



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ - UFPI
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - CCS
NÚCLEO DE PESQUISAS EM PLANTAS MEDICINAIS - NPPM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA



**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO ÓXIDO DE ROSA EM
ROEDORES**

LARISSA CRISTINA TEIXEIRA FURTADO LEITE

Teresina – PI

2017

LARISSA CRISTINA TEIXEIRA FURTADO LEITE

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO ÓXIDO DE ROSA EM
ROEDORES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais - NPPM, da Universidade Federal do Piauí - UFPI, como requisito para a obtenção do título de mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fernanda Regina de Castro Almeida.

Teresina – PI

2017

LARISSA CRISTINA TEIXEIRA FURTADO LEITE

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO ÓXIDO DE ROSA EM
ROEDORES.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais - NPPM, da Universidade Federal do Piauí - UFPI, como requisito para a obtenção do título de mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fernanda Regina de Castro Almeida.

EXAMINADA EM ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a. Fernanda Regina de Castro Almeida
(Orientadora)

Universidade Federal do Piauí

Prof. Dr. Francisco de Assis Oliveira
(Membro interno)

Universidade Federal do Piauí

Prof. Dr^a. Rosemarie Brandim Marques
(Membro Externo ao programa)

Universidade Estadual do Piauí

Dedicatória

A Deus, pela vida e por ter me permitido chegar até aqui
Aos meus pais, Rita de Cássia e Francisco Nivaldo, muito obrigada pela vida, pelo
amor, dedicação e incentivo que vocês me deram durante toda a minha jornada

A minha filha Maria Rita, minha fonte de amor

Ao meu esposo, Raimundo Neto, pelo amor, e dedicação

Aos meus irmãos (Luís Gustavo e Maria Clara), muito obrigada pelo
companheirismo.

A todos os meus familiares e amigos, pelo amor e pelo carinho que vocês me doam.

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me acompanhar na minha caminhada, no sentido intelectual e moral, dando-me força e coragem, perseverança e fé para transpor as montanhas da adversidade e dificuldades encontradas nesse caminho.

Agradeço aos meus pais (Rita de Cássia e Francisco Nivaldo), pelo amor e companheirismo. Agradeço em especial a minha mãe, pelas palavras de incentivo e por sempre me mostrar que eu posso conseguir tudo o que eu desejo. Dona Rita de Cássia, você é fonte de inspiração.

À minha boneca, Maria Rita, a maior prova do amor de Deus. Filha é por você que a cada dia eu quero ser uma pessoa melhor.

Aos meus irmãos (Luís Gustavo e Maria Clara), pelo amor e amizade. Em especial a minha Irmã Maria Clara, minha companheira de vida, muito obrigada por cuidar da minha menina, nos momentos em que eu tive que me ausentar. Nós amamos você demais.

Ao meu esposo, Raimundo Neto, pelo amor e incentivo. Por sempre me incentivar a realizar meus sonhos, mesmo que para isso, temos que ficar distantes, fisicamente, mais os nossos corações sempre estão juntinhos.

A minha Orientadora Professora Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida, pelos ensinamentos e amizade. Obrigada, por ser mais que uma orientadora, por me ajudar em todos os momentos que eu precisei.

Ao meu amigo, Prof. Dr. Luciano da Silva Lopes, que me acompanha desde a graduação. Muito obrigada, pela valiosa contribuição no trabalho e também por me ajudar em toda a minha caminhada.

Aos meus amigos de laboratório, em especial, Celyane, Everton e Marluce. Acredito que Deus sempre nos manda anjos e vocês foram os meus. Muito obrigada, pela ajuda

nos experimentos, pelas conversas, pelas experiências trocadas, enfim, obrigada pela amizade de vocês.

Aos amigos da turma de Mestrado pela boa convivência e solidariedade durante esses dois anos, foi muito importante à amizade de todos vocês;

A todos os professores e funcionários do Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais da Universidade Federal do Piauí, pelos conhecimentos compartilhados;

Ao Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa, do Laboratório de Química de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (LAPROBIO) da Universidade Federal de Sergipe, por ter cedido o monoterpeno testado nessa pesquisa;

À Universidade Federal do Piauí, pelo subsídio à realização deste trabalho, aliado a seu potencial científico e tecnológico;

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Piauí- FAPEPI, pela concessão da bolsa durante o período de realização deste mestrado.

A todos os meus amigos, colegas e conhecidos que direta ou indiretamente me ajudaram durante minha caminhada, o meu muito obrigada.

LARISSA CRISTINA TEIXEIRA FURTADO LEITE

Epígrafe

**“Se uma rosa de amor tu guardaste
Bem no teu coração;
Se a um Deus supremo e justo
Endereçaste, tua humilde oração;
Se com a taça erguida,
Cantaste, um dia, teu louvor à vida;
Tu não viveste em vão...”**

Omar Kayyan

RESUMO

Avaliação da atividade antinociceptiva do óxido de rosa em roedores. LEITE, L.C.T.F. Pós-graduação em farmacologia. Dissertação de mestrado, NPPM/CCS/UFPI (2017).

RESUMO

A dor é uma resposta a estímulos com lesão tecidual real ou potencial e representa uma resposta adaptativa essencial do organismo. O óxido de rosa é um monoterpene presente em várias espécies vegetais e que tem uma estrutura química semelhante a outros monoterpenos que apresentam propriedades sedativas, antinociceptivas e antidepressivas. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antinociceptiva do óxido de rosa em roedores. O primeiro protocolo a ser realizado foi o da toxicidade, onde os animais (camundongos Swiss fêmeas, 25-30 g), receberam o óxido de rosa (2 g/kg, v.o) ou veículo (salina + 2% Tween 80%, v.o) e foram observados em um período de 0-8 horas e por 14 dias após administração do óxido de rosa. Após esse período (14 dias), os animais foram eutanasiados e o sangue coletado para análises hematológicas e bioquímicas. Em seguida, foi realizado o protocolo de avaliação do dano gástrico, onde os animais foram tratados com óxido de rosa (150 mg/kg, v.o), veículo ou indometacina (20 mg/kg, v.o), após 7 horas os animais foram eutanasiados e os estômagos retirados e as lesões foram medidas (mm) com o auxílio de um paquímetro. Para a avaliação da atividade antinociceptiva, os animais (n=6-8) foram tratados com OR (6,25; 12,5; 25 e 50 mg/kg, v.o) para o teste de capsaicina e com óxido de rosa (12,5; 25 e 50 mg/kg, v.o) para o teste do glutamato, os outros grupos receberam veículo ou morfina (5 mg/kg, s.c.), após 30 ou 60 minutos foram submetidos ao estímulo, capsaicina (2 µg/20 µL/pata) ou glutamato (2 µmol/pata), injetado na pata traseira direita. A nocicepção foi avaliada, quantificando o tempo de lambertura da pata, após a administração da capsaicina (5 min) e o glutamato (15 min). Para investigar possíveis mecanismos de ação no teste do glutamato, os animais (n =6-8) foram pré-tratados i.p (20 -15 min) antes da administração do óxido de rosa (25mg/kg v.o), com naloxona (2 mg/kg); L-arginina (600 mg/kg), bicuculina (1,0 mg/kg), cetanserina (1 mg/kg, i.p), pindolol (0,5 mg/kg, i.p) ou ondansetrona (1,0 mg/kg, i.p). Foi avaliado também a hiperalgesia induzida por carragenina (0,1mL/pata) e prostaglandina E2 (1 µg/mL/ pata) usando o modelo de compressão mecânica da pata de ratas (Randall-Selitto), onde se avalia o limiar de retirada da pata em um período de 1 a 6 horas, após receber o agente álgico. No teste do campo aberto e rota rod, onde os animais foram tratados com o óxido de rosa (50 mg/kg, v.o), diazepam (4mg/kg, i.p) ou veículo. Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA / UFPI n ° 148/2016). As análises estatísticas foram realizadas utilizando ANOVA de sentido único seguido do teste de Tukey, p <0,05. No protocolo de toxicidade durante os 14 dias de observação, nenhum animal veio óbito e nem apresentaram alterações comportamentais, não sendo possível calcular a DL50 do OR, tal como também, não houve diferenças significativas entre os grupos, quanto a massa corpórea, peso dos órgãos e aos parâmetros bioquímicos e hematológicos. No protocolo de lesão gástrica foi mostrado que o óxido de rosa não causou lesão, quando comparado com a indometacina. Na avaliação da atividade antinociceptiva, o óxido de rosa foi capaz de reduzir o tempo de lambertura da pata, nas doses 12,5, 25 e 50 mg/kg, no teste da capsaicina, quando comparado ao veículo e no glutamato nas doses 25 e 50 mg/kg, quando comparado ao veículo. O pré- tratamento com a naloxona, não reverteu a antinocicepção do óxido de rosa, bem como a L-ARGININA e a ondansetrona. No entanto, a bicuculina, a cetanserina e o pindolol, reverteram a antinocicepção do óxido de rosa. Na hiperalgesia induzida por carragenina, o óxido de rosa só foi capaz de aumentar o limiar de retirada da pata, a partir da 3ª hora na dose de 50 mg/kg e a partir da 4ª hora na dose de 25 mg/kg. No entanto, na hiperalgesia induzida por prostaglandina E2 o óxido de rosa foi capaz de aumentar o limiar de retirada da pata a partir da 1ª hora, se estendendo até a 6ª hora, em todas as doses. No teste do campo aberto, os animais tratados com o óxido de rosa, não reduziram o número de invasões, quando comparado aos animais que receberam o diazepam, sendo semelhante ao grupo que recebeu apenas o veículo. No Rota-rod, os animais que receberam o óxido de rosa e o veículo permaneceram os 60 segundos na barra giratória, diferente dos tratados com o Diazepam, que reduziram consideravelmente o tempo de permanência na mesma. Em conclusão, esses resultados sugerem que o óxido de rosa, possui atividade antinociceptiva nos protocolos de dor aguda, envolvendo o sistema GABAérgico e serotoninérgico, no entanto sem alterar a capacidade exploratória e locomotora dos animais.

Palavras-chave: Monoterpene. Óxido de Rosa. Antinociceptivo

ABSTRACT

Evaluation of antinociceptive activity of rose oxide in rodents. LEITE, L.C.T.F. Post-Graduate Program in Pharmacology. Mastership Dissertation, NPPM/CCS/UFPI, (2017).

ABSTRACT

Pain is a response to stimuli with actual or potential tissue injury and represents an essential adaptive response of the organism. Rose oxide is a monoterpene present in several plant species and has a chemical structure similar to other monoterpenes that have sedative, antinociceptive and antidepressant properties. The objective of this study was to evaluate the antinociceptive activity of rose oxide in rodents. The first protocol to be performed was toxicity, where the animals (female Swiss mice, 25-30 g) received rose oxide (2 g/kg, p.o) or vehicle (saline + 2% Tween 80%, p.o) and were observed over a period of 0-8 hours and for 14 days after administration of rose oxide. After this period (14 days), the animals were euthanized and the blood collected for haematological and biochemical analyzes. After that, the animals were treated with rose oxide (150 mg/Kg, p.o), vehicle or indomethacin (20 mg/Kg, p.o), after 7 hours the animals were euthanized and the stomachs removed and the lesions were measured (mm) with the aid of a pachymeter. For the evaluation of antinociceptive activity, the animals (n = 6-8) were treated with OR (6.25, 12.5, 25 and 50 mg/kg, p.o) for the capsaicin and rose oxide test (12, 5, 25 and 50 mg/Kg, p.o) for the glutamate test, the other groups received either vehicle or morphine (5 mg/kg, sc), after 30 or 60 minutes were given to the stimulus, capsaicin (2 µg/20 µL/paw) or glutamate (2 µmol/paw), injected into the right hind paw. Nociception was evaluated by quantifying the paw licking time after administration of capsaicin (5 min) and glutamate (15 min). To investigate possible mechanisms of action in the glutamate test, animals (n = 6-8) were pretreated i.p (20 -15 min) prior to administration of rose oxide (25 mg/Kg), with naloxone (2 mg/Kg); L-arginine (600 mg/Kg), bicuculline (1.0 mg/Kg), ketanserin (1 mg/Kg, i.p), pindolol (0.5 mg/Kg, i.p) or ondansetron, i.p). Carrageenan (0.1mL / paw) and prostaglandin E2 (1 µg / ml / paw) -induced hyperalgesia were also evaluated using the rat paw mechanical compression model (Randall-Selitto), which evaluates the withdrawal threshold of paw in a period of 1 to 6 hours after receiving the pain reliever. In the open field test and rod route, where animals were treated with rose oxide (50 mg/Kg, p.o), diazepam (4 mg/Kg, i.p) or vehicle. All protocols were approved by the Committee on Ethics in the Use of Animals (CEUA / UFPI n ° 148/2016). Statistical analyzes were performed using one-way ANOVA followed by the Tukey test, p <0.05. In the protocol of toxicity during the 14 days of observation, no animal died and did not present behavioral alterations, it was not possible to calculate the LD50 of the OR, as well as there were no significant differences between the groups, regarding body mass, body weight and biochemical and hematological parameters. In the gastric lesion protocol it was shown that rose oxide did not cause lesion when compared to indomethacin. In the evaluation of the antinociceptive activity, the pink oxide was able to reduce the time of paw licking, in doses 12,5, 25 and 50 mg/Kg, in the capsaicin test, when compared to the vehicle and in the glutamate doses 25 and 50 mg/Kg when compared to vehicle. Pre-treatment with naloxone did not reverse the antinociception of rose oxide, as did L-ARGININE and ondansetron. However, bicuculline, ketanserin and pindolol reversed the antinociception of rose oxide. In carrageenan-induced hyperalgesia, rose oxide was only able to increase the paw withdrawal threshold from the 3rd hour at the dose of 50 mg/Kg and from the 4th hour at the dose of 25 mg/Kg. However, in prostaglandin E2-induced hyperalgesia, rose oxide was able to increase the paw withdrawal threshold from the 1st hour, extending up to the 6th hour, at all doses. In the open field test, animals treated with rose oxide did not reduce the number of invasions when compared to animals receiving diazepam, similar to the group that received only the vehicle. In the Rota-rod, the animals receiving the pink oxide and the vehicle remained the 60 seconds on the rotating bar, different from those treated with Diazepam, which considerably reduced the residence time in the same. In conclusion, these results suggest that rose oxide has antinociceptive activity in acute pain protocols, involving the GABAergic and serotonergic system, however without altering the exploratory and locomotor capacity of the animals.

Keywords: Monoterpeno. Rose oxide. Antinociceptive

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01: Conexões entre as fibras aferentes e a medula.....	32
FIGURA 02: Circuito principal de mediação da dor fisiológica.....	34
FIGURA 03: Estrutura molecular do monoterpeno óxido de rosa.....	45
FIGURA 04: Câmara de observação de acrílico espelhada usada nos testes capsaicina e glutamato.....	52
FIGURA 05: Teste de compressão da pata (Randall-Selitto)	55
FIGURA 06: Teste do Campo Aberto	57
FIGURA 07: Teste do Rota-Rod.....	58
FIGURA 08: Dano gástrico (mm) após a administração do óxido de rosa (150 mg/kg, v.o)	62
FIGURA 09. Imagens referente aos estômagos dos animais utilizados no protocolo de toxicidade aguda oral do óxido de rosa.....	63
FIGURA 10. Efeito do óxido de rosa na nocicepção induzida por capsaicina em camundongos.....	64
FIGURA 11: Efeito do óxido de rosa na nocicepção induzida por glutamato em camundongos.....	65
FIGURA 12: Investigação do envolvimento dos receptores opióides no efeito antinociceptivo do óxido de rosa.....	66

FIGURA 13: Investigação do envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico no efeito antinociceptivo do óxido de rosa.....	67
FIGURA 14: Investigação do envolvimento da via GABAérgica no efeito antinociceptivo do óxido de rosa.....	68
FIGURA 15: Investigação do envolvimento da via serotoninérgica no efeito antinociceptivo do óxido de rosa.....	69
FIGURA 16: Efeito da administração aguda do óxido de rosa sobre o limiar de retirada de pata após hiperalgesia mecânica induzida por carragenina.....	70
FIGURA 17: Efeito da administração aguda do óxido de rosa sobre o limiar de retirada de pata após hiperalgesia mecânica induzida por PGE2.....	71
FIGURA 18: Efeito do óxido de rosa sobre a atividade locomotora no teste do campo aberto em camundongos.....	72
FIGURA 19: Efeito do óxido de rosa sobre a atividade locomotora no teste do rota-rod em camundongos	73

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1:** Dados referentes a variação da massa corpórea de camundongos fêmeas tratadas com veículo e óxido de rosa, no teste de toxicidade aguda..... **60**
- TABELA 2:** Dados referentes a média dos pesos em gramas dos órgãos dos camundongos fêmeas tratadas com salina e óxido de rosa (2g /kg v.o), 14 dias após o início do teste de toxicidade aguda..... **60**
- TABELA 3:** Dados referentes dos parâmetros bioquímicos pesquisados em camundongos fêmeas tratadas com salina e óxido de rosa (2g /kg v.o), 14 dias após o início do teste de toxicidade aguda..... **61**
- TABELA 4:** Dados referentes aos parâmetros hematológicos pesquisados em camundongos fêmeas tratadas com veículo (salina + 2% Tween) e óxido de rosa (2g/ kg v.o), 14 dias após o início do teste de toxicidade aguda..... **61**

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	5-hidroxitriptamina (serotonina)
AINE	Anti-inflamatório não-esteróide
AMPA	Receptores de ácido a-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico
ANOVA	Análise de Variância
BDZ	Benzodiazepínicos
Ca ⁺²	Íon Cálcio
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CFMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária
COX	Ciclooxigenase
DEXA	Dexametasona
DL50	Dose Letal
E.P.M.	Erro padrão da média
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GAD	Descarboxilase de ácido glutâmico
HTM	Nociceptores mecânicos de alto limiar
i. pl.	Intraplantar
i.p.	Intraperitoneal
IASP	International Association for the Study of Pain
iGluRs	Receptores ionotrópicos de glutamato
IL-1 β	Interleucina 1 β
INDO	Indometacina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
K ⁺	Íon Potássio
mg	Miligrama
mGluRs	Receptor metabotrópicos de glutamato
Na ⁺	Íon Sódio
NMDA	N-metil-D-aspartato
iNOS	Óxido nítrico sintase indutível
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronais
NO	Óxido nítrico

NOS	Óxido nítrico sintase
NPPM	Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinas
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	Óxido de rosa
PGs	Prostaglandinas
PGE2	Prostaglandina E2
PGI2	Prostaglandina I2
PGG2	Prostaglandina G2
PGH2	Prostaglandina H2
r.p.m.	Rotações por minuto
s.c.	Subcutâneo
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SP	Substância P
TXA2	Tromboxano
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TRP	Canais iônicos receptores de potencial transitório
TRPV1	Receptor de Potencial Transitório Vanilóide do Tipo 1
UFPI	Universidade Federal do Piauí
v. ipl.	Via intraplantar
v.o.	Via oral
μ g	Microgramas
μ L	Microlitros

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	27
1.1 Considerações gerais sobre a Dor.....	27
1.2 Classificação da dor.....	28
1.3 Neurofisiologia da dor.....	30
1.4 Mediadores envolvidos na modulação da dor.....	35
1.4.1 Sistema Glutamatérgico.....	35
1.4.2 Sistema GABAérgico.....	36
1.4.3 Prostaglandinas.....	37
1.4.4 Sistema Serotoninérgico.....	39
1.5 Tratamento farmacológico da dor.....	40
1.6 Produtos naturais e o Monoterpeno óxido de Rosa.....	42
2 OBJETIVOS.....	47
2.1 Objetivo Geral.....	47
2.2 Objetivos Específicos.....	47
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	49
3.1 Drogas e reagentes.....	49
3.2 Equipamentos.....	49
3.3 Obtenção do óxido de Rosa.....	49
3.4 Animais.....	49
3.5 Avaliação da toxicidade aguda- determinação da DL₅₀.....	50
3.6 Avaliação do dano gástrico.....	51
3.7 Avaliação da atividade antinociceptiva.....	52
3.7.1 Efeito do óxido de rosa no teste de capsaicina.....	52
3.7.2 Efeito do óxido de rosa no teste de glutamato.....	52
3.7.3 Investigação dos possíveis mecanismos de ação nociceptiva do óxido de rosa.....	53
3.7.3.1 Participação do sistema opióide no efeito antinociceptivo do óxido de rosa.....	53
3.7.3.2 Participação da via L-arginina-NO no efeito antinociceptivo do Óxido de Rosa.....	53

3.7.3.3 Participação da via GABAérgica no efeito antinociceptivo do óxido de rosa.....	54
3.7.3.4 Participação da via serotoninérgica no efeito antinociceptivo de óxido de rosa.....	54
3.7.4 Avaliação da hiperalgesia inflamatória induzida.....	54
3.7.4.1 Efeito do tratamento com óxido de rosa na hiperalgesia inflamatória induzida por carragenina.....	55
3.7.4.2 Efeito do óxido de rosa na hiperalgesia inflamatória induzida por PGE ₂	55
3.8 Avaliação do efeito do óxido de rosa na atividade motora dos animais.....	56
3.8.1 Teste do campo aberto.....	56
3.8.2 Rota-Rod.....	57
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	58
4 RESULTADOS.....	60
4.1 Avaliação da toxicidade aguda oral do óxido de rosa.....	60
4.2 Avaliação do dano gástrico.....	62
4.3 Avaliação da atividade antinociceptiva.....	63
4.3.1 Efeito do óxido de rosa no teste de capsaicina.....	63
4.3.2 Efeito do óxido de rosa no teste de glutamato.....	64
4.3.3 Investigação dos possíveis mecanismos de ação nociceptiva do óxido de rosa.....	65
4.3.3.1 Participação do sistema opióide no efeito antinociceptivo do óxido de rosa	65
4.3.3.2 Participação da via L-arginina-NO no efeito antinociceptivo do óxido de rosa.....	66
4.3.3.3 Participação da via GABAérgica no efeito antinociceptivo do óxido de rosa.....	67
4.3.3.4 Participação da via serotoninérgica no efeito antinociceptivo de óxido de rosa.....	68
4.3.4 Avaliação da hiperalgesia inflamatória induzida.....	69

4.3.4.1 Efeito do óxido de rosa na hiperalgesia inflamatória aguda induzida por carragenina.....	69
4.3.4.2 Efeito do óxido de rosa por via oral na hiperalgesia aguda induzida por Prostaglandina E2	70
4.4 Avaliação do efeito do óxido de rosa na atividade motora dos animais.....	71
4.4.1 Teste do campo aberto.....	71
4.4.2 Rota-rod	72
5 DISCUSSÃO.....	75
6 CONCLUSÃO.....	89
7 PERSPECTIVAS.....	91
REFERÊNCIAS.....	93

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais sobre a Dor

A dor é uma resposta a estímulos com lesão tecidual real ou potencial e representa uma resposta adaptativa essencial para proteger a integridade do organismo. No entanto, a dor também pode ser gerada por respostas desadaptativas do organismo, que afetam as atividades diárias e qualidade de vida. A persistência e exacerbação da dor podem ocorrer devido à sensibilização de nociceptores, neurônios somatossensoriais que respondem a estímulos nocivos e representam um passo importante para a geração de dor (PINHO-RIBEIRO, et al., 2016).

Vários conceitos de dor são descritos na literatura, no entanto nenhum consegue descrever a infinidade de eventos relacionados a dor. A primeira definição de dor foi dada em 1986, pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), como uma experiência sensorial e emocional desagradável que está associada a lesões reais ou potenciais. Em 1994, o conceito de dor foi atualizado pelos membros e colaboradores da IASP, como sendo “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal dano” (IASP, 1994). Outro conceito foi descrito por Julius e Basbaum (2001), onde eles relatam a dor como uma experiência complexa que envolve não apenas a transdução do estímulo nocivo ambiental, mas envolve também o processamento cognitivo e emocional pelo encéfalo.

Um ponto que corrobora no estudo da dor são os dados epidemiológicos, onde esses são fundamentais para a compreensão da mesma, possibilitando a análise da distribuição e dos determinantes da sua ocorrência em populações ou grupos de indivíduos, contribuindo para caracterizar a história natural das doenças em termos de início, duração, recorrência, complicações, incapacidades e mortalidade (TEIXEIRA, et al., 2001).

