o veículo (PBS 10 ml/kg i.p.), um grupo recebeu pellucidina A na dose de 10mg/kg e para controle positivo foi usado indometacina na dose de 10 mg/kg, que é um anti-inflamatório não esteroide.

Os animais foram tratados durante 7 dias consecutivos por meio da administração intraperitoneal das drogas, uma vez por dia. O tratamento foi iniciado 30 minutos antes dos animais serem anestesiados com cloridrato de cetamina 100mg/kg e cloridrato 5 mg de xilazina, via intraperitoneal e ser feita a implatação do algodão. No oitavo dia os animais foram eutanasiados por alta dosagem da associação de cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina (i.p.) e os pelotes implantados foram cuidadosamente removidos e libertados a partir de tecidos estranhos para serem posteriormente guardados em papel alumínio. O peso úmido foi imediatamente determinado em miligramas através de balança analítica e o peso seco do sedimento foi calculado após o aquecimento das pelotas em estufa a 60°C (18 h mais tarde).

3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados como média \pm e.p.m. (erro padrão da média), onde n representa o número de animais. São considerados estatisticamente

significantes os resultados que apresentaram probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade menor que 5% ($P < 0,05$). A análise estatística foi realizada com o software graphpad prism 5.0, utilizando análise de variância ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey, Dunnet's ou Newman Keuls.

4. RESULTADOS

4.1. EFEITO DA PELLUCIDINA A NA ATIVIDADE LOCOMOTORA

Os efeitos da pellucidina A sobre a capacidade locomotora e exploratória de camundongos são demonstrados na (**figura 13**).

Os grupos tratados com a pellucidina A não afetaram de forma significativa o desempenho locomotor dos animais, quando comparados com o grupo de animais que foram tratados apenas com o veículo. O número de quadrantes percorridos, assim como números de bipedestações realizadas pelos animais (rearing), foi significativamente reduzido apenas nos camundongos tratados com diazepam (2 mg/kg i.p.), que foi utilizado como droga de referência para produzir atividade sedante. O teste estatístico foi realizado utilizando a análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Dunnett's.

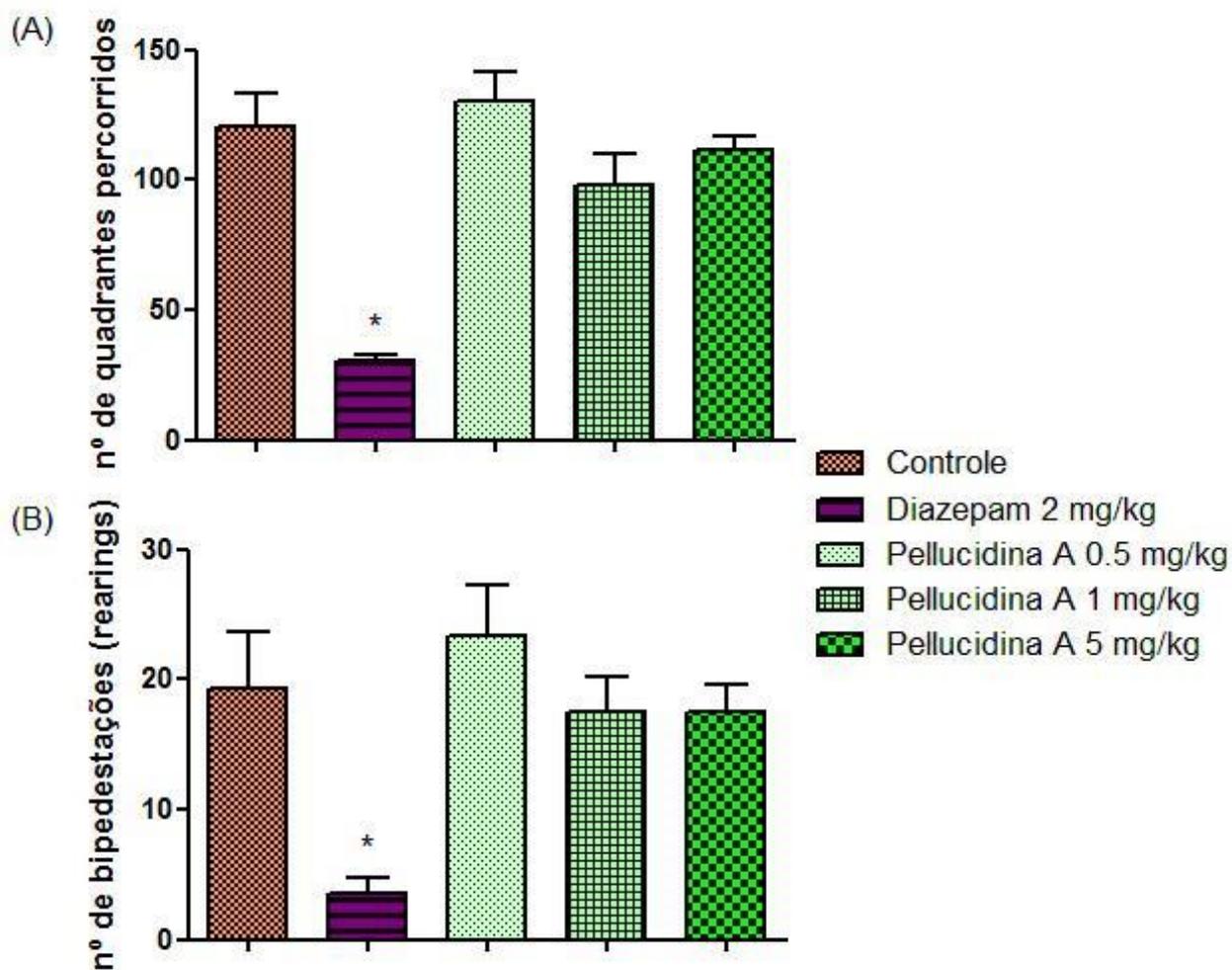


Figura 13. Efeito da pellucidina A na atividade locomotora dos camundongos. (A) Número de quadrantes percorridos (deslocamento horizontal) e (B) Número de bipedestações realizadas (deslocamento vertical) no ensaio de campo aberto durante o período de exposição de 5 minutos. Os animais foram tratados com pellucidina A (0,5; 1 e 5 mg/kg i.p.), diazepam (2 mg/kg i.p., controle (+)) e veículo (PBS 10 ml/kg). Os dados são médias \pm E.P.M. com n de 6 camundongos e * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$, quando comparados com o grupo controle (veículo). A análise estatística foi realizada com a análise de variância ANOVA, seguido do teste de Dunnett's.

4.2. EFEITO DA PELLUCIDINA A NA CONTORÇÃO ABDOMINAL INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO.

O efeito da pellucidina A na contorção abdominal induzida por ácido acético é demonstrado na (**figura 14**).

O número de contorções abdominais foi significativamente reduzido nos grupos tratados com pellucidina A nas doses de 1mg/kg e 5 mg/kg com uma

redução de 43% e 65%, respectivamente, quando comparados com o controle (veículo).

Na avaliação da diferença entre as doses da pellucidina A, houve diferença estatística apenas entre as doses de 0,5 e 5 mg/kg. A pellucidina A na dose de 5 mg/kg foi a única dose que não demonstrou diferença estatística quando comparada com o controle positivo indometacina, que foi utilizado na dose de 5mg/kg (i.p.) e foi capaz de reduzir o número de contorções abdominais em cerca de 73%. O teste estatístico utilizou-se da análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey.

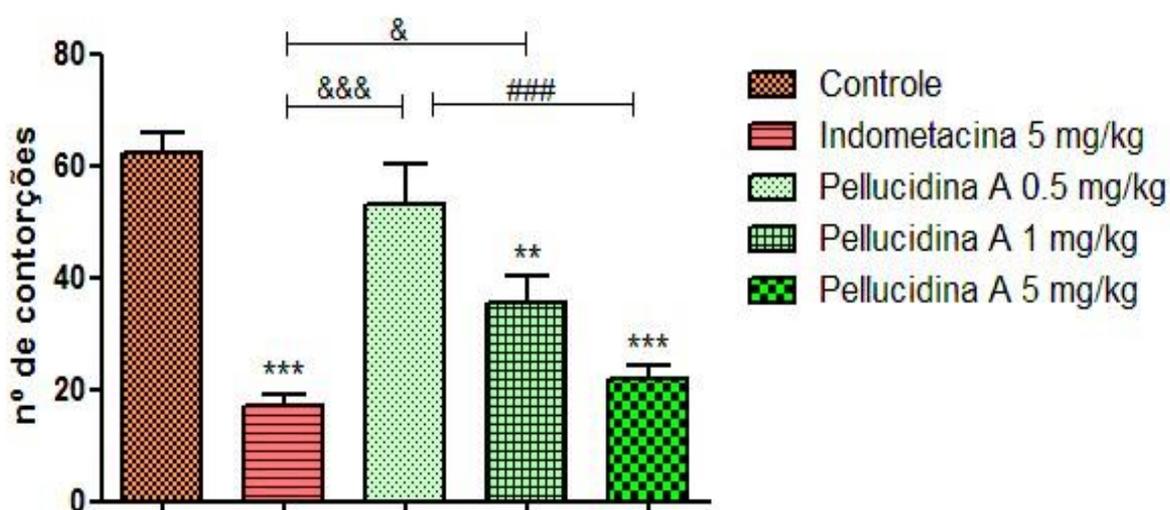


Figura 14. Efeito da pellucidina A sobre a nocicepção induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético 0,6%. No eixo das Ordenadas podemos observar o número de contorções que foram contabilizados no período de 30 minutos. No eixo das Abcissas os grupos tratados com pellucidina A (0,5; 1 e 5 mg/kg i.p.), indometacina (5 mg/kg i.p., controle (+)) e veículo (PBS 10ml/kg i.p.). Dentre os grupos avaliados, os animais tratados com Pellucidina A nas doses de 1 e 5 mg/kg demonstraram diminuição no padrão de contorções, quando comparados com o grupo controle, onde foi aplicado apenas veículo. A pellucidina A na dose de 5 mg/kg demonstrou resultado similar ao grupo tratado com indometacina. Os dados são médias \pm E.P.M. com n de 6 camundongos e * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$, comparados com o controle; & $p \leq 0,05$, && $p \leq 0,01$ e &&& $p \leq 0,001$, comparados com o controle positivo e # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,01$ e ### $p \leq 0,001$, comparados entre as doses da pellucidina A. O teste estatístico utilizado foi a análise de variância ANOVA seguido teste de Tukey.

4.3. EFEITO DA PELLUCIDINA A NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA FORMALINA.

Como mostrado na (**figura 15**), nenhum dos grupos tratados com a pellucidina A conseguiu reduzir de forma significativa o tempo de lambidas do animal na pata com formalina durante a primeira fase, quando comparados com o controle, no qual foi utilizado apenas o veículo. O único grupo que demonstrou atividade estatisticamente significativa nesta fase foi a morfina (4 mg/kg i.p.), utilizada como controle positivo para esta fase e reduziu o tempo de lambidas em 82%.

No entanto, a pellucidina A demonstrou um efeito antinociceptivo estatisticamente significativo na segunda fase do ensaio (**figura 16**), reduzindo o tempo de lambidas em 68% na dose de 5 mg/kg (i.p.), quando comparado com o controle (veículo) da segunda fase. Na comparação com o controle (+) para esta fase, indometacina (10 mg/kg i.p.), que também demonstrou possuir eficácia apenas na segunda fase (fase inflamatória) reduzindo em 76% o tempo de lambidas, a pellucidina A na dose de 5 mg/kg foi a única dose que não demonstrou diferença estatística. O teste estatístico foi realizado utilizando a análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey.

