



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



**POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO DO ISOPULEGOL E  
POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO EM ROEDORES**

**DEYNA FRANCÉLIA ANDRADE PRÓSPERO**

**Teresina – PI**

**2016**

**DEYNA FRANCÉLIA ANDRADE PRÓSPERO**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO  
DO ISOPULEGOL EM ROEDORES**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Regina de Castro Almeida.

**Teresina – PI**

**2016**

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco  
Serviço de Processamento Técnico

P966a Próspero, Deyna Francélia Andrade.  
Avaliação do potencial antinociceptivo e anti-inflamatório do  
isopulegol em roedores / Deyna Francélia Andrade Próspero. –  
2016.  
108 f.

Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Farmacologia,  
Universidade Federal do Piauí, 2016.

“Orientação: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Regina de Castro  
Almeida”.

1. Isopulegol. 2. Monoterpeno. 3. Antinocicepção. 4.  
Atividade Anti-inflamatória. I. Título.

CDD 615.1

**DEYNA FRANCÉLIA ANDRADE PRÓSPERO**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO  
DO ISOPULEGOL EM ROEDORES**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Regina de Castro Almeida.

**EXAMINADA EM** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Fernanda Regina de Castro Almeida**  
**(Orientadora)**

**Universidade Federal do Piauí**

---

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

**Universidade Federal do Piauí**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria das Graças Freire de Medeiros Carvalho**  
**(Membro Externo ao programa)**

**Universidade Federal do Piauí**

*Dedicatória*

---

*A Deus, que me permitiu alcançar mais essa conquista.  
Aos meus pais, Francisco (in memoriam) e Maria do Carmo,  
minhas referências de vida.  
Ao meu filho Victor Kidner, pelo amor e compreensão. Você enche  
os meus dias de alegria e ao meu esposo Kidner pelo carinho e  
incentivo. Não teria conseguido sem vocês, obrigada.  
E a todos que contribuíram de alguma forma para a realização  
deste trabalho.*

*Agradecimientos*

---

## AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, por todas as bênçãos recebidas, por ser meu socorro bem presente nas horas de angústias e pela força para superar as dificuldades que surgiram ao longo do desenvolvimento desse trabalho, a honra e glória são para Ele;

Aos meus pais Francisco, (*in memoriam*) e Maria do Carmo e meu irmão Moisés pelo amor e companheirismo. Agradeço em especial à minha mãe pelas palavras de incentivo e por toda sua dedicação em me ajudar sempre em tudo;

Ao meu querido filho Victor Kidner, por me fazer tão feliz simplesmente por existir, pela paciência nos momentos em que estive ausente ou que tive que trazê-lo para dentro do laboratório e ficar até tarde esperando a mamãe terminar os experimentos, meu parceirinho de sempre!

Ao meu esposo Kidner, por ter permanecido ao meu lado, me incentivando a percorrer este caminho que, com muito carinho e apoio, não mediu esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida;

Aos meus sogros Aminadabe e Joemi, e as minhas cunhadas Naira e Neila pelo apoio constante e pelas palavras de força;

À minha orientadora Professora Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida, pela confiança depositada em mim e pelo imenso aprendizado;

Aos amigos do Laboratório pela valiosa ajuda e pelos momentos de descontração e companheirismo na realização dos experimentos;

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 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - **CAPES** pela concessão da bolsa durante o período de realização deste mestrado; À Universidade Federal do Piauí, pelo subsídio à realização deste trabalho, aliado a seu potencial científico e tecnológico;

Enfim, agradeço a todos que de certa forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*Deyna Francélia Andrade Próspero.*



*Epígrafe*

---

---

*Minha energia é o desafio,  
minha motivação é o impossível,  
e é por isso que eu preciso  
ser, à força e a esmo, inabalável.*

*(Augusto Branco)*

*RESUMO*

---

---

**Avaliação do potencial antinociceptivo e anti-inflamatório do isopulegol em roedores.** PRÓSPERO, D. F. A. Pós-graduação em farmacologia. Dissertação de mestrado, NPPM/CCS/UFPI (2016).

## RESUMO

O isopulegol (ISO) (p-Menth-8-en-3-ol) é um monoterpeno álcool, presente em óleos essenciais de várias plantas aromáticas, como *Corymbia citriodora* H.; *Zanthoxylum schinifolium* L. e *Melissa officinalis* L., essas plantas são utilizadas na medicina popular como antiespasmódica, curativo cirúrgico para feridas, sedativo/hipnótico, fortalecimento da memória e alívio da dor de cabeça induzida por estresse. Estudos anteriores mostraram que o isopulegol apresenta atividade ansiolítica, anticonvulsivante, gastroprotetora e antioxidante em roedores, mas até agora não existem estudos que comprovam atividade do isopulegol em modelos de nocicepção e na inflamação. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do ISO, bem como possíveis mecanismos de ação envolvidos nos efeitos observados em roedores. Foram utilizados camundongos Swiss machos e fêmeas (20-35 g, n = 5-8) e ratos Wistar fêmeas (180-250 g, n = 5-8). Para avaliar a atividade antinociceptiva do ISO foram realizados os testes de nocicepção induzida por formalina, capsaicina e glutamato, no modelo de lambertura de pata, seguidos da investigação do envolvimento dos mecanismos opióides, canais de  $K^+_{ATP}$ , muscarínicos, L-arginina-óxido-nítrico e  $GMP_c$ . Foi avaliado também a hiperalgesia induzida por carragenina e prostaglandina  $E_2$  usando o modelo de compressão da pata de ratas (Randall-Selitto). Na investigação da atividade anti-inflamatória foram estudados o efeito antiedematogênico do ISO sobre edema de pata induzido por carragenina, dextrana e  $PGE_2$ , e sua ação sobre a migração de leucócitos nos modelos de bolsa de ar e peritonite induzida por carragenina em roedores. Nos modelos de nocicepção aguda, o ISO, por via oral, mostrou efeito antinociceptivo nos testes de formalina nas doses de 0,78 (\* $p < 0,05$ ) a 25 mg/kg (\*\* $p < 0,001$ ) na primeira fase e 1,56(\* $p < 0,05$ ) a 25(\*\* $p < 0,001$ ) mg/kg na segunda fase do teste; no teste de capsaicina nas doses de 1,56 a 12,5 mg/kg(\*\* $p < 0,001$ ) e glutamato nas doses de 3,12 a 6,25 mg/kg(\*\* $p < 0,001$ ) com efeito da dependente dose. A antinocicepção do isopulegol foi inibida na presença de naloxona (2 mg/kg, i.p.; \*\* $p < 0,001$ ), glibenclamida (3 mg/kg, i.p.; \*\* $p < 0,001$ ), atropina (1mg/kg, i.p.; \*\* $p < 0,001$ ), L-arginina (600 mg/kg, i.p.;  $p < 0,001$ ) e azul de metileno (20mg/kg, i.p.; \*\* $p < 0,01$ ). Na dor inflamatória, o ISO (6,25 e 12,5 mg/kg, v.o.) reduziu a hiperalgesia em modelos de hipernocicepção aguda (\*\* $p < 0,001$ ) induzida por carragenina, quando avaliado no teste de Randall-Selitto. O ISO também apresentou ação anti-hiperalgésica quando administrado por via intraplantar (40 e 80 $\mu$ g/pata, \*\* $p < 0,001$ ) na hiperalgesia induzida tanto por carragenina quanto por prostaglandina  $E_2$ . O ISO (12,5 mg/kg, v.o.) inibiu a formação de edema induzido por carragenina da 1<sup>a</sup> a 6<sup>a</sup> horas, \*\* $p < 0,001$ ; e atenuou o edema de pata induzido por dextrana, \*\* $p < 0,001$ ; e prostaglandina  $E_2$ , \*\* $p < 0,001$  comparado ao controle. Na avaliação da migração leucocitária induzida por carragenina em bolsa de ar, o ISO (6,25 e 12,5 mg/kg, v.o.) reduziu significativamente (\*\* $p < 0,001$ ) a migração de leucócitos para o local da injúria, assim como no modelo de peritonite. O ISO reduz \*\* $p < 0,001$ , a atividade da enzima MPO no exsudado da bolsa de ar induzida por carragenina. Os resultados sugerem que a ação antinociceptiva aguda do ISO envolva o sistema opióide via canais de  $K^+_{ATP}$ , participação de receptores muscarínicos, inibição de óxido nítrico e  $GMP_c$ . As ações, anti-inflamatória e anti-hiperalgésica, do ISO parecem estar relacionadas com a inibição da produção ou liberação de mediadores pró-inflamatórios e da migração de leucócitos.

**Palavras-chave:** Isopulegol. Monoterpeno. Antinocicepção. Atividade anti-inflamatória.

*ABSTRACT*

---

---

**Potential evaluation antinociceptive and anti-inflammatory of isopulegol in rodents.** PRÓSPERO, D. F. A. Post-Graduate Program in Pharmacology. Mastership Dissertation, NPPM/CCS/UFPI, (2016).

### ABSTRACT

The isopulegol (ISO) (p-Menth-8-en-3-ol) is a monoterpene alcohol, present in essential oils of various aromatic plants, as *Corymbia citriodora* H.; *Zanthoxylum schinifolium* L. and *Melissa officinalis* L., these plants are used in folk medicine as antispasmodic, surgical dressing for wounds, and sedative / hypnotic, strengthening memory and relieving headache induced by stress. Previous studies have shown that the isopulegol has anxiolytic activity, anticonvulsant, gastroprotective and antioxidant in rodents, but so far there are no studies showing activity of isopulegol in nociception models and inflammation. The aim of this study was to evaluate the analgesic effect and anti-inflammatory effects of ISO, as well as possible mechanisms involved in the effects observed in rodents. Swiss male and female mice were used (20-35 g, n=5-8) and female Wistar rats (180-250 g, n=5-8). To evaluate the ISO antinociceptive activity were performed the nociception induced by formalin test, capsaicin and glutamate in paw licking model, followed by investigation of the involvement of opioid mechanisms,  $K^+_{ATP}$  channels, muscarinic, L- arginine-nitric oxide and cGMP. It was also evaluated hyperalgesia induced by carrageenin and prostaglandin  $E_2$  using a compression model of the rat paw (Randall-Selitto). In the investigation of anti-inflammatory activity have been studied the antiedematogenic effect of ISO on paw edema induced by carrageenan, dextran and  $PGE_2$ , and its effect on the migration of leukocytes into the air pouch model and carrageenan-induced peritonitis in rodents. In models of acute nociception, ISO orally showed antinociceptive effect in the formalin test at doses of 0.78 (\* $p < 0.05$ ) at 25 mg/kg (\*\* $p < 0.001$ ) in the first phase and 1.56 (\* $p < 0.05$ ) 25 mg/kg (\*\* $p < 0.001$ ) during the second test phase; the capsaicin test at doses from 1.56 to 12.5 mg/kg (\*\* $p < 0.001$ ) and glutamate in doses from 3.12 to 6.25 mg/kg (\*\* $p < 0.001$ ) in effect dose dependent. The isopulegol of antinociception was inhibited in the presence of naloxone (2 mg/kg, i.p.; \*\* $p < 0.001$ ), glibenclamide (3 mg/kg, i.p.; \*\* $p < 0.001$ ), atropine (1mg/kg i.p.; \*\* $p < 0.001$ ), L-arginine (600 mg / kg, ip;  $p < 0.001$ ) and methylene blue (20 mg/kg, i.p.; \*\* $p < 0.01$ ). In inflammatory pain, ISO (6.25 and 12.5 mg/kg, p.o.) reduced the hyperalgesia in models of acute hyperalgesia (\*\* $p < 0.001$ ) induced by carrageenan, when measured in the Randall-Selitto test. ISO also showed anti-hyperalgesic action when administered by intraplantar route (40 and 80 $\mu$ g/paw, \*\* $p < 0.001$ ) in both hyperalgesia induced by carrageenan as prostaglandin  $E_2$ . The ISO (12.5 mg/kg, p.o.) inhibited edema formation induced by carrageenin 1st to 6th hours, \*\* $p < 0.001$ ; and attenuated paw edema induced by dextran, \*\* $p < 0.001$ ; and prostaglandin  $E_2$ , \*\* $p < 0.001$  compared to the control. In the evaluation of leukocyte migration induced by carrageenan air bag, ISO (6.25 and 12.5 mg/kg, p.o.) significantly (\*\* $p < 0.001$ ) the migration of leukocytes to the site of injury, as well as in peritonitis model. ISO reduces \*\* $p < 0.001$ , MPO enzyme activity in the air pouch exudate induced by carrageenan. The results suggest that acute antinociceptive ISO involves the opioid system via  $K^+_{ATP}$  channels, participation of muscarinic receptors, inhibiting nitric oxide and cGMP. ISO anti-inflammatory and antihyperalgesic actions appear to be related to inhibiting the production or release of pro-inflammatory mediators of leukocyte migration.

**Keywords:** Isopulegol. Monoterpene. Antinociceptive. Anti-inflammatory.

## *LISTA DE FIGURAS*

---

---

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 01:</b> Circuito principal de mediação da dor fisiológica.....	<b>30</b>
<b>FIGURA 02:</b> Bases celulares e moleculares da dor inflamatória.....	<b>34</b>
<b>FIGURA 03:</b> Estrutura molecular do monoterpene Isopulegol (ISO) e dose letal média para 50% dos animais (DL 50).....	<b>40</b>
<b>FIGURA 04:</b> Câmara de observação de acrílico espelhada usada nos testes formalina, capsaicina e glutamato.....	<b>47</b>
<b>FIGURA 05:</b> Teste de compressão da pata (Randall-Selitto).....	<b>50</b>
<b>FIGURA 06:</b> Efeito antinociceptivo do ISO na resposta nociceptiva induzida por formalina em camundongos. ....	<b>56</b>
<b>FIGURA 07:</b> Efeito do ISO na nocicepção induzida por capsaicina em camundongos.....	<b>57</b>
<b>FIGURA 08:</b> Efeito do ISO na nocicepção induzida por glutamato em camundongos...	<b>58</b>
<b>FIGURA 09:</b> Investigação do envolvimento dos receptores opióides no efeito antinociceptivo do ISO.....	<b>59</b>
<b>FIGURA 10:</b> Investigação do envolvimento dos canais de potássio, $K^+_{ATP}$ , no efeito antinociceptivo do ISO.....	<b>60</b>
<b>FIGURA 11:</b> Investigação do envolvimento dos receptores muscarínicos no efeito antinociceptivo do ISO.....	<b>61</b>
<b>FIGURA 12:</b> Investigação do envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico no efeito antinociceptivo do ISO.....	<b>62</b>



<b>FIGURA 13:</b> Investigação do envolvimento da via do $GMP_C$ no efeito antinociceptivo do ISO.....	<b>63</b>
<b>FIGURA 14:</b> Efeito da administração aguda do ISO por via oral sobre o limiar de retirada de pata de ratas Wistar com hiperalgesia mecânica induzida por carragenina....	<b>64</b>
<b>FIGURA 15:</b> Efeito da administração aguda do ISO por via intraplantar sobre o limiar de retirada de pata de ratas Wistar com hiperalgesia mecânica induzida por carragenina	<b>65</b>
<b>FIGURA 16:</b> Efeito da administração aguda do ISO por via intraplantar sobre o limiar de retirada de pata de ratas Wistar com hiperalgesia mecânica induzida por $PGE_2$ .....	<b>66</b>
<b>FIGURA 17:</b> Efeito do ISO sobre o edema de pata induzido por carragenina.....	<b>67</b>
<b>FIGURA 18:</b> Efeito do ISO sobre o edema de pata induzido por dextrana.....	<b>68</b>
<b>FIGURA 19:</b> Efeito do ISO sobre o edema de pata induzido por $PGE_2$ .....	<b>69</b>
<b>FIGURA 20:</b> Efeito da administração aguda do ISO sobre a migração de leucócitos total induzida por carragenina na bolsa de ar em ratas.....	<b>70</b>
<b>FIGURA 21:</b> Efeito da administração aguda do ISO sobre a migração de leucócitos polimorfonucleares na peritonite induzida por carragenina em camundongos.....	<b>71</b>
<b>FIGURA 22:</b> Efeito da administração aguda do ISO sobre a migração de leucócitos mononucleares na peritonite induzida por carragenina em camundongos.....	<b>72</b>
<b>FIGURA 23:</b> Efeito do ISO sobre a atividade da Mieloperoxidase (MPO) no exsudado de bolsa de ar induzida por carragenina.....	<b>73</b>

## *LISTA DE TABELAS*

---

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1:</b> Efeito do ISO sobre o edema de pata induzido por dextrana.....	<b>68</b>
<b>TABELA 2:</b> Efeito do ISO sobre o edema de pata induzido por PGE <sub>2</sub> .....	<b>69</b>
<b>TABELA 3:</b> Efeito da administração aguda do ISO sobre migração de leucócitos total induzida por carragenina na bolsa de ar.....	<b>70</b>
<b>TABELA 4:</b> Efeito da administração aguda do ISO sobre migração de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares na peritonite induzida por carragenina.....	<b>72</b>

## *LISTA DE ABREVIATURAS*

---

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	5-hidroxitriptamina (serotonina)
AINE	Anti-inflamatório não-esteróide
ATP	Adenosina Trifosfato
BK	Bradicinina
C3a	Sistema complemento C3a
C5a	Sistema complemento C5a
Ca <sup>+2</sup>	Cálcio
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CFMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CIPRO	Ciproheptadina
DEXA	Dexametasona
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
E.P.M.	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
GABA	Ácido gama-aminobutírico
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
i. pl.	Intraplantar
i.p.	Via intraperitoneal
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
IL-6	Interleucina 6
ISO	Isopulegol
INDO	Indometacina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
K <sup>+</sup>	Potássio
LPS	Lipopolissacarídeo
LTs	Leucotrienos
<i>M. butyricum</i>	<i>Mycobacterium butyricum</i>
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos

mg	Miligrama
MPO	Mieloperoxidase
NA	Noradrenalina
Na <sup>+</sup>	Sódio
NaNO <sub>2</sub>	Nitrito de sódio
NGF	Fator de crescimento neuronal
NKA	Neurocinina A
NKB	Neurocinina B
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronais
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NPPM	Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinas
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion superóxido
OH	Radical hidroxila
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAF	Fator de ativação plaquetário
PBS	Tampão fosfato salino
PGs	Prostaglandinas
PGI <sub>2</sub>	Prostaciclina
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PMN	Polimorfonucleares
r.p.m.	Rotações por minuto
s.c.	Via subcutânea
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SP	Substância P
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
UFPI	Universidade Federal do Piauí
v. ipl.	Via intraplantar
v.o.	Via oral
$\mu$ g	Microgramas
$\mu$ L	Microlitros

## *SUMÁRIO*

---

---

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>27</b>
1.1 Considerações gerais sobre a Dor.....	27
1.2 Inflamação.....	32
1.3 Estresse Oxidativo.....	35
1.4 Óxido Nítrico.....	35
1.5 Mieloperoxidase.....	36
1.6 Tratamento farmacológico da dor e da inflamação.....	37
1.7 Produtos naturais e o monoterpene ISO.....	38
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
2.1 Objetivo Geral.....	43
2.2 Objetivos Específicos.....	43
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
3.1 Drogas e reagentes.....	45
3.2 Equipamentos.....	45
3.3 Obtenção do Isopulegol.....	45
3.4 Animais.....	45
<b>3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA.....</b>	<b>46</b>
3.5.1 Efeito do ISO no teste de formalina.....	46
3.5.2 Efeito do ISO no teste de capsaicina.....	46
3.5.3 Efeito do ISO no teste de glutamato.....	46
3.5.4 Investigação dos possíveis mecanismos de ação nociceptiva do ISO.....	47
3.5.4.1 Participação do sistema opióide no efeito antinociceptivo do ISO.....	47
3.5.4.2 Participação dos canais $K^+_{ATP}$ no efeito antinociceptivo do ISO.....	48
3.5.4.3 Participação da via muscarínica no efeito antinociceptivo do ISO.....	48
3.5.4.4 Participação da via L-arginina-NO no efeito antinociceptivo do ISO.....	48
3.5.4.5 Participação da via do $GMP_c$ no efeito antinociceptivo do ISO.....	49
3.5.6 Efeito do ISO na hiperalgesia inflamatória aguda induzida por carragenina.....	49
3.5.6.1 Efeito do tratamento do ISO por via oral na hiperalgesia aguda induzida por carragenina.....	49
3.5.6.2 Efeito do tratamento do ISO por via intraplantar na hiperalgesia aguda induzida por carragenina.....	50



3.5.7 Efeito do ISO na hiperalgesia inflamatória aguda induzida por PGE <sub>2</sub> .....	50
<b>3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA.....</b>	<b>51</b>
3.6.1 Efeito do ISO no edema de pata induzido por carragenina.....	51
3.6.2 Efeito do ISO no edema de pata induzido por dextrana.....	51
3.6.3 Efeito do ISO no edema de pata induzido por PGE <sub>2</sub> .....	51
3.6.4 Efeito do ISO na migração de leucócitos totais induzida por carragenina na bolsa de ar em ratas.....	52
3.6.5 Efeito do ISO na migração de leucócitos diferenciais em peritonite induzida por carragenina em camundongos.....	52
3.6.6 Efeito do ISO sobre a atividade da Mieloperoxidase (MPO) no exsudado de bolsa de ar subcutânea.....	52
3.7 Análise estatística.....	53
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>56</b>
<b>4.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA.....</b>	<b>56</b>
4.1.1 Efeito do ISO no teste de formalina.....	56
4.1.2 Efeito do ISO no teste de capsaicina.....	57
4.1.3 Efeito do ISO no teste de glutamato.....	58
4.1.4 Investigação dos possíveis mecanismos de ação nociceptiva do ISO.....	59
4.1.4.1 Participação do sistema opióide no efeito antinociceptivo do ISO.....	59
4.1.4.2 Participação dos canais K <sup>+</sup> <sub>ATP</sub> no efeito antinociceptivo do ISO.....	60
4.1.4.3 Participação da via muscarínica no efeito antinociceptivo do ISO.....	61
4.1.4.4 Participação da via L-arginina-NO no efeito antinociceptivo do ISO.....	62
4.1.4.5 Participação da via do GMP <sub>c</sub> no efeito antinociceptivo do ISO.....	63
4.1.5 Efeito do ISO na hiperalgesia inflamatória aguda induzida por carragenina.....	64
4.1.5.1 Efeito do ISO por via oral na hiperalgesia aguda induzida por carragenina.....	64
4.1.5.2 Efeito do ISO por via intraplantar na hiperalgesia aguda induzida por carragenina.....	65
4.1.6 Efeito do ISO na hiperalgesia inflamatória aguda induzida por PGE <sub>2</sub> .....	66
<b>4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA.....</b>	<b>67</b>
4.2.1 Efeito do ISO no edema de pata induzido por carragenina.....	67
4.2.2 Efeito do ISO no edema de pata induzido por dextrana.....	68
4.2.3 Efeito do ISO no edema de pata induzido por PGE <sub>2</sub> .....	69
4.2.4 Efeito do ISO na migração de leucócitos totais induzida por carragenina na bolsa	

de ar em ratas.....	70
4.2.5 Efeito do ISO na migração de leucócitos diferenciais em peritonite induzida por carragenina em camundongos.....	71
3.6.6 Efeito do ISO sobre a atividade da Mieloperoxidase (MPO) no exsudado de bolsa de ar subcutânea.....	73
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>75</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>87</b>
<b>7 PERSPECTIVA.....</b>	<b>89</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>91</b>

# *INTRODUÇÃO*

---

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Considerações gerais sobre a Dor

A dor pode ser entendida como um processo fisiológico e necessário, ela permite que o indivíduo tenha consciência de que sua integridade está sendo ameaçada ou que ocorre alguma disfunção em seu organismo. É uma experiência complexa e abrange componentes sensorial-discriminativo, afetivo-motivacional e cognitivo-emocional mediada por diferentes mecanismos e processada em uma complexa rede neural (CAO et al., 2014; PINHO-RIBEIRO, et al., 2016).

De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) a dor é uma “experiência sensorial e emocional desagradável que está associada com lesões reais ou potenciais” (TRACEY; MANTYH, 2007). No sistema nociceptivo, os nociceptores são terminações nervosas capazes de traduzir um estímulo agressivo de natureza térmica, química ou mecânica. Este estímulo é transmitido até o sistema nervoso central e interpretado no córtex cerebral como dor (ROCHA et al., 2007; NETO, COSTA e SIQUEIRA, 2009).

A capacidade de detectar estímulos nocivos é essencial para a sobrevivência e bem-estar de um organismo. A dor sinaliza algum estímulo ou dano nas células, tecidos e órgãos através dos mais variados mecanismos de defesa. Seu papel protetor consiste em ações imediatas, que ocorrem devido ao reflexo de retirada, além de outras alterações internas neuronais, que se associam ao desconforto da sensação provocada, associado também à angústia emocional criada (GREGORY et al., 2013). No entanto, a dor também pode ser gerado por respostas inadaptadas do organismo, afetando as atividades diárias e qualidade de vida (PINHO-RIBEIRO, et al., 2016). Isto é ilustrado dramaticamente pelo exame de indivíduos que sofrem de anomalias congênitas que os tornam incapazes de detectar estímulos dolorosos. Essas pessoas não podem sentir dor penetrante de um objeto pontiagudo, o calor de uma chama, ou mesmo desconforto associado com lesões internas, como um osso quebrado. Como resultado, eles não desenvolvem comportamentos de proteção adequados contra essas condições, que muitas das quais podem ser fatais (BASBAUM, et al., 2009).

Clinicamente e experimentalmente faz-se necessária à distinção entre a dor percebida e a resposta ao dano tecidual ou nocicepção (KANDEL et al., 2000). Assim, o termo nocicepção é utilizado para diferenciar a percepção de estímulos nocivos da sensação de dor, propriamente dita. A nocicepção é a ativação de vias nociceptivas por estímulos nocivos ou desagradáveis (STEENBERGEN; BARDINE, 2014). As vias nociceptivas periféricas

recebem estímulos nocivos e convertem em sinais elétricos que são transmitidos até o sistema nervoso central e sinapse no corno dorsal da medula (WALKER, 2014).

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 nociceção e antinociceção para animais (JONES; DUNLOP, 2007).

A dor pode ser 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 (TURCK, 2001; GELLER, et. al., 2012). Com base na fisiopatologia, a dor é classificada em nociceptiva, neuropática e inflamatória. A dor nociceptiva tem origem quando há a estimulação persistente de nociceptores localizados na pele, vísceras e outros órgãos, é relacionada à lesão de tecidos ósseos, musculares ou ligamentares, representando um aviso precoce (MILLAN, 1999; BENNETT et al., 2006; WOOLF, 2010; FINE, 2012).

Na dor neuropática, lesões do sistema nervoso periférico ou central causam alterações neuroplásticas que resultam em sintomas e sinais característicos específicos desse tipo de dor (VELASCO, 2014). 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, 2014). Isto é resultado de duas diferentes condições: aumento da responsividade dos neurônios da medula espinhal (sensibilização central) ou diminuição do limiar de ativação dos receptores (sensibilização periférica) (JULIUS, BASBAUM, 2001).

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 pelo tecido lesionado (MAMET; LAZDUNSKI; VOILLEY, 2009, TENORIO; KULKARNI; ERR, 2013).

Outro parâmetro importante de classificação é a duração da sua manifestação, ela pode se apresentar nas formas transitória, aguda e crônica. Na dor transitória, a ativação dos nociceptores acontece na ausência de qualquer dano tecidual e contribui para proteger o organismo de potenciais danos físicos, causados pelo ambiente ou por estresse de tecidos corporais (BRENNAN et al., 2007). A dor aguda é uma resposta causada por uma lesão, caracterizando-se por ser de curta duração, desaparecendo, até mesmo, antes da cura do dano

tecidual. Além disso, a dor aguda é geralmente de fácil identificação e tratamento, possuindo também caráter protetor (LOESER; MELSACK, 1999; LIPMAN et al., 2010).

