



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**Potencial terapêutico do extrato metanólico de *Condalia buxifolia* Reissek no controle da dor aguda: estudo do mecanismo de ação**

**TESE DE DOUTORADO**

**Róli Rodrigues Simões**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2015**

**Potencial terapêutico do extrato metanólico de *Condalia buxifolia* Reissek no controle da dor aguda: estudo do mecanismo de ação**

por

**Róli Rodrigues Simões**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração Neuropsicofarmacologia e Imunofarmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Farmacologia.**

**Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos**

**Santa Maria**

**2015**

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

Rodrigues Simões, Róli  
Potencial terapêutico do extrato metanólico de  
Condalia buxifolia Reissek no controle da dor aguda:  
estudo do mecanismo de ação / Róli Rodrigues Simões.-2015.  
172 p.; 30cm

Orientador: Adair Roberto Soares dos Santos  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-  
Graduação em Farmacologia, RS, 2015

1. Condalia buxifolia 2. camundongos 3. opióide 4.  
TRPV1 5. PKA I. Soares dos Santos, Adair Roberto II.  
Título.

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Tese de Doutorado

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DO EXTRATO METANÓLICO DE *CONDALIA  
BUXIFOLIA* REISSEK NO CONTROLE DA DOR AGUDA: ESTUDO DO  
MECANISMO DE AÇÃO**

elaborada por  
**Róli Rodrigues Simões**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutor em Farmacologia**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Adair Roberto Soares dos Santos**  
(Presidente/orientador-UFSC)

**Emilio Luiz Streck** (Membro externo-UNESC)

**Carina Rodrigues Boeck** (Membro externo-UNIFRA)

**Roselei Fachinetto** (Membro- UFSM)

**Ana Flavia Furian** (Membro- UFSM)

Santa Maria, 6 de agosto de 2015

Dedico este trabalho a mim, pois apesar de todos os obstáculos e dificuldades com as quais me deparei, não recuei um passo sequer, sempre objetivando a realização de um sonho

*O inverno nunca falha em se tornar primavera*  
Nitiren Daishonin

## AGRADECIMENTOS

Agradeço às funções protetoras do universo pela proteção a mim fornecida, com a qual pude desenvolver paciência, dedicação e, principalmente, determinação. Características que sem as quais não teria como realizar e terminar este trabalho;

Aos meus familiares, pelo carinho, incentivos e investimentos que recebi;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos pela orientação, pelos ensinamentos e por acreditar nesse trabalho;

Aos animais utilizados durante o curso, sem os quais não teria esta coletânea de dados;

Aos colegas do LANDI, pelas conversas, discussões de ideias e parceria nas comemorações;

Ao casal Nilva e Roque pelo acolhimento em sua casa durante meu período inicial em Florianópolis, além de sua amizade e ajuda em diversas questões;

Às amigas Caroline e Marisa Frederico pelo carinho e amizade em momentos difíceis;

Ao colega Leandro Flores pela amizade, pela ajuda na leitura da tese e realização de esquemas gráficos;

Ao colega e amigo Igor Coelho pela amizade, parceria na realização dos experimentos, discussão de ideias, realização de esquemas gráficos e toda ajuda durante os anos do doutorado;

À família da Carol pela acolhida, os convites para os passeios, os almoços...que fizeram me sentir em família;

À Ivanda Masson, que, além de me acolher como uma filha, me aconselhando, ouvindo e, principalmente, acreditou em meu potencial, não somente como cientista, mas também como um valor humano;

Aos meus companheiros de luta da Soka Gakkai, por todo carinho e amizade;

Ao meu Mestre, Dr. Daisaku Ikeda, que mesmo longe, sempre pude contar com seu apoio e incentivo, e que sempre tive a certeza de nunca estar sozinha;

À todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para que eu pudesse realizar meus experimentos e concluir o doutorado;

À CAPES pela bolsa concedida;

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia pela oportunidade de realização deste curso.

À Universidade Federal de Santa Catarina pela oportunidade de realizar a parte experimental e pela disponibilização dos animais.