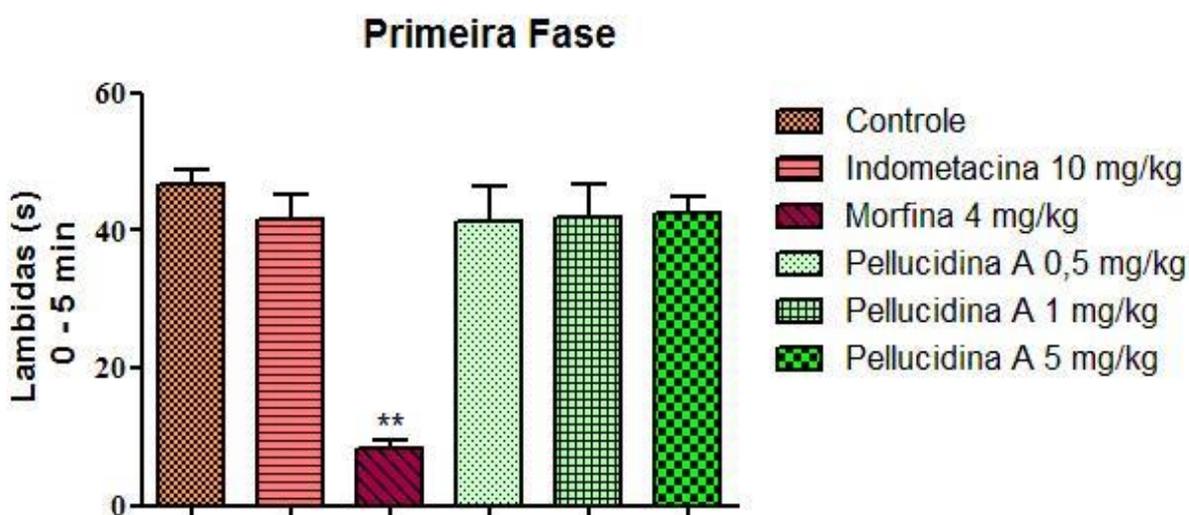


Figura 15 – Primeira fase da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina a 2,5 %. No eixo das Ordenadas verifica-se o tempo, medido em segundos, que os animais passaram lambendo ou mordendo a pata com formalina 2,5% no período de 0 - 5 minutos e no eixo das Abcissas os tratados. A pellucidina A não demonstrou resultado estatisticamente significativo nesta fase, caracterizada pela dor aguda neurogênica. Apenas a morfina aplicada na dose de 4 mg/kg s.c., que foi utilizado como controle (+) para esta fase, obteve resultado estatisticamente significativo. Os dados são médias ± E.P.M. com n de 6 camundongos e * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$, quando

comparados com o controle (veículo). O teste estatístico utilizado para o ensaio foi a análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey.

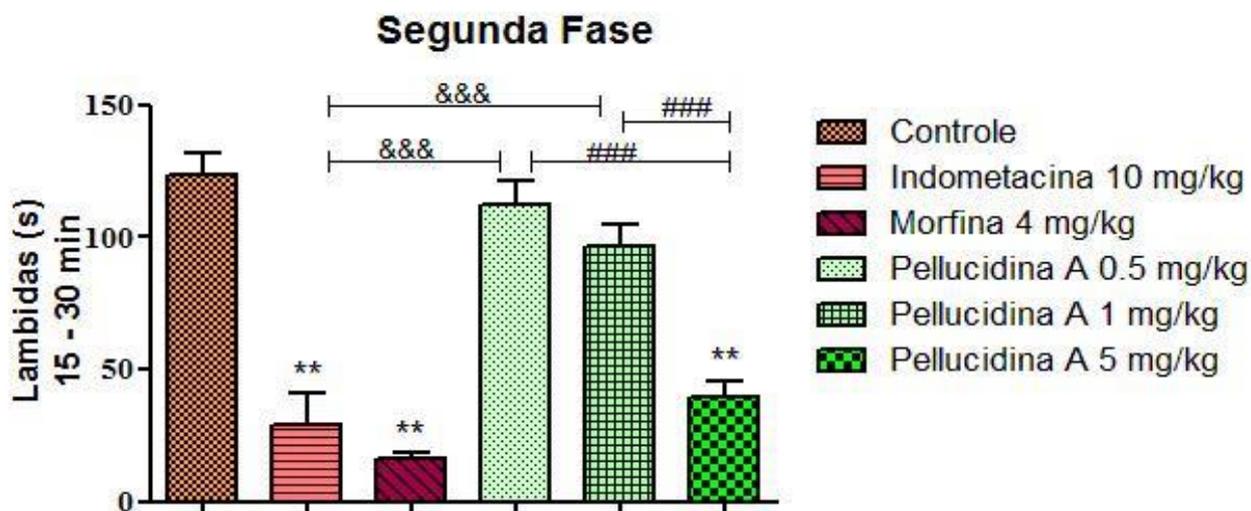


Figura 16 – Segunda fase da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina a 2,5 %. No eixo das Ordenadas verifica-se o tempo, medido em segundos, que os animais passaram lambendo ou mordendo a pata com formalina no período de 15-30 minutos e no eixo das Abcissas os grupos tratados. A pellucidina A demonstrou resultado estatisticamente significativo na dose de 5 mg/kg i.p., exibindo atividade antinociceptiva apenas nesta fase do teste, caracterizada pela dor aguda inflamatória, tendo um resultado similar a indometacina aplicada na dose de 10 mg/kg i.p., utilizada como controle (+) para essa fase. Os dados são médias \pm E.P.M. com n de 6 camundongos, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$, quando comparados com o controle; & $p \leq 0,05$, && $p \leq 0,01$ e &&& $p \leq 0,001$, quando comparados com o controle positivo desta fase e # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,01$ e ### $p \leq 0,001$, comparados entre as doses da pellucidina A. O teste estatístico utilizado foi a análise de variância (ANOVA) seguido de Tukey.

4.4. EFEITO DA PELLUCIDINA A NA NOCICEPÇÃO TÉRMICA INDUZIDA PELA PLACA-QUENTE

Como demonstrado na (**figura 17**), a pellucidina A administrada nas doses de 0,5, 1 e 5 mg / kg (i.p.) não foi capaz de aumentar o tempo de latência do animal sobre a placa aquecida, exibindo um resultado similar ao controle (PBS, 10 ml/kg i.p.). Os animais tratados com morfina (10 mg/kg s.c.), usada como droga de referência, foram os únicos que demonstraram uma resposta estatisticamente diferente do controle.

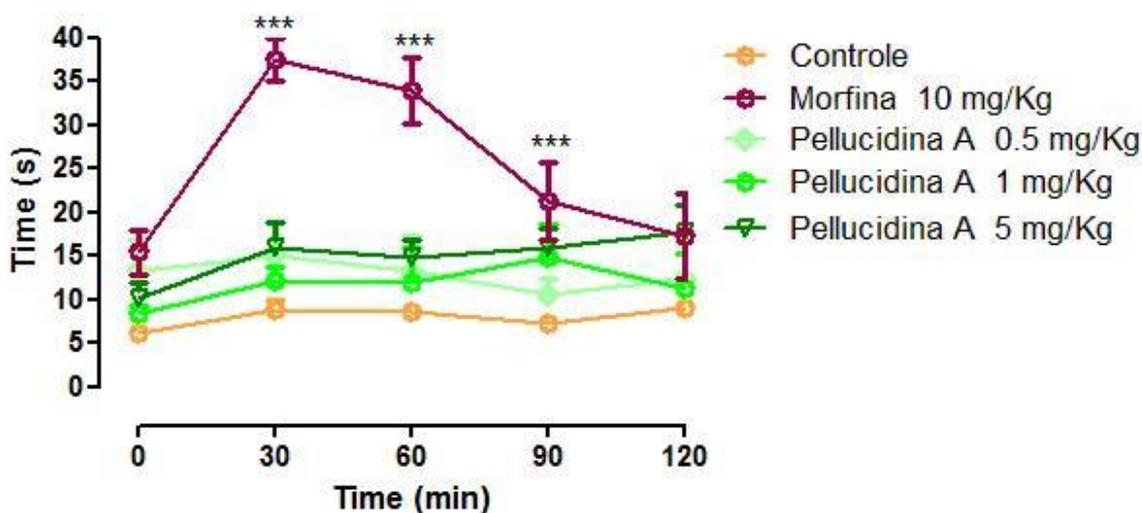


Figura 17. Tempo de curso dos efeitos da pellucidina A sobre a nocicepção induzida pela placa quente. No eixo das Ordenadas tempo de latência (s) do animal para a resposta à estimulação térmica ($55^{\circ}\text{C} \pm 0,5$, média \pm S.E.M., $N = 6$). O eixo das Abcissas contabiliza o tempo (min) após a administração da pellucidina A nas doses de 0,5, 1 e 5 mg/kg (i.p.) e morfina (10 mg/kg s.c.). Apenas a morfina, que foi utilizada como controle positivo para este ensaio, demonstrou resultado significativo quando comparado com o controle, onde foi administrado apenas veículo. Os dados são médias \pm E.P.M. com n de 6 camundongos, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$, quando comparados com o controle (veículo). O teste estatístico utilizado foi a análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Dunnet's.

4.5. ELUCIDAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DA PELLUCIDINA A PELO ENSAIO DO ÁCIDO ACÉTICO A 0,6%

O modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético é um modelo de baixa especificidade e é sensível para fármacos que possuem atividade analgésica, por isso foi escolhido como modelo para a elucidação do mecanismo de ação da pellucidina A, que demonstrou melhor eficácia neste ensaio em sua avaliação para antinocicepção.

4.5.1. Avaliação da pellucidina A na via das ciclo-oxigenases

Os resultados do ensaio são demonstrados na (**figura 18**). O grupo tratado com pellucidina A (5 mg/kg i.p.) apresentou uma diminuição no padrão de contorções em 60%, quando comparado ao grupo controle no qual foi administrado apenas veículo, apresentando uma resposta estatisticamente similar ao grupo de indometacina (bloqueador não seletivo das ciclo-oxigenases), utilizado na dose de 5

mg/kg (i.p.), que reduziu em 65%. E na associação deles a inibição do número de contorções chegou a 69%.

Na avaliação da pellucidina A (5 mg/kg i.p.) com o NS-398 (10 mg/kg i.p.), inibidor seletivo da ciclo-oxigenase 2. A pellucidina A reduziu em 60% o padrão de contorções, enquanto a ICOX2, reduziu em 58 % e no grupo da associação deles a redução foi de 72% na média de contorções, quando comparado com os animais tratados apenas com o veículo (PBS, 10 ml/kg i.p.).

Os resultados demonstraram respostas similares entre os grupos tratados, houve diferença significativa apenas quando os grupos foram comparados com o grupo veículo em ambos os ensaios. O teste estatístico foi realizado utilizando a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey

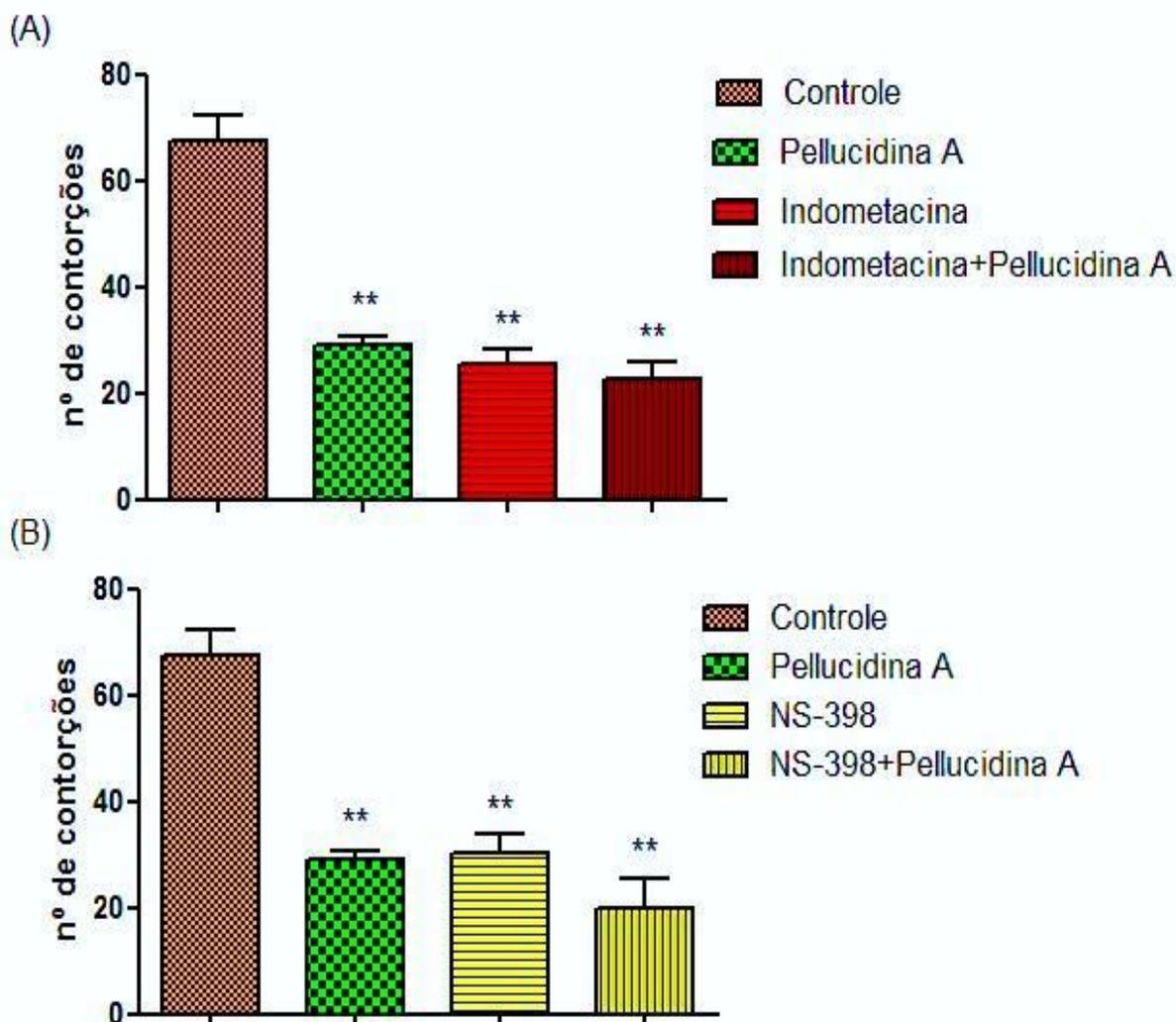


Figura 18- Avaliação da ação da pellucidina A em associação com o bloqueador de ciclo-oxigenases indometacina e o inibidor seletivo de COX2, NS-398. No eixo das Ordenadas observa-se o número de contorções realizadas no período de 30 minutos, no eixo das Abcissas os grupos tratados. (A) ocorre a comparação entre os grupos da pellucidina A (5 mg/kg i.p.) e indometacina (5 mg/kg i.p.)