Aproximadamente 20% da população adulta europeia sofre de dor crônica e, além do peso físico e emocional que essa trás, o custo financeiro para a sociedade é enorme, onde o custo anual atualmente é estimado em mais de 200 bilhões de euros na Europa e 150 bilhões de dólares nos Estados Unidos da América (HECKE; SMITH, 2013). No Brasil, dor é razão das consultas para 1/3 dos doentes, manifestando-se em mais de 70% dos doentes que procuram consultórios por razões diversas. Cerca de metade dos doentes brasileiros procuram consultórios devido à dor aguda e, 50%,

para o tratamento da dor crônica, enquanto que a prevalência de dor em hospitais varia de 45% a 80% (TEIXEIRA et al., 2001). Outro dado relevante sobre a dor é a incidência de lombalgia, uma das alterações musculoesqueléticas mais comuns nas sociedades industrializadas, onde essa afeta de 70% a 80% da população adulta em algum momento da vida (ANDRADE; ARAÚJO; VILAR, 2005).

Antes de classificarmos e descrevermos os principais eventos fisiológicos que ocorrem para a propagação da dor, cabe aqui distinguirmos os termos nocicepção e dor. A dor possui uma natureza muito subjetiva onde além dos eventos fisiológicos, ainda estão presentes os psicológicos. A nocicepção refere-se ao processamento no sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP) das informações sobre o ambiente interno ou externo. Tipicamente, estímulos nocivos, incluindo lesões teciduais, ativam nociceptores que estão presentes em estruturas periféricas e que transmitem informações para o corno dorsal da medula espinhal. A partir daí a informação continua para o tronco encefálico e, finalmente, para o córtex cerebral, onde a percepção da dor é gerada (Comitê de Reconhecimento e Alívio da Dor em Animais de Laboratório, 2009). A nocicepção, portanto refere-se à percepção consciente ou não do estímulo doloroso. Em contraste, o processamento da dor envolve uma ativação cortical mais extensa, incorporando sistemas sensoriais discriminativos, bem como sistemas motivacional-afetivo e cognitivo-avaliativo (SCHNAKERS, et al., 2012).

Os animais são incapazes de verbalizar a ocorrência de dor, o reconhecimento da dor em modelos de animais tem sido baseado na identificação de comportamentos e aparência, pois eles são mais prováveis de serem reconhecidos na prática (WHITTAKER; HOWARTH, 2014). Sendo assim, termos como dor e analgesia são mais empregados para humanos e nocicepção e antinocicepção para animais (JONES; DUNLOP, 2007).

1.2 Classificação da dor

A distinção entre os tipos de dor é importante, uma vez que as causas e o tratamento de cada tipo de dor podem variar. A dor é classificada em diversas categorias, de acordo com mecanismos fisiológicos, mecanismos neuroquímicos, duração e gravidade, localização anatômica, sistema envolvido, bem como causas e características temporais, embora essas categorias não sejam universalmente uniformizadas (WOOLF, 2010; WOOLF, 2011; GELLER, et al., 2012).

Quando se pretende classificar a dor em relação à sua fisiopatologia então, esta pode ser de origem nociceptiva, neuropática, inflamatória e psicogênica. A dor nociceptiva surge quando ocorre uma ativação fisiológica dos receptores ou da via dolorosa, estando associada a lesões de tecidos musculares, ósseos e ligamentos (SCHESTATSKY, 2008). A dor do tipo nociceptiva pode ser de origem somática ou visceral. O sentimento doloroso que, provém dos músculos, ossos, pele e articulações consiste na dor nociceptiva somática, afirma-se como uma dor bastante intensa e de fácil localização. Quando a dor atinge órgãos mais internos trata-se de dor nociceptiva visceral, dor de caráter vago, persistente e de difícil localização (GRUNENTHAL, 2017).

A dor neuropática surge como efeito de uma lesão ou de uma disfunção do SNC ou SNP. Qualquer síndrome de origem aguda ou crônica capaz de desencadear um fenómeno somatosensorial ao nível do SNC ou SNP pode ser designado de dor neuropática (QUINTAL, 2004). É caracterizada por sintomas de hipersensibilidade dolorosa, representados pela alodinia mecânica (respostas dolorosas a estímulos táteis normalmente inócuos) e hiperalgesia mecânica e térmica (responsividade aumentada a estímulos previamente nocivos), (JI; XU; GAO, 2014).

A dor inflamatória é caracterizada por um aumento da sensibilidade do tecido lesionado, resultado da interação entre neurônios nociceptivos aferentes periféricos e os mediadores inflamatórios que são liberados no local afetado (MAMET; LAZDUNSKI; VOILLEY, 2009, TENORIO; KULKARNI; KERR, 2013).

Quanto a dor psicogênica, essa pode ser entendida como aquela que surge na ausência de qualquer processo lesional, ou que permanece após a resolução do processo lesivo (SEIXAS et al., 2009).

No que concerne à duração, a dor pode ser classificada em aguda ou crônica. A dor aguda surge como um indicador de uma possível lesão, ocorrendo de forma súbita, sendo que na maior parte das vezes é acompanhada por mudanças do sistema nervoso autônomo (SNA). Frequentemente a pessoa com este tipo de dor apresenta espasmos, sudorese, hipertensão arterial e taquicardia. Apresenta-se como sendo uma dor pontual, resultante de traumas ou associada a patologias e durabilidade inferior a seis meses (ANGELLOTTI, 2007). A literatura aponta como fatores desencadeantes desses problemas o : I) sub tratamento da dor, II) sua subavaliação, III) a inadequada formação de profissionais de saúde quanto ao fenómeno algico e medicamentoso, IV) crenças e valores errôneos frente à dor e analgesia, V) a

dificuldade em aferir a dor ou a não sistematização da avaliação (SALUM; GARCIA; SANCHES, 2012)

A dor aguda inicia-se com uma lesão ou injúria e substâncias algogênicas são sintetizadas no local e liberadas estimulando terminações nervosas (nociceptores) de fibras mielinizadas finas ou amielínicas; sua evolução natural é a remissão, porém, em decorrência da ativação de várias vias neuronais de modo prolongado, o caráter da dor pode se modificar e a dor aguda cronificar-se (TEIXEIRA, et al.,2001; SALUM; GARCIA; SANCHES, 2012).

A transmissão para a dor persistente, crônica e patológica envolve alterações duradouras em neurônios sensoriais primários, neurônios da medula espinhal e células da glia, que continuam a transmitir um sinal de dor na ausência de um estímulo nociceptivo (PODVIN; YAKSH; HOOK, 2016). O desenvolvimento de um estado de dor crônica é um grande problema de saúde pública. Há uma alta prevalência de dor crônica, com estimativas que variam de 11% a mais de 50% da população, tendo uma maior prevalência em classes econômicas baixas e em mulheres. Décadas de estudos levaram à conclusão de que a dor crônica não é simplesmente uma persistência do processamento nociceptivo que ocorre com um estímulo agudo de alta intensidade, mas surge de adaptações secundárias no sistema somatossensorial que persistem após a lesão do nervo ou condição inflamatória inicial (PODVIN; YAKSH; HOOK, 2016).

1.3 Neurofisiologia da dor

Ao contrário de algumas desordens neurobiológicas que podem ser atribuídas a regiões específicas do cérebro, a dor incorpora múltiplos componentes do sistema nervoso, nas regiões periférica, espinal e supraespinhal (GOLD; GEBHART, 2010).

Os primeiros componentes da via da dor são os nociceptores. Nociceptores são órgãos sensoriais finais na pele, músculo, articulações e vísceras que respondem seletivamente a estímulos nocivos ou potencialmente prejudiciais aos tecidos. Uma propriedade importante dos nociceptores é a sensibilização, que tipicamente se desenvolve como consequência do extensivo estímulo ao tecido e da inflamação, a mesma é definida como uma redução no limiar e um aumento na magnitude de uma resposta à estimulação nociva. Além disso, os estímulos anteriormente ineficazes podem se tornar efetivos e a atividade espontânea também pode se desenvolver.

Embora seja uma propriedade importante dos nociceptores, a sensibilização não é necessariamente específica para os mesmos, pois os aferentes que codificam outras modalidades sensoriais também podem ser sensibilizados (GOLD; GEBHART, 2010).

Os nociceptores possuem propriedades biofísicas e moleculares que lhes permitem detectar e responder seletivamente a estímulos potencialmente prejudiciais. Existem duas classes principais de nociceptores. A primeira inclui fibras aferentes mielinizadas de diâmetro médio (A δ) que medeiam as lesões agudas ou rápidas e as fibras A β que possuem diâmetro maior e que respondem a estimulação mecânica inócua (isto é, toque leve) (BASBAUM, et al., 2009).

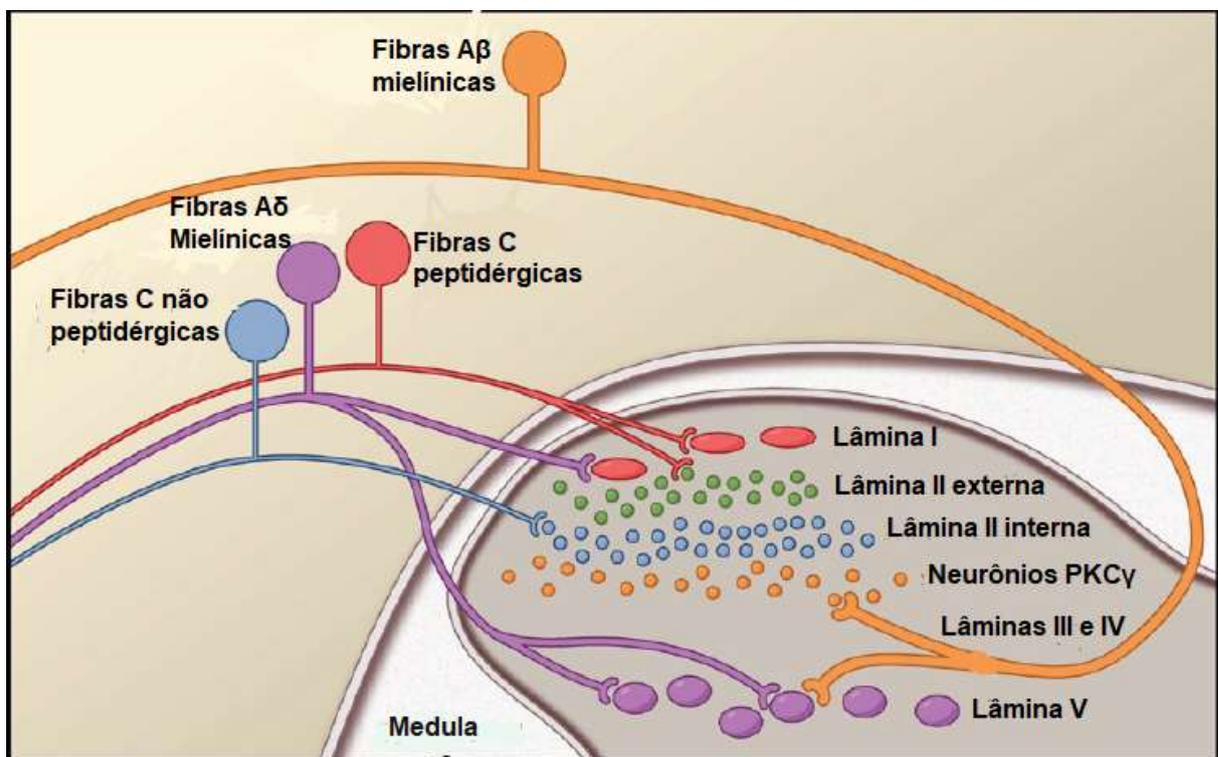
Estudos eletrofisiológicos subdividiram ainda os nociceptores A δ em duas classes principais, Tipo I e II. O Tipo I (HTM: nociceptores mecânicos de alto limiar) respondem a estímulos mecânicos e químicos, mas têm limiares térmicos relativamente altos (> 50 °C). Se, no entanto, o estímulo de calor for mantido, estes aferentes responderão a temperaturas mais baixas. E o mais importante, eles irão sensibilizar no estabelecimento de lesão tecidual. Os nociceptores de tipo A δ II têm um limiar de calor muito mais baixo, mas um limiar mecânico muito elevado. A atividade deste aferente quase certamente medeia a "primeira" resposta de dor aguda ao calor nocivo (BASBAUM, et al., 2009).

A segunda classe de nociceptores incluem as fibras não-mielinizadas tipo "C", sendo essas de pequeno diâmetro e que transmitem a dor lenta (BASBAUM, et al., 2009). As fibras do tipo C são polimodais, pois respondem a diversos tipos de estímulos, tais como os térmicos, mecânicos e químicos. O tipo de resposta dessas fibras é dependente de um conjunto de receptores presentes na membrana dos nociceptores e de um perfil neuroquímico distinto que depende de dois grupos variantes de fibras tipo C: as peptidérgicas e as não-peptidérgicas (COUTAX et al., 2005). Existe um grupo de fibras C, também chamadas fibras silenciosas, que apresentam insensibilidade a estímulos mecânicos, mas não ao calor, e são ativas durante processos inflamatórios (BASBAUM, et al., 2009).

As fibras nervosas aferentes primárias projetam-se para o corno dorsal da medula espinhal, que é organizado em lâminas distintas anatomicamente e eletrofisiologicamente (**Figura 1**). Os nociceptores A δ projetam para a lâmina I assim como para o corno dorsal mais profundo (lâmina V). O limiar baixo, que conduz rapidamente A β aferentes, que respondem ao toque leve, projetam-se para as lâminas profundas (III, IV e V). Em contraste, os nociceptores C projetam mais superficialmente

as lâminas I e II. Em concordância com esses estudos anatômicos, as análises eletrofisiológicas demonstram que os neurônios da medula espinhal dentro da lâmina I são geralmente sensíveis à estimulação nociva (através das fibras A δ e C), os neurônios nas lâminas III e IV são primariamente responsivos à estimulação inócua (via A β) e os neurônios na lâmina V recebem uma estímulos nocivos e não-nocivos via direta, através das fibras A δ e A β (monossinápticas) e indiretas, através das fibras C (polissinápticas) (BASBAUM, et al., 2009).

Figura 1. Conexões entre as fibras aferentes e a medula



Fonte: adaptado de Basbaum (2009).

Os nociceptores podem ser ativados por várias formas de estímulos, como mecânicos, eletromagnéticos, elétricos, térmicos e químicos. Alta intensidade de estímulo, indica que existe um risco de lesão tecidual, sendo esse necessário para que ocorra a ativação do nociceptor. Um estímulo algogênico é definido como um estímulo nociceptivo que causa dor. Se o estímulo é nocivo, ocorre dano tecidual, produzindo assim as manifestações cardinais clássicas que são vermelhidão, calor, inchaço e dor. A dor pode ocorrer na ausência de um estímulo local (dor espontânea) ou em resposta a um estímulo previamente não algogênico (alodinia), como acariciar suavemente a pele sobre um sítio de artrite inflamatória. Por outro lado, um estímulo

nociceptivo pode produzir dor que é desproporcionalmente severa em comparação com a intensidade do estímulo (hiperalgesia) (COUTAUX, et al., 2005).

As fibras e os nociceptores participam do processo fisiológico da nocicepção que consiste em quatro etapas básicas: a transdução, transmissão, modulação e a percepção (**Figura 2**), FERNANDES; GOMES, 2011).

A *transdução* é o fenômeno que se dá pela transformação do estímulo nócico em potencial de ação. O primeiro passo na sequência dos eventos que originam o fenômeno sensitivo-doloroso é a transformação dos estímulos ambientais físicos ou químicos intensos em potenciais de ação, que das fibras nervosas periféricas são transferidas para o SNC (TEIXEIRA, 2001). Fisiologicamente a dor é deflagrada por estímulos intensos e potencialmente lesivos que ativam os nociceptores e desencadeiam reação inflamatória (humoral e celular) com liberação de mediadores químicos que, por sua vez, culminam nas alterações vasculares e imunológicas inflamatórias, ativação dos nociceptores ou redução do limiar de excitabilidade, tornando-os mais sensíveis aos estímulos (OLIVEIRA, 2001; FERNANDES; GOMES, 2011).

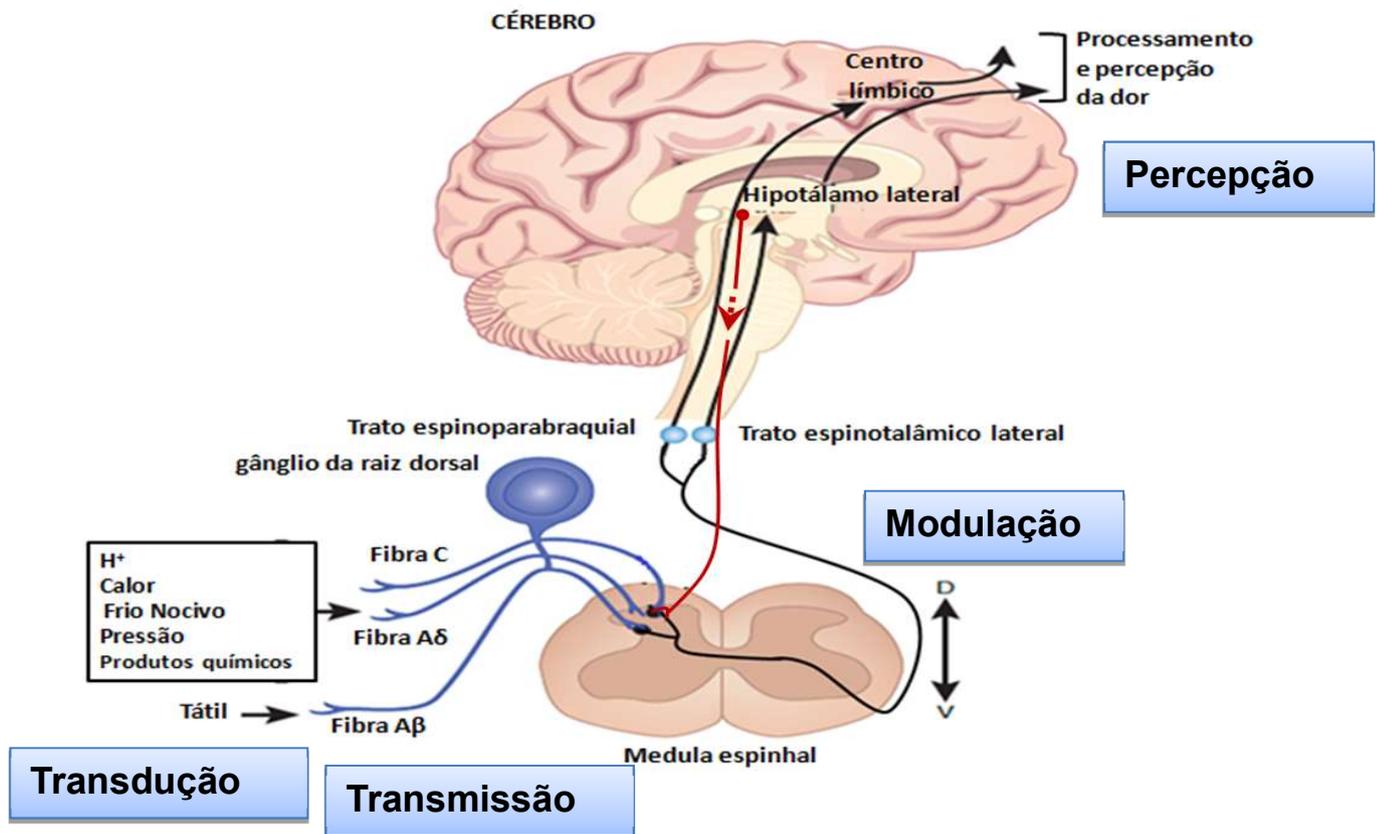
A *transmissão* envolve as estruturas e os mecanismos relacionados à condução da sensação nociceptiva (FERNANDES; GOMES, 2011). A transmissão ou condução, nada mais é que o movimento da atividade elétrica, desde as fibras A δ e C dos aferentes periféricos até os centros nervosos superiores. Na transmissão, os impulsos são enviados através dos nervos periféricos a medula espinhal, onde as fibras fazem sinapses com os neurônios da substância cinzenta (LORENZ; COATES; KENT, 2011). A transmissão dos impulsos da dor ocorre em três estágios, o primeiro é do local de transdução ao longo das fibras nociceptivas para o corno dorsal na medula espinhal, o segundo da medula espinhal ao tronco encefálico, e o terceiro do tronco cerebral para o tálamo, córtex e para os níveis mais elevados do cérebro (KUMAR, et al., 2014).

O terceiro passo é o processo de modulação, que envolve a alteração da transmissão neural aferente ao longo da via da dor. O corno dorsal da medula espinhal é o local mais comum para a modulação da via da dor, onde nessa fase ocorrer a inibição ou o aumento dos sinais de dor. As vias múltiplas e complexas envolvidas na modulação da dor são referidas como as vias de dor moduladora descendente. A inibição descendente envolve a liberação de neurotransmissores inibitórios (por exemplo, opióides endógenos, serotonina, norepinefrina, ácido gama-aminobutírico,

neurotensina, acetilcolina e ocitocina) que bloqueiam totalmente ou parcialmente a transmissão de impulsos de dor e, portanto, produzem analgesia (KUMAR, et al., 2014).

E por fim, tem-se a *percepção*, etapa final onde o encéfalo reflete a experiência física e emocional provocada pelo estímulo nociceptivo. Diferentes grupos de neurônios encefálicos além de definirem a percepção das características somáticas do estímulo, são responsáveis pelos aspectos cognitivo e afetivo da sensação de dor (TRACEY; MANTYH, 2007).

FIGURA 02: Circuito principal de mediação da dor fisiológica.



Fonte: Adaptado de KUNER, 2010.

1.4 Mediadores envolvidos na modulação da dor

Quando as fibras nociceptivas aferentes chegam ao corno dorsal da medula espinhal, elas transmitem o sinal originado na periferia através da liberação de vários neurotransmissores específicos que estão associados com a dor (D'MELLO; DICKENSON, 2008).

Os circuitos neuroanatômicos responsáveis pelas respostas defensivas são modulados por diversos neurotransmissores, como o glutamato, ácido gamma-aminobutírico (GABA), prostanóides, transmissores monoaminérgicos (noradrenalina, serotonina e dopamina), hormônio liberador de corticotrofinas, neuropeptídeo Y, substância P, óxido nítrico, vanilóides e canabinóides (BERGINK; VAN MEGEN; WESTENBERG, 2004; GUIMARAES, et al., 2005).

1.4.1 Sistema Glutamatérgico

O glutamato é o neurotransmissor excitatório mais abundante no cérebro dos vertebrados. Ele possui duas famílias de receptores: receptores ionotrópicos de glutamato (iGluRs) e receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs). Os iGluRs são responsáveis tanto pela transmissão sináptica, quanto pela plasticidade sináptica e são fundamentais para os mecanismos moleculares de aprendizagem e memória. Esses formam poros de canais com ligandos tetraméricos que permitem o influxo de Na^+ e Ca^{+2} , quando o glutamato se liga. Os iGluR podem ser ainda subdivididos em receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), receptores de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA) e receptores de cainato (ZHU; GOUAUX, 2017; TRAYNELIS, et al., 2010).

Do ponto de vista estrutural, os mGluRs pertencem à família de proteína de sete transmembranas, principalmente compartilhada por receptores acoplados à proteína G. Existem oito subtipos de mGluRs, sendo esses classificados em três subgrupos de acordo com a similaridade da sequência, a seletividade do agonista e as diferenças do sistema efetor: subgrupo I (mGluR1 e -5), são acoplados a proteína Gq que ativa a fosfolipase C, e, conseqüentemente há a formação de segundos mensageiros e liberação de Ca^{+2} de reservas intracelulares; subgrupo II (mGluR2 e -3) e subgrupo III (mGluR4, -6, -7 E -8), são acoplados a proteína Gi, que inibem a adenilato ciclase e conseqüentemente a formação do monofosfato cíclico de adenosina, AMPc (KUNISHIMA et al., 2000; SPOOREN et al, 2003).

Dados clínicos mostram que a sinapse do glutamato é um alvo potencial para a intervenção, em uma ampla gama de distúrbios neurológicos e psiquiátricos. Dentre essas, estão inclusas a epilepsia, amnésia, doença do neurônio motor, acidente vascular cerebral, lesão cerebral traumática, dor, ansiedade e psicose (MELDRUM, 2000).

Dentre os receptores glutamatérgicos, o subtipo NMDA tem sido o mais estudado, em virtude da existência de fármacos altamente seletivos para esse receptor (LEESON, 1993). A hiperalgesia envolve claramente receptores NMDA na medula espinhal. As tentativas no uso clínico de antagonistas NMDA foram limitadas por efeitos colaterais, mas é possível que a administração intratecal possa ser uma abordagem útil. Os receptores de kainato são expressos em fibras C, e os antagonistas seletivos de GluR5, como LY 294,486, parecem ser analgésicos (MELDRUM, 2000).