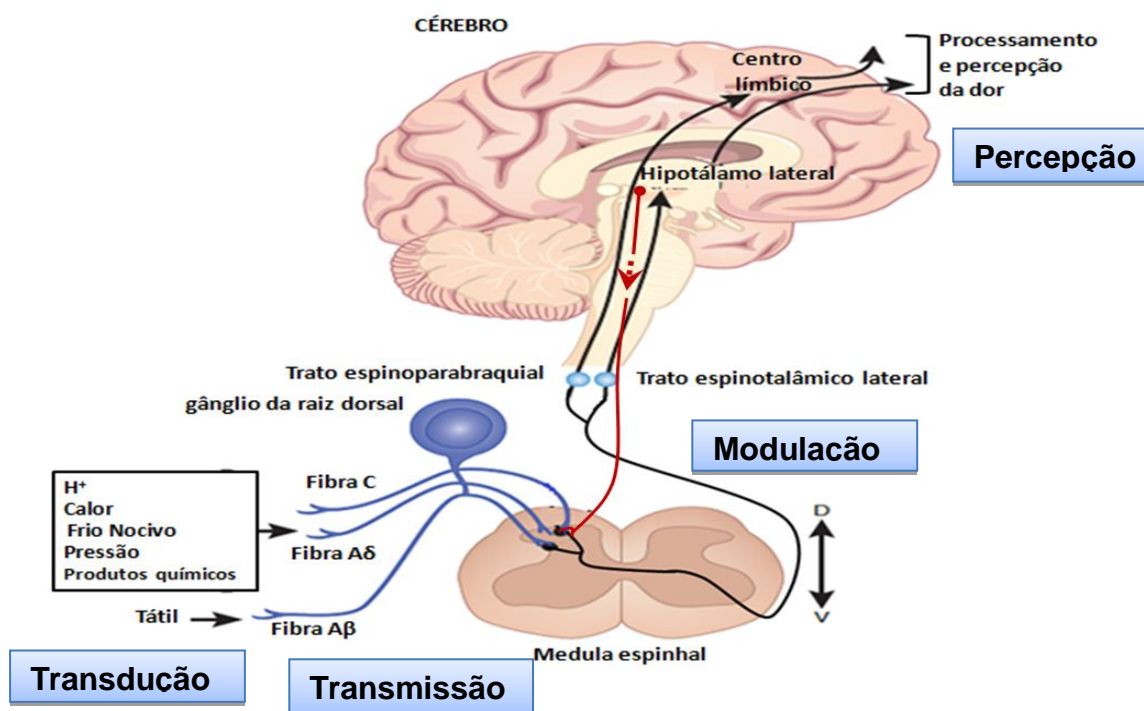
Já a dor crônica como a dor neuropática, é produzida pela disfunção ou lesão do Sistema Nervoso Periférico ou Central e pode persistir por dias, meses ou anos após a lesão nervosa (ZIMMERMANN, 2001; SOMERS; CLEMENTE, 2009). Parece existir uma semelhança funcional da persistente inflamação com lesão do nervo, o que leva a alterações na função ou constante estado de dor (PODVIN; YAKSH; HOOK, 2016). A dor crônica é a maior causa de incapacidade em todo o mundo e afeta não só a pessoa com dor, mas também pode ter um impacto negativo sobre as relações com os entes queridos (VOS et al., 2012; EDLUND et al., 2015).

A dor inflamatória pode ser classificada em aguda e hiperalgésica; a primeira decorre da ação de um estímulo nociceptivo clássico, ou de um mediador inflamatório, como a bradicinina (BK), que ativa os neurônios periféricos sensibilizados, esta sensibilização faz experiência de dor mais desagradável do que o habitual (FERREIRA et al., 2009), já a hiperalgesia é o resultado de alterações funcionais nos neurônios aferentes primários nociceptivos, por meio de mudanças metabotrópicas que facilitariam sua ativação levando a um aumento da resposta a estímulos nocivos térmicos e mecânicos, bem como alodinia (JI; XU; GAO, 2014).

Os nociceptores, presentes em quase todos os órgãos, são ativados ou sensibilizados por uma vasta gama de estímulos térmicos e mecânicos, bem como irritantes químicos ambientais ou endógenos que quando chegam ao sistema nervoso são detectadas e interpretadas (KANDEL et al., 2000; LAMONT et al., 2000; MARCHAND, 2008; BASBAUM et al., 2009; SCHAIBLE et al., 2011).

Para que esse processo inflamatório inicie, o estímulo nos receptores periféricos deve atingir determinado limiar nociceptivo, sugerindo a existência de determinadas propriedades biofísicas e moleculares que os capacitam a detectar seletivamente e responder aos estímulos potencialmente prejudiciais (BASBAUM et al., 2009). Ao atingir o limiar de ativação dos nociceptores, é deflagrado um potencial de ação ou impulso nociceptivo que é conduzido até o corno dorsal da medula espinhal pelos neurônios aferentes primários que conduzem o estímulo em diferentes velocidades, são as fibras A $\beta$ , A $\delta$  e C, muito mielinizadas, pouco mielinizadas e amielinizadas respectivamente. Esta sinapse é uma das etapas envolvidas no processo de percepção e modulação da dor segundo mostrado na **Figura 1** (SCHAIBLE; RITHER, 2004; COUTAUX et al., 2005).

**FIGURA 01:** Circuito principal de mediação da dor fisiológica. As setas azuis representam as fibras nervosas, as pretas representam o caminho realizado pelo estímulo elétrico até os centros nervosos superiores. A seta vermelha representa o mecanismo de modulação da dor caracterizado pela liberação de endorfinas.



**Fonte:** Adaptado de KUNER, 2010.

As fibras Aβ, bastante mielinizada, apresentam condução nervosa mais rápida dentre as envolvidas com o processo nociceptivo e de diâmetro grande. Detectam estímulos inócuos aplicados à pele, músculos e articulações. As fibras Aδ são responsáveis por mediar a dor rápida e bem localizada e respondem a estímulos mecânicos, químicos e térmicos, elas exibem diâmetro pequeno e possuem baixa velocidade de condução, são classificadas em Tipo I e Tipo II de acordo com seu limiar térmico,  $\pm 45\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $\pm 53\text{ }^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. Já as fibras do tipo C apresentam baixo diâmetro e baixa velocidade de condução, responsáveis pela dor lenta e difusa, com sensação de queimação, que persiste após o estímulo nocivo ter cessado. Existe um grupo de fibras C, também chamadas fibras silenciosas, apresentam insensibilidade a estímulos mecânicos, mas não ao calor, ativas durante processos inflamatórios (JULIUS, 2001, GOLD; GEBHART, 2010; LIPMAN et al., 2010; SZALAI et al., 2014, BRAZ et al., 2014).

As fibras e os nociceptores participam do processo fisiológico da nocicepção que consiste em quatro etapas básicas: a transdução, transmissão, modulação e a percepção

(FERNANDES; GOMES, 2011). A *transdução* é a transformação do estímulo nocivo, que é detectado pelos nociceptores, em potenciais de ação que são transmitidos das fibras nervosas periféricas, nociceptores, para o SNC. Esse potencial de ação leva a uma resposta imediata da nocicepção com a liberação de substâncias algógenas, tais como histamina, prostaglandinas, leucotrienos, citocinas, substância P, bradicinina e adenosinas a partir do tecido lesado (MARCHAND, 2008; WOOLF, 2011; WALKER, 2014). A fase seguinte é a *transmissão* ou condução, processo pelo qual os impulsos são enviados através das fibras A $\delta$  e C dos aferentes periféricos a medula espinhal, onde as fibras fazem sinapses com os neurônios da substância cinzenta (SCHAIBLE; RICHTER, 2004; LORENZ; COATES; KENT, 2011;).

Terminada a transmissão, dá-se início a terceira fase que é a *modulação*, que é caracterizada pelas alterações que ocorrem no sistema nervoso em resposta a estímulos nócicos, inibindo de forma seletiva os sinais lesivos recebidos no corno dorsal da medula espinhal, gerando uma modificação da transmissão do sinal para centros superiores. Além de envolver outras estruturas do SNC, como os mecanismos excitatórios e inibitórios do tronco cerebral, sistema nervoso autônomo, e as estruturas corticais responsáveis pelos aspectos emocionais e cognitivos da percepção da dor (MARCHAND, 2008; 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).

Há também receptores que detectam sensações de frio e calor e nocicepção, onde se detecta estímulo doloroso mecânico, térmico ou químico. Estudos mostram que estes nociceptores são canais iônicos mais precisamente catiônicos de potencial transitório (TRPs), formados por proteínas. Existe um grande número de subtipos deles, cada um respondendo a um determinado tipo de estímulo, mas podendo um único subtipo responder a vários destes (KANDEL et al., 2000; JULIUS, 2013).

O receptor de potencial transitório vanilóide 1 (TRPV1), foi descrito como receptor polimodal ativado por três estímulos dolorosos; compostos vanilóides (capsaicina e resiniferatoxina), calor nocivo ( $>43^{\circ}\text{C}$ ) e pH baixo ( $<5.9$ ) (CATERINA et al., 1997; TOMINAGA et al., 1998). Após a identificação do canal TRPV1 em nociceptores, uma variedade de outros tipos de células, incluindo: os queratinócitos, as células endoteliais, os linfócitos, os macrófagos e as células de diferentes regiões do cérebro, também expressam o TRPV1 (FEIN, 2011).



Os receptores opióides também estão envolvidos na nocicepção, pois sua ativação resulta em potente analgesia via inibição da transmissão nociceptiva ascendente excitatória e ativação de sistemas de inibição descendente (STEIN; et al., 2003; STEIN, 2013). A redução nessa excitabilidade ocorre por meio da estimulação do NO e abertura de canais de potássio sensíveis a ATP ( $K^+_{ATP}$ ) (CUNHA et al., 2010). Geralmente esses canais são modulados por sinais fisiológicos como neurotransmissores ou segundos mensageiros, cujo mecanismo mais comumente envolvido, é a fosforilação e desfosforilação (JACKSON, 2005). Evidências apontam que o óxido nítrico (NO) é um dos principais responsáveis pela modulação desses canais, ele produz efeitos pro ou antinociceptivo dependendo do local ou do tipo de estímulo (CUNHA et al., 2010).

Além dos receptores citados anteriormente, os colinérgicos também estão envolvidos na nocicepção. A liberação de acetilcolina pela medula espinhal produz antinocicepção, assim agonistas muscarínicos e nicotínicos, bem como inibidores da colinesterase podem produzir analgesia, destacando um potencial terapêutico diferente para esses fármacos (DUTTARROY et al., 2002). Os anticolinesterásicos também intensificam e prolongam a atividade analgésica de muitas drogas, nas dores agudas, inflamatórias e neuropáticas (ZHANG et al., 2012).

É importante lembrar ainda sobre o papel das prostaglandinas (PGs), principalmente a prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). Esta substância formada a partir da biotransformação do ácido araquidônico apresenta uma importante função no processo de sensibilização de nociceptores. A participação das PGs é essencial para o processo de sensibilização periférica e atuam principalmente através de receptores EP1, EP3, EP4 e IP. Todos são ligados à proteína G e sua ativação aumenta a atividade de receptores como os TRPV1 facilitando assim o processo de despolarização de fibras sensitivas (ZEILHOFER, 2007).

## 1.2 Inflamação

A inflamação é caracterizada por cinco sinais, conhecidos como sinais cardinais da inflamação: dor, rubor, calor, edema e perda da função. Os sinais cardinais são resultados de uma vasoconstrição, seguida de uma vasodilatação reflexa. A transição de constrição para dilatação vascular é mediada por fatores derivados de mastócitos como leucotrienos (LTs), prostaglandinas (PGs) e, particularmente, a histamina e serotonina (5-HT) que contribuem para a vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (calor e rubor) (DORWARD et al., 2012), juntos esses processos provocam a redução do fluxo sanguíneo e exudação do plasma rico em proteínas para o espaço extravascular (eventos vasculares) esses eventos auxiliam na migração de leucócitos (eventos celulares), e contribuem para a formação do

edema, ocorre também a estimulação das terminações nervosas por mediadores (dor) e por último sobrevém à inibição do reflexo muscular, rompimento da estrutura do tecido (perda da função) (ALLER et al., 2007; LARSEN et al., 2009).

Durante o processo inflamatório as células do sistema imune são recrutadas para o local da injúria, principalmente, neutrófilos, monócitos e linfócitos T, através do sangue e aderem à parede dos vasos, extravasam e acumulam-se no local da lesão. O recrutamento se dá por moléculas de adesão em células endoteliais e por fatores quimioatraentes liberados durante a resposta inflamatória. Essas células imunes contribuem para a sensibilização nociceptiva periférica, liberando fatores solúveis e interagindo diretamente com nociceptores (FUHLBRIGGE; WEISHAUPT, 2007; REN, DUBNER, 2010; SADIK; KIM; LUSTER, 2011). Sendo cruciais para a gênese da hipernocicepção inflamatória, pois os mesmos estão envolvidos na produção de mediadores hipernociceptivos de ação direta como a PGE2 (VERRI et al., 2006).

O processo inflamatório é uma resposta primária do organismo a uma infecção ou lesão atuando na remoção do agente prejudicial ou antígeno além de promover a restauração da estrutura do tecido e a função fisiológica (ASHLEY; et al., 2012). A resposta inflamatória é composta por quatro componentes: indutores inflamatórios, receptores que detectam os indutores, mediadores inflamatórios que são liberados a partir da ativação dos receptores e tecidos alvos afetados pelos mediadores inflamatórios (MEDZHITOV, 2010).

Os agentes responsáveis pela injúria tecidual são detectados por macrófagos residentes do tecido lesado, que induzem uma resposta inflamatória e ativam os nociceptores, causando sensação de dor na área afetada (MEDZHITOV, 2010). A dor associada a processos inflamatórios é resultante de mudanças funcionais dos nociceptores (BATTAGLIA, 1988; RODRIGUEZ-VITA; LAWRENCE, 2010).

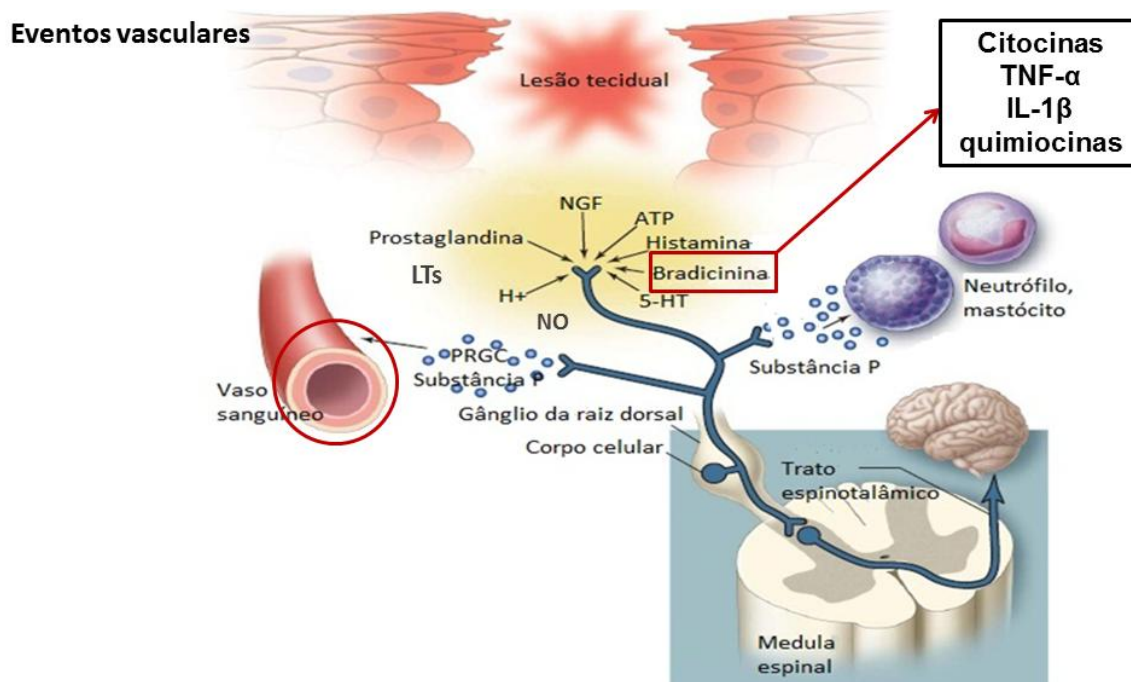
Em doenças inflamatórias, um dano tecidual leva a ativação de cascatas de sinalização que induzem a sensibilização central e hipersensibilidade aos estímulos dolorosos que frequentemente levam a síndromes de dor intensa e de longa duração em pacientes afetados. Tais síndromes de dor são caracterizadas por hiperalgesia, alodinia e a ocorrência de dor espontânea na ausência de qualquer entrada sensorial (XU et al., 2014; ZEILHOFER; Z., 2008; ZHAO; ZHANG; LI, 2015).

Após a lesão do tecido, as células lesionadas juntamente com as células do sistema imunológico são estimuladas a liberarem diversos mediadores químicos com superexpressão de RNAm de citocinas pró-inflamatórias tais como: interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) (LAUNAY, et al., 2016); quimiocinas, proteína quimiotática de

monócitos 1 (MCP-1), PGs e prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), bradicininas (BK), LTs, histamina, substância (SP), 5-HT, noradrenalina (NA), acetilcolina, adenosina trifosfato (ATP), fatores de crescimento do nervo (NGF), fator de ativação plaquetário (PAF), óxido nítrico (NO), íons (hidrogênio H<sup>+</sup> e potássio K<sup>+</sup>) e muitos outros. Os terminais periféricos nociceptivos expressam receptores para muitos desses mediadores inflamatórios (JENSEN; FINNERUP, 2009; LIEDTKE WB, 2007; NIETO et al., 2012).

Esses mediadores inflamatórios estimulam diretamente receptores nociceptivos (H<sup>+</sup>, ATP e serotonina) ou aumentando sua sensibilidade (PGs, LTs, BK e NGF) (DICKENSON, 1997; MILLAN, 2002; GUEDES et al., 2015). Eles também reduzem o limiar de ativação celular que leva a abertura direta dos canais de cálcio voltagem dependente (Ca<sup>2+</sup>) ou, ligando-se a receptores acoplados a proteína G na membrana celular que estimulam sistemas de segundos mensageiros, os quais resultam na ativação de proteínas quinases que tem a habilidade de fosforilar canais iônicos e receptores (ROCHA, 2011; NIETO et al., 2012;). Com a sensibilidade aumentada, os terminais periféricos dos nociceptores são fortemente ligados, respondendo com dor forte a estímulos que geralmente causariam dor leve, e sensações normalmente indolores, tais como calor ou pressão no local da inflamação agora provocam dor (**figura 2**) (LATREMOLIERE; WOOLF, 2009).

**FIGURA 02:** Bases celulares e moleculares da dor inflamatória. Adenosina trifosfato (ATP), fatores de crescimento do nervo (NGF), interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), leucotrienos (LTs), peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (PRGC).



Fonte: Adaptado de Medicinanenet.com e RIBEIRO, 2012.

No decorrer do processo inflamatório ocorre a interação entre as células do sistema imunológico com o sistema nervoso. Em resposta ao dano, as células residentes do sistema imunológico os mastócitos e os macrófagos são ativados imediatamente e liberam citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, efetores do sistema complemento (C3a e C5a) e vasodilatadores, incluindo aminas vasoativas e bradicinina (REN; DUBNER, 2010).

Quando o processo inflamatório não é controlado, um número excessivo de neutrófilos pode produzir grande quantidade de radicais livres, o que contribui para o estresse oxidativo, lesão dos tecidos e amplifica os danos (WENINGER; BIRO; JAIN, 2014). Dessa forma, uma grande variedade de fármacos são utilizados com a finalidade de impedir a migração celular como forma de amenizar o processo inflamatório (ULBRICH; ERIKSSON; LINDBOM, 2003).

### 1.3 Estresse Oxidativo

O desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e as defesas antioxidantes em favor da geração de oxidantes provoca o estresse oxidativo (TONON, 2012). As EROs são resultado do metabolismo celular normal dos organismos vivos. Em concentrações de baixas a moderadas funcionam em processos celulares fisiológicos, mas o excesso de EROs, como ocorre em processos inflamatórios, pode provocar danos aos componentes celulares, tais como lipídios, proteínas e o ácido desoxirribonucléico (DNA) (BINDOLI; RIGOBELLO, 2013).

As principais EROs com importância fisiológica são: o *ânion superóxido* ( $O_2^-$ ), durante condições de estresse oxidativo e processos inflamatórios, esse ânion é gerado a partir da óxido nítrico sintase (eNOS); o radical hidroxila ( $OH\bullet$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e intermediários reativos do oxigênio, cujo principal representante é o óxido nítrico (NO), que é degradado rapidamente por oxidases produzidas durante o estresse oxidativo (BIRBEN et al., 2012; BINDOLI; RIGOBELLO, 2013; LUNDBERG, et al., 2015).

### 1.4 Óxido Nítrico

Segundo Ignarro (1990), o Óxido Nítrico (NO) é uma molécula lipofílica pequena que se difunde rapidamente através da membrana celular e assim pode alcançar os compartimentos intracelulares de células adjacentes apresentando variadas funções. O radical livre NO tem uma vida curta e está envolvido em processos biológicos diversos. Atua como um mediador chave em diversas funções biológicas, como atividades microbicidas,

neurotransmissão, vasodilatação, resposta imune, agregação plaquetária (AKAIKE et al., 2010; BURKE et al., 2013) regula o tônus e a pressão sanguínea (IGNARRO et al., 1987, KUKONGVIRIYAPAN et al., 2014) a motilidade gástrica, a cicatrização de feridas, a respiração mitocondrial, apoptose e inflamação (LO FARO et al., 2014).

NO é gerado por uma grande variedade de células através de três isoformas da NO sintase (NOS). Todas as três isoformas utilizam a L-arginina de aminoácidos e oxigênio molecular em conjunto com vários co-factores, incluindo NADPH e tetrahidrobiopterina (BH4), gerando quantidades equimolares de NO e L-citrullina. A produção contínua de NO é realizada por dois tipos de NOS constitutivas, a NOS neuronal (nNOS) e a NOS endotelial (eNOS), que geram quantidades moderadas de NO, o qual está envolvido em vários processos fisiológicos (LO FARO et al., 2014; LUNDBERG, et al., 2015).

Uma terceira isoforma NOS, a NOS induzível (iNOS) que produz uma grande quantidade de NO. O NO produzido a partir da iNOS fisiologicamente pode apresentar função benéfica, quando sua indução ocorre por produtos bacterianos e várias citocinas, gera grandes quantidades de NO e, assim, contribui com o sistema imune inato ajudando no combate de bactérias, vírus e fungos (AKAIKE et al., 2010; BURKE et al., 2013; LUNDBERG, et al., 2015) ou danosa quando se envolve em processos patológicos de uma variedade de doenças humanas, tais como a artrite reumatóide (STEFANOVIC-RACIC et al., 1994), estados inflamatórios, incluindo aterosclerose (LUNDBERG, et al., 2015), diabetes, lúpus eritematoso sistêmico, choque séptico e carcinogênese (JAISWAL; LARUSSO; GORES, 2001).

Além do NOS, existem outras enzimas que atuam de forma a contribuir com o aumento ou diminuição do estresse oxidativo no decorrer do processo inflamatório: a mieloperoxidase (PATTERSON et al., 2014).

### **1.5 Mieloperoxidase**

A mieloperoxidase (MPO) é descrita como uma hemoproteína com propriedade pró-inflamatória importantes na defesa inata pela formação de oxidantes e espécies reativas de oxigênio, sintetizada durante a diferenciação mielóide, constitui o principal componente de grânulos azurófilos do neutrófilo e contribui para extravasamento de neutrófilos (LAU, et al., 2005).

É uma enzima presente em polimorfonucleares (PMN) que catalisa várias reações, contribuindo para a fisiopatologia de numerosas doenças inflamatórias sistêmicas (FAURSCHOU, BORREGAARD, 2003). A MPO é encontrada nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, pode ser liberada após a ativação dos leucócitos, nos fagossomo ou no espaço

extracelular. Quando liberada a MPO pode reagir com o peróxido de hidrogênio formado pela NADPH oxidase, e aumentar o potencial tóxico deste oxidante (KHALIL; PEPATO; BRUNETTI, 2008). O complexo hidroperóxido-MPO pode promover a oxidação de várias substâncias dentre elas o cloreto, a tirosina e o nitrito, favorecendo a formação de ácido hipocloroso, radicais tirosina, e outros intermediários reativos de nitrogênio, estes compostos formados favorecem o mecanismo de defesa contra micro-organismo e contribui para a propagação da inflamação e lesão/disfunção dos tecidos (PATTERSON et al., 2014).

Diante disso, sabemos que o processo inflamatório na maioria das vezes precisa ser controlado e esse controle é feito através do tratamento farmacológico que dispõe de uma vasta lista de fármacos que agem em diferentes rotas de mecanismos que levam a gênese da inflamação e culminam no aparecimento dos seus sinais.

### **1.6 Tratamento farmacológico da dor e da inflamação**

Mesmo sendo o mecanismo de nocicepção e inflamação indispensável à homeostase corpórea, o desconforto causado por essas respostas exige, em alguns casos, a intervenção com o uso de medicamentos. Diversas classes de fármacos são amplamente utilizadas para o alívio da dor e da inflamação, onde destacamos principalmente os agonistas dos receptores opióides, corticoides, os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) e outros fármacos adjuvantes (GRIFFIN; WOOLF, 2009; MESHRAM et al., 2015; RAHMAN; DICKENSON, 2014; SREEKEESON; MAHOMOODALLY, 2014).

Os AINEs apresentam ação analgésica, antitérmica e anti-inflamatória. Estes medicamentos agem inibindo as enzimas COX, com consequente diminuição da produção de prostaglandinas e combate a inflamação, a dor, a febre e inibição plaquetária (HILÁRIO, TERRERI e LEN, 2006; ARONSON, 2016). Fármacos anti-inflamatórios não-esteróides são geralmente utilizados como analgésicos no tratamento da dor aguda (CONAGHAN, 2013). Estudos descrevem uma série de efeitos adversos associados ao uso de AINES, dentre os efeitos mais reportados estão eventos cardiovasculares, toxicidade gastrointestinal e disfunção renal e hepática (BAIGENT et al., 2013; MCGETTIGAN; HENRY, 2013) esses efeitos estão relacionados com a dose e o tempo de uso, resultando em orientações que enfatizam o uso de AINEs na menor dose eficaz e pelo menor período de tempo (ODOM et al., 2014).

Os opióides são utilizados principalmente para o alívio da dor, ou analgesia, os quais podem modificar tanto os aspectos sensitivos quanto emocionais da dor (GRAEFF; GUIMARÃES, 2000). Produzem efeitos analgésicos potentes sem afetar outras modalidades

sensoriais como a visão ou toque. Entretanto, uso prolongado ou repetido de opióides pode levar a tolerância à droga e dependência (KAKOTI et al., 2013; YU, 2014).

Já os corticoides são bastante eficientes na redução do processo inflamatório, eles 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 ciclooxigenase (COX-2) (SCHAFER-KORTING, 2005; FIOCCH, 2002; 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).

Dentre as classes adjuvantes, os antidepressivos também são utilizados para controlar a dor, mais são associados a problemas como retenção urinária, boca seca, sedação e constipação e eventos cardíacos. Os anticonvulsivantes apresentam efeitos adversos como letargia, sonolência, tonturas e hipotonia (KATZ; BARKIN, 2010). Existem outros fármacos que podem modular a transmissão nociceptiva e controlar a dor, como os bloqueadores de canais de sódio, os neurolépticos, entre outros. No entanto, a eficácia desses fármacos é muito variável entre os indivíduos, assim como outros tratamentos complementares, por vezes pouco eficientes, como a estimulação elétrica dos nervos cutâneos, “biofeedback” e acupuntura (MACFARLANE et al., 1997).

Dessa forma, torna-se necessário a busca por novas alternativas terapêuticas para o tratamento da dor inflamatória. Nesse contexto, várias substâncias naturais têm sido estudadas por seu alto potencial para o tratamento de doenças inflamatórias estimulando a comunidade científica a realizar estudos e ensaios farmacológicos para investigar a possível ação dessas substâncias. Isso seria de grande valor terapêutico, sobretudo para países em desenvolvimento detentores de ricas biodiversidades (GOSSELL-WILLIAMS; SIMON; WEST, 2006)

### **1. 7 Produtos naturais e o monoterpeno isopulegol ( ISO)**

Os produtos naturais proporcionam uma fonte significativa de potenciais fármacos a partir da qual a humanidade tem identificado não apenas fitoterápicos e remédios de ervas, mas também, a maioria dos nossos antibióticos atuais e medicamentos anticânceres (NERIO, et al., 2010). Estudos etnofarmacológicos comprovam isso, mostrando que as pessoas nos até

em países mais desenvolvidos ainda dependem dos conhecimentos tradicionais sobre o uso de plantas medicinais para o tratamento de doenças (MENENDEZ-BACETA et al., 2014).

Muitas substâncias farmacologicamente ativas são encontradas nas plantas aromáticas, tornando-as importantes pela grande multiplicidade de espécies e principalmente pela produção de uma variedade de metabólitos secundários de natureza química diversa (PATRA et al., 2013; TULP; BOHLIN, 2004). Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias de baixo peso molecular extraídos de plantas aromáticas por destilação a vapor, arraste a vapor de água entre outros métodos (NGUEFACK et al., 2009). Interações complexas entre vários os componentes de óleos essenciais muitas vezes contribuem para o efeito farmacológico e os resultados terapêuticos (GUIMARÃES et al., 2010; GONÇALVES, 2012; PATRA et al., 2013).