administrados sozinhos, e deles administrados em associação na mesma dose e via de aplicação usada no grupo da droga isolada, todos comparados com o grupo controle (PBS 5 ml/kg i.p.). (B) ocorre a comparação entre os grupos da pellucidina A (5 mg/kg i.p.) e NS-398 (10 mg/kg i.p.) administrados sozinhos, e deles administrados em associação na mesma dose e via de aplicação usada no grupo da droga isolada, comparados com o grupo controle (PBS 5 ml/kg i.p.), demonstrando resultado estatisticamente significativo apenas na comparação com o controle. Os dados são médias \pm E.P.M. com n de 4 camundongos sendo *p \leq 0,05, ** p \leq 0,01 e *** p \leq 0,001. O teste estatístico utilizado foi a análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey.

4.5.2. Avaliação da pellucidina a nos receptores histaminérgicos h1

Na (**figura 19**) são demonstrados os grupos tratados com a pellucidina A (5 mg/kg i.p.) e cipro-heptadina (0,5 mg/kg i.p.) administrados sozinhos e em associação nos camundongos, nas mesmas doses e via de aplicação no qual eles foram administrados isoladamente. A cipro-heptadina é um bloqueador histaminérgico H1 e demonstrou diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo da pellucidina A administrada sozinha, que reduziu as contorções em 60% o número de contorções, enquanto a cipro-heptadina reduziu em 82%, quando comparados com o controle (PBS 5 ml/kg i.p.).

Na comparação entre os grupos da administração isolada com o da associação das drogas, que reduziu em 97% o número de contorções abdominais quando comparados com o controle, observou-se uma redução estatisticamente significativa entre o grupo da pellucidina A e o grupo da associação, enquanto o grupo da cipro-heptadina não demonstrou diferença estatística. O teste estatístico foi realizado utilizando a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey.

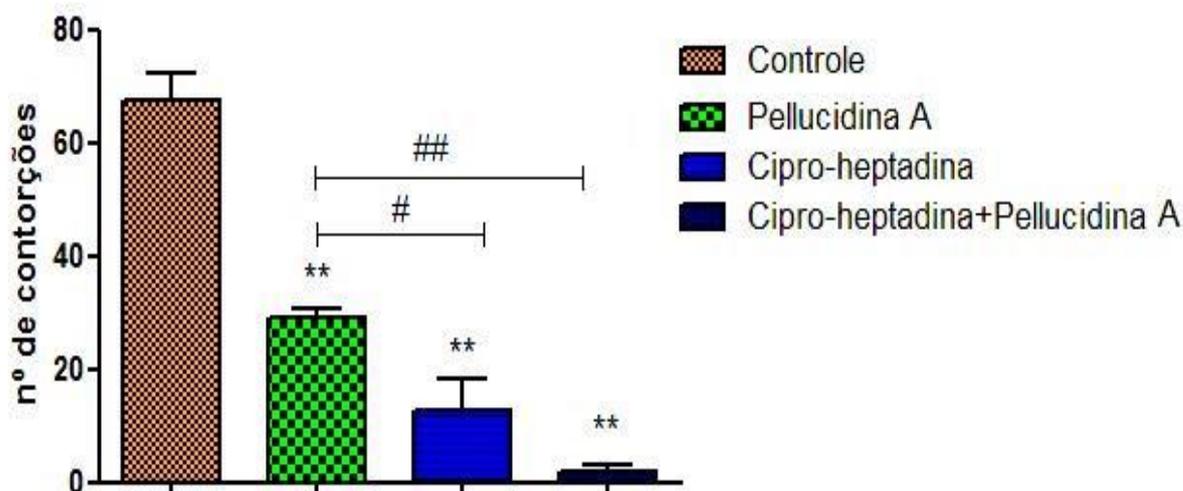


Figura 19- Avaliação da ação da pellucidina A em associação com o bloqueador histaminérgico H1 cipro-heptadina. Análise da ação da associação das duas drogas na via histaminérgica. No eixo das Ordenadas observa-se o número de contorções realizadas no período de 30 minutos e no eixo das Abscissas os grupos tratados. Foi realizada a comparação entre os grupos administrados sozinhos, em associação e com o grupo controle (PBS 5 ml/kg i.p.), demonstrando resultado estatisticamente significativo entre todos eles e o veículo, assim como entre a Pellucidina A e o grupo de associação das drogas. Os dados são médias \pm E.P.M. com n de 4 camundongos sendo * para $p \leq 0,05$, ** para $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, quando comparados com o controle e # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,01$ e ### $p \leq 0,001$, comparados com a pellucidina A. O teste estatístico utilizado foi a análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey.

4.5.3. Avaliação da pellucidina a nos receptores opióides

Nos resultados da avaliação de via opióide a (**figura 20**), os grupos foram tratados com a pellucidina A (5 mg/kg i.p.) e Naloxona (1 mg/kg i.p.), ambos foram administrados sozinhos e em associação na mesma dose e via de administração das drogas isoladas. A Naloxona é um conhecido antagonista competitivo de receptores opióides e não demonstrou diminuição significativa no número de contorções quando administrada sozinha. No entanto, na associação da pellucidina A (5 mg/kg i.p.) com a Naloxona (1 mg/kg i.p.) houve um resultado similar a pellucidina A administrada sozinha.

Enquanto a pellucidina A reduziu em 60% o padrão de contorções, a sua associação com a naloxona reduziu em 68% quando comparado ao grupo controle. O teste estatístico foi realizado utilizando a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey.

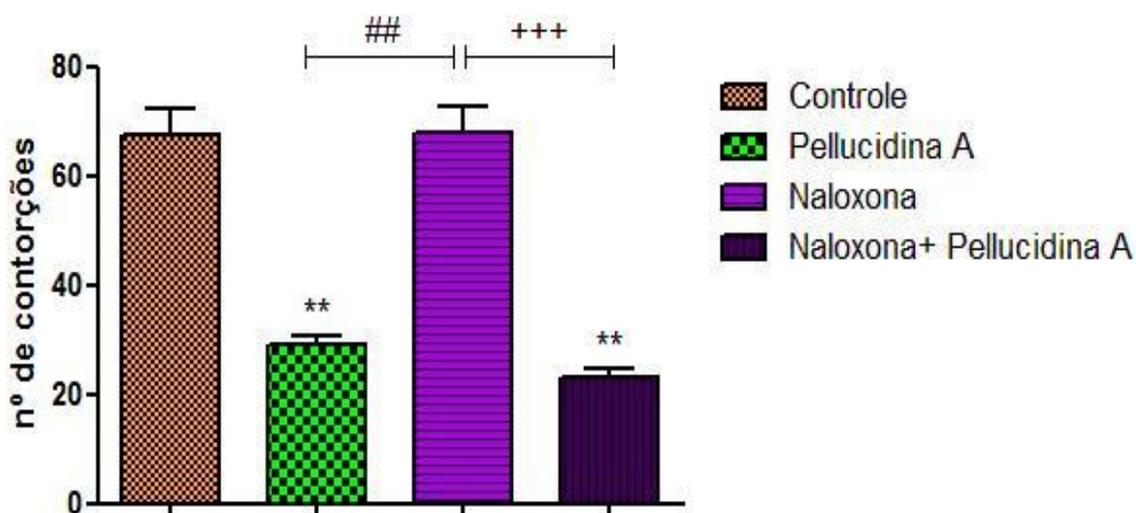


Figura 20- Avaliação da ação da pellucidina A em associação com o bloqueador opióide Naloxona. Análise da ação da associação das duas drogas na via opióide, no eixo das Ordenadas observa-se o número de contorções realizadas no período de 30 minutos e no eixo das Abscissas os grupos tratados. Foi realizada a comparação entre os grupos administrados sozinhos, em associação e com o grupo controle (PBS 5 ml/kg i.p.), demonstrando um resultado estatisticamente significativo apenas quando comparados com o veículo ou com a naloxona administrada sozinha. Os dados são médias \pm E.P.M. com n de 4 camundongos, sendo * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$, quando comparados com o controle; # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,01$ e ### $p \leq 0,001$, quando comparados com a pellucidina A e + $p \leq 0,05$, ++ $p \leq 0,01$ e +++ $p \leq 0,001$, quando comparados com a naloxona. O teste estatístico utilizado foi o ANOVA seguido do teste de Tukey.

4.5.4. Avaliação da pellucidina a na via nitrérgica

Para a avaliação da via do NO sintase foi utilizado um bloqueador inespecífico da síntese de óxido nítrico, o L-NAME. Os resultados desta avaliação são demonstrados na (**figura 21**). A análise comparatória dos grupos tratados foi realizada e a Pellucidina A na dose de 5 mg/kg (i.p.) reduziu o padrão de contorções em 76%, quando comparado com o grupo tratado apenas com veículo e o L-NAME na dose de 5 mg/kg (i.p.) conseguiu reduzir em 60%, enquanto o grupo tratado com a associação conseguiu reduzir o número de contorções em 96%. O grupo da pellucidina A associada com o L-NAME possuiu uma eficácia estatisticamente significativa quando comparado com o grupo tratado apenas com a pellucidina A, com $p \leq 0,05$ e com o grupo tratado apenas com o L-NAME com $p \leq 0,001$. Os resultados caracterizam uma atuação sinérgica e potencialização da eficácia de ambas as drogas testadas.