1.4.2 Sistema GABAérgico

O ácido gama-aminobutírico (GABA) é conhecido por ser o neurotransmissor inibitório principal do SNC, mediando sua função interagindo com três subclasses de receptores, GABA_A e GABA_C, que são canais iônicos (ionotrópicos) e GABA_B, que são receptores membros da superfamília dos receptores acoplados a proteína G (metabotrópicos) (BALERIO; RUBIO, 2002).

Os receptores GABA_A são compostos de um canal com cloreto formado por cinco subunidades de proteínas. As subunidades podem ser selecionadas de dezenove famílias conhecidas: α (1–6), β (1–3), γ (1–3), δ , ϵ , θ , π e ρ (1–3). As combinações de subunidades individuais geram vários receptores GABA_A e determinam propriedades eletrofisiológicas e farmacológicas distintas, levando a funções específicas. No entanto, os processos que controlam a montagem de subunidades em receptores funcionais reduzem significativamente a diversidade de receptores. Assim, embora teoricamente, um grande número de arranjos heteropentaméricos parece ser possível, apenas um número limitado de subtipos de receptores é montado fisiologicamente (CHAGRAOUI et al., 2016).

O receptor GABA_B é um heterodimérico, metabotrópico, de classe III, acoplado a proteína G (ENNA; Mc CARSON, 2014). A ativação do receptor GABA_B está associada à abertura de canais internos retificadores de potássio, à inibição dos

canais de cálcio e à ativação da adenilil ciclase. Os receptores GABA_B têm uma estrutura heterodimérica e a função receptora completa requer a montagem de subunidades GABA_{B1} e GABA_{B2}, que estão ligadas por interações proteína / proteína entre seus domínios intracelulares C-terminais. O local de ligação GABA está localizado no domínio extracelular da subunidade GABA_{B1}, enquanto a subunidade GABA_{B2} interage com a proteína G e é essencial para a expressão funcional do receptor. As subunidades dos receptores GABA_B são encontradas nas áreas centrais e periféricas, incluindo o tálamo, os núcleos do tronco encefálico e a medula espinhal (MALCANGIO, 2017).

Embora a ativação dos receptores GABA em várias regiões do cérebro ou medula espinhal tenha efeitos variáveis no limiar da dor, o peso da evidência indica que a administração sistêmica de agonistas alostéricos GABA_A ou GABA_B geralmente produz antinocicepção em modelos animais de dor aguda e persistente (ENNA; Mc CARSON, 2014).

Diferentes compostos farmacológicos alteram as funções de um receptor GABA através da ligação aos seus locais moduladores. Em outras palavras, além do local ortostático em um complexo de proteína do receptor GABA ao qual o ligando primário, GABA, se liga, existem outros locais de ligação alostérica para os moduladores, como benzodiazepínicos (BZD). Outros alvos conhecidos para fármacos que modulam o sistema GABA são as enzimas envolvidas na síntese e metabolismo de GABA, como é o caso da GAD (decarboxilase de ácido glutâmico) e a GABA transaminase, respectivamente. Alguns distúrbios, como ansiedade, insônia, dor e depressão são frequentemente associados com baixa função do sistema GABAérgico. Assim, compostos que melhoram a transmissão de GABA, por exemplo, moduladores positivos de GABA_A, podem ter propriedades ansiolíticas, sedativas-hipnóticas, analgésicas e antidepressivas (MANAYI et al.,2016).

1.4.3 Prostaglandinas

As prostaglandinas (PGs) são mediadores lipídicos produzidos por cicloxigenases a partir de ácido araquidônico, que servem de funções fundamentais na inflamação e na dor. A inibição de sua produção é o principal mecanismo analgésico de ação de anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) - mas também a fonte da maioria dos seus efeitos indesejados. Embora o desenvolvimento de inibidores

seletivos da cicloxigenase indutível (COX-2), chamados coxibs, tenham diminuído bastante os efeitos colaterais gastrointestinais, foi relatada toxicidade cardiovascular dos mesmos, diminuindo consideravelmente seu uso clínico (ZEILHOFER, 2007).

As PGs são um grupo de ácido carboxílico com 20 carbonos, contendo um anel de ciclopentano e agem como hormônios locais em um número de processos fisiológicos e patofisiológicos, incluindo dor, edema, febre e vários aspectos da inflamação. Enquanto muitos mediadores e neurotransmissores químicos, tais como SP e glutamato são armazenados nas vesículas dos terminais sinápticos, o ácido araquidônico, precursor das PGs, é armazenado em fosfolipídios na membrana plasmática e clivados pela fosfolipase A₂ por estimulações mediadas por receptor ou independente de receptor. A biossíntese de prostanóides é feita pela conversão metabólica do ácido araquidônico em PGH₂ via PGG₂, que é o precursor para a síntese comum dos prostanóides. PGH₂ é convertida para vários prostanóides pelas sintases respectivas. Os prostanóides então produzidos são liberados para fora das células imediatamente após a síntese. Enquanto a PGH₂, PGI₂ e TXA₂ são quimicamente instáveis, a PGD₂, PGE₂ e PGF₂ são estáveis (ITO; OKUDA-ASHITAKA, MINAMI, 2001). No estado basal, as PGs são consideradas, por serem formadas e inativadas dentro da mesma célula ou em células vizinhas antes da sua liberação dentro da circulação, como metabólitos inativos. No entanto, quando a biossíntese das PGs é ativada ou quando as PGs são exogenamente adicionadas, a acumulação das PGs na circulação é controlada através da rápida degradação mediante a passagem através dos pulmões (ITO; OKUDA-ASHITAKA, MINAMI, 2001).

As PGs são produzidas nas células em resposta a estímulos externos e atuam como autacoides dentro dos tecidos, através de receptores específicos presentes na superfície celular e desempenham um papel na ativação da resposta inflamatória. As PGs exercem os seus efeitos inflamatórios ligando-se aos receptores acoplados a proteínas G (GPCR), também conhecidos como receptores de domínio transmembrana. Esses receptores estão envolvidos em duas principais vias de transdução de sinal: cAMP e fosfatidilinositol. Os receptores de PG são divididos em cinco tipos básicos: receptores PGE, PGD, PGF, PGI e TXA. A existência de diversos receptores indica que as PGs podem ativar uma grande variedade de eventos de transdução de sinal em diversos tipos de células e modulando efeitos biológicos distintos. A PGE₂ medeia processos celulares em direções pró-inflamatórias e anti-

inflamatórias. A PGE₂ liga-se aos receptores de PGE, que existem como subtipos EP₁, EP₂, EP₃ e EP₄, e está envolvido na resposta à dor, ovulação, fertilização, febre e reabsorção óssea (OH; SEO, 2017).

Um fato relevante é que as prostaglandinas foram erroneamente descritas, quando colocadas que as mesmas só sensibilizam o sistema nociceptivo apenas ao nível do nociceptor periférico, através de receptores prostanóides localizados nos terminais periféricos dos neurônios sensoriais primários (gânglios dorsais, DRG). Conseqüentemente, os inibidores da COX foram equivocadamente classificados como analgésicos "periféricos". Durante a década de 1990, no entanto, foi progressivamente percebido que as prostaglandinas exerceram pelo menos parte de seus efeitos pró-nociceptivos também no SNC principalmente ao nível da medula espinhal, corroborando assim com a indução da dor a nível central (ST-JACQUES; MA, 2014).

Embora a eficácia dos inibidores da COX, para tratar a dor neuropática ainda não tenha sido estabelecida em ensaios controlados, eles pertencem aos medicamentos mais frequentemente prescritos para tratar neuropatias puras (incluindo neuropatia diabética, etc.) e associadas (dor nas costas/pescoço com envolvimento neuropático). Os tratamentos de primeira linha atuais para neuropatia ciática incluem AINE. Os dados clínicos sugerem que os AINEs são eficazes e úteis no tratamento de certos tipos de dor neuropática, sendo também os adjuvantes mais utilizados no tratamento dessa dor (MA; QUIRION, 2008).

1.4.4 Sistema Serotoninérgico

A serotonina (5-HT) desempenha um papel importante na modulação das respostas nociceptivas (BARDIN, 2011; NOGUEIRA, et al., 2014; GRANADOS-SOTO et al., 2015). O corno dorsal da medula espinhal é a localização das primeiras sinapses nas vias de dor e, como tal, oferece um alvo muito poderoso para a regulação da transmissão nociceptiva tanto por mecanismos segmentares quanto supraespinhais locais (HEINRICHER et al., 2009). Desta forma, os neurônios serotoninérgicos do tronco encefálico que se projetam sobre a medula espinhal estão envolvidos na transmissão de dor aguda e a atividade antinociceptiva de vários analgésicos depende da integridade das vias serotoninérgicas descendentes (MILLAN, 2002).

A serotonina produz seus efeitos através de uma multiplicidade de alvos neuronais ao interagir com diferentes subtipos de receptores 5-HT (BARNES; SHARP, 1999; GRANADOS-SOTO et al., 2015). Existem sete famílias de receptores de 5-HT diferentes, constituídas por seis receptores heptahélicos acoplados à proteína G e um ligado a canal iônicos (BARNES; SHARP, 1999). Os receptores incluem 5-HT₁ (5-HT_{1A} - F), 5-HT₂ (5-HT_{2A-C}), 5-HT₃ (5-HT_{3A-C}), 5-HT₄, 5-HT₅ (5-HT_{5A-B}), 5-HT₆ e 5-HT₇ (GRANADOS-SOTO et al., 2015). A 5-HT afeta a nocicepção através de sete famílias de receptores 5-HT (5-HT₁₋₇) (MILLAN, 2002). Papéis particulares de 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, e os receptores 5-HT₃ na inibição descendente da dor são descritos (DOGRUL; SEYREK, 2006).

Outro papel do sistema serotoninérgico na dor é que vias facilitadoras de 5-HT que ligam as áreas da medula espinhal e tronco cerebral estão envolvidas no humor e nas emoções. Como a dor engloba aspectos afetivos, sugerimos que essas vias de 5-HT e outros circuitos são importantes para determinar os níveis de dor, o resultado dos tratamentos de fármacos envolvidos com o sistema serotoninérgico fornece um mecanismo pelo qual as emoções podem alterar a percepção da dor (SUZUKI; RYGH; DICKENSON, 2004).

1.5 Tratamento farmacológico da dor

A dor é uma experiência complexa que engloba componentes sensoriais-discriminatórios, afetivo-motivacionais e cognitivo-emocionais sendo esses mediados por diferentes mecanismos e processados em uma complexa rede neural. A dor foi reconhecida como o quinto sinal vital seguido pela respiração, pulso, pressão sanguínea e temperatura. Além de sentimentos desagradáveis, a dor pode causar sérios danos ao corpo, como choque. Atualmente, muitos fármacos estão disponíveis para uso clínico com o intuito de aliviar a dor, como opióides, anti-inflamatórios não esteroidais e corticosteroides. No entanto, devido aos complexos mecanismos fisiopatológicos da dor, efeitos colaterais significativos ou ação menos efetiva dos medicamentos disponíveis, é urgente investigar os mecanismos da dor e desenvolver estratégias terapêuticas efetivas para amenizá-la (CAO et al., 2014).

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) constituem um grupo heterogêneo de fármacos que inibem a atividade das duas isoformas da enzima cicloxigenase (COX), COX-1 e COX-2. A cicloxigenase atua como enzima chave na

biossíntese de prostaglandina, através do ácido araquidônico (VERDOODT; KJAER; FRIIS, 2017). São os fármacos de primeira escolha no tratamento de doenças reumáticas e não-reumáticas como, artrite reumatoide, osteoartrite e artrite psoriática, assim como nas sequelas de traumas e contusões e ainda nos pós-operatórios. É o principal tratamento para a dor leve e moderada devido as suas propriedades analgésicas prolongadas e diminuem a temperatura corporal elevada sem provocar dependência química (MURI; SPOSITO; METSAVAHT, 2009).

A principal limitação no uso dos AINES são os seus efeitos gastrointestinais que estão entre os mais graves, incluindo náuseas, dor abdominal e úlcera gástrica. Os AINES inibidores seletivos de COX-2 parecem minimizar esses efeitos. Os AINES não oferecem efeitos cardioprotetores, e podem agravar problemas renais em paciente idosos, com insuficiência cardíaca, diabéticos, cirróticos, dentre outros (MURI; SPOSITO; METSAVAHT, 2009).

Os opióides são universalmente utilizados no tratamento da dor oncológica e dor aguda, embora alguns clínicos ainda resistam ao uso destes analgésicos principalmente pelo temor de suas complicações, como a depressão respiratória, e pela falta de conhecimento de respostas fisiológicas individuais frente a alguns aspectos farmacológicos, como a tolerância, a dependência física e psicológica (MCQUAY, 1999; RIBEIRO et al., 2002).

Estudos demonstram que o efeito analgésico dos opióides é devido à sua propriedade em inibir, de maneira direta, a transmissão ascendente das informações nociceptivas provenientes do corno dorsal da medula espinhal e ativar os circuitos de controle da dor que descem do mesencéfalo pelo bulbo ventromedial rostral e chegam ao corno dorsal da medula espinhal. Os peptídeos opióides e seus receptores são encontrados em todos esses circuitos descendentes da dor (GUTSTEIN et al., 1998; VITOR, et al., 2008).

Outra classe de fármacos usada para o tratamento da dor são os corticosteroides, sendo esses bastantes eficientes redução do processo doloroso e inflamatório. Atuam na redução da expressão de múltiplas citocinas e quimiocinas, na diminuição da expressão de moléculas de adesão e na diminuição da expressão de enzimas como, por exemplo, a óxido nítrico sintase indutível (iNOS) e a cicloxigenase (COX-2) (FIOCCH, 2002; SCHAFER-KORTING, 2005; ROGLER, 2010). No entanto, esses fármacos apresentam vários efeitos adversos, entre os mais comuns tem-se a supressão do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), reduzindo a produção do

hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), através de realimentação negativa, que, por sua vez, conduz a uma secreção de cortisol reduzida pela glândula suprarrenal; osteoporose, alterações na densidade mineral óssea; retardo do crescimento em crianças; catarata e glaucoma (BARNES; PEDERSEN, 1993).

A terapia adjuvante vem sendo utilizada como um reforço antiálgico, com o objetivo de aumentar a analgesia (anticonvulsivantes), controlar as reações adversas dos opiáceos (antieméticos, laxativos) e controlar os sintomas que estão contribuindo para a dor do paciente, como ansiedade, depressão, insônia (antidepressivos). No entanto, tem-se relatado o aumento do número de reações adversas, com o uso dos adjuvantes terapêuticos. Para minimizar as reações adversas a antidepressivos e anticonvulsivantes, deve-se iniciar com baixas doses e aumentar gradativamente (BARBOSA, et al., 2008).

Em virtude dos efeitos adversos relatados em todas as classes de fármacos supracitados, se fazem necessários estudos que visem à elucidação de substâncias com potencial analgésico e com baixo risco de toxicidade que as classes farmacológicas ora empregados detêm, sendo os produtos naturais, recursos terapêuticos importantes para o desenvolvimento de novos fármacos com potencial analgésico.

1.6 Produtos naturais e o Monoterpeno óxido de Rosa

Plantas medicinais são amplamente utilizadas pela população ao redor do mundo. O conhecimento de que as plantas possuem propriedades terapêuticas é uma herança cultural milenar e que ainda possui grande impacto nos dias de hoje (FACHINI et al., 2015). Apesar da grande evolução da medicina alopática a partir da segunda metade do século XX, ainda existem obstáculos básicos na sua utilização pelas populações carentes, que vão desde o acesso aos centros de atendimento ambulatoriais e hospitalares à obtenção de exames e medicamentos. Estes motivos, associados com a fácil obtenção e a grande tradição do uso de plantas medicinais, contribuem para sua utilização pelas populações dos países em desenvolvimento (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

As propriedades farmacêuticas das plantas aromáticas são atribuídas principalmente aos óleos essenciais. O termo "óleo essencial" foi utilizado pela primeira vez no século XVI por Paracelsus von Hohenheim (EDRIS, 2007). São

produtos de origem natural, compostos por misturas líquidas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas e com aroma acentuado, podendo ser obtido de todas as partes das plantas, como botões, flores, folhas, caules, ramos, sementes, frutos, raízes ou cascas (BAKKALI et al., 2008). Quimicamente, os óleos essenciais são compostos principalmente de terpenóides e fenilpropanóides, incluindo policétides e alcalóides (DA SILVA et al., 2008; DE SOUSA, 2011).

Várias propriedades biológicas dos óleos essenciais já foram descritas, dentre essas estão atividade antimicrobiana, antiviral, antimutagênica, anticancerígena, antioxidante, anti-inflamatórias, imunomoduladoras e antiprotozoárias (KARUPPAYIL, 2014).

Os terpenos são compostos que ocorrem em todas as plantas e compreendem uma classe de metabólitos secundários com uma grande variedade estrutural (RAUT; KARUPPAYIL, 2014). Os terpenóides são derivados de unidades de isopreno (C₅), como o linalol, que consiste em duas unidades de isopreno. Eles são classificados de acordo com o número de unidades de isopreno como hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterterpenos, triterpenos e tetraterpenos. São obtidos por duas vias biossintéticas, através do ácido mevalônico ou do 5-fosfato de 1-desoxi-D-xilulose. Os terpenóides dos óleos essenciais são geralmente monoterpenos e sesquiterpenos, sendo o primeiro o mais abundante, representando cerca de 90% dos óleos. Os diterpenos podem estar presentes quando os óleos essenciais são extraídos com solventes orgânicos (DE SOUSA, 2011).

Os monoterpenos já possuem propriedades terapêuticas bastante descritas, dentre essas destacam-se as atividades antioxidante, analgésica e anti-inflamatória (DE SOUSA, 2011; GUIMARÃES et al., 2015), possuem também atividade no SNC, incluindo sedativas e antidepressivas (DE SOUZA; NOBREGA; ALMEIDA, 2007; SOUSA et al., 2007; PERAZZO et al., 2007; LEITE et al., 2008; PASSOS, 2009). A grande diversidade de mecanismos que estão associados com o efeito analgésico destes monoterpenos são surpreendentes, e vários monoterpenos apresentaram mais do que um mecanismo de ação que pode estar relacionado com esse efeito (GUIMARÃES; QUINTANS; QUINTANS JR, 2013).

Estudos realizados com o linalol, mostraram que esse monoterpeno foi capaz de reduzir a resposta nociceptiva em diversos modelos de nocicepção com envolvimento dos sistemas muscarínico (receptor M₂), opióide, dopaminérgico

(receptores D2), adenosinérgicos (receptores A1 e A2), glutamatérgicos (receptores ionotrópicos de glutamato) e participação dos canais de potássio sensíveis a ATP (PEANA et al., 2003, 2004a, 2004b, 2006; BATISTA et al., 2008; SAKURADA et al., 2011; VENÂNCIO et al., 2011).

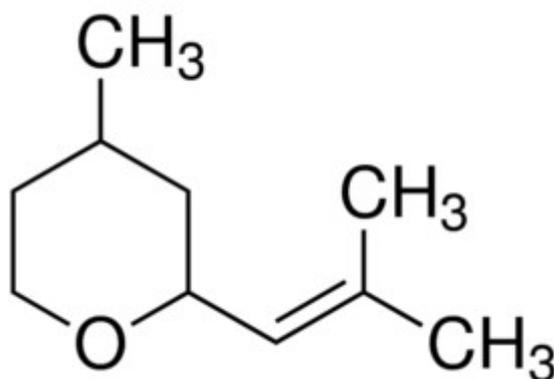
Estudos realizados com o monoterpene aromático p-cimeno, demonstraram a ação analgésica, em modelos de dor orofacial (dor neurogênica e inflamatória), onde essa ação antinociceptiva do p-cimeno envolve o sistema opióide (SANTANA et al., 2011). No estudo realizado por Bonjardim (2012), o p-cimeno também demonstrou atividade antinociceptiva nos modelos de contorção abdominal induzida por ácido acético, teste de formalina e placa quente.

O α -terpineol é um monoterpene álcool presente em diversas espécies de óleos essenciais de *Eucalyptus*. Em estudos realizados com o α -terpineol, mostrou-se que esse aumenta o tempo de latência no teste de placa quente, possivelmente pela modulação da neurotransmissão inibitória, como receptor GABA_A ou pela sua ação como depressor da excitabilidade nervosa (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2012).

Outro monoterpene é o α -felandreno, esse apresenta efeito antinociceptivo em diversos modelos de nocicepção, além de reduzir a hiperalgesia induzida por carragenina, sem mostrar citotoxicidade. Essa atividade parece envolver diversos sistemas como glutamatérgico, opióide, nitrérgico, colinérgico e adrenérgico (LIMA et al., 2012). Além disso, esse monoterpene reduz a hipersensibilidade mecânica e térmica ao frio em modelo de ligadura do nervo ciático (PICCINELLI et al., 2014).

O óxido de rosa ou (4S)-2-(2-Metil-1-propenil)-4-metiltetra-hidropirano, **Figura 3**, é um éter cíclico, pertencente a classe dos monoterpenos (NAKASHI, H., et al., 2015). É uma fragrância encontrada em rosas, como a rosa búlgara, Geranium, *Rosa damascena* Mill., *Laggera* spp., *Eucalyptus citriodora*, *Dracocephalum heterophyllum*, *Pelargonium* spp. *Cymbopogon winterianus* (BABU, et al., 2002; KUIATE; BESSIÉRE; ZOULO, 2002; NONATO, et al., 2012; NAKASHI et al., 2015). O óxido de rosa também contribui para o sabor de algumas frutas como a lichia e pode ser produzido industrialmente com base na fotooxigenação do citronelol (ALSTERS, et al., 2009).

Figura 3. Estrutura molecular do Monoterpene óxido de rosa.



Estudos realizados por Nonato (2012), descreveram que o óxido de rosa, diminuiu os níveis de IL-1 β no edema de pata induzido pelo adjuvante completo de Freund, reduz o edema causado pela carragenina e pela prostaglandina E2 e diminuiu a ação da enzima mieloperoxidase (MPO), conseqüentemente atenuando a migração de leucócitos (NONATO, et al.,2012).

O citronelol, precursor industrial do óxido de rosa, já possui descritas suas atividades antinociceptiva e anti-inflamatória (BRITO, et al.,2012). Tendo em vista os resultados satisfatórios em vários modelos de inflamação demonstrada pelo óxido de rosa, e que não foram realizados estudos do mesmo em modelos de dor, tal como também em virtude da necessidade de descoberta de novos fármacos mais seguros e efetivos, que apresentem disponibilidade, acessibilidade e redução dos efeitos colaterais, a presente proposta tem por objetivo investigar o potencial antinociceptivo óxido de rosa em roedores.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Investigar a atividade antinociceptiva do óxido de rosa em roedores.

2.2 Objetivos Específicos:

- ✓ Investigar o potencial toxicológico do óxido de rosa, através do estudo da toxicidade aguda (DL_{50})
- ✓ Avaliar a capacidade do óxido de rosa em gerar lesões gástricas
- ✓ Avaliar a atividade antinociceptiva do óxido de rosa, utilizando metodologias de estímulos nociceptivos químicos (capsaicina e glutamato);
- ✓ Estudar os possíveis mecanismos de ação envolvidos no efeito antinociceptivo do óxido de rosa
- ✓ Avaliar a ação do óxido de rosa na hipernocicepção inflamatória induzida por carragenina e PGE_2 , utilizando o método de compressão de pata Randall-Selitto
- ✓ Avaliar o efeito do óxido de rosa sobre a coordenação motora e capacidade exploratória nos testes do rota-rod e campo aberto

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Drogas e reagentes

Bicarbonato de Sódio, Carragenina tipo I, Capsaicina I, PGE₂ (Sigma, USA), Dexametasona (Decadron) (Galeno, Brasil); Formaldeído (Dinâmica, Brasil); Glibenclamida, Glutamato, Naloxana, L-arginina, L-NOARG, Tween 80 (Sigma, USA), Bicuculina (Sigma, USA); Óxido de rosa (LAPROBIO); Indometacina (Indocid®)(Galeno, Brasil); NaCl 0,9%; Tiopental sódico, Sulfato de morfina (Dimorf®) (Cristália, Brasil).