## RESUMO

A planta medicinal *Condalia buxifolia* tem sido tradicionalmente utilizada para o tratamento de processos inflamatórios. O presente estudo tem como objetivo avaliar o perfil fitoquímico e o efeito antinociceptivo do extrato metanólico da casca da raiz de *Condalia buxifolia* (EBMCb) em modelos de dor aguda, bem como investigar o possível mecanismo adjacente a este efeito em camundongos. A análise fitoquímica do extrato evidenciou a presença de grande quantidade de alcaloides. O EBMCb administrado 1 hora antes dos experimentos por via intragástrica (100 e 300 mg/kg, i.g.), reproduzindo a via utilizada em seres humanos (oral), promoveu redução da nocicepção de origem inflamatória (2ª fase) induzida pela injeção intraplantar (i.pl.) de formalina e do edema de pata, sendo que seu efeito antiedematogênico e antinociceptivo perdurou por até 4 e 6 h após a sua administração. O EBMCb (10-300) também preveniu a nocicepção induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético. Ademais, o EBMCb (100 mg/kg, i.g.) preveniu a nocicepção e edema de pata induzido pela injeção i.pl. de capsaicina, salina ácida e a nocicepção induzida pela injeção i.pl. de glutamato. Centralmente, o EBMCb atuou aumentando a latência ao estímulo nociceptivo no modelo de placa quente. Aliado a este resultado foi demonstrado que o sistema opióide está envolvido no mecanismo de ação do EBMCb, uma vez que seu efeito (na dose de 300 mg/kg, i.g.) foi revertido pela naloxona (antagonista de receptores opióides). O tratamento agudo (prolongado) com o EBMCb (100 mg/kg, i.g.) preveniu a hiperalgesia mecânica e térmica (calor) causada pela incisão plantar (IP), um modelo de dor pós-operatória; bem como preveniu o aumento das concentrações de citocinas inflamatórias [interleucina 1- $\beta$  (IL-1  $\beta$ ), fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ )] e do fator de crescimento do nervo (NGF). Adicionalmente, o EBMCb foi capaz de prevenir a nocicepção induzida pelos ativadores da via PLC/PKC e AMPc/PKA, como o PMA e a forskolina e PGE<sub>2</sub>. Além disso, o EBMCb também foi capaz de reduzir a ativação da PKA, demonstrada por análise do conteúdo da proteína fosforilada, sugerindo que o EBMCb possa agir por interação com essa via de sinalização. Também foi demonstrado que o tratamento intratecal com capsaicina (para dessensibilização das fibras C), não alterou a hiperalgesia mecânica induzida pela IP e que a ablação não influenciou no efeito antinociceptivo do EBMCb. Finalmente, o EBMCb não causou efeitos sedativos ou alteração na atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto e o tratamento prolongado não promoveu alterações macroscópicas nos órgãos vitais (fígado, coração, rins e pulmões), nem alterações no hemograma e de parâmetros de bioquímica sanguínea (glicemia, ureia, creatinina, ácido úrico, AST, ALT, GGT, colesterol total, HDL e LDL), bem como não mudou o perfil de ingestão de água e ração. Tomados em conjunto, os resultados demonstram que o efeito antinociceptivo do EBMCb se deve, em parte, pela ativação do sistema opióide e inibição do sistema glutamatérgico, de citocinas pró-inflamatórias e de canais TRPV1 e ASICs, bem como da inibição da sinalização dependente da PLC/PKC e/ou AMPc/PKA. Assim, os resultados do presente estudo evidenciam o potencial efeito de *Condalia buxifolia* no controle da dor, bem como a continuidade de estudos pré-clínicos aprofundados, e futuramente clínicos, visando o desenvolvimento de um fitoterápico analgésico.

Palavras-chave: *Condalia buxifolia*, camundongos, opióide, TRPV1, PKA.

## ABSTRACT

The medicinal plant *Condalia buxifolia* has been traditionally used to treat inflammatory processes. The present study aimed to evaluate the phytochemical profile and the analgesic effect of the methanolic extract from the root bark of *Condalia buxifolia* (MECb) in models of acute pain as well as to investigate the possible adjacent mechanism of its effect in mice. The phytochemical analysis of the extract showed the presence of large amounts of alkaloids. The MECb administered intragastrically 1 hour before the experiments (100 and 300 mg/kg, ig), mimicking the route used in humans (oral), promoted reduction of the nociceptive inflammatory pain (2nd phase) and paw oedema induced by intraplantar (i.pl.) injection of formalin, and its antiedematogenic and analgesic effect lasted until 4 and 6 h after MECb pretreatment. MECb (10-300) also prevented nociception induced by intraperitoneal injection of acetic acid. Furthermore, MECb (100 mg/kg, i.g.) prevented paw oedema and nociception induced by i.pl. injection of capsaicin, acidified saline, and nociception glutamate-induced by i.pl. injection. Centrally, MECb increased the latency to nociceptive stimulation in the hot plate model. Moreover, the opioid system is involved in the mechanism of action of MECb, since its effect (at the dose of 300 mg/kg, i.g.) was reversed by naloxone (an antagonist of opioid receptor). Acute (prolonged) treatment with MECb (100 mg/kg, i.g.) reduced the mechanical and thermal (heat) hyperalgesia caused by plantar incision (PI), a model of postoperative pain; and prevented the increase of the concentration of inflammatory cytokines [interleukin-1  $\beta$  (IL-1  $\beta$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )] and neurotrophin [nerve growth factor (NGF)]. Additionally, MECb was able to prevent nociception induced by PLC/PKC and cAMP/PKA pathway activators, PMA, forskolin and PGE<sub>2</sub>. Furthermore, MECb was also able to reduce PKA activation, demonstrated by western blotting analysis, suggesting that the MECb can act by interaction with this signaling pathway. Intrathecal treatment with capsaicin (for desensitization of C fibers) does not alter the mechanical hyperalgesia induced by IP and ablation did not influence the analgesic effect of MECb. Finally, MECb caused no sedative effects or alterations on motor activity of the animals in the open field test and the prolonged treatment did not promote macroscopic changes in important organs (liver, heart, spleen, kidneys and lungs), or changes in hematological and biochemical parameters (glucose, urea, creatinine, uric acid, AST, ALT, GGT, total cholesterol, HDL and LDL), and did not change the profile of food and water intake. Taken together, the results show that the antinociceptive effect of MECb is due, in part, by activation of the opioid system and inhibition of glutamatergic system, pro-inflammatory cytokines and TRPV1 and ASICs channels, as well as the PLC/PKC and/or cAMP/PKA signaling-dependent inhibition. Thus, the results of this study support that *Condalia buxifolia* has potential effect on pain control, and the continuity of extensive preclinical and clinical studies for the development of an analgesic phytoterapeutic.