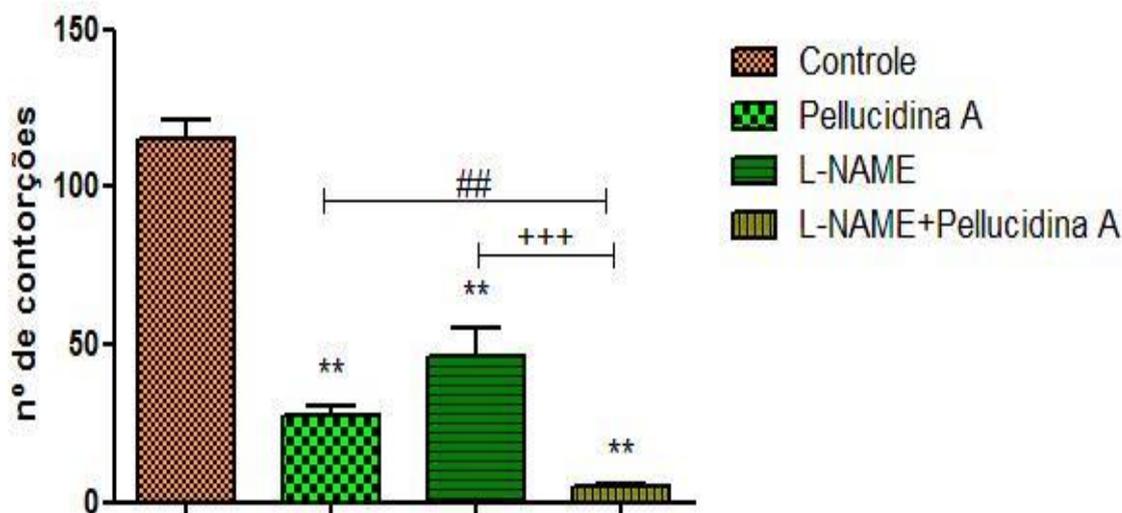


Figura 21- Avaliação da ação da pellucidina A em associação com o bloqueador de NO sintase L-NAME. Análise da ação da associação das duas drogas na via nitrérgica e promoção da analgesia. No eixo das Ordenadas observa-se o número de contorções realizadas no período de 30 minutos e no eixo das Abscissas os grupos tratados. A comparação foi realizada entre os grupos administrados sozinhos, em associação e com o grupo controle (PBS 10 ml/kg i.p.). Demonstrando resultado estatisticamente significativo entre todos os grupos tratados e o controle. Na comparação da eficácia da Pellucidina A administrada isoladamente com ela em associação com o L-NAME houve redução significativa das contorções. Assim como na comparação entre o grupo das drogas associadas com o grupo tratado apenas com L-NAME e o grupo da associação. Os dados são médias \pm E.P.M. com n de 4 camundongos, sendo * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$, comparados com o controle; # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,01$ e ### $p \leq 0,001$, comparados com a pellucidina A e + $p \leq 0,05$, ++ $p \leq 0,01$ e +++ $p \leq 0,001$. O teste estatístico utilizado foi a análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey.

4.6. O EFEITO DA PELLUCIDINA A NA INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR PELOTAS DE ALGODÃO.

Como demonstrado nas (**figuras 22**) e (**figura 23**), a pellucidina A teve uma redução estatisticamente significativa no peso úmido e seco das pelotas de algodão retirados dos camundongos suíços, quando comparados com os grupos controle e SHAM, este ensaio foi feito para estimar a quantidade de exsudado produzido pela inserção subcutânea de um corpo estranho nas costas do camundongo através da pesagem do material retirado após sete dias de tratamento.

De acordo com os resultados apresentados, a pellucidina A na dose de 10 mg/kg apresentou uma redução significativa de 24% no valor do peso úmido formado após os 7 dias, enquanto a indometacina demonstrou uma redução significativa de 43% no peso úmido, quando comparados com o controle. No peso seco das pelotas dos animais, a redução foi de 30% na Pellucidina A e 46% no peso da indometacina, quando comparados com o peso seco do controle. Os resultados

estatisticamente significativos são apresentados na comparação entre os grupos e ocorre diferença estatística inclusive entre o grupo tratado com pellucidina A e a Indometacina, utilizada como controle (+).

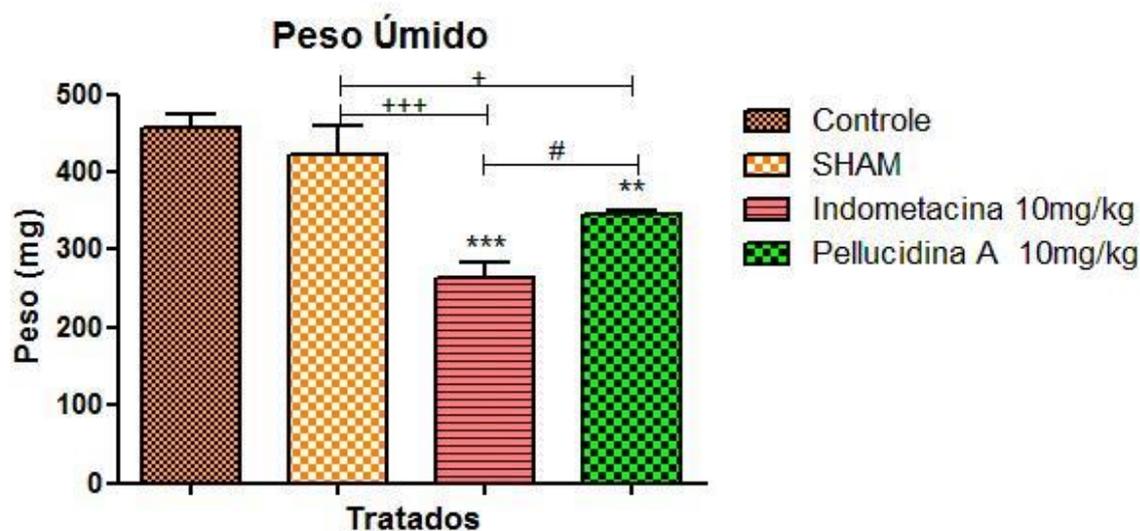


Figura 22 – Efeito da pellucidina A no granuloma induzido por pelotas de algodão, análise do peso úmido. A pellucidina A na dose de 10 mg/kg, indometacina na dose de 10 mg/kg e veículo (PBS 10 ml/kg), todos aplicados por via intraperitoneal e no grupo SHAM não houve qualquer tratamento. O peso úmido das pelotas de algodão foi mensurado logo após ser retirado da região dorsal dos animais testados. A pellucidina A e a indometacina demonstraram efeito estatisticamente significativo nas doses aplicadas e comparadas com os grupos do veículo e SHAM, assim como houve também a diferença estatística entre a pellucidina A e a indometacina no peso úmido, como demonstrado com as médias \pm E.P.M. com n de 5 camundongos, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$, comparados com o controle; + $p \leq 0,05$, ++ $p \leq 0,01$ e +++ $p \leq 0,001$, comparados com o SHAM e # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,01$ e ### $p \leq 0,001$, comparado com a pellucidina A. O teste estatístico utilizado foi análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Student Newman Keuls.

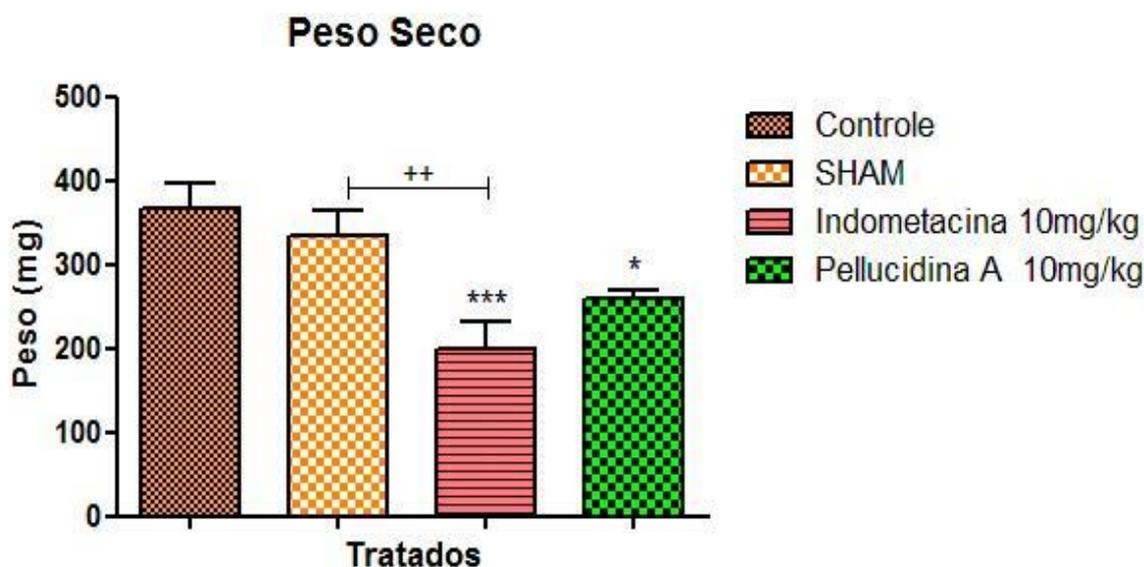


Figura 23 - Efeito da pellucidina A no granuloma induzido por pelotas de algodão, análise do peso seco. A pellucidina A na dose de 10 mg/kg, indometacina na dose de 10 mg/kg e veículo (PBS 10 ml/kg), todos aplicados por via intraperitoneal e no grupo SHAM não houve qualquer tratamento. O peso seco do algodão retirado dos animais foi mensurado após aquecimento por 18 horas em estufa a 60°C. No peso seco a diferença ocorreu apenas quando o grupo da pellucidina A foi comparado com o grupo controle como demonstrado pelas médias \pm E.P.M. com n de 5 camundongos, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$, comparados com o controle; + $p \leq 0,05$, ++ $p \leq 0,01$ e +++ $p \leq 0,001$, comparados com o SHAM e # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,01$ e ### $p \leq 0,001$, comparado com a pellucidina A. O teste estatístico utilizado foi análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Student Newman Keuls.

5. DISCUSSÃO

A *Peperomia pellucida* possui uma ampla utilização popular e atualmente existem várias pesquisas comprovando a sua eficácia medicinal. Porém, para uma melhor determinação de suas atividades terapêuticas e possível aplicabilidade farmacológica são necessários mais estudos com seus componentes isolados.

A pellucidina A é um composto dimérico isolado da *Peperomia pellucida*, cuja origem da síntese ainda não foi totalmente definida. No entanto, de acordo com Bayman e colaboradores (2000) este composto pode ser formado por uma enzima estereoespecífica que medeia o acoplamento redutivo de duas unidades de 2,4,5-trimetóxi-estireno, sendo assim um tipo de derivado intermediário do 2,4,5-trimetoxi-estireno. Esta substância não possui nenhum estudo que demonstre sua atividade biológica e neste trabalho procurou-se avaliar a atividade antinociceptiva, anti-inflamatória e elucidar o possível mecanismo de ação deste composto.

Entretanto, antes de iniciar qualquer teste que visasse à determinação de algumas das possíveis atividades biológicas da pellucidina A foi realizado primeiramente a avaliação da interferência dessa substância na capacidade locomotora, mudanças na exploração e atividade espontânea dos animais, pelo ensaio de campo aberto, diminuindo assim a possibilidade de falsos positivos para os testes nociceptivos (BROW *et al.*, 2011). Afinal, drogas que causam relaxamento ou sedação são capazes de promover alterações no desempenho locomotor, interferindo nas respostas do animal ao estímulo nociceptivo provocado, sem possuírem de fato um potencial antinociceptivo (BROW *et al.*, 2011).

O teste de campo aberto pode servir como um teste para avaliação de drogas de efeito ansiolítico ou de drogas que podem diminuir a atividade locomotora dos animais. Este tipo de ensaio possui uma boa aplicabilidade para ambas às avaliações, pois expõe o animal a um ambiente aberto e desconhecido, retira ele de seu convívio grupal e impede sua fuga por paredes vizinhas, sendo assim, capaz de avaliar sua atividade locomotora e sua reação diante de um evento extressante (PRUT & BELZUNG, 2003; TADAIESKY *et al.*, 2006).

No ensaio proposto nenhum dos grupos tratados com a pellucidina A demonstrou alteração em sua atividade deambulatória, apresentando uma resposta similar ao controle, onde foi aplicada apenas a solução veículo. A partir desses dados podemos inferir que a pellucidina A não possui atividade sedante ou que seja

capaz de alterar de alguma forma o desempenho locomotor dos animais e partindo disso iniciaram-se os ensaios nociceptivos.

Todos os ensaios que promovem estímulos nociceptivos podem ser definidos por um certo número de parâmetros diferentes, que podem ser colocados em três categorias:

O primeiro parâmetro é a natureza física, que controla com certa precisão a intensidade, a duração e a área da superfície estimulada. O segundo é o local de aplicação, que é importante para inferir o tipo de tecido a partir do qual se originam dores clínicas: somática ou visceral, articular ou esquelética. O terceiro é o antecedente do local de aplicação, sendo este relacionado com a história anterior do local estimulado, pois testes para a dor aguda envolvem tecidos saudáveis e, ocasionalmente inflamação aguda, enquanto os testes de dor-crônica referem-se a dor reumática ou neuropática, que dura por um longo tempo, indo de semanas a meses. Estes três parâmetros determinam a "quantidade global de informação nociceptiva", que irá ser transportada para o sistema nervoso central pelo o sistema nervoso periférico (LE BARS *et al.*, 2001).

Neste trabalho foram escolhidos três testes de estímulo nociceptivo para dor aguda. As contorções abdominais induzidas por ácido acético, que possui intensidade alta, imediata e de longa duração, estimulando a dor visceral. O teste da formalina, que possui duas fases e estimula a dor somática superficial e a intensidade depende da concentração de formalina utilizada. A placa-quente, que possui uma estimulação de média intensidade e curta duração, estimulando a dor somática superficial e resposta supra-espinhal (LE BARS *et al.*, 2001). Os experimentos foram escolhidos por sua especificidade, sensibilidade e fácil reproduzibilidade, sendo comuns para triagem de fármacos com atividade analgésica.