3.2 Equipamentos

Analgesímetro (Randall-Selitto), Câmara de observação de acrílico espelhada, Microscópio ótico (Insight equipamentos, Brasil); Balança digital (Plenna, USA); Balança analítica (Modelo-AR2140)(OHAUS, USA); Câmara de Neubauer (Optik Labor); Espectrofotômetro, Analisador Bioquímico (LabTest), Microcentrifuga, Rota Rod e Campo Aberto.

3.3 Obtenção do óxido de Rosa

A substância óxido de rosa foi fornecida pelo Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa, membro do Departamento de Ciências Farmacêuticas/UFPB.

Para os estudos farmacológicos, o óxido de rosa foi suspenso em Tween 80 a 2% em salina (0,9% de NaCl- 10 mL/kg). As doses foram determinadas como miligramas de óxido de rosa por grama de peso corporal (mg/kg). O intervalo de doses foi de 6,25 a 50 mg/kg, exceto no protocolo de toxicidade aguda que foi utilizado 2 g/kg (v.o). Os resultados das doses inferiores ou superiores para alguns protocolos não foram mostrados, devido a semelhança nos efeitos farmacológicos entre as doses anteriores e seguintes. O óxido de rosa foi administrado em todos os protocolos pela via oral (v.o).

3.4 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss fêmeas (25-30 g), ratas Wistar fêmeas (170-230 g) provenientes do biotério setorial do Núcleo de Pesquisas em Plantas

Medicinais (NPPM) da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Acondicionados em caixas de polipropileno a temperatura de 22 ± 1 ° C e ciclo claro/escuro de 12 h com água e ração *ad libitum*.

Para a execução dos protocolos experimentais, os animais foram colocados em jejum de 12 h e permaneceram no laboratório para adaptação por um período de 1h antes dos experimentos. Os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as orientações para cuidados com animais de laboratório e considerações éticas para investigação de dor experimental em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983). Os estímulos utilizados foram os mínimos necessários para demonstrar efeitos consistentes dos procedimentos empregados e dos tratamentos com fármacos.

Os animais foram eutanasiados com superdosagem de tiopental sódico (100 mg/kg, i.p.) de acordo com o estabelecido pela Resolução N° 1.000 de 11 de maio de 2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária – CFMV, tendo como responsável técnico a Médica Veterinária, Adeline de Andrade Carvalho, CRMV-PI N° 866. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPI (CEUA/UFPI N° 148/16).

3.5 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA

Os animais foram divididos em grupos (n =6), em jejum de sólidos de 12 h e tratados com veículo (salina + 2% Twenn 80%, v.o) e óxido de Rosa (2 g/kg, v.o). Foram realizadas observações comportamentais sistemáticas nos tempos de 15 min, 30 min, 1h, 2h, 4h e 8h após a administração e, a partir de então, diariamente, até o décimo quarto dia, por meio do *screening hipocrático*. Os parâmetros analisados foram atividade geral, frênilo vocal, irritabilidade, resposta ao toque, resposta aperto cauda, contorção, posição trem posterior, reflexo ao endireitamento, tônus do corpo, força para agarrar, ataxia, reflexo auricular, reflexo corneal, tremores, convulsões, straub, hipnose, anestesia, lacrimação, ptose palpebral, micção, defecação, piloereção, hipotermia, respiração, cianose, hiperemia, morte. Sinais de toxicidade, a época do seu aparecimento, a intensidade, a duração e a progressão dos mesmos foram anotados, tabulando-as numa escala de 0 a 4 (ausente, raro, pouco, moderado, intenso), para posterior análise (MALONE, 1977; OECD 423,2001).

O peso de cada animal foi determinado no primeiro, sétimo e décimo quarto dia. Ao fim do período de observação todos os animais sobreviventes foram eutanasiados. Após a eutanásia, foi realizada a coleta de sangue para análise hematológica (hematócrito; dosagem de hemoglobina; contagem total de leucócitos) e bioquímica (alanina transferase; aspartato aminotransferase; uréia; creatinina) e a retirada de órgãos para a observação macroscópica e pesagem.

O sangue foi acondicionado em dois tipos de tubo, um com anticoagulante EDTA (Labtest®) para determinação dos parâmetros hematológicos e o outro, sem anticoagulante, para obtenção do soro para avaliação dos parâmetros bioquímicos. Para análise bioquímica, o material foi centrifugado a 3500 rpm durante 10 minutos e, em seguida, determinados os parâmetros, uréia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (AST). Os ensaios foram realizados em aparelho automático Labmax 400 com sistemas comerciais da LABTEST®

Para a dosagem do hematócrito, foi preenchido um tubo capilar com sangue de cada animal. Em seguida o tubo foi centrifugado na microcentrífuga a 10.000 rpm por 5 minutos. Após o tempo de centrifugação, foi o valor (%) do hematócrito com o auxílio de uma tabela específica graduada. A dosagem da hemoglobina, foi realizada através de kit reagente LabTest, e a leitura foi realizada no espectrofotômetro a 540nm. A contagem total de leucócitos, foi realizado com o auxílio da câmara de Neubauer, onde o sangue (20 µL) foi acrescido de 400 µL de líquido de Turk (agente lisante das hemácias).

3.6 AVALIAÇÃO DO DANO GÁSTRICO

Os animais (n=6) receberam, veículo (salina + 2% Twenn 80%, v.o), óxido de rosa (150 mg/kg, v.o) ou indometacina (20 mg/kg v.o). Após 7 h, os animais foram sacrificados; o estômago foi localizado, removido e aberto ao longo da curvatura maior. O dano gástrico macroscópico foi calculado através da soma dos comprimentos de todas as erosões lineares, com o auxílio do paquímetro (SILVA et al., 2015)

3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

3.7.1 Efeito do Óxido de Rosa no teste de capsaicina

Os animais (n= 6-8), foram tratados com óxido de rosa (6,25, 12,5, 25 e 50 mg/kg, v.o.), veículo ou morfina (5 mg/kg, s.c.). Uma hora (v.o.) ou 30 minutos (s.c.) após esses tratamentos, na pata traseira direita foi injetado capsaicina (2 µg/20 µL/pata). A nocicepção foi avaliada imediatamente após a injeção e quantificada pelo tempo de lambertura da pata durante um período de 5 minutos, **Figura 4** (SAKURADA et al., 1992).

3.7.2 Efeito do óxido de rosa no teste do glutamato

Com o intuito de avaliar o papel do sistema glutamatérgico na atividade antinociceptiva do óxido de rosa, os animais (n = 6-8) receberam uma injeção de glutamato por via intraplantar, i.pl. (2 µmol/pata) 60 minutos após o tratamento com OR por via oral (12,5, 25 e 50 mg/kg, v.o.) ou veículo. Morfina (5 mg/kg, s.c.) foi usada como controle positivo e administrada 30 minutos antes do glutamato. O tempo que o animal lambe ou morde a pata que recebeu o estímulo durante 0-15 min foi quantificado e comparado entre os grupos, **Figura 4** (BEIRITH, 1998).

Figura 04: Câmara de observação de acrílico espelhada usada nos testes formalina, capsaicina e glutamato



Fonte: Arquivo pessoal.

3.7.3 INVESTIGAÇÃO DOS POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO ANTINOCICEPTIVA DO ÓXIDO DE ROSA

A fim de elucidar os mecanismos subjacentes antinociceptivos do óxido de rosa, os animais (n= 6-8), foram pré-tratados intraperitonealmente no modelo de glutamato (n= 6-8) com naloxona (2 mg/kg) um antagonista não seletivo do receptor opióide; L-arginina (600 mg/kg), um substrato para a biossíntese de NO; bicuculina (1mg/kg), um antagonista dos receptores GABA_A; ondansetrona (0,1 mg/kg), antagonista dos receptores 5-HT₃; cetanserina (1 mg/kg), antagonista do receptor 5-HT_{2A/2C}; pindolol (0,5 mg/kg), antagonista do receptor 5-HT_{1A/1B}. As doses desses fármacos foram selecionadas de acordo com dados da literatura e estudos prévios do nosso laboratório (SANTOS et al., 2005; LOPES et al., 2009; GUGINSKI et al., 2009).

3.7.3.1 Participação do sistema opióide no efeito antinociceptivo do óxido de rosa

Com a finalidade de avaliar a influência do sistema opióide sobre o efeito antinociceptivo do óxido de rosa, grupos distintos de animais (n= 6-8), foram pré-tratados com o antagonista opióide não seletivo naloxona (2 mg/kg, i.p.), 20 min antes da administração do óxido de rosa (25 mg/kg, v.o.) ou morfina (5 mg/kg, s.c.), a qual foi utilizada como controle positivo (PIETROVSKI et al., 2006). Decorrida 1 h após a administração do óxido de rosa ou 30 minutos após a administração de morfina, injetou-se por via intraplantar 20 µL de solução de glutamato (20 µmol/pata) e avaliou-se a resposta nociceptiva (BEIRITH; SANTOS; CALIXTO, 2002).

3.7.3.2 Participação da via L-arginina-óxido nítrico no efeito antinociceptivo do óxido de rosa

Para avaliarmos também a participação da via L-arginina - óxido nítrico no efeito antinociceptivo causado pelo óxido de Rosa, os animais (n = 6-8) foram previamente tratados com o precursor do óxido nítrico, L-arginina (600 mg/kg, i.p.) e após 20 minutos cada grupo recebeu o óxido de rosa (25 mg/kg, v.o.) e N^ω-nitro-L-arginina (L-NOARG, 75 mg/kg, i.p.), um inibidor da enzima óxido nítrico sintase (PIETROVSKI et al., 2006). Decorrida 1 h após a administração do óxido de rosa e 30

min após o tratamento com L-NOARG, os animais foram avaliados quanto à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de 20 µL de solução de glutamato (20 µmol/pata). Os animais controle foram tratados com veículo por via oral (BEIRITH; SANTOS; CALIXTO, 2002).

3.7.3.3 Participação do sistema GABAérgico no efeito antinociceptivo do óxido de rosa

A possível participação do sistema GABAérgico no processo de antinociceptivo do óxido de rosa foi investigado. Para avaliar, os animais (n= 6-8), foram pré-tratados com bicuculina (1,0 mg/kg, i.p.), um antagonista de GABAA. Após 15 min da administração da bicuculina os animais receberam o óxido de rosa (25 mg/kg, i.p.) e o veículo. Depois de 60 minutos da administração do óxido de rosa os animais foram submetidos ao teste do glutamato.

3.7.3.4 Participação do sistema serotoninérgico no efeito antinociceptivo do óxido de rosa

Para avaliar a especificidade do óxido de rosa sob os receptores serotoninérgicos, foram formados grupos de diferentes substâncias que agem nestes receptores. Os animais (n= 6-8), foram pré-tratados com ondansetrona (0,1 mg/kg) ou Cetanserina (1 mg/kg) ou Pindolol (0,5 mg/kg). Após 30 minutos receberam o óxido de rosa (25 mg/kg, v.o.) ou veículo (salina + 2% tween 80, v.o.). Depois de 60 minutos da administração do óxido de rosa, os animais foram submetidos ao teste do glutamato.

3.7.4 Avaliação da hiperalgesia inflamatória induzida

Para avaliação da hiperalgesia inflamatória, foi utilizado o método de compressão mecânica na pata de ratas, Randall Selitto (RANDALL; SELITTO, 1957). Esse método baseia-se no princípio de que a inflamação aumenta a sensibilidade ao estímulo nociceptivo mecânico, e que essa sensibilidade aumentada pode ser modificada por recursos analgésicos (SLUKA; WALSH, 2003). O equipamento apresenta um cone de ponta romba que é colocado sobre o dorso da pata dos animais (**Figura 5**). O limiar de dor foi medido pela aplicação de uma força contínua crescente

(em gramas) à região dorsal da pata do animal capaz de induzir a reação de retirada desta ou luta/vocalização. As medidas basais foram realizadas previamente à injeção dos agentes inflamatórios.

Figura 05: Teste de compressão da pata (Randall-Selitto) – (A) Equipamento Randall-Selitto (B) Realização do teste de compressão da pata (Randall-Selitto), quando uma força em gramas (g), de magnitude crescente, é aplicada continuamente sobre o dorso da pata traseira direita do animal.

Fonte: Arquivo pessoal.



3.7.4.1 Efeito do tratamento com óxido de Rosa na hiperalgesia inflamatória induzida por carragenina

Os animais (n=6-8) foram tratados com óxido de rosa (25 e 50 mg/kg, v.o.), veículo (NaCl 0,9% + 2% de tween 80, v.o.) ou Indometacina (10 mg/kg, v. o.) e 60 minutos após receberam o agente indutor da nocicepção, carragenina 1% (0,1mL), na região plantar da pata traseira direita. Cada animal foi avaliado após 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas da administração.

3.7.4.2 Efeito do óxido de rosa na hiperalgesia inflamatória induzida por PGE2

Os animais (n=6-8) foram tratados com o óxido de rosa (25 e 50 mg/kg, v.o.), veículo (NaCl 0,9% + 2% de tween 80, v.o.) ou dexametasona (0,5mg/kg), 30 minutos depois receberam o agente indutor de hipernocicepção, 100 µL de PGE2 (1 µg/mL),

na região plantar da pata traseira direita. Cada animal foi avaliado após 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas da administração.

3.8 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÓXIDO DE ROSA NA ATIVIDADE MOTORA DOS ANIMAIS

3.8.1 Teste do campo aberto

Este teste é utilizado para avaliar a capacidade exploratória dos animais (LAPA, 2003). Os camundongos foram divididos em grupos (n= 6-8) e tratados com o Óxido de Rosa (25 e 50 mg/kg, v.o), veículo (salina + 2% de tween 80, v.o.) ou diazepam (agonista benzodiazepínico, 4 mg/kg i.p.). Após 60 ou 30 minutos, os animais foram levados individualmente ao campo aberto, que consiste em uma arena quadrada (30 x 30 x 15 cm), confeccionada em acrílico, com piso preto dividido em nove partes iguais, paredes transparentes e iluminada com luz vermelha, **Figura 6**. O animal foi posto na arena e deixado para explorar o ambiente por um minuto. Após esse período, foi quantificado o número de quadrantes atravessados com as quatro patas pelo animal, o número de rearings (levantar as patas - exploração vertical) e o tempo de imobilidade, durante um tempo de 5 minutos. A arena foi limpa com álcool a 20 % após cada animal ser retirado, sendo então realizada a comparação entre os grupos (BROADHURST, 1957).

Figura 6. Teste do campo Aberto

Fonte: Arquivo pessoal

3.8.2 Rota-Rod

Por este método é possível detectar a ocorrência de incoordenação motora, permitindo uma interpretação mais precisa dos testes de nocicepção (LAPA et al., 2003). Os animais foram selecionados 24 h antes do experimento, através de uma triagem em sessões de 1 minuto de duração, sendo escolhidos os que permanecerem este tempo no aparelho. Os animais foram divididos em grupos ($n = 6-8$) e tratados com o Óxido de Rosa (25 e 50mg/kg, v.o), veículo (NaCl 0,9% + 2% de tween 80, v.o.) ou diazepam (agonista benzodiazepínico, 4 mg/kg i.p.) como controle positivo. Foi registrado o tempo de permanência na barra giratória, (**Figura 7**) podendo o animal ser reconduzido por até três vezes, no tempo máximo de 1 minuto.

Figura 7. Equipamento para o Teste Rota-rod

Fonte: Arquivo pessoal

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Foi empregada a análise de variância (ANOVA one way ou two way), seguida pelo Teste de Tukey. Quando necessário os dados receberam outro tipo de tratamento estatístico complementar. A análise de significância foi considerada quando $p < 0,05$. Foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism versão 6.0.

RESULTADOS

4.0 RESULTADOS

4.1 Avaliação da toxicidade aguda oral do óxido de Rosa

Para determinar a toxicidade aguda, os animais receberam o óxido de rosa (2 g/Kg, v.o) e foram observados por um período de 8 horas e durante 14 dias após o tratamento. Durante esse período de observação, nenhum animal veio óbito ou apresentou alterações comportamentais. Por esta razão não foi possível calcular a DL₅₀ do óxido de rosa, uma vez que essa se refere à dose necessária para levar a óbito 50% dos animais avaliados.

Quanto a variação do peso dos animais e do peso dos órgãos, dados descritos nas **tabelas 1 e 2**, respectivamente, foi observado que não houve diferenças significativas entre os animais que foram tratados com o óxido de rosa (2 g/kg, v.o) e o grupo veículo (salina + 2% Tween).

Tabela 1. Variação da massa corpórea de camundongos fêmeas tratadas com veículo (salina + 2% Tween) e óxido de rosa (2g /kg v.o), no teste de toxicidade aguda. Os números representam a média e o erro padrão da média.

TEMPO	TRATAMENTO	
	Veículo	Óxido de Rosa (2 g/kg)
1º dia	22,33 ± 0,843	23,20 ± 0,969
7º dia	25,75 ± 1,197	25,20 ± 0,938
14º dia	27,83 ± 1,27	26,200 ± 1,019

Tabela 2. Média dos pesos em gramas dos órgãos dos camundongos fêmeas tratadas com salina e óxido de rosa (2g/ kg v.o), 14 dias após o início do teste de toxicidade aguda. Os números representam a média e o erro padrão da média em gramas.

ORGÃOS	TRATAMENTO	
	Veículo	Óxido de Rosa (2 g/kg)
Coração	0,128 ± 0,009	0,121 ± 0,007
Baço	0,187 ± 0,024	0,118 ± 0,013
Pulmão	0,182 ± 0,014	0,156 ± 0,007
Fígado	1,342 ± 0,073	1,150 ± 0,065
Rins	0,333 ± 0,019	0,304 ± 0,016

As **tabelas 3 e 4**, trazem os resultados obtidos através das dosagens bioquímicas (alanina transferase; aspartato aminotransferase; uréia; creatinina) e

hematológicas (Hematócrito; hemoglobina e contagem total de leucócitos), respectivamente. Os dados mostram que tanto nas dosagens bioquímicas, quanto nas hematológicas, mostraram que não houve diferenças significativas entre os grupos, corroborando com os resultados já expostos.

Tabela 3. Avaliação dos parâmetros bioquímicos pesquisados em camundongos fêmeas tratadas com o veículo (salina + 2% Tween) e óxido de rosa (2 g/kg v.o), 14 dias após o início do teste de toxicidade aguda. Os números representam a média e o erro padrão da média. ALT- alanina transferase; AST- aspartato aminotransferase; U/L – Unidades internacionais por litro.

Parâmetros Bioquímicos	TRATAMENTO	
	Veículo	Óxido de Rosa (2 g/kg)
ALT (U/L)	44,000 ± 4,187	49,600 ± 3,893
AST (U/L)	96,333 ± 8,612	97,400 ± 6,289
Creatinina (mg/dl)	0,211 ± 0,036	0,148 ± 0,023
Ureia (mg/dl)	47,333 ± 6,849	60,600 ± 2,942

Tabela 4. Dosagem dos parâmetros hematológicos pesquisados em camundongos fêmeas tratadas com veículo (salina + 2% Tween) e óxido de rosa (2g/ kg v.o), 14 dias após o início do teste de toxicidade aguda. Os números representam a média e o erro padrão da média.

Parâmetros Hematológicos	TRATAMENTO	
	Veículo	Óxido de Rosa (2 g/kg)
Hematócrito (%)	48,00 ± 0,80	50,00 ± 0,59
Hemoglobina (g/ dL)	13,73 ± 0,53	13,90 ± 0,44
Contagem Total de Leucócitos (Leucócitos/ mm ³)	7.600,00 ± 1441,04	8.785,71 ± 963,17

4.2 AVALIAÇÃO DO DANO GÁSTRICO

No protocolo de avaliação do dano gástrico (**Figura 08**), foi observado que o óxido de rosa (150 mg/kg, v.o) não foi capaz de gerar nenhuma lesão erosiva no estômago, quando comparada a indometacina (20 mg/kg, v.o), um fármaco já conhecido por causar sérios danos a mucosa gástrica. O efeito do óxido de rosa, foi semelhante ao do grupo dos animais que receberam o veículo (**Figura 09**). Vale ressaltar, que a dose do óxido de rosa utilizada nessa avaliação, foi três vezes superior a dose máxima adotada nos protocolos que avaliam a atividade antinociceptiva

Figura 08. Dano gástrico (mm) após a administração do óxido de rosa-OR (150 mg/kg, v.o). Os animais receberam veículo (salina + 2% Tween), óxido de rosa ou indometacina (20 mg/ kg, v.o), o dano gástrico foi avaliado 7 horas após a administração. Os dados representam a média \pm E.P.M. (n=6) (ANOVA one way, Teste de Tukey).

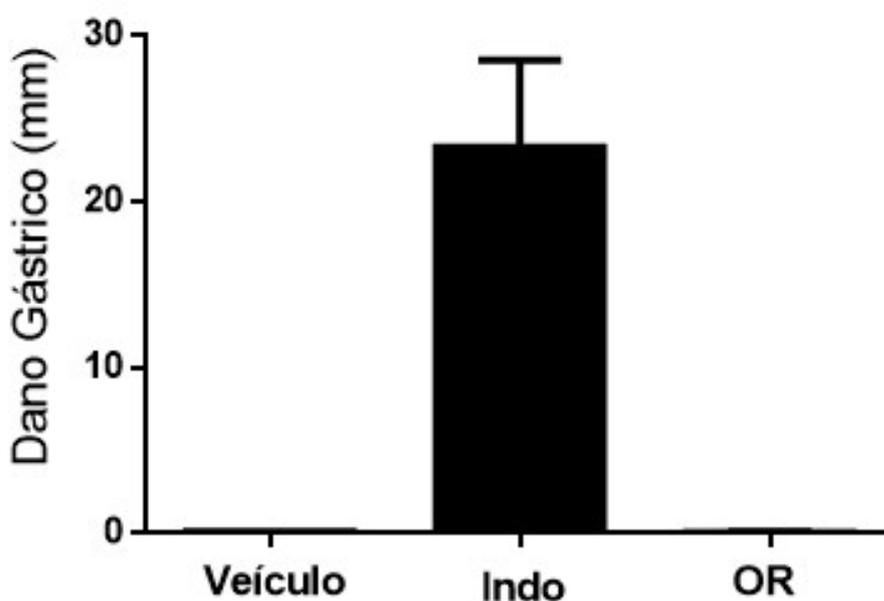
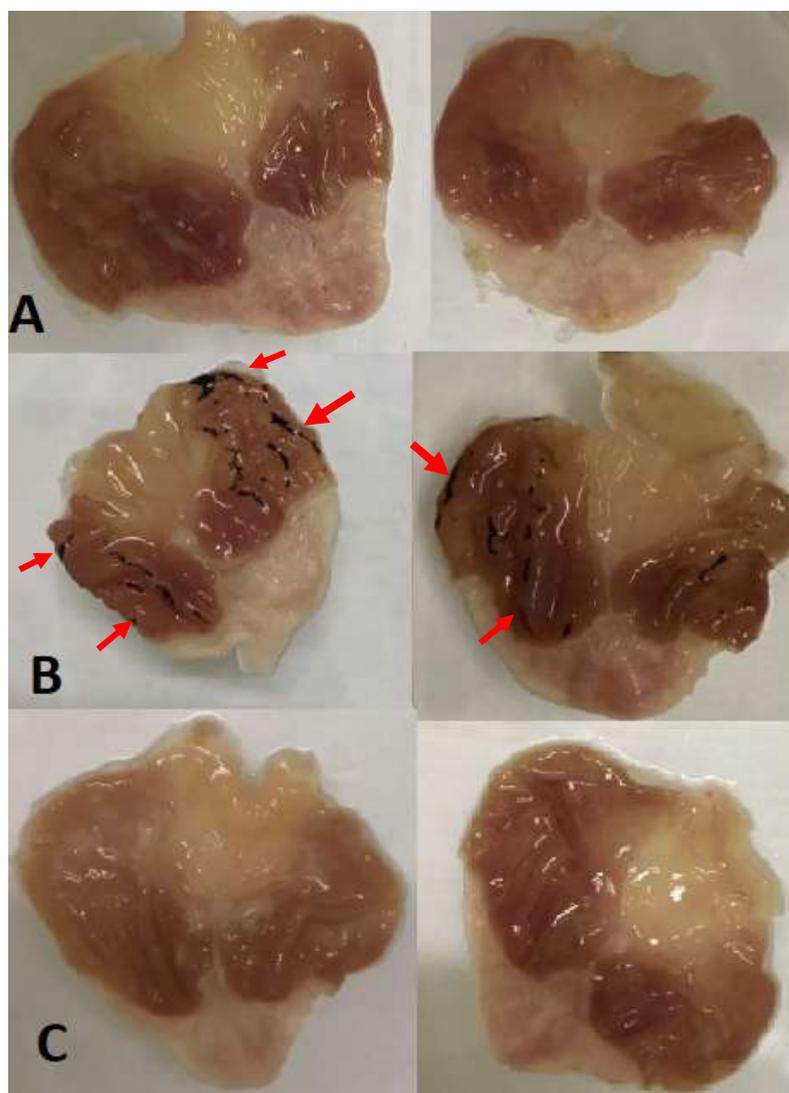


Figura 09. Imagens referentes aos estômagos dos animais 7 horas após a administração do veículo (salina + 2% tween), óxido de rosa (150 mg/kg, v.o) ou indometacina (20 mg/kg, v.o), onde **(A)** corresponde ao grupo veículo. **(B)** grupo que recebeu a indometacina e **(C)** grupo que recebeu o óxido de rosa. As setas em vermelho, apontam as lesões gástricas.



