UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA

Fernanda Regina Hamann

EXTRATO BRUTO DE *Vitex megapotamica* APRESENTA EFEITO ANTINOCICEPTIVO E TIPO-ANTIDEPRESSIVO EM RATOS

Santa Maria, RS,
2016

Fernanda Regina Hamann

EXTRATO BRUTO DE *Vitex megapotamica* APRESENTA EFEITO ANTINOCICEPTIVO E TIPO-ANTIDEPRESSIVO EM RATOS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica.**

Orientadora: Profª Drª Maribel Antonello Rubin
Coorientadora: Profª Drª Sara Marchesan de Oliveira

Santa Maria, RS
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática
da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Hamann, Fernanda Regina
Extrato bruto de Vitex megapotamica apresenta efeito antinociceptivo e tipo-antidepressivo em ratos / Fernanda Regina Hamann.- 2016.
57 p.; 30 cm

Orientadora: Maribel Antonello Rubin
Coorientadora: Sara Marchesan de Oliveira
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, RS, 2016

1. Produtos Naturais 2. Analgesia 3. Depressão I. Rubin, Maribel Antonello II. de Oliveira, Sara Marchesan III. Título.

Fernanda Regina Hamann

EXTRATO BRUTO DE *Vitex megapotamica* APRESENTA EFEITO ANTINOCICEPTIVO E TIPO-ANTIDEPRESSIVO EM RATOS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica.**

Aprovado em 12 de agosto de 2016:

_____
Maribel Antonello Rubin, Dra (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

_____
Denis Broock Rosemberg, Dr (UFSM)

_____
Jonatas Zeni Klafke, Dr (UNICRUZ)

Santa Maria, RS
2016

RESUMO

EXTRATO BRUTO DE Vitex megapotamica APRESENTA EFEITO ANTINOCICEPTIVO E TIPO-ANTIDEPRESSIVO EM RATOS

AUTOR: Fernanda Regina Hamann
ORIENTADOR: Maribel Antonello Rubin
COORIENTADORA: Sara Marchesan de Oliveira

Vitex megapotamica (Spreng) Moldenke é uma árvore nativa da América do Sul, conhecida popularmente como Tarumã, que tem sido utilizada na medicina popular para o tratamento de doenças inflamatórias. Embora os efeitos de *V. megapotamica* em modelos animais de dor inflamatória e depressão sejam desconhecidos até o momento, uma análise fitoquímica preliminar das folhas de *V. megapotamica* revelou a presença de flavonoides, compostos que apresentam atividade anti-inflamatória e tipo-antidepressiva já descritas na literatura, além de evidências de que outras plantas do mesmo gênero *Vitex* apresentam efeito antinociceptivo dependente do sistema opioide e de modulação do humor. Neste estudo investigamos se o extrato bruto das folhas de *V. megapotamica* causa efeitos antinociceptivo e tipo-antidepressivo em modelos de inflamação crônica e depressão induzida por adjuvante completo de Freund (CFA). A inflamação crônica e o comportamento tipo-depressivo foram induzidos pela injeção intraplantar de CFA (100 µl/pata) em ratos. O efeito do extrato bruto de *V. megapotamica* (VmE; 3–30 mg/kg, v.o.) sobre parâmetros nociceptivos (hiperalgesia térmica, alodínia mecânica e escore de artrite), inflamatórios (edema de pata e atividade da mieloperoxidase), tipo-antidepressivo (teste do nado forçado), atividade locomotora (teste do campo aberto), trânsito gastrointestinal, hiperalgesia e síndrome de retirada de morfina desencadeada por naloxona foram avaliados. Naloxona (0.4 mg/kg, i.p.) foi usada para investigar o envolvimento do sistema opioide sobre os efeitos de VmE. O extrato bruto causou efeitos antinociceptivo e tipo-antidepressivo em um modelo de inflamação crônica induzida por CFA, que foram bloqueados pela naloxona. VmE (10 mg/kg, v.o.) não alterou a atividade locomotora, função gastrointestinal e parâmetros inflamatórios, além de não causar hiperalgesia. *V. megapotamica* induziu seu efeito antinociceptivo e tipo-antidepressivo de maneira dependente do sistema opioide, sem apresentar atividade anti-inflamatória. Esses resultados suportam o uso de VmE como um novo analgésico e antidepressivo.

Palavras-chave: Tarumã. CFA. Dor crônica. Depressão. Planta medicinal.

ABSTRACT

CRUDE EXTRACT OF *Vitex megapotamica* PRODUCES ANTINOCICEPTIVE AND ANTIDEPRESSANT-LIKE EFFECTS IN RATS

AUTHOR: Fernanda Regina Hamann
ADVISOR: Maribel Antonello Rubin
CO-ADVISOR: Sara Marchesan de Oliveira

Vitex megapotamica (Spreng) Moldenke is a native tree of South America, popularly known as Tarumã, has been used in folk medicine to treat inflammatory diseases. Although the effects of *V megapotamica* in animal models of inflammatory pain and depression have not been evaluated to date, a preliminary phytochemical analysis of leaves of *V. megapotamica* revealed the presence of flavonoid, compounds that exhibit anti-inflammatory and antidepressant-like effects described in literature, in addition to evidence that other plants of the same genus *Vitex* have analgesic effect dependent on the opioid system and mood modulation. This study investigated whether the crude leaf extract of *V. megapotamica* exhibit antinociceptive and antidepressant-like effects in models of chronic inflammation and depression induced by complete Freund's adjuvant (CFA). Chronic inflammation and like-depressive behavior were induced by intraplantar injection of CFA (100 ul/paw) in rats. The effect of oral crude extract of *V. megapotamica* (VmE; 3–30 mg/kg, p.o.) on nociception (thermal hyperalgesia, mechanical allodynia and arthritis score), inflammation (edema, myeloperoxidase activity), antidepressant-like (forced swimming test), locomotor activity (open field), gastrointestinal transit, hyperalgesia and naloxone-precipitated morphine withdrawal syndrome was evaluated. Naloxone (0.4 mg/kg, i.p.) was used to investigate the involvement of opioid system in the currently described effects of VmE. Crude extract caused antinociceptive/antidepressant-like effects in the CFA-induced chronic inflammation model, which was prevented by naloxone. The VmE extract (10 mg/kg, p.o.) did not alter locomotor activity, gastrointestinal function and inflammatory parameters and besides did not cause hyperalgesia. *V. megapotamica* induces opioid-dependent antinociception and antidepressant-like effect, without anti-inflammatory activity. The results support the use of VmE as a new analgesic and antidepressant.

Keywords: Tarumã. CFA. Chronic pain. Depression. Medicinal plant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática da dor gerada durante o processo inflamatório.....13

Figura 2- Folhas e frutos de *Vitex megapotamica* (Sprengel) Moldenke.....23

Figura 3- Conclusão ilustrativa do efeito do extrato bruto de *V. megapotamica*.....50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
CFA	Adjuvante Completo de Freund
CGRP	Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina, do inglês Calcitonin gene-related peptide
DRG	Gânglio da Raiz Dorsal, do inglês Dorsal Root Ganglion
FDA	*Food and Drug Administration*
GT	Gânglio Trigeminal
HTAB	Hexadeciltrimetilamônio
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor, do inglês International Association for the Study of Pain
IL-1β	Interleucina 1- β
IL-6	Interleucina 6
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intraplantar
mg/kg	Miligrama/quilograma
MPO	Mieloperoxidase
OMS	Organização Mundial de Saúde
PEG	Propilenoglicol
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS
SBED	Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral α, do inglês Tumor Necrosis Factor α
v.o.	Via oral
VmE	Extrato bruto das folhas de *Vitex megapotamica*
mDO/mL	Milidensidade óptica/ mililitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 10

1.1 DOR 10

1.1.1 Dor crônica e depressão 14

1.1.2 Modelo experimental de dor inflamatória crônica induzida por CFA 16

1.1.3 Tratamento da dor 17

1.1.4 Tratamento da dor crônica e depressão 19

1.2 PLANTAS MEDICINAIS 20

1.2.1 *Vitex megapotamica* (Sprengel) Moldenke 22

2 OBJETIVOS 25

2.1 OBJETIVO GERAL 25

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 25

3 ARTIGO CIENTÍFICO 26

4 CONCLUSÕES 49

4.1 CONCLUSÕES PARCIAIS 49

4.2 CONCLUSÃO GERAL 49

5 PERSPECTIVAS 51

6 REFERÊNCIAS 52

7 CARTA DE ACEITE DO COMITÊ DE ÉTICA EM USO ANIMAL (CEUA) .. 58

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOR

A dor é definida, segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal lesão” (LOESER e TREEDE, 2008). A percepção da dor é um fenômeno complexo, pois envolve dimensões afetivas e cognitivas além da dimensão sensorial (transmissão de um estímulo nocivo) tornando-se uma experiência subjetiva e individual (NAVRATILOVA e PORRECA, 2014). Por envolver fatores psicológicos e emocionais difíceis de serem avaliados em animais, a dor em modelos experimentais é avaliada somente pelo seu componente sensorial, conhecido como nocicepção, termo que se refere aos processos neurais de codificação e processamento de estímulos nocivos (LOOSER e TREEDE, 2008).

Para que um determinado estímulo doloroso, seja ele térmico, mecânico ou químico, desencadeie sua resposta, é necessária a ativação dos nociceptores localizados na periferia. Os nociceptores são terminações nervosas livres de neurônios aferentes primários capazes de traduzir e codificar estímulos nocivos e de transmitir estas informações até estruturas supra-espinhais envolvidas na percepção da dor (WOOLF, 2010). Os corpos celulares dos nociceptores que inervam o tronco, os membros e as vísceras são encontrados no gânglio da raiz dorsal (DRG), já os nociceptores que inervam a cabeça, a cavidade oral e o pescoço são encontrados no gânglio trigeminal (GT) (BASBAUM, 2009). A partir de cada fibra aferente primária encontrada no DRG partem duas terminações nervosas livres originadas de uma haste axonal comum, sendo uma direcionada a tecidos periféricos e outra para a medula espinhal (BASBAUM, 2009). Os nociceptores são responsáveis por detectar estímulos nocivos ou potencialmente nocivos, e podem tornar-se sensibilizados após lesão tecidual ou estimulação repetida (BOVE e DILLEY, 2010).

Diferentes tipos de fibras aferentes são fundamentais para a transmissão sensorial periférica, as quais são divididas em duas classes. A primeira classe é constituída por fibras do tipo A que podem ser Aβ ou Aδ e a segunda classe é constituída por fibras do tipo C. As fibras Aβ são neurônios mielinizados e de grande diâmetro, que apresentam uma velocidade de condução muito rápida do estímulo e

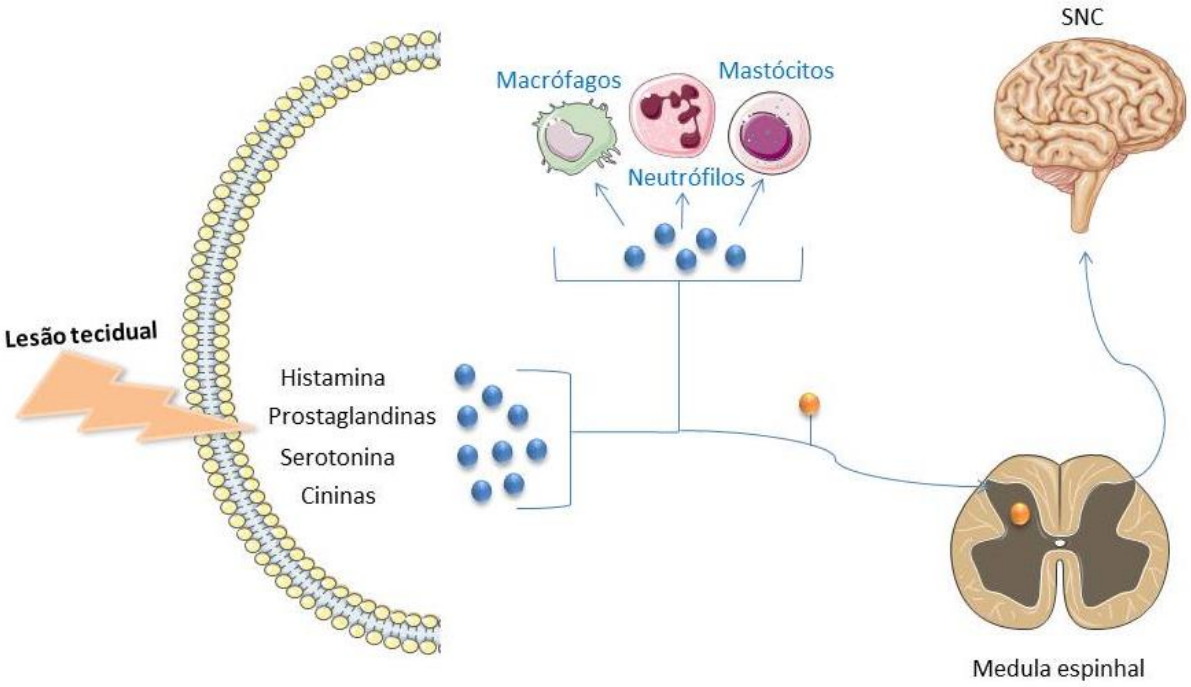
respondem à estímulos de baixo limiar (não nocivos) como, por exemplo, um toque leve sobre um membro do corpo, enquanto as fibras Aδ, são neurônios levemente mielinizados e de médio diâmetro, com uma velocidade de condução rápida e de forma localizada do estímulo doloroso. Já a segunda classe de nociceptores é constituída por fibras do tipo C, que são neurônios de pequeno diâmetro e não mielinizados, que apresentam uma velocidade de condução lenta do estímulo doloroso, regulando a dor lenta e pulsante. As fibras do tipo C podem ser peptidérgicas (liberam peptídeos como a Substância P e CGRP) ou não peptidérgicas (possuem receptores para a isolecitina B4 e para o fator neurotrófico derivado de células gliais). Tanto as fibras Aδ quanto as fibras C estão envolvidas na nocicepção mecânica, térmica e química e também na neuropatia (BASBAUM et al., 2009; VOSCOPOULOS e LEMA, 2010).