O modelo de contorção é considerado um modelo inflamatório, pois a aplicação de um agente químico irritante na região peritoneal provoca um comportamento similar a uma peritonite no animal, ocorrendo à liberação de vários mediadores inflamatórios, tais como citocinas, bradicinina, prostaglandinas, histamina, serotonina e proteases, que podem sensibilizar diretamente os terminais aferentes que conduzem a hipersensibilidade visceral (CAVENDISH *et al.*, 2015; JOHNSON *et al.*, 2016).

Na contorção abdominal induzida por ácido acético a pellucidina A nas doses de 1 e 5 mg/kg (i.p.), conseguiu diminuir o padrão de contorções de forma significativa. Este teste é um método pouco específico, pois possui vários fatores periféricos e centrais que influenciam no comportamento estereotipado dos animais (LE BARS, 2001). E é sensível tanto para drogas que agem centralmente como periféricamente, sendo por isso um ensaio amplamente utilizado como um teste de rastreio para avaliar compostos que podem vir a ser potenciais fármacos anti-inflamatórios ou analgésicos e tem sido sugerida como um modelo clinicamente relevante para a dor intestinal em seres humanos (SREBRO, VUČKOVIĆ & PROSTRAN, 2016).

Enquanto o teste da formalina é diferente da maior parte dos modelos de dor, por ser capaz de avaliar o modo como um animal responde a dor moderada e contínua, gerada pelo tecido lesionado e devido a esta ligação a lesão de tecidos, acredita-se que este teste proporciona um modelo mais válido para a dor clínica do que os testes com estímulos mecânicos ou térmicos (TJØLSEN *et al.*, 1992). Este ensaio possui maior sensibilidade que o ácido acético, pois demonstra uma resposta bifásica bem definida, uma fase aguda, que é caracterizada pela estimulação direta do nociceptor e uma fase tardia ou inflamatória, que é caracterizada pela resposta tônica a dor e processo inflamatório, pois ocorre a liberação de mediadores que induzem a dor inflamatória (TJØLSEN *et al.*, 1992; LE BARS *et al.*, 2001).

A fase aguda (fase neurogênica) ocorre predominantemente pela ativação direta das fibras A δ e fibras-C, devido ao estímulo periférico, enquanto que a fase tardia (fase inflamatória) parece ser dependente da combinação entre a reação inflamatória promovida pela ação de mediadores inflamatórios (como histamina, serotonina e bradicinina), que são liberados no tecido periférico e as alterações funcionais no corno dorsal da medula espinal (HUNSKAAR & HOLE, 1987; TJØLSEN *et al.*, 1992; RODRIGUES *et al.*, 2012).

A primeira fase do ensaio possui uma especificidade maior para fármacos opióides ou outras drogas de atividade central (HUNSKAAR & HOLE, 1987; HALDER *et al.*, 2012) e a pellucidina A não possuiu eficácia nesta fase em nenhuma das doses testadas. Enquanto na segunda fase, que é mais eficaz para demonstrar ação de drogas anti-inflamatórias e corticosteroides (HUNSKAAR & HOLE, 1987; HALDER *et al.*, 2012), a pellucidina A foi capaz de apresentar ação antinociceptiva na dose de 5 mg/kg. A partir das informações obtidas neste ensaio e no ensaio de

contorção, podemos presumir que a ação antinociceptiva da pellucidina A pode estar associada a uma possível atividade periférica, agindo na inflamação. Então, para comprovar que a ação antinociceptiva da droga está relacionada com sua interferência do processo inflamatório foi realizado o teste da nocicepção induzida pela placa-quente, que é um ensaio nociceptivo que não promove lesão tecidual e consequente inflamação aguda.

Assim como a formalina, o ensaio da placa-quente é considerado um modelo de dor somática, pois a pele que é estimulada para a nocicepção, este tipo de ensaio não envolve estímulo visceral ou de tecidos musculoesqueléticos. No entanto, devido ao calor que é utilizado neste tipo de ensaio, temos a ativação de termorreceptores e isso consequentemente irá resultar em uma sequência organizada e inalterável de ativação, onde os termorreceptores são os primeiros a serem ativados, em seguida ocorre a estimulação de termorreceptores e nociceptores, para finalmente apenas os nociceptores serem ativados (LE BARS *et al.*, 2001).

Quando a substância testada exerce atividade supra-espinal o tempo de latência do animal sobre a placa é duradouro, como no caso dos analgésicos opióides, que aumentam consideravelmente o tempo para a resposta do animal ao estímulo (MACDONALD *et al.* 1946; YAKSH & RUDY, 1977). No ensaio a Pellucidina A não demonstrou eficácia analgésica em nenhuma das doses administradas. De acordo com os resultados adquiridos nos testes nociceptivos pode-se inferir que a pellucidina A possui atividade analgésica, mas a sua ação não está relacionada ao SNC, pois o composto não foi capaz de influenciar na resposta supra-espinal dos camundongos (MACDONALD *et al.* 1946). Corroborando com a hipótese de que o efeito analgésico da pellucidina A pode estar associada a uma atuação periférica.

Como dito anteriormente, o ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético atualmente é um dos modelos experimentais mais bem estabelecidos e amplamente utilizados para estudar as ações antinociceptivas tanto de anti-inflamatórios como de opióides, sendo um modelo adequado para indicar os componentes centrais e periféricos envolvidos na nocicepção (AL-KHRASANI *et al.*, 2012).

Com isso, utilizamos este teste para a elucidação do mecanismo de ação da pellucidina A, sendo feita a associação da pellucidina A com diversos bloqueadores

que agem na inflamação e nocicepção por mecanismos diferentes, promovendo analgesia, para assim inferir o possível mecanismo de ação da droga, pela observação de quais bloqueadores são capazes de interferir inibindo ou colaborando na atuação da pellucidina A.

A indometacina é um anti-inflamatório não esteroidal que atua no bloqueio inespecífico das isoformas da ciclo-oxigenase, promovendo analgesia periférica por inibição da produção das prostaglandinas, cuja produção foi induzida pelo processo inflamatório, causado pela aplicação do ácido acético. Afinal, o ácido acético provoca uma reação de dor indireta através da geração de inflamação aguda no peritônio, com conseqüente aumento local dos níveis de PGE_2 e PGF_2 (DELEO, 1989).

Na avaliação do mecanismo de ação a indometacina foi utilizada na dose de 5 mg/kg em associação com a pellucidina A na dose de 5 mg/kg e este fármaco não demonstrou possuir qualquer capacidade de interferir na ação analgésica da pellucidina A. Assim como o SN-389, bloqueador específico da isoforma COX2 (que é a principal isoforma induzida pela inflamação) utilizado na dose de 10 mg/kg. Em ambos os ensaios, os fármacos que foram associados com a pellucidina A promovem a inibição das prostaglandinas e a pellucidina A em associação com estes bloqueadores apresentou seu efeito antinociceptivo inalterado, possuindo uma ação similar ao grupo de animais em que foi feita a sua aplicação isoladamente, demonstrando que nenhum dos bloqueadores testados possui capacidade de interferir na ação da pellucidina A.

Dentre os mediadores liberados na reação inflamatória provocada pelo ácido acético está a histamina, que promove a sensibilização dos terminais periféricos dos aferentes nociceptivos quimiossensíveis e migração leucocitária (CAVENDISH *et al.*, 2015) possuindo receptores periféricos que colaboram para a sensibilização dos aferentes nociceptivos (DINIZ *et al.*, 2015; NICOLSON *et al.*, 2007).

A cipro-heptadina é um antagonista de receptores histaminérgicos do tipo H1, que é o responsável pelas principais respostas de reação inflamatória e excitabilidade nociceptiva, estimulada pela sua ligação com a histamina. Neste ensaio a Cipro-heptadina, foi utilizada na dose de 0,5 mg/kg e associada com a pellucidina A. De acordo com os resultados obtidos no ensaio à associação da pellucidina A com a cipro-heptadina apresentou uma ação sinérgica. Pois, houve uma potencialização do efeito analgésico na associação deste bloqueador

histaminérgico com a pellucidina A, quando comparado com o grupo da administração da pellucidina A isolada, sugerindo que a pellucidina A pode utilizar uma via de ação similar a cipro-heptadina, potencializando sua ação ou uma via diferente, mas que colabora para a sua eficácia. Os resultados corroboram com a hipótese de que a pellucidina A pode interferir na via histaminérgica, potencializando o bloqueio da ação da histamina, atuando em conjunto com a cipro-heptadina para diminuir o padrão de contorções abdominais induzidos por ácido acético.

Os receptores opióides, como os Mu-(μ) (denominados MOR), são amplamente distribuídos na coluna espinhal e supra-espinhal. A ativação deles nestas regiões resulta na inibição da dor aguda e inflamatória. Além disso, a presença desses receptores tem sido demonstrada em vários tecidos periféricos, células do sistema imunológico e se faz presente tanto nos terminais centrais como periféricos dos neurónios pré-sinápticos de aferentes primários (AL-KHRASANI *et al.*, 2012).

A naloxona é um antagonista puro que se liga aos receptores opióides e quando administrado isoladamente produz pouco ou nenhum efeito, mas em associação com um agonista opióide a naloxona age bloqueando rapidamente a ação de qualquer agonista, diminuindo assim muitos dos efeitos colaterais provocados por opiáceos (WERMELING, 2015). Neste ensaio a naloxona foi utilizada na dose de 1mg/kg para avaliação da ação da pellucidina A em receptores opióides. Os resultados demonstraram que a naloxona não interfere na diminuição do padrão de contorções promovido pela pellucidina A, eliminando assim a hipótese de que a pellucidina A poderia atuar em receptores opióides, reforçando os resultados apresentados anteriormente nos primeiros ensaios para a avaliação antinociceptiva.

O L-NAME é um bloqueador inespecífico de NO sintases e de acordo com Makuch e colaboradores (2013), este bloqueador administrado intratecalmente possui efeito analgésico fraco, porém estatisticamente significativo em ensaio de alodinia mecânica e hiperalgesia térmica em roedores. No entanto, o bloqueador nitrérgico demonstrou ser capaz de potencializar o efeito analgésico de agonistas opióides em modelos de dor aguda e neuropática. Além disso, bloqueadores como o L-NAME são capazes de promover analgesia quando administrado intraperitonealmente em modelos de dor aguda como a contorção abdominal, demonstrando que as NO sintases são importantes na geração e inibição da

nocicepção e que sua ação vária de acordo com o local de aplicação e sistema (SNC ou SNP) observado, pois a via das NO sintases possuem uma estreita relação com a modulação do mecanismo de ação de opióides, além de possuir importantes funções no processo de nocicepção e inflamação, causada pela indução de suas isoformas (MAKUCH *et al.*, 2013).

No ensaio de contorção o L-NAME apresentou atividade antinociceptiva quando administrado pela via intraperitoneal na dose de 5 mg/kg e teve seu efeito potencializado quando administrado com a pellucidina A, demonstrando resultados estatisticamente significativos na comparação entre os grupos testados. Os resultados corroboram com a hipótese de que a pellucidina A pode interferir na via nitrérgica, promovendo uma atividade sinérgica entre a pellucidina A e o L-NAME, no qual o L-NAME interfere de forma significativa na ação da Pellucidina A, potencializando seu efeito analgésico e vice-versa. De acordo com os dados, as drogas podem estar utilizando uma via de ação similar, bloqueando as NO sintases ou agindo por vias de atuação diferentes, mas que são relacionadas.

A ação antinociceptiva da pellucidina A pode estar relacionada com uma ação anti-inflamatória, agindo até mesmo de forma sinérgica com outros bloqueadores na inibição de alguns dos mediadores liberados em grande quantidade na inflamação, como o óxido nítrico e a histamina. A pellucidina A pode estar colaborando para a inibição da produção e liberação ou bloqueando a ligação desses mediadores com seus receptores. E para avaliar se a pellucidina A possui ação anti-inflamatória foi realizado o ensaio de granuloma induzido por pelota de algodão em camundongos, por ser um método de considerável aplicabilidade e fácil reprodutibilidade, quando comparado com outros ensaios inflamatórios (ARAGÃO, 2008).