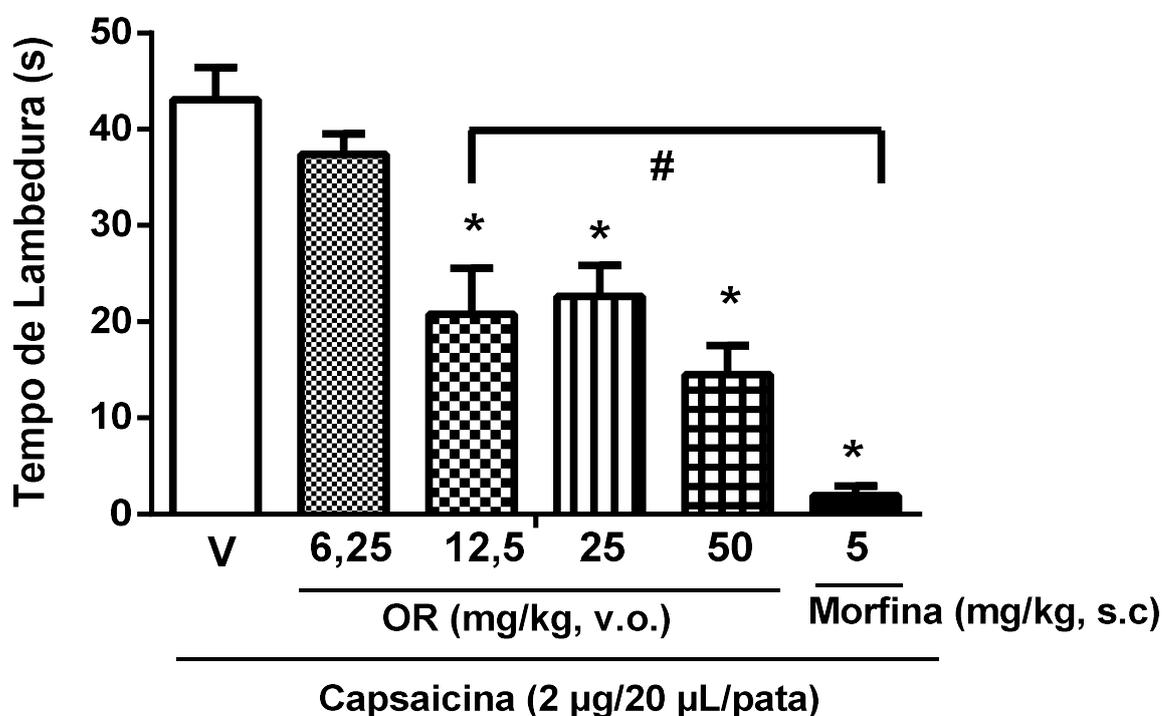
4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

4.3.1 Efeito do Óxido de Rosa no teste de capsaicina

O efeito do óxido de rosa na nocicepção induzida por capsaicina em camundongos é mostrada na **figura 10**. Uma redução significativa no tempo de lambertura da pata foi observada em camundongos tratados por via oral com óxido de rosa nas doses 12,5, 25 e 50 mg/kg (* $p < 0,05$), comparado ao grupo veículo, o que

indica um efeito antinociceptivo na dor neurogênica. O óxido de rosa na dose de 6,25 mg/kg não foi capaz de reduzir o tempo de lambedura da pata, em contrapartida, apresentou diferença significativa com as doses 12,5, 25 e 50 mg/kg ($\#p<0,05$). Morfina 5 mg/kg, s.c., foi usada como controle positivo e mostrou uma redução da nocicepção quando comparado com o grupo veículo ($*p<0,05$).

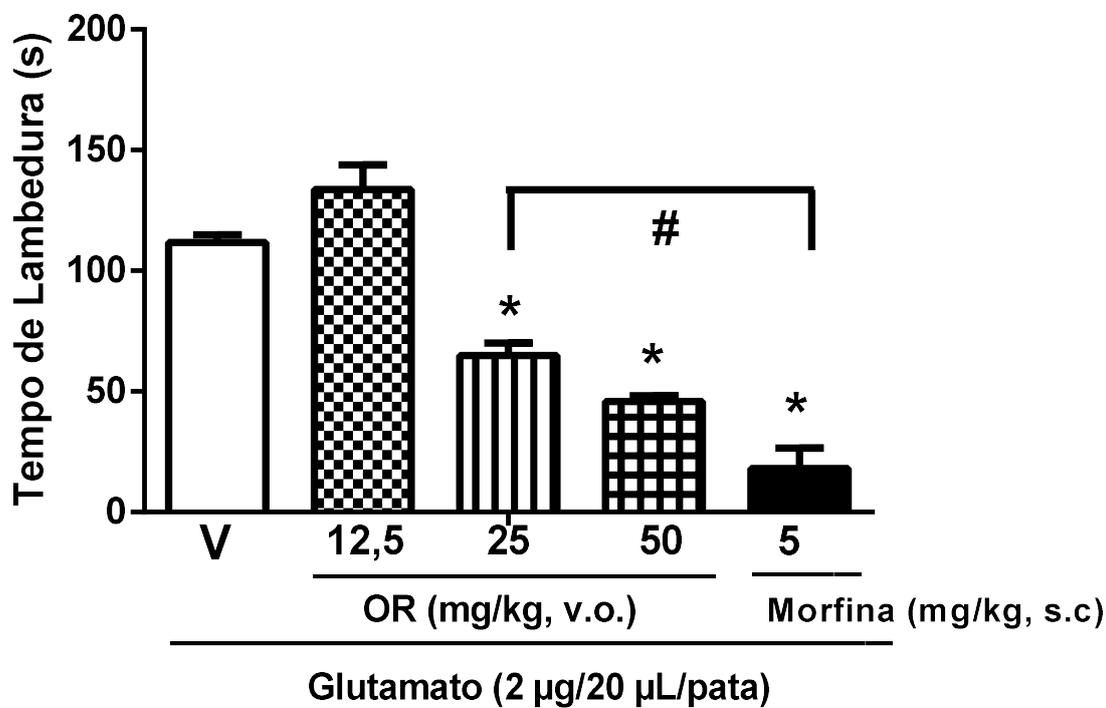
Figura 10: Efeito do óxido de rosa-OR (6,25, 12,5, 25 e 50 mg/kg, v.o) na nocicepção induzida por capsaicina em camundongos. Animais foram tratados com óxido de rosa 60 min (v.o.) antes do tratamento com capsaicina. Os dados representam a média \pm E.P.M. (5-7 animais). $*p<0,05$ comparado com o veículo e $\#p<0,05$ para comparação com a dose de 6,25 mg/kg do óxido de rosa. (ANOVA one way, Teste de Tukey).



4.3.2 Efeito do Óxido de Rosa no teste do glutamato

A **Figura 11** mostra que a administração de óxido de rosa reduziu significativamente o tempo de lambedura da pata, nas doses de 25 e 50 mg/kg ($*p<0,05$), e conseqüentemente a nocicepção induzida por glutamato quando comparado ao veículo. Entretanto a dose de 12,5 mg/kg não apresentou efeito significativo neste teste. No teste as doses de 25 e 50 mg/kg não apresentaram diferenças significativas.

Figura 11: Efeito do óxido de rosa-OR na nocicepção induzida por glutamato (20 $\mu\text{mol/pata}$) em camundongos. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. (5-8 animais). * $p < 0,05$, comparado com o veículo e # $p < 0,05$ para comparação com a dose de 12,5 mg/kg do óxido de rosa. (ANOVA one way, Teste de Tukey).

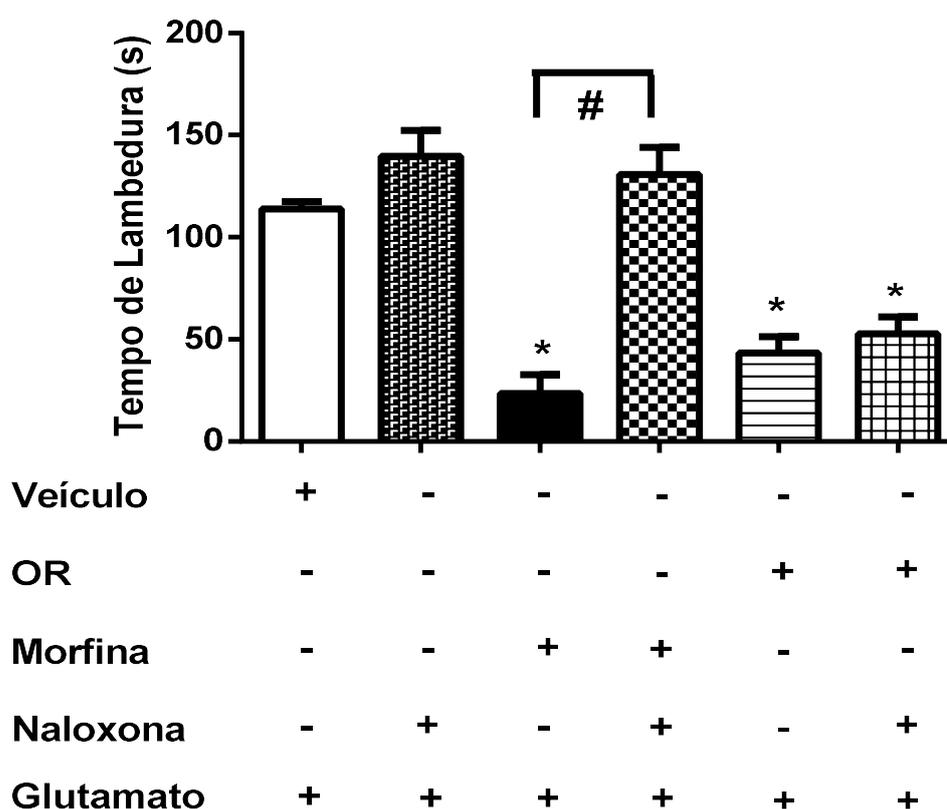


4.3.3 INVESTIGAÇÃO DOS POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO ANTINOCICEPTIVA DO ÓXIDO DE ROSA

4.3.3.1 Participação do sistema opióide no efeito antinociceptivo do Óxido de Rosa

A **Figura 12** mostra que o grupo tratado apenas com naloxona ($139,8 \pm 12,64$) apresentou valores semelhantes aos do veículo ($113,90 \pm 3,47$), descartando a existência de efeito antinociceptivo da naloxona. Ao compararmos o efeito da associação naloxona + óxido de rosa-25 mg/kg ($52,68 \pm 8,46$) com o efeito do óxido de rosa ($64,94 \pm 5,08$), podemos observar que a naloxona não consegue reverter a ação antinociceptiva do óxido de rosa, da mesma forma que reverte significativamente (# $p < 0,05$) o efeito da morfina quando associadas ($130,7 \pm 13,39$) em comparação com a morfina sozinha ($23,62 \pm 9,15$).

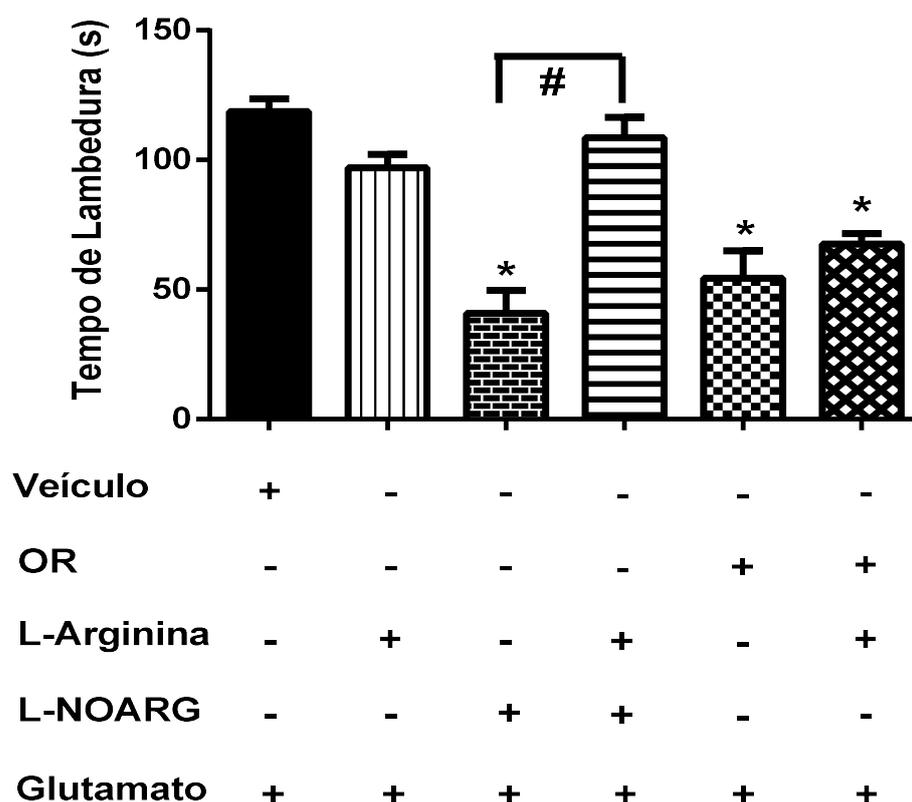
Figura 12: Investigação do envolvimento dos receptores opióides no efeito antinociceptivo do óxido de rosa- OR (25 mg/kg, v. o.), na nocicepção induzida pelo glutamato (20 μ L/20 μ mol/pata) em camundongos. Onde (+) indica presença e (-) ausência do tratamento. Cada grupo representa a média \pm E.P.M do tempo de reação dos animais tratados com óxido de rosa, naloxona (2 mg/kg, i.p.), Morfina (5 mg/kg, s.c.) e controle, 30 ou 20 min antes do estímulo. n = 5-8 (*p <0,05 vs. veículo; # p<0,0, vs. Naloxona) (ANOVA one way, teste de Tukey).



4.3.3.2 Participação da via L-arginina-óxido nítrico no efeito antinociceptivo do Óxido de rosa

A **Figura 13** mostra que o grupo tratado apenas com L-arginina ($97,03 \pm 2,08$) apresentou valores próximos aos do controle ($118,66 \pm 1,98$), descartando a existência de efeitos antinociceptivos do precursor do óxido nítrico. A L-arginina associada ao L-NOARG ($108,54 \pm 3,51$) reverteu, significativamente (*p<0,05), o efeito do L-NOARG sozinho ($40,78 \pm 2,97$). A associação da L-arginina com o óxido de rosa-25 mg/kg ($67,52 \pm 2,07$) não alterou significativamente o tempo de lambertura dos animais, quando comparado com óxido de rosa ($54,38 \pm 4,28$) sozinho.

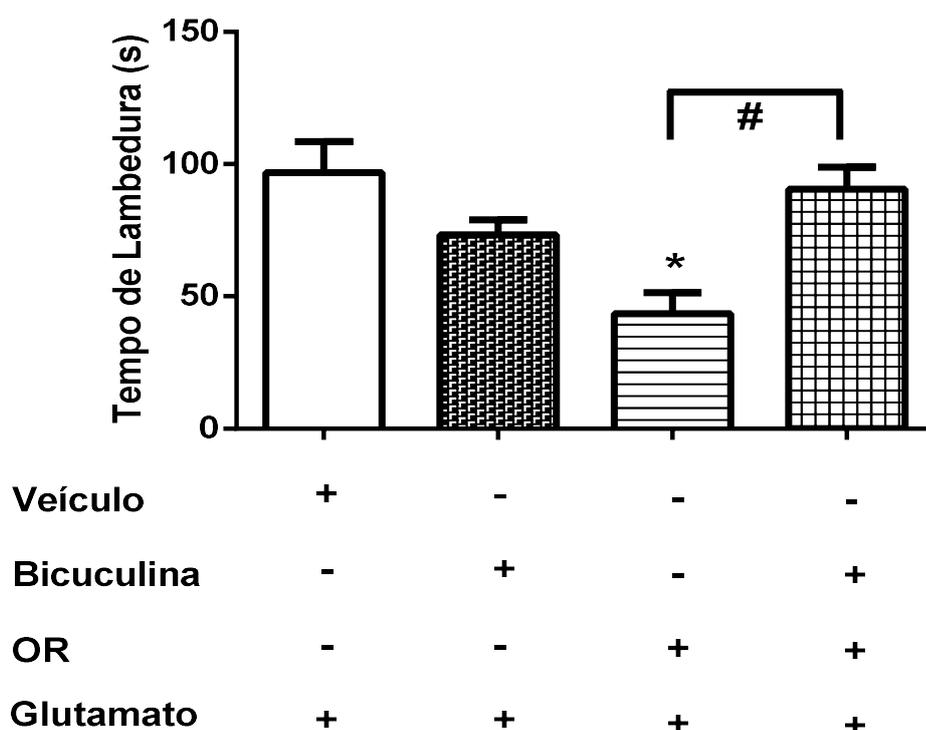
Figura 13: Investigação do envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico no efeito antinociceptivo do óxido de rosa (25 mg/kg, v.o) na nocicepção induzida pelo glutamato (20 μ L, 20 μ mol/pata) em camundongos. Onde (+) indica presença e (-) ausência do tratamento. Cada grupo representa a média \pm E.P.M do tempo de reação dos animais tratados com o óxido de rosa, L-NOARG (75 mg/kg, i.p.), L-arginina (600 mg/kg, i. p.) e controle, 30 ou 20 min antes do estímulo. n = 6-8. (* p <0,05 vs. veículo; # p <0,05 vs. L-NOARG) (ANOVA one way, teste de Tukey).



4.3.3.3 Participação do sistema GABAérgico no efeito antinociceptivo do Óxido de Rosa

A **Figura 14** mostra que o grupo tratado apenas com a bicuculina ($73,34 \pm 8,03$) apresentou valores próximos aos do veículo ($96,83 \pm 11,55$), descartando a existência de efeitos antinociceptivo do antagonista dos receptores GABA_A. A bicuculina associada ao óxido de rosa- 25 mg/kg ($90,60 \pm 8,25$) reverteu, significativamente (* p <0,05), o efeito do óxido de rosa ($43,43 \pm 8,03$).

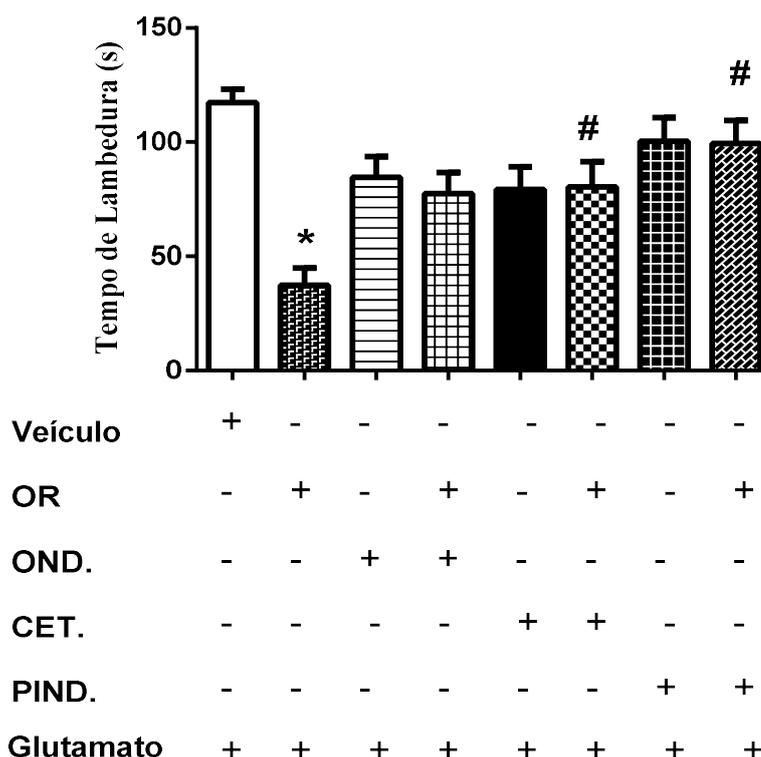
Figura 14: Investigação do envolvimento da via GABA_A no efeito antinociceptivo do óxido de rosa- OR na nocicepção induzida pelo glutamato (20 µL/20 µmol/pata) em camundongos. Onde (+) indica presença e (-) ausência do tratamento. Cada grupo representa a média ± E.P.M do tempo de reação dos animais tratados com óxido de rosa (25 mg/kg, v.o.), Bicuculina (1 mg/kg, i.p.), e controle, 15 ou 60 min antes do estímulo. n = 6-8. (*p<0,05 vs. veículo; # p<0,05 vs. óxido de rosa) (ANOVA one way, teste de Tukey).



4.3.3.4 Participação do sistema serotoninérgico no efeito antinociceptivo do óxido de Rosa

A **Figura 15** mostra o envolvimento dos receptores serotoninérgico no efeito antinociceptivo do óxido de rosa. A associação entre o óxido de rosa (25 mg/ kg, v.o) e a ondansetrona (OND. + OR- 77,47 ± 9,27), antagonista dos receptores 5-HT₃, não foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo do óxido de rosa (37,37 ± 7,59). A cetanserina (79,37 ± 9,85), antagonista do receptor 5-HT_{2A/2C}, foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo do óxido de rosa (CET. + OR- 80,38 ± 10,99), quando comparado ao óxido de rosa sozinho (37,37 ± 7,59). O pindolol (100,39 ± 10,44), antagonista do receptor 5-HT_{1A/1B}, também foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo do óxido de rosa, quando associados (PIND. + OR- 99,46 ± 9,97). Todos os antagonistas não tiveram diferenças significativas, quando comparados ao grupo veículo (117,33 ± 5,82).

Figura 15. Investigação do envolvimento dos receptores serotoninérgicos no efeito antinociceptivo do óxido de rosa-OR na nocicepção induzida pelo glutamato (20 μ L/20 μ mol/pata) em camundongos. Onde (+) indica presença e (-) ausência do tratamento. Cada grupo representa a média \pm E.P.M do tempo de reação dos animais tratados com OR (25mg/ kg, v.o), ondansetrona (0,1 mg/ kg, i.p); Cetanserina (1 mg/ kg, i.p); Pindolol (0,5 mg/kg i.p) e veículo, 15 ou 60 min antes do estímulo. n = 6-7 (*p<0,05 vs. veículo; # p<0,05 vs. óxido de rosa) (ANOVA one way, teste de Tukey)

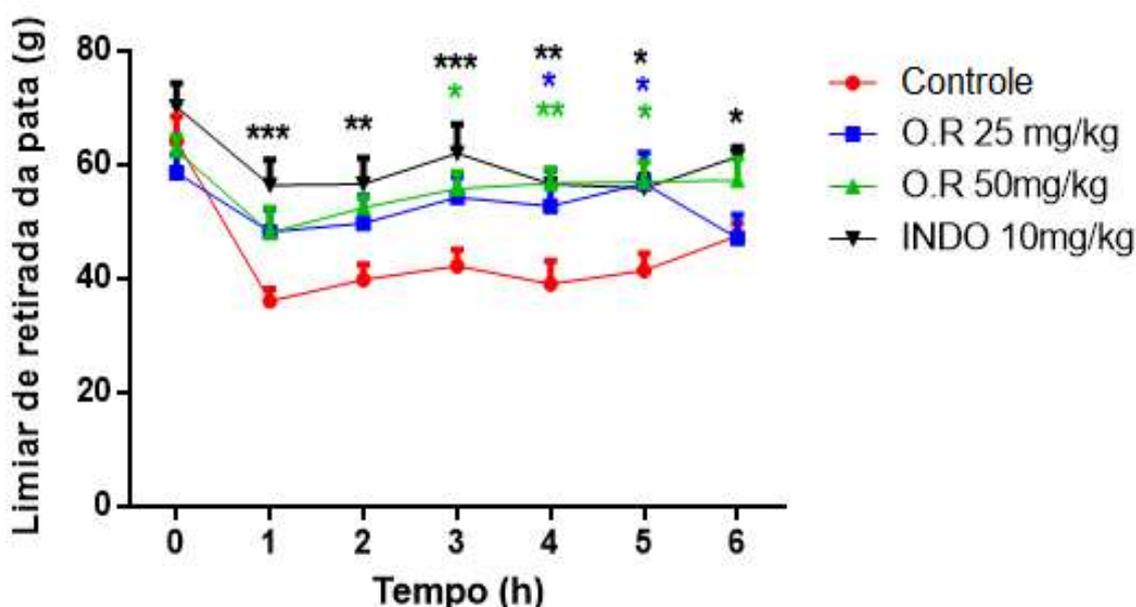


4.3.4 AVALIAÇÃO DA HIPERALGESIA INFLAMATÓRIA INDUZIDA

4.3.4.1 Efeito do tratamento com óxido de rosa por via oral na hiperalgesia inflamatória induzida por carragenina

O pré-tratamento por via oral com óxido de rosa (25 mg/ kg, v.o), só foi eficaz na redução da hiperalgesia mecânica, levando a um aumento do limiar nociceptivo, a partir da quarta hora (*p<0,1). A dose de 50 mg/kg foi capaz de aumentar o limiar de retirada de pata, desde a terceira hora perdurando o efeito até a sexta hora, quando comparada ao controle. O grupo tratado com o óxido de rosa na dose de 25 mg/kg, aumentou o limiar de retirada apenas na quarta e quinta hora (*p<0,1) quando comparada ao controle (**Figura 16**). A indometacina (10 mg/kg, v.o.) inibiu significativamente (**p<0,001) a hiperalgesia já a partir da primeira hora e perdurou até a sexta hora comparado ao controle.