Os monoterpenos são os principais constituintes químicos dos óleos essenciais de plantas e estes encontram-se na forma de misturas de componentes odoríferos que podem ser obtidos por destilação com vapor ou por extração por solvente em uma grande variedade de plantas (MARTINO et al., 2015). Trabalhos recentes demonstraram que os monoterpenos podem apresentar propriedades farmacológicas e biológicas importantes, incluindo atividades antibacteriana, antifúngica, anticancerígena, antimutagênica, antidiabética, antiviral, anti-inflamatória, antioxidantes, e analgésicas (MARTINO et al., 2015; RAUT; KARUPPAYIL, 2014; NERIO, et al., 2010; GUIMARÃES et al., 2015)

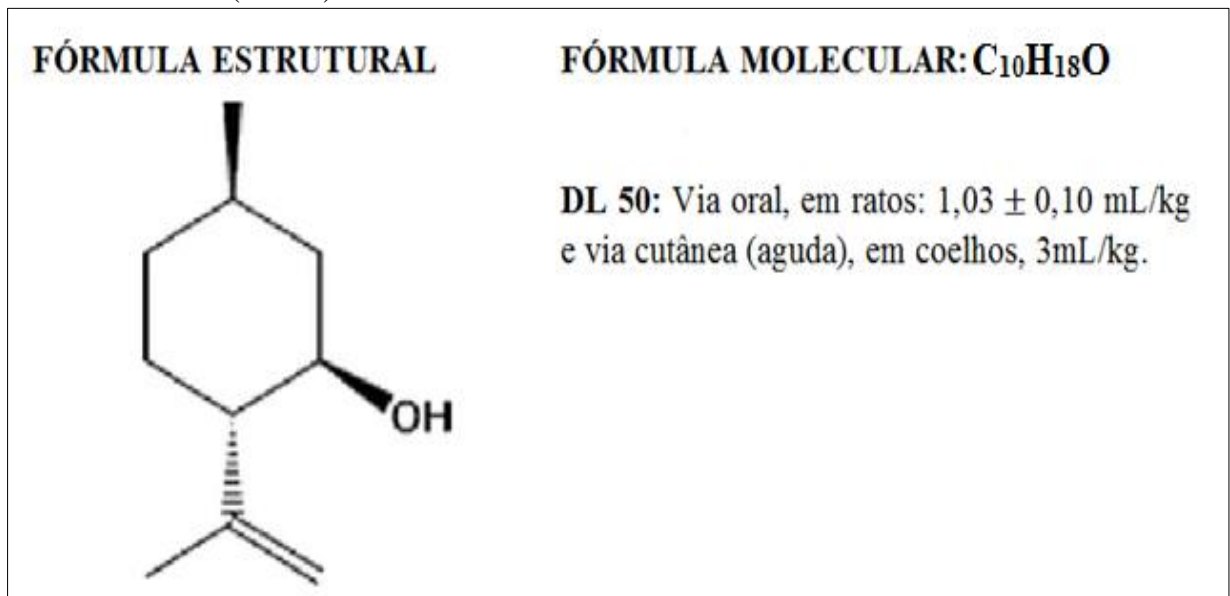
O isopulegol-(ISO) **Figura 3**, é um monoterpeno álcool monocíclico presente nos óleos essenciais de várias plantas, tais como *Corymbia citriodora* H. (eucalipto-cidró, eucalipto-limão ou eucalipto-cheiroso), da família Myrtaceae, é uma espécie caracterizada por produzir árvores de médio e grande porte, com distribuição natural nas regiões de clima temperado e subtropical do nordeste da Austrália. O epíteto específico *citriodora* deriva do latim *citriodorus*, que significa odor de limão (VERNIN et al. 2004), encontrado na *Zanthoxylum schinifolium* L., da família Rutaceae formada por cerca de 250 espécies de árvores e arbustos, nativas de zonas temperadas e subtropicais de todo o planeta (PAIK et al., 2005). A *Melissa officinalis* L. pertence à família Lamiaceae, também apresenta ISO em sua composição, é utilizada na medicina popular como antiespasmódica, curativo cirúrgico para feridas, sedativo/hipnótico, fortalecimento da memória e alívio da dor de cabeça induzida por estresse (VANE e BOTTING, 1995; SREELEKSHMI et al., 2007; BLUMENTHAL et al., 2000).

O ISO intermediário na preparação de (-) – mentol (SERRA et al., 2003), tem sido usado na fabricação de composições de fragrâncias com flores, como condimento alimentar



desde muito tempo sendo aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) para uso alimentar (21 CFR 121,1164), e incluído pelo Conselho da Europa (1974) na lista de substâncias aromatizantes artificiais que podem ser adicionados temporariamente aos géneros alimentícios sem perigo para a saúde pública, além disso o Food Chemicals Codex (1972) tem uma monografia sobre isopulegol, **Figura 03** (OPDYKE, 2013; LYNCH, 1971). Estudos descritos por Paik et al., (2005), demonstraram que o óleo essencial de *Z. schinifolium* L., que contém isopulegol como composto marjoritário, mostra-se capaz de induzir apoptose de células de hepatoma humano HepG2, o que sugere uma utilização plausível deste óleo como um agente anti-tumor na terapia do carcinoma hepatocelular.

**FIGURA 03:** Estrutura molecular do monoterpene Isopulegol (ISO) e dose letal média para 50% dos animais (DL 50).



**Fonte:** Adaptado de OPDYKE, 2013 e LYNCH, 1971.

Pesquisas também mostraram que o ISO apresentou efeito antioxidante e ansiolítico (SILVA et al.; 2007, **a**), anticonvulsivo e atividade sedativa em camundongos (SILVA et al., 2007, **b**), e atividade gastroprotetora (SILVA et al., 2009), que o autor sugere ser mediadas, pelo menos em parte, por prostaglandinas endógenas, envolvimento de canais K<sup>+</sup><sub>ATP</sub>, e propriedades antioxidantes.

Sabe-se que o citronelal é convertido por tratamento com ácido em isopulegol, a partir do qual uma mistura de mentol estereoisomérica é produzida por hidrogenação catalítica (CHUAH et al., 2001). O processo é utilizado comercialmente para complementar as fontes naturais de mentol (óleo de hortelã-pimenta), amplamente utilizado como um condimento e

em preparações medicinais (EASTMAN, KLUGER, 2015). Ensaio farmacológico mostraram que o citronelal apresenta atividades anti-inflamatória e antinociceptiva (MELO et al, 2010; QUINTANS-JÚNIOR, L. et al., 2010), sendo um indício de que o ISO também possa apresentar tais atividades.

Sabendo do potencial farmacológico dos monoterpenos e das atividades promissoras demonstradas pelo isopulegol como gastroproteção e ação no SNC, tendo em vista que não foram realizados trabalhos na área da dor e a necessidade de estudos que visem à 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 e anti-inflamatório do isopulegol em roedores.

## ***OBJETIVOS***

---

---

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral:**

Investigar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do isopulegol em roedores.

### **2.2 Objetivos Específicos:**

- ✓ Avaliar o efeito antinociceptivo do ISO em modelos de nocicepção química induzida por formalina, capsaicina e glutamato;
- ✓ Investigar possíveis mecanismos envolvidos na ação antinociceptiva evidenciada.
- ✓ Avaliar a ação do ISO na hipernocicepção inflamatória induzida por carragenina e PGE<sub>2</sub>, utilizando o método de compressão de pata Randall-Sellito;
- ✓ Pesquisar o efeito antiedematogênico do ISO em métodos de indução de edema de pata induzido por carragenina, dextrana e PGE<sub>2</sub>;
- ✓ Avaliar o efeito do ISO na migração de leucócitos induzida por carragenina na bolsa de ar e peritonite em roedores;
- ✓ Investigar o efeito do ISO sobre a atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) no exsudato inflamatório de animais tratados com ISO no modelo experimental de bolsa de ar em ratas;

## *MATERIAL E MÉTODOS*

---

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Fármacos e reagentes

Bicarbonato de Sódio, Carragenina tipo I, Capsaicina I, Ciproheptadina I, Dextrana, PGE<sub>2</sub>(Sigma, USA), Dexametasona (Decadron) (Galeno, Brasil); Formaldeído (Dinâmica, Brasil); Glibenclamida, Glutamato, Líquido de turk, Naloxana, Kits para determinação de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , NO, MPO e SOD, Tampão PBS, Atropina, Pilocarpina, azul de metileno, L-arginina, L-NOARG, Tween 80 (Sigma, USA); Isopulegol (LAPROBIO); Indometacina (Indocid<sup>®</sup>)(Galeno, Brasil); NaCl 0,9%, Solução de Turk (MERCK, Brasil); Tiopental sódico, Sulfato de morfina (Dimorf<sup>®</sup>) (Cristália, Brasil).

#### 3.2 Equipamentos

Analgesímetro (Randall-Sellito), Câmara de observação de acrílico espelhada, Paquímetro, Microscópio ótico (Insight equipamentos, Brasil); Balança digital (Plenna,USA); Balança analítica (Modelo-AR2140)(OHAUS,USA); Câmara de Neubauer (Optik Labor); Câmera digital SL605 12,1 MP 5 (Samsung, Brasil).

#### 3.3 Obtenção do Isopulegol

A substância isopulegol foi adquirida da Sigma, USA e fornecida pelo Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa, membro do Departamento de Ciências Farmacêuticas/UFPB.

#### 3.4 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos e 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  $22 \pm 1$  ° 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, 1986). Os estímulos

utilizados foram os mínimos necessários para demonstrar efeitos consistentes dos procedimentos empregados e dos tratamentos com drogas.

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, Camila Ernanda Sousa de Carvalho, CRMV N°. 1173. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPI (CEEA/UFPI N° 82/2014).

### **3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA**

#### **3.5.1 Efeito do ISO no teste de formalina**

Para avaliar se o ISO possui atividade antinociceptiva tanto na dor neurogênica quanto na dor inflamatória os camundongos foram divididos em grupos (n = 5) e tratados com isopulegol (0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5 e 25 mg/kg, v.o.) ou veículo (NaCl 0,9% + 5% de tween 80, v.o.) uma hora antes do teste. Morfina (5 mg/kg) foi administrada 30 minutos antes do teste por via subcutânea (s.c.) como controle positivo. Na pata traseira direita foi injetada formalina (20 µL, 2%) na região intraplantar. O animal foi colocado numa câmara de observação de acrílico espelhada para observação e quantificação da lambedura da pata durante 5 minutos (fase neurogênica) e de 15-30 minutos (fase inflamatória), para avaliar a nocicepção, **figura 4** (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

#### **3.5.2 Efeito do ISO no teste de capsaicina**

Para avaliar a ação nociceptiva do ISO na dor neurogênica os camundongos (n = 5) foram tratados com ISO (0,78; 1,56; 3,12; 6,25 e 12,5 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 lambedura da pata durante um período de 5 minutos na câmara de observação, **figura 4** (SAKURADA et al., 1992).

#### **3.5.3 Efeito do ISO no teste do glutamato**

Com o intuito de avaliar o papel do sistema glutamatérgico na atividade antinociceptiva do isopulegol, os camundongos (n = 5) receberam uma injeção de glutamato por via intraplantar, i.pl. (2 µmol/pata) 60 minutos após o tratamento com ISO por via oral

(1,56; 3,12 e 6,24 mg/kg) 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).

### 3.5.4 Investigação dos possíveis mecanismos de ação antinociceptiva do ISO

Para elucidar os mecanismos subjacentes antinociceptivos do ISO, camundongos foram pré-tratados intraperitonealmente no modelo de glutamato (n= 5-8) com naloxona (2 mg/kg) um antagonista não seletivo do receptor opióide; glibenclamida (3 mg/kg), um antagonista dos canais de  $K_{ATP}^+$ ; atropina (1 mg/kg), um antagonista dos receptores muscarínicos; azul de metileno (20 mg/kg) um inibidor da monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) e L-arginina (600 mg/kg), um substrato para a biossíntese de NO. As doses dessas drogas foram selecionadas de acordo com dados da literatura e estudos prévios do nosso laboratório.

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



Fonte: Arquivo pessoal.

#### 3.5.4.1 Participação do sistema opióide no efeito antinociceptivo do ISO

Com a finalidade de avaliar a influência do sistema opióide sobre o efeito antinociceptivo do ISO, grupos distintos de animais foram pré-tratados com o antagonista opióide não seletivo naloxona (2 mg/kg, i.p.), 20 min antes da administração do ISO (6,25



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 ISO 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 quantificando o tempo de lambertura da pata durante 15 min (BEIRITH et al., 2002).

#### **3.5.4.2 Participação dos canais de $K^+_{ATP}$ no efeito antinociceptivo do ISO**

Para a avaliação da participação dos canais de  $K^+_{ATP}$  no efeito antinociceptivo do ISO, os animais foram previamente tratados com glibenclamida (3 mg/kg, i.p.) e 20 minutos após, receberam o ISO (6,25 mg/kg, v.o.). Decorridos 60 minutos, os animais foram avaliados quanto à nocicepção (quantificando o tempo de lambertura da pata durante 15 min) induzida pela injeção intraplantar de 20 µL de solução de glutamato (20 µmol/pata). Os animais controle foram tratados com veículo (NaCl 0,9% + 5% de tween 80, v.o) (BEIRITH et al., 2002).

#### **3.5.4.3 Participação dos receptores muscarínicos no efeito antinociceptivo do ISO**

Somado a isso, avaliamos o envolvimento dos receptores muscarínicos, para tal pré-tratamos os camundongos com atropina (1 mg/kg, i.p.), e 20 minutos após isso, administramos ISO (6,25 mg/kg, v.o.) ou o agonista desses receptores, Pilocarpina (3 mg/kg, i.p.). Transcorridos 60 e 30 minutos após as administrações, injetamos por via intraplantar 20 µL de solução de glutamato (20 µmol/pata) e observamos a resposta nociceptiva, quantificando o tempo de lambertura da pata durante 15 min. Avaliamos ainda, a respostas dos animais as administrações apenas de atropina e pilocarpina (BEIRITH et al., 2002).

#### **3.5.4.4 Participação da via L-arginina-óxido nítrico no efeito antinociceptivo do ISO**

Para avaliarmos também a participação da via L-arginina - óxido nítrico no efeito antinociceptivo causado pelo ISO, 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 ISO (6,25 mg/kg, v.o.) e  $N^{\omega}$ -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 ISO e 30 min após o tratamento com L-NOARG, os animais foram avaliados quanto à nocicepção (quantificando o tempo de lambertura da pata durante 15 min) 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 et al., 2002).

### **3.5.4.5 Participação da via do Monofosfato cíclico de guanosina no efeito antinociceptivo do ISO**

Para verificar o envolvimento do Monofosfato cíclico de guanosina na antinocicepção causada pelo monoterpeno em estudo, os animais foram pré-tratados com o azul de metileno (20 mg/kg, i.p.), um inibidor do GMPc, 15 minutos antes da administração do ISO (6,25 mg/kg, v.o.). Além disso, alguns animais foram tratados apenas com ISO (6,25 mg/kg, v.o.) ou azul de metileno (20 mg/kg, i.p.). A resposta nociceptiva foi avaliada após 60 e 15 minutos dos tratamentos, através da injeção intraplantar de 20 µL de solução de glutamato (20 µmol/pata) e quantificado o tempo de lambertura da pata durante 15 min (BEIRITH et al., 2002)

### **3.5.6 Avaliação da hiperalgesia inflamatória induzida por carragenina**

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). Durante o teste, os animais (n=5) foram cuidadosamente contidos, 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 de carragenina. Neste teste foram realizados tratamentos com ISO por duas vias de administração, oral e intraplantar.

#### **3.5.6.1 Efeito do tratamento com ISO por via oral na hiperalgesia inflamatória induzida por carragenina**

As ratas foram tratadas com ISO (3,12; 6,25 e 12,5 mg/kg, v.o.), veículo (NaCl 0,9% + 5% 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 e avaliada após 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas da administração (RANDALL; SELITTO, 1957).

### 3.5.6.2 Efeito do tratamento com ISO por via intraplantar na hiperalgesia inflamatória induzida por carragenina

As ratas foram tratadas no dorso da pata direita com 100 $\mu$ L de ISO (20, 40 e 80  $\mu$ g/pata), veículo ou indometacina (36  $\mu$ g/pata), 30 minutos depois receberam o agente indutor de hipernocicepção, carragenina 1% (0,1mL), na região plantar da pata traseira direita e avaliada após 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas da administração (SYRIATOWICZ, et al, 1999) (RANDALL; SELITTO, 1957).

**Figura 05: Teste de compressão da pata (Randall-Selitto)** – a figura à esquerda mostra o aparelho Randall-Selitto. A figura à direita mostra a realização do teste quando uma força em gramas (g), de magnitude crescente, é aplicada continuamente sobre o dorso da pata traseira direita do animal.



Fonte: Arquivo pessoal.

### 3.5.7 Efeito do ISO na hiperalgesia inflamatória induzida por PGE<sub>2</sub>

Para avaliação da hiperalgesia inflamatória, foi utilizado o método de compressão mecânica na pata de ratas, Randall Selitto (**figura 5**). As medidas basais foram realizadas previamente à injeção de prostaglandina. As ratas (n=5) foram tratadas no dorso da pata direita com 100 $\mu$ L de ISO (20, 40 e 80  $\mu$ g/pata), veículo ou dexametasona (7,2  $\mu$ g/pata), 30 minutos depois receberam o agente indutor de hipernocicepção, 50 $\mu$ L de prostaglandina E<sub>2</sub> (1  $\mu$ g/mL), na região plantar da pata traseira direita e avaliada após 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas da administração (RANDALL; SELITTO, 1957).

### **3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA**

#### **3.6.1 Edema de pata induzido por carragenina**

Para avaliar se o ISO apresenta atividade antiedematogênica, testamos sua ação no edema de pata induzido por carragenina. Os camundongos foram divididos em grupos (n=5) e tratados por via oral com veículo, isopulegol (3,12; 6,25; 12,5 mg/kg, v.o) ou indometacina (10 mg/kg, v.o.) 60 minutos antes da administração intraplantar de carragenina (1%; 0,1 mL), na pata traseira direita região subplantar. Os volumes das patas foram medidos por paquímetro e expressos em mm tempo zero (t<sub>0</sub>) e após a aplicação de carragenina nos tempos 1, 2, 3, 4, e 5 h (WINTER et al., 1962).

#### **3.6.2 Edema de pata induzido por dextrana**

Dando prosseguimentos aos estudos, avaliamos também a ação do ISO no edema induzido por dextrana. Os camundongos (n=5) foram tratados por via oral com veículo, isopulegol (12,5 mg/kg) e ciproheptadina (10 mg/kg). Após 1 hora dos tratamentos os animais receberam uma aplicação de 0,05 mL/ por via i. pl. do veículo na pata esquerda e 0,05 mL de dextrana 1% dissolvida em salina 0,9% na pata direita, e 2 horas depois da indução com dextrana, os animais foram eutanasiados, ambas as patas traseiras foram cortadas ao nível da junção tíbio-tarsal e pesadas. O edema foi registrado com a diferença de peso entre as patas direita e esquerda de cada animal e expresso em miligramas para quantificação do tamanho do edema (WINTER et al., 1962).

#### **3.6.3 Edema de pata induzida por PGE<sub>2</sub>**

Foi avaliada também a atividade antiedematogênica do ISO no edema induzido por PGE<sub>2</sub>, para isso os camundongos (n=5) foram tratados por via oral com veículo, isopulegol (12,5 mg/kg) e ou dexametasona (0,5 mg/kg) (TUBARO, et al. 1985). Após 1 hora dos tratamentos os animais receberam uma aplicação de 0,05 mL/ por via i. pl. do veículo na pata esquerda e 0,05 mL de PGE<sub>2</sub> 1% dissolvida em salina 0,9% na pata direita, e 1 hora depois da indução com prostaglandina E<sub>2</sub>, os animais foram eutanasiados, ambas as patas traseiras foram cortadas ao nível da junção tíbio-tarsal e pesadas. O edema foi registrado com a diferença de peso entre as patas direita e esquerda de cada animal e expresso em miligramas para quantificação do tamanho do edema (WINTER et al., 1962).

### **3.6.4 Efeito do ISO na migração de leucócitos induzida por carragenina na bolsa de ar em ratas**

Para saber se o ISO interfere na migração leucocitária ratas Wistar foram distribuídas em grupos (n=5-8) e tricotomizadas no dorso, na área escapular. No 1º dia, os animais receberam uma injeção subcutânea intra-escapular de 20 mL de ar estéril colhidos em capela de fluxo laminar, para a formação da bolsa de ar. Os animais retornaram ao biotério, com água e alimento *ad libitum*. No 3º dia, as bolsas foram reinfladas com 10 mL de ar estéril. No 6º dia, os animais foram pré-tratados por via oral com veículo, isopulegol (3,12; 6,25 e 12,5 mg/kg) e indometacina (10 mg/kg). Uma hora após, 100 µL de carragenina 1% foi administrada em cada bolsa. Após 4 h, os animais foram eutanasiados e cada bolsa foi lavada com 10 mL de tampão PBS, e o conteúdo colhido (MULLER, 2001).

Em seguida, foi realizada uma diluição 1:20 do lavado com líquido de Turk, procedendo-se à contagem total dos leucócitos na câmara de Neubauer ao microscópio. Os resultados foram expressos em percentual (%) de leucócitos totais (MULLER, 2001).

Alíquota adicional do exsudato foi armazenada em *eppendorfs* a -20°C para posterior análise da atividade de mieloperoxidase (MPO).

### **3.6.5 Efeito do ISO na migração de leucócitos diferencial na peritonite induzida por carragenina em camundongos**

Camundongos Swiss (25-30 g) foram tratados por via oral com veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80), ISO (12,5 mg/kg) ou indometacina (10mg/kg) após 60 minutos receberam injeção de carragenina (0,1mL a 1%,) na cavidade peritoneal (VINEGAR et al., 1973). Após quatro horas, os animais foram eutanasiados, a cavidade peritoneal foi lavada com 5 mL de solução PBS heparinizada (10 UI/mL) (SOUSA; FERREIRA, 1985).

Em seguida, foi realizada uma diluição 1:20 do lavado com líquido de Turk, procedendo-se à contagem diferencial dos leucócitos. A contagem diferencial foi realizada contando no mínimo 100 leucócitos e diferenciando-os através do microscópio óptico (MULLER, 2001).

### **3.6.6 Efeito do ISO sobre a atividade da Mieloperoxidase (MPO) no exsudado de bolsa de ar subcutânea**

A quantificação da atividade de mieloperoxidase foi baseada no método descrito por (BRADLEY; CHRISTENSEN; ROTHSTEIN, 1982). Assim, 400 µL do exsudato da bolsa de ar foram centrifugados a 4000 g por 7 minutos a 4°C. Foram retirados 100 µl do sobrenadante

e adicionados a 1 mL de tampão HTAB 0,5% e pH 6,0 (brometo de hexadeciltrimetilamônio) seguida de centrifugação a 4500 g durante 10 minutos a 4°C. 10 µL do sobrenadante foram retirados e adicionados a placa de 96 poços com posterior acréscimo de 200 µL da solução de leitura (H<sub>2</sub>O destilada, tampão fosfato pH 6,0, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 1% e o-dianisidina 0,167 mg/mL). A atividade de MPO foi determinada por medição da alteração da absorbância a 450 nm em leitor de placa durante 5 minutos. A concentração de MPO está expressa em unidades de MPO por microlitro (UMPO/µL) segundo curva padrão obtida para mieloperoxidase.

### **3.7 Análise estatística**

Os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). Foi empregada a análise de variância (ANOVA uma via ou duas vias), seguida pelo Teste de Bonferroni. 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 5.0. Dados não paramétricos foram expressos como mediana, valores máximos e mínimos. Posteriormente foi realizada a análise estatística por meio de teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunns.

## *RESULTADOS*

---

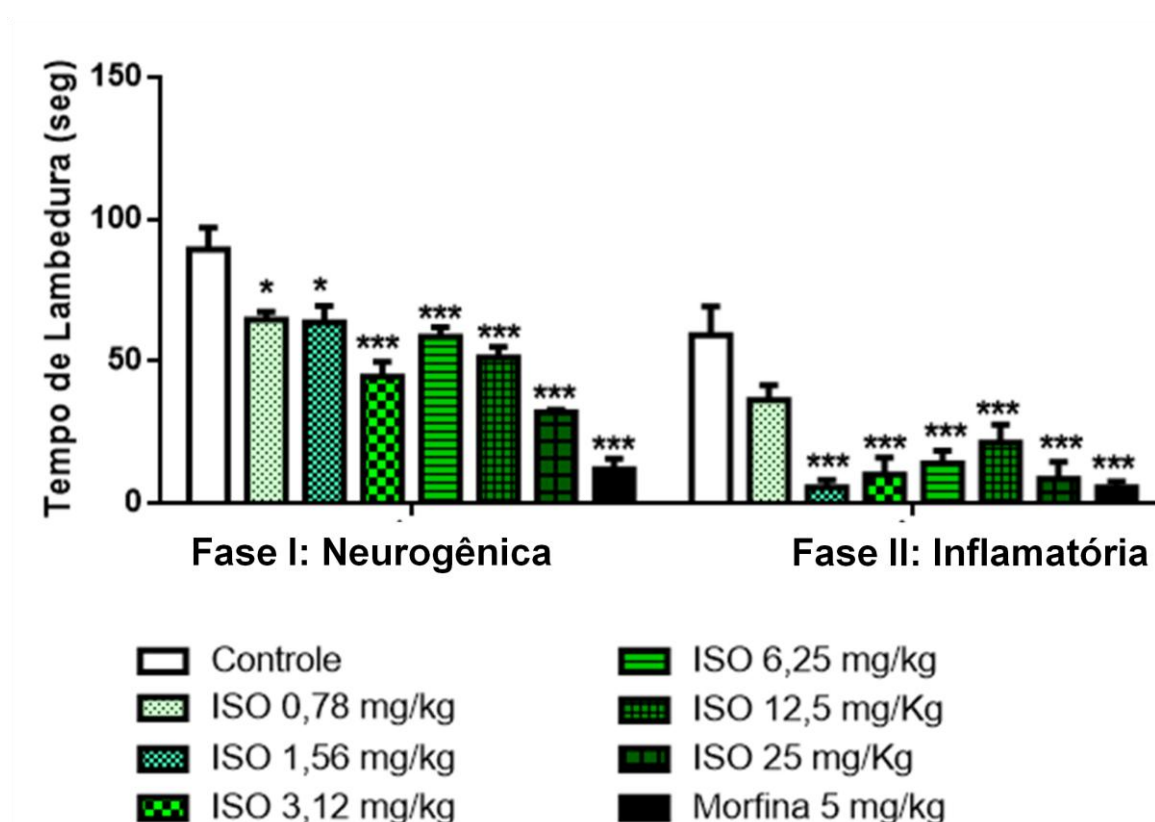
## 4 RESULTADOS

### 4.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

#### 4.1.1 Efeito do ISO na nocicepção induzida por formalina

Como mostra a **figura 06**, o ISO nas doses de 1,56; 3,12; 6,25; 12,5 e 25 mg/kg (v.o.) reduziu significativamente o tempo de lambedura da pata estimulada em ambas as fases do teste quando comparado ao controle (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ), enquanto a dose de 0,78 mg/kg (v.o.) foi efetiva apenas na primeira fase do teste.

**Figura 06:** Efeito antinociceptivo do ISO na resposta nociceptiva induzida por formalina em camundongos. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. (5-8 animais). \*\*\* $p < 0,001$ , \* $p < 0,05$  comparado com o controle. (ANOVA uma via, Teste de Tukey).

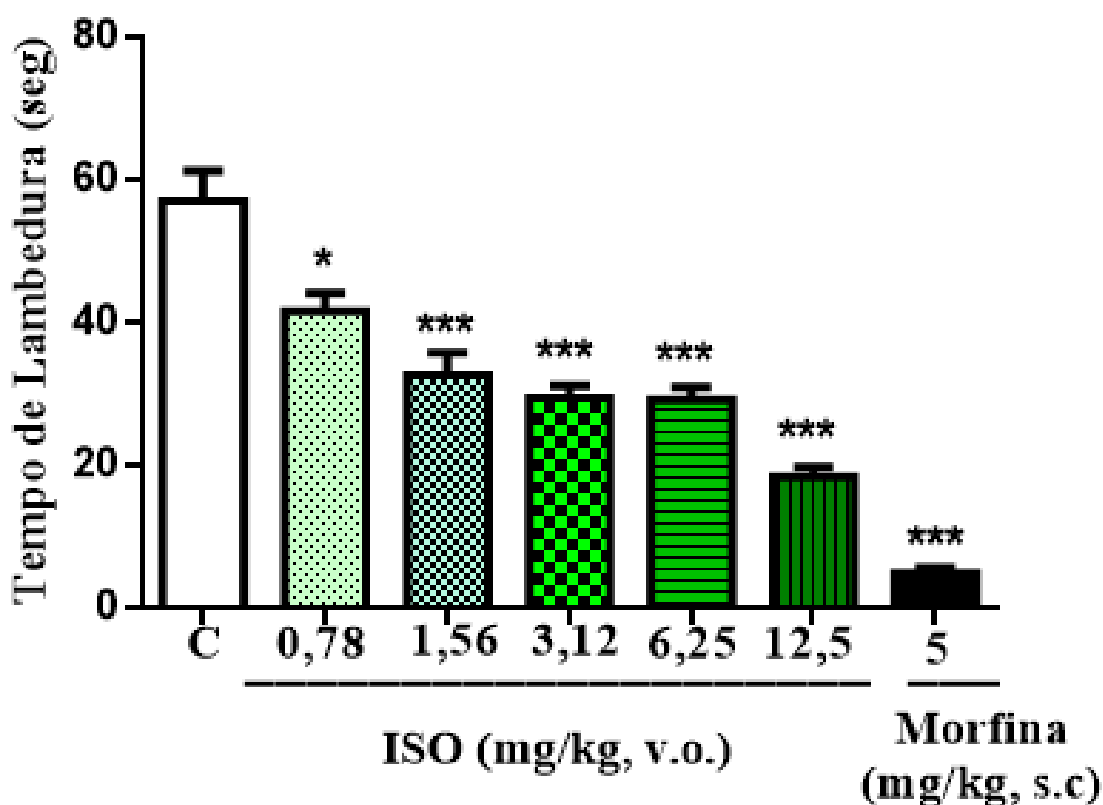




#### 4.1.2 Efeito do ISO na nocicepção induzida por capsaicina

O efeito do ISO na nocicepção induzida por capsaicina em camundongos é mostrada na **figura 07**. Uma redução significativa no tempo de lambedura da pata foi observada em camundongos tratados por via oral com ISO 0,78 mg/kg (\* $p < 0,05$ ); 1,56; 3,12; 6,25 e 12,5 mg/kg (\*\* $p < 0,001$ ), comparado ao grupo controle, indicando um efeito antinociceptivo na dor neurogênica. Morfina 5 mg/kg, s.c., foi usada como controle positivo e mostrou uma redução da resposta quando comparado com o grupo controle (\*\* $p < 0,001$ ).