Quando um determinado estímulo é capaz de ativar um nociceptor, ocorre a geração de um potencial de ação, que é conduzido a partir do local do estímulo até o corno dorsal da medula espinhal (principalmente para as lâminas I, II) através de neurônios aferentes primários de primeira ordem. Quando o potencial de ação atinge as terminações pré-sinápticas na medula espinhal, ocorre a abertura dos canais de cálcio dependente de voltagem com consequente influxo de cálcio e liberação de uma variedade de neurotransmissores estimulatórios (principalmente glutamato e substância P) na medula espinhal. Estes neurotransmissores ligam-se a receptores presentes em neurônios nociceptivos pós-sinápticos (de segunda ordem) ativando-os, os quais conduzem as informações da medula espinhal até centros superiores. O estímulo doloroso pode ascender até o trato espinotalâmico em direção ao tálamo com auxilio dos neurônios de segunda ordem. Uma vez que o sinal tenha atingido o tálamo, neurônios de terceira ordem conduzem esse estímulo até o córtex somatossensorial, onde serão atribuídos os aspectos discriminativos-sensoriais da dor, como por exemplo, o local e o tipo de estímulo doloroso. Após essa estimulação é possível que ocorra uma resposta reflexa desencadeada pelo estímulo nociceptivo, com o objetivo de afastar o membro afetado da fonte do estímulo, ativando, assim, um neurônio motor reflexo. Ao mesmo tempo, o estímulo doloroso pode ascender ainda pela via espinoparabraquial amigdaloide que converge até o córtex cingulado e o córtex insular, o qual é capaz de atribuir o componente afetivo emocional associado à experiência dolorosa, o qual não é possível medir em animais experimentais (SCHOLZ e WOOLF, 2002; BASBAUM et al., 2009; WOOLF, 2010; GRACE et al., 2014).

Vários mecanismos moleculares e celulares operam, tanto em nível de sistema nervoso central quanto periférico, isoladamente ou em combinação para produzir as diferentes formas de dor: nociceptiva, neuropática ou inflamatória (SCHOLZ e WOOLF, 2002). A dor nociceptiva serve como um sistema fisiológico de alerta precoce ao organismo, sendo essencial para detectar e minimizar o contato com estímulos potencialmente prejudiciais, evitando que o indivíduo permaneça em contato com o agente agressor (WOOLF, 2010). Esse tipo de dor ocorre como resposta a estímulos nocivos e continua apenas na presença mantida deles.

O segundo tipo de dor, denominado de dor inflamatória, ocorre em resposta a uma lesão tecidual e subsequente resposta inflamatória (COSTIGAN et al., 2009). Assim como a dor nociceptiva, a dor inflamatória também é importante como resposta fisiológica adaptativa e protetora do organismo. Após o dano tecidual, ocorre um aumento da sensibilidade dolorosa, que auxiliará no processo de cicatrização da parte do corpo atingida, criando uma situação que desencoraja o contato físico e o movimento, tornado-se assim uma sensação dolorosa de caráter protetor (WOOLF, 2010). Essa dor resulta da ativação de células residentes, como os mastócitos, da infiltração de células inflamatórias, como os neutrófilos, macrófagos e da liberação de mediadores inflamatórios (como cininas, citocinas, prostaglandinas,) que promovem uma redução no limiar de ativação dos nociceptores e amplificação na resposta dos nociceptores que inervam o tecido inflamado (sensibilização periférica) (COSTIGAN et al., 2009). O processo inflamatório pode promover ainda uma sensibilização central, gerando uma resposta aumentada dos neurônios nociceptivos do sistema nervoso central (WOOLF, 2010). Devido a essa hipersensibilidade gerada, pode-se observar nos pacientes o aparecimento de uma resposta dolorosa a um estímulo que anteriormente era inócuo (alodínia), uma percepção exacerbada de um estímulo anteriormente doloroso (hiperalgesia) e também o aparecimento de dor espontânea (dor na ausência de estímulos) (COSTIGAN et al., 2009; WOOLF, 2010). A dor inflamatória é causada pela ativação do sistema imunológico após lesão ou inflamação, é ainda, uma das principais características do processo inflamatório e normalmente desaparece após a cura da lesão tecidual inicial (WOOLF, 2010). No entanto, em doenças crônicas, tais como artrite reumatoide, a dor persiste durante tanto tempo quanto a inflamação é ativa (MICHAUD et al., 2007). A liberação dos mediadores inflamatórios e consequente ativação dos nociceptores encontram-se ilustradas na Figura 1.

Figura 1- Representação esquemática da dor gerada durante o processo inflamatório. Após a lesão tecidual ocorre a ativação de células residentes (mastócitos) e também infiltração de células inflamatórias, como os neutrófilos e macrófagos com consequente liberação de mediadores inflamatórios, como histamina, prostaglandinas, serotononina e cininas que modificam as propriedades de resposta dos nociceptores promovendo sensibilização periférica. Fonte: do autor; baseado em Scholz e Woolf, 2002



Por fim, há a dor neuropática que é mal-adaptativa, não protetora e resultante do funcionamento anormal do sistema nervoso (WOOLF, 2010). Essa dor patológica não é um sintoma de alguma doença, mas sim um estado patológico que afeta o sistema nervoso central ou periférico. Ela pode ocorrer em consequência de um dano no sistema nervoso, mas também em condições onde não exista lesão (WOOLF, 2010; GRACE et al., 2014). Ao contrário da dor nociceptiva que cessa após a cura da lesão, a dor neuropática pode persistir indefinidamente e não tem caráter protetor conduzindo na maioria das vezes a uma redução das atividades diárias, depressão, ansiedade, convívio social reduzido e em muitos casos a dor neuropática prejudica a capacidade de trabalho dos pacientes (JUNG et al., 2003; FIORE e AUSTIN, 2016).

A dor também pode ser retratada quanto ao seu tempo de duração como aguda ou crônica. A dor aguda representa uma resposta protetora contra infecções ou danos teciduais. Desta forma, ela pode ser vista como um mecanismo de adaptação que permite a detecção de estímulos nocivos e, por sua vez, promove respostas

comportamentais adequadas para a cura da lesão e aumento da sobrevivência do indivíduo. Porém, quando ocorre a cura da lesão e a resposta dolorosa perdura, ela passa a ser denominada como dor crônica e não está mais relacionada com o dano do tecido, portanto não é mais considerada uma função fisiológica ou sintoma, mas sim uma condição patológica (LOESER e MELZACK, 1999, WALKER et al., 2014). A IASP estabelece que é difícil determinar quando a dor passa a ser considerada crônica pelo seu tempo de duração, pois na prática ela pode variar de um mês a mais de seis meses. Entretanto o período de três meses foi considerado o ponto mais conveniente de divisão entre dor aguda e crônica (FAYAZ et al., 2016).

1.1.1 Dor crônica e depressão

Estudos epidemiológicos realizados entre os anos 1990-2010 apontaram que 15-25% da população adulta sofre com algum tipo de dor crônica em algum momento da vida, e que em pessoas com mais de 75 anos esse número pode chegar a 62% (BLYTH et al., 2001; FAYAZ et al., 2016). No Brasil, estima-se que 15-40% da população sofreu com algum tipo de dor crônica, variando conforme a região do país (SBED, 2013). Quando a dor evolui para o estado crônico, torna-se um problema de saúde pública, causador de morbidade, ausência ao trabalho e incapacidade temporária ou permanente, gerando elevados custos aos sistemas de saúde (SÁ et al., 2009). O custo total gerado para a sociedade no ano de 2011, somente nos EUA, incluindo os custos indiretos da dor crônica devido à produtividade econômica inferior foi estimado em 560- 635 bilhões de dólares – maior do que o custo de doenças cardíacas, câncer ou diabetes (NHI, 2011).

A dor crônica apresenta um componente afetivo negativo e está intimamente relacionado com a ansiedade e a depressão (BAIR et al., 2008). Sabe-se que o aumento nos níveis das citocinas pró-inflamatórias em processos inflamatórios crônicos está estreitamente relacionado com quadros de depressão. Estudos já demonstraram que pacientes com doenças inflamatórias periféricas crônicas, como a artrite-reumatoide, apresentam um aumento nos níveis das citocinas IL-1β, IL-6 e TNF-α circulantes os quais estão associados com sintomas de depressão (ZHU et al., 2006). Além disso, outro estudo já demonstrou que a administração intracerebroventricular de TNF-α em camundongos produz alterações comportamentais semelhantes com as apresentadas por

pacientes depressivos (MANOSSO et al., 2013). Estima-se que mais de 50% dos pacientes que sofrem de dor crônica também expressem sintomas clinicamente diagnosticáveis de depressão (DWORKIN e GITLIN, 1991).

Embora o mecanismo da relação entre a dor e a depressão não seja totalmente compreendido, existem algumas hipóteses que tentam explicá-lo: a "hipótese antecedente", em que a depressão precede o desenvolvimento da dor crônica, a "hipótese consequência", em que a depressão é uma consequência da dor crônica, e a "hipótese da patogênese comum", em que a depressão e dor crônica permanecem sendo doenças distintas, mas compartilham alguns mecanismos patogênicos comuns, como uma via neurológica partilhada (LACERDA et al., 2009; SINGH et al., 2015). A resposta a estímulos físicos dolorosos é modulada no cérebro com auxílio de pelo menos quatro neurotransmissores: substância P, fator de liberação de corticotrofina, serotonina e noradrenalina (TENG et al., 2005). Sabe-se que a serotonina e a noradrenalina também afetam o humor. Pacientes com a comorbidade dor crônica-depressão apresentariam uma menor disponibilidade de neurotransmissores centrais, principalmente da serotonina e da norepinefrina, o que poderia explicar a ligação entre os sintomas físicos dolorosos e depressão (SINGH et al., 2015, TENG et al., 2005). Quando um paciente com depressão se queixa de que ele está sentindo dor física, pode haver uma razão química para isto (SINGH et al., 2015). Essa teoria é reforçada pelo fato de que tanto os antidepressivos tricíclicos (que agem inibindo a receptação de serotonina e de noradrenalina) quanto os inibidores seletivos da receptação de serotonina costumam ser eficazes para o tratamento da depressão e também da dor crônica (PIMENTA et al., 2000, TENG et al., 2005).

Trabalhos realizados com pacientes que apresentam a comorbidade dor crônica-depressão evidenciaram que eles eram mais propensos a incapacidade e ausência no trabalho devido a complicações de saúde, apresentam menor aceitação a dor e dor generalizada (RAYNER et al., 2016), procuram atendimento médico mais frequentemente do que pacientes que apresentam somente dor crônica (ANDERSSON, 2009), e são menos propensos a procurar cuidados de saúde mental do que pacientes que apresentam somente depressão (BAO et al., 2003). Além disso, já foi demonstrado que pacientes que apresentam a comorbidade dor crônica-depressão respondem menos ao tratamento farmacológico convencional e este, por sua vez, torna-se menos eficaz na

redução dos sintomas (RAYNER et al., 2016) e por isso os pacientes se tornam mais propensos a usar tratamentos complementares e alternativos (BAO et al., 2003).

1.1.2 Modelo experimental de dor inflamatória crônica induzida por CFA

Pesquisas realizadas em humanos são difíceis de serem controladas, sejam por questões éticas, pela interferência dos hábitos diários na resposta individual observada, ou pela dificuldade de realizar testes repetidos, os quais se tornam exaustivos e desgastantes (GOMES et al., 2014). Modelos animais que apresentem semelhança com a fisiopatologia da doença humana são fundamentais para aprofundar o conhecimento sobre diversas doenças, possibilitando a descoberta de novos tratamentos através de diferentes modelos (CRYAN et al., 2002).

Diversos modelos animais são utilizados para avaliação de propriedades antinociceptivas e mecanismos de ação de novos fármacos analgésicos e anti-inflamatórios (AOKI et al., 2014), dentre eles um dos mais frequentemente utilizados para mimetizar a dor causada por um processo inflamatório crônico é o modelo de artrite induzida por adjuvante completo de Freund (CFA, do inglês *Complete Freund's adjuvant*) (SANTOS et al., 2013). O CFA (substância distinta dos antígenos que é capaz de potencializar a ativação de linfócitos T e prolongar a resposta imunológica) é composto por óleo mineral com micobactéria (*Mycobacterium tuberculosis*) inativada pelo calor (SANTOS et al., 2013; AOKI et al., 2014). O CFA é um agente indutor de inflamação crônica que é capaz de ativar a resposta imunológica do organismo, levando a produção e liberação de citocinas e mediadores inflamatórios (SILVA, 2009; AOKI et al., 2014).

A administração intraplantar (i.pl.) de CFA na pata traseira de roedores resulta em um intenso processo inflamatório ao redor da área injetada, gerando sinais inflamatórios característicos como hiperemia, edema e dor (LI et al., 2005). Ainda, esse modelo pode gerar alodínia mecânica (estímulos anteriormente inócuos passam a produzir dor) e hiperalgesia térmica (resposta exagerada e prolongada a um estímulo nocivo), semelhante aos sintomas comumente observados nos pacientes que sofrem de dores inflamatórias crônicas (COSTIGAN et al., 2009; AOKI et al., 2014). Por reproduzir muitas características semelhantes às observadas na doença dos seres

humanos, esse é um modelo estabelecido para mimetizar a dor inflamatória crônica em roedores (SANTOS et al., 2013; AOKI et al., 2014).

Sabe-se que existe uma forte relação entre o processo inflamatório e o comportamento depressivo em pacientes (RAISON et al., 2006; MACIEL et al., 2013). Tem sido relatado que pacientes depressivos apresentam maiores níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias (SCHMIDT et al., 2011) e que pacientes tratados com interferon-α (utilizado para tratamento do câncer) tem maior propensão a desenvolver depressão (CAPURON e MILLER, 2004). Estudos com animais mostram que a administração de agentes inflamatórios como o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) ou citocinas pró-inflamatórias provocam um comportamento tipo-depressivo (DANTZER et al., 2008; MACIEL et al., 2013). MACIEL e colaboradores (2013) caracterizaram o comportamento tipo-depressivo em camundongos que apresentavam inflamação crônica induzida por uma única injeção intraplantar de CFA, através do aumento do tempo de imobilidade em testes clássicos para avaliar depressão em roedores.