Key words: *Condalia buxifolia*, mice, opioid, TRPV1, PKA.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Exemplar da espécie <i>Condalia buxifolia</i> .....	22
Figura 2: Alguns receptores em terminais nociceptivos e sua interação com diferentes estímulos. ....	29
Figura 3: Representação esquemática das diferenças anatômicas e funcionais das fibras sensoriais aferentes primárias. ....	31
Figura 4: Representação esquemática da inserção das fibras sensoriais aferentes primárias no corno dorsal da medula espinal. ....	33
Figura 5: Três das principais vias ascendentes que transmitem a informação nociceptiva a partir da medula espinal aos centros superiores. ....	34
Figura 6: Principais mediadores periféricos da inflamação. ....	38
Figura 7: Esquema do processo de inflamação neurogênica.....	41
Figura 8: Sensibilização central: Medula espinal.....	44
Figura 9: Principais <i>termo-TRPs</i> envolvidos na transmissão nociceptiva e seus principais ativadores.....	46
Figura 10: Canais, receptores e mecanismos de transdução de terminações aferentes nociceptivas.....	48
Figura 11: Representação esquemática do circuito modulatório da dor.....	51
Figura 12: Ilustração de uma lesão periférica e do terminal periférico do neurônio aferente primário. ....	52
Figura 13: Sistema de controle descendente da dor e sítios de ação dos opióides ..	55
Figura 14: Representação esquemática dos possíveis mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo do EBMCb.....	149

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC- Adenilato ciclase

AINE- Anti-inflamatório não esteroide

ALT- Alanina aminotransferase

AMPC- Monofosfato de adenosina cíclico

ASIC- Canal iônico sensível ao ácido (da sigla em inglês: Acid sensing ion channel)

AST- Aspartato aminotransferase

ATP- Adenosina trifosfato

BDNF- Fator neurotrófico derivado do cérebro (da sigla em inglês: Brain-derived neurotrophic factor)

CCK- Colecistocinina (da sigla em inglês: Cholecystokinin)

CDME- Corno dorsal da medula espinal

CEUA- Comissão de Ética no Uso de Animais

CGRP- Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (da sigla em inglês: Calcitonin gene-related polipeptide)

DE<sub>50</sub>- Dose efetiva 50%

EBMCb- Extrato bruto metanólico de *Condalia buxifolia*

EP- Receptor prostanóide E (da sigla em inglês: E Prostanoid receptor)

ERK- Cinase regulada por sinal extracelular (da sigla em inglês: Extracellular signal-regulated kinase)

FSK- Forscolina (da sigla em inglês: Forskolin)

FTC $\beta$ - Fator transformador de crescimento  $\beta$

GABA- Ácido gama amino-butírico

GGT- Gama Glutamil Transferase

GJ- Gânglio jugular

GN- Gânglio nodoso

GPCRs- Receptores acoplados à proteína G (da sigla em inglês: G protein coupled receptors)

GRD- Gânglio da raiz dorsal

GT- Gânglio trigeminal

HDL- Lipoproteína de alta densidade (da sigla em inglês: High density lipoprotein)

i.g.- Via intragástrica

i.p.- Via intraperitoneal

i.pl.- Via intraplantar

IASP- Associação internacional para o estudo da dor (da sigla em inglês: International Association for the Study of Pain)

IL-10- Interleucina 10

IL-1 $\beta$ - Interleucina 1  $\beta$

IL-6- Interleucina 6

IL-8- Interleucina 8

K2P- Canal de potássio 2 poros

Kv- Canais de potássio controlados por voltagem

LC- Locus coeruleus

LDL- Lipoproteína de baixa densidade (da sigla em inglês: Low density lipoprotein)