O método do granuloma induzido por pelota de algodão tem sido amplamente utilizado para avaliar os componentes transudativos e exsudativos de inflamação sub-crônica. O fluido absorvido pelo sedimento influencia no peso úmido do granuloma e o peso seco correlacionando-se bem com a quantidade de tecido granuloso formado (ISMAIL *et al.*, 1997; KUMAR, RAJKAPOOR & PERUMAL, 2013).

Neste ensaio a pellucidina A na dose de 10 mg/kg apresentou um efeito anti-inflamatório, com uma diferença estatisticamente significativa quando comparado com o controle e o SHAM na diminuição da produção de material inflamatório e do tecido granulomatoso formado. Os resultados demonstram que a pellucidina A foi

capaz de diminuir a quantidade de material transsudativo e exudativo formados, quando comparados ao grupo controle ou o SHAM. Assim como possuiu uma menor formação de tecido granulomatoso, que consiste basicamente em um agrupado de macrófagos epitelióides cercados por um colar de leucócitos mononucleares, especialmente linfócitos, estimulados pela reação imunológica ao corpo estranho inserido na região dorsal do camundongo (KUMAR *et al.*, 2008). Logo, podemos inferir que a pellucidina A possui efeito antinociceptivo por atuar na inflamação promovendo uma resposta anti-inflamatória.

Na literatura foram encontrados estudos de moléculas que possuem similaridade estrutural com a pellucidina A. Em estudos realizados por Davis e colaboradores (2007) e Riener & Nicewicz (2013), foram utilizados métodos de isolamento de biomoléculas de estrutura similar a pellucidina A e avaliação de suas atividades biológicas, assim como a comparação dessas moléculas e suas atividades. Dentre essas biomoléculas está a lignana ciclobutânica, endiandrina A, que foi caracterizada por possuir uma potente ação de se ligar a receptores de glicocorticóides, formando o complexo ativado (GR). Neste experimento a capacidade das moléculas sintéticas da endiandrina A também foram testadas, como a sua forma metilada a Di-O-metilendiandrina A, que possui maior similaridade com a pellucidina A, e esta substância também demonstrou possuir capacidade de se ligar ao receptor de glicocorticóides (DAVIS *et al.*, 2007).

A nomenclatura IUPAC da pellucidina A é benzene, 1,1'-[(1R,2S)-1,2-cyclobutanedilyl] bis [2,4,5-trimethoxy-, rel- (9CI) e como dito anteriormente a via de biossíntese proposta para a pellucidina A é diferente das lignanas. No entanto, devido a sua média polaridade é possível pressupor que esta molécula possa transpassar a membrana fosfolipídica celular e exercer seu efeito no núcleo celular, agindo como um possível agonista glicocorticóide, se ligando ao receptor de glicocorticóide que estava inativo, formando o complexo ativado (GR) e promovendo assim a inibição do processo inflamatório.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados podemos concluir que a pellucidina A apresentou um efeito antinociceptivo no ensaio de ácido acético e na segunda fase da formalina, demonstrando possível ação antinociceptiva por atuação periférica.

Na avaliação de sua ação em associação com antagonistas que agem na inflamação e/ou nocicepção a pellucidina A demonstrou ação sinérgica ao ser associada com o inibidor inespecífico de NO sintase, L-NAME e com o bloqueador de receptores H1 histaminérgico, cipro-heptadina, que possuem atividade analgésica por interferir na liberação ou atuação do óxido nítrico e da histamina, que são liberados em grande quantidade na inflamação.

A comprovação da atividade anti-inflamatória da pellucidina A pelo ensaio de granuloma induzido por pelota de algodão corrobora com a hipótese de sua ação na interferência do processo inflamatório. E na comparação da pellucidina A com moléculas que possuem similaridade estrutural com este composto, pode-se presumir que sua ação antinociceptiva e anti-inflamatória pode estar relacionada com uma possível ação na via de ativação dos receptores de glicorticóides.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALA, S., DÉVORA, S., MARTÍN-HERRERA, D., & PÉREZ-PAZ, P. Antinociceptive and anti-inflammatory activity of *Sambucus palmensis* link, an endemic Canary Island species. **Journal of ethnopharmacology**, v. 155, n. 1, p. 626-632, 2014.
- AL-KHRASANI, M., LACKÓ, E., RIBA, P., KIRÁLY, K., SOBOR, M., TIMÁR, J., ... & FÜRST, S. The central versus peripheral antinociceptive effects of μ -opioid receptor agonists in the new model of rat visceral pain. **Brain research bulletin**, v. 87, n. 2, p. 238-243, 2012.
- ARAGÃO, T. P. **CASSIA VIRGÍNICA®(CASSIA OCCIDENTALIS L.): ABORDAGEM FARMACOLÓGICA E TOXICOLÓGICA**. 2008. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Ciências Farmacêuticas.
- ARRIGONI-BLANK, M. F.; DMITRIEVA, E. G.; FRANZOTTI, E. M.; ANTONIOLLI, A. R.; ANDRADE, M. R.; MARCHIORO, M. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Peperomia pellucida* (L.) HBK (Piperaceae). **Journal Ethnopharmacology**, v. 91, n. 2, p. 215-218, 2004.
- BAKER, P. R.S., SCHOPFER, F.J., O'DONNELL, V.B., FREEMAN, B. A. Convergence of nitric oxide and lipid signaling: Anti-inflammatory nitro-fatty acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 46, n. 8, p. 989-1003, 2009.
- BATISTA, J. M.; BATISTA, A. N. L.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; LÓPEZ, S. N.; NAFIE, L. A.; FURLAN, M. Further monoterpene chromane esters from *Peperomia obtusifolia*: VCD determination of the absolute configuration of a new diastereomeric mixture. **Tetrahedron Letters**, v. 53, n. 45, p. 6051-6054, 2012.
- BAYMA, J. D.; ARRUDA, M. S.; MÜLLER, A. H.; ARRUDA, A. C.; CANTO, W. C. A dimeric ArC₂ compound from *Peperomia pellucida*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 779-782, 2000.
- BRANDÃO, H. N.; JUCENI, P. D.; COUTO, D. R.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química nova**. v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.
- CALVO, M.; DAWES, J. M.; BENNETT, D. L. H. The role of the immune system in the generation of neuropathic pain. **Lancet neurology**. v. 11, n. 7, p. 629-642, 2012.
- CARVALHO-SILVA, M.; GUIMARÃES, E. F.; CÂMARA, P. E. A. S. New Species of *Peperomia* (Piperaceae) from Brazil. **Systematic Botany**. v. 38, n. 3, p. 571-575, 2013.
- CAVENDISH, R. L., DE SOUZA SANTOS, J., NETO, R. B., PAIXÃO, A. O., OLIVEIRA, J. V., DE ARAUJO, E. D., ... & GOMES, M. Z. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Brazilian red propolis extract and formononetin in rodents. **Journal of ethnopharmacology**, v. 173, p. 127-133, 2015.

CORRÊA, C. R., KYLE, D. J., CHAKRAVERTY, S., & CALIXTO, J. B. Antinociceptive profile of the pseudopeptide B2 bradykinin receptor antagonist NPC 18688 in mice. **British journal of pharmacology**, v. 117, n. 3, p. 552-558, 1996.

COVIAN, Miguel R. Physiopathogenesis of pain. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 23, n. 3, p. 143-164, 1965.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochim. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

CRIADO, P. R.; CRIADO, R. F. J.; MARUTA, C. W.; MACHADO FILHO, C. D. A.; Histamina, receptores de histamina e anti-histaminicos: Novos conceitos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 2, p. 195-210, 2010.

CRUVINEL, W. M., JÚNIOR, D. M., ARAÚJO, J. A. P., CATELAN, T. T. T., DE SOUZA, A. W. S., DA SILVA, N. P., & ANDRADE, L. E. C. Sistema Imunitário–Parte I Fundamentos da imunidade inflata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rev Bras Reumatol**, v. 50, n. 4, p. 434-61, 2010.

DAVIS, R. A., CARROLL, A. R., DUFFY, S., AVERY, V. M., GUYMER, G. P., FORSTER, P. I., & QUINN, R. J. Endiandrin A, a potent glucocorticoid receptor binder isolated from the Australian plant *Endiandra anthropophagorum*. **Journal of natural products**, v. 70, n. 7, p. 1118-1121, 2007.

DELEO, J. A., COLBURN, R. W., COOMBS, D. W., & ELLIS, M. A. The differentiation of NSAIDs and prostaglandin action using a mechanical visceral pain model in the rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 33, n. 1, p. 253-255, 1989.

DEUMENS, R.; STEYAERT, A.; FORGET, P.; SCHUBERT, M.; LAVAND'HOMME, P.; HERMANS, E.; DE KOCK, M. Prevention of chronic postoperative pain: Cellular, molecular, and clinical insights for mechanism-based treatment approaches. **Progress in Neurobiology**, v. 104, p. 1-37, 2013.

DINIZ, D. A., PETROCCHI, J. A., NAVARRO, L. C., SOUZA, T. C., CASTOR, M. G., PEREZ, A. C. & ROMERO, T. R. Serotonin induces peripheral mechanical antihyperalgesic effects in mice. **European journal of pharmacology**, v. 767, p. 94-97, 2015.

DOGRUL, A.; SEYREK, M.; YALCIN, B.; ULUGOL, A. Involvement of descending serotonergic and noradrenergic pathways in CB1 receptor-mediated antinociception. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 1280, p. 52-59, 2009.

DOGRUL, A.; OSSIPOV, M. H.; PORRECA, F. Differential mediation of descending pain facilitation and inhibition by spinal 5HT-3 and 5HT-7 receptors. **Brain Research**, v. 38, n. 1, p. 97-105, 2012.

ESKANDARI, N.; BASTAN, R.; PEACHELL, P. T. Regulation of human skin mast cell histamine release by PDE inhibitors. **Allergologia et immunopathologia**, v. 43, n. 1, p. 37-41, 2015.

FEIN, A., PETROV, P., FRANCISCHI, J. N., & FERREIRA, S. H. Nociceptores: as células que sentem dor. **Ribeirão Preto: Dor On Line**, 2011.

FEITOZA, C. Q.; SEMEDO, P.; GONÇALVES, G. M.; CENEDEZE, M. A.; PINHEIRO, H. S.; SANTOS, O. F. P.; LANDGRAF, R. G.; PACHECO-SILVA, A.; CAMARA, N. O. S. Modulation of inflammatory response by selective inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in acute kidney injury. **Inflammation Research**, v. 59, n. 3, p. 167-175, 2010.

FELIPPE, L. G.; BATISTA, J. M.; BALDOQUI, D. C.; NASCIMENTO, I. R.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; & FURLAN, M. Structure and absolute configuration of a secolignan from *Peperomia blanda*. **Phytochemistry Letters**, v. 4, n. 3, p. 245-249, 2011.

FINNERUP, N.B. Pain in patients with spinal cord injury. **PAIN®**, v. 154, p. S71-S76, 2013.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 265-271, 2000.

GAO, Y.; RU-RONG, J. Chemokines, neuronal–glial interactions, and central processing of neuropathic pain. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 126, n. 1, p. 56-68, 2010.

GARCÍA-RAMALLO, E.; MARQUES, T.; PRATS, N.; BELETA, J.; KUNKEL, S.L.; GODESSART, N. Resident cell chemokine expression serves as the major mechanism for leukocyte recruitment during local inflammation. **Journal of immunology**, v. 169, n. 11, p. 6467-6473, 2002.

GARLAND, E.L. Pain processing in the human nervous system: a selective review of nociceptive and biobehavioral pathways. **Primary Care**, v. 39, n. 3, p. 561-571, 2012.

GENOVESE, S.; EPIFANO, F.; FIORITO, S.; CURINI, M.; MARRELLI, M.; MENICHINI, F.; CONFORTI, F. Conjugation of L-NAME to prenyloxycinnamic acids improves its inhibitory effects on nitric oxide production. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 10, p. 2933-2935, 2013.

GOES, M. C. V., JACOBS, J. W., & BIJLSMA, J. W. The value of glucocorticoid co-therapy in different rheumatic diseases-positive and adverse effects. **Arthritis research & therapy**, v. 16, n. 2, p. 1, 2014.

GOINS, W. F.; COHEN, J. B.; GLORIOSO, J. C. Gene therapy for the treatment of chronic peripheral nervous system pain. **Neurobiology of disease**, v. 48, n. 2, p. 255-270, 2012.

GOLAN, D., JUNIOR, T., ARMEN, H., ARMSTRONG, E. J., & ARMSTRONG, A. W. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia.** Guanabara Koogan, 2009.