Por ser um modelo já bem estabelecido para avaliar atividades antinociceptivas de novas drogas, e por já ter sido caracterizado como um modelo de comportamento tipo-depressivo em roedores, o modelo de dor crônica induzida pelo CFA pode ser útil para avaliar efeitos de novas drogas sobre a comorbidade dor crônica-depressão.

1.1.3 Tratamento da dor

Apesar da grande quantidade de opções terapêuticas disponíveis atualmente para o tratamento da dor crônica, a grande maioria não oferece resultados satisfatórios. Além do alívio limitado da dor crônica obtido por fármacos, o tratamento torna-se ainda mais difícil em função do aparecimento de efeitos adversos muitas vezes intoleráveis pelos pacientes (DA SILVA et al., 2012). Os principais tratamentos farmacológicos disponíveis incluem as drogas anti-inflamatórias não esteroidais (AINES), anticonvulsivantes, drogas antidepressivas e analgésicos opióides (DWORKIN et al., 2010).

Os fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) são os analgésicos mais amplamente utilizados pela população, com cerca de 60 milhões de prescrições por ano nos EUA, para o tratamento de condições dolorosas tanto agudas quanto crônicas, (WEHLING, 2014; TAUBEN, 2015). Os AINES então entre as abordagens iniciais

para o alívio da dor em condições dolorosas crônicas, como, por exemplo, a artrite reumatoide (WEHLING, 2014). Seu efeito analgésico está relacionado à sua propriedade anti-inflamatória através da inibição da síntese de prostaglandinas (BEAL e WALLACE, 2016). Porém, os AINEs podem causar efeitos adversos, tais como úlceras gástricas, hemorragias, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade, que limitam seu uso crônico (TAUBEN, 2015; BEAL e WALLACE, 2016).

As drogas anticonvulsivantes têm uma boa ação analgésica, especialmente sobre dores crônicas de difícil tratamento como a neuropatia periférica diabética, polineuropatia, dor neuropática associada ao câncer, neuralgia pós-herpética e fibromialgia, sendo que a gabapentina e a pregabalina são os medicamentos desta classe mais utilizados para o tratamento da dor crônica (TAUBEN, 2015; BEAL e WALLACE, 2016). Para desencadear seu efeito analgésico elas se ligam na subunidade α-2δ dos canais de cálcio dependente de voltagem e reduzem o influxo de cálcio através destes canais, com consequente redução na liberação de neurotransmissores excitatórios, inibição da condução de potenciais de ação e um decréscimo na sinalização da dor (BEAL e WALLACE, 2016). Apesar da gabapentina e a pregabalina serem consideradas terapia de primeira escolha para o tratamento da dor neuropática, dado o elevado perfil de segurança e a eficácia (BEAL e WALLACE, 2016), elas causam efeitos adversos que limitam a sua utilização como sonolência, tontura, ataxia e edema periférico (TAUBEN, 2015; BEAL e WALLACE, 2016).

Além dos fármacos analgésicos convencionais, os antidepressivos tricíclicos também têm sido utilizados há bastante tempo para o tratamento da dor (JARACZ et al., 2016). Diversos estudos têm mostrado que os antidepressivos tricíclicos são efetivos em reduzir dores relacionadas à neuropatia diabética, neuralgia pós-herpética, fibromialgia, dor facial atípica, dentre outras (LYNCH, 2008). Alguns estudos têm sugerido que o efeito de antidepressivos na dor crônica pode não ter necessariamente relação com sua ação antidepressiva, já que são necessárias doses menores para aliviar as dores crônicas de pacientes, quando comparadas àquelas utilizadas no tratamento da depressão (KIM et al., 2012, MARCHAND et al., 2003). Já foi relatado que o efeito antinociceptivo observado pelos antidepressivos é inibido pela administração de naloxona (antagonista não seletivo dos receptores opioides), evidenciando uma possível interação do efeito antinociceptivo de drogas antidepressivas com o sistema opioide (LYNCH e WATSON, 2006). Apesar da eficácia em diversas condições dolorosas, o uso dos antidepressivos é

limitado devido à instalação lenta das suas ações (de dias a semanas) e ao aparecimento de efeitos adversos, tais como sedação, hipotensão postural, constipação intestinal e boca seca (LYNCH, 2008).

Os analgésicos opioides, como a morfina, são atualmente a melhor opção para a gestão de dores moderadas a intensas induzidas por trauma, dores pós-operatórias e associadas ao câncer (WHITE e WILSON, 2010). Ainda, essa classe está sendo cada vez mais utilizada para o tratamento de dor patológica crônica não associada ao câncer (WHITE e WILSON, 2010). Os opioides desencadeiam sua resposta analgésica através dos receptores opioides, expressos na membrana celular no sistema nervoso central e também em terminais dos nervos sensoriais periféricos (LIANG et al., 2016). Uma vez ligado ao seu receptor, ocorre a abertura dos canais de potássio, com consequente hiperpolarização da membrana celular e inibição da enzima adenilil ciclase, diminuindo os níveis de AMPc e inibindo os canais de cálcio dependente de voltagem (LAW et al., 2000; SCHULTZ e GROSS, 2001). A redução do influxo de cálcio nas fibras nervosas acarreta uma inibição da liberação de neurotransmissores, diminuindo a transmissão do estímulo doloroso (LAW et al., 2000). Apesar da sua eficácia, diversos médicos ficam receosos em prescrever os analgésicos opioides pela sua grande incidência de efeitos adversos, tais como: tolerância (perda da eficácia analgésica da dose geralmente utilizada, necessitando de doses maiores para obter efeito equivalente), dependência (um estado de adaptação fisiológica que se manifesta através da síndrome de abstinência induzida por interrupção abrupta do fármaco, rápida redução da dose, diminuindo o nível do fármaco no sangue, e / ou administração de um antagonista), constipação e depressão respiratória, principalmente com seu uso crônico (CEPEDA et al., 2014; BEAL e WALLACE, 2016).

Devido à eficácia limitada e ao aparecimento de sérios efeitos adversos existe uma pequena quantidade de opções eficazes para o tratamento de dores crônicas. Assim, existe a necessidade de identificar novas terapias que possam ser úteis para o tratamento de diferentes condições dolorosas, especialmente a dor crônica.

1.1.4 Tratamento da dor crônica e depressão

O tratamento da dor crônica associada com sintomas depressivos é uma atividade difícil na prática médica. Isso ocorre porque os pacientes são pouco

responsivos ou não respondem aos tratamentos disponíveis na clínica, exigindo uma abordagem multidisciplinar, incluindo a farmacoterapia, terapia cognitiva e psicoterapia (SELLINGER et al., 2015; SINGH et al., 2015).

Acredita-se que ocorra uma modulação mútua entre a dor crônica e a depressão. Por exemplo, quando ocorre um aumento da intensidade da dor os sintomas depressivos ficam mais prevalentes. Da mesma forma, quando ocorre um aumento dos sintomas depressivos os episódios dolorosos ficam mais intensos (GAMBASSI, 2009, SELLINGER et al., 2015). Portanto, é necessário escolher agentes terapêuticos eficazes que promovam a eliminação de ambos os sintomas, depressivos e dolorosos, para assegurar uma remissão completa, um retorno às atividades diárias e para evitar a recidiva (SINGH et al., 2015; GAMBASSI, 2009).

Os antidepressivos e analgésicos opioides são frequentemente prescritos em combinação para o tratamento da comorbidade dor crônica-depressão por apresentarem efeito tanto no processamento nociceptivo quanto na percepção da dor (GILRON et al., 2009; MAO et al., 2011). No entanto, esta abordagem clínica tem um sucesso limitado, já que o tratamento com essa associação frequentemente agrava a sedação e a confusão mental causada pelos analgésicos opioides, que acabam limitando a sua utilização a longo prazo (MAO et al., 2011). Foi demonstrado que a coexistência entre dor e depressão leva a um efeito aditivo sobre os efeitos adversos nos pacientes, e também ocorre uma resposta reduzida ao tratamento quando comparado com a ocorrência das mesmas condições isoladamente (RAYNER et al., 2016, JAFARINIA et al., 2016). Portanto, é importante a busca de novos compostos que possam tratar a dor crônica e a depressão, e que apresentem um número menor de efeitos adversos do que os medicamentos atualmente disponíveis.

1.2 PLANTAS MEDICINAIS

A utilização de plantas medicinais é uma das práticas mais antigas empregadas pela humanidade para o tratamento de enfermidades (VEIGA JUNIOR E PINTO, 2005). A Organização Mundial da Saúde (OMS) define planta medicinal como sendo “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos”

(WHO, 1998). Muito do que se sabe hoje a respeito de tratamentos com plantas provém do conhecimento popular.

Nos últimos anos a indústria farmacêutica utiliza plantas medicinais para o desenvolvimento de novas drogas. Estima-se que pelo menos 25% das drogas atualmente disponíveis na clínica sejam derivadas direta ou indiretamente de plantas medicinais (BRASIL, 2012). No caso de certas classes de produtos farmacêuticos, como medicamentos antitumorais e antimicrobianos, essa percentagem pode ser maior que 60% (WHO, 2011). Recentemente, mostrou-se que 50% dos medicamentos aprovados entre 1981 e 2006, pelo FDA, foram direta ou indiretamente derivados de produtos naturais (FERREIRA E PINTO, 2010).

Apesar da evolução do conhecimento científico, a utilização de métodos alternativos como o uso das plantas medicinais ainda é muito frequente (BRASIL, 2012). Embora não existam dados oficiais sobre o tamanho do mercado fitoterápico no Brasil, a Associação Brasileira de Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e Promoção da Saúde dimensiona o mercado brasileiro de fitoterápicos a partir de um faturamento de R$ 660,5 milhões em 2007, correspondente a cerca de 3% do mercado farmacêutico (HASENCLEVER et al., 2009).

No final da década de 1970, a OMS criou o Programa de Medicina Tradicional que recomenda a integração da medicina tradicional e da medicina complementar alternativa nos sistemas nacionais de atenção à saúde. Embora a medicina moderna esteja bem desenvolvida na maior parte do mundo, a OMS reconhece que cerca de 80% da população utiliza-se de extratos vegetais para resolução de seus problemas de saúde (LUZ, 2006), principalmente nos países em desenvolvimento, que ainda são dependentes da medicina tradicional nos seus cuidados básicos de saúde (BRASIL, 2006). Nesses países elas são utilizadas na forma bruta (não processados), como chás ou decocções, como fitoterápicos (extratos padronizados e formulados de plantas) e como alternativa popular aos produtos medicinais alopáticos (GURIB-FAKIM, 2006).

No Brasil, país que detém de 15 a 20% da biodiversidade total mundial (BRASIL, 2006), o potencial de uso de plantas como fonte de novos medicamentos é ainda pouco explorado, já que se estima que somente 8% das espécies vegetais existentes no país tenham sido avaliadas em suas propriedades medicinais (BRASIL et al., 2006). Em 2006 foi criada a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS – PNPIC (BRASIL, 2006), que incorporou as plantas

medicinais e a fitoterapia nos serviços e nas práticas de saúde. O uso de plantas medicinais e fitoterápicas na assistência à saúde é favorecido pela aceitação da população, derivada da inserção cultural, pela disponibilidade de recursos naturais no país e por políticas públicas (BRASIL, 2006).

Atualmente, a fitoterapia vem crescendo a cada dia devido ao grande interesse da população por terapias menos agressivas (YUNES et al., 2001), pelos apelos comerciais da mídia para o consumo de produtos à base de fontes naturais (VEIGA JUNIOR E PINTO 2005) e até mesmo pela falta de medicamentos sintéticos eficazes para o tratamento de algumas doenças (FERREIRA E PINTO, 2010). Segundo ARNOUS e colaboradores (2005) a procura pelos medicamentos fitoterápicos vem aumentando, pois a população acredita nos benefícios do tratamento natural. Por ser de baixo custo e de fácil acesso, ao contrário do que ocorre com medicamentos sintéticos, as pessoas veem nas plantas medicinais um método de cura e prevenção mais acessível, além de sentirem-se encorajados a usar por acreditarem que estes remédios, por serem naturais, são inerentemente seguros (VEIGA JUNIOR E PINTO 2005). Porém são necessários estudos que comprovem a eficácia da planta medicinal em questão, para garantir que a mesma não cause danos à saúde do paciente e dessa forma a população possa fazer seu uso com segurança (REZENDE E COCCO, 2002).

1.2.1 *Vitex megapotamica* (Sprengel) Moldenke

A espécie *Vitex megapotamica* (Sprengel) Moldenke (Figura 2), conhecida popularmente como “Tarumã” (do Tupi-Guarani "fruto escuro para fazer vinho") ou “azeitona-do-mato”, é uma árvore da família *Lamiaceae* (ex-*Verbenaceae*) encontrada em uma vasta área, desde os estados de Minas Gerais e Mato Grosso do Sul até o Rio Grande do Sul, e ainda na Argentina, Paraguai e Uruguai (VIANNA e KOEHLER, 2007). Na medicina popular, a infusão de suas folhas é utilizada no tratamento de hemorróidas, depurativa do sangue (hipocolesterolêmica), diuréticas, afecções cutâneas, expectorante, hipertensão arterial, anti-inflamatória, dentre outras propriedades terapêuticas (BRUM et al., 2011). BRANDT e colaboradores (2009) confirmaram, em um estudo *in vivo* realizado em ratos, o efeito hipolipidêmico do extrato hidroalcoólico das folhas e das cascas da *V. megapotamica* preparadas por decocção. Este efeito foi verificado sem a ocorrência de lesão cardíaca, hepática ou renal nos animais. Além

disso, ZANATTA e colaboradores (2007) confirmaram o efeito hipoglicemiante do extrato bruto, bem como das frações acetato de etila e butanólica das folhas de *V. megapotamica* em ratos. Em um estudo recente, foi confirmado que o extrato metanólico das folhas de *V. megapotamica* foi eficaz em diminuir os níveis de colesterol total, triglicerídeos, ureia, creatinina, além de uma redução no estresse oxidativo e na lesão renal em um modelo de dislipidemia e aterogênese em camundongos (ARAÚJO et al., 2015).