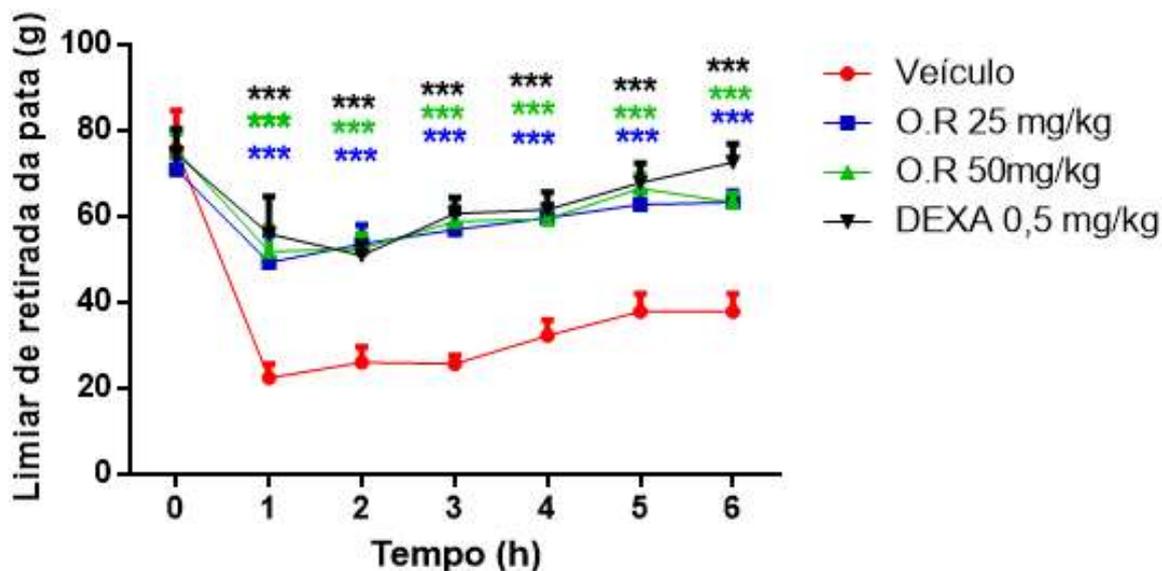
Figura 16: Efeito da administração aguda do óxido de rosa sobre o limiar de retirada de pata de ratos Wistar com hiperalgesia mecânica induzida pela injeção (i.pl.) de carragenina 1% (50 μ L/pata), submetidas ao teste de compressão da pata (Randall-Selitto). Os grupos de animais (n=6-8) receberam OR (25 e 50 mg/kg, v.o.), veículo ou indometacina (10 mg/kg, v.o.). Cada grupo representa a média \pm E.P.M. (* p <0,1, ** p < 0,01 e *** p <0,001 comparado com grupo controle; ANOVA two way, Teste de Bonferroni).



4.2.4.2 Efeito do tratamento com óxido de rosa por via oral na hiperalgesia inflamatória induzida por prostaglandina E₂.

A **Figura 17** mostra que os grupos tratados com o óxido de rosa nas doses 25 e 50 mg/kg, via oral, apresentaram uma redução da hiperalgesia mecânica induzida por PGE₂, causando um aumento do limiar nociceptivo a partir da primeira hora e perdurou até a sexta, com significância *** p <0,001. As doses 25 e 50 mg/kg não apresentaram diferenças significativas, quando comparadas entre si. A dexametasona (0,5 mg/kg, v.o) inibiu significativamente (*** p <0,001) a hiperalgesia já a partir da primeira hora e perdurou até a sexta hora, quando comparada ao controle.

Figura 17: Efeito da administração aguda do óxido de rosa sobre o limiar de retirada de pata de ratos Wistar com hiperalgesia mecânica induzida pela injeção (i.pl.) de 100 μ L de prostaglandina E_2 (1 μ g/mL), submetidas ao teste de compressão da pata (Randall- Selitto). Os grupos de animais (n = 6-9) receberam OR (25 e 50 mg/kg, v.o.), veículo ou dexametasona (0,5 mg/kg, v.o.). Cada grupo representa a média \pm E.P.M. (***) p <0,001 comparado com grupo controle; ANOVA two way, Teste de Bonferroni).

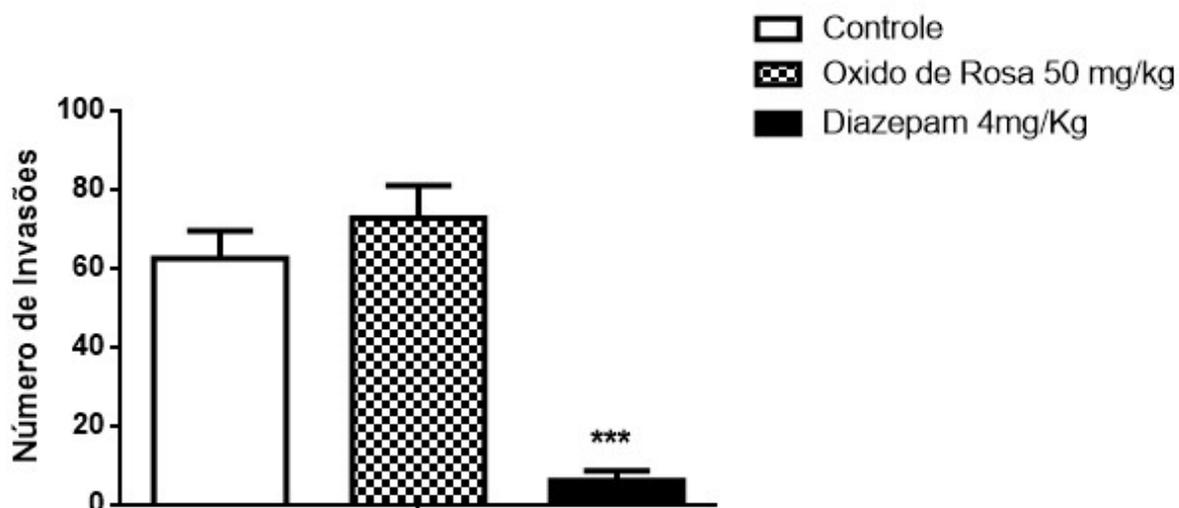


4.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÓXIDO DE ROSA NA ATIVIDADE MOTORA DOS ANIMAIS

4.4.1 Teste do campo aberto

A **Figura 18** mostra a atividade motora no teste de campo aberto, onde se demonstrou que o diazepam (4mg/kg, i.p), reduziu de maneira significativa (***) p <0,001), o número de invasões no seu grupo (6,20 \pm 2,53), em relação ao grupo controle (62,57 \pm 6,96). Enquanto que o óxido de rosa 50 mg/kg (72,80 \pm 8,2) não produziu reduções significativas na quantidade de quadrantes percorridos, quando comparado ao controle.

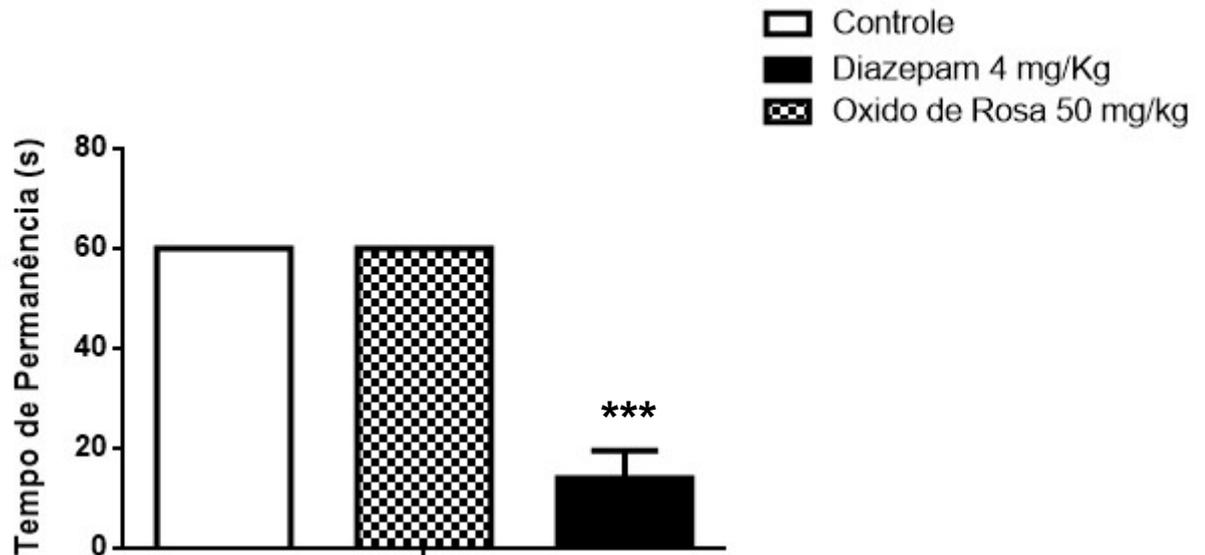
Figura 18. Efeito do óxido de rosa sobre a atividade locomotora no teste do campo aberto em camundongos. Os animais foram tratados com Óxido de rosa (50 mg/kg, v.o), veículo, diazepam (4mg/kg), 60 ou 30 min. Antes do estímulo. A média e o \pm E.P.M do número de invasões foram anotados (** $p < 0,001$ em relação ao controle, Anova one way, teste de Tukey)



4.4.2 ROTA-ROD

A **Figura 19**, mostra os resultados do óxido de rosa sobre a atividade motora no teste do rota-rod, onde se demonstrou que o diazepam (4mg/kg, i.p), reduziu de maneira significativa o tempo de permanência na barra giratória ($14 \pm 5,49$), em relação ao grupo controle ($60,0 \pm 0,0$). Enquanto que o grupo tratado com o óxido de rosa 50 mg/kg ($60,00 \pm 0,0$) não mostrou reduções significativas no tempo de permanência da barra giratória, quando comparado ao controle, permanecendo até o final do tempo de corte do experimento (60 segundos).

Figura 19. Efeito do óxido de rosa sobre a atividade locomotora no teste do rota-rod em camundongos. Os animais foram tratados com óxido de rosa (50 mg/kg, v.o), veículo, diazepam (4mg/kg), 60 ou 30 min. Antes do estímulo. A média e o \pm E.P.M do número de invasões foram anotados (** $p < 0,001$ em relação ao controle e ao óxido de rosa, Anova one way, teste de Tukey)



DISCUSSÃO

5.0 DISCUSSÃO

A dor em si é difícil de ser entendida, diagnosticada e tratada. A sensação da dor é diferente de pessoa para pessoa, mesmo quando há características e condições semelhantes. A dor é, portanto, um fenômeno complexo e multidimensional que exige atenção e cuidado interdisciplinar e intersetorial (LISBOA; LISBOA; SÁ, 2016). Devido à dificuldade de compreender todos os eventos fisiológicos relacionados a dor, tal como também a escolha do tratamento mais adequado, surge a necessidade de se apresentar novas moléculas com potencial analgésico e menos efeitos adversos, sendo as mesmas fundamentais no incremento de novos recursos terapêuticos que auxiliem no manejo desta enfermidade.

Produtos naturais constituem uma importante fonte de pesquisa visando a descoberta de novas substâncias com atividades farmacológicas. Substâncias isoladas de fontes vegetais também fornecem moldes estruturais para a obtenção de substâncias sintéticas e, além disso, podem ser empregados como ferramentas na identificação de mecanismos de ação (PASSOS, et al., 2009). Os óleos voláteis possuem uma grande variedade de atividades farmacológicas, tais como ansiolítica, anticonvulsivante e antinociceptiva. Dentre os metabólitos secundários que compõe os óleos vegetais, os terpenóides, substâncias cuja origem biossintética deriva de unidades do isopreno, constituem um dos grupos de maior expressão. Na medicina popular, assim como na terapêutica, plantas contendo derivados terpênicos têm sido usadas como sedativas, tranquilizantes e anticonvulsivantes. Monoterpenos como linalol, limoneno e citronelol possuem ação anticonvulsivante, enquanto mentol e mircenol, atividade analgésica (DE SOUSA; NOBREGA; ALMEIDA, 2007; SOUSA, et al., 2007; PERAZZO, et al., 2008; LEITE, et al., 2008). O óxido de rosa, como já citado anteriormente, pertence à classe dos monoterpenos, contudo não se encontra na literatura estudos que mostram sua atividade antinociceptiva em diferentes modelos de nocicepção química e mecânica em roedores.

Estudos realizados por Nonato e seus colaboradores (2012), demonstraram, pela primeira vez, as propriedades anti-inflamatórias do óxido de rosa. Nesse estudo a administração sistêmica do óxido de rosa reduziu eventos-chaves do processo inflamatório, como a formação do edema, o aumento dos níveis de IL-1 β e interferir também na migração de leucócitos, produzindo efeitos anti-inflamatórios consistentes nos mais diversos modelos de inflamação em roedores (NONATO, et al., 2012).

A investigação de efeitos tóxicos, sejam eles agudos ou crônicos, provocados por substâncias possivelmente farmacológica, é de grande relevância, visto que podem interferir em vários mecanismos biológicos, inclusive na produção de células sanguíneas ou na lesão de órgãos nobres, que revelam papel importante nas funções vitais do organismo (OLSON, et al., 2000; TAN, et al., 2008).

Os estudos de toxicidade aguda objetivam caracterizar a relação dose/resposta de uma substância que conduz ao cálculo da DL_{50} , ou seja, a dose que tem efeito letal em 50% dos animais de uma população (VASCONCELOS, et al., 2007; MOREIRA, 2014). Devido à ausência de registro na literatura, sobre a toxicidade do óxido de rosa em roedores, o presente trabalho teve início com o teste de toxicidade oral aguda. Os animais receberam a administração do monoterpene na dose de 2 g/kg por via oral, sendo observado o número de mortes por um período de 14 dias. Essa etapa é fundamental para o uso seguro de uma substância, visto que fornece informações das doses capazes de provocar efeitos tóxicos em um estudo pré-clínico (SÁ; ALMEIDA, 2006).

Durante a avaliação da toxicidade aguda, não ocorreu morte, nem sinais de toxicidade nas 8 horas de observação e nos 14 dias subsequentes, sugerindo que o óxido de rosa apresenta baixa toxicidade, quando administrado agudamente. Um ponto determinante no ensaio de toxicidade é a via de administração escolhida, onde as características farmacocinéticas são diferentes entre as vias oral e intraperitoneal. A escolha da via oral, pode ter influenciado na baixa toxicidade do óxido de rosa, pois a biodisponibilidade pode apresentar-se diferente, devido a vários fatores como a natureza química das substâncias teste (ácidos e/ou bases), solubilidade nos sucos digestivos, estado de ionização das moléculas, inativação enzimática ou diminuição da velocidade de esvaziamento gástrico (PIRES, et al., 2004).

Ainda no estudo de toxicidade, foram observados alguns parâmetros, como a variação do peso corpóreo e variação do peso dos órgãos (fígado, coração, baço, pulmão e rins), onde não foi observada diferenças significativas entre os animais que receberam o veículo e o óxido de rosa.

Na avaliação dos parâmetros bioquímicos, uréia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (AST), não se observou diferenças significativos entre os grupos veículo e óxido de rosa. Com isso, pode-

se sugerir que o uso do óxido de rosa de forma aguda pode não ser nefrotóxico ou hepatotóxico. Na avaliação hematológica, também não foram quantificadas diferenças significativas entre os grupos, corroborando ainda mais com o uso do óxido de rosa.

Assim, em todos os parâmetros avaliados no protocolo de toxicidade aguda foi observado que não houve diferenças estatísticas, entre os animais que receberam o veículo e dos tratados com o óxido de rosa (2 g/kg, v.o). Sendo assim, podemos sugerir que o óxido de rosa quando administrado por via oral em uma dose menor ou igual a 2g / Kg, aparentemente não apresenta toxicidade aguda nos protocolos avaliados.

Entretanto, apesar da impossibilidade de calcular a dose única responsável por provocar a morte em 50% dos animais (DL50) tratados com o óxido de rosa já que essa se encontra superior a 2 g/ kg, isso não indica que o mesmo não apresenta toxicidade, uma vez que qualquer substância química pode ser tóxica, se a dose ou a exposição se tornar suficientemente alta (VASCONCELOS et al., 2007).

Dentre os efeitos colaterais mais frequentes e graves associados com os AINES convencionais estão as lesões agudas gastrointestinais, incluindo úlceras, erosões e, ainda, complicações como sangramento gastrointestinal, perfuração e obstrução. O risco de perfuração e ulceração gástrica apresenta incidência 3 a 4 vezes maior em usuários destes compostos (LIPSKY, et al., 2000). O provável mecanismo para tal toxicidade é a inibição da atividade da isoforma COX-1, que produz as prostaglandinas citoprotetoras PGE₂ e PGI₂). Estas são responsáveis pela manutenção da integridade da mucosa gástrica, reduzem a secreção de ácido, aumentam a secreção de bicarbonato e melhoram o fluxo sanguíneo na microcirculação da mucosa (ECKMANN, et al., 1997; BUTTGEREIT; BURMESTER; SIMON, 2001). Com intuito de observar a ação do óxido de rosa sobre a mucosa gástrica, foi realizado o protocolo que avalia o risco potencial de gerar lesão. Nesse, observou-se que a indometacina, um AINE com potencial lesivo já descrito, causou várias lesões em toda as extensões do estômago, enquanto que o óxido de rosa (150 mg/kg, v.o), administrado em uma dose três vezes maior do que a dose máxima utilizada nos demais protocolos, não foi capaz de lesionar a mucosa gástrica, sendo semelhante aos animais do grupo veículo. Com isso, podemos sugerir que o óxido de rosa tem baixo potencial em causar lesões gástricas, sendo isso um parâmetro que

corroborar com o seu uso, em decorrência de que alterações na mucosa gástrica corresponde aos efeitos colaterais mais associados ao uso dos AINES.

No estudo da atividade antinociceptiva do óxido de rosa, o primeiro teste realizado foi a nocicepção induzida pela capsaicina (8-metil-N-vanillil-6-nonenamida). A capsaicina é um alcaloide extraído da pimenta vermelha do gênero *capsicum*, que estimula as terminações nervosas nociceptivas e térmicas, causando dor intensa. A capsaicina atua especificamente em fibras de tipo C não mielinizadas e raramente em fibras A δ mielinizadas e finas, no receptor vanilóide (TRPV-1) no sistema nervoso periférico, abrindo um canal catiônico não seletivo, principalmente Ca²⁺ e Na⁺, causando despolarização e iniciação de potenciais de ação. A capsaicina determina a liberação de neuropeptídeos, especialmente taquicininas (substância P, neuroquinina B), que atuam na transmissão da sensação de dor em vias nociceptivas e processos inflamatórios (SAKURADA et al, 1992; PALAZZO; ROSSI.; MAIONE, 2008; PASSOS, et al.,2015).

A ativação do terminal central TRPV1 pela capsaicina resulta num aumento da libertação sináptica de glutamato e neuropeptídeos. Estes resultados indicam um possível papel para os canais TRP como moduladores sinápticos, tanto diretamente (pelo controle do influxo de cálcio e, portanto, liberação de vesícula sináptica) e indiretamente (produzindo uma despolarização do terminal) (PATAPOUTIAN.; TATE; WOOLF,2009).

Neste, os resultados mostram que o pré-tratamento com o óxido de rosa nas doses de 12,5, 25 e 50 mg/kg diminuiu o comportamento sugestivo de dor após a aplicação da capsaicina. Esse resultado nos oferece uma suspeita do possível envolvimento do TRPV1 no efeito antinociceptivo do óxido de rosa, embora, apenas este teste, não seja suficiente para confirmar esse efeito. Estudos realizados com outros monoterpenos, como o carvacrol (GUIMARÃES et al., 2010), citronelal (QUINTANS JÚNIOR et al., 2010) e γ - terpineno (PASSOS et al., 2015) mostraram atividade antinociceptiva no teste de capsaicina.

Existem evidências de que o glutamato e alguns dos neuropeptídeos, em especial a substância P (um dos neurotransmissores liberados na dor induzida pela capsaicina), coexistem em fibras sensoriais periféricas de grande e pequeno diâmetro e podem ser libertados a partir de fibras aferentes primárias. Foi observado que quando a substância P é injetada perifericamente, a mesma aumenta a nocicepção induzida pelo glutamato, indicando que este neurotransmissor também tem um efeito

na periferia. Evidência também indica que glutamato e a substância P podem agir sinergicamente na transmissão de dor (BEIRITH; SANTOS; CALIXTO, 2003). Sendo assim, pesquisamos a participação da via glutamatérgica no efeito antinociceptivo do óxido de rosa.

O glutamato é o principal e mais abundante neurotransmissor excitatório do SNC dos mamíferos, exercendo um papel crucial em diversos mecanismos fisiológicos e patológicos (BEIRITH; SANTOS; CALIXTO, 2002; RUGIERRO et al., 2011). O glutamato e seus receptores estão localizados em áreas do cérebro, na medula espinhal e na periferia e estão envolvidos na transmissão e na sensação de dor. O glutamato atua em vários tipos de receptores, incluindo ionotrópicos e metabotrópicos (FUNDYTUS, 2001). A aplicação de glutamato, ou agonistas seletivos para um dos vários tipos de receptor de glutamato, na medula espinhal ou na periferia induz comportamentos nociceptivos. Por outro lado, a inibição da liberação de glutamato, ou dos receptores de glutamato, na medula espinhal ou na periferia diminui a dor aguda e crônica em modelos animais (FUNDYTUS, 2001).

Como descrito nos resultados, os animais que foram pré-tratados com o óxido de rosa nas doses 25 e 50 mg/ kg foram capazes de inibir de maneira significativa a nocicepção induzida pelo glutamato em camundongos. Esses resultados sugerem que óxido de rosa pode estar atuando diretamente nos receptores de glutamato ou impedindo a liberação dos diversos mediadores inflamatórios e neuropeptídeos que estão envolvidos na transmissão nociceptiva do glutamato no SNC e SNP, sugerindo que o óxido de rosa provavelmente possa apresentar ação antinociceptiva tanto periférica quanto central nesse modelo. Os resultados obtidos da interferência do óxido de rosa na via glutamatérgica, corrobora com outros estudos, realizados com monoterpenos, como o (-)- mirtenol (SILVA, et al., 2014), (-)- linalool (BATISTA et. al, 2008), assim como o carvacrol um monoterpeno fenólico (GUIMARÃES et al., 2010), e o γ - terpineno (PASSOS et al., 2015).

Em seguida, a fim de elucidar possíveis mecanismos da ação antinociceptiva do óxido de rosa, os animais foram pré-tratados com diversos fármacos que interferem com diferentes sistemas e avaliado no modelo de nocicepção induzida por glutamato.