LIF- Fator inibitório da leucemia

MAPK- Proteína cinase ativada por mitógeno (da sigla em inglês: Mitogen-activated protein Kinase)

NaV- Canal de sódio controlado por voltagem de subunidade alfa

NCHS- Centro Nacional para Estatísticas da Saúde (da sigla em inglês: National Center for Health Statistics)

NGF- Fator de crescimento neural (da sigla em inglês: Nerve Growth Factor)

NKA- Neurocinina A (da sigla em inglês: Neurokinin A)

NKB- Neurocinina B (da sigla em inglês: Neurokinin B)

OMS- Organização mundial da saúde

P2X- Receptor purinérgico ionotrópico

P2Y- Receptor purinérgico acoplado à proteína G

PAF- Fator ativador plaquetário

PAG- Substância cinzenta periaquedutal (da sigla em inglês: Periaqueductal Grey Matter)

PG- Prostaglandina

PGE<sub>2</sub>- Prostaglandina E<sub>2</sub>

PGI<sub>2</sub>- Prostaciclina

pH- Potencial hidrogeniônico

PKA- Proteína cinase A

PKC- Proteína cinase C

PLC- Fosfolipase C

PMA- Miristato acetato de forbol (da sigla em inglês: Phorbol miristate acetate)

rACC- córtex cingulado anterior rostral

RS- Rio Grande do Sul

RVM- Bulbo ventromedial rostral (da sigla em inglês: Rostral Ventromedial Medulla)

SARA- Sistema ativador reticular ascendente

SCPV- Substância cinzenta periaquedutal ventral

SG- Substância gelatinosa

SNC- Sistema nervoso central

SNP- Sistema nervoso periférico

SP- Substância P

TLR- Receptores tipo "Toll" (da sigla em inglês: Toll like receptor)

TNF- $\alpha$ - Fator de necrose tumoral alfa (da sigla em inglês: Tumor Necrosis Factor Alpha)

TrK- Receptor tirosina-quinase

TRP- Receptor de potencial transitório (da sigla em inglês: Transient Receptor Potential Channel)

TRPA- Receptor de potencial transitório da subfamília anquirina

TRPA1- Receptor de potencial transitório da subfamília anquirina, membro 1

TRPC- Receptor de potencial transitório da subfamília canônico

TRPM- Receptor de potencial transitório da subfamília melastatina

TRPML- Receptor de potencial transitório da subfamília mucolipina

TRPP- Receptor de potencial transitório da subfamília policistina

TRPV- Receptor de potencial transitório da subfamília vanilóide

TRPV1- Receptor de potencial transitório da subfamília vanilóide, membro 1

TRPV2- Receptor de potencial transitório da subfamília vanilóide, membro 2

TRPV3- Receptor de potencial transitório da subfamília vanilóide, membro 3

VGICs- Canais iônicos controlados por voltagem

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1</b> .....	169
<b>Anexo 2</b> .....	171



## SUMÁRIO

<b>1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
<b>1.1 Plantas Medicinais</b> .....	17
1.1.1 Plantas Medicinais e o Brasil.....	19
<b>1.2 Considerações sobre <i>Condalia buxifolia</i></b> .....	20
<b>1.3 Dor- Considerações gerais</b> .....	23
<b>1.4 Classificação da dor</b> .....	24
<b>1.5 Fisiopatologia da dor</b> .....	25
1.5.2 Transdução sensorial .....	27
1.5.3 Canais iônicos .....	28
1.5.5.1 Vias da transmissão nociceptiva .....	33
1.5.6 Percepção e processamento da dor.....	35
<b>1.6 Mediadores inflamatórios e nocicepção: sensibilização periférica e central</b> .....	36
1.6.1 Sensibilização periférica.....	37
1.6.2 Sensibilização Central.....	41
<b>1.7 Receptores de Potencial Transitório (TRP)</b> .....	44
<b>1.8 Dor pós-operatória</b> .....	48
1.8.1 Incisão plantar .....	50
<b>1.9 Controle da dor: Vias descendentes analgésicas</b> .....	50
1.9.1 Sistema opioide.....	53
<b>1.10 Farmacologia da dor</b> .....	55
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	60
2.1 Objetivo geral .....	60
2.2 Objetivos específicos .....	60
<b>3 ARTIGOS CIENTÍFICOS</b> .....	62
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	137
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	150
<b>6 REFERÊNCIAS</b> .....	152

## 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 Plantas Medicinais

O conhecimento sobre as plantas tem acompanhado a evolução do homem através dos tempos. As civilizações primitivas logo notaram a existência, ao lado das plantas comestíveis, de outras dotadas de maior ou menor toxicidade que, ao serem experimentadas no combate às doenças, revelaram, embora empiricamente, o seu potencial curativo. Toda essa informação foi inicialmente transmitida oralmente às gerações posteriores, para depois, com o aparecimento da escrita, passar a ser compilada e guardada (VICTORIO, LAGE, 2008).