Figura 2- Folhas e frutos de *Vitex megapotamica* (Sprengel) Moldenke. Fonte: http://www.viveirofeltrin.com.br/mudas/produto/97, acessado em 18/07/2016.

Em uma análise fitoquímica preliminar das folhas de *V. megapotamica* foi revelada a presença de antocianinas glicosídicas, taninos, catequinas, flavonoides (ácido clorogênico), triterpenoides, glicosídeos cardioativos, cumarinas, ácidos orgânicos e fenóis (BRUM et al., 2011). Estudos comprovaram que outras plantas do mesmo gênero *Vitex*, como *Vitex cymosa* e *Vitex negundo* apresentaram efeito antinociceptivo em diferentes modelos de nocicepção (DHARMASIRI et al., 2003), incluindo modelos de dor inflamatória e dependente do sistema opioide (LEITÃO et al., 2011). Está disponível na clínica para o tratamento dos sintomas da síndrome pré-menstrual um fitoterápico a base de *Vitex agnus-castus* comercializado em doses que variam de 40 a 400 mg. Relatos na literatura evidenciaram que os diterpenoides contidos nessa planta

ligam-se nos receptores μ, κ, δ opioides e estão relacionados com o aumento das β-endorfinas séricas (WEBSTER et al., 2006). Ainda, seus flavonoides neuroativos parecem modular os distúrbios de humor (BERGER et al., 2000).

Assim, como é de grande importância a busca por novas alternativas terapêuticas para o tratamento da dor e da depressão que causem menos efeitos adversos do que as disponíveis no mercado atualmente e diante do uso etnofarmacológico de *V. megapotamica* entre a população, *V. megapotamica* poderia ser uma nova alternativa terapêutica para o tratamento de dores inflamatórias e depressão.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o efeito antinociceptivo e tipo-antidepressivo do extrato bruto das folhas de *Vitex megapotamica* em um modelo de dor inflamatória crônica em ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Verificar se o extrato bruto de *V. megapotamica* apresenta atividade antinociceptiva em um modelo de nocicepção inflamatória crônica.

2.2.2 Investigar o efeito anti-inflamatório do extrato bruto de *V. megapotamica* sobre características inflamatórias induzidas pela administração intraplantar de CFA.

2.2.3 Verificar a atividade tipo-antidepressiva do extrato bruto de *V. megapotamica*.

2.2.4 Identificar um possível mecanismo de ação opioide do extrato bruto de *V. megapotamica*.

2.2.5 Verificar possíveis efeitos adversos causados pelo tratamento com extrato bruto de *V. megapotamica.*

3 ARTIGO CIENTÍFICO

A metodologia, os resultados e a discussão inseridos nessa dissertação apresentam-se sob a forma de artigo científico. O artigo "**Antinociceptive and antidepressant-like effects of the crude extract of *Vitex megapotamica* in rats"** foi aceito para publicação na revista científica Journal of Ethnopharmacology.

Author's Accepted Manuscript

www.elsevier.com/locate/jep

Antinociceptive and antidepressant-like effects of the crude extract of *Vitex megapotamica* in rats

Fernanda Regina Hamann, Adriana Maria Zago, Mateus Fortes Rossato, Veronica Rubert Beck, Carlos Fernando Mello, Thiele Faccim de Brum, Leandro Machado de Carvalho, Henrique Faccin, Sara Marchesan Oliveira, Maribel Antonello Rubin

PII: S0378-8741(16)30468-8
DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.07.045
Reference: JEP10310

To appear in: *Journal of Ethnopharmacology*

Received date: 19 March 2016
Revised date: 12 July 2016
Accepted date: 15 July 2016

Cite this article as: Fernanda Regina Hamann, Adriana Maria Zago, Mateu Fortes Rossato, Veronica Rubert Beck, Carlos Fernando Mello, Thiele Faccim d Brum, Leandro Machado de Carvalho, Henrique Faccin, Sara Marchesa Oliveira and Maribel Antonello Rubin, Antinociceptive and antidepressant-lik effects of the crude extract of *Vitex megapotamica* in rats, *Journal o Ethnopharmacology,* http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.07.045

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted fo publication. As a service to our customers we are providing this early version o the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, an review of the resulting galley proof before it is published in its final citable form Please note that during the production process errors may be discovered whic could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain

ACCEPTED MANUSCRIPT

Antinociceptive and antidepressant-like effects of the crude extract of *Vitex megapotamica* in rats

Fernanda Regina Hamann[a], Adriana Maria Zago[b], Mateus Fortes Rossato[c], Veronica Rubert Beck[d], Carlos Fernando Mello[d], Thiele Faccim de Brum[e], Leandro Machado de Carvalho[f], Henrique Faccin[f], Sara Marchesan Oliveira[a*], Maribel Antonello Rubin[a,d*]

[a] Graduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry, Center of Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

[b] Pharmacy Undergraduation Program, Centro Universitário Franciscano - UNIFRA, Santa Maria, RS, Brazil.

[c] Center of Innovation and Pre-clinical Pharmacology – CIEnP, Florianopolis, SC, Brazil.

[d] Graduate Program in Pharmacology, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

[e] Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

[f] Graduate Program in Chemistry, Center of Exact and Natural Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

**Corresponding Authors:*

MA Rubin, PhD, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Center of Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil, 97105-900. Tel: + 55 55 3220 8053, Fax: + 55 55 3220 8978 E-mail: maribel.rubin@gmail.com

SM Oliveira, PhD, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Center of Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil, 97105-900. Tel: + 55 55 3220 8053, Fax: + 55 55 3220 8978 E-mail: saramarchesan@hotmail.com

Accepted manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: Vitex megapotamica (Spreng) Moldenke has been used in South American folk medicine to treat inflammatory diseases. However, the effects of *V. megapotamica* on animal models of nociception and depression have not been evaluated.

Aim of the study: This study investigated whether the crude leaf extract of *V. megapotamica* exhibits antinociceptive and antidepressant-like effects in a Freund's adjuvant-induced chronic inflammation and depression model.

Materials and methods: Chronic inflammation was induced in rats by the intraplantar administration of complete Freund's adjuvant (CFA; 100 ul). The effect of oral crude extract of *V. megapotamica* (VmE; 3–30 mg/kg, p.o.) on nociception (thermal hyperalgesia, mechanical allodynia and arthritis score), inflammation (edema, myeloperoxidase activity), immobility (forced swimming test), locomotor activity (open field), gastrointestinal transit, hyperalgesia and naloxone-precipitated morphine withdrawal syndrome was evaluated. Naloxone (0.4 mg/kg, i.p.) was used to investigate the involvement of opioid system in the currently described effects of VmE.

Results: Crude extract caused antinociceptive/antidepressant-like effects in the CFA-induced chronic inflammation model, which was prevented by naloxone. The VmE extract (10 mg/kg, p.o.) did not alter the locomotor activity, gastrointestinal function and inflammatory parameters and did not cause hyperalgesia.

Conclusion: V. megapotamica induces opioid-dependent antinociception and antidepressant-like effect, without anti-inflammatory activity. The results support the use of VmE as analgesic and antidepressant.

Keywords: allodynia; forced swimming test; hyperalgesia; opioid; Tarumã; *Verbenaceae*.

Accepted manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

1. Introduction

The treatment of chronic inflammatory pain is one of the most challenging activities in medical practice. This occurs because chronic pain is associated with a profound decrease in the quality of life and affects daily activities of the affected patients (Orru et al., 2014). Chronic pain has a negative affective component and is closely related to anxiety and depression. It has been estimated that over 50% of patients who suffer from chronic pain also express clinically diagnosable symptoms of depression (Dworkin and Gitlin, 1991). However, the currently available analgesic drugs are devoid of anxiolytic or antidepressant action. Antidepressants and opioid analgesics are often prescribed in combination for the treatment of these disorders. However, opioid-treatment is often associated with adverse effects such as constipation, tolerance and abuse that limit their long-term utilization (Mao et al., 2011). Thus, the search for new compounds that could treat inflammatory pain and depression is welcome. In this context, plants used in folk medicine have been considered an important source of new molecules and therapies (Gautam and Jachak, 2009).

Vitex megapotamica (Spreng.) Moldenke, popularly known in Brazil as "tarumã", is a native tree from Brazil, Uruguay, Paraguay and Argentina of the *Lamiaceae* (formerly *Verbenaceae*) family (Vianna and Koehler, 2007). Folk medicine reports that *V. megapotamica* leaf infusion is indicated to treat rheumatism, skin disorders, inflammation, hypercholesterolemia and hyperglycemia (Brandt et al., 2009; Zanatta et al., 2007). In fact, initial preclinical studies have confirmed the presumed hypocholesterolemic and hypoglycemic effects of *V. megapotamica* leaf extracts and also of its ethanolic and butanolic fractions (Brandt et al., 2009; Zanatta et al., 2007). In this context, the following chemical components have been reported in leaves of *V. megapotamica*: anthocyanin glycosides, tannins, catechins, flavonoids (chlorogenic acid), triterpenoids, cardioactive glycosides, coumarins, organic acids and phenols (Brum et al., 2011). However, there is a lack of preclinical studies investigating whether *V. megapotamica* or its components have analgesic and/or anti-inflammatory activity. Therefore, the aim of this study was to investigate the antinociceptive, anti-inflammatory and antidepressant-like

Accepted manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

effects of the crude extract of *V. megapotamica* (VmE) in animals subjected to CFA-induced inflammation.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

To prepare the plant material, the leaves of *Vitex megapotamica* were collected in Sobradinho, (Rio Grande do Sul, Brazil, coordinates: latitude 29º 25' 17" south and longitude 53º 01' 43" west) in March 2010. A voucher specimen number SMDB 12.526 was deposited at the Herbarium of the Botany Department, Federal University of Santa Maria (UFSM), Brazil.

2.2. Preparation of the extract of V. megapotamica

The crude extract of leaves of *V. megapotamica* (VmE) was obtained by maceration in ethanol/water (70:30 v/v) at room temperature during seven days, filtered and concentrated using a rotary evaporator under reduced pressure and low temperature (Boligon et al., 2013). After evaporation the VmE was obtained.

2.3. Analysis of phenolic compounds in VmE

Separations were carried out on a UHPLC 1260 Infinity Binary system (Agilent, Santa Clara, CA, USA), which was able to operate at pressures up to 600 bar. A Zorbax SB-C18 Rapid Resolution HD column (2.1 × 50 mm, 1.8 µm, Agilent) was used at a temperature of 40 °C. The injection volume was 5 µL, and the injected aliquots were acidified to a final concentration of 0.1% acetic acid (v/v). The phenolic compounds were separated using a gradient elution composed of 0.1% acetic acid in water (A) and acetonitrile (B) as the mobile phase at a constant flow rate (0.8 mL min-1) according to the following elution program: 8.0% B (0.00–0.10 min); 8.0–25.8% B (0.10–3.45 min); 25.8–54.0% B (3.45–6.90 min); 54.0–100.0% B (6.90–7.00 min); and 100.0% B (7.00–9.00 min). The detection of the phenolic compounds by tandem mass spectrometry (MS/MS) was carried out by using an electrospray ionization source (ESI) as described elsewhere (Faccin et al., 2016).

2.4. Drugs and reagents

Accepted manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

The following reagents were purchased from Sigma: Complete Freund's Adjuvant (CFA - 1 mg/ml of heat killed *Mycobacterium tuberculosis* oil suspension), hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB), 5-(N,N-diethylamino)-pentyl-3,4,5-trimethoxybenzoate (TMB). Naloxone and morphine sulfate were purchased from Cristália, São Paulo, Brazil. All other reagents were of analytical grade and were purchased from local supplier.

2.5. Animals

The present study was conducted in accordance with the internationally accepted principles for laboratory animal use and care, and all procedures were approved by the local Ethics Committee (process number 116/2013). The number of animals and the intensity of nociceptive stimuli used were the minimum necessary to demonstrate the consistent effects of drug treatments. The behavior evaluation was performed blindly with respect to drug administration. All experiments were performed using adult male Wistar rats (3 months old; 250–300 g). The animals were housed in a room with controlled temperature (22 ± 1°C) and a 12 h light/12 h dark cycle with standard lab chow and water *ad libitum*.

2.6. Animal treatment

The VmE was dissolved in 5% Tween 80, 20% polyethylene glycol and 75% saline (0.9% NaCl) prior oral administration by gavage (p.o.). VmE was administered at the dose of 3 – 30 mg/kg. Morphine was used as positive control at the dose of 10 mg/kg and administered intraperitoneally (i.p.) (Tonello et al., 2014).

2.7. CFA-induced inflammation

The antinociceptive, anti-inflammatory and antidepressant-like activities of VmE were evaluated in rats subjected to the CFA-induced paw inflammation, an animal model of chronic pain. Animals were anesthetized with isofluorane and 100 µL of CFA (1 mg/ml) or saline were injected intraplantarly (i.pl.) in the right hind paw (Rossato et al., 2014). Forty-eight hours after CFA injection, inflammatory and nociceptive parameters were evaluated (Rossato et al.,

Accepted manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

2014). On the other hand, the antidepressant-like parameter was assessed 7 days after CFA injection (Maciel et al., 2013).

2.8. Nociceptive parameters

To investigate the possible effect of VmE (3-30 mg/kg) on the nociceptive changes induced by CFA, we measured mechanical allodynia (defined as pain in response to a non-nociceptive stimulus; Khan et al., 2014), thermal hyperalgesia (defined as an increased pain sensitivity; Khan et al, 2014), and arthritis score. Morphine (10mg/kg, i.p.) was used as a positive control.