HALDER, S., MEHTA, A. K., MEDIRATTA, P. K., & SHARMA, K. K. Acute effect of essential oil of *Eugenia caryophyllata* on cognition and pain in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 385, n. 6, p. 587-593, 2012.

HAMEED, F., IHM, JOSEPH. Injectable medications for osteoarthritis. **PM&R**, v. 4, n. 5, p. S75-S81, 2012.

HANANI, M. Intercellular communication in sensory ganglia by purinergic receptors and gap junctions: Implications for chronic pain. *Brain Research*. **Brain Research**, v. 1487, p. 183-191, 2012.

HANSEN, R. R.; MALCANGIO, M. Astrocytes-Multitaskers in chronic pain. **European Journal of Pharmacology**. v. 716, n. 1, p. 120-128, 2013.

HORNER, H. T. *Peperomia* leaf cell wall interface between the multiple hypodermis and crystal-containing photosynthetic layer displays unusual pit fields. **Annals of Botany**. v. 109, p. 1307-1315, 2012.

HUNSKAAR, S., & HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, n. 1, p. 103-114, 1987.

HVAS, C. L.; NØRREGAARD, R.; NIELSEN, T. K.; BARKLIN, A.; TØNNESEN, E. Brain death increases COX-1 and COX-2 expression in the renal medulla in a pig model. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v. 58, n. 2, p. 243-250, 2014.

ISMAIL, T. S., GOPALAKRISHNAN, S., BEGUM, V. H., & ELANGO, V. Anti-inflammatory activity of *Salacia oblonga* Wall. and *Azima tetraacantha* Lam. **Journal of ethnopharmacology**, v. 56, n. 2, p. 145-152, 1997.

JALIL, A. M. A.; SHUID, A. N.; MUHAMMAD, N. Role of medicinal plants and natural products on osteoporotic fracture healing. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**. Vol.2012, 2012.

JOHNSON, A. C., & GREENWOOD-VAN MEERVELD, B. Chapter Ten-The Pharmacology of Visceral Pain. **Advances in Pharmacology**, v. 75, p. 273-301, 2016.

JUNIOR, V. B. S., BERMUDEZ, G. M. M., & GUIMARÃES, E. F. Diversidade de Piperaceae em um remanescente de Floresta Atlântica na região serrana do Espírito Santo, Brasil. **Biotemas**, v. 27, n. 1, p. 49-57, 2013.

KALLENBORN-GERHARDT, W.; SCHRÖDER, K.; GEISLINGER, G.; SCHMIDTKO, A. NOXious signaling in pain processing. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 137, n. 3, p. 309-317, 2013.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M.; SIEGELBAUM, S. A.; HUDSPETH, J. A. **Principios da Neurociência**, 5 ed. Porto Alegre, AMGH, 2014.

KIGUCHI, N.; MAEDA, T.; KOBAYASHI, Y.; FUKAZAWA, Y.; KISHIOKA, S. Macrophage inflammatory protein-1 α mediates the development of neuropathic pain following peripheral nerve injury through interleukin-1 β up-regulation. **PAIN**, v. 149, 305-315, 2010.

KIGUCHI, N., KOBAYASHI, Y., KISHIOKA, S. Chemokines and cytokines in neuroinflammation leading to neuropathic pain. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 12, n. 1, p. 55-61, 2012.

KING, C. D.; GOODIN, B.; GLOVER, T. L.; RILEY, J. L.; HOU, W.; STAUD, R.; FILLINGIM, R. B. Is the pain-reducing effect of opioid medication reliable? A psychophysical study of morphine and pentazocine analgesia. **PAIN**, v. 154, n. 3, p. 476-483, 2013.

KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. PATOFISIOLOGIA DA DOR (Pathophysiology of pain). **Archives of veterinary science**, v. 13, n. 1, p. 1-12, 2008.

KOBAYASHI, Y.; KIGUCHI, N.; MAEDA, T.; OZAKI, M.; KISHIOKA, S. The critical role of spinal ceramide in the development of partial sciatic nerve ligation-induced neuropathic pain in mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 421, n. 2, p. 318-322, 2012.

KOSTER, R., ANDERSON, M., & DE BEER, E. J. Acetic acid-induced analgesic screening. **FEDERATION PROCEEDINGS**, 1959.

KUMAR, R. S., RAJKAPOOR, B., & PERUMAL, P. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of methanolic leaf extract of *Indigofera cassioides* Rottl. Ex. DC. **Journal of Acute Disease**, v. 2, n. 4, p. 322-326, 2013.

KUMMER, C. L., & COELHO, T. C. R. Antiinflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2): aspectos atuais. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, n. 4, p. 498-512, 2002.

KWON, M.; ALTIN, M.; DUENAS, H.; ALEV, L. The role of descending inhibitory pathways on chronic pain modulation and clinical implications. **Pain Practice**, v. 14, n. 7, p. 656-667, 2014.

LAHERA, V. Interacciones entre los inhibidores de la ciclooxigenasa y los inhibidores de la enzima de conversión de angiotensina. **Hipertension y Riesgo Vascular**, v. 26, n. 2, p. 53-55, 2009.

LANGFIELD, R. D.; SCARANO, F. J.; HEITZMAN, M. E.; KONDO, M.; HAMMOND, G. B.; NETO, C. C. Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the Peruvian medicinal plant *Peperomia galioides*. **Journal Ethnopharmacol**, v. 94, n. 2, p. 279-281, 2004.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. biochimica et biophysica acta Animal models of nociception. **Pharmacology**, v. 53, n. 4, p. 597-652, 2001.

LI, Y.; TONG, A.; HUANG, J. Two New Norlignans and a New Lignanamide from *Peperomia tetraphylla*. **Chemistry & biodiversity**, v. 9, n. 4, p. 769-776, 2012.

LIMA, J. J. F. Plantas e Dor . Contributo para o Estudo Etnoantropológico do Tratamento da Dor. **Dor** v. 18, p. 5–19, 2010.

LIN, M.; YU, D.; WANG, Q.; LU, Q.; ZHU, W.; BAI, F.; LI, G.; WANG, X.; YANG, Y.; QIN, X.; FANG, C.; CHEN, H.; YANG, G. Secolignans with antiangiogenic activities from *Peperomia dindygulensis*. **Chemistry & biodiversity**, v. 8, n. 5, p. 862-871, 2011.

LINHART, O.; OBREJA, O.; KRESS, M. The inflammatory mediators serotonin, prostaglandin e2 and bradykinin evoke calcium influx in rat sensory neurons. **Neuroscience**, v. 118, n. 1, p. 69-74, 2003.

LÖTSCH, J.; DOEHRING, A.; MOGIL, J. S.; ARNDT, T.; GEISLINGER, G.; ULTSCH, A. Functional genomics of pain in analgesic drug development and therapy. **Pharmacology & therapeutics**, v. 139, n. 1, p. 60-70, 2013.

LUMLEY, M. A., COHEN, J. L. ; BORSZCZ, G. S.; CANO, A.; RADCLIFFE, A. M.; PORTER, L. S.; SCHUBINER, H.; KEEFE, F. J. Pain and emotion:a biopsychosocial review of recent research. **Journal of Clinical Psychology**, v. 67, n. 9, p. 942-968, 2011.

MACDONALD, A. D.; WOOLFE, G.; BERGEL, F.; MORRISON, A. L.; RINDERKNECHT, H. Analgesic action of pethidine derivatives and related compounds. **British journal of pharmacology and chemotherapy**, v. 1, n. 1, p. 4-14, 1946.

MATHIEU, G.; SAMAIN, M. S.; REYNDERS, M.; GOETGHEBEUR, P. Taxonomy of the *Peperomia* species (Piperaceae) with pseudo-epiphyllous inflorescences, including four new species. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 157, n. 2, p. 177-196, 2008.

MATSUI, T.; ITO, C.; MASUBUCHI, S.; ITOIGAWA, M. Licarin A is a candidate compound for the treatment of immediate hypersensitivity via inhibition of rat mast cell line RBL-2H3 cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 67, n. 12, p. 1723-1732, 2015.

MAYHEW, S. D.; HYLANDS-WHITE, N.; PORCARO, C.; DERBYSHIRE, S. W. G.; BAGSHAW, A. P. Intrinsic variability in the human response to pain is assembled from multiple, dynamic brain processes. **NeuroImage**, v. 75, p. 68-78, 2013.

MBAH, J. A; NGEMENYA, M. N.; ABAWAH, A. L.; BABIAKA, S. B.; NUBED, L. N.; NYONGBELA, K. D.; LEMUH, N. D.; EFANGE, S. M. N.; Bioassay-guided discovery of antibacterial agents: in vitro screening of *Peperomia vulcanica*, *Peperomia fernandopoioana* and *Scleria striatinux*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 11, n. 1, p. 1, 2012.

MEVES, H. The action of prostaglandins on ion channels. **Current neuropharmacology**, v. 4, n. 1, p. 41-57, 2006.

MEYMANDI, M. S.; KEYHANFAR, F. Assessment of the antinociceptive effects of pregabalin alone or in combination with morphine during acetic acid-induced writhing in mice. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 110, p. 249-254, 2013.

MIENKE, R., WIJCK, A. J., KALKMAN, C. J., & YAKSH, T. L. The effects of glucocorticoids on neuropathic pain: a review with emphasis on intrathecal methylprednisolone acetate delivery. **Anesthesia & Analgesia**, v. 118, n. 5, p. 1097-1112, 2014.

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

MIRI, A., SHARIFI-RAD, J., TABRIZIAN, K., & NASIRI, A. A. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of *Teucrium persicum* Boiss. Extract in Mice. **Scientifica**, v. 2015, 2015.

MOLLACE, V.; MUSCOLI, C.; MASINI, E.; CUZZOCREA, S.; SALVEMINI, D. Modulation of Prostaglandin Biosynthesis by Nitric Oxide and Nitric Oxide Donors. **Pharmacological Reviews**, v. 57, n. 2, p. 217-252, 2005.

MORAIS, T. C. **EFEITO ANALGÉSICO, ANTIINFLAMATÓRIO E GASTROPROTETOR DOS ÁCIDOS ANACÁRDICOS, ISOLADOS DE ANACARDIUM OCCIDENTALE L., EM MODELOS EXPERIMENTAIS.** 2010. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Ceará.

MORI, Lidia Sayuri. **ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO EXTRATO ETANÓLICO E DO DERIVADO SEMI-SINTÉTICO DA XILOPINA, N-ACETIL XILOPINA, OBTIDOS DE *Magnolia ovata*.** 2010. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná.

NGUEGUIM, F. T.; KHAN, M. P.; DONFACK, J. H.; TEWARI, D.; DIMO, T.; KAMTCHOUING, P.; MAURYA, R.; CHATTOPADHYAY, N. Ethanol extract of *Peperomia pellucida* (Piperaceae) promotes fracture healing by an anabolic effect on osteoblasts. **Journal Ethnopharmacology**, v. 148, n. 1, p. 62-68, 2013.

NICKEL, F. T.; SEIFERT, F.; LANZ, S.; MAIHÖFNER, C. Mechanisms of neuropathic pain. **European Neuropsychopharmacology**, v. 22, n. 2, p. 81-91, 2012.

NICOLSON, T. A.; FOSTER, A. F.; BEVAN, S.; RICHARDS, C. D. Prostaglandin E2 sensitizes primary sensory neurons to histamine. **Neuroscience** v. 150, n. 1, p. 22-30, 2007.

NWOKOCHA, C. R.; OWU, D. U.; KINLOCKE, K.; MURRAY, J.; DELGODA, R.; THAXTER, R.; MCCALLA, G.; YOUNG, M. L. Possible Mechanism of Action of the Hypotensive Effect of *Peperomia pellucida* and Interactions between Human Cytochrome P450 Enzymes. **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 1, n. 4, p. 1-5, 2012.

OLD, E. A.; MALCANGIO, M. Chemokine mediated neuron-glia communication and aberrant signalling in neuropathic pain states. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 12, n. 1, p. 67-73, 2012.

OLIVEIRA, R. G., MAHON, C. P. A. N., ASCÊNCIO, P. G. M., ASCÊNCIO, S. D., BALOGUN, S. O., & DE OLIVEIRA MARTINS, D. T. Evaluation of anti-inflammatory activity of hydroethanolic extract of *Dilodendron bipinnatum* Radlk. **Journal of ethnopharmacology**, v. 155, n. 1, p. 387-395, 2014.