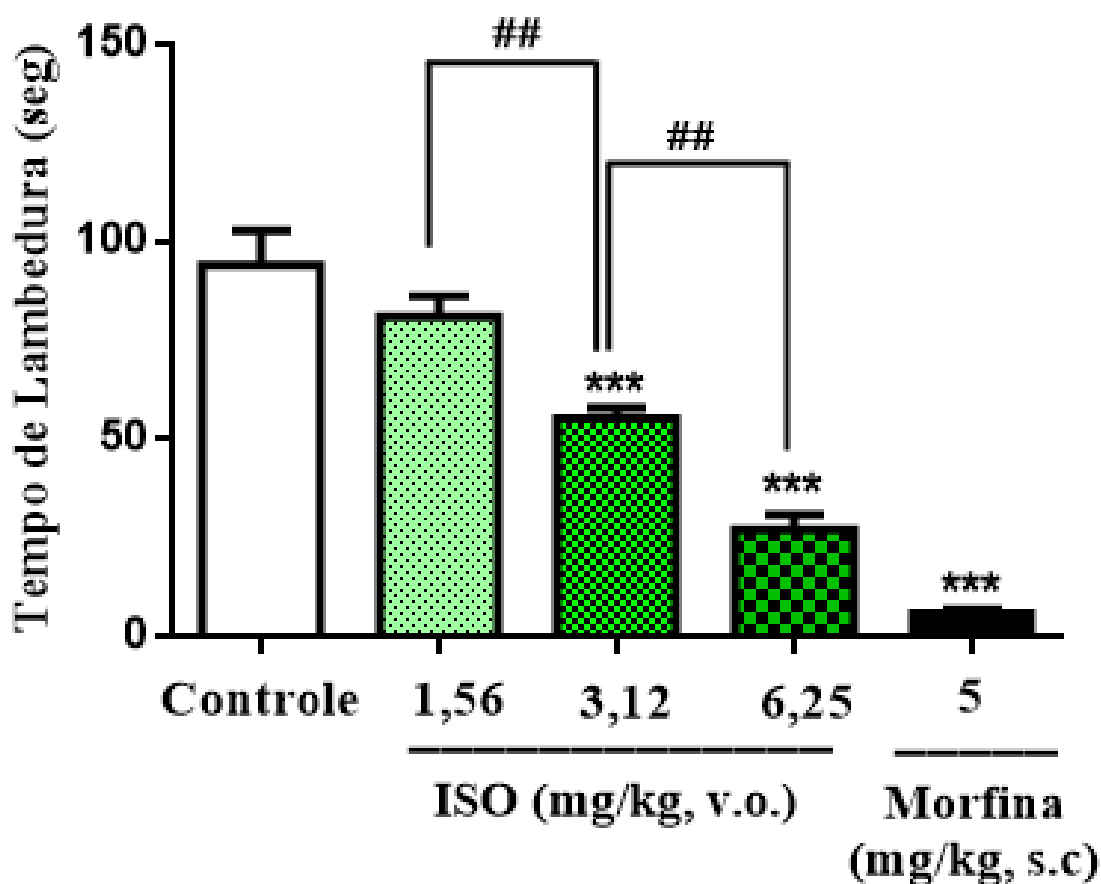
**Figura 07:** Efeito do ISO na nocicepção induzida por capsaicina em camundongos. Animais foram tratados com ISO 60 min (v.o.) antes do tratamento com capsaicina. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. (5-7 animais). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$ , comparado com o controle (c). (ANOVA uma via, Teste de Tukey).



#### 4.1.3 Efeito do ISO no teste do glutamato

A **figura 08** mostra que a administração de ISO (3,12 e 6,25 mg/kg, v.o.) inibiu significativamente,  $***p < 0,001$ , dependente da dose, a nocicepção induzida por glutamato quando comparado ao controle. Enquanto que a dose de 1,56 mg/kg não apresentou significância neste teste.

**Figura 08:** Efeito do ISO na nocicepção induzida por glutamato (20  $\mu\text{mol/pata}$ ) em camundongos. Cada coluna representa a média  $\pm$  E.P.M. (5-8 animais).  $***p < 0,001$ ;  $**p < 0,01$ ;  $*p < 0,05$  comparado com o controle e  $##p < 0,01$  para comparação entre as doses do ISO. (ANOVA uma via, Teste de Tukey).

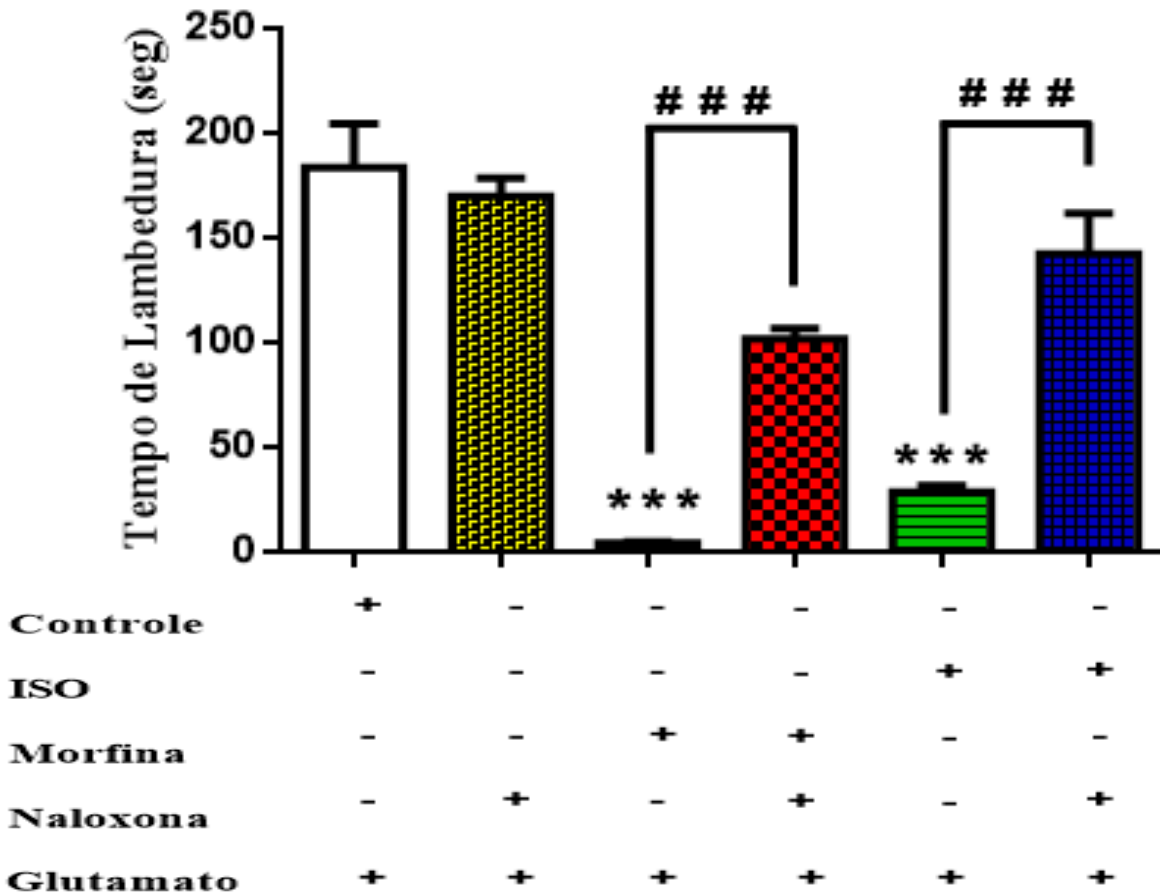


**4.1.4 Investigação dos possíveis mecanismos de ação antinociceptiva do ISO**

**4.1.4.1 Participação do sistema opióide no efeito antinociceptivo do ISO**

Os resultados da **figura 09** mostram que o grupo tratado apenas com naloxona ( $169 \pm 8,84$ ) apresentou valores semelhantes ao do controle ( $183 \pm 11,46$ ), descartando a existência de efeito antinociceptivo da naloxona. Ao compararmos o efeito da associação naloxona + ISO ( $142,35 \pm 19,13$ ) com o efeito do ISO  $6,25 \text{ mg/kg}$  ( $28,45 \pm 3,33$ ), podemos ver que a naloxona reverteu, significativamente ( $***p < 0,001$ ), a ação antinociceptiva do ISO, da mesma forma que a naloxona reverte significativamente ( $***p < 0,001$ ) o efeito da morfina quando associadas ( $101,79 \pm 4,85$ ) em comparação com a morfina ( $4,30 \pm 0,38$ ).

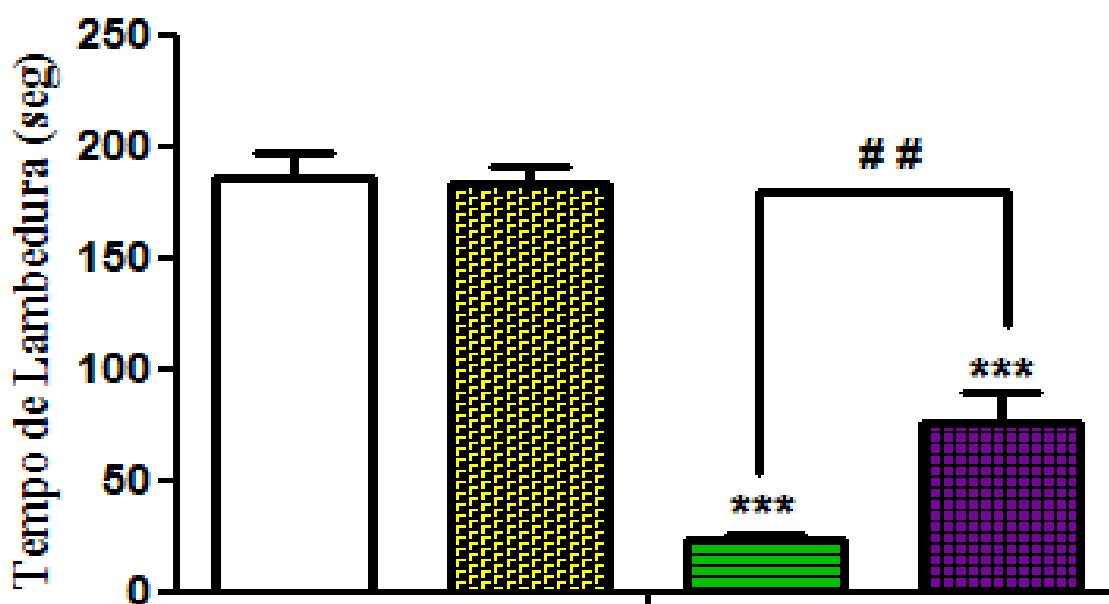
**Figura 09:** Investigação do envolvimento dos receptores opióides no efeito antinociceptivo do ISO na nocicepção induzida pelo glutamato ( $20 \mu\text{L}$ ,  $20 \mu\text{mol/pata}$ ) em camundongos. Onde (+) indica presença e (-) ausência do tratamento. Cada grupo representa a média  $\pm$  E.P.M do tempo de reação dos animais tratados com ISO ( $6,25 \text{ mg/kg}$ , v. o.), naloxona ( $2 \text{ mg/kg}$ , i.p.), Morfina ( $5 \text{ mg/kg}$ , s.c.) e controle, 30 ou 20 min antes do estímulo.  $n = 5-8$  ( $***p < 0,001$ , vs. Controle;  $### p < 0,001$ , vs. Naloxona) (ANOVA uma via, teste de Tukey).



#### 4.1.4.2 Participação dos canais de $K^+_{ATP}$ no efeito antinociceptivo do ISO

A **figura 10** mostra que o grupo controle ( $185,38 \pm 11,57$ ) e o grupo pré-tratado com apenas glibenclamida ( $183,14 \pm 7,29$ ) apresentaram um alto tempo de lambertura, mostrando que o antagonista dos canais de potássio não reduz o tempo de resposta dos animais. Os camundongos tratados com ISO ( $23,41 \pm 3,01$ ) mostraram redução do tempo de lambertura da pata, resposta que foi alterada, significativamente (\*\* $p < 0,01$ ), quando os animais foram pré-tratados com glibenclamida associada ao ISO ( $76,29 \pm 12,93$ ).

**Figura 10:** Investigação do envolvimento dos canais de potássio,  $K^+_{ATP}$ , no efeito antinociceptivo do ISO na nocicepção induzida pelo glutamato ( $20 \mu\text{L}$ ,  $20 \mu\text{mol/pata}$ ) 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 ISO ( $6,25 \text{ mg/kg}$ , v. o.), glibenclamida ( $3 \text{ mg/kg}$ , s. c.) ou controle, 30 ou 20 min antes do estímulo,  $n = 7-8$  (\*\* $p < 0,001$ , vs. controle; ##  $p < 0,01$  vs. ISO  $6,25 \text{ mg/kg}$ ) (ANOVA uma via, teste de Tukey).



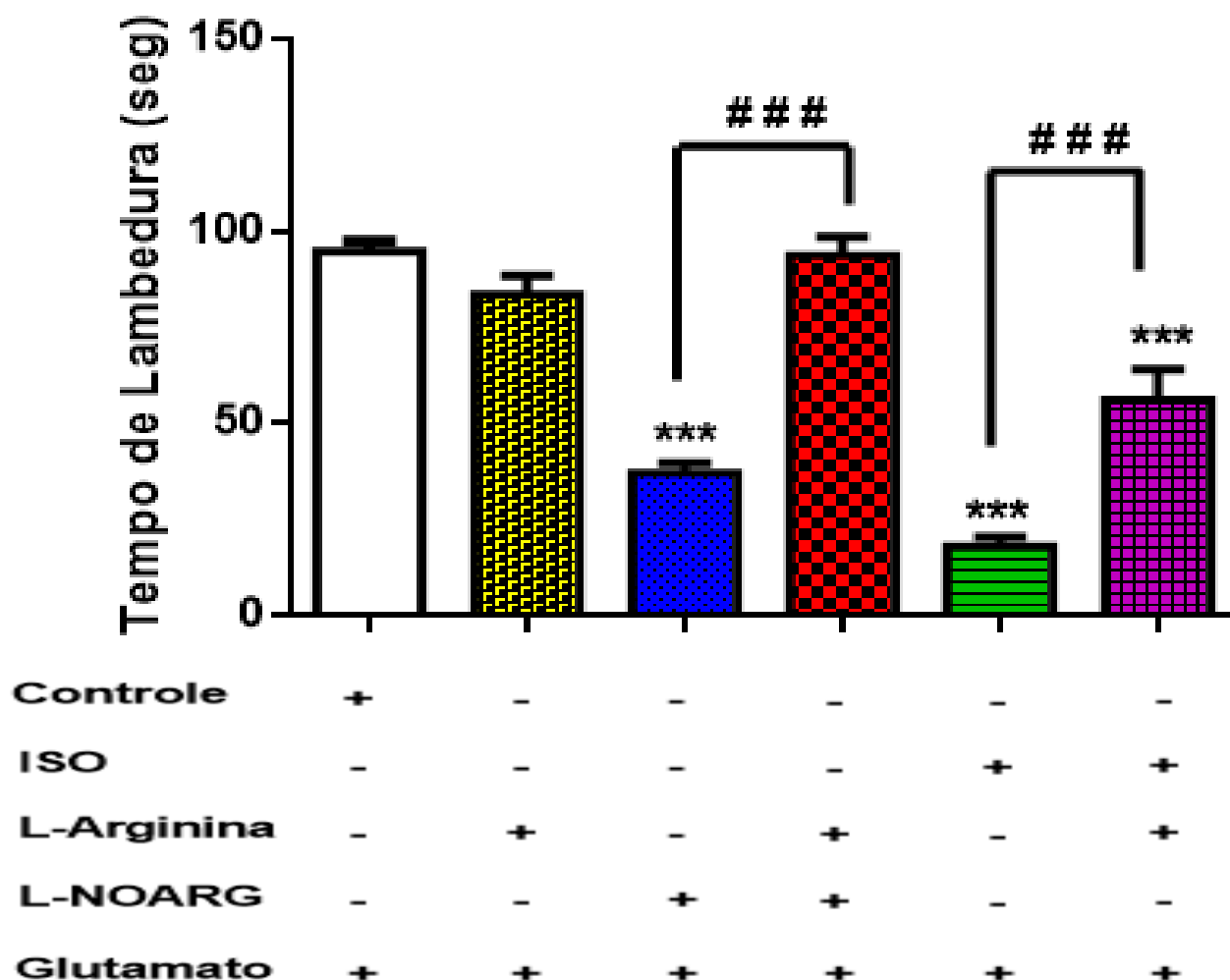
<b>Controle</b>	+	-	-	-
<b>ISO</b>	-	-	+	+
<b>Glibenclamida</b>	-	+	-	+
<b>Glutamato</b>	+	+	+	+



#### 4.1.4.4 Participação da via L-arginina-óxido nítrico no efeito antinociceptivo do ISO

A **figura 12** mostra que o grupo tratado apenas com L-arginina ( $83,38 \pm 4,94$ ) apresentou valores próximos aos do controle ( $94,71 \pm 2,69$ ), descartando a existência de efeitos antinociceptivo precursor do óxido nítrico. A L-arginina associada ao L-NOARG ( $93,51 \pm 4,92$ ) reverteu, significativamente ( $p < 0,001$ ), o efeito do L-NOARG ( $37,6 \pm 2,56$ ). A L-arginina com ISO ( $55,96 \pm 8,01$ ) aumentou, significativamente ( $p < 0,001$ ), o tempo de lambertura quando comparado com ISO ( $17,79 \pm 2,56$ ), evidenciando uma participação dessa via no efeito antinociceptivo do isopulegol.

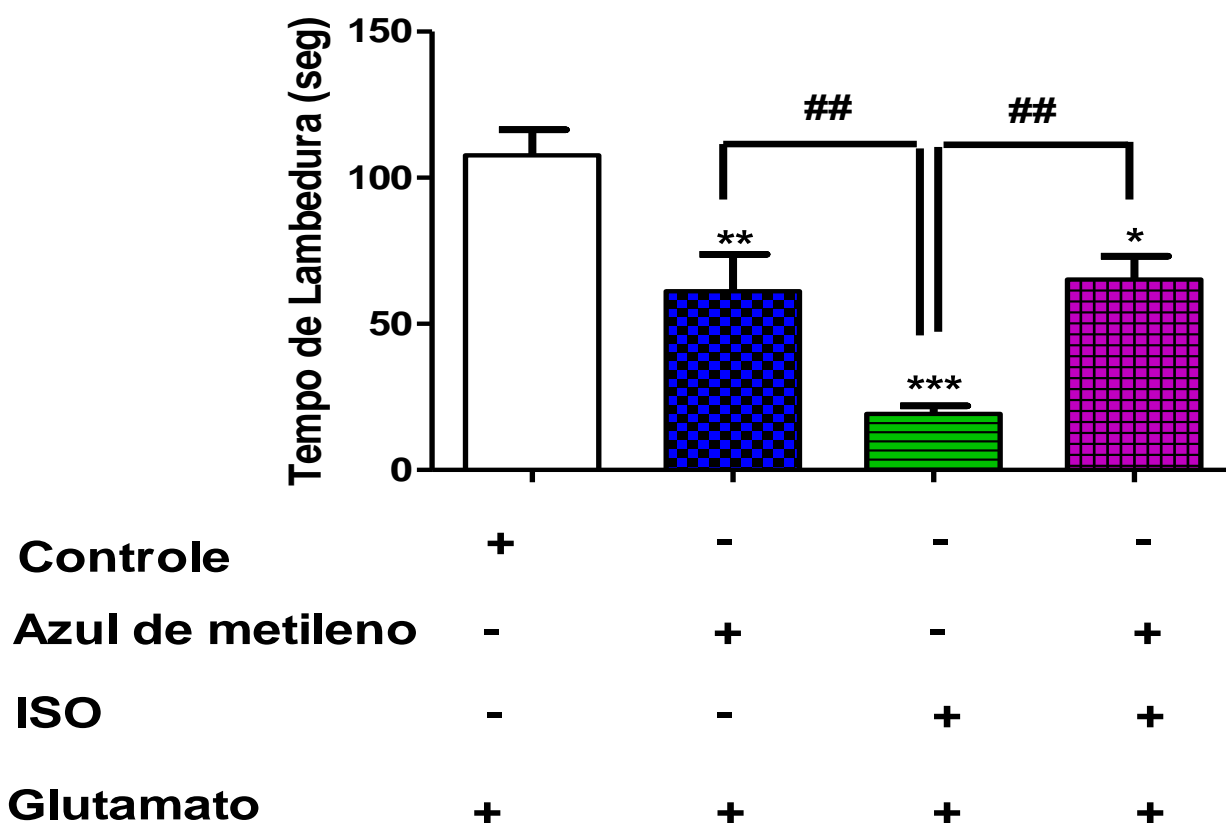
**Figura 12:** Investigação do envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico no efeito antinociceptivo do ISO na nocicepção induzida pelo glutamato ( $20 \mu\text{L}$ ,  $20 \mu\text{mol/pata}$ ) em camundongos. Onde (+) indica presença e (-) ausência do tratamento. Cada grupo representa a média  $\pm$  E.P.M do tempo de reação dos animais tratados com ISO ( $6,25 \text{ mg/kg}$ , v.o.), L-NOARG ( $75 \text{ mg/kg}$ , i.p.), L-arginina ( $600 \text{ mg/kg}$ , i. p.) e controle, 30 ou 20 min antes do estímulo.  $n = 6-8$ . (\*\* $p < 0,001$  vs. controle; # # #  $p < 0,001$  vs. L-arginina) (ANOVA uma via, teste de Tukey).



#### 4.1.4.5 Envolvimento da via do monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) no efeito antinociceptivo do ISO

A **figura 13** evidencia que o grupo controle ( $107,67 \pm 8,75$ ) foi um único que apresentou um elevado tempo de lambedura, os animais tratados com ISO ( $19,18 \pm 2,75$ ) ou azul de metileno ( $61, 14 \pm 12,62$ ) tiveram redução no tempo de lambedura, evidenciando um efeito antinociceptivo das substâncias. A associação do Isopulegol com o azul de metileno ( $65, 23 \pm 7, 94$ ) mostrou diferença significativa em relação ao grupo tratado apenas com o ISO.

**FIGURA 13** - Investigação do envolvimento da via da Guanosina monofosfato ciclico, no efeito antinociceptivo do ISO na nocicepção induzida pelo glutamato ( $20 \mu\text{L}$ ,  $20 \mu\text{mol/pata}$ ) em camundongos. Cada grupo representa a média  $\pm$  E.P.M do tempo de reação dos animais tratados com ISO ( $6,25 \text{ mg/kg}$ , v.o.), azul de metileno ( $20 \text{ mg/kg}$ , i.p.) ou controle v.o., 60 ou 15 min antes do estímulo,  $n = 6-8$  (\*\* $p < 0,001$ , vs. controle); (\*\* $p < 0,01$ , vs. ISO  $6,5 \text{ mg/kg}$ ) (ANOVA uma via, teste de Tukey).

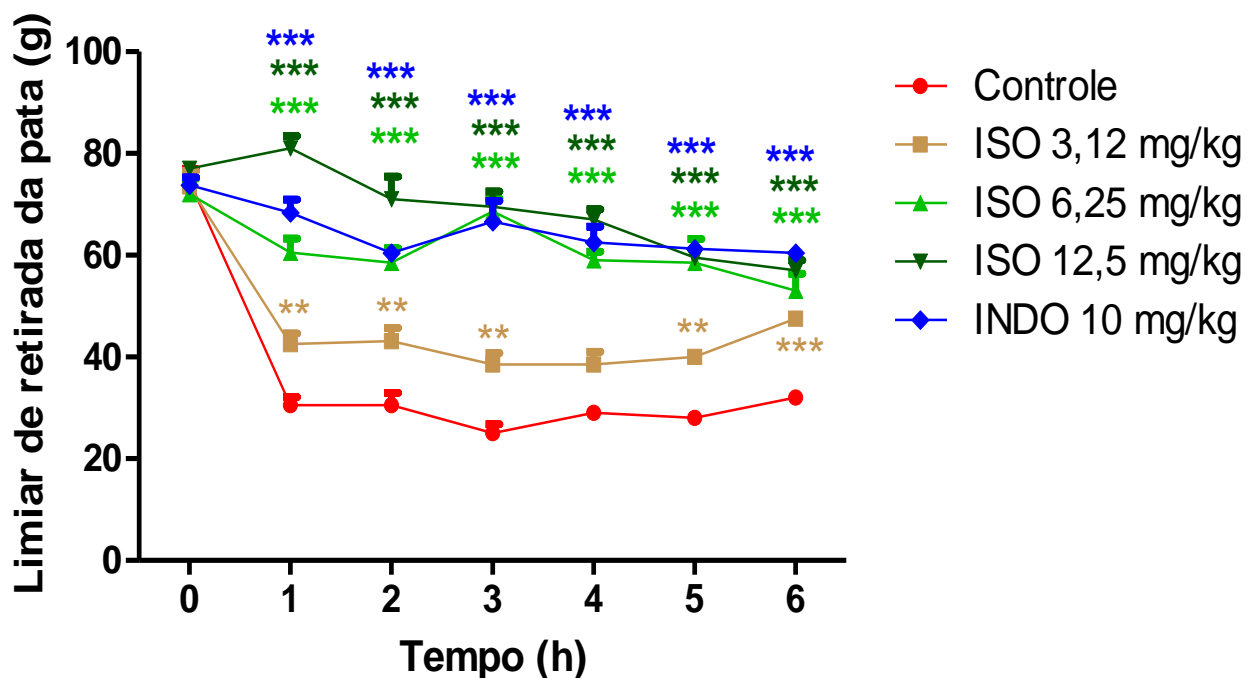


#### 4.1.5. AVALIAÇÃO DA HIPERALGESIA INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR CARRAGENINA

##### 4.1.5.1 Efeito do tratamento com ISO por via oral na hiperalgesia inflamatória induzida por carragenina

O pré-tratamento por via oral com ISO nas doses 6,25 e 12,5 mg/kg, reduziu significativamente ( $***p<0,001$ ), a hiperalgesia mecânica causando um aumento do limiar nociceptivo da primeira hora até a sexta comparada ao controle (**Figura 14**). O grupo tratado com ISO 3,12 mg/kg também aumentou o limiar nociceptivo nas horas 1, 2, 3, 5( $**p<0,01$ ) e 6 ( $***p<0,001$ ), exceto na 4 hora. 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 14:** Efeito da administração aguda do isopulegol sobre o limiar de retirada de pata de ratos Wistar com hiperalgesia mecânica induzida pela injeção (i.pl.) de carragenina 1% (50  $\mu$ L / pata), submetidas ao teste de compressão da pata (Randall- Selitto). Os grupos de animais (n=5) receberam ISO (3,12; 6,25 e 12,5 mg/kg, v.o.), veículo ou indometacina - INDO (10 mg/kg, v.o.). Cada grupo representa a média  $\pm$  E.P.M. ( $** p< 0,01$  e  $*** p<0,001$  comparado com grupo controle; ANOVA duas vias, Teste de Bonferroni).