2.8.1. Mechanical allodynia measurement

Rats were placed in cages with a wire mesh bottom that allowed full access to the paws. Mechanical allodynia was evaluated through *up-and-down* method using von Frey filaments (Dixon, 1980). A sequence of von Frey filaments, with different forces and logarithmic increments (6, 8, 10, 15, 26, 60 and 100 g) was used. In case of a positive response (paw withdrawal), the next filament with smaller force was applied; in case of negative response (no paw withdrawal response), the next filament with greater force was applied. This was repeated until a total of 6 applications (Rossato et al., 2014).

2.8.2. Thermal hyperalgesia

Thermal hyperalgesia was assessed using Plantar test with minor modifications (Hargreaves et al., 1988). Briefly, animals were habituated in a Plexiglas chamber for 20 min; a radiant light beam generated by a 60W light bulb was then directed onto the right hind paw (Plantar test, UgoBasile, Italy). The time (in seconds) between the onset of the stimulus and manifestation of the paw withdrawal response was automatically measured and taken as an index of the thermal nociceptive threshold.

2.8.3. Arthritis score

Animals were placed individually in chambers (transparent glass) and adapted for 5 min and arthritis score were observed and classified according to the following scale: edema formation (0 -normal, 1- slight swelling at the injection site, 2- swelling at the injection site and toes or ankle, 3- swelling at the

Accepted manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

injection site, toes and ankle), redness (0- normal, 1- slightly red/purple, 2- red/purple), and claw position (0- normal, 1- slightly curved, 2- almost closed). Individual scores were added to give the total score (Rossato et al., 2014).

2.9. Inflammatory parameters

To evaluate the anti-inflammatory effect of VmE (3-30 mg/kg) on the inflammation induced by CFA, we evaluated the development of paw edema and the myeloperoxidase activity (neutrophil infiltration marker).

2.9.1. Edema evaluation

Paw thickness (in millimeter - mm) was measured before and 48 h after the intraplantar CFA injection (100 µl) in the right hind paw. Forty eight hours after CFA injection the animals received VmE (3-30 mg/kg, p.o.) or morphine (10 mg/kg, i.p.) and paw thickness was measured from 0.5 up to 4 h after treatments using a digital caliper (Rossato et al., 2014). The results were expressed as the baseline and test value of the paw thickness.

2.9.2. Myeloperoxidase activity

Myeloperoxidase (MPO) activity was evaluated as an indicator of neutrophil accumulation. Two hours after VmE (3-30 mg/kg, p.o.) or morphine (10 mg/kg, i.p.) administration the animals were anesthetized with sodium thiopental, perfused and the paw tissue was collected. Samples were homogenized in sodium acetate buffer (80 mM, pH 5.5) containing 0.5% HTAB in ice bath. Just before the assay, tissue homogenates were centrifuged and the supernatants were collected for analysis. The supernatant was mixed with sodium acetate buffer (80 mM, pH 5.5) and TMB 18.4 mM. The solution was incubated for 3 min at 37 °C and the reaction was stopped on ice by the addition of acetic acid and the absorbance read at 630 nm in a spectrophotometer. A Fisher Biotech Microkinetics BT 2000 (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) microplate reader was utilized and values were expressed as optical densities (OD) corrected by tissue weight (in mg) (Rossato et al. 2014).

2.10. Depressive-like behavior

Accepted manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

To evaluate the effect of VmE on the depressive-like behavior induced by CFA, the animals were subjected to the forced swimming test. The test was conducted using the forced swimming test, according to Porsolt et al. (1977) with minor modifications. Seven days after intraplantar CFA administration (100 µl, right hind paw) the rats received VmE (3-30 mg/kg) and 2 h later were individually forced to swim in an open cylindrical container (diameter 25 cm, height 35 cm), containing water at 25 ± 1ºC. Morphine (10 mg/kg, i.p.) was used as a positive control. Rats were placed into the water and immobility was defined as the absence of movement except the motion required for keeping the head above the water. The total time spent still was recorded (in seconds) during 6 min. The immobility behavior was recorded by an observer blind to the drug treatment.

2.11. Investigation of opioid system participation in the VmE effect

To investigate the participation of the opioid system in the antinociceptive and antidepressant-like effect of VmE, rats were pre-treated with naloxone (0.4 mg/kg, i.p.) or vehicle (1 ml/kg, i.p.). Firstly, the animals received CFA injection (100 µl, i.pl.) and after 48 h or 7 days were evaluate the effect of naloxone or vehicle on antinociceptive or antidepressant-like action caused by VmE, respectively. Animals received naloxone or vehicle and after 15 min they received the VmE (10 mg/kg, p.o.). Two hours after naloxone or vehicle administration, the antinociceptive or antidepressant-like effect of VmE was evaluated. Morphine (10 mg/kg, i.p.) was used as a positive control for naloxone pre-treatment or vehicle.

Accepted manuscript

2.12. Adverse effects

2.12.1. Open-field test

The animals received VmE (10 mg/kg, p.o.), morphine (10 mg/kg, i.p.) or vehicle and 2 h later they were placed in a round arena (57 cm in diameter) with the floor divided into 21 equal areas. The number of areas crossed with all paws was recorded for 5 min. The number of crossings was recorded as an index of

ACCEPTED MANUSCRIPT

locomotor activity. The test was conducted according to Rossato et al. (2014) with minor modifications.

2.12.2. Gastrointestinal transit

To evaluate the effect of VmE on the gastrointestinal transit, the animals were fasted for 18 h (water *ad libitum*) and the gastrointestinal transit was assessed according to Tonello et al. (2014). After, the animals received VmE (10 mg/kg, p.o.), morphine (10 mg/kg, i.p.) or vehicle and 55 min later, a standard charcoal meal (5% charcoal, 20% arabic gum, 0.5 ml) was given to rats by gavage. Five minutes after administration of the standard charcoal meal, the animals were euthanized and their stomachs and small intestines were removed to measure the length of the intestine (from the pyloric sphincter to the ileum-caecal junctions, the total intestine length) and the distance traveled by the charcoal meal. Propulsive activity of the intestine was determined by the percentage of gastrointestinal traveled charcoal, calculated as: traveled %= 100 x (charcoal traveled distance/total intestine length).

2.12.3. Hyperalgesia and withdrawal syndrome induced by the opioid

Animals received vehicle (1 ml/kg, v.o.), morphine (10 mg/kg, i.p.) or VmE (10 mg/kg, v.o.) 3 times a day for 3 days with an interval of 4 to 5 hours between administrations. Each morning, before the injection of vehicle, morphine or VmE, a thermal nociception test was carried out to evaluate whether animals developed opioid withdrawal-induced hyperalgesia (Tonello et al., 2014).

To evaluate a possible withdrawal syndrome induced by chronic administration of morphine, VmE or vehicle 2 h after the last repeated treatment, rats received naloxone (0.4 mg/kg, i.p.) to precipitate the withdrawal syndrome. Signs of morphine, VmE or vehicle withdrawal syndrome were evaluated according to Tonello et al. (2014), with some modifications. Briefly, paw tremor, headshaking, ejaculation, abdominal writhing, and grooming behavior were evaluated at 10-minute intervals for a total testing period of 30 minutes, and a standardized score of 0 to 3 was assigned (0 = absent; 1 = 1–3 bouts; 2 = 4–6 bouts; 3 = 7 bouts or more).

Accepted manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

2.13. Statistical analysis

The data were analyzed by Student's t test or one-way ANOVA followed by Sudent-Newman-Keuls *post-hoc* test or two-way ANOVA followed by Bonferroni *post-hoc* test. $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. LC-MS/MS determination of phenolic and triterpenic compounds as active markers in VmE

Table 1 shows that among the phenolic and triterpenic compounds found in VmE, vanillic, caffeic, ρ-coumaric, ferulic, trans-cinnamic, chlorogenic acids, luteolin, apigenin, quercetin and rutin were determined as major compounds. As can be seen, chlorogenic acid (1279.2 ± 34.0 μg/g) and luteolin (1325.8 ± 15.6 μg/g) were found to be the most abundant phenolic compounds (Table 1) in the crude extract. Thus, a total of 10 compounds within the phenolic acids, flavonols, flavonoids, coumarins, and stilbenes screened by the UHPLC-ESI-MS/MS method could be identified as possible bioactive compounds in extracts of *V. megapotamica*.

Table 1 Phenolic and triterpenic compounds determined in crude extract of *V. megapotamica*

Bioactive compounds	Concentration (μg/g)
Phenolic acids	
ρ-coumaric acid	63.4 ± 2.2
Ferulic acid	23.5 ± 2.9
Chlorogenic acid	1279.2 ± 34.0
Vanilic acid	72.3 ± 3.5
Caffeic acid	170.8 ± 6.9
Trans-cinnamic acid	6.8 ± 0.9
Flavonoids	
Luteolin	1325.8 ± 15.6
Apigenin	175.4 ± 4.3

Accepted manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

Rutin	1.9 ± 1.1
Quercetin	8.5 ± 3.2

3.2. Effect of VmE on the nociception CFA-induced

CFA-induced nociception is characterized by mechanical allodynia and thermal hyperalgesia (Fig. 1). VmE (10 mg/kg, p.o.) had no effect on the arthritis score (data not shown). The inhibitory effect of VmE (10 mg/kg, p.o.) on mechanical allodynia (86 ± 23%) and thermal hyperalgesia (66 ± 10%) occurred 2 h after its administration (Fig. 1A and 1C, respectively). Thus, we chose the time of 2 h after VmE administration to investigate the effect of different doses of VmE (3 – 30 mg/kg; p.o.) on arthritis score, mechanical allodynia and thermal hyperalgesia (Fig 1B and 1D). While 30 mg/kg VmE induced antinociception in all tests, the dose of 3 mg/kg did not alter CFA-induced nociception in any test. However, VmE at the dose of 10 mg/kg induced maximal antinociceptive effect in the mechanical allodynia test; therefore this dose was chosen for the remaining experiments. Similar to the VmE, the morphine (10 mg/kg, i.p., used as a positive control) inhibited both the mechanical and thermal hyperalgesia caused by CFA with 100% inhibition at 1 h after treatment (Fig. 1A and 1C).

Accepted manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

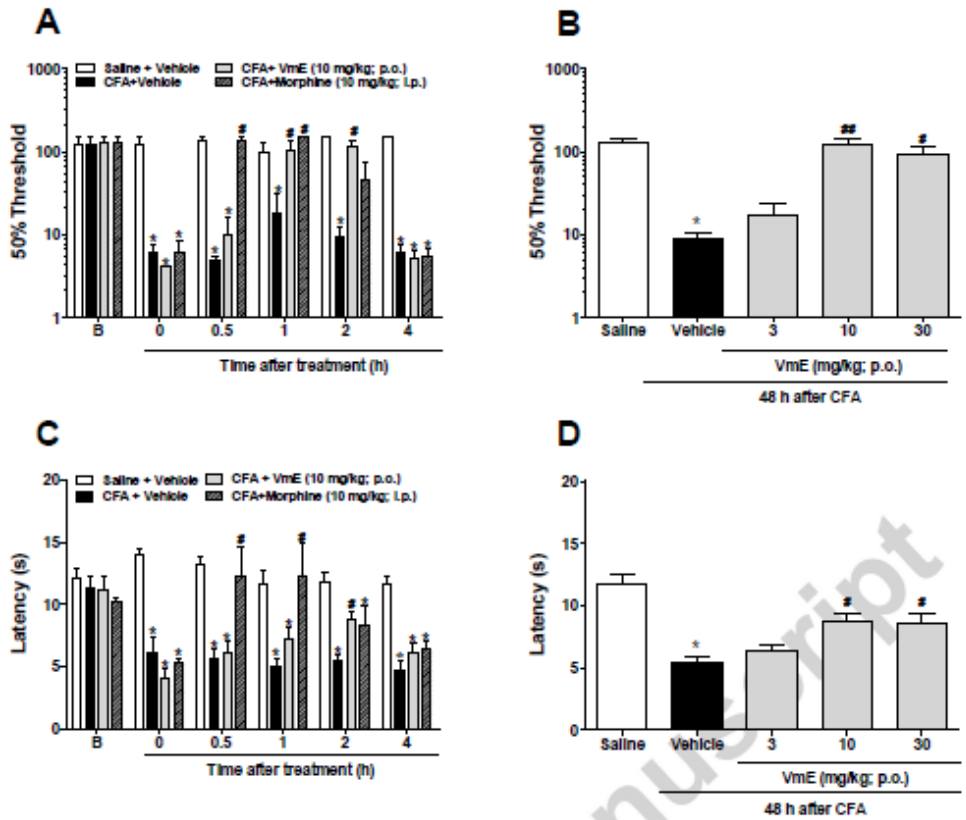


Fig. 1. Effect of the crude extract of *V. megapotamica* (VmE, 3-30 mg/kg, p.o.) or morphine (10 mg/kg, i.p.) on the nociception induced by intraplantar CFA injection (100 µl/paw). Time-course and dose-response curve effect produced by VmE on mechanical allodynia (A and B) and thermal hyperalgesia (C and D) induced by intraplantar CFA injection. Dose-response curves, 50% threshold and paw withdrawal latency were calculated at 2 h post VmE treatment. B in the x axis denotes the baseline threshold of animals before CFA injection. Data are expressed as mean ± S.E.M. (n= 5-6 animals/group). * p <0.05 when compared with the intraplantar vehicle group. # p <0.05 when compared with the intraplantar CFA group treated with the vehicle; two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test (A and C) or one-way ANOVA followed by SNK post-hoc test (B and D).

Accepted manuscript

3.3. Effect of VmE on the inflammation CFA-induced

The intraplantar injection of CFA, but not saline, increased paw thickness (edema) and MPO activity. VmE (3-30 mg/kg, p.o.) and morphine (10 mg/kg,

ACCEPTED MANUSCRIPT

i.p.) did not reduce paw edema and MPO activity 2 h after their administration in animals treated with CFA (data not shown).

3.4. Assessment of antidepressant-like effect of VmE

The intraplantar CFA administration increased the immobility time of animals 7 days after CFA injection (Fig. 2). VmE (3, 10 and 30 mg/kg, p.o.) and morphine (10 mg/kg, i.p.) completely reversed the CFA-induced increase of immobility time (Fig. 2).