Consideram-se como os primeiros documentos escritos as placas de barro, atualmente conservadas no British Museum, em Londres, as quais são documentos suméricos, babilônicos e acadianos, datando alguns mais de 3000 anos antes da era cristã. Dentre eles destaca-se o código de Hamurabi, no qual se encontra descrito, dentre diversas questões, o uso de produtos vegetais como curativos de enfermidades ou aromatizantes (ex. ópio, gálbano, assafétida, meimendo). Outro documento escrito de importância relevante é o papiro de Ebers, o qual representa o primeiro tratado médico egípcio conhecido, da primeira metade do século XVI antes da era cristã, em que parte do seu texto é destinada ao tratamento das doenças internas e o restante fornece indicações sobre a constituição dos medicamentos a serem empregados. Na antiga civilização chinesa é célebre a obra denominada *Pent-Sao* constituída por vários livros onde existem referências a numerosas substâncias naturais (LORENZI, MATOS, 2002; CONSELHO REGIONAL DE FARMÁCIA, 2012).

Em relação a civilizações mais recentes, uma contribuição importante é dada pelos povos helênicos, que ao receberem dos persas muitos produtos orientais, tiveram grandes médicos como Hipócrates, o “pai da medicina”, Galeno, a quem se deve algumas das formas farmacêuticas precursoras das que ainda hoje são usadas e Teofrasto que com a sua “História das plantas”, deixa descrições botânicas muito precisas, acompanhadas de indicações sobre efeitos tóxicos e propriedades curativas (ALMEIDA, 2003). Durante a Idade Média há um retrocesso na evolução da “Arte de Curar”. Esta situação, aos poucos, vai-se alterando com o esforço

exercido, em benefício da saúde e bem-estar da população em geral, pelas Ordens Religiosas, pois muitos dos seus membros utilizavam, criteriosamente, os conhecimentos greco-latinos sobre o emprego das plantas medicinais que cultivavam junto aos mosteiros. Com o Renascimento, o charlatanismo e o empirismo da medicina e farmácia da Idade Média, cedem lugar à experimentação, ao mesmo tempo em que vão sendo introduzidos na terapêutica novos medicamentos (VICTORIO, LAGE, 2008). No entanto, somente no final do século XVIII começou-se a isolar e determinar a estrutura dos constituintes ativos dos produtos de origem natural dotados de propriedades medicinais, o que levou o uso das plantas medicinais a novos rumos (DA CUNHA, 2003).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) (2000) define planta medicinal como “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”. A diferença entre planta medicinal e fitoterápico reside na elaboração da planta para uma formulação específica, o que caracteriza um fitoterápico. Segundo a Secretaria de Vigilância Sanitária, em sua portaria no. 6 de 31 de janeiro de 1995, fitoterápico é “todo medicamento tecnicamente obtido e elaborado, empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais com finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnóstico, com benefício para o usuário. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos do seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade”, ou seja, é o produto final acabado, embalado e rotulado. Na sua preparação podem ser utilizados adjuvantes farmacêuticos permitidos na legislação vigente. Dessa forma, não se considera fitoterápico um composto que inclua substâncias ativas isoladas do mesmo material vegetal ou de misturas de substâncias isoladas. Como exemplos podem ser citados *Uncaria tomentosa* (unha-de-gato), como antiinflamatória e *Passiflora spp* (maracujá), como calmante/ansiolítico. Por outro lado, fitofármaco é constituído do princípio ativo isolado de uma planta medicinal, sem passar por qualquer alteração molecular e, caso sofra alteração química, passa ao grupo dos sintéticos. Um exemplo de fitofármaco é o salicilato, obtido da árvore *Salix alba* ou salgueiro. Após modificação química deixa de ser fitofármaco e se transforma em medicamento sintético [ácido acetil salicílico (AAS)], um dos analgésicos mais difundidos mundialmente (CALIXTO et al., 2000).

Dados mostram que 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam práticas medicinais tradicionais, sendo que 85% dessas práticas envolvem o uso de plantas medicinais (BRASÍLIA, 2006; WHO, 2008). Isso demonstra que, apesar da grande oferta de medicamentos de uso convencional, os problemas de saúde da maior parte da população não foram resolvidos (VEIGA Jr, PINTO, MACIEL, 2005). Como exemplo, podemos citar as patologias envolvendo processos dolorosos (especialmente nos estados crônicos de dor), onde é grande o índice de refratariedade e/ou tolerância aos tratamentos convencionais com fármacos opióides e anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs), além da grande incidência de efeitos indesejados, o que demonstra a necessidade da contínua busca por medicamentos mais potentes e seguros, sendo que as plantas medicinais demonstram um vasto e promissor campo de pesquisa (CALIXTO et al., 2000).