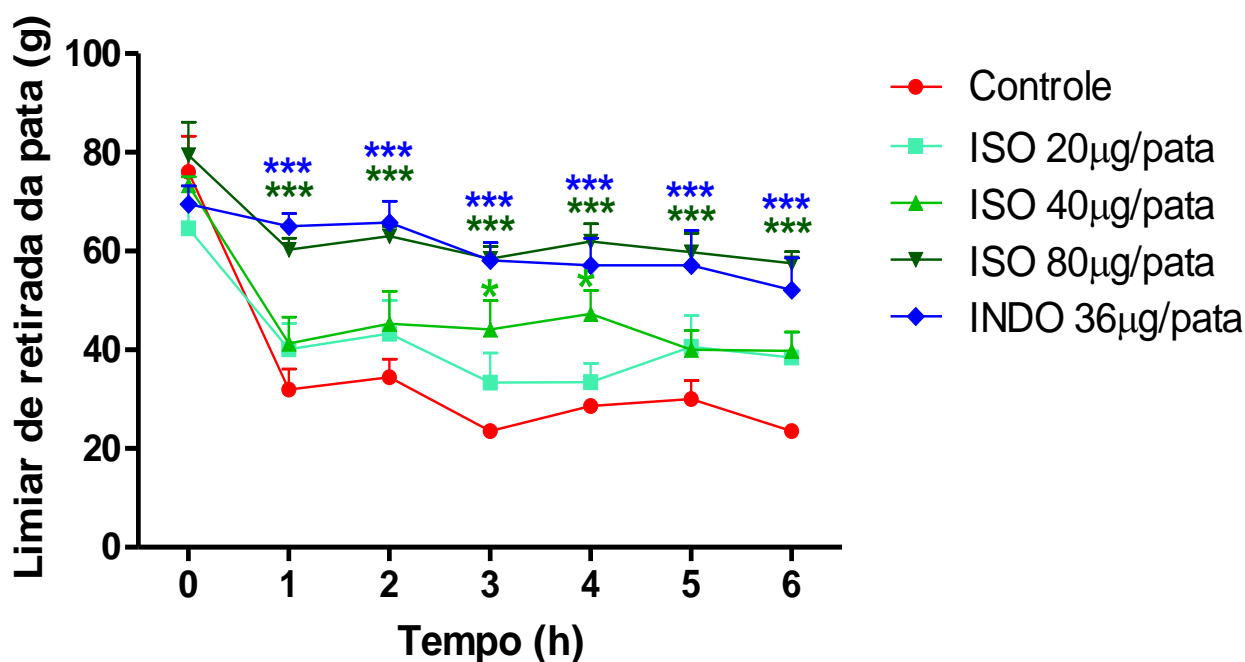




#### 4.1.5.2 Efeito do tratamento com ISO por via intraplantar na hiperalgesia inflamatória induzida por carragenina

O efeito antinociceptivo do ISO na hiperalgesia mecânica foi verificado pelo aumento na intensidade da carga suportada pelo animal no teste de compressão da pata (Randall-Selitto). A **Figura 15** mostra que o grupo tratado com ISO 80 µg/pata mostrou uma redução da hiperalgesia mecânica causando um aumento do limiar nociceptivo da primeira hora até a sexta, com significância \*\*\*  $p < 0,001$ , comparada ao controle. Os animais que receberam o ISO 40 µg/pata, mostraram uma redução da hiperalgesia com consequente aumento do limiar de nocicepção apenas nas 3<sup>a</sup> ( $44,16 \pm 5,8g$ ) e 4<sup>a</sup> ( $47,3 \pm 4,7g$ ) horas, \*  $p < 0,05$ , comparado ao controle ( $23,5 \pm 0,6g$  e  $28,66 \pm 1,18g$ ). A indometacina (36µg/pata) inibiu significativamente (\*\*\*) $p < 0,001$ ) a hiperalgesia já a partir da primeira hora e perdurou até a sexta hora comparada ao controle. Já a dose 20µg/pata não alterou o limiar nociceptivo comparado ao controle. Na pata contralateral, que não recebeu tratamento, não houve alteração significativa no limiar de retirada da pata.

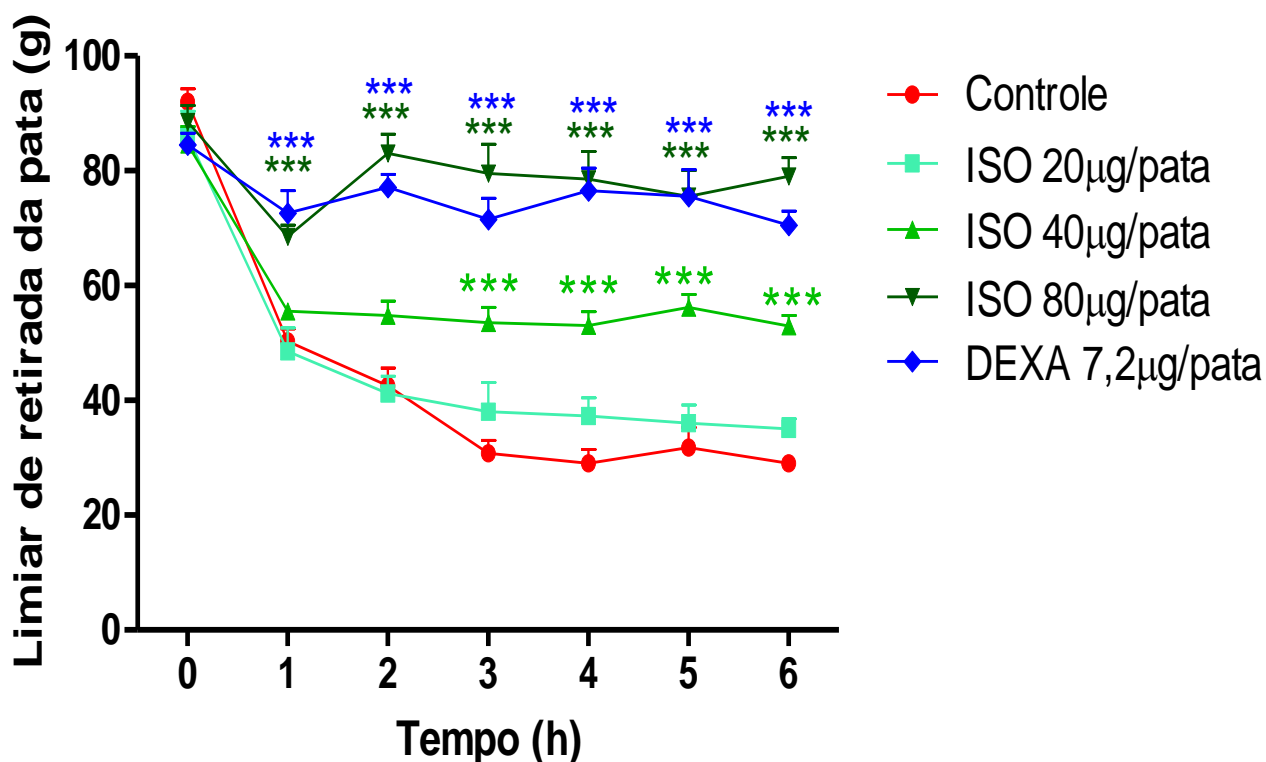
**Figura 15:** Efeito da administração aguda do isopulegol sobre o limiar de retirada de pata de ratas Wistar com hiperalgesia mecânica induzida pela injeção de carragenina 1% (50µL/pata), submetidas ao teste de compressão da pata (Randall- Selitto). Os grupos de animais (n=5) receberam 100µL de ISO (20, 40, 80 µg/100µL i.pl.), veículo ou indometacina - INDO (36 µg/pata). Cada grupo representa a média ± E.P.M. (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  comparado com grupo controle; ANOVA duas vias, Teste de Bonferroni).



#### 4.1.5.3 Avaliação da hiperalgesia inflamatória induzida por prostaglandina E<sub>2</sub>.

A **figura 16** mostra que o grupo tratado com ISO 80 µg/pata mostrou uma redução da hiperalgesia mecânica induzida por PGE<sub>2</sub>, causando um aumento do limiar nociceptivo a partir da primeira hora e perdurou até a sexta, com significância \*\*\* p<0,001, apresentando melhor efeito na 3ª hora (83,00 ± 3,39) comparada ao controle (42,50 ± 3,16). Os animais que receberam o ISO 40 µg/pata, mostraram uma redução da hiperalgesia com consequente aumento do limiar de nocicepção apenas nas a partir da 3ª hora (\*\*\*p<0,001) e se prolongou até a sexta hora em comparação ao controle. A dexametasona (7,2 µg/pata) inibiu significativamente (\*\*\*p<0,001) a hiperalgesia já a partir da primeira hora e perdurou até a sexta hora comparada ao controle. Já a dose 20 µg/pata não alterou o limiar nociceptivo comparado ao controle. Na pata contralateral, que não recebeu tratamento, não houve alteração significativa no limiar de retirada da pata.

**Figura 16:** Efeito da administração aguda do isopulegol sobre o limiar de retirada de pata de ratas Wistar com hiperalgesia mecânica induzida pela injeção (i.pl.) de 50µL de prostaglandina E<sub>2</sub>(1µg/mL), submetidas ao teste de compressão da pata (Randall- Selitto). Os grupos de animais (n = 5) receberam 100µL de ISO (20, 40, 80 µg/pata), veículo ou dexametasona - DEXA (7,2µg/pata). Cada grupo representa a média ± E.P.M. (\*\*\*p<0,001 comparado com grupo controle; ANOVA duas vias, Teste de Bonferroni).

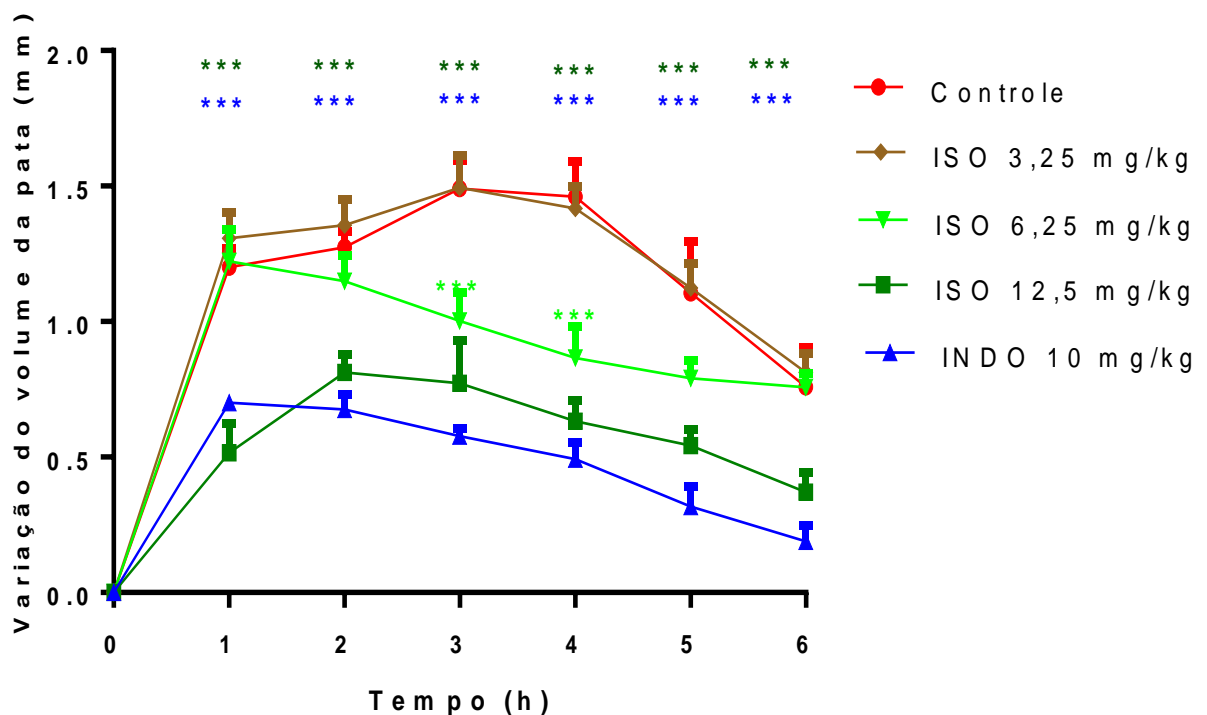


## 4.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

### 4.2.1 Efeito do ISO no edema de pata induzido por carragenina

O pré-tratamento dos animais com ISO (12,5 mg/kg, v.o.) inibiu significativamente (\*\*\*)  $p < 0,001$ ) o edema de pata induzido por carragenina nas 6 horas de observação quando comparado ao grupo controle ( **Figura 17** ). O grupo tratado com ISO 6,25 mg/kg por via oral, apresentou redução do edema apenas nas 3<sup>o</sup> e 4<sup>o</sup> horas de observação, (\*\*\*)  $p < 0,001$ ), em relação ao grupo controle. A indometacina (10 mg/kg, v.o.) inibiu significativamente (\*\*\*)  $p < 0,001$ ) a formação do edema já a partir da primeira hora e perdurou até a sexta hora comparado ao controle. O ISO na dose de 3,25 mg/kg (v.o.) não apresentou inibição significativa do edema de pata induzido por carragenina ( $p > 0,05$ ).

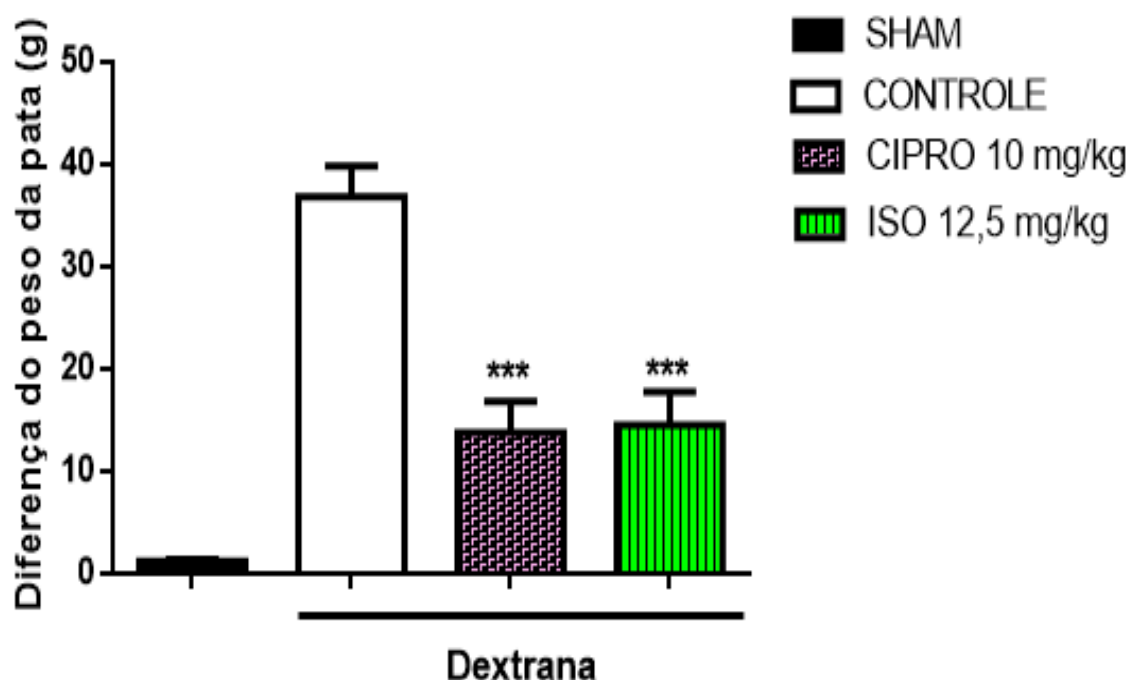
**Figura 17:** Efeito do isopulegol sobre o edema de pata induzido por carragenina (1 %; 0,1 mL, i.pl.) em camundongos (n=5-6). Os animais receberam ISO (3,25; 6,25 e 12,5 mg/kg), veículo ou indometacina – INDO (10 mg/kg) por via oral. Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. (\* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  vs. Controle) (ANOVA duas vias, seguida de pós-teste de Bonferroni).



#### 4.2.2 Efeito do ISO no edema de pata induzido por dextrana

O pré-tratamento com ISO (12,5 mg/kg, v.o.) atenuou significativamente, (\*\*p<0,001), o edema na pata traseira direita dos camundongos duas horas após a indução por dextrana (1mg/mL) em comparação ao grupo controle ( **Figura 18**). A Ciproheptadina (10 mg/kg) também reduziu (\*\*p<0,001), o edema de pata após duas horas do tratamento do com o agente flogístico dextrana, quando comparado ao controle. Não houve diferença significativa entre o grupo que foi tratado com ISO e o grupo tratado com Ciproheptadina.

**Figura 18:** Efeito do isopulegol sobre o edema de pata induzido por dextrana (1 %; 0,05 mL, i.pl.) em camundongos (n = 5-6). Os animais foram tratados com ISO 12,5 mg/kg, veículo ou ciproheptadina - CIPRO (10 mg/kg), por v.o. Cada grupo representa a média ± E.P.M. \*\*\*p<0,001 vs. Controle (ANOVA uma via, teste de Tukey).



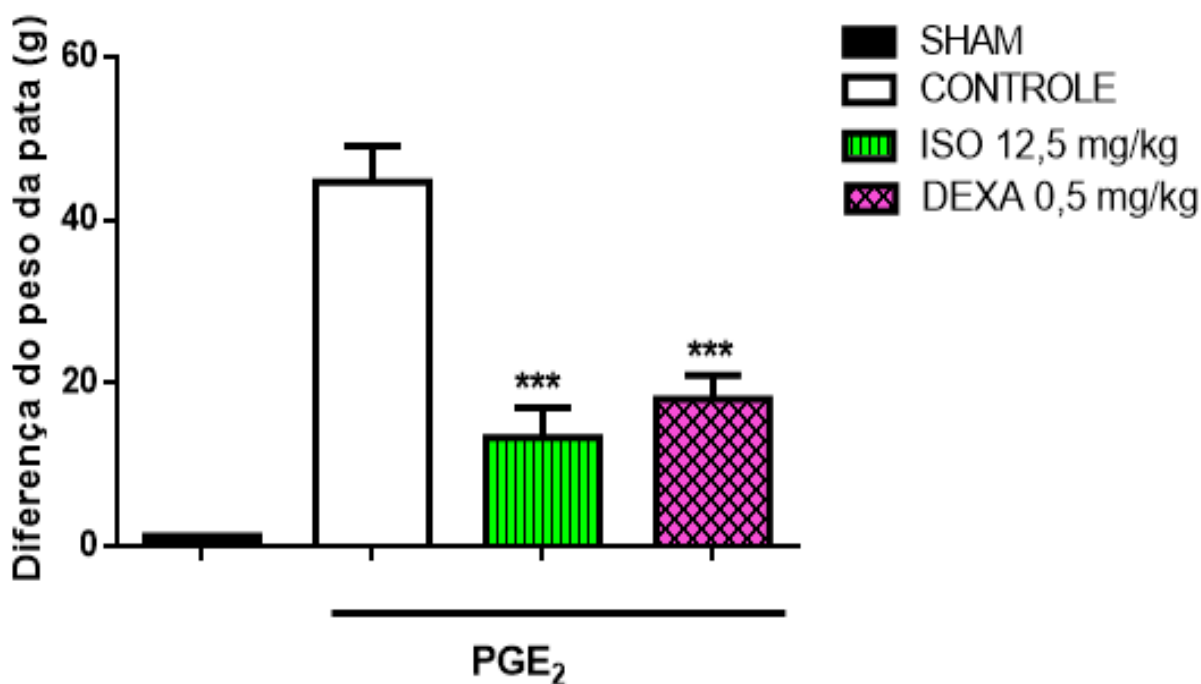
**Tabela 01:** Efeito do isopulegol sobre o edema de pata induzido por dextrana (1 %; 0,05 mL, i.pl.) em camundongos (n = 5-6). Os animais foram tratados com ISO 12,5 mg/kg, veículo ou ciproheptadina – CIPRO (10 mg/kg), por v.o. Cada grupo representa a média ± E.P.M. \*\*\*p<0,001 vs. Controle (ANOVA uma via, teste de Tukey).

TRATAMENTO	Dose em mg/kg, por via oral	Diferença média do peso da pata (g)
SHAM	-	1,20 ± 0,20
Veículo	-	36,80 ± 3,05
ISO	12,5	14,50 ± 3,27 ***
CIPRO	10	13,75 ± 3,09 ***

#### 4.2.3 Efeito do ISO no edema de para induzido por PGE<sub>2</sub>

O pré-tratamento com ISO (12,5 mg/kg, v.o.) reduziu significativamente, (\*\*p<0,001), o edema na pata traseira direita dos camundongos uma hora após a indução PGE<sub>2</sub> (50 ng/50µL, i. pl.) em comparação ao grupo controle ( **Figura 19**). A dexametasona (0,5 mg/kg) também reduziu (\*\*p<0,001), o edema de pata uma horas após o tratamento do com o agente flogístico prostaglandina E<sub>2</sub>, quando comparado ao controle.

**Figura 19:** Efeito do isopulegol sobre o edema de pata induzido por PGE<sub>2</sub> (50 ng/50µL, i. pl.) em camundongos (n = 5). Os animais foram pré-tratados com ISO 12,5 mg/kg, veículo e ou dexametasona – DEXA (0,5 mg/kg). Cada grupo representa a média ± E.P.M. \*\*\*p<0,001 vs. Controle (ANOVA uma via, teste de Tukey).



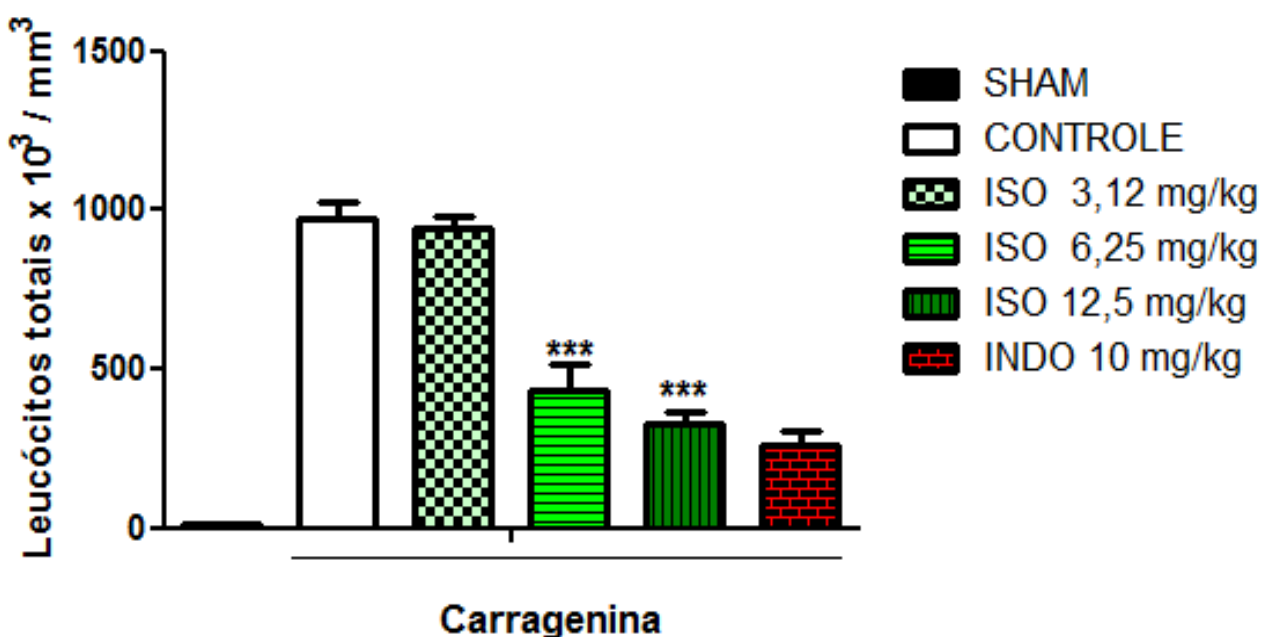
**Tabela 02:** Efeito do isopulegol sobre o edema de pata induzido por PGE<sub>2</sub> (50 ng/50µL, i. pl.) em camundongos (n = 5). Os animais foram pré-tratados com ISO 12,5 mg/kg, veículo e ou dexametasona – DEXA (0,5 mg/kg). Cada grupo representa a média ± E.P.M. \*\*\*p<0,001 vs. Controle (ANOVA uma via, teste de Tukey).

TRATAMENTO	Dose em mg/kg, por via oral	Diferença média do peso da pata (g)
SHAM	-	1,20 ± 0,20
Veículo	-	44,66 ± 4,41
ISO	12,5	13,33 ± 3,64 ***
DEXA	0,5	18,00 ± 2,95 ***

#### 4.2.4 Efeito do isopulegol na migração de leucócitos totais induzida por carragenina na bolsa de ar em ratas

O grupo que recebeu tratamento com ISO (6,25 e 12,5 mg/kg, v.o.) mostrou redução significativa ( $***<0,001$ ), sem diferença significativa entre as doses, da migração de leucócitos totais para bolsa de ar em ratas induzida por carragenina 1%, comparado ao grupo controle (**Figura 20**). A Indometacina (10 mg/kg, v.o.) também reduziu ( $***<0,001$ ), a migração leucocitária comparada ao controle. O grupo tratado com ISO 3,12 mg/kg não conseguiu reduzir a migração de leucócitos totais induzido por carragenina 1%.

**Figura 20:** Efeito da administração aguda do ISO sobre migração de leucócitos totais induzida por 100 $\mu$ L de carragenina 1% na bolsa de ar em ratas (n=5-10). Cada grupo representa a média  $\pm$  E.P.M. ( $***p<0,001$  comparado com grupo controle; ANOVA uma via, teste de Tukey).



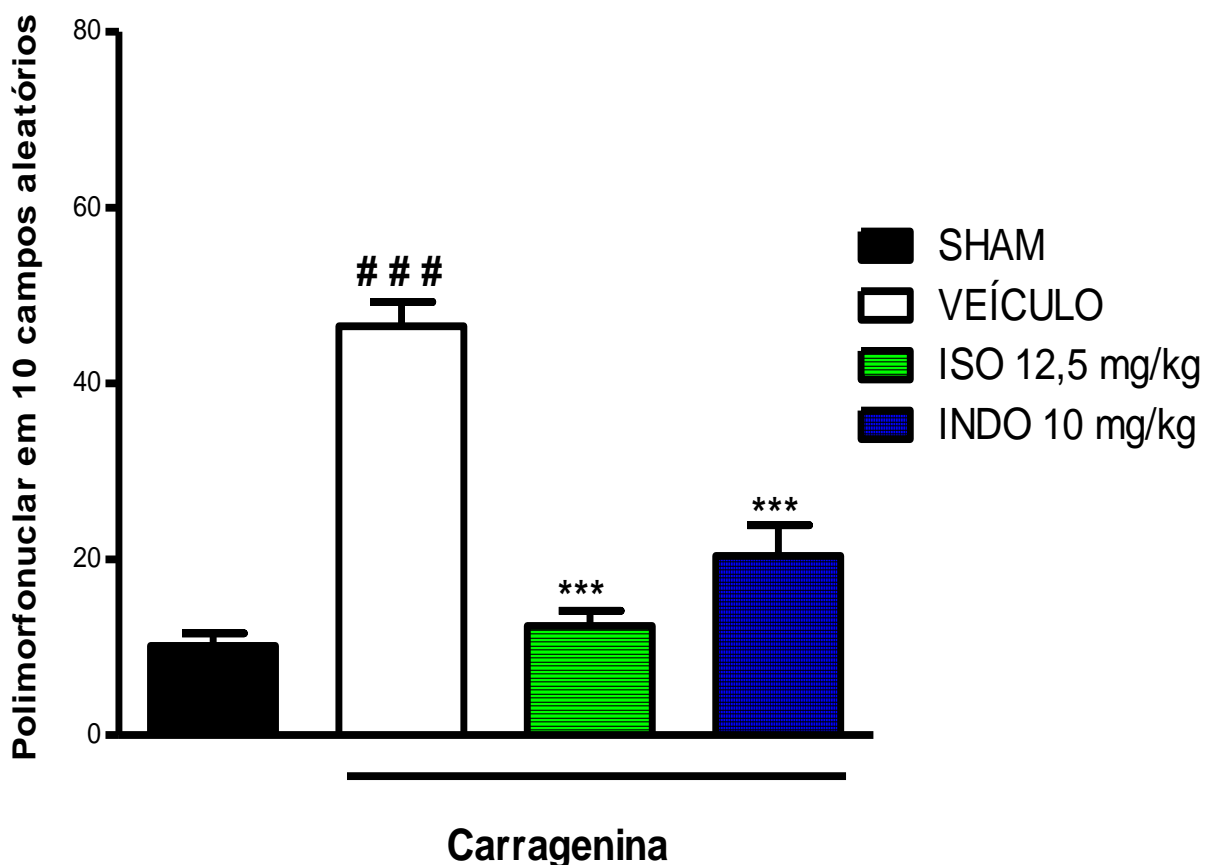
**Tabela 3:** Efeito da administração aguda do isoplegol sobre migração de leucócitos totais induzida por 100 $\mu$ L de carragenina 1% na bolsa de ar em ratas (n=5-10). Cada grupo representa a média  $\pm$  E.P.M. ( $***p<0,001$  comparado com grupo controle; ANOVA uma via, teste de Tukey).