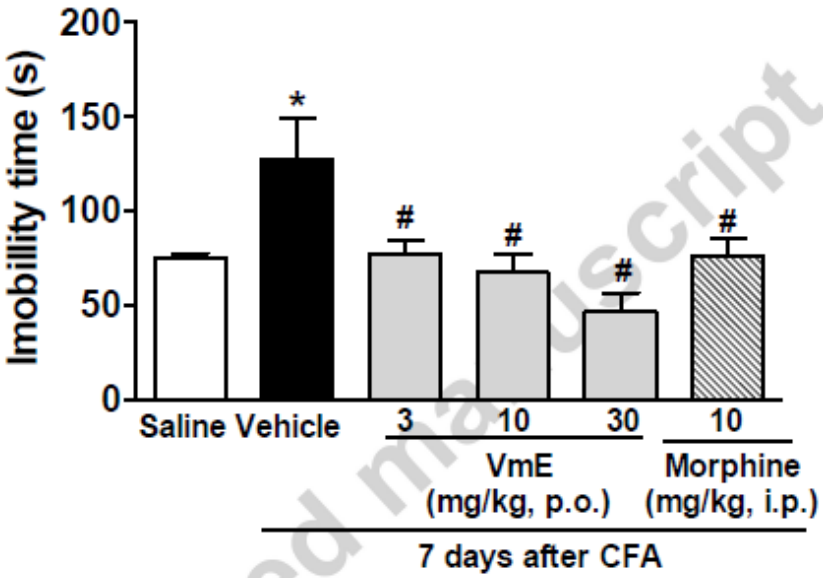


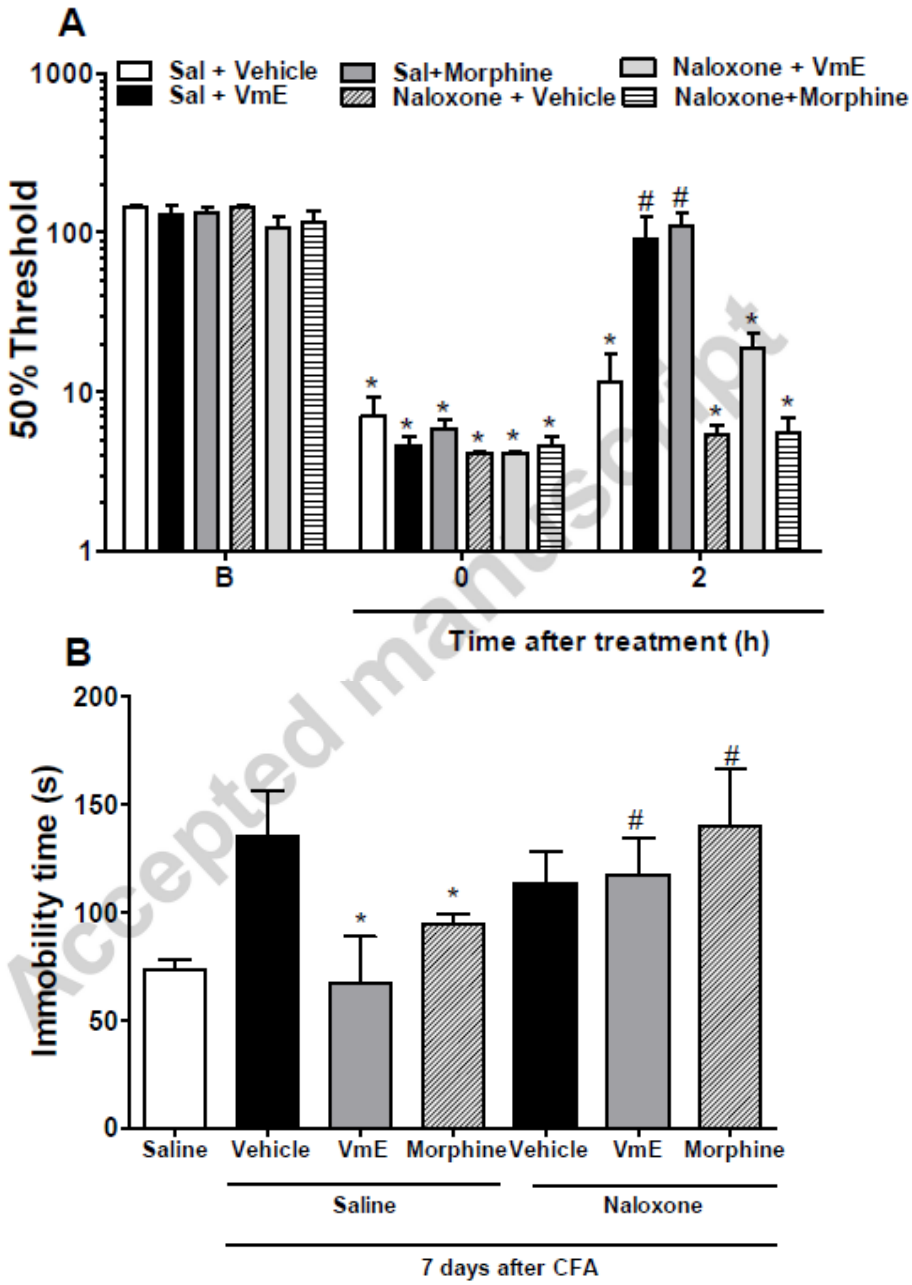
Fig. 2. The antidepressant-like effect of the crude extract of *V. megapotamica* (VmE) and morphine on the depressant-like effect induced by intraplantar CFA injection (100 µl/paw). The immobility time was evaluated at 2 h after the oral treatment of VmE (3-30 mg/kg, p.o.). Data are expressed as mean + S.E.M. (n= 5-7 animals/group). * p <0.05 when compared with the saline/vehicle group. # p <0.05 when compared with the CFA/vehicle group; one-way ANOVA followed by SNK post-hoc test.

3.5. Investigation of opioid mechanisms in VmE effect

Pre-treatment with the opioid receptor antagonist naloxone (0.4 mg/kg, i.p.), prevented the antinociceptive and antidepressant-like effect of VmE (77.9 ± 16.5% and 79.28 ± 15.85% of prevention, Fig. 3A and 3B, respectively).

ACCEPTED MANUSCRIPT

Similarly, naloxone prevented the antinociceptive and antidepressant-like effect of morphine with preventions of 84.24 ± 25.38 % and 67.71 ± 3.09% respectively (Fig 3A and 3B). These results suggest that the opioid system is involved in the antinociceptive and antidepressant-like effects of VmE.



Accepted manuscript

Fig. 3. Effect of naloxone (0.4 mg/kg, i.p.) on the increase of mechanical

ACCEPTED MANUSCRIPT

allodynia thereshold (A) and on decrease of immobility time (B) induced by *V. megapotamica* extract (VmE, 10 mg/kg, p.o.) or morphine (10 mg/kg, i.p.). The antinociceptive (A) and antidepressant-like effects (B) were evaluated 2 h after VmE administration. B in the X axis denotes the baseline threshold of animals before CFA injection. Data are expressed as mean + S.E.M. (n= 4-6 animals/group). * p <0.05 when compared with the baseline threshold (A) or vehicle/saline/CFA group (B), # p <0.05 compared with the CFA/vehicle group; two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post-hoc* test (A) or one-way ANOVA followed by SNK *post-hoc* test (B).

3.6. Assessment of the adverse effects of VmE

VmE (10 mg/kg, p.o.) did not alter locomotor activity (crossing) in the open-field test or gastrointestinal motility, when compared with the vehicle-treated animals (data not shown).

We also showed that the repeated administration of morphine (10 mg/kg, i.p.) induced thermal hyperalgesia (28.5 ± 3.63% reduction, Fig. 4A) and naloxone-precipitated morphine withdrawal syndrome (419.88 ± 34.9% increase, Fig. 4B) when compared with the vehicle group. In contrast, the repeated administration of VmE (10 mg/kg, p.o.) did not induce thermal hyperalgesia (Fig. 4A) but caused mild naloxone-precipitated morphine withdrawal syndrome (37.7 ± 4.17%) when compared with the vehicle group (Fig. 4B).

Accepted manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

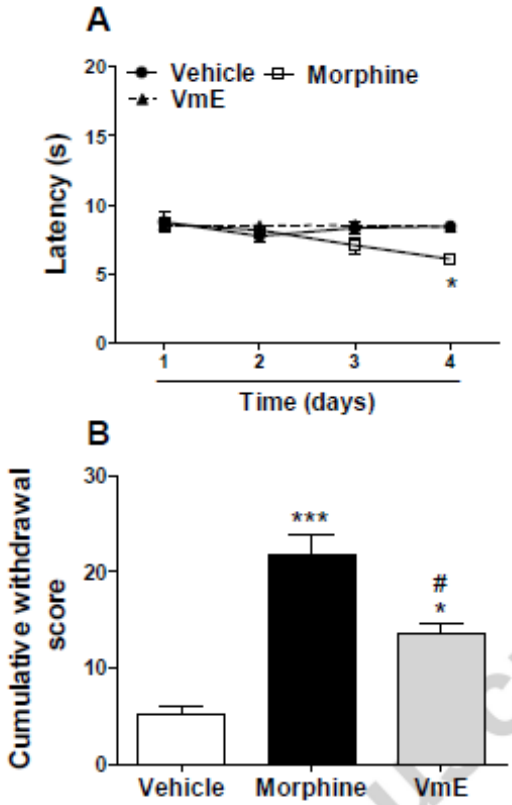


Fig 4. Effect of repeated injection of morphine (10 mg/kg, i.p.) or crude extract of *V. megapotamica* (VmE, 10 mg/kg, p.o.) on paw withdrawal latency (A) and withdrawal syndrome score (B). Data are expressed as mean + S.E.M. (n= 6 animals/group). * p <0.05 when compared with the vehicle group; two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post-hoc* test (A). ***p<0.01, *p<0.05 when compared with the vehicle group and #p<0.05 when compared with the morphine group; one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post-hoc* test (B).

Accepted manuscript

4. Discussion

In this study we showed that oral VmE administration caused antinociception in mechanical and thermal tests, but not in the ongoing pain score (arthritis score). In addition, VmE decreased the immobility time in the forced swimming test. Both VmE-antinociception and antidepressive-like effects were prevented by naloxone. VmE (10 mg/kg) did not alter locomotor activity, gastrointestinal function or inflammatory parameters. Moreover, the repeated administration of VmE did not cause hyperalgesia.

A significant antinociceptive effect of the extract of other plant of the *Vitex* genus (*Vitex cymosa*) has been shown in different nociception models (Leitão et al, 2011). Our results with VmE are similar to these findings, and may be due to common active components of these plants. Interestingly, despite its antinociceptive effect, VmE had no effect on paw edema and neutrophil infiltration. These results suggest a pure analgesic effect, independent of the inflammatory process, which is also similar to that described by Leitão and colleagues (2011).

In addition to the nociceptive changes, we observed that rats with CFA-induced chronic inflammation developed a depressive-like behavior 7 days after adjuvant injection, in the forced swimming test. The same results were found by Kim et al. (2012) and Maciel et al. (2013), indicating that chronic pain is causally related to depressive-like behavior. The forced swimming test has been used for antidepressant drug screening and to evaluate depressant-like changes in animal models, with good predictive value of antidepressant action in the clinics (Porsolt et al., 1977). This is particularly relevant from the translational point of view because depressant-like behavioral changes elicited by chronic pain have a major impact in the quality of life of patients (Rijavec and Grubic, 2012). VmE decreased the increase of immobility time induced by CFA in the forced swimming test, suggesting that VmE has antidepressant-like effects in rats. Current evidence supports that *Piper laetispicum* causes antinociception and decreases the immobility time in the forced swimming test, suggesting combined antinociceptive and antidepressant-like effects, quite similar to those reported in the current study (Xie et al., 2011).

The identification and quantitation of constituents that occur in high quantities and contribute to the therapeutic effects of an herbal medicine is a very important step in phytochemical studies. Liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) analysis of the VmE indicated the presence of several phenolic compounds, especially chlorogenic acid and luteolin which are the most abundant phenolic compounds found in the VmE. Previous studies have shown that the chlorogenic acid possess antinociceptive effect in screening tests for new analgesics and in chronic pain models (Yonathan et al., 2006; Gorzalczany et al., 2011, Bagdas et al., 2013). Therefore, it is possible that the chlorogenic acid present in the extract contributed to the antinociceptive

Accepted manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT
effect of VmE. However, chlorogenic acid does not affect cognitive performance and mood-related behaviour (Camfield et al., 2013) suggesting that this compound may not be responsible for the antidepressant-like effect of the VmE reported in this study. On the other hand, luteolin, other biologically active compound found in the extract, causes antidepressant-like effect in forced swimming test (Ishisaka et al., 2011), and opioid-dependent anti-hyperalgesic effect in a chronic pain model (Hara et al., 2014). Therefore, it is tempting to propose that luteolin content may contribute to the antidepressant-like and antinociceptive effects of VmE.

Since opioid mechanisms mediate the antinociceptive effect of luteolin (Hara et al., 2014), we decided to investigate whether opioid receptors are involved in the antinociceptive and antidepressant-like effects of the VmE. Pre-treatment of animals with naloxone prevented both the antinociceptive and antidepressant-like effects of VmE, suggesting that its action involves the opioid system. This is in agreement with the view that the opioid system is of outmost importance for pain control and mood status (Broom et al., 2002). Moreover, morphine reversed the CFA-induced mechanical allodynia. This finding is in agreement with Li et al. (2013), who have shown that morphine reverses CFA-induced pain in an already installed inflammatory process.

The main limitation for opioid prescription is the induction of adverse effects, which include sedation, constipation, hyperalgesia and withdrawal syndrome (Anselmi et al., 2013; Holzer et al., 2009). In our study, a single oral dose of VmE did not induce sedation or constipation. These results reinforce the view that VmE induces antinociception and antidepressant-like effects without significant adverse effects.