Ainda segundo a OMS, 80% da população mundial não têm acesso ao atendimento primário de saúde, por estarem muito distantes dos centros médicos ou por não possuírem recursos para adquirir os medicamentos de uso convencional (AKERELE, 1993; ROSA et al., 2011). Para essa população, as terapias complementares e/ou alternativas são as principais formas de tratamento, e as plantas medicinais, os principais medicamentos (MENGUE, MENTZ, SCHENKEL, 2001; PEREIRA, OLIVEIRA, LEMOS, 2004; CARLINI et al., 2006; AGRA, FRANÇA, BARBOSA-FILHO, 2007).

### 1.1.1 Plantas Medicinais e o Brasil

Pioneiros europeus que se aventuraram pelo Novo Mundo aprenderam com os povos nativos sobre as plantas medicinais e seus usos, uma vez que os estudos e comércio de medicamentos eram privativos dos boticários. Uma das primeiras publicações sobre plantas medicinais brasileiras é a “Flora Fluminensis”, de Frei Velloso (1741 – 1811); contudo, o trabalho mais significativo e completo de botânica publicada no país até então foi de Von Martius (1794 – 1868), denominada de “Flora Brasiliensis” (CONSELHO REGIONAL DE FARMÁCIA, 2012).

Um levantamento realizado (BRASIL, 2001) indicou que cerca de 60% da população brasileira utiliza alguma medicação baseada em conceitos de medicina fitoterápica ou alternativa, como homeopatia e florais de Bach. Todavia, há controvérsias entre diversos autores sobre a efetividade deste tipo de intervenção

terapêutica (SHANG et al., 2005; LÜDTKE, RUTTEN, 2008; HALBERSTEIN, SIRKIN, OIEDA-VAZ, 2010; NAYAK et al., 2013). Apesar disso, ainda é comum no Brasil o consumo de plantas medicinais, sendo que grande parte desta utilização tem fundamentação empírica, propagada por usuários ou comerciantes. Apenas uma pequena parcela dessas plantas apresenta estudos científicos sobre suas propriedades farmacológicas e que comprovam sua eficácia e segurança, demonstrando, assim, a necessidade de mais pesquisas na área (VEIGA Jr, PINTO, MACIEL, 2005). Dessa forma, como o Brasil é um país de clima tropical e apresenta grande biodiversidade (cerca de 20-22% das plantas e microrganismos do planeta), há um crescente interesse da indústria farmacêutica para a produção de agentes terapêuticos de origem natural (CALIXTO, SIQUEIRA JUNIOR, 2008). Atualmente, os esforços para a descoberta de novos medicamentos são dirigidos no sentido de obter alternativas para superar a dependência externa. No Brasil, 84% dos medicamentos são importados e 78% da produção brasileira de fármacos é realizada por empresas multinacionais (CALIXTO et al., 2005; CALIXTO, SIQUEIRA JUNIOR, 2008).

## 1.2 Considerações sobre *Condalia buxifolia*

*Condalia buxifolia* pertence à família Rhamnaceae, que é uma família de plantas angiospérmicas (plantas com flor) e pertencentes à ordem Rosales. As Rhamnáceas possuem 58 gêneros e cerca de 900 espécies, entre árvores, arbustos e vinhas. Apresentam distribuição cosmopolita, mas são mais comuns em regiões tropicais e subtropicais (TORTOSA, NOVARA, 1992). Plantas da família Rhamnaceae apresentam uma variada classe de constituintes químicos como alcalóides ciclopeptídicos (MOREL, MACHADO, WESSJOHANN, 1995; MARCHAND, MOUSEUR, 1968), ciclopeptídeos (MOREL et al., 1979), flavonóides, antocianinas, taninos, esteróides, triterpenos e saponinas (SHAH et al., 1986).

O gênero *Condalia*, por sua vez, compreende cerca de 18 espécies distribuídas ao longo do continente Americano, do Norte ao Sul da América e, dentre as principais, temos: *C. buxifolia*, *C. correllii*, *C. ericoides*, *C. globosa*, *C. hookeri*, *C. lycioides*, *C. mexicana*, *C. microphylla*, *C. montana*, *C. spathulata*, *C. thomasiana*, *C. velutina*, *C. viridis*, *C. warnockii* e *C. weberbaeuri* (JHONSTON, 1962). Cinco destas

espécies são encontradas na América do Sul, sendo que uma (*C. buxifolia*) encontra-se no Brasil (JOHNSTON, SOARES, 1972). Atualmente, há raros estudos na literatura mostrando os constituintes químicos de plantas do gênero *Condalia*, todavia, estudos com *Condalia microphylla* mostram que de suas partes aéreas foram obtidos alcanos (hidrocarbonetos), esteróis, álcoois e ácidos graxos (especialmente palmítico e linoleico), e de seus frutos, antocianinas (malvidinas) (FRONTERA et al., 2000). Por outro lado, pesquisas a partir de extratos de folhas de *Condalia montana* revelaram apenas o seu perfil de alcanos e ácidos graxos (apresentando principalmente o palmítico e o linolênico) (ZYGLADO et al., 1992).