Tratamento	Dose (mg/kg), via oral	Leucócitos totais/mL	% Inibição
Controle	-	970 $\pm$ 51,48	-
ISO	3,12	940 $\pm$ 40,00	3,1
ISO	6,25	430 $\pm$ 83,06***	55,68
ISO	12,5	330 $\pm$ 33,91***	65,98
Indometacina	10	260 $\pm$ 43,01***	71,2

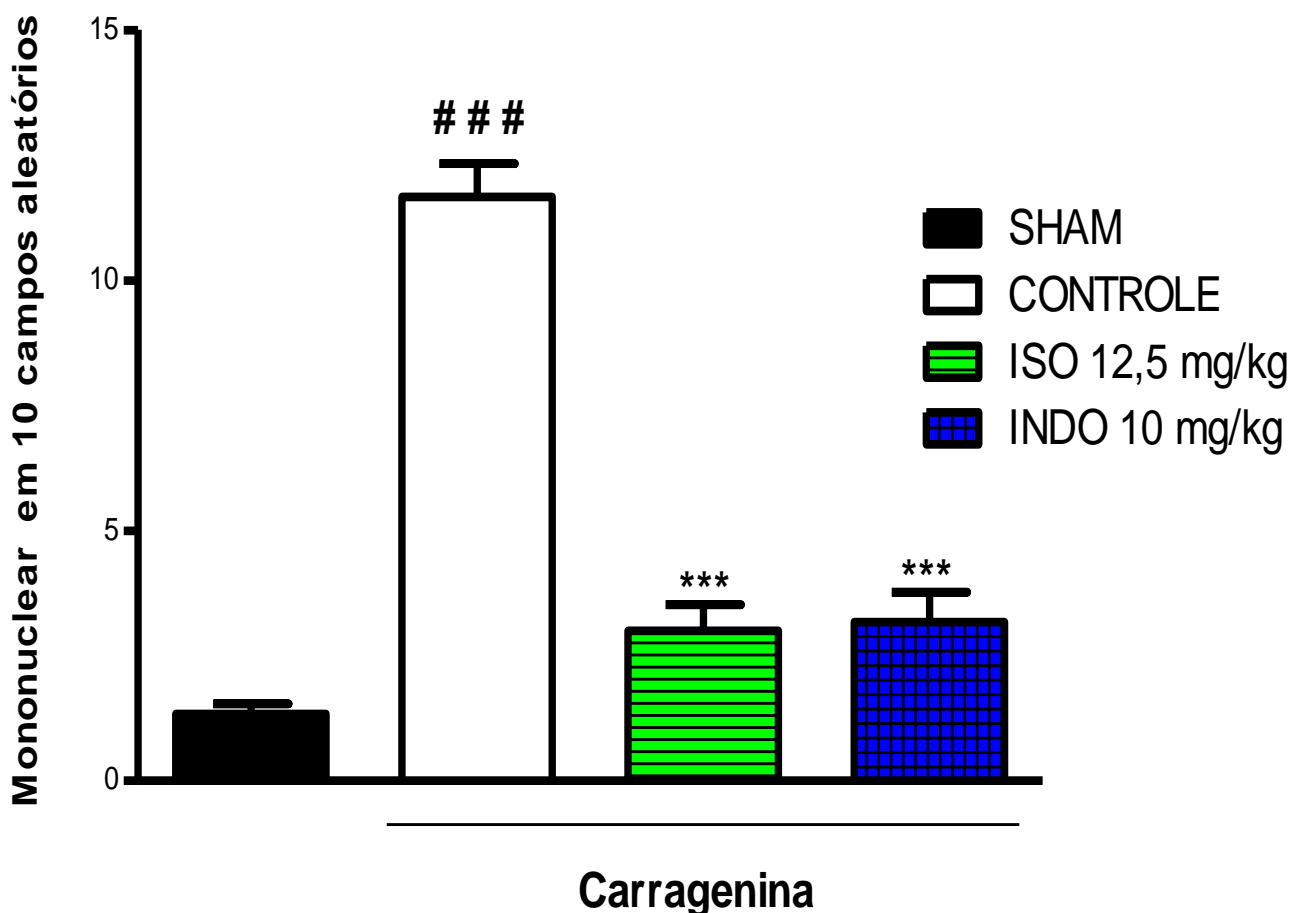
#### 4.2.5 Efeito do ISO sobre migração diferencial de leucócitos em peritonite induzida por carragenina em camundongos

O grupo que recebeu tratamento com ISO (12,5 mg/kg, v.o.) mostrou redução significativa ( $***<0,001$ ) da migração de leucócitos tanto polimorfonucleares quanto mononucleares para bolsa de ar em ratas induzida por carragenina 1%, comparado ao grupo controle (**Figura 21**). A Indometacina (10 mg/kg, v.o.) também reduziu ( $***<0,001$ ), a migração leucocitária comparada ao controle.

**Figura 21:** Efeito da administração aguda do isopulegol sobre migração de leucócitos polimorfonucleares na peritonite induzida por 100 $\mu$ L de carragenina 1% em camundongos (n=5) Cada grupo representa a média  $\pm$  E.P.M. ( $***p<0,001$  comparado com grupo controle;  $###p<0,001$  comparado ao grupo sham; ANOVA uma via, teste de Tukey).



**Figura 22:** Efeito da administração aguda do isopulegol sobre migração de leucócitos mononucleares na peritonite induzida por 100µL de carragenina 1% em camundongos (n=5) Cada grupo representa a média ± E.P.M. (\*\*\*p<0,001 comparado com grupo controle; ###p<0,001 comparado ao grupo sham; ANOVA uma via, teste de Tukey).



**Tabela 4:** Efeito da administração aguda do ISO sobre migração de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares em peritonite induzida por 100µL de carragenina 1% em camundongos (n=5). Cada grupo representa a média ± E.P.M. (\*\*\*p<0,001 comparado com grupo controle; ANOVA uma via, teste de Tukey).

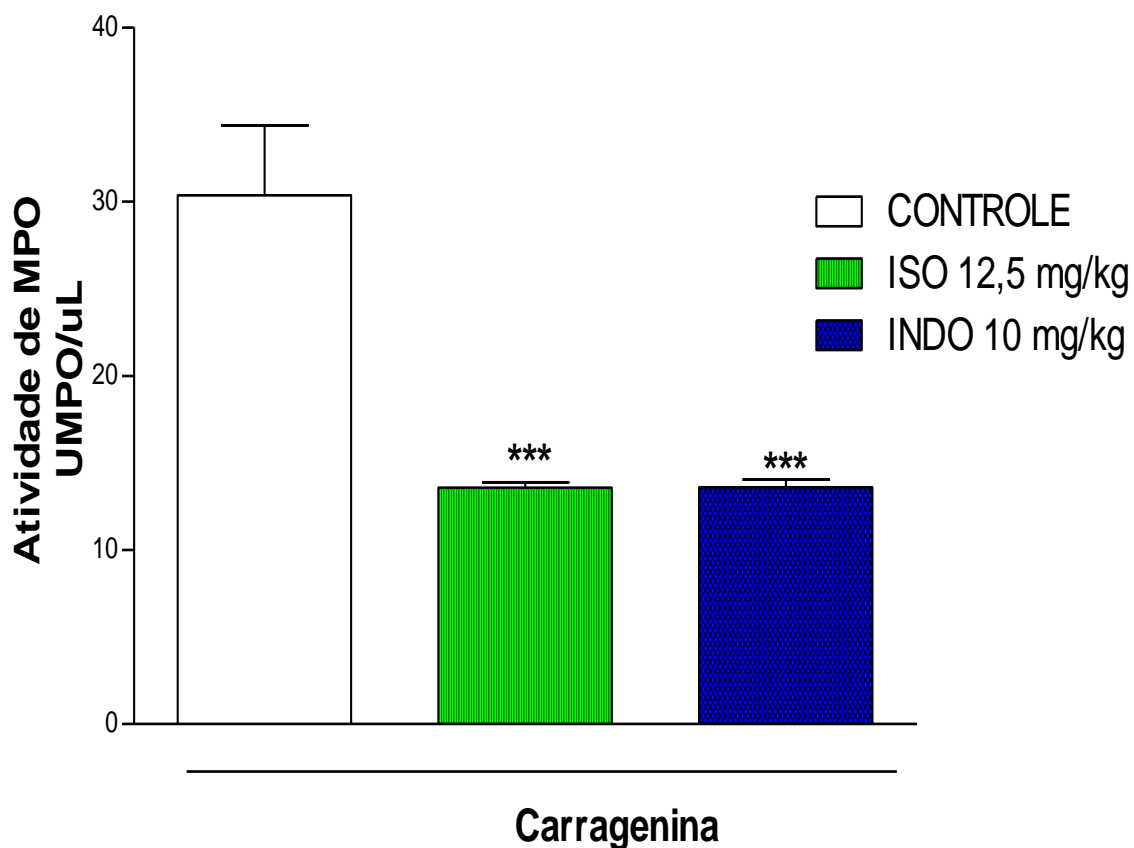
Tratamento	Dose (mg/kg), via oral	Leucócitos totais/mL		% Inibição	
		Mononucleares	Polimorfonucleares	P	M
Controle	-	11,66 ± 0,66	46,50 ± 2,77	-	-
ISO	12,5	3,00 ± 0,51***	12,4 ± 1,74***	73,34	74,3
Indometacina	10	3,16 ± 0,60***	20,40 ± 3,50***	56,13	72,9



### 3.6.6 Efeito do ISO sobre a atividade da Mieloperoxidase (MPO) no exsudado de bolsa de ar subcutânea

A **figura 23** mostra que o ISO (12,5 mg/kg, v.o.) administrado 1 hora antes da carragenina, inibiu de forma significativa a atividade de MPO quando comparado com o grupo veículo (veículo:  $33,85 \pm 3,15$  e ISO 12,5 mg/kg:  $13,58 \pm 0,30$  \*\*\* $p < 0,001$ ). Nas mesmas condições experimentais a indometacina (10 mg/kg) também reduziu a atividade da MPO ( $13,60 \pm 0,44$ ) (\*\* $p < 0,001$ ).

**Figura 23:** Efeito da administração aguda do isopulegol sobre a atividade da Mieloperoxidase (MPO) no exsudado de bolsa de ar subcutânea induzida por 100 $\mu$ L de carragenina 1% em camundongos (n=5) Cada grupo representa a média  $\pm$  E.P.M. (\*\* $p < 0,001$  comparado com grupo controle; ANOVA uma via, teste de Tukey).



## *DISCUSSÃO*

---

## 5 DISCUSSÃO

Os monoterpenos, principais constituintes dos óleos essenciais, já mostraram e vêm mostrando que são dotados de diversas propriedades biológicas e farmacológicas, dentre elas podemos citar atividades anti-inflamatória, gastroprotetora, ansiolítica, antidiabética, anticonvulsivante e antinociceptiva (DE SOUSA et al., 2006; RIELLA et al., 2012, NISHIJIMA et al., 2014; RIBEIRO et al., 2016; TAN, et al., 2016). Como citado anteriormente, o ISO é um monoterpene álcool que possui várias atividades farmacológicas, contudo não se encontra na literatura estudos que mostram sua atividade antinociceptiva e anti-inflamatória em diferentes modelos de nocicepção e inflamação química e mecânica em roedores.

Inicialmente, para avaliar a dor nociceptiva foi realizado o teste de formalina. A nocicepção induzida por formalina é comumente empregada como um modelo de dor aguda, caracterizada pela presença de respostas nociceptivas bifásicas distintas. A primeira fase ocorre durante os primeiros 5 minutos e corresponde à dor neurogênica, nesta fase há liberação de bradicinina e substância P (SP) que promovem a ativação direta de receptores transientes, localizados potencialmente nos canais cátions A1 nas fibras sensoriais C, refletindo uma dor mediada centralmente (MCNAMARA et al., 2007). A segunda fase ocorre entre 15 e 30 minutos após o estímulo, também conhecida como fase inflamatória, é mediada por uma combinação de mediadores inflamatórios periféricos liberados de tecidos lesionados, como histamina, 5-HT, PGs, bradicinina e aminoácidos excitatórios, causando a sensibilização de neurônios nociceptivos centrais (ROSLAND et al., 1990; TJOLSEN et al., 1992; PARADA et al., 2001; TAN-NO, et al. 2001; LARSEN et al, 2009).

O ISO mostrou-se efetivo contra nocicepção induzida por formalina nas duas fases do teste, figura 06. Estudos anteriores mostraram que drogas que atuam principalmente no SNC inibem ambas as fases igualmente, enquanto drogas de ação periférica inibem a segunda fase (TJOLSEN et al., 1992). Com isso podemos sugerir que o ISO possa agir pela inibição de mediadores inflamatórios diretos e indiretos e possivelmente através das vias de transmissão no nível do SNC (tais como SP e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina- CGRP), podendo ser comparado com outros monoterpenos estruturalmente semelhantes, como o  $\gamma$ -TPN e o carvacrol, que apresentam efeitos antinociceptivos semelhantes (PASSOS, et al., 2015; MELO et al., 2012).

Para comprovação da ação neurogênica do ISO observada no teste de formalina, o mesmo foi testado na nocicepção induzida por capsaicina. A capsaicina (8-metil-N-vanilil-trans-6-nonenamida), um componente pungente de pimentas vermelhas do gênero *Capsicum*

(TANG, HAAS, HU, 2004), é uma ferramenta farmacológica utilizada para estimular as terminações nervosas térmicas e nociceptivas causando dor intensa por agir especificamente em fibras do tipo C não mielinizadas do receptor vanilóide (TRPV1) no sistema nervoso periférico (SNP), pela abertura de canais de cátions não seletivos ( $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$ ), causando despolarização e iniciação de potenciais de ação (SZALLASI; BLUMBERG, 1999).

Neste teste o ISO, figura 07, foi capaz de inibir a dor durante os 5 min de observação assim como a morfina. Os resultados encontrados sugerem duas possíveis interpretações para o efeito antinociceptivo do ISO na dor neurogênica induzida pela capsaicina. Primeiro, o ISO estaria impedindo a liberação de neuropeptídeos, como por exemplo, as neurocininas A (NKA) e B (NKB) e substância P, que participam na transmissão de dor na via nociceptiva e em processos inflamatórios (LABRAKAKIS, MACDERMOTT, 2003; SAKURADA et al., 1996). Em segundo lugar, o ISO poderia antagonizar a atividade da capsaicina por competir com ela nos terminais nociceptivos das fibras C. Outros monoterpenos, como o carvacrol e citronelal, também promovem atividade antinociceptiva no teste de capsaicina (GUIMARÃES et al., 2010; QUINTANS-JÚNIOR et al., 2010).

Estudos mostram que a SP, um dos neurotransmissores liberados na dor induzida pela capsaicina, induz a transmissão sináptica glutamatérgica (WALLENGREN, HAKÁNSON, 2008; SAKURADA et al., 1992). Sendo assim, pesquisamos a participação da via glutamatérgica no efeito antinociceptivo do ISO.

O glutamato é um dos principais neurotransmissores excitatórios no sistema nervoso central dos mamíferos, desempenha um papel importante tanto na função celular e fisiológica, quanto na lesão celular (ANJANEYULU; BERENT-SPILLSON, RUSSELL, 2008). Ele ativa diretamente receptores em fibras nociceptivas, liberando diversos mediadores inflamatórios e neuropeptídeos, e envolve sítios de ação periféricos, espinhais e supraespinhais (BEIRICH et al. 2002; MILLAN, 1999; FUNDYTUS, 2001). O glutamato age através de receptores glutamatérgicos do tipo metabotrópicos e ionotrópicos (ANJANEYULU; BERENT-SPILLSON e RUSSELL, 2008).

O ISO nas doses 3,12 e 6,25 mg/kg como mostrado na figura 08, foi capaz de inibir de maneira significativa e dependente da dose a nocicepção induzida pelo glutamato em camundongos. Esses resultados sugerem que o ISO pode agir diretamente nos receptores de glutamato ou impedir a liberação dos diversos mediadores inflamatórios e neuropeptídeos que estão envolvidos na transmissão nociceptiva do glutamato no SNC e SNP, mostrando que o ISO provavelmente possui ação antinociceptiva tanto periférica quanto central nesse modelo (MILLAN, 1999; FUNDYTUS, 2001).

Pesquisa envolvendo a modulação da neurotransmissão glutamatérgica vem ganhando destaque na promoção do efeito antinociceptivo de diversos monoterpenos, como exemplo, o linalol, que mostrou efeito antinociceptivo contra a nocicepção induzida por glutamato em camundongos (BATISTA et al., 2008).

Em seguida, a fim de elucidar possíveis mecanismos antinociceptivos do ISO, 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 com os receptores opióides, visto que esse sistema interfere na ação de um dos analgésicos mais potentes usados clinicamente, a morfina, que serve como fármaco padrão no estudo da nocicepção (PIETROVSKI et al., 2006). Existem vários tipos de receptores opióides, porém três são os mais conhecidos:  $\mu$ ,  $\delta$  e  $\kappa$ , todos pertencentes à família de receptores acoplados à proteína G (CHEN, 1993). O sistema opióide é um importante sistema inibitório na nocicepção, que age através de duas vias principais, central e periférica, sendo que em vias centrais os agonistas opióides atuam sobre a massa cinzenta periaquedutal, bulbo rostroventral e corno dorsal da medula espinhal, ativando as vias descendentes de controle da dor (BLEAKMAN; ALT; NISENBAUM, 2006; XU, et al., 2015).

O pré-tratamento dos animais com a naloxona, um antagonista não seletivo dos receptores opióides, inibiu a atividade antinociceptiva do ISO. A partir desses resultados podemos sugerir que o efeito antinociceptivo do ISO possa ser devido à ocupação dos receptores opióides seja por ele próprio ou pela ativação de opióides endógenos, que, uma vez ativados são modulados alostericamente, alterações na bioquímica intracelular do neurônio, levando a uma hiperpolarização da membrana com aumento da condutância ao potássio e a inativação dos canais para cálcio, determinando assim a diminuição da liberação dos neurotransmissores excitatórios (NISENBAUM, 2006; XU, et al., 2015).

O efeito antinociceptivo do ISO também foi antagonizado pelo pré-tratamento com a glibenclamida, antagonista dos canais de  $K^+_{ATP}$ , sugerindo que o monoterpeno exerceu sua atividade antinociceptiva através da abertura de canais para  $K^+$  sensíveis ao ATP, promovendo um efluxo de íons  $K^+$ , levando a repolarização ou hiperpolarização da membrana, diminuindo conseqüentemente a excitabilidade desta, dificultando a propagação do estímulo nociceptivo, figura 10 (OCAÑA et al., 2004; KAWANO et al., 2009; WANG; ZHANG, 2011).

Estes resultados mostrados na figuras 09 e 10, sugerem que a antinocicepção do ISO envolve o sistema opióide via canais de  $K^+_{ATP}$ , corroborando como os estudos de Silva e

colaboradores (2009) que mostraram que o ISO apresenta efeito gastroprotetor também pela via dos canais de  $K^+_{ATP}$ . Os canais de potássio desempenham um papel muito importante na dor e são um dos responsáveis pela determinação do potencial de repouso da membrana, no controle da excitabilidade dos neurônios e na liberação de neurotransmissores, a morfina, por exemplo, é um analgésico potente que tem seu efeito bloqueado por antagonistas desses canais. (WANG; ZHANG, 2011). A ativação dos canais de  $K^+_{ATP}$  causa uma hiperpolarização que leva a uma redução na geração de potenciais de ação, portanto os ativadores desses canais se destacam pelo potencial analgésico (OCAÑA et al., 2004). Estudos mostram que outros monoterpenos como o timol e carvacrol exercem efeitos antinociceptivos por essa mesma via (HAESELER et al., 2002; KAWANO et al., 2009; DU; RIBEIRO, et al., 2016).

Dando prosseguimento à pesquisa, testamos se o efeito antinociceptivo do ISO há envolvimento colinérgico com a participação dos receptores muscarínicos. Agonistas desses receptores podem agir como importantes analgésicos, uma vez que quando a acetilcolina é liberada pela medula espinhal também produz antinocicepção, por ativarem esses receptores (YOON; CHOI; JEONG, 2003). Em estímulos dolorosos, opióides sistêmicos são conhecidos por aumentar os níveis da acetilcolina na medula espinhal (HAMURTEKIN; GURUN, 2006; CHIARI, EISENACH J. C., 1998). A atropina, antagonista não seletivo dos receptores muscarínicos, foi capaz de reverter à ação antinociceptiva do ISO de modo significativo, figura 11.

Esses resultados nos levam a crer que o efeito antinociceptivo do ISO tenha origem central, uma vez que o principal local de ação para colinomiméticos em analgesia é o cordão espinhal. O ISO, provavelmente, ativa os receptores muscarínicos no cordão espinhal resultando no aumento da liberação de transmissores inibitórios (GABA) e diminuem a liberação de transmissores excitatórios (glutamato), e essa ativação, em parte, medeia o seu efeito antinociceptivo (JONES; DUNLOP, 2007).

Quando os nociceptores são ativados ocorre geralmente uma estimulação da cascata de sinalização intracelular com vários mediadores, como NO e GMPc. As concentrações de NO estão diretamente relacionadas à nocicepção, visto que um aumento na produção de NO aumenta a concentração de GMPc, assim como leva a ativação de receptores NMDA de glutamato (SACHS; CUNHA; FERREIRA, 2004; PEANA et al., 2006; VALE et al., 2007; WANG et al., 2008). Também é sugerida uma interação entre o NO e a prostaglandina na qual a produção de  $PGE_2$  é aumentada (NUSSLER; BILLIAR, 1993). A inibição da produção de NO por inibidores da NOS parece diminuir a produção de  $PGE_2$  em modelos *in vitro* e *in vivo*.

Este efeito parece ser mediado pela habilidade do NO em induzir a enzima COX, por um mecanismo ainda não bem definido (GELLER et al., 2012). Sabendo-se da importância da via L-arginina-NO-GMPc, procurou-se investigar a participação da via nitrérgica na ação do ISO.

Nossos resultados mostraram que o efeito antinociceptivo do ISO está relacionado com a via L-arginina-óxido nítrico, uma vez que a L-arginina conseguiu reverter essa ação antinociceptiva do ISO, sugerindo que o monoterpene interfere na síntese do NO e assim pode agir reduzindo os níveis de COX e conseqüentemente a produção de PGE<sub>2</sub>, figura 12 (NUSSLER; BILLIAR, 1993; GELLER et al., 2012) ou ainda pode impedir a ligação do NO ao ferro do grupo prostético heme da enzima guanilato ciclase solúvel para ativá-la. A guanilato ciclase solúvel desativada não produz o GMPc, que está diretamente relacionado com efeitos pro-nociceptivos (VALE et al., 2007), produzindo o efeito analgésico final (LUO; CIZKOVA, 2000; SCHMIDTKO; TEGEDER; GEISLINGER, 2009; 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;). Sistemicamente o bloqueio da cascata L-arginina/NO/GMPc provoca uma redução na nocicepção (DUARTE; LORENZETTI; FERREIRA, 1990; DUARTE et al., 1992). Assim, o azul de metileno é um inibidor específico da guanilato ciclase, que inibe indiretamente a formação de GMPc por oxidação do ferro heme da enzima (ABACIOGLU et al., 2000; EL DESOKY; FOUAD, 2005; MARUNA P, MASEK Z, SCHREIBER V., 1994; HOLTHUSEN H., 1997)

Os resultados citados anteriormente e a figura 13, mostraram que o azul de metileno e o ISO reduziram o comportamento nociceptivo dos animais, e a associação dessas duas substâncias manteve o mesmo padrão de resposta antinociceptiva quando comparadas as administrações sem associação. Como não houve sinergismo, aumento na ação antinociceptiva, nem reversão do efeito, provavelmente o ISO esteja agindo por mecanismos que se assemelham ao do azul de metileno, (KURTZ, 1980). Sugerindo que o monoterpene também reduza a concentração do GMPc direta ou indiretamente por inibir guanilato ciclase (DUARTE; LORENZETTI; FERREIRA, 1990).

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, podem sofrer a interferência de drogas que promovam sedação, levando a uma deficiência da coordenação motora, fazendo com que as respostas não sejam necessariamente antinociceptivas. Estudos anteriores usando o teste de campo aberto mostraram que o ISO nas doses de 25 e 50 mg/kg, doses maiores de que aquelas que se mostraram efetivas contra

nocicepção, não alteraram significativamente a capacidade exploratória em camundongos, comparado ao Diazepan (2 mg/kg), que diminuiu esse parâmetro. Portanto, é pouco provável que os efeitos antinociceptivos do isopulegol baseiem-se na depressão do SNC (SILVA, et al., 2007). Outro parâmetro que se deve levar em consideração é se o isopulegol interfere na coordenação motora dos animais. Através do teste rota rod, um modelo clássico usado para avaliar bloqueio neuromuscular periférico em animais, e nas mesmas doses do teste anterior, Silva e colaboradores (2007) mostraram que o ISO não afetou significativamente a coordenação motora dos animais.

Com base nesses resultados, procurou-se avaliar o efeito antinociceptivo do ISO em outro modelo de dor, com maior correlação clínica. A alta efetividade deste monoterpene em inibir a segunda fase do teste da formalina, aliada ao fato da grande dificuldade de tratamento da dor inflamatória, tornou-se oportuna a avaliação da ação dessa substância em modelo de dor inflamatória.

Dando continuidade aos estudos foi avaliada a ação do ISO na hiperalgesia aguda. Para isso foi realizado o modelo de hiperalgesia inflamatória induzida pela carragenina no 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).

A injeção intraplantar de carragenina é um modelo comum para a inflamação e dor inflamatória. As carrageninas são extraídas de algas vermelhas (*Gigartinales*, Rhodophyta) e são altamente utilizadas nas industriais como espessantes, gelificantes, suspensores, estabilizantes ou agentes de texturização. (VAN DE VELDE, 2008; VILLANUEVA; HILLIOU; SOUSA-PINTO, 2009). A carragenina produz edema e uma sensibilidade exacerbada para estímulos térmicos e mecânicos que é conhecido como hiperalgesia (NANTEL et al., 1999; FARSHID; TAMADDONFARD et al., 2014; PONTE et al., 2010; RODRIGUES et al., 2012). A carragenina produz inflamação e é caracterizada por um comportamento bifásico relacionado a edema. A primeira fase (0 -1 h) tem sido atribuída à liberação de histamina, 5-HT e bradicinina. Na segunda fase (1- 6 h), ocorre alta produção de PGs e espécies reativas de oxigênio. No entanto, parece desenvolver hiperalgesia em paralelo com o aumento de COX<sub>2</sub> em nível espinal e seu pico ocorre apenas dentro de quatro horas após a injeção de carragenina (DI ROSA; SORRENTINO, 1970; HILÁRIO; TERRERI; LEN, 2006).



Nossos resultados mostraram que o ISO produziu inibição significativa da hipersensibilidade mecânica (Randall-Sellito) com conseqüente aumento do limiar de retirada da pata na hiperalgesia inflamatória induzida por carragenina por diferentes vias de administração, sistêmica e intraplantar, a partir da primeira hora e seu efeito perdurou constante até a sexta hora, figura 14 e 15. Resultado semelhante à indometacina, anti-inflamatório padrão usado no teste baseado em sua eficácia na dor inflamatória por inibir COX e com isso inibir a produção e ação da PGE<sub>2</sub> (GHOSH, 1974). A administração intraplantar de ISO não alterou o limiar nociceptivo da pata contralateral, sugerindo que a nocicepção induzida por ISO pode ser mediada apenas localmente quando administrado por essa via, outro monoterpeneo como o linalol tem efeito semelhante quando administrado localmente (SAKURADA, 2011).

Esses resultados indicam que a ação anti-hiperalgésica do ISO possa está relacionada com a inibição de vários mediadores inflamatórios endógenos, como os metabólitos do ácido araquidônico, como a PGE<sub>2</sub>, produtos originados de mastócitos, histamina, SP, BK, neuropeptídeos, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , além de fatores de transcrição como o fator de transcrição nuclear (NF- $\kappa$ B) (CUNHA et al., 2008). Podemos sugerir também que o ISO possa reduzir os níveis COX<sub>2</sub> em nível espinhal impedindo que a hiperalgesia se instale (DI ROSA; SORRENTINO, 1970; HILÁRIO; TERRERI; LEN, 2006).

Na hiperalgesia induzida diretamente por PGE<sub>2</sub>, figura 16, nossos dados mostraram que o ISO, por via intraplantar, aumentou o limiar de nocicepção a partir da primeira hora e seguiu constante até a sexta, resultado semelhante à ação da dexametasona, anti-inflamatório padrão usado no teste. Estes dados sugerem que a injeção intraplantar de ISO pode reduzir a hiperalgesia periférica que é, pelo menos em parte, mediada através de sua ação direta em receptores de PGE<sub>2</sub> periféricos ou indiretamente bloqueando pontos na via de sinalização envolvendo as PGE<sub>2</sub>, atenuando a dor inflamatória que é gerada em parte pela sensibilização dos nociceptores provocada pelas prostaglandinas (ZARPELON et al., 2013).