O primeiro possível mecanismo investigado foi o envolvimento do óxido de rosa nos receptores opioides. Os opioides compreendem uma classe de fármacos bastante utilizados na clínica médica, tendo suas atividades toxicológicas e analgésicas bem descritas na literatura. Os opioides possuem três tipos de receptores (μ , δ , κ). Estão

localizados e podem ser ativados em todos os níveis da neuronais, incluindo os processos periféricos e centrais dos neurônios sensoriais primários (nociceptores), medula espinhal (interneurônios, neurônios de projeção), tronco cerebral, mesencéfalo e córtex. Todos os receptores de opióides acoplam-se às proteínas G (principalmente Gi / Go) e subsequentemente inibem a adenilil ciclase, diminuem a condutância dos canais de Ca^{+2} dependente de voltagem e / ou abertura de canais específicos de K^{+} (STEIN, 2013).

O cloridrato de naloxona, é um antagonista de não seletivo dos receptores opiáceos amplamente utilizado para a reversão da depressão cardiovascular e respiratória associada a uma possível sobredose de narcóticos. Seu mecanismo de ação envolve deslocamento de opiáceos de receptores locais no SNC e trato gastrointestinal (IMBELONI, 1989). Na avaliação do sistema opioide na ação antinociceptiva do óxido de rosa, os animais foram pré-tratados com a naloxona, para se observar ou não a alteração do tempo de lambedura dos animais. Como descrito nos resultados, a naloxona não foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo do óxido de rosa, mostrando que a via opioide não está relacionada com a atividade farmacológica da mesma. Tal resultado, se assemelha ao dos monoterpenos citronelila (RIOS, 2014) e nerolidol (FONSECA et.al, 2016). Em adição, estudos realizados com o óleo essencial de *Piper aleyreanum* C.DC, que tem o monoterpeno β -pinene um de seus componentes majoritários, relatou que o efeito antinociceptivo do mesmo não pode ser bloqueado pela naloxona (LIMA, et. al, 2012).

O segundo mecanismo a ser investigado, foi a participação do óxido nítrico no efeito antinociceptivo do óxido de rosa. O óxido nítrico (NO) é derivado da L-arginina pela ação de formas neuronais e não neuronais da enzima NO sintase (NOS). O óxido nítrico e suas enzimas estão envolvidos em muitos processos fisiológicos e fisiopatológicos. A produção de óxido nítrico por nNOS no SNC requer a Influxo de Ca^{+2} . Esse influxo é dependente da ativação dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA). O aumento nos níveis intracelulares de Ca^{+2} desencadeia uma cascata de eventos que incluem a ativação do nNOS, seguido pelo aumento na produção de NO. O principal receptor intracelular para NO é uma guanilil ciclase solúvel (GCs). A ativação da GCs pelo NO, resulta na conversão de guanosina trifosfato para o cGMP, sendo esse o segundo mensageiro (CURY, et al., 2011). O GMPc age diretamente ou através da ativação de proteínas quinases que fosforilam canais iônicos favorecendo

a deflagração de potenciais de ação que culminam na geração da dor (XU; PIEPER; TSENG, 1995; MONCADA; HIGGS, 1993).

Além do papel do óxido nítrico nas vias nociceptivas, várias linhas de evidência indicaram que o NO além de induzir a analgesia, também medeia o efeito antinociceptivo periférico e central de compostos analgésicos, como opióides, anti-inflamatórios não esteroidais e de produtos naturais (CURY, et al., 2011).

Na avaliação da participação do óxido nítrico, no efeito antinociceptivo do óxido de rosa, foi possível analisar que o L-NOARG, inibidor da enzima óxido nítrico sintase, reduziu significativamente o tempo de lambadura da pata, quando comparado ao veículo. A associação do L-NOARG + L-arginina, reverteu o efeito antinociceptivo do L-NOARG, quando comparado ao veículo. No entanto, a L-arginina, quando associada ao óxido de rosa, não foi capaz de reverter significativamente o efeito antinociceptivo do óxido de rosa. Tal resultado, mostra que a via L-arginina- óxido nítrico, não participa do efeito antinociceptivo do óxido de rosa.

Neurotransmissores inibitórios também podem estar envolvidos na antinocicepção, como o GABA, a serotonina, a dopamina e a adrenalina (MALCANGIO, M.; BOWERY, N.G., 1996). Com isso, foi avaliada a participação do sistema GABAérgico na ação antinociceptiva do óxido de rosa. O GABA foi firmemente estabelecido como o principal neurotransmissor inibitório no sistema nervoso central. A administração de agonistas de GABA_A parece interferir com a nocicepção, enquanto que o baclofeno agonista GABA_B pode induzir analgesia na coluna vertebral ou supra espinal (TATSUO et al., 1997).

Em condições saudáveis, os interneurônios GABAérgicos e glicinérgicos servem como “portas”, controlando a transmissão do sinal nociceptivo da periferia até o sistema nervoso central (ZEILHOFER; MOHLER; DI LIO, 2009). Estudos sugerem que um déficit na inibição mediada pelo neurotransmissor GABA na medula espinal está relacionado com o surgimento da dor de diversas origens (ZEILHOFER, 2008; ZEILHOFER; MOHLER; DI LIO, 2009).

Quanto a participação dos receptores GABA, foi relatado que os GABA_A participam da maioria das sinalizações GABAérgicas nos mamíferos (HELDWEIN, et al., 2012). Relatos na literatura têm sugerido o envolvimento do Receptor GABA_A na modulação da nocicepção central através do sistema inibitório descendente (TATSUO et al., 1997).

Devido a participação do sistema GABAérgico na modulação da dor, o presente trabalho avaliou a participação dos receptores GABA_A na antinocicepção mediada pelo óxido de rosa, através da utilização de um antagonista para esses receptores. O antagonista dos receptores GABA_A escolhido, foi a bicuculina (1m/Kg, i.p). A bicuculina é um potente antagonista dos receptores GABA_A em vertebrados. Atua competindo com o GABA, reconhecendo o mesmo sítio do receptor. É um fármaco convulsivante que reduz por diminuição da frequência de abertura e tempo, a abertura do canal para a entrada de cloro (Cl⁻) (DELOREY.; OLSEN, 1994; LUFT, 2003).

Como já foi descrito, o óxido de rosa foi capaz de diminuir o tempo de lambida da pata após a administração do glutamato, entretanto esse efeito foi revertido ao administrar a bicuculina. Esse resultado indica que o efeito antinociceptivo do óxido de rosa pode ser mediado pelos receptores GABA_A. A via GABAérgica, uma vez bloqueada pela bicuculina, pode provocar neuropatias, devido à perda da inibição mediada pelo receptor GABA no mecanismo nociceptivo (GREEN; DICKENSON, 1997; MALAN, et al., 2002; BASBAUM, et al., 2009). De fato, em roedores, a administração espinal de antagonistas dos receptores GABA (bicuculina) produz hipersensibilidade comportamental semelhante à observada após lesão periférica. Em adição, a lesão periférica leva a uma diminuição das correntes pós-sinápticas inibitórias nos neurónios dorsais de corno superficial (BASBAUM, et al., 2009). JOLIVALT e colab. (2008), mostraram que o uso da bicuculina, foi capaz de reduzir a alodinia mecânica em ratos diabéticos.

Os receptores GABA_A são substratos moleculares para a regulação de vigilância, ansiedade, tensão muscular, atividade epilética e funções de memória, o aumento da inibição sináptica rápida mediada por receptor GABA_A é a base para a farmacoterapia de vários distúrbios neurológicos e psiquiátricos (RUDOLPH; MOHLER,2004). No estudo realizado por ZEILHOFER e colab. (2009), foram utilizados roedores com receptores GABA_A nocauteados, em subunidades específicas, tornando assim os animais insensíveis ao diazepam, afim de identificar os subtipos do receptor GABA_A responsáveis por este efeito anti-hiperalgésico. Neste estudo foi observado que o efeito anti-hiperalgésico do diazepam, administrado pela via espinal é mediado por receptores GABA_A contendo uma subunidade $\alpha 2$ e (em menor extensão) por aqueles que contêm uma subunidade $\alpha 3$.

Com base no resultado obtido, podemos sugerir que o efeito antinociceptivo do óxido de rosa, pode estar diretamente relacionada com a via dos receptores GABA_A. Outras substâncias, pertencentes ao grupo dos monoterpenos, também tiveram seu mecanismo de ação associado ao sistema GABAérgico, como é o caso do nerolidol (FONSECA, et al., 2015), do isopulegol (SILVA et al., 2009).

Ainda na participação das vias inibitórias, avaliou-se a participação da via serotoninérgica no efeito antinociceptivo do óxido de rosa. Segundo MILLAN (1999), a serotonina pode exercer tantas ações anti- quanto pró- nociceptiva, dependendo do tipo de receptor ativado. A atividade antinociceptiva da serotonina ocorre no SNC, onde a mesma está diretamente relacionada com o processamento e a modulação da dor. Sua ação analgésica se dá quando liberada no corno dorsal da medula espinhal por estimulação da PAG (substância cinzenta periaquedutal), por meio da excitação dos interneurônios inibitórios resultando na inibição dos neurônios do corno dorsal, e conseqüentemente reduzindo a propagação da dor (SOMMER, 2004). As ações analgésicas da serotonina são relacionadas a ativação dos receptores 5-HT₁, 5-HT₂ e 5-HT₃. Por outro lado, a serotonina quando aplicada de forma exógena, estimula uma reação inflamatória composta por edema e ardor em seres humanos e ratos (DOAK; SAWYNOK, 1997). Como mediador endógeno de dor e inflamação, há abundantes reservas de serotonina em plaquetas e mastócitos, que podem ser liberadas após um estímulo lesivo. Os receptores serotoninérgicos envolvidos no processo nociceptivo e inflamatório são expressos em fibras aferentes primárias, neurônios de projeção e interneurônios, resultando em uma ação complexa da serotonina na transmissão da dor (ROMERO, et al., 2015).

No presente estudo, foram utilizadas a cetanserina, a ondansetrona e o pindolol, sendo esses, antagonistas dos receptores 5-HT_{2A}, 5-HT₃, e 5-HT_{1A/1B}, respectivamente. O resultado obtido nesse estudo mostra, que o efeito antinociceptivo do óxido de rosa pode estar relacionado com a via serotonina, mais precisamente com os receptores 5-HT_{1A/1B} e 5-HT_{2A}, mas não interferindo com a ligação no 5-HT₃. Essa hipótese é claramente suportada pelo fato de que o pré-tratamento dos animais com cetanserina ou pindolol aumentou o tempo de lambadura da pata dos animais tratados com o óxido de rosa.

Em estudos, onde foram utilizados vários modelos de dor inflamatória ou neuropática, foi mostrado que a administração sistêmica de um agonista altamente

seletivo do receptor 5-HT_{1A}, befiradol, diminuiu a condução da dor. No modelo de dor induzida por formalina, a administração sistêmica aguda de befiradol diminuiu o comportamento nociceptivo tanto para as fases precoce como tardia. Em ratos artríticos, a infusão crônica do mesmo agonista do receptor 5-HT_{1A} induziu, em dose dependente efeito anti-hiperalgésico (WU, et al.,2003; VIGUIER, et al., 2013). Por outro lado, NAKAI e seus colaboradores (2010), mostraram que a ativação do receptor 5-HT_{2A} também atenuou a dor do trigêmeo causada por tal lesão nervosa. Esses dados corroboram ainda mais com a hipótese de que o efeito antinociceptivo do óxido de rosa, tem a participação dos receptores 5-HT_{1A/1B} e 5-HT_{2A}, da via serotoninérgica. Outros monoterpenos como o linalol e o β-pinene tem suas ações relacionadas com a via serotoninérgica (GUZMÁN-GUTIERREZ, et al.,2015)

Uma vez que o tecido foi danificado mecanicamente ou por infecção, isquemia, crescimento tumoral ou um processo autoimune, múltiplos mediadores inflamatórios são liberados nas células danificadas. A resultante "sopa inflamatória" é rica em citocinas, fatores de crescimento, cininas, purinas, aminas, prostanóides e íons, incluindo prótons. Alguns mediadores inflamatórios ativam diretamente nociceptores, levando a propagação dor. Outros agem em conjunto para produzir uma sensibilização do sistema nervoso somatossensorial, que é característico da dor inflamatória, permitindo assim uma ativação mais fácil da via da dor (SCHOLZ; WOOLF,2002).

Os resultados apresentados por NONATO e colab. (2012), sugerem fortemente que o óxido de rosa possui atividade anti-inflamatória, onde essa está relacionada à sua capacidade de inibir IL-1β e a migração de leucócitos. Com base nos resultados descritos por NONATO e colab. (2012), decidimos avaliar o efeito antinociceptivo do óxido de rosa em modelos de hipernocicepção inflamatória induzida por vários agentes algogênicos, tais como carragenina e a PGE₂.

As carrageninas são galactanos sulfatados extraídas de algas vermelhas (*Gigartinales*, Rhodophyta) e são amplamente usadas nas indústrias como espessantes, gelificantes, suspensores, estabilizantes ou agentes de texturização. A maioria das algas carragenofitas produzem carrageninas híbridas (VAN DE VELDE, 2008; VILLANUEVA; HILLIOU; SOUSA-PINTO, 2009). A injeção de carragenina na pata traseira de ratos é um modelo comum para estudar inflamação e dor inflamatória. A carragenina causa edema, aumento do volume da pata e uma

sensação exacerbada aos estímulos térmicos e mecânicos, que é conhecida como hiperalgesia (NANTEL, et al., 1999).

A resposta inflamatória induzida pela carragenina é caracterizada por uma resposta bifásica com formação marcada de edema resultante da rápida produção de vários mediadores inflamatórios como histamina, serotonina e bradicinina (primeira fase; 60-90 minutos), que é posteriormente sustentada pela liberação de Prostaglandinas e óxido nítrico (segunda fase; 4-6 horas) com pico na 3 h, produzido por isoformas indutíveis de COX (COX₂) e óxido nítrico sintase (iNOS), respectivamente (SEIBERT et al., 1994; THOMAZZI, et al., 2010).

Nossos resultados da avaliação da hipersensibilidade mecânica (Randall-Sellito) mostraram que a indometacina, fármaco usado como controle positivo, produziu inibição da hiperalgesia inflamatória induzida por carragenina, com um aumento do limiar de retirada da pata, a partir da primeira hora e seu efeito perdurou constante até a sexta hora. Por outro lado, o óxido de rosa só foi capaz de aumentar o limiar de retirada da pata, a partir da terceira hora. Como, já mencionado, é na terceira hora após a injeção da carragenina, que ocorre o pico de liberação de prostaglandina, diante disso podemos sugerir que o óxido de rosa, possa interferir na produção, via COX, desse neurotransmissor, sendo esse um dos mecanismos contribuinte para o seu efeito antinociceptivo.

Os subtipos de prostaglandinas mais relevantes para o processo doloroso e inflamatório, são a PGD₂, PGE₂ e PGI₂, essas causam vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, potencializando o efeito da histamina e bradicinina sobre as vênulas pós-capilares, bem como a formação de edema e calor (KULINSKY, 2007).

Na hipernocicepção inflamatória aguda induzida diretamente por PGE₂, o óxido de rosa nas doses de 25 e 50 mg/kg, por v.o., foi capaz de aumentar o limiar de retirada da pata (g) quando comparado com o veículo, tal como dexametasona (fármaco de referência). O aumento do limiar de retirada da pata causado pelo óxido de rosa, iniciou a partir da primeira hora e se estendeu até a sexta hora. Portanto, a capacidade do óxido de rosa em interferir na hipernocicepção mediada por PGE₂, parece contribuir, pelo menos em parte, pela sua ação antinociceptiva. Os AINES, tem seu efeito antinociceptivo em decorrência da reversão da hiperalgesia induzida pela prostaglandina E₂ (PGE₂), ou seja, esses fármacos atuam por bloquear pontos na via de sinalização das PGE₂, e assim atenuar a dor inflamatória que é gerada em

parte pela sensibilização dos nociceptores provocada pelas prostaglandinas (ZARPELON, et al., 2013).

Os métodos que permitem estudar a resposta nociceptiva envolvem comportamento motor, seja o reflexo de retirada da cauda ou o ato de levantar ou lambe a pata estimulada, e podem sofrer a interferência de fármacos que promovam sedação, levando a uma deficiência da coordenação motora, fazendo com que as respostas não sejam necessariamente antinociceptivas. Com o intuito de detectar se o óxido de rosa altera a capacidade exploratória ou locomotora nos camundongos, foi realizado os testes do campo aberto e rota-rod.

O teste do campo foi descrito por Hall, em 1934, esse permite ao animal explorar um ambiente novo, sendo um teste bastante utilizado para descrever o comportamento dos animais numa situação nova, que possa gerar alguma reação de estresse. Um aumento da atividade locomotora do animal, representado por um maior número de cruzamentos do animal, no campo aberto, indica um efeito estimulante. Já uma diminuição do número de cruzamentos do animal, bem como do número de vezes que este se levanta verticalmente, pode indicar efeito sedativo (PRUT; BELZUNG, 2003).

Outro teste utilizado foi o teste do rota-rod, que avalia o efeito miorrelaxante e a integridade motora dos animais através da capacidade de o animal equilibrar-se sobre uma barra giratória. A importância, de se realizar esse teste, se dá pela possibilidade de descartar resultados falsos-positivos (MATTEI; FRANÇA, 2006). A interpretação do resultado do teste, consiste em que quanto mais tempo o animal permanecer na barra giratória, menor o efeito miorrelaxante ou de incoordenação motora (PULTRINI; GALINDO; COSTA, 2006).

No teste do campo aberto e do rota-rod, os animais tratados com o óxido de rosa (50 mg/kg) na maior dose utilizada nos protocolos, não apresentaram alteração na capacidade exploratória e na atividade locomotora, sendo semelhante aos animais que receberam somente o veículo, enquanto os animais tratados com o diazepam (benzodiazepínico), fármaco que causa relaxamento muscular, provocou diminuição da capacidade exploratória e da atividade locomotora dos animais.

Neste contexto, os resultados obtidos com o óxido de rosa confirmaram sua ação antinociceptiva com resultados promissores no tratamento da dor aguda, com boas perspectivas de aplicabilidade clínica por ser uma substância com baixo risco de toxicidade. Além disso, a não interferência na capacidade exploratória e na atividade

locomotora dos animais, no teste do campo aberto e rota rod, respectivamente, demonstra que o óxido de rosa exerce seu efeito antinociceptivo, sem alterar as habilidades motoras dos animais. Assim, novos estudos são necessários para elucidar ainda mais as ações farmacológicas do óxido de rosa, afim de que esse monoterpene possa vim a estar disponível como analgésico para a população.

CONCLUSÕES

6.0 CONCLUSÕES

O óxido de rosa:

- ✓ Não apresentou toxicidade quando administrado por via oral a dose de 2 g/Kg.
- ✓ Apresentou baixo potencial em causar lesões gástricas, quando comparado com a indometacina.
- ✓ Mostrou eficácia ao reduzir a nocicepção química induzida por capsaicina e glutamato, com efeito sistêmico e periférico.
- ✓ Possui ação antinociceptiva com possível envolvimento dos sistemas GABAérgico e serotoninérgico.
- ✓ Reduziu significativamente a hiperalgesia inflamatória induzida por carragenina, a partir da terceira hora, e pela PGE₂, em todas as horas, utilizando o método de compressão de pata Randall-Selitto, isso sugere que a ação anti-hiperalgésica do óxido de rosa apresenta inibição de mediadores inflamatórios e nociceptivos podendo agir diretamente sobre eles ou em seus receptores.
- ✓ Não foi capaz de alterar a capacidade exploratória e locomotora dos animais, nos testes campo aberto e rota-rod.

PERSPECTIVAS

7 PERSPECTIVAS

- ✓ Avaliar o efeito antinociceptivo do óxido de rosa em metodologia com estímulo nociceptivo térmico (placa quente) e químico com salina ácida e mentol;
- ✓ Avaliar outros possíveis mecanismos de ação da atividade antinociceptiva do óxido de rosa (sistema adrenérgico, muscarínico);
- ✓ Investigar a ação antinociceptiva do óxido de rosa em modelos de dor crônica e neuropática.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ALSTERS P. L, et al.. “Dark” singlet oxygenation of β -citronellol: a key step in the manufacture of rose oxide. **Org Process Res Dev**, v.14, p. 259-62, 2009.
- ANDRADE, S.C.; ARAUJO, A. G. R.; VILAR, M. J. P. Escola de Coluna: Revisão Histórica e Sua Aplicação na Lombalgia Crônica. **Rev Bras Reumatol**, v. 45, n. 4, p. 224-8, 2005.
- ANGELLOTTI, G. Terapia cognitiva-comportamental no tratamento da dor. São Paulo, **Casa do Psicólogo**, p. 37, 2007.
- BABU K. G. D, et al. Essential oil composition of Damask rose (*Rosa damascena* Mill.) distilled under different pressures and temperatures. **Flavour Fragr. J.**, v.17, p.136-40,2002.
- BAKKALI, F., et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.446-475, 2008.
- BALERIO, G. N.; RUBIO, M. C. Baclofen analgesia: involvement of the GABAergic system. **Pharmacological Research**, v. 46, n.3, 2002.
- BARBOSA, A. A. et al. Farmacoterapia adjuvante no tratamento. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, v. 21, n. 2, p. 112-120, 2008.
- BARDIN, L. The complex role of serotonin and 5-HT receptors in chronic pain. **Behav. Pharmacol.**, v. 22, p. 390–404, 2011.
- BARNES, N. M.; SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacology**, v. 38, p. 1083–1152, 1999.
- BARNES, P. J, PEDERSEN, S. Efficacy and safety of inhaled corticosteroids in asthma. **American review of respiratory disease** v.148, p.1–26.1993.
- BASBAUM, A. I., et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-284, 2009.
- BATISTA, P.A., et al. Evidence for the involvement of ionotropic glutamatergic receptors on the antinociceptive effect of (-)-linalool in mice. **Neuroscience letters**, v.440, p. 299-303, 2008.
- BEIRITH, A. et al. Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyrone in formalin, capsaicin and glutamate tests. Study of the mechanisms of action. **European Journal of Pharmacology**. v. 345, p. 233-245, 1998.
- BEIRITH, A.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. The role of neuropeptides and capsaicin-sensitive fibres in glutamate-induced nociception and paw oedema in mice. **Brain Research**, v. 969, p. 110–116, 2003.

LEITE, L.C.T.F. Avaliação da atividade antinociceptiva do óxido de rosa em roedores.

BEIRITH, A.; SANTOS, A. R. S; CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Research**, v. 924, p. 219–228, 2002.

BERGINK, V; VAN MEGEN, H. J. G. M; WESTENBERG, G. M. **Eur Neuropsychopharm**, v.14, p. 175-183, 2004.

BRITO, A, et al. Citronellol, a monoterpene alcohol, reduces nociceptive and inflammatory activities in rodents. **J Nat Med**, v. 66, p. 637–644, 2012.

BROADHURST, P.L. Emotionality and the Yerkes-Dodson Law. *Journal of Experimental Psychology*. V. 54, p. 345–352, 1957.

BUTTGEREIT, F.; BURMESTERG, G.R.; SIMON, L. S. Gastrointestinal Toxic Side Effects of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and Cyclooxygenase-2 Specific Inhibitors. **Am J Med.**, v. 110, n. 3A, p. 13–19,2001.

CAO, F., LE. Antinociceptive effects of systemic tanshinone IIA on visceral and somatic persistent nociception and pain hypersensitivity in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 124, p. 74–80, 2014.

CEGIELSKA-PERUN, K., et al. Modification of Morphine Analgesia by Venlafaxine in Diabetic Neuropathic Pain Mode. **Pharmacol Rep**, v. 64, n.5,p.1267-1275, 2012.

CHAGRAOUI, A. et al. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry To what extent is it possible to dissociate the anxiolytic and sedative / hypnotic properties of GABA A receptors modulators? **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 71, p. 189–202, 2016.

COUTAUX, A., et al. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, v.72, p.359-371, 2005.

CURY, Y., et al. Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. **Nitric Oxide**. v. 25, p. 243-254, 2011.

D' MELLO, R.; DICKENSON, A. H. Spinal cord mechanisms of pain. **British Journal of Anaesthesia** v. 101, n. 1, p. 8–16, 2008.

DA SILVA, M.S., et al. Alkaloid, flavonoids, and pentacyclic triterpenoids of *Maytenus obtusifolia* Mart. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, p. 500-503, 2008.

DE SOUSA, D. P. Analgesic-like activity of essential oils constituents. **Molecules**, v. 16, p. 2233–2252, 2011.