*Condalia buxifolia* Reissek (Figura 1) foi descrita por Siegfried Reissek em 1861. É conhecida popularmente como coronilha-folha-de-buxo ou espinilho e apresenta-se como uma árvore de aproximadamente quatro metros de altura, sendo encontrada no Brasil [desde o estado do Rio de Janeiro até o Rio Grande do Sul (RS)], Uruguai, Argentina e Bolívia. No RS, apresenta-se na floresta de restinga e em campos arenosos associados, bem como na floresta da encosta da Serra do Sudeste (SOBRAL et al. 2006). É utilizada na medicina popular através da infusão das cascas da raiz e do caule, sendo relatados os seus efeitos como antitérmico, anti-inflamatório e antidiarreico (BASTOS, 1989).

Da casca da raiz obtiveram-se os alcalóides ciclopeptídicos adouetina-Y' (MARCHAND, MONSEUR, 1968), scutianina-B (TSCHESCHE, AMMERMANN, FEHLHABER, 1971; TSCHESCHE, AMMERMANN, 1974), scutianina-C (SIERRA et al., 1974) e condalina-A (MOREL et al., 2002) e, a partir da casca do caule, isolaram os triterpenos taraxerol e lupeol, com potentes ações antiinflamatórias, e o esteróide  $\beta$ -sitosterol (MALDANER, 2005). Os alcalóides condalina-A e scutianina-B, em experimentos realizados por MOREL e colaboradores (2002), revelaram atividade antibacteriana *in vitro* contra cepas de bactérias gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *Micrococcus luteus*) e gram negativas (*Klebsiella pneumoniae*, *Salmomella setubal* e *Escherichia coli*). Por sua vez, com relação ao seu perfil de alcanos e de ácidos graxos, *C. buxifolia* apresenta uma porcentagem maior de alcanos do tipo hentriacontanos (21,7-25,9 %) e nonacosanos (13,1-19,1 %); e, em relação ao perfil lipídico, apresentou maiores porcentagens de ácido palmítico (29,6-35,6 %), ácido linolênico (11,6-17,6 %) e de ácido linoleico (8,9-9,0

%) (ZYGLADO et al., 1992). Interessante ressaltar que o ácido linolênico e o linoleico são ácidos graxos poli-insaturados pertencentes à série ômega-3 ( $\omega$ -3) e ômega-6 ( $\omega$ -6), respectivamente. Ambos são importantes componentes das membranas celulares, consistindo em precursores para variadas substâncias do nosso organismo, tais como as envolvidas na manutenção da pressão arterial e na resposta inflamatória (LOTTEMBERG, 2009).



Figura 1: Exemplar da espécie *Condalia buxifolia*.

Em A visão geral do arbusto e em B destaque para os espinhos presentes na planta.

Fonte: <http://floradeluruguay.blogspot.com.br/2010/06/molle-bagual.html>

Assim, devido à falta de estudos científicos até o momento sobre as atividades farmacológicas de *Condalia buxifolia*, à necessidade de validação de estudos piloto, associado ao seu principal uso popular (atividade anti-inflamatória é estreitamente relacionada com ação analgésica) e à análise de seus constituintes fitoquímicos envolvidos com atividade antinociceptiva e anti-inflamatória, reforça-se o interesse na pesquisa com esta planta em um dos campos de maior interesse farmacológico na atualidade: a dor.

### 1.3 Dor- Considerações gerais

A dor foi e continua sendo uma das grandes preocupações da humanidade. Desde os primórdios da civilização, de acordo com registros da Pré-história, e com os vários documentos escritos posteriormente, o ser humano procura esclarecer as razões que justificam a ocorrência da dor e desenvolver procedimentos destinados ao seu controle (TEIXEIRA, OKADA, 2009a).

Fisiologicamente a dor desempenha um papel importante porque funciona como um sinal de alerta de que algo está ameaçando a integridade do organismo (CHAPMAN, GAVRIN, 1999; BASBAUM et al., 2009). Neste sentido, torna-se um sintoma clinicamente importante para a detecção e avaliação de doenças, bem como para induzir um comportamento de precaução e, dessa forma, limitar os possíveis danos (MILLAN, 1999; WOOLF, 2000; ALMEIDA, ROIZENBLATT, TUFIK, 2004). No entanto, em certas condições patológicas os mecanismos relacionados à transmissão da dor podem ser alterados levando a quadros de hipersensibilidade onde, de uma função de alerta, a dor passa a ter um caráter crônico e muitas vezes debilitante (BASBAUM et al., 2009). Por outro lado, a falta da capacidade de experimentar a dor pode causar vários problemas sérios para a saúde, tais como automutilações e autoamputações. Esta condição rara é encontrada na insensibilidade congênita à dor, um problema genético, que acomete homens e mulheres na mesma proporção e surge devido a mutações no gene SCN9A que codifica a subunidade  $\alpha$  do NaV1.7 (canal de sódio controlado por voltagem do tipo VII). Esta doença só é conhecida no homem, sendo este um indício de que a ausência da dor seja incompatível com a sobrevivência dos animais (AXELROD, HILZ, 2003; DIB-HAJJ, YANG, WAXMAN, 2008). Em contraste, mutações no gene A1632E do mesmo canal conduzem a uma hiperexcitabilidade deste, acarretando em alterações na percepção de dor uma vez que os indivíduos acometidos desenvolvem intensa percepção dolorosa (ESTACION et al., 2008).