It is fairly known that opioids, such as morphine, increase pain threshold in naive animals (Khan et al., 2014). In our study we showed that morphine, but not VmE, increased the thermal threshold in naive animals. Nevertheless VmE seems to exert its effects through the activation of the opioid system in a different way of morphine, since δ-opioid receptors are involved in the regulation of mechanical pain while μ-opioid receptors are involved in the regulation of thermal pain (Scherrer et al., 2009). Meier et al. (2000) revealed that the aqueous extract of the fruits of *Vitex agnus-castus* interacts with the δ-opioid receptor. Therefore, we suggest that VmE may interact with δ-opioid

Accepted manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

receptors to produce its effects, without causing the adverse effects induced by classical opioids like morphine. However, further investigation is necessary to elucidate its exact mechanism of action.

5. Conclusion

The current study showed that the crude extract of *V. megapotamica* promotes antinociception and antidepressant-like effects that involve the opioid system. It is possible that chlorogenic acid and luteolin, known chemical components of leaf extract of *V. megapotamica* contribute for the antinociceptive and antidepressant-like activity found. Despite VmE did not show superior efficacy to morphine, our results suggest that it may be an interesting mild analgesic for the treatment of chronic painful conditions such as arthritic pain.

Acknowledgments

This study was supported by the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico*- CNPq (306468/2014-0, 307812/2014-6) and *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul* - FAPERGS (2342-2551/14-6). We also acknowledge fellowships from CNPq and CAPES.

Conflicts of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

Accepted manuscript

References

Anselmi, L., Huynh, J., Vegezzi, G., Sternini, C., 2013. Effects of methylnaltrexone on guinea pig gastrointestinal motility. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 386, 279-286.

Bagdas, D., Cinkilic, N., Ozboluk, H.Y., Ozyigit, M.O., Gurun, M.S., 2013. Antihyperalgesic activity of chlorogenic acid in experimental neuropathic pain. J Nat Med 67, 698–704.

Boligon, A.A., Brum, T.F., Zadra, M., Piana, M., Alves, C.F., Fausto, V.P., Júnior, V. dos S.,Vaucher, R. de A., Santos, R.C., Athayde, M.L., 2013. Antimicrobial activity of *Scutia buxifolia* against the honey bee pathogen Paenibacillus *larvae*. J Invertebr Pathol 112, 105-107.

Brandt, A.P., Oliveira, L.F.S., Fernandes, F.B., Alba, J., 2009. Avaliação in vivo do efeito hipocolesterolêmico e toxicológico preliminar do extrato bruto

hidroalcoólico e decocção da *Vitex megapotamica* (Spreng) Moldenke (*V. montevidensis* Cham.). Rev Bras Farmacogn 19, 388-393.

Broom, D.C., Jutkiewicz, E.M., Folk, J.E., Traynor, J.R., Rice, K.C., Woods, J.H., 2002. Nonpeptidic delta-opioid receptor agonists reduce immobility in the forced swim assay in rats. Neuropsychopharmacology 26, 744-755.

Brum, T.F., Zadra, M., Froeder, A.L.F.,Boligon, A.A., Frohlich, J.K.,Athayde, M.L., 2011. Análise fitoquímica preliminar das folhas de *Vitex megapotamica* (Sprengel) Moldenke. Revista Saúde (Santa Maria) 37, 57-62.

Camfield, D.A., Silber, B.Y., Scholey, A.B., Nolidin, K., Goh, A., Stough, C., 2013. A randomised placebo-controlled trial to differentiate the acute cognitive and mood effects of chlorogenic acid from decaffeinated coffee. PLoS One 8, e82897.

Dixon, W.J., 1980. Efficient analysis of experimental observations. Annu Rev Pharmacol Toxicol 20, 441-462.

Dworkin, R.H., Gitlin, M.J., 1991. Clinical aspects of depression in chronic pain patients. Clin J Pain 7, 79–94.

Faccin, H., Viana, C., Nascimento, P.C., Bohrer, D., Carvalho, L.M., 2016. Study of ion suppression for phenolic compounds in medicinal plant extracts using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. J Chromatogr A 1427, 111–124.

Gautam, R., Jachak, S.M., 2009. Recent developments in anti-inflammatory natural products. Med Res Rev 29, 767-820.

Gorzalczany, S., Marrassini, C., Mino, J., Acevedo, C., Ferraro, J., 2011. Antinociceptive activity of ethanolic extract and isolated compounds of *Urtica circularis*. J Ethnopharmacol 134, 733–738.

Hara, K., Haranishi, Y., Terada, T., Takahashi, Y., Nakamura, M., Sata, T., 2014. Effects of intrathecal and intracerebroventricular administration of luteolin in a rat neuropathic pain model. Pharmacol Biochem Behav 125, 78-84.

Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C., Joris, J., 1988. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. Pain 32, 77-88.

Holzer, P., Ahmedzai, S.H., Niederle, N., Leyendecker, P., Hopp, M., Bosse, B., Spohr, I., Reimer, K., 2009. Opioid-induced bowel dysfunction in cancer-related pain: causes, consequences, and a novel approach for its management. J Opioid Manag 5, 145-151.

Ishisaka, M., Kakefuda, K., Yamauchi, M., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Tsuruta, A., Hara, H., 2011. Luteolin shows an antidepressant-like effect via suppressing endoplasmic reticulum stress. Biol Pharm Bull 34, 1481-1486.

Khan, S., Shehzad, O., Chun, J., Choi, R.J., Park, S., Islam, M.N., Choi, J.S., Kim, Y.S., 2014. Anti-hyperalgesic and anti-allodynic activities of capillaris in via suppression of inflammatory signaling in animal model. J Ethnopharmacol 152, 478–486.

Kim, H., Chen, L., Lim, G., Sung, B., Wang, S., McCabe, M.F., Rusanescu, G., Yang, L., Tian, Y., Mao, J., 2012. Brain indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to the comorbidity of pain and depression. J Clin Invest 122, 2940-2954.

Leitão, S.G., dos Santos, T.C., Delle Monache, F., Matheus, M.E., Fernandes, P.D., Marinho, B.G., 2011. Phytochemical profile and analgesic evaluation of *Vitex cymosa* leaf extracts. Rev Bras Farmacogn 21, 874-883.

Accepted manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

Li, J.X., Thorn, D.A., Qiu, Y., Peng, B.W., Zhang, Y., 2013. Antihyperalgesic effects of imidazoline I2 receptor ligands in rat models of inflammatory and neuropathic pain. Br J Pharmacol 171, 1580–1590.

Maciel, I.S., Silva, R.B., Morrone, F.B., Calixto, J.B., Campos, M.M., 2013. Synergistic effects of celecoxib and bupropion in a model of chronic inflammation-related depression in mice. PloS One 8, 1-15.

Mao, J., Gold, M.S., Backonja, M.M., 2011. Combination drug therapy for chronic pain: a call for more clinical studies. The Journal of Pain 12, 157-166.

Meier, B., Berger, D., Hoberg, E., Sticher, O., Schaffner, W., 2000. Pharmacological activities of *Vitex agnus-castus* extracts in vitro. Pythomedicine 7, 373-381.

Orru, A., Marchese, G., Casu, G., Casu, M.A., Kasture, S., Cottiglia, F., Acquas, E., Mascia, M.P., Anzani, N., Ruiu, S., 2014. *Withania somnifera* root extract prolongs analgesia and suppresses hyperalgesia in mice treated with morphine. Phytomedicine 21, 745-752.

Porsolt, R.D., Le Pichon, M., Jalfre, M., 1977. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. Nature 266, 730-732.

Rijavec, N., Grubic, V.N., 2012. Depression and pain: often together but still a clinical challenge: a review. Psychiatr Danub 24, 346-352.

Rossato, M.F., Hoffmeister, C., Tonello, R., de Oliveira Ferreira, A.P., Ferreira, J., 2014. Anti-inflammatory effects of vitamin e on adjuvant-induced arthritis in rats. Inflammation 38, 606-615.

Scherrer, G., Imamachi, N., Cao, Y., Contet, C., Mennicken, F., O'Donnell, D., Kieffer, B.L., Basbaum, A.I., 2009. Dissociation of the opioid receptor mechanisms that control mechanical and heat pain. Cell 137, 1148–1159.

Tonello, R., Rigo, F., Gewehr, C., Trevisan, G., Pereira, E.M.R., Gomez, M.V., Ferreira, J., 2014. Action of Pha1b, a peptide from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer*, on the analgesic and adverse effects caused by morphine in mice. J Pain 15, 619-631.

Vianna, E., Koehler, A.B., 2007. Tratamentos simplificados para germinação de sementes de Tarumã (*Vitex megapotamica* (SPRENG.) MOLDENKE). Rev. Acad Ciência Animal 5, 189-193.

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

Yonathan, M., Asres, K., Assefa, A., Bucar, F., 2006. *In vivo* anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Cheilanthes farinosa*. J Ethnopharmacol 103, 462–470.

Zanatta, L., de Sousa, E., Cazarolli, L.H., Junior, A.C., Pizzolatti, M.G., Szpoganicz, B., Silva, F.R.M.B., 2007. Effect of crude extract and fractions from *Vitex megapotamica* leaves on hyperglycemia in alloxandiabetic rats. J Ethnopharmacol 109, 151-155.

Accepted manuscript

4 CONCLUSÕES

4.1 CONCLUSÕES PARCIAIS

Com os resultados do presente estudo podemos concluir que:

O extrato bruto de *Vitex megapotamica*:

4.1.1 Apresentou efeito antinociceptivo verificado pela redução da alodínia mecânica e hiperalgesia térmica induzidas por CFA em ratos;

4.1.2 Apresentou comportamento tipo-antidepressivo, observado pela diminuição do tempo de imobilidade no teste do nado forçado;

4.1.3 Não reduziu o edema de pata e nem preveniu o aumento da atividade da enzima mieloperoxidase induzidos por CFA, descartando efeito anti-inflamatório;

4.1.4 Não apresentou efeitos antinociceptivo e tipo-antidepressivo após a administração da naloxona, indicando que seus efeitos são dependentes do sistema opioide;

4.1.5 Não induziu efeitos adversos comumente observados pelo uso de opioides (constipação, sedação), bem como não induziu hiperalgesia térmica nos animais.

4.2 CONCLUSÃO GERAL

Com os resultados do presente estudo concluímos que o extrato bruto das folhas de *Vitex megapotamica* apresentou efeito antinociceptivo e tipo-antidepressivo os quais parecem ser dependentes do sistema opioide, sem alterar parâmetros inflamatórios e sem causar efeitos adversos comumente desencadeados pelos opioides como constipação e sedação, suportando seu uso popular como analgésico (Figura 3).

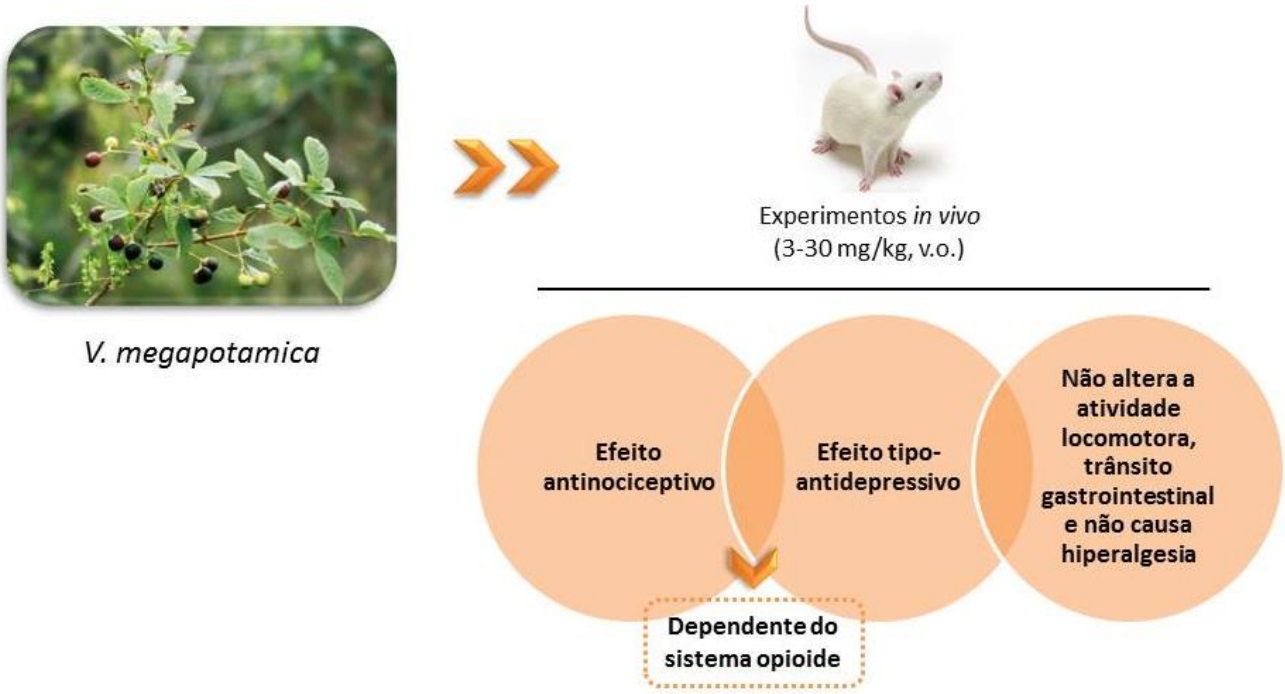


Figura 3- Conclusão ilustrativa do efeito do extrato bruto de *V. megapotamica*. Fonte: do autor.

5 PERSPECTIVAS

✓ Testar o envolvimento dos diferentes receptores opioides (μ, κ, δ), no efeito antinociceptivo e tipo-antidepressivo de *V. megapotamica*, utilizando antagonistas específicos para cada um deles.

✓ Verificar outros mecanismos de ação para o efeito antinociceptivo e tipo-antidepressivo do extrato bruto de *V. megapotamica.*

6 REFERÊNCIAS

ANDERSSON, H.I. Increased mortality among individuals with chronic widespread pain relates to lifestyle factors: A prospective population-based study. **Disability and Rehabilitation**, v. 31, p. 1980–1987, 2009.