DE SOUSA, D. P. et al. Artigo Pharmacological effects of the monoterpene α , β - epoxy-carvone in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 170–175, 2007.

LEITE, L.C.T.F. Avaliação da atividade antinociceptiva do óxido de rosa em roedores.

DE SOUSA, D. P. NOBREGA, F. F.F; ALMEIDA, R.N. Influence of the Chirality of (R) - (Δ) - and (S) - (β) -carvone in the Central Nervous System : A Comparative Study. **Chirality** v. 19, p. 264–268, 2007.

DELOREY, T.; OLSEN, R. GABA and Glycine. In: Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. 5 ed. Raven Press, New York, 1994.

DOAK, G. J.; SAWYNOK, J. Formalin induced nociceptive behavior and oedema: involvement of multiple peripheral 5-hydroxytryptamine receptor subtypes. **Neuroscience**, v. 80, p- 939-949, 1997.

DOGRUL, A.; SEYREK, M. Systemic morphine produce antinociception mediated by spinal 5-HT7, but not 5-HT1A and 5-HT2 receptors in the spinal cord. **Br J Pharmacol.**, v. 149, p. 498–505,2006.

ECKMANN, L., et al. Role of Intestinal Epithelial Cells in the Host Secretory Response to Infection by Invasive Bacteria. **J. Clin. Invest.**, v. 100, n. 2, p. 296–309, 1997.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 308-323, 2007.

ENNA, K. E. M. S. J. GABA Pharmacology: The Search for Analgesics. *Neurochem Res*, v. 39, p. 1948–1963, 2014.

FACHINI, J. B. et al. Interações entre plantas medicinais e varfarina. **Visão Acadêmica**, v. 16, n.1 p. 198–206, 2015.

FERNANDES, B. H.P; GOMES, C. R. G. Anatomic mechanisms and aspects of pain. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 4, n. 2, p. 237-246,2011.

FIOCCHI, C, Inflammatory bowel disease: dogmas and heresies, **Digestive Liver Disease**, v.34 p.306–311, 2002.

FONSECA, D. V., et al. Nerolidol exhibits antinociceptive and anti-inflammatory activity: involvement of the GABAergic system and proinflammatory cytokines. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 30, p. 14–22, 2016.

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

GELLER, M.; KRYMCHANTOWSKI A. V.; STEINBRUCH, M.; CUNHA, K. S.; RIBEIRO, M. G.; OLIVEIRA, L.; OZERI, D.; DAHER, J. P. L. Use of diclofenac in clinical practice: review of the therapeutic evidence and pharmacologic actions. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v. 10, n. 1, p. 29-38, 2012.

GOLD, M. S.; GEBHART, G. F. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. **Nature medicine**, v. 16, p. 1248–1257, 2010.

GRANADOS-SOTO, V., et al. Role of spinal 5-HT_{5A}, and 5-HT_{1A/1B/1D}, receptors in neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in rats. **Brain research**, v. 1662, p. 377-385, 2015.

GREEN, G. M.; DICKENSON, A. GABA-receptor control of the amplitude and duration of the neuronal responses to formalin in the rat spinal cord. **European Journal of Pain**, v. 1, p. 95–104, 1997.

GRUNENTHAL. [Em linha]. Disponível em: https://www.grunenthal.com/grt-web/Grunenthal_Portugal/Tratamento_da_Dor/Sobr_a_Dor/Os_tipos_de_dor/pt_PT/167000189.jsp. [Consultado em 22/06/2017].

GUGINSKI, G., et al. Mechanisms involved in the antinociception caused by ethanolic extract obtained from the leaves of *Melissa officinalis* (lemon balm) in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 93, p. 10-16, 2009.

GUIMARÃES, A. G. et al. Encapsulation of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano, with β -cyclodextrin, improves the pharmacological response on cancer pain experimental protocols. **Chemico-Biological Interactions**, v. 227, p. 69–76, 2015.

GUIMARÃES, A.G.; QUINTANS, J.S.S.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. Monoterpenes with Analgesic Activity — A Systematic Review. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. July 2011, p. 1–15, 2013.

GUIMARÃES, F. S. Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions. **Neuroscience and Behavioral Reviews**, v. 29, p. 1313-1322, 2005.

GUIMARES, A. G. et al. Bioassay-guided Evaluation of Antioxidant and Antinociceptive Activities of Carvacrol. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.107, p. 949–957, 2010.

GUTSTEIN, H. B., et al. Mu and Kappa opioid receptors in periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla. **Neuroreport**, v. 9, n. 8, p.1777-1781, 1998.

GUZMÁN-GUTIERREZ, S. L., et al. Linalool and β -pinene exert their antidepressant-like activity through the monoaminergic pathway. **Life Sciences**, v. 128, p. 24–29, 2015

HEINRICHER, M. M., et al. Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. **Brain research reviews**, v. 60, p. 214 – 225, 2009.

HELDWEIN, C.G. et al. Participation of the GABAergic system in the anesthetic effect of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown essential oil. **Braz J Med Biol Res [online]**, v.45, n.5, pp.436-443, 2012.

IMBELONI, L. E. Naloxona: Estado atual. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.39, n.2, 1989.

ISBN, C. et al. **Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals**.p. 196, 2009.

ITO, S.; OKUDA-ASHITAKA, E.; MINAMI, T. Central and peripheral roles of prostaglandins in pain and their interactions with novel neuropeptides nociceptin and nocistatin. **Neuroscience Research**, v. 41, p. 299-332, 2001.

JI, L.; XU, Z.; GAO, Y. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. **Nature Reviews/Drug Discovery**, v.13, p. 533-548, 2014.

JOLIVALT, C.G., et al. Allodynia and hyperalgesia in diabetic rats are mediated by GABA and depletion of spinal potassium-chloride co-transporters. **Pain.**, v. 140, n.1, p.48-57.

JONES, P. G.; DUNLOP, J. Targeting the cholinergic system as a therapeutic strategy for the treatment of pain. **Neuropharmacology**, v. 53, p. 197–206, 2007.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v.413, p. 203-210, 2001.

KUIATE, J.R; BESSIÉRE, J. M; ZOULO, P. H. A. Composition of the essential oils from three *Lagdera* Spp . from Cameroon. **Flavour Fragr. J** , V. 17, p. 105–108, 2002.

Kulinsky, V. I. Biochemical aspects of inflammation. **Biochemistry (Mosc).**, v. 72, n. 6, p. 595-607,2007.

KUMAR, S.; GUPTA, R.; KALEEM, A.; PANDEY, A. Mitigation of pain and anaesthetic drugs. **OA Anaesthetics**, v. 2, n.1, p. 1-14, 2014.

KUNER, R. Central mechanisms of pathological pain. **Nature medicine**, v. 16, n. 11, p. 1258–1266, 2010.

KUNISHIMA, N. et al. Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. **Nature**, v. 407, p. 971–977, 2000.

LAPA, J.A.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R. Mechanisms involved in the antinociception caused by ethanolic extract obtained from the leaves of *Melissa officinalis* (lemon balm) in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.93, p. 64-66, 2003.

LEESON, P. D. Glycine-site N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. In: Drug Design for Neuroscience. **New York: Raven Press**, p.339-381, 1993.

LEITE, M. P. et al. Behavioral effects of essential oil of *Citrus aurantium* L. inhalation in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 661–666, 2008.

LIMA, D. K. S. et al. Evaluation of the antinociceptive, anti-inflammatory and gastric antiulceractivities of the essential oil from *Piper aleyreanum* C.DC in rodents. **J. Ethnopharmacol**, v. 142, p. 274–282, 2012.

LIPSKY, P. E., et al. Unresolved issues in the role cyclooxygenase-2 in normal physiologic processes and disease. **Arch intern.**, v. 160, p. 913-920, 2000.

LEITE, L.C.T.F. Avaliação da atividade antinociceptiva do óxido de rosa em roedores.

LISBOA, L. V.; LISBOA, J. A. A.; SÁ, K. N. Pain relief as a way to legitimate human rights. **Rev Dor**, v. 17, n. 1, p. 57–60, 2016.

LOPES, L.S., et al. Antinociceptive effect of topiramate in models of acute pain and diabetic neuropathy in rodents. **Life Sciences**, v. 84, p. 105-110, 2009.

LORENZ, M.D.; COATES, J.R.; KENT, M. Pain. In: **Handbook of veterinary neurology**. 5 ed. Missouri: Elsevier Saunders, p. 413-431, 2011.

MA, W.; QUIRION, R. Does COX2-dependent PGE2 play a role in neuropathic pain ?. **Neuroscience Letters**, v. 437, p. 165–169, 2008.

MALAN, T. P. et al. Spinal GABA A and GABA B Receptor Pharmacology in a Rat Model of Neuropathic Pain. **Anesthesiology**, v.96, n. 5, p. 1161–1167, 2002.

MALCANGIO, M. Neuropharmacology Invited review GABA B receptors and pain. **Neuropharmacology**, p. 10–13, 2017.

MALCANGIO, M.; BOWERY, N. G. GABA and its receptors in the spinal cord. **Trends pharmacol. Sci.**, v.17, n. 12, p. 457-462, 1996.

MALONE, M. H. Pharmacological approaches to natural product, screening and evaluation. In: **New natural products and plant drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity**. Berlin : H. Wagner, Wolf Springer-Verlag, 1977.

MAMET, J.; LAZDUNSKI, M.; VOILLEY, N. How Nerve Growth Factor Drives Physiological and Inflammatory Expressions of Acid-sensing Ion Channel 3 in Sensory Neurons. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 278, n. 49, p. 48907–48913, 2003.

MANAYI, A. et al. Pharmacological Reports Natural terpenoids as a promising source for modulation of GABAergic system and treatment of neurological diseases. **Pharmacological Reports**, v. 68, n. 4, p. 671–679, 2016.

MATTEI, R., FRANCA, C. I. F. Testes gerais para confirmar a ação central: modelos animais em psicofarmacologia. In: ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: Fundamentos Práticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.138-42.

MCQUAY, H. Opioids in pain management. **Lancet**, v. 353, p. 2229-2232, 1999.

MEDEIROS, J. V. R. Riparin A, a compound from *Aniba riparia*, attenuate the inflammatory response by modulation of neutrophil migration. **Chemico-Biological Interactions**, v. 229, p. 55–63, 2015.

MELDRUM, B. S. Glutamate and Glutamine in the Brain Glutamate as a Neurotransmitter in the Brain : Review of Physiology and Pathology. **The journal of nutrition**, v. 8, p. 1007–1015, 2000.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, v. 66, p. 355–474, 2002.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. [Prog Neurobiol.](#), v. 57, n. 1, p. 1-164, 1999.

MONCADA, S.; PALMER, R. M; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews**. v. 43, n. 2,p. 109-42. 1991.

MOREIRA, M. R. C., et al. Neuroscience Letters Anxiolytic-like effects and mechanism of (-)-myrtenol : A monoterpene alcohol. **Neuroscience Letters**, v. 579, p. 119–124, 2014.

MURI, E. M. F, SPOSITO, M. M. M., METSAVAHT L. Anti-inflamatórios não-esteroidais e sua farmacologia local. **Acta Fisiatr.**, v.16, n. 4, p.186-90, 2009.

NAKAI, K., et al. 5-HT_{2C} receptor agonists attenuate pain-related behaviour in a rat model of trigeminal neuropathic pain. **European Journal of Pain**, v. 14, p. 999–1006, 2010.

NANTEL, M., et al. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 128, p. 853–859, 1999.

NOGUEIRA, C. W., et al. Serotonergic systems are implicated in antinociceptive effect of m-trifluoromethyl diphenyl diselenide in the mouse glutamate test, **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 125, p. 15–20, 2014.

NONATO, F. R. et al. Anti-inflammatory properties of rose oxide. **International Immunopharmacology**, v. 14, n. 4, p. 779–784, 2012.

OECD Guidelines for the testing of chemicals. 2001. OECD 423. **Acute Oral Toxicity- Acute Toxic Class Method**. Organization for economic Cooperation and Development. Paris.

OLIVEIRA, L. F.. Atualização em mecanismos e fisiopatologia da dor. In: PRIMER SIMPOSIO VIRTUAL DE DOLOR. Medicina Paliativa y Avances en Farmacologia del Dolor, nov./ dez. 2001. Anais... [S. I.]: [S. n.], 2001.

OLSON, H. et al. Concordance of the Toxicity of Pharmaceuticals in Humans and in Animals. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 32, p. 56–67, 2000.

PALAZZO, E.; ROSSI, F.; MAIONE, S. Role of TRPV1 receptors in descending modulation of pain. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.286, p.S79–S83, 2008.

PASSOS, C. S. et al. Terpenóides com atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 3, p. 140–149, 2009.

PASSOS, F.F.B., et al. Involvement of cholinergic and opioid system in γ -terpinene-mediated antinociception. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p.1-9, 2015.

PATAPOUTIAN, A.; TATE, S.; WOOLF, C. J. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. **Nature**, v. 8, p. 55-68, 2009.

PERAZZO, F. F. et al. Terpenoids and an aqueous extract obtained from *Croton cajucara*. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v. 17, n. 4, p. 521–528, 2007.

PERAZZO, F. F. et al. Effect of *Artemisia annua* L. leaves essential oil and ethanol extract on behavioral assays. **Rev. bras. farmacogn**, vol.18, suppl., pp.686-689, 2008.

PIETROVSKI, E. F., et al. Antinociceptive properties of the ethanolic extract and of the triterpene 3 β , 6 β , 16 β - trihidroxilup-20(29)-ene obtained from the flowers of *Combretum leprosum* in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 83, p. 90–99, 2006.

PINHO-RIBEIRO, F. A., et al. Naringenin reduces inflammatory pain in mice, **Neuropharmacology**, 2016.

PIRES, O.C., et al. Análise preliminar da toxicidade aguda e dose letal mediana (DL 50) comparativa entre os frutos de Pimenta-do-Reino do Brasil (*Schinus terebinthifolius* Raddi) e Pimenta do Reino (*Piper nigrum* L .). **Acta Farm. Bonaerense**, v. 23, n. 2, p. 176–182, 2004.

PODVIN, S.; YAKSH, T.; HOOK, V. The Emerging Role of Spinal Dynorphin in Chronic Pain : A Therapeutic Perspective. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* v. 56, p. 511–33, 2016.

PRUT, L. et al. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors : a review. **European Journal of Pharmacology** , v. 463, p. 3–33, 2003.

PULTRINI, A. D. E. M., GALINDO, L. A., COSTA, M. Effects of essential oils from *Citrus aurantium* L. in experimental anxiety models in mice. **Life Sci.**, v.78, n.15, p.1720–5, 2006.

QUINTAL, M. (2004). *Biblioteca da Dor: Dor Neuropática*. Lisboa, Permanyer Portugal, pp. 2-3.

QUINTANS-JÚNIOR, L.J., et al. Antinociceptive activity of citronellal in formalin-, capsaicin- and glutamate- induced orofacial nociception in rodents and its action on nerve excitability. **Journal of Orofacial Pain**, v. 24, p. 305–312, 2010.

RANDALL, L. O.; SELITTO, J. J. A method for measurement of analgesic activity of inflamed tissue. **Archives Internationales Pharmacodynamie et de Thérapie**, v. 111, p. 409 – 419, 1957.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops & Products**, v. 62, p. 250–264, 2014.

RIBEIRO, S. O., et al. Uso de Opióides no Tratamento da Dor Crônica. **Rev Bras Anestesiol** , v. 52, p. 644–651, 2002.

RIOS, E. R.V. Efeito antinociceptivo do acetato de citronelila: estudo dos possíveis mecanismos de ação. 2014. 115 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2014.

rodents. *J. Ethnopharmacol.* (2012) 142 274–282

ROGLER, G, Gastrointestinal and liver adverse effects of drugs used for treating IBD, **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology** v 24, (2), p.157–165, 2010.

RUDOLPH, U.; MOHLER, H. Analysis of GABAA receptor function and dissection of the pharmacology of benzodiazepines and general anesthetics. **Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 44, p. 475–98, 2004.

RUGGIERO, R. N. et al. Neurotransmissão glutamatérgica e plasticidade sináptica: aspectos moleculares, clínicos e filogenéticos. **Medicina**, v. 44, n. 2, p. 143–156, 2011.

SÁ, R. C. S.; ALMEIDA, R. N. Toxicidade Aguda in: ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 10, p. 124-130, 2006.

SAKURADA, T., et al. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. *Neuropharmacology*, v.31, p. 1279–1285, 1992.

SAKURADA, T.; MIZOGUCHI, H.; KUWAHATA, H.; KATSUYAMA, S.; KOMATSU, T.; MORRONE, L.A.; CORASANITI, M.T.; BAGETTA, G.; SAKURADA, S. Intraplantar injection of bergamot essential oil induces peripheral antinociception mediated by opioid mechanism. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 97, p. 436–443, 2011.

SALUM, A. M. C.; GARCIA, D.M.; SANCHES, M. Dor aguda e crônica: revisão narrativa da literatura. **Acta Paul Enferm.** v. 25, p. 150–154, 2012.

SANTOS, A.R.S., et al. Mechanisms involved in the antinociception caused by agmatine in mice. **Neuropharmacology**, v.48, p.1021–1034, 2005.

SCHAFER-KORTING, KLEUSER, B. M. AHMED, M, HOLTJE H. D. KORTING H. C. Glucocorticoids for human skin: new aspects of the mechanism of action **Skin Pharmacology Physiology**, v.18 p.103–114, 2005.

SCHESTATSKY, P. Definição, diagnóstico e tratamento da dor neuropática. *HCPA*. v.28, n.3, p. 177-187,2008.

SCHNAKERS, C. et al. What about Pain in Disorders of Consciousness ?. *The AAPS Journal*. v. 14, n. 3, 2012.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Can we conquer pain ? . **Nature**, v. 5, p. 1062-1067, 2002.

SEIBERT, K. et al. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. **Proc. Nati. Acad. Sci**, v. 91, p. 12013–12017, 1994.

SEIXAS, D., et al. Dor na esclerose múltipla: caracterização de uma população portuguesa de 85 doentes. **Acta Médica Portuguesa**, 22(3), p. 234, 2009.

SIEGHART, W. Allosteric Modulation of GABA_A Receptors via Multiple Drug-Binding Sites. **Advances in Pharmacology**, v.72,p. 53-96, 2015.

SILVA, R. O. et al. Evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive effects of myrtenol , a plant- derived monoterpene alcohol , in mice. **Flavour Fragr. J.**,v. 29, p. 184–192, 2014.

SILVA,M. I. G. et al. Effects of isopulegol on pentylentetrazol-induced convulsions in mice : Possible involvement of GABAergic system and antioxidant activity. **Fitoterapia**, v. 80, p. 506–513, 2009.

SLUKA, K. A.; WALSH, D. Transcutaneous electrical nerve stimulation: Basic science mechanisms and clinical effectiveness. **The Journal of Pain**, v. 4, p. 109– 121, 2003.

SOMMER, C. Serotonin in Pain and Analgesia. **Molecular Neurobiology**, v.30, p. 117-125, 2004.

SPOOREN, W. et al. Insight into the function of Group I and Group II metabotropic glutamate (mGlu) receptors: behavioural characterization and implications for the treatment of CNS disorders. **Behavioural Pharmacology**, v. 14, n. 4, p 257–277, 2003.

STEIN, C. Opioids, sensory systems and chronic pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 716, n. 1–3, p. 179-187, 2013.

ST-JACQUES, B.; MA, W. Peripheral prostaglandin E2 prolongs the sensitization of nociceptive dorsal root ganglion neurons possibly by facilitating the synthesis and anterograde axonal trafficking of EP4 receptors. **Experimental Neurology**, v. 261, p. 354–366, 2014.

SUZUKI, R. ; RYGH, L. J.; DICKENSON, A. H. Bad news from the brain: descending 5-HT pathways that control spinal pain processing. **Pharmacological Sciences**, v. 25, n. 12, 2004.

TAN, P. V et al. Teratogenic effects, acute and sub chronic toxicity of the leaf aqueous extract of *Ocimum suave* Wild (Lamiaceae) in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, p. 232–237, 2008.

TATSUO, M. A., et al. Hyperalgesic effect induced by barbiturates, midazolam and ethanol: pharmacological evidence for GABA-A receptor involvement. **Braz J Med Biol Res.**, v.30, n.2, p. 251-6, 1997.

TEIXEIRA, M. J. et al. Epidemiologia clínica da dor músculo-esquelética. **Clinical epidemiology of musculoskeletal pain**. v. 80, p. 1–21, 2001.

TENORIO, G.; KULKARNI, A.; KERR, B. J. Resident glial cell activation in response to perispinal inflammation leads to acute changes in nociceptive sensitivity: Implications for the generation of neuropathic pain. **Pain**, v. 154, n. 1, p. 71–81, 2013.

THOMAZZI, S. M. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Bowdichia virgilioides* (sucupira). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 451–456, 2010.
TRACEY, I.; MANTYH, P. W. The cerebral signature for pain perception and its modulation. **Neuron**, v. 55, n. 3, p. 377-391, 2007.

TRAYNELIS, S. F. et al. Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. **Pharmacol Ver.** v. 62, n. 3, p. 405–496, 2010.

VAN DE VELDE, F. Structure and function of hybrid carrageenans. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 727-734, 2008.

VASCONCELOS, T. H. C., et al. Estudo toxicológico pré-clínico agudo com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). **Rev. bras. farmacogn.**, v.17, n.4, pp.583-591,2007.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Quím. Nova [online]**, v.28, n.3, p. 519-528, 2005.

VERDOODT, F.; KJAER, S. K.; FRIIS, S. Maturitas Influence of aspirin and non-aspirin NSAID use on ovarian and endometrial cancer: Summary of epidemiologic evidence of cancer risk and prognosis. **Maturitas**, v. 100, p. 1–7, 2017.

VIGUIER, F. Multiple roles of serotonin in pain control mechanisms —Implications of 5-HT₇ and other 5-HT receptor types. **European Journal of Pharmacology**, v. 716, p. 8–16, 2013.

VILLANUEVA, R.D.; HILLIOU, L.; SOUSA-PINTO, I. Postharvest culture in the dark: an eco-friendly alternative to alkali treatment for enhancing the gel quality of kappa/iota-hybrid carrageenan from *Chondrus crispus* (Gigartinales Rhodophyta). **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2633-2638, 2009.

VITOR, A. O., et al. Psicofisiologia da dor: uma revisão bibliográfica. – **R. Eletr. de Com. Inf. Inov. Saúde**, v.2, n.1, p.87-96, 2008.

WHITTAKER, A. L.; HOWARTH, G. S. Use of spontaneous behaviour measures to assess pain in laboratory rats and mice: How are we progressing?? **Applied Animal Behaviour Science**, v. 151, p. 1–12, 2014.

WOOLF, C.J. Central sensitization: Implications for the diagnosis and treatment of pain, **PAIN**, v. 152, n. 3, p. S2-S15. 2011.

WOOLF, C.J. What is this thing called pain? **The Journal of clinical investigation**, v. 120, p.3742-3744, 2010

LEITE, L.C.T.F. Avaliação da atividade antinociceptiva do óxido de rosa em roedores.

WU, W., et al. The very-high-efficacy 5-HT_{1A} receptor agonist, F 13640, preempts the development of allodynia-like behaviors in rats with spinal cord injury. **European Journal of Pharmacology**, v.478, p. 131– 137, 2003.

XU, J. Y.; PIEPER, G. M.; TSENG, L. F. Activation of a NO-cyclic GMP system by NO donors potentiates beta-endorphin-induced antinociception in the mouse. **Pain**. v. 63, n. 3, p. 377–383, 1995.

ZARPELON, A. C. et al. IL-33 / ST2 signalling innate inflammation and inflammatory pain: role of cytokines, endothelin-1 and prostaglandin E₂. **British Journal of Pharmacology**, v. 169, p. 90–101, 2013.

ZEILHOFER, H. U. Loss of glycinergic and GABAergic inhibition in chronic pain — contributions of inflammation and microglia. **International Immunopharmacology**, v. 8, p. 182–187, 2008.

ZEILHOFER, H. U. Prostanoids in nociception and pain. **Biochemical Pharmacology**, v.73, n.2, p.165–174, 2007.

ZEILHOFER, H. U.; MO, H.; LIO, A. DI. GABAergic analgesia: new insights from mutant mice and subtype-selective agonists. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 30, n.8, p. 397-402, 2009.

ZHU, S.; GOUAUX, E. Neuropharmacology Structure and symmetry inform gating principles of ionotropic glutamate receptors. **Neuropharmacology**, v. 112, p. 11–15, 2017.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v.16, p.109–110, 1983.