Dando continuidade aos estudos, avaliamos a ação antiedematogênica do ISO no edema de pata induzido por carragenina, figura 17. Os dados apresentados neste estudo demonstram que o pré-tratamento dos animais com o ISO reduziu significativamente o desenvolvimento do edema de pata da 1<sup>a</sup> à 6<sup>a</sup> hora, sugerindo que a ação antiedematogênica deste monoterpeneo esteja relacionada tanto com a inibição de histamina, serotonina e bradicinina, quanto com a inibição de COX o que leva a uma redução na produção de prostaglandinas, atenuando as citocinas envolvidas nas duas fases do processo inflamatório (KALE et al., 2007). Resultados semelhantes foram demonstrados em estudos com os

monoterpenos linalol e geranial, os quais apresentaram atividade anti-inflamatória frente ao modelo de edema de pata induzido por carragenina (NAKAJIMA et al., 2007).

Assim como a carragenina, a dextrana é um agente flogístico que induz processo inflamatório através uma série de eventos vasculares, tais como promover o extravasamento vascular, à migração de células para o sitio inflamatório, desgranulação de mastócitos e a liberação de mediadores inflamatórios como histamina e serotonina (METCALFE, 2008; WINTER et al., 1962).

Nossos estudos mostraram que o tratamento prévio dos camundongos com ISO atenuou significativamente o edema de pata induzido por dextrana, constatado pela redução do peso da pata direita, tratada com dextrana, comparado ao controle, figura 18. Esse padrão de resposta no grupo que recebeu ISO também foi obtido no grupo que foi tratado com a Ciproheptadina, fármaco padrão que também se mostrou eficaz para reduzir a formação do edema. Um possível mecanismo da capacidade antiedematogênica do ISO seria a possibilidade do ISO antagonizar especificamente os agentes responsáveis diretamente pelo edema ou impedindo sua síntese (COURVOISIER; DUCROT, 1955). Esses achados confirmam o resultado positivo do ISO nas primeiras horas no teste anterior de edema de pata induzido por carragenina, sugerindo sua capacidade de bloquear as ações da histamina e serotonina. Estudos mostram que outros monoterpenos também exibem esse padrão de atividade antiedematogênica, como por exemplo, o carvacrol que descrito por Silva e colaboradores (2012), mostrou-se eficaz em reduzir edema induzido por dextrana.

Sendo assim, investigamos a atividade antiedematogênica do ISO no edema de pata induzido pela  $PGE_2$ , figura 19. A  $PGE_2$ , um produto do ácido araquidônico catalisado pela enzima cicloxigenase, é liberada após sua síntese e desempenha função biológica ativando seu receptor (EP) acoplado a proteína G. A heterogeneidade nas funções biológicas da  $PGE_2$  é conferida à sua ligação pelo menos a quatro subtipos de diferentes de receptores EP que, por sua vez expressam seus sinais através de alteração do cálcio intracelular ( $Ca^{2+}$ ) ou modificações dos níveis de adenosina-monofosfato cíclico (cAMP) (DEWITT, 1991).

Dessa forma, a  $PGE_2$  é responsável pela ativação de uma série de cinases que modulam sequentemente uma série de funções celulares, podendo levar a uma resposta inflamatória caracterizada pelo extravasamento de plasma, dor e febre (DEY et al., 2006). O edema de pata induzido por  $PGE_2$  é utilizado como um método clássico para elucidar o papel de um potencial fármaco sobre a atividade desse mediador inflamatório. Todavia, esse protocolo não permite considerar a atividade das ciclooxygenases, devido à aplicação direta da própria molécula ao tecido.

Os resultados obtidos no edema de pata induzido pela injeção de PGE<sub>2</sub>, em camundongos pré-tratados com ISO mostram redução do edema de maneira semelhante à dexametasona, um fármaco padrão utilizado na clínica médica como inibidor da COX. Estes dados revelam que a substância inibiu a ação da PGE<sub>2</sub> e que esse efeito inibitório pode ser devido a ligação direta do ISO ao receptor da PGE<sub>2</sub> ou ainda bloqueando pontos na via de sinalização induzida pela PGE<sub>2</sub> (GHOSH, 1974).

Sabendo que o ISO apresenta atividade antiedematogênica em edemas induzidos por diferentes agentes flogísticos, buscamos saber se o ISO interfere sobre a migração de leucócitos para o local da injúria, outro evento importante para a instalação no processo inflamatório (MEDZHITOV, 2010). Para avaliar tais parâmetros utilizamos os modelos experimentais de bolsa de ar em ratas e peritonite em camundongos, ambas induzidas por carragenina.

A fagocitose e eliminação de agentes agressores durante a inflamação é realizada principalmente pelos leucócitos. Eles são recrutados da circulação para o local da lesão através de interações com o endotélio microvascular, onde ocorre a transmigração dessas células através da parede dos vasos e extravasamento atingindo o tecido extravascular (CAMPBELL et al., 2014; MITROULIS et al., 2015; ULBRICH; YONEKAWA; HARLAN, 2005). Com o reconhecimento do papel dos leucócitos nos processos inflamatórios agudos, muita atenção tem sido conferida a modelos animais de inflamação aguda que permitam avaliar a migração desses leucócitos. Os modelos animais envolvendo cavidades como a pleural, peritoneal, e também o modelo de inflamação na bolsa de ar, permitem a mensuração quantitativa da migração celular, mediadores inflamatórios e extravasamento plasmático após a indução de um processo inflamatório agudo desencadeado por diferentes agentes irritantes (SEDGWICK; LEES, 1986).

Uma característica de inflamação aguda é a ativação de neutrófilos e a migração de células endoteliais vasculares através de locais de inflamação. A injeção de carragenina em cavidades induz a inflamação determinada por um acúmulo de exsudato (extravasamento de fluido e proteínas do espaço intravascular para a cavidade) e migração de leucócitos para a cavidade quatro horas após o estímulo (EDWARDS; SEDGWICK; WILLOUGHBY, 1981; NAKAMURA; FERREIRA, 1987; POSADAS et al., 2004). Quando a carragenina induz o processo inflamatório agudo, os leucócitos polimorfonucleares (PMN) migram em grande quantidade para as áreas de tecido danificado. Eles são as primeiras células a serem recrutadas para o local da agressão e podem ser altamente ativados por uma grande variedade de ligandos (LI et al., 2014).

Nossos resultados mostram que o ISO reduziu de forma significativa à migração de leucócitos em ambos os modelos de bolsa de ar e peritonite, figura 20, 21e 22. Esses resultados sugerem que o ISO pode estar impedindo o aumento da permeabilidade capilar e conseqüentemente a infiltração de celular induzida pela carragenina (MALECH; GALLIN, 1987). Outra possibilidade seria que o ISO poderia está interferindo nos agentes quimiotáticos, principalmente citocinas e quimiocinas, que recrutam os leucócitos para o local da lesão (BROOKS; DAY, 1991). Pesquisas mostraram que leucócitos ativados podem sintetizar e libertar um arsenal de moléculas, tais como citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, os quais podem subseqüentemente ativar novos leucócitos. Podem ativar as células endoteliais que conduzem a interação de neutrófilos culminando nos eventos sequenciais de rolamento, a adesão, transmigração (FUJISHIMA et al., 1993; HALLETT et al., 2008; SILVA et al., 2015).

O recrutamento de neutrófilos, figura 23, é favorecido pela atividade da enzima MPO que participa da defesa imunitária inata e modifica o padrão eletrostático do endotélio, o que facilita a interação dos mesmos com quimiocinas e moléculas de adesão e atividade microbida formando oxidantes reativos e radicais difusíveis (KLEIKERS et al., 2012; NAJAFI; MOHAMMADI, 2015; NUSSBAUM et al., 2012). O acúmulo de uma grande quantidade de MPO nos tecidos, devido à infiltração excessiva de PMN e degranulação, contribui significativamente para o dano tecidual e disfunção na inflamação (DAVIES, 2011; DAVIES et al., 2008). Os neutrófilos representam os transportadores primários de MPO, essa enzima é estocada nos grânulos primários de neutrófilos ativados (ARNHOLD; FLEMMIG, 2010; LO; ALMEIDA; BEAVEN, 1982). Assim, a MPO pode ser usada como um marcador bioquímico do conteúdo de neutrófilos no exsudato (SZALAI et al., 2014). A análise da sua atividade é uma forma indireta de demonstrar a presença ou não dessas células no exsudato inflamatório.

Nossos resultados mostram que o ISO (12,5 mg/kg) e indometacina, reduziram de forma significativa a atividade da enzima MPO. O provável motivo desse efeito reside no fato que o ISO foi capaz de reduzir a migração de células inflamatórias para o sítio da lesão. Assim a atividade anti-inflamatória do ISO pode ser resultado da redução da presença de neutrófilos ativados na cavidade inflamada, em função da diminuição da atividade da MPO (SZALAI et al., 2014). Outros monoterpenos também mostram inibição semelhante, como a verificada nos experimentos realizados por LI e colaboradores (2014), onde foi demonstrado que o linalol inibiu a migração de leucócitos e essa inibição se deu principalmente pela sua

capacidade em inibir a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, no modelo de peritonite induzida pelo LPS (LI; ZHANG; HUANG, 2014).

Neste contexto, os resultados obtidos com o ISO confirmam sua ação antinociceptiva e anti-inflamatória com resultados promissores no tratamento da dor aguda, com boas perspectivas de aplicabilidade clínica por ser uma substância com baixo risco de toxicidade e já utilizada por humanos com outras finalidades, além disso, a efetividade antinociceptiva sistêmica e local aguda ampliam as possíveis aplicações clínicas do ISO, que poderá vir a ser utilizado por pacientes numa gama bem variada de formulações com finalidade analgésica. Assim, novos estudos são necessários para que esse monoterpene possa estar disponível como analgésico para a população.

**CONCLUSÃO**

---

## 6 CONCLUSÃO

- ✓ O ISO mostrou eficácia ao combater a nocicepção química induzida por formalina, capsaicina e glutamato, dependente da dose neste último, com efeito sistêmico e periférico.
- ✓ A ação antinociceptiva do ISO parece ocorrer possivelmente por envolvimento do sistema opióide via canais  $K^+$ <sub>ATP</sub>, receptores muscarínicos com participação de via da L-arginina óxido nítrico e  $GMP_c$ .
- ✓ O ISO por via oral e intraplantar reduziu significativamente a hiperalgisia inflamatória induzida por carragenina e o ISO por via intraplantar reduziu a hipernocicepção inflamatória induzida  $PGE_2$ , utilizando o método de compressão de pata Randall-Sellito, isso sugere que a ação anti-hiperalgésica do ISO apresenta inibição de mediadores inflamatórios e nociceptivos tais como histamina, serotonina e  $PGE_2$  podendo agir diretamente sobre eles ou em seus receptores.
- ✓ Em modelos de inflamação o ISO apresentou efeito antiedematogênico em métodos de indução de edema de pata induzido por carragenina, dextrana e  $PGE_2$ , onde a atividade anti-inflamatória parece ser pela inibição de mediadores inflamatórios como histamina e serotonina e  $PGE_2$ .
- ✓ O ISO foi capaz de reduzir de modo significativo à migração leucocitária induzida por carragenina na peritonite em camundongos e na bolsa de ar em ratas.
- ✓ O ISO reduziu a atividade da MPO no exsudado da bolsa de ar em ratas.

*PERSPECTIVAS*

---

---



## **7 PERSPECTIVAS**

- ✓ Avaliar o efeito antinociceptivo do ISO em metodologia com estímulo nociceptivo térmico (placa quente) e químico com salina ácida e mentol;
- ✓ Investigar o efeito do ISO sobre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), bem como sobre as concentrações de interleucina-1 beta (IL-1  $\beta$ ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e óxido nítrico (NO<sub>2</sub>-), iNOS e COX no exsudato inflamatório de animais tratados com ISO no modelo experimental de bolsa de ar em ratas;
- ✓ Investigar a ação antinociceptiva em modelos de dor neuropática;
- ✓ Investigar a ação do ISO em modelos de inflamação crônica.

## *REFERÊNCIAS*

---

---

## REFERÊNCIAS

ABACIOĞLU, N.; TUNÇTAN B., AKBULUT E., ÇAKICI I. Participation of the components of L-arginine/nitric oxide/cGMP cascade by chemically-induced abdominal constriction in the mouse. **Life Sciences**. v. 67, n. 10, p. 1127-1137, 2000.

AKAIKE, T.; FUJII S, SAWA T, IHARA H. Cell signaling mediated by nitrated cyclic guanine nucleotide. Nitric Oxide - **Biology and Chemistry**, v. 23, p. 166–174, 2010.

ALLER, M. A. ARIAS J. L., SÁNCHEZ-PATÁN F., ARIAS J. The inflammatory response: an efficient way of life. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 12, n. 10, p. RA225–A234, 2007.

ANJANEYULU, Muragundla; BERENT-SPILLSON, Alison; and RUSSELL, James W. Metabotropic Glutamate Receptors (mGluRs) and Diabetic Neuropathy. **Current Drug Targets**, v.9, p. 85-93, 2008.

ARNHOLD, J.; FLEMMIG, J. Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2010.

ARONSON, Jeffrey K. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). Meyler's Side Effects of Drugs. **The International Encyclopedia of Adverse Drug Reactions and Interactions**. v. 16, p. 236–272, 2016.

ASHLEY, N. T.; WEIL, Z. M.; NELSON, R. J. Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 43, p. 12-143, 2012.

BAIGENT, C., BHALA N., EMBERSON, J., MERHI A., ABRAMSON, S. et al. Vascular and upper gastrointestinal effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs: Meta-analyses of individual participant data from randomised trials. **The Lancet**, v. 382, p. 769–779, 2013.

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.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-284, 2009.

BATTAGLIA G, R. A. Coexistence of glutamate and substance P in dorsal root ganglion neurons of the rat and monkey. **J Comp Neurol.**, v. 2, p. 302–12, 1988.

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.

BENNETT, M. I.; SMITH, B. H.; TORRANCE, N.; LEE, A. J. Can pain can be more or less neuropathic? Comparison of symptom assessment tools with ratings of certainty by clinicians. **Pain**, v. 122, n. 3, p. 289-94, 2006.

PRÓSPERO, D. F. A. Avaliação do potencial antinociceptivo e anti-inflamatório do isopulegol em roedores.

BINDOLI, A.; RIGOBELLO, M. P. Principles in redox signaling: from chemistry to functional significance. **Antioxidants & redox signaling**, v. 18, p. 1557–93, 2013.

BLEAKMAN, D.; ALT, A.; NISENBAUM, E.S. Glutamate receptors and pain. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 17, p. 592-604, 2006.

BLUMENTHAL, M.; GOLDBERG, A.; BRINCKMANN, J. *Herbal Medicine-Expanded Commission E Monographs*, **Integrative Medicine Communications**, Newton, Mass, USA, 2000.

BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, p. 618–622, 1982.

BRAZ, J. Transmitting Pain and Itch Messages: A Contemporary View of the Spinal Cord Circuits that Generate Gate Control. **Neuron**, v. 82, p. 522–536, 2014.

BRENNAN, F.; CARR, D. B.; COUSINS, M. Pain management: A fundamental human right. **Anesthesia & Analgesia**, v.105, p. 205-21, 2007.

BROOKS, P.M., DAY, R.O. Non-steroidal anti-inflammatory drugs differences and similarities. **N Engl J Med**. 324(24):1716-25, 1991.

BURKE, A. J., SULLIVAN F. J, GILES F. J., GLYNN S. A. The yin and yang of nitric oxide in cancer progression. **Carcinogenesis**, v. 34, p. 503–512, 2013.

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.

CATERINA, M.J.; SCHUMACHER, M.A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T.A.; LEVINE, J.D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**. v. 389, n. 6653, p.816-824, 1997.

CHEN, Y.; MASTEK, A.; LIU, J.; HURLEY, J.; YU, L. Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. **Molecular Pharmacology**, v.44, p.8-12, 1993.

CHIARI A., EISENACH J. C. - Spinal anaesthesia: Mechanisms, agents, methods, and safety. **Reg Anesth Pain Med**, v. 23, p. 357-362, 1998.

CHUAH, G.K., LIU, S.H.; JAENICKE, S.; HARRISON L.J. Isomerization of Citronellal to Isopulegol Using Eclectically Engineered Sulfated Zirconia–Carbon Molecular Sieve Composite Catalysts, UDCaT-2. **J.of Catal.**, **200**: 352-359, 2001.

CONAGHAN, P. G. Osteoarthritis in 2012: Parallel evolution of OA phenotypes and therapies. **Nature reviews. Rheumatology**, v. 9, p. 68–70, 2013.

COUTAUX, A.; ADAM, F.; WILLER, J.C.; LE BARS, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, v.72, p.359-371, 2005.

CULL-CANDY, S. G.; LESZKIEWICZ, D. N. Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. **Science's STKE**, n. 16, 2004.

CUNHA, T.M.; ROMAN-CAMPOS, D.; LOTUFO, C.M.; DUARTE, H.L.; SOUZA, G.R.; VERRI, W.A.J.; FUNEZ, M.I.; DIAS, Q.M.; SCHIVO, I.R.; DOMINGUES, A.C.; SACHS, D.; CHIAVEGATTO, S.; TEIXEIRA, M.M.; HOTHERSALL, J.S.; CRUZ, J.S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3Kgamma/AKT/nNOS/NO/KATP signaling pathway. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 107, n. 9, p. 4442-7, 2010.

CURY, Y., PICOLO G, GUTIERREZ V. P, FERREIRA S. H. Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. **Nitric Oxide**. v. 25, p. 243-254, 2011.

DAS, K SAMANTA, L; CHAINY, G.B. N. A modified espectrophotometric assay of superoxide dismutase using nitrite formation by superoxide radicals. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysucs**, v. 37, p. 201 - 204, 2000.

DAVIES, M. J., HAWKINS C. L., PATTISON D. I., REES M. D. **Mammalian heme peroxidases: from molecular mechanisms to health implications**. Antioxidants & redox signaling, v. 10, p. 1199–1234, 2008.

DAVIES, M. J. Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**, v. 48, p. 8–19, 2011.

DE SOUSA, D.P.; GONÇALVES, J.C.R.; QUINTANS JÚNIOR, L.; CRUZ, J.S.; ARAÚJO, D.A.M.; DE ALMEIDA, R.N. Study of anticonvulsant effect of citronellol, a monoterpene alcohol, in rodents. **Neuroscience Letters**, v. 401, p. 231-235, 2006.

DEWITT, D. L. Prostaglandin endoperoxide synthase: regulation of enzyme expression. **Biochimica et Biophysica Acta** v.1083, n. 2, p. 121-34, 1991.

DEY, I., LEJEUNE, M., CHADEE, K. Prostaglandin E2 receptor distribution and function in the gastrointestinal tract. **British Journal of Pharmacology** v.149(6), p. 611–623, 2006

DICKENSON, A. Mechanisms of Central Hypersensitivity: Excitatory Amino Acid Mechanisms and Their Control. **The pharmacology of pain**, v. 130, p. 167–210, 1997.

DONPUNHA, W.; SRIPUI, J.; SAE-EAW; A. and BOONLA, O. Mameo Pomace Extract Alleviates Hypertension and Oxidative Stress in Nitric Oxide Deficient Rats. **Nutrients**, p. 6179- 6194, 2015.

DORWARD, D.A.; LUCAS, C.D.; ROSSI, A.G.; HASLETT, C.; DHALIWAL, K. Imaging inflammation: Molecular strategies to visualize key components of the inflammatory cascade, from initiation to resolution. **Pharmacology & Therapeutics**, v.135, p.182–199, 2012.

DU, X.; WANG, C.; ZHANG, H. Activation of ATP-sensitive potassium channels antagonize nociceptive behavior and hyperexcitability of DRG neurons from rats. **Molecular Pain**. v. 7, p. 1-12. 2011.

DUARTE, I. D. G., SANTOS, I. R. , LORENZETTI, B. B., FERREIRA, S. H. Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. **European Journal of Pharmacology**. v. 217, p. 225-227. 1992.

DUARTE, I. D. G.; LORENZETTI, B. B.; FERREIRA S. H. Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. **European Journal of Pharmacology**, v. 186, p. 289-293, p. 1990.

DUTTARROY, A.; GOMEZA, J.; GAN, J.W.; SIDDIQUI, N.; BASILE, A.S.; HARMAN, W.D.; SMITH, P.L.; FELDER, C.C.; LEVEY, A.I.; WESS, J. Evaluation of Muscarinic Agonist-Induced Analgesia in Muscarinic Acetylcholine Receptor Knockout Mice. **Molecular pharmacology**, v. 62, n. 5, p. 1084–1093, 2002.

EASTMAN, Richard H., KLUGER, Ronald H. Isopulegol: composto químico. **Encyclopédia Britânica**, 2015. Disponível em: <http://global.britannica.com/science/isopulegol>, acesso em: 15/02/2016.

EDDY, N. B.; LEIMBACH, D. Synthetic analgesics. Dithienylbutenyl and Dithienylbutylmanines, **J Pharmacol Exp Ther**, v. 107, p. 385-393, 1953.

EDLUND, S. M., CARLSSON, M. L., LINTON, S. J., FRUZZETTI, A. E., TILLFORS, M. I see you're in pain - The effects of partner validation on emotions in people with chronic pain. **Scandinavian Journal of Pain**, v. 6, p. 16–21, 2014.

FEIN, A. Nociceptores: As células que sentem dor. Tradução PETROV, P.; FRANCISCHI, J.N.; FERREIRA, S.H et al. Ribeirão Preto – SP: **Dor On Line**; 2011. 106 p. Disponível em: <<http://www.dol.inf.br/nociceptores>> acesso em: 13 jun. 2015.

FERREIRA, S. H.; FERRARI, L. F.; CUNHA, T. M.; NASCIMENTO, P. G. B. D.; VERRI JUNIOR, W. A.; CUNHA, F. Q. Dor inflamatória. In: ALVES-NETO, O; COSTA, C. M. C.; TEIXEIRA, M. J. (Org.). **Dor: princípios e prática**. 1 Ed. Porto Alegre: Artmed Editora S. A., p. 265-279, 2009.

FINE, P. G. Treatment guidelines for the pharmacological management of pain in older persons. **Pain medicine (Malden, Mass.)**, v. 13 Suppl 2, p. S57–66, 2012.

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

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.

GHOSH, M. N., SINGH, H. Inhibitory effect of a pyrrolizidine alkaloid, crotalaburnine, on rat paw edema and cotton pellet granuloma. **British Journal of Pharmacology**, v. 51, p. 503-8, 1974.

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

GONÇALVES, M. J.; CRUZ, M. T.; TAVARES, Ana C.; CAVALEIRO C.; LOPES, M.C.; CANHOTO, J.; SALGUEIRO, L. Composition and biological activity of the essential oil

from *Thapsia minor*, a new source of geranyl acetate. **Industrial Crops and Products** 35, 166–171, 2012.

GOSSELL-WILLIAMS, M.; SIMON, O. R.; WEST, M.E. The Past and Present Use of Plants for Medicines. **West Indian Med J**, v. 55, p. 217-218, 2006.

GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S. **Fundamentos de psicofarmacologia**, São Paulo: Atheneu, v. 2, p. 260, 2000.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical biochemistry**, v. 126, p. 131–138, 1982.

GREGORY, N. S. et al. An Overview of Animal Models of Pain: Disease Models and Outcome Measures, **The Journal of Pain**, v. 14, n. 11, p. 1255-1269, 2013.

GRIFFIN, R. S.; WOOLF, C. J. Farmacologia da analgesia. In: GOLAN, D. E.; TASHJIAN-JÚNIOR, A. H.; ARMSTRONG, E.J.; ARMSTRONG, A.W. **Princípios de Farmacologia**. 2ªed. , cap.16, p. 240-259, 2009.

GUDES, S., BARKAI, O., CASPI, Y., KATZ, B., LEV, S., BINSHTOK, A. M., The role of slow and persistent TTX-resistant sodium currents in acute tumor necrosis factor-alpha mediated increase in nociceptors excitability. **J Neurophysiol** , v.113, p. 601-619, 2015.

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

GUIMARÃES, A.G.; OLIVEIRA, G.F.; MELO, M.S.; CAVALCANTI, S.C.; ANTONIOLLI, A.R.; BONJARDIM, L.R.; SILVA, F.A.; SANTOS, J.P.; ROCHA, R.F.; MOREIRA, J. C.; ARAÚJO, A. A.; GELAIN, D. P.; QUINTANS-JÚNIOR, L. Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 107, p. 949-957, 2010.

HAESLER, G., MAUE, D.; GROSSKREUTZ, J.; BUFLER, J.; NENTWIG, B.; PIEPENBROCK, S., et al.; Voltage-dependent block of neuronal and skeletal muscle sodium channels by thymol and menthol, **Eur. J. Anaesthesiol.** v. 19, p. 571-579, 2002.

HAMURTEKIN, E.; GURUN, M. S. The antinociceptive effects of centrally administered CDP-choline on acute pain models in rats: The involvement of cholinergic system. **Brain Research**. v. 1117, n. 1, p. 92-100. 2006.

HAYTOWITZ, D. B.; BHAGWAT, S.; HOLDEN, J. M. Sources of Variability in the Flavonoid Content of Foods. **Procedia Food Science**, v. 2, p. 46–51, 2013.

HILÁRIO, M. O. E.; TERRERI, M. T.; LEN, C. A. Antiinflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2. **Jornal de Pediatria**. v. 82, n. 5 (supl), p. 206-212, 2006.

HOLTHUSEN H. Involvement of the NO/ cyclic GMP pathway in bradykinin-evoked pain from veins in humans. **Pain**, v. 69, p. 87–92, 1997.

HUANG, M. H. WANG B. S., WU C. H., SHEUL M. J., HOU W. C., LIN S. S., HUANG G. J. Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Cardiospermum halicacabum* and its

reference compounds ex vivo and in vivo. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 133, n. 2, p. 743–750, 2011.

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

IGNARRO, L. J., BUGA G. M., WOOD K. S., BYRNS R. E., CHAUDHURI G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 84, p. 9265–9269, 1987. Inflammation. *Microbes Infection*, v. 5, p. 1317 – 1327, 2003.

JACKSON, W. F. Potassium channels in the peripheral microcirculation. *Microcirculation*. v. 12, p. 113-127, 2005.

JAISSWAL, M.; LARUSSO, N. F.; GORES, G. J. Nitric oxide in gastrointestinal epithelial cell carcinogenesis: linking inflammation to oncogenesis. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, v. 281, p. G626–G634, 2001.

JENSEN, T. S.; FINNERUP, N. B. Neuropathic pain: Peripheral and central mechanisms. *European Journal of Pain Supplements*, v. 3, p. 33–36, 2009.

JI, R.-R.; XU, Z.-Z.; GAO, Y.-J. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. *Nature reviews. Drug discovery*, v. 13, p. 533–48, 2014.

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. Molecular mechanisms of nociception . *Nature*, v. 413, n. September, p. 203–210, 2001.

JULIUS, D. TRP channels and pain. *Annual Review of Cell Developmental Biology*, v. 29 p. 355-384, 2013.

KAKOTI, B. B., PRADHAN, P., BORAH, S., MAHATO, K., M. K.. Analgesic and anti-inflammatory activities of the methanolic stem bark extract of *Nyctanthes arbor-tristis* Linn. *BioMed Research International*, v. 2013, p. 1-6, 2013.

KANDEL, E.R.; SCWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M.; SIEGELBAUM, S.T.; HUDSPETH, A.J. *Principles of Neural Science*, New York: McGraw-Hill, v. 4, p. 430-50, 2000.

KATZ, W.A.; BARKIN, R.L. Dilemmas in Chronic/persitent pain management. *Disease-a-Month*. v. 56, p. 233-241. 2010.

KAWANO, T., ZOGA V., MCCALLUM J. B., WU H. E., GEMES G., LIANG M. Y., ABRAM S., KWOK W. M., HOGAN Q. H., SARANTOPOULOS C. D. ATP-sensitive potassium currents in rat primary afferent neurons: biophysical, pharmacological properties, and alterations by painful nerve injury. *Neuroscience*. v. 162, p. 431-443, 2009.

KLEIKERS, P. W. M., WINGLER K., HERMANS J. J., DIEBOLD I., ALTENHÖFER S., RADERMACHER K. A., JANSSEN B., GÖRLACH A., SCHMIDT H. H. NADPH oxidases as a source of oxidative stress and molecular target in ischemia/reperfusion injury. *Journal of Molecular Medicine*, 2012.



KUKONGVIRIYAPAN, U.; KUKONGVIRIYAPAN, V.; PANNANGPETCH, P., 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.

KURTZ, G.S. Interação medicamentosa, . Rio de Janeiro, apostila da UFRJ, 1980.

LABRAKAKIS, C.; MACDERMOTT, A. B. Neurokinin receptor 1-expressing spinal cord neurons in lamina I and III/IV of postnatal rats receive inputs from capsaicin sensitive fibers. **Neuroscience Letters**, v. 352, n. 2, p. 121-4, 2003.