AOKI, Y. et al. Differential alternation of the antinociceptive effect of narcoticanalgesics on the inflammatory pain state. **Neuroscience Letters**, v. 560, p. 122-125, 2014.

ARAÚJO, V.O. et al. Renoprotective Effects of *Vitex megapotamica* (Spreng.) Moldenke in C57BL/6 LDLr-Null Mice Undergoing High Fat Diet. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1-10, 2015.

ARNOUS, A.H.; SANTOS, A.S.; BEINNER, R.P.C. Plantas medicinais de uso caseiro-conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. **Revista Espaço para a Saúde**, v. 6, p. 1-6, 2005.

BAIR, M.J. et al. Association of Depression and Anxiety Alone and in Combination with Chronic Musculoskeletal Pain in Primary Care Patients. **Psychosomatic Medicine**, v. 70, p. 890–897, 2008.

BAO, Y.; STURM, R.; CROGHAN, T.W. How does chronic pain impact health care utilization by depressed individuals? A national study. **Psychiatric Services**, v. 54, p. 693–697, 2003.

BASBAUM, A.I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, p. 267-284, 2009.

BEAL, B.R.; WALLACE, M.S. An overview of pharmacologic management of chronic pain. **Medical Clinics of North America**, v. 100, p. 65-79, 2016.

BERGER, D. et al. Efficacy of *Vitex agnus castus L*. extract Ze 440 in patients with pre-menstrual syndrome (PMS). **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 264, p. 150-153, 2000.

BLYTH, F.M. et al. Chronic pain in Australia: a prevalence study. **Pain**, v. 89, p.127-134, 2001.

BOVE, G.M.; DILLEY, A. The conundrum of sensitization when recording from nociceptors. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 188, p. 213-218, 2010.

BRANDT, A.P et al. Avaliação in vivo do efeito hipocolesterolêmico e toxicológico preliminar do extrato bruto hidroalcoólico e decocção da *Vitex megapotamica* (Spreng) Moldenke (*V. montevidensis Cham*.). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 388-393, 2009.

BRASIL, Ministério Da Saúde. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**, 1ª edição, Brasília, 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de fitoterápicos – Farmacopeia Brasileira,** 1ª edição Brasília: Anvisa, 2012.

BRUM, T.F. et al. Análise fitoquímica preliminar das folhas de *Vitex megapotamica* (Sprengel) Moldenke. **Revista Saúde (Santa Maria)**, v. 37, p. 57-62, 2011.

CAPURON, L.; MILLER, A.H. Cytokines and psychopathology: lessons from interferon-alpha. **Biological Psychiatry**, v. 56, p. 819-824, 2004.

CEPEDA, M.S. et al. Comparison of the risks of shopping behavior and opioid abuse between tapentadol and oxycodone and association of shopping behavior and opioid abuse. **The Clinical Journal of Pain**, v. 30, p. 1051–1056, 2014.

COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C.J. Neuropathic pain: a maladaptive response of nervous system to damage. **Annual Review Neurosciwnce**, v. 32, p. 1-32, 2009.

CRYAN, J.F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 23, p. 238–245, 2002.

DANTZER, R. et al. From inflammation to sickness and depression: when the imune system subjugates the brain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, p. 46-56, 2008.

DA SILVA, K.A.B.S. et al. Plant derived alkaloid (-)-cassine induces anti-inflammatory and anti-hyperalgesics effects in both acute and chronic inflammatory and neuropathic pain models. **Neuropharmacology**, v. 62, p. 967-977, 2012.

DHARMASIRI, M.G. et al. Anti-inflammatory and analgesic activities of mature fresh leaves of *Vitex negundo*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, p. 199-206, 2003.

DWORKIN, R.H.; GITLIN, M.J. Clinical aspects of depression in chronic pain patients. **The Clinical Journal of Pain**, v. 7, p. 79–94, 1991.

DWORKIN, R.H. et al. Recommendations for the pharmacological management of neuropathic pain: an overview and literature update. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 85, p. 3-14, 2010.

FAYAZ, A. et al. Prevalence of chronic pain in the UK: a systematic review and meta-analysis of population studies. **BMJ Open**, v. 6, e010364, 2016.

FERREIRA, V.F.; PINTO, A.C. A fitoterapia no mundo atual. **Química Nova**, v. 33, p. 1829-1829, 2010.

FIORE, N.T.; AUSTIN, P.J. Are the emergence of affective disturbances in neuropathic pain states contingent on supraspinal neuroinflammation? **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 56, p. 397–411, 2016.

GAMBASSI, G. Pain and depression: the egg and the chicken story revisited. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v. 49, p. 103-112, 2009.

GILRON, I. et al. Nortriptyline and gabapentin, alone and in combination for neuropathic pain: a double-blind, randomised controlled crossover trial. **The Lancet**, v. 374, p. 1252–1261, 2009.

GOMES, R.P. et al. Efeitos de um minuto e dez minutos de deambulação em ratos com artrite induzida por adjuvante completo de Freund sobre os sintomas de dor e edema. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 54, p. 83-89, 2014.

GRACE, P.M. et al. Pathological pain and the neuroimmune interface. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, p. 217 -231, 2014.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 1-93, 2006.

HASENCLEVER, L. et al. Diagnóstico dos Desafios e Oportunidades no Mercado de Plantas Medicinais e Fitoterápicos Brasileiro. **Centro de Gestão e Estudos Estratégicos - Ciência, Tecnologia e Inovação**, p. 1-150, 2009.

Institute of Medicine (US) Committee on Advancing Pain Research C, and Education. Relieving pain in America: a blueprint for tansforming prevention, care, education, and research. Report Brief. **Institute of Medicine of the National Academies (NHI)**, 2011.

JAFARINIA, M. et al. Efficacy and safety of oral ketamine versus diclofenac to alleviate mild to moderate depression in chronic pain patients: A double-blind, randomized, controlled trial. **Journal of Affective Disorders**, v. 204, p. 1-8, 2016.

JARACZ, J. et al. Unexplained painful physical symptoms in patients with major depressive disorder: prevalence, pathophysiology and management. **CNS Drugs**, v. 30, p. 293–304, 2016.

JUNG, B.F. et al. Neuropathic pain following breast cancer surgery: proposed classification. **Pain**, v. 104, p. 1-13, 2003.

KIM, H. et al. Brain indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to the comorbidity of pain and depression. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, p. 2940-2954, 2012.

LACERDA, A.L.T. et al. Depressão: do neurônio ao funcionamento social. Artmed, Porto Alegre, 2009.

LAW, P.Y.; WONG, Y.H.; LOH, H.H. Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 40, p. 389-430, 2000.

LEITÃO, S.G. et al. Phytochemical profile and analgesic evaluation of *Vitex cymosa* leaf extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p. 874-883, 2011.

LI, W.M. et al. Analgesic effect of electroacupuncture on complete Freund's adjuvant-induced inflammatory pain in mice: a model of antipain treatment by acupuncture in mice. **The Japanese Journal of Physiology**, v. 55, p. 339-344, 2005.

LIANG, X. et al. Opioid system modulates the immune function: a review. **Translational Perioperative and Pain Medicine**, v. 1, p. 5-13, 2016.

LOESER, J.D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **The Lancet**, v. 353, p. 1607–1609, 1999.

LOOSE, J.D.; TREEDE, R.D. The Kyoto protocol of IASP basic pain terminology. **Pain**, v. 137, p. 473-477, 2008.

LUZ, N. et al. A fitoterapia no SUS e o programa de pesquisas de plantas medicinais da CEME. Brasília, 2006.

LYNCH, M.E.; WATSON, C.P.N. The pharmacotherapy of chronic pain: A review. **Pain Research and Management**, v. 11, p. 11-38, 2006.

LYNCH, M.E. The pharmacotherapy of chronic pain. **Rheumatic Disease Clinics of North American**, v. 34, p. 369-385, 2008.

MACIEL, I.S. et al. Synergistic effects of celecoxib and bupropion in a model of chronic inflammation-related depression in mice. **PloS One**, v. 8, p. 1-15, 2013.

MANOSSO, L.M. et al. Antidepressant-like effect of α-tocopherol in a mouse model of depressive-like behavior induced by TNF-α. **Progress in Neuropharmacology and Biological Psychiatry**, v. 46, p. 48-57, 2013.

MAO, J., GOLD, M.S., BACKONJA, M.M. Combination drug therapy for chronic pain: a call for more clinical studies. **The Journal of Pain**, v. 12, p. 157-166, 2011.

MARCHAND, F. et al. Evidence for an involvement of supraspinal δ- and spinal μ-opioid receptors in the antihyperalgesic effect of chronically administered clomipramine in mononeuropathic rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 307, p. 268-274, 2003.

MICHAUD, K.; BOMBARDIER, C.; EMERY, P. Quality of life in patients with rheumatoid arthritis: Does abatacept make a difference? **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 25 p. 35–45, 2007.

NAVRATILOVA, E.; PORRECA, F. Reward and motivation in pain and pain relief. **Nature Neuroscience,** v. 17, p. 1304-1312, 2014.

PIMENTA, C.A.M.; KOIZUM, M.S.; TEIXEIRA, M.J. Dor crônica e depressão: estudo em 92 doentes. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 34, p. 76-83, 2000.

RAISON, C.L.; CAPURON, L.; MILLER, A.H. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. **Trends in Immunology**, v. 27, p. 24-31, 2006.

RAYNER, L. et al. Depression in patients with chronic pain attending a specialised pain treatment centre: prevalence and impact on health care costs. **PAIN**, v. 157, p. 1472-1479, 2016.

REZENDE, H.A.; COCCO, M.I.M. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. **Revista Escola Enfermagem**, v. 36, p. 282-288, 2002.

SÁ, K. et al. Prevalência de dor crônica e fatores associados na população de Salvador, Bahia. **Revista Saúde Pública**, v. 43, p. 1-9, 2009.

SANTOS, D.S. et al. Utilização de um modelo experimental para estudo sobre o toque terapêutico. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 21, p. 1-8, 2013.

SBED- Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor. 2013. Disponível em: http://memoria.ebc.com.br/agenciabrasil/noticia/2013-01-13/dor-cronica-afeta-entre-15-e-40-dos-brasileiros-dependendo-da-regiao-do-pais. Acesso em: 20 de junho de 2016.

SCHMIDT, H.D.; SHELTON, R.C.; DUMAN, R.S. Functional biomarkers of depression: diagnosis, treatment, and pathophysiology. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, p. 2375-2394, 2011.

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

SCHULTZ, J.; GROSS, G. Opioids and cardioprotection. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 89, p. 123-137, 2001.

SELLINGER, J.J. et al. Combined use of opioids and antidepressants in the treatment of pain: a review of veterans health administration data for patients with pain both with and without co-morbid depression. **Psychiatric Quarterly**, p. 1-9, 2015.

SILVA, M.D. Estudos comportamentais e farmacológicos com a diacereína no modelo de monoartrite induzida por adjuvante completo de Freund (CFA) em ratos. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

SINGH, B.; DASH, A.; HALDAR, P. Comorbidity of chronic pain & depression and its treatment outcome: a review. **IOSR Journal of Dental and Medical Sciences**, v. 14, p. 32-34, 2015.

TAUBEN, D. Nonopioid medications for pain. **Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America**, v. 26, p. 219–248, 2015.

TENG, C.T.; HUMES, E.C.; DEMETRIO, F.N. Depression and medical comorbidity. **Archives of Clinical Psychiatry**, v. 32, p. 149-159, 2005.

VEIGA JR, V.F.; PINTO, A.C. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, p. 519-528, 2005.

VIANNA, E.; KOEHLER, A.B. Tratamentos simplificados para germinação de sementes de Tarumã (*Vitex megapotamica* (Spreng.) Moldenke). **Revista Acadêmica**, v. 5, p. 189-193, 2007.

VOSCOPOULOS, C.; LEMA, M. When does acute pain become chronic? **British Journal of Anaesthesia**, v. 105, p. 69-85, 2010.

WALKER, A.K. et al. Neuroinflammation and Comorbidity of Pain and Depression. **Pharmacological reviews**, v. 66, p. 80-101, 2014.

WEBSTER, D.E. et al. Activation of the mu-opiate receptor by *Vitex agnus-castus* methanol extracts: implication for its use in PMS. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p. 216-221, 2006.

WEHLING, M. Non-steroidal anti-inflammatory drug use in chronic pain conditions with special emphasis on the elderly and patients with relevant comorbidities: management and mitigation of risks and adverse effects. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 70, p. 1159-1172, 2014.

WHITE, F.; WILSON, N. Opiate-induced hypernociception and chemokine receptors. **Neuropharmacology**, v. 58, p. 35-37, 2010.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Regional office for the Western Pacific. Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines. Geneva: WHO, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). The world medicines situation 2011: traditional medicines: global situation, issues and challenges. Geneva: WHO, 2011.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, p. 147-152, 2001.

ZANATTA, L. et al. Effect of crude extract and fractions from *Vitex megapotamica* leaves on hyperglycemia in alloxandiabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 151-155, 2007.

ZHU, C.; BLAKELY, R.D.; HEWLETT, W.A. The Proinflammatory Cytokines Interleukin-1beta and Tumor Necrosis Factor-Alpha Activate Serotonin Transporters. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, p. 2121–2131, 2006.

7 CARTA DE ACEITE DO COMITÊ DE ÉTICA EM USO ANIMAL (CEUA)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-UFSM

CARTA DE APROVAÇÃO

A Comissão de Ética no Uso de Animais-UFSM, analisou o protocolo de pesquisa:

Título do Projeto: "Avaliação do efeito analgésico, antinflamatório, tipo-antidepressivo e da toxicidade de extratos de plantas da flora brasileira"

Número do Parecer: 116/2013

Pesquisador Responsável: Prof.ª Dr.ª Maribel Antonello Rubin

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê.

OBS: Anualmente deve-se enviar à CEUA relatório parcial ou final deste projeto.

Os membros da CEUA-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

DATA DA REUNIÃO DE APROVAÇÃO: 10/04/2014.

Santa Maria, 10 de abril de 2014.

Prof. Dr. Alexandre Krause
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais- UFSM