OOI, D. J.; IQBAL, S.; ISMAIL, M. Proximate composition, nutritional attributes and mineral composition of *Peperomia pellucida* L. (Ketumpangan Air) grown in Malaysia. **Molecules**, v. 17, n. 9, p. 11139-11145, 2012.

PARK, H.; LEE, S. Free energy perturbation approach to the critical assessment of selective cyclooxygenase-2 inhibitors. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 19, n. 1, p. 17-31, 2005.

PINHEIRO, B. G.; SILVA, A. S. B.; SOUZA, G. E. P.; FIGUEIREDO, J. G.; CUNHA, F. Q.; LAHLOU, S.; DA SILVA, J. K. R.; MAIA, J. G. S.; SOUSA, P. J. C. Chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory effects in rodents of the essential oil of *Peperomia serpens* (Sw.) Loud. **Journal Ethnopharmacol**, v. 138, n. 2, p. 479-486, 2011.

PINO, G., CIEZA, N., WANKE, S., SAMAIN, M.-S. New Succulent Window-Leaved *Peperomias* from Peru. **Haseltonia**, v. 18, p. 3-26, 2012.

RANG, H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M., FLOWER, R.J., HENDERSON, G. *Farmacologia*. 7^aed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

REICHLING, D. B.; GREEN, P. G.; LEVINE, J. D. The fundamental unit of pain is the cell. **PAIN@**, v. 154, p. S2-S9, 2013.

RIENER, M., & NICEWICZ, D. A. Synthesis of cyclobutane lignans via an organic single electron oxidant–electron relay system. **Chemical Science**, v. 4, n. 6, p. 2625-2629, 2013.

RUIZ, S. P.; ANJOS, M. M.; CARRARA, V. S.; DELIMA, J. N.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, T. U.; NAKAMURA, C. V.; DE ABREU FILHO, B. A. Evaluation of the antibacterial activity of piperaceae extracts and nisin on *alicyclobacillus acidoterrestris*. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 11, p. M1772-M1777, 2013.

SAAD, G. A.; LÉDA, P. H. O.; SÁ, I. M.; SEIXLACK, A. C. C. *Fitoterapia Contemporânea: Tradição e ciência na pratica clínica*. Rio de Janeiro. **Elsevier**, 402p. 2009.

SALAZAR, K. J. M.; KATO, M. J. Meroterpenes from *Peperomia oreophila* Hensch. and *Peperomia arifolia* Miq (Short Report). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 4, p. 782-785, 2012.

SAMAIN, M. S. G; MATHIEL, G; PINO, L. SYMMANK, N. CIEZA, C. NEINHUIS, P. GOETGHEBEUR & S. WANKE. The geophytic *Peperomia* subgenus *Tildenia* (Piperaceae) in the Andes with the description of new species in a phylogenetic framework. **Plant Ecology and Evolution** **144**, v. 144, n. 2, p. 148-176, 2011.

SAMAIN, M.S., VANDERSCHAEVE, L., CHAELE, P., GOETGHEBEUR, P., NEINHUIS, C., WANKE, S. Is morphology telling the truth about the evolution of the species rich genus *Peperomia* (Piperaceae)? **Plant Systematics and Evolution**, v. 278, n. 1-2, p. 1-21, 2009.

SANTOS, P. R. D.; MOREIRA, D. L.; GUIMARÃES, E. F.; KAPLAN, M. A. C. Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlantic forest. **Phytochemistry**, v. 58, n. 4, p. 547-551, 2001.

SANTOS, T. G.; FUKUDA, K.; KATO, M. J.; SARTORATO, A.; DUARTE, M. C. T.; RUIZ, A. L. T. G.; DE CARVALHO, J. E., AUGUSTO, F.; MARQUES, F. A.; SALES MAIA, B. H. L. N. Characterization of the essential oils of two species of Piperaceae by one- and two-dimensional chromatographic techniques with quadrupole mass spectrometric detection. **Microchemical Journal**, v. 115, p. 113-120, 2014.

SENGUPTA, J. N. Visceral pain: the neurophysiological mechanism. **Handbook of Experimental Pharmacology**. v. 194, p. 31–74, 2009.

SHAMASH, S.; REICHERT, F.; ROTSHENKER, S. The cytokine network of Wallerian degeneration: tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1alpha, and interleukin-1beta. **Journal Neuroscience**, v. 22, n. 8, p. 3052-3060, 2002.

SIKANDAR, S.; RONGA, I.; IANNETTI, G. D.; DICKENSON, A. H. Neural coding of nociceptive stimuli-from rat spinal neurones to human perception. **PAIN®**, v. 154, n. 8, p. 1263-1273, 2013.

SILVA, A. O., ALVES, A. D., DE ALMEIDA, D. A. T., BALOGUN, S. O., DE OLIVEIRA, R. G., AGUIAR, A. A., ... & DE OLIVEIRA MARTINS, D. T. Evaluation of anti-inflammatory and mechanism of action of extract of *Macrosiphonia longiflora* (Desf.) Müll. Arg. **Journal of ethnopharmacology**, v. 154, n. 2, p. 319-329, 2014.

SPONCHIADO, G.; ADAM, M. L.; SILVA, C. D.; SILVA SOLEY, B.; DE MELLO-SAMPAYO, C.; CABRINI, D. A.; CORRER, C. J.; OTUKI, M. F. Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 178, p. 289-296, 2016.

SREBRO, DRAGANA; VUČKOVIĆ, SONJA; PROSTRAN, MILICA. Inhibition of neuronal and inducible nitric oxide synthase does not affect the analgesic effects of NMDA antagonists in visceral inflammatory pain. **Acta Neurobiol Exp**, v. 76, p. 110-116, 2016.

STEEDS, C. E. The anatomy and physiology of pain. **Surgery (Oxford)**, v. 27, n. 12, p. 507-511, 2009.

STEIN, C. Opioids, sensory systems and chronic pain. **European journal of pharmacology**, v. 716, n. 1, p. 179-187, 2013.

SYAM, S.; BUSTAMAM, A.; ABDULLAH, R.; SUKARI, M. A.; HASHIM, N. M.; MOHAN, S.; LOOI, C. Y.; WONG, W. F.; YAHAYU, M. A.; ABDELWAHAB, S. I. β Mangostin suppress LPS-induced inflammatory response in RAW 264.7 macrophages in vitro and carrageenan-induced peritonitis in vivo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 153, n. 2, p. 435-445, 2014.

TADAIESKY, M. T., ANDREATINI, R., & VITAL, M. A. Different effects of 7-nitroindazole in reserpine-induced hypolocomotion in two strains of mice. **European journal of pharmacology**, v. 535, n. 1, p. 199-207, 2006.

TAKAHASHI, Y.; HASEGAWA-MORIYAMA, M.; SAKURAI, T.; INADA, E. The macrophage-mediated effects of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone attenuate tactile allodynia in the early phase of neuropathic pain development. **Anesthesia and Analgesia**, v. 113, n. 2, p. 398-404, 2011.

TJØLSEN, A., BERGE, O. G., HUNSKAAR, S., ROSLAND, J. H., & HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, n. 1, p. 5-17, 1992.

VILLARINHO, J. G., PINHEIRO, K. V., PINHEIRO, F. V.; OLIVEIRA, S. M.; MACHADO, P.; MARTINS, M. A. P.; BONACORSO, H. G.; ZANATTA, N.; FACHINETTO, R.; FERREIRA, J. The antinociceptive effect of reversible monoamine oxidase-A inhibitors in a mouse neuropathic pain model. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 44, p. 136-142, 2013.

WALKER, K., FOX, A. J., & URBAN, L. A Animal models for pain research. **Molecular medicine today**, v. 5, n. 7, p. 319-321, 1999.

WANG, X. Z.; LIANG, J. Y.; WEN, H. M.; SHAN, C. X. ; LIU, R. Qualitative and quantitative analyses of bioactive secolignans from folk medicinal plant *Peperomia dindygulensis* using UHPLC-UV/Q-TOF-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 94, p. 1-11, 2014.

WANKE, S.; SAMAIN, M. S.; VANDERSCHAEVE, L.; MATHIEU, G.; GOETGHEBEUR, P.; NEINHUIS, C. Phylogeny of the genus *Peperomia* (Piperaceae) inferred from the trnK/matK region (cpDNA). **Plant Biology**, v. 8, n. 01, p. 93-102, 2006.

WEI, L. S.; WEE, W.; SIONG, J. Y. F.; SYAMSUMIR, D. F. Characterization of anticancer, antimicrobial, antioxidant properties and chemical compositions of *Peperomia pellucida* leaf extract. **Acta Medica Iranica**. v. 49, n. 10, p. 670, 2011.

WERMELING, DANIEL P. Review of naloxone safety for opioid overdose: practical considerations for new technology and expanded public access. **Therapeutic advances in drug safety**, v. 6, n. 1, p. 20-31, 2015.

WERMELING, D. P. Review of naloxone safety for opioid overdose: practical considerations for new technology and expanded public access. **Therapeutic advances in drug safety**, v. 6, n. 1, p. 20-31, 2015.

WHALEN, K.; FINKEL, R.; PANAVELIL, T. A. Farmacologia ilustrada. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016

WOOLF, C. J.; MA, Q. Nociceptors-Noxious Stimulus Detectors. **Neuron**, v. 55, n. 3, p. 353-364, 2007.

XU, S.; LI, N.; NING, M. M.; ZHOU, C. H.; YANG, Q. R.; WANG, M. W. Bioactive compounds from *Peperomia pellucida*. **Journal of Natural Products**. v. 69, n. 2, p. 247-250, 2006.

YAKSH, T. L., & RUDY, T. A. Studies on the direct spinal action of narcotics in the production of analgesia in the rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 202, n. 2, p. 411-428, 1977.

ZANOTTI, C. A.; SUESCÙN, A. M.; MATHIEU, G. Sinopsis y novedades taxonómicas de *Peperomia* (Piperaceae) em la Argentina. **Darwiniana**, v. 50, p. 124-147, 2012.

APÊNDICE A

CERTIFICADO



UFPA
Universidade Federal do Pará

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

Certificamos que o Projeto intitulado "ELUCIDAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DA BIOATIVIDADE DA SUBSTANCIA PNI-23 EMENSAIO DE CONTORÇÃO ABDOMINAL EM CAMUNDONGOS SUÍÇOS", protocolado sob o CEUA nº 5671030216, sob a responsabilidade de **Gilmara De Nazareth Tavares Bastos e equipe; Amanda Pamela Dos Santos Queiroz** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Universidade Federal do Pará (CEUA/UFPA) em reunião de 25/02/2016.

We certify that the proposal "ELUCIDATION OF THE ACTION MECHANISM ON THE BIOACTIVITY OF THE SUBSTANCE

PNI-23 IN ASSAY OF THE WRITHING ABDOMINAL WITH SWISS MICE", utilizing 80 Heterogenics mice (80 males), protocol number CEUA 5671030216, under the responsibility of **Gilmara De Nazareth Tavares Bastos and team; Amanda Pamela Dos Santos Queiroz** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Para (CEUA/UFPA) in the meeting of 02/25/2016.

Vigência da Proposta: de 02/2016 a 08/2016

Área: Instituto De Ciência Biológicas

Procedência: Biotério de experimentação do laboratório de neuroinflamação

Espécie: Camundongos heterogênicos

Gênero: Machos

idade: 4 a 6

semanas

N: 80 Linhagem: swiss

Peso: 20 a 35 g

Resumo: O PNI-23 é um novo composto dimérico, isolado juntamente com o fenilpropanoide dilapiol de partes aéreas da *Peperomia pellucida*, esta planta já possui atividade medicinal comprovada em estudos anteriores feitas com seu extrato, onde se observou sua atividade analgésica, antiinflamatória, antibacteriana, antioxidante e embora haja trabalhos envolvendo alguns de seus compostos químicos isolados, observando-se o potencial bioativo eficaz destes em ensaios in vitro, para atividade anticancerígena. Há ainda uma imensa quantidade de componentes desta espécie que ainda não foram isolados e devidamente avaliados em estudos experimentais que comprovem sua eficácia farmacológica. Em pesquisas anteriores feitas em nosso laboratório avaliou-se a atividade antinociceptiva do PNI-23, nesta nova perspectiva pretende-se a elucidação do mecanismo de ação in vivo deste componente. Dentre os modelos de nocicepção optou-se pelo ensaio de contorção abdominal para análise in vivo do mecanismo de ação. Palavras-chave: *Peperomia pellucida*; nocicepção; inflamação.

Belém do Pará, 24 de setembro de 2016

Prof. Dr. Moisés Hamoy
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Pará