LAMONT, L. A.; TRANQUILLI, W. J.; GRIMM, K. A. Physiology of pain. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, v. 30, p. 703–728, v, 2000.

LARSEN, J. M., BONEFELD C. M., POULSEN S. S., GEISLER C., SKOV L. IL-23 and TH17-mediated inflammation in human allergic contact dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 123, n. 2, 2009.

LATREMOLIERE, A.; WOOLF, C. J. Central Sensitization: A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity. **Journal of Pain**, v. 10, p. 895–926, 2009.

LAUNAY, P. S.; REBOUSSIN, E.; LIANG, H.; KESSAL, K.; GODEFROY, D.; ROSTENE, W.; SAHEL, J. A.; BAUDOUIN, C.; PARSADANIANTZ, S. M.; GOAZIGO, A. R. L. Ocular inflammation induces trigeminal pain, peripheral and central neuroinflammatory mechanisms. **Neurobiology of Disease**, v. 88, p. 16-28, 2016.

LI, J.; ZHANG, X.; HUANG, H. Protective effect of linalool against lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced liver injury in mice. **International Immunopharmacology**, v. 23, n. 2, p. 523–529, 2014.

LI, Z., JI H., SONG X., HU J., HAN N., CHEN N. Osthole attenuates the development of carrageenan-induced lung inflammation in rats. **International Immunopharmacology**, v. 20, n. 1, p. 33–36, 2014.

LIEDTKE WB, H. S. TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades. **Frontiers in Neuroscience**, v.5, p. 58-69, 2007.

LIPMAN, A. G. Pharmacology of pain. **Journal of pain & palliative care pharmacotherapy**, v. 24, p. 179, 2010.

LO FARO, M. L., FOX B., WHATMORE J. L., WINYARD P. G, WHITEMAN M. Hydrogen sulfide and nitric oxide interactions in inflammation. Nitric Oxide - **Biology and Chemistry**, v. 41, p. 38–47, 15 set. 2014.

LO, T. N.; ALMEIDA, A. P.; BEAVEN, M. A. Dextran and carrageenan evoke different inflammatory responses in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indomethacin. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 221, p. 261–267, 1982.

LOESER, J. D.; MELZACK, R. Pain: An Overview. **Lancet**, v. 353, p.1607-1609, 1999.

PRÓSPERO, D. F. A. Avaliação do potencial antinociceptivo e anti-inflamatório do isopulegol em roedores.

LUIKING, Y. C.; ENGELEN, M. P. K. J.; DEUTZ, N. E. P. Regulation of nitric oxide production in health and disease. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 13, p. 97–104, 2010.

LUNDBERG, J. O., GLADWIN, WEITZBERG, E. Strategies to increase nitric oxide signaling in cardiovascular disease. **Nature Reviews**, v.14, p. 623-641, 2015.

LUO, Z. D.; CIZKOVA, D. The Role of Nitric Oxide in Nociception. **Basic Science and Other Topics on Pain**. v. 4, p. 459–466, 2000.

LYNCH, T. A. (1971). Report to **RIFM**, 21 June. 1971.

MACFARLANE, B.V.; WRIGHT, A.; O'CALLAGHAN, J.; BENSON, H.A. Chronic neurophatic pain and its control by drugs. **Pharmacology**, v.75, p.1-19, 1997.

MALECH, H.L., GALLIN, J.I. Current concepts: immunology. Neutrophils in human diseases. **N Engl J Med**. 317(11):687-94, 1987.

MAMET, J.; LAZDUNSKI, M.; VOILLEY, N. How nervy growth factor drives hysiological and inflammatory expressions of acid-sensing ino channel 3 in sensory. MARCHAND, S. The Physiology of Pain Mechanisms: From the Periphery to the Brain. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 34, p. 285–309, 2008.

MARNETT, J. L. The COXIB Experience: A Look in the Rearview Mirror. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 49, p. 265-290, 2009.

MARUNA P, MASEK Z, SCHREIBER V. Methylene blue inhibition of oestradiol-induced increase of ceruloplasmin serum levels in rats. **Physiol Res**, v. 43, p. 219–21, 1994.

MARTINO, L. Essential Oils from Mediterranean Aromatic Plants in. **The Mediterranean Diet**, p. 649–661, 2015.

MCGETTIGAN, P.; HENRY, D. Use of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs That Elevate Cardiovascular Risk: An Examination of Sales and Essential Medicines Lists in Low Middle, and High-Income Countries. **PLoS Medicine**, v. 10, p. 47-81, 2013.

McNAMARA, C.R.; MANDEL-BREHM, J.; BAUTISTA, D.M.; SIEMENS, J.; DERANIAN, K.L.; ZHAO, M.; HAYWARD, N.J.; CHONG, J.A.; JULIUS, D.; MORAAN, M.M.; FANGER, C.M. TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, p. 13525-13530, 2007.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old. **FlameCell**, 2010.

MELO, F.H.C.; RIOS, E.R.; ROCHA, N.F.; CITÓ, M.C.; FERNANDES, M.L.; DE SOUSA, D.P.; DE VASCONCELOS, S.M.; DE SOUSA, F.C. Antinociceptive activity of carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 64, p. 1722-1729, 2012.

MELO, M.S.; SENA, L.C.S.; BARRETO, F.J.N.; BONJARDIM, L.R.; ALMEIDA, J.R.; LIMA, J.T.; DE SOUSA, D.P.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. Antinociceptive effect of citronellal in mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, p. 411–416, 2010.

MENENDEZ-BACETA, G. et al. Medicinal plants traditionally used in the northwest of the Basque Country (Biscay and Alava), Iberian Peninsula. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 152, p. 113–134, 2014.

MESHAM, G. G., KUMAR, A., RIZVI, W., TRIPATHI, C. D., KHAN, R. A. Evaluation of the anti-inflammatory activity of the aqueous and ethanolic extracts of the leaves of *Albizia lebbek* in rats. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, p. 4–7, 2015.

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. **Progress in Neurobiology**, v. 57, p. 1–164, 1999.

MOGIL, J. S., RITCHIE J., SOTOCINAL S. G., SMITH S. B., CROTEAU S., LEVITIN D. J., NAUMOVA A. K. Screening for pain phenotypes: analysis of three congenic mouse strains on a battery of nine nociceptive assays. **Pain**, v. 126, p. 24-34, 2006.

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

NAJAFI, M.; MOHAMMADI, P. System study of MPO promoter high-frequency polymorphic variants on transcription factor network. **Gene**, v.45, p. 45-54, 2015.

NAKAJIMA, Y., M. SHIMAZAWA, *et al.* Water extract of propolis and its main constituents, caffeoylquinic acid derivatives, exert neuroprotective effects via antioxidant actions. **Life Sci**, v.80, n.4, Jan 2, p.370-7. 2007.

NAKANISHI, S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. **Science**, v.258, p.597–603, 1992.

NERIO, L. S.; OLIVERO-VERBEL J.; STASHENKO, E. “Repellent activity of essential oils: a review,” **Bioresource Technology**, v. 101, p. 372–378, 2010.

NETO, O. A.; COSTA, C. M. de C.; SIQUEIRA, J. T. T. de Neurons. **The journal of biological chemistry**. Vol.278, n.49, p. 48907-48913, 2009.

NGUEFACK, J.; DONGMO, J. B. L.; DAKOLE, C. D. et al., “Food preservative potential of essential oils and fractions from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against mycotoxigenic fungi”, **International Journal of Food Microbiology**, v. 131, p. 151–156, 2009.

NIETO, F. R. COBOS, E. J., TEJADA, M, Á., et al. Tetrodotoxin (TTX) as a therapeutic agent for pain. **Marine Drugs**, v. 10, p. 281–305, 2012.

NISHIJIMA, C. M.; GANEV, E. G.; MAZZARDO-MARTINS, L.; MARTINS, D. F.; ROCHA, L. R. M.; SANTOS, A. R.S.; HIRUMA-LIMA, C. A. Citral: A monoterpene with prophylactic and therapeutic anti-nociceptive effects in experimental models of acute and chronic pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 736, p. 16 - 25, 2014.

NUSSBAUM, C., KLINKE, A., ADAM, M., BALDUS, S. SPERANDIO, M. Myeloperoxidase: A Leukocyte-Derived Protagonist of Inflammation and Cardiovascular Disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.23, p.234-243, 2012.

NUSSLER, A. K.; BILLIAR, T.R. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 54, n.2, p.171-178, 1993.

OAKLANDER AL. Chronic pain. **ACP Medicine**, p. 1-19, 2011. Disponível em [http://www.medicinanet.com.br/conteudos/acpmedicine/5249/dor\\_cronica\\_%E2%80%93ann\\_e\\_louise\\_oaklander.htm](http://www.medicinanet.com.br/conteudos/acpmedicine/5249/dor_cronica_%E2%80%93ann_e_louise_oaklander.htm), acesso 08/02/2015.

OCAÑA, M. CENDÁN, C. M., COBOS, E. J., ENTRENA, J. M. Potassium channels and pain: present realities and future opportunities. **European Journal of Pharmacology**, v. 500, p. 203-219, 2004.

ODOM, D. M. MLADSI, D. M., SAAG, K. G., SHERIF, B. N., MILES, L. S., et al. Relationship between diclofenac dose and risk of gastrointestinal and cardiovascular events: Meta-regression based on two systematic literature reviews. **Clinical Therapeutics**, v. 36, n. 6, p. 906–917, 2014.

OPDYKE, D. L. J. Monographs on Fragrance Raw Materials: **A Collection of Monographs Originally Appearing in Food and Cosmetics Toxicology**, v. 1979, p. 750, 2013.

PAIK, S.Y.; KOK, K. H.; BICO, S.M. Os óleos essenciais de *Zanthoxylum schinifolium* pericarpo induzem a apoptose de células de hepatoma humano HepG2 através do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio. **Biol Pharm Touro**, v. 28, p. 802-807, 2005.

PARADA, C.A; TAMBELI, C.H.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. **Neuroscience**, v. 102, p. 937-944, 2001.

PASSOS, F. F. de B.; LOPES, E. M.; ARAÚJO, J. M. de, SOUSA D. P. de , VERAS, L. M. C.; J. LEITE R. S. A.; ALMEIDA, F. R. de C.. Involvement of Cholinergic and Opioid System in  $\gamma$ -Terpinene-Mediated Antinociception. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2015, p. 1-9, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/829414>, 28/04/16.

PATRA, B. SCHLUTTENHOFER, C., WU, Y., PATTANAIK, S., YUAN, L. Transcriptional regulation of secondary metabolite biosynthesis in plants. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1829, p. 1236–47, 2013.

PEANA, A. T.; MARZOCCO, S.; POPOLO, A.; PINTO, A. (–)-Linalool inhibits in vitro NO formation: Probable involvement in the antinociceptive activity of this monoterpene compound. **Life Sciences**. v. 78, p. 719–723, 2006.

PIETROVSKI, E. F.; ROSA, K. A.; FACUNDO, V. A.; RIOS, K.; MARQUES, M. C. A.; SANTOS, A. R. S. Antinociceptive properties of the ethanolic extract and of the triterpene 3 $\beta$ , 6 $\beta$ , 16 $\beta$ - 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., ZARPELON, A.C., FATTORI, V., MANCHOPE, M. F., MIZOKAMI, S. S., CASAGRANDE, R., VERRI, W. A., Naringenin reduces inflammatory

PRÓSPERO, D. F. A. Avaliação do potencial antinociceptivo e anti-inflamatório do isopulegol em roedores.

pain in mice, **Neuropharmacology**, 2016. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002839081630051X>, acesso em: 07/03/2016.

POBER, J. S.; SESSA, W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nature reviews. Immunology**, v. 7, p. 803–815, 2007.

PODVI, 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. Disponível em: <http://www.annualreviews.org.ez17.periodicos.capes.gov.br/doi/pdf/10.1146/annurevpharmato1010715-103042>, acesso em: 01/03/2016.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; GUIMARÃES, A. G.; ARAÚJO, B. E. S. et al. “Carvacrol, (–)-borneol and citral reduce convulsant activity in rodents” **African Journal of Biotechnology**, vol. 9, n. 39, p. 6566–6572, 2010.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; MELO, M. S.; DE SOUSA, D. P.; ARAÚJO, A. A.; ONOFRE, A. C.; GELAIN, D. P.; GONÇALVES, J. C.; ARAÚJO, D. A.; ALMEIDA, J. R.; BONJARDIM, L.R. 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.

RAHMAN, W.; DICKENSON, A. H. Voltage gated sodium and calcium channel blockers for the treatment of chronic inflammatory pain. **Neuroscience Letters**, v. 557, p. 19–26, 2013.

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.

REN, K.; DUBNER, R. Interactions between the immune and nervous systems in pain. **Nature medicine**, v. 16, p. 1267–1276, 2010.

RIBEIRO, Ana Roseli S.; DINIZ, Polyana B.F.; PINHEIRO, Malone S.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, Ricardo L.C.; THOMAZZI, Sara M. Gastroprotective effects of thymol on acute and chronic ulcers in rats: The role of prostaglandins, ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels, and gastric mucus secretion. **Chemico-Biological Interactions**, v. 244, p. 121–128, 2016.

RIBEIRO, R. A. Modelo de dor e inflamação aguda In: **Práticas de Fisiologia, farmacologia e bioquímica**. Fortaleza: [s.n.], 2012.

RIELLA, K. R.; MARINHO, R. R.; SANTOS, J. S.; PEREIRA-FILHO, R. N.; CARDOSO, J. C.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C.; THOMAZZI, S. M. Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. **Journal of ethnopharmacology**, v.143, p.656-663, 2012.

ROCHA, A. P. C.; KRAYCHETE, D. C.; LEMONICA, L.; CARVALHO, L. R de; BARROS, G. A. M. de; GARCIA, J. B. dos S.; SAKATA, R. K. Pain: Current Aspects on Peripheral and Central Sensitization. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. v. 57, n. 1, p. 94-105, 2007.

PRÓSPERO, D. F. A. Avaliação do potencial antinociceptivo e anti-inflamatório do isopulegol em roedores.

ROCHA, L. W. Avaliação do potencial anti-hiperalgésico de chalconas bioativas frente a diferentes modelos experimentais de dor persistente em camundongos. [s.l.] **Universidade do Vale do Itajaí**, 2011.

RODRIGUEZ-VITA, J.; LAWRENCE, T. The resolution of inflammation and cancer. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 21, p. 61–65, 2010.

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.

ROMITELLI, F. SANTINI, S. A., CHERICI, E., PITOCCO, D., TAVAZZI, B., AMORINI, A. M.LAZZARINO, G., Di SATASIO, E.. Comparison of nitrite/nitrate concentration in human plasma and serum samples measured by the enzymatic batch Griess assay, ion-pairing HPLC and ion-trap GC-MS: the importance of a correct removal of proteins in the Griess assay. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.**, v. 851, n. 1, p. 257–67, 2007.

ROSLAND, J. H., TJOLSEN, J. H., MÆHLE, B., HOLE, K. The formalin test in mice: effects of formalin concentration. **Pain**, v. 42, p. 235–242, 1990

SACHS, D.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Peripheral analgesic blockade of hypernociception: Activation of arginine/NO/cGMP/protein kinase G/ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel pathway. **PNAS**. v. 101, n.10, p. 3680–3685. 2004.

SADIK, C. D.; KIM, N. D.; LUSTER, A. D. Neutrophils cascading their way to inflammation. **Trends in Immunology**, v. 32, p. 452–460, 2011.

SAKURADA, T. SUGIYAMA, A., SAKURADA, C., TANNO, K., SAKURADA, S., KISARA, K., HARA, A., ABIKO, Y. Involvement of nitric oxide in spinally mediated capsaicin- and glutamate-induced behavioural responses in the mouse. **Neurochemistry International**, v. 29, n. 3, p. 271-278, 1996.

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.

SAKURADA, T.; KATSUMATA, K.; TAN-NO, S.; SAKURADA, S.; KISARA, K. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. **Neuropharmacology**, v.31, p. 1279–1285, 1992.

SCHAFFER-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.

SCHAIBLE, H.-G.; EBERSBERGER, A.; NATURA, G. Update on peripheral mechanisms of pain: beyond prostaglandins and cytokines. **Arthritis Research & Therapy**, v. 13, p. 210, 2011.

SCHAIBLE, H.G.; RICHTER, F. Pathophysiology of pain. **Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft für Chirurgie**, v. 389, p. 237–243, 2004.

SCHMIDTKO, A.; TEGEDER, I.; GEISSLINGER, G. No NO, no pain: The role of nitric oxide and cGMP in spinal pain processing. **Trends in Neurosciences**. v. 32, n. 6, p. 339-346, 2009.

SILVA F.V., GUIMARÃES A. G., SILVA E. R., SOUSA-NETO B. P., MACHADO F.D., QUINTANS-JÚNIOR L.J., ARCANJO D. D., OLIVEIRA F. A., OLIVEIRA R. C. Anti-inflammatory and anti-ulcer activities of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano. **J Med Food**, v.15, n. 11, p. 984-91, 2012.

SILVA, M. I. G.; AQUINO NETO, M. R. de; TEIXEIRA NETO, P. F. et al. A atividade do sistema nervoso central da administração aguda do isopulegol em camundongos. **Pharmacologi Biochem Behav** 88 (2):141-147, 2007. (a)

SILVA, M. I. G.; MOURA, B. A.; AQUINO NETO, M. R.; TOMÉ, A. R.; ROCHA, N. F. M.; CARVALHO, A. M. R.; MACÊDO, D. S.; VASCONCELOS, S. M. M.; SOUSA, D. P.; VIANA, G. S. de B.; SOUSA, F. C. F. Gastroprotective activity of isopulegol on experimentally induced gastric lesions in mice: investigation of possible mechanisms of action. **Naunyn-Schmied Arch Pharmacol**, v. 380, p. 233–245, 2009.

SILVA, M. I. G.; SILVA, M. A. G.; AQUINO NETO, M. R. de; MOURA, B. A.; SOUSA, H. L. de ; LAVOR, E. P. H. de; VASCONCELOS, P. F. de; MACÊDO, D. S.; SOUSA, D. P. de; VASCONCELOS, M. S. M.; SOUSA, F. C. F. de. Efeitos do isopulegol sobre as convulsões induzidas por pentilenotetrazol em ratos: possível envolvimento do sistema GABAérgico e atividade antioxidante. **Fitoterapia**, v. 80, p. 506-513, 2007. (b)

SILVA, R. O. DAMASCENO, S. R., SILVA, I. S., SILVA, V. G., BRITO, C. F., TEXEIRA, A. E., NUNES, G. B., CAMARA, C. A., FILHO, J. M., GUTIERREZ, S. J., RIBEIRO, R. A., SOUZA, M. H. BARBOSA, A. L., FREITAS, R. M., MEDEIROS, J.V. Riparin A, a compound from *Aniba riparia*, attenuate the inflammatory response by modulation of neutrophil migration. *Chemico-Biological Interactions*, v. 229, n. February, p. 55–63, 2015.

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.

SOARES, C. L. S. PÉREZ, C. D., MAIA, M. B. S., SILVA, R. S., MELO, L. F. A. Avaliação da atividade anti-inflamatória e analgésica do extrato bruto hidroalcoólico do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860). *Revista Brasileira de Farmacognosia*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, p. 463-468, 2006.

SOMERS, D. L.; CLEMENTE, F. R. Contralateral high or a combination of high- and low-frequency transcutaneous electrical nerve stimulation reduces mechanical allodynia and alters dorsal horn neurotransmitter content in neuropathic rats. **Journal of Pain**, v. 10, n. 2, p. 221-9, 2009.

SOUSA, G.E.P., FERREIRA, S.H. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflammation peritoneal cavity. **Agents and Actions** v.17, p.1–5, 1985.

SREEKEESON, D. P.; MAHOMOODALLY, M. F. Ethnopharmacological analysis of medicinal plants and animals used in the treatment and management of pain in Mauritius. **J Ethnopharmacol.**, v. 157, p. 181–200, 2014.

SREELEKSHMI, R.; LATHA, P. G.; ARAFAT, M. M. et al. "Antiinflammatory, analgesic and anti-lipid peroxidation studies on stem bark of *Ficus religiosa* Linn," **Natural Product Radiance**, v.6, no. 5, p. 377–381, 2007.

STEENBERGEN, P. J.; BARDINE, N. Antinociceptive effects of buprenorphine in zebrafish larvae: An alternative for rodent models to study pain and nociception? **Applied Animal Behaviour Science**, v. 152, p. 92–99, 2014.

STEFANOVIC-RACIC, M., MEYERS, K., MESCHTER, C., COFFEY, J.M., HOFFMAN, R. A., EVANS, C.H. N-monomethyl arginine, an inhibitor of nitric oxide synthase, suppresses the development of adjuvant arthritis in rats. **Arthritis and Rheumatism**, v. 37, p. 1062–1069, 1994.

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

STEIN, C.; SCHÄFER, M.; MACHELSKA, H. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. **Nature Medicine**, v. 9, p. 1003-1008, 2003.

SYRIATOWICZ, J.P.; HU, D.; WALKER, J. S. and TRACEY, D. J. Hyperalgesia due to nerve injury: role of prostaglandins. **Neuroscience**, v. 94; n. 2, p. 587 – 594, 1999.

SZALAI, Z. SZÁSZ, A., NAGY, I., PUSKÁS, L. G., KUPAI, K., KIRÁLY, A. et al., Anti-inflammatory effect of recreational exercise in TNBS-Induced colitis in rats: Role of NOS/HO/MPO system. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, p.102-112, 2014.

SZALLASI, A.; BLUMBERG, P. M.; Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms, tachyinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Pharmacological Reviews**, v.51, n.2, p.159-212, 1999.

TAMADDONFARD, E. FARSHID, A. A., MAROUFI, S. Effects of safranal, a constituent of saffron, and vitamin E on nerve functions and histopathology following crush injury of sciatic nerve in rats. **Phytomedicine**. 2014. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711313004406>>. Acesso em: 23 fev. 2014.

TAN, X. C.; CHUA, K. H.; RAM, M. R.; KUPPUSAMY, U. R. Monoterpenes: Novel insights into their biological effects and roles on glucose uptake and lipid metabolism in 3T3-L1 adipocytes. **Food Chemistry**, v. 196, p. 242–25, 2016.

TANG, M. L. Y.; HAAS, D. A.; HU, J. W. Capsaicin-induced joint inflammation is not blocked by local anesthesia. **Anesthesiology**, v. 51, p. 2-9, 2004.

TAN-NO, K.; OHSHIMA, K.; TAIRA, A.; INOUE, M.; NIIJIMA, F.; NAKAGAWASAI, O.; TADANO, T.; NYLANDER, I.; SILBERRING, J.; TERENIUS, L.; KISARA, K. Antinociceptive effect produced by intracerebroventricularly administered dynorphin A is potentiated by p-hydroxymercuribenzoate or phosphoramidon in the mouse formalin test, **Brain Res**. v.89, p.274–280, 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.



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

TOMINAGA, M.; CATERINA, M. J.; MALMBERG, A. B.; ROSEN, T. A.; GILBERT, H.; SKINNER, K.; RAUMANN, B. E.; BASBAUM, A. I.; JULIUS, D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. **Neuron**, v. 21, n. 3, p. 531-543, 1998.

TONON, J. Anemia associated with extraerythrocytic oxidative stress damage mediated by neutrophil superoxide anion production in chronic renal failure patients undergoing hemodialysis. *Pathophysiology*, v. 19, p. 261–268, 2012.

TRACEY, I.; MANTYH, P. W. The cerebral signature for pain perception and its modulation. **Neuron**, v. 55, n. 3, p. 377-391, 2007.

TRIPATHI, P. KASHYAP, L., SINGH, V. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. **FEMS: Immunology and Medical Microbiology**, v.15, p. 134-1143, 2007.

TUBARO, A.; DRI, P.; DELBELLO, G.; ZILLI, C.; DELLA LOGGIA, R.; The croton oil ear test revisited. **Agents and Actions**, v. 17, p. 347-349, 1985.

TULP, M.; BOHLIN, L. Unconventional natural sources for future drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 9, p. 450–458, 2004.

ULBRICH, H.; ERIKSSON, E. E.; LINDBOM, L. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules as targets for therapeutic interventions in inflammatory disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 24, p. 640–647, 2003.

VALE, M. L. BRITO, G. A., BENEVIDES, V. M., FERREIRA, S. H., POOLE, S., RIBEIRO, R. A., CUNHA, F. Q. Role of NO/cGMP/KATP pathway in antinociceptive effect of sildenafil in zymosan writhing response in mice. **Inflammation Research**. v. 56, n. 2, p. 83-88. 2007.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. “A better understanding of anti-inflammatory drugs based on isoforms of cyclooxygenase (COX-1 and COX-2),” **Advances in Prostaglandin, Thromboxane, and Leukotriene Research**, v. 23, p. 41–48, 1995.

VERNIN G. A.; PARKANYI, C.; COZZOLINO, F. et al. GC / MS analysis of volatile constituents of *Corymbia citriodora* Hook on Réunion. **J Essential oil Res**, v.16, p. 560-565, 2004.

VERRI, W. A. CUNHA, T. M., PARADA, C. A., POOLE, S., CUNHA, F. Q., FERREIRA, S. H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? **Pharmacology and Therapeutics**, v. 112, p. 116–138, 2006.

VINEGAR, R.; TRUAX, J.F.; SELPH, J.L. Some quantitative temporal characteristics of carrageenin-induced pleurisy in rat. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.143, p.711-4, 1973.

VOS, T., FLAXMAN, A. D., NAGHAVI, M., LOZANO, R., MICHAUD, C., EZZATI, M., SHIBUYA, K., et al. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **The Lancet**, v. 380, p. 2163–2196, 2012.

WALKER, S. M. Overview of neurodevelopment and pain research, possible treatment targets. **Best Practice and Research: Clinical Rheumatology**, v. 28, n. 2, p. 213–228, 2014.

WALLENGREN, J., HAKÁNSON, R. Effects of substance P, neurokinin A and calcitonin gene-related peptide in human skin and their involvement in sensory-mediated responses. *Eur J Pharmacol.* 143:267-73, 1987.

WANG, J., ZHANG, L. C., LV, Y. W., YAN, X. J., JI, Y., XUE, J. P. Involvement of the nitric oxide–cyclic GMP–protein kinase G–K<sup>+</sup> channel pathway in the antihyperalgesic effects of bovine lactoferrin in a model of neuropathic pain. **Brain Research**. v. 1209, p. 1-7. 2008.

WENINGER, W.; BIRO, M.; JAIN, R. Leukocyte migration in the interstitial space of non-lymphoid organs. **Nature reviews. Immunology**, v. 14, p. 232–46, 2014.

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. What is this thing called pain? **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, p. 3742–3744, 2010.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v. 288, n. 5472, p. 1765-9, 2009.

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

XU, F., LI, Y., LI, S., MA, Y., ZHÃO, N., LIU, Y., QIAN, N., et al. Complete Freund's adjuvant-induced acute inflammatory pain could be attenuated by triptolide via inhibiting spinal glia activation in rats. **Journal of Surgical Research**, v. 188, n. 1, p. 174–182, 2014.

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.

XU, J., FASKOWITZ, A. J., ROSSI, G. C., XU, M., Lu, Z., PAN, Y. X., PASTERNAK, G. W. Stabilization of morphine tolerance with long-term dosing: association with selective upregulation of mu-opioid receptor splice variant mRNAs. *Proc. Natl.Acad. Sci.* v. 112, p. 279–284, 2015.

YOON, M. H.; CHOI, J. I.; JEONG, S. W. Antinociception of intrathecal cholinesterase inhibitors and cholinergic receptors in rats. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**. v. 47, p. 1079–1084, 2003.

YU, L. Opioids in Reference Module in Biomedical Sciences. **Biomedical Sciences**, 2014.

ZEILHOFER, H. U.; ZEILHOFER, U. B. Spinal disinhibition in inflammatory pain. **Neuroscience Letters**, v. 437, p. 170–174, 2008.

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

PRÓSPERO, D. F. A. Avaliação do potencial antinociceptivo e anti-inflamatório do isopulegol em roedores.

ZHANG, J.; XIAO, Y. D.; JORDAN, K. G.; HAMMOND, P. S.; VAN DYKE, K. M.; MAZUROV, A. A.; SPEAKE, J. D.; LIPPIELLO, P. M.; JAMES, J. W.; LETCHWORTH, S. R.; BENCHERIF, M.; HAUSER, T. A. Analgesic effects mediated by neuronal nicotinic acetylcholine receptor agonists: Correlation with desensitization of  $\alpha 4\beta 2$  receptors. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 47, n. 5, p. 813-823. 2012.

ZHAO, X. H.; ZHANG, T.; LI, Y. Q. The up-regulation of spinal Toll-like receptor 4 in rats with inflammatory pain induced by complete Freund's adjuvant. **Brain Research Bulletin**, v. 111, p. 97–103, 2015.

ZIMMERMANN, M. Pathobiology of neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 429, n. 1-3, p. 23-37, 2001.