A dor é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, sigla em inglês) como uma “experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial ou ainda, descrita em termos que sugerem tal dano” (LOESER, TREEDE, 2008). Conforme tal descrição, a dor representa uma experiência complexa e muitas vezes subjetiva, envolvendo dois



componentes distintos: o componente emocional refere-se às expectativas e/ou experiências prévias do indivíduo, enquanto o componente sensorial, denominado *nocicepção*, é determinado pela estimulação das fibras aferentes primárias que transmitem o impulso nociceptivo até o sistema nervoso central (SNC) (RUSSO, BROSE, 1998). Desta forma, o termo *dor* é apropriado quando relacionado aos seres humanos, que são capazes de expressar tais componentes emocionais. Em modelos experimentais com roedores, a dor sentida pelos animais também envolve diversos aspectos, e embora vários trabalhos venham demonstrando metodologias para avaliação desse componente emocional em animais (KAZLAUCKAS et al., 2005; MUÑOZ-ABELLÁN, ARMARIO, NADAL, 2010; LEITE-ALMEIDA et al., 2012; MALATYNSKA et al., 2012; WANG et al., 2012), os modelos clássicos de investigação de dor permitem avaliar com relativa precisão e reprodutibilidade apenas o seu componente sensorial. Desta forma, nestes modelos considera-se mais apropriado utilizar o termo *nocicepção* (BARROT, 2012).

#### **1.4 Classificação da dor**

Existem muitas maneiras de se classificar a dor, porém didaticamente pode ser dividida quanto a sua duração e origem. Quanto à duração, a dor pode ser considerada *aguda*, decorrente da ativação direta de nociceptores após um estímulo nocivo, ou *crônica*, quando persiste por semanas ou meses, muitas vezes permanecendo mesmo após a recuperação da lesão inicial (LOESER, MELZACK, 1999). Com relação à origem, a dor pode ser classificada como *nociceptiva*, ocorrendo por ativação direta e/ou excessiva de nociceptores ou *neuropática*, que ocorre como consequência direta de uma lesão nervosa ou de uma doença que afete o sistema somatossensorial, seja em nível periférico ou central. Há ainda a dor de origem *inflamatória*, sustentada pela sensibilização dos nociceptores por mediadores inflamatórios. Os processos dolorosos, de origem neuropática ou inflamatória, levam a situações de hiperalgesia, caracterizada por dor exacerbada frente a um estímulo nocivo, ou alodínia, caracterizada pela sensação de dor ocasionada por exposição a estímulos não nocivos (DRAY, 1995; MILLAN, 1999; LOESER, TREEDE, 2008). E, por último, temos a dor de origem *psicogênica*, a qual está relacionada à prevalência de fatores psicológicos na gênese e manutenção do

processo doloroso. Esse tipo pode ser observado em distúrbios psicológicos como na depressão e na ansiedade (MERSKEY, 1986; MILLAN, 1999; NAKAMURA et al., 2014).

### **1.5 Fisiopatologia da dor**

Desde a antiguidade as ideias relacionadas à dor foram bastante diversificadas. Na Grécia antiga foi Aristóteles (384-322 a.C.) quem teve o impacto mais significativo no futuro entendimento sobre as sensações. Aristóteles entendia o tato como sendo um dos cinco sentidos principais, junto com a visão, olfato, audição e paladar, e acreditava que o tato estava diretamente relacionado à sensação de dor, reconhecendo sua direta correlação com um dano tecidual. Seguindo essa linha, Herophilus (335-280 a.C.) propunha ser o cérebro o órgão responsável pela consciência e sensações, reconhecendo que nervos periféricos seriam a ligação com a medula espinal, controlando as sensações e os movimentos, ideia que foi mais tarde confirmada por Galeno (130-201) (para revisão ver PERL, 2011). No entanto, foi Avicenna (980-1037), filósofo e fisiologista persa, quem relatou que em condições de doença a dor poderia ser dissociada do reconhecimento do tato e temperatura, propondo então que a dor seria uma sensação independente (para revisão ver PERL, 2007).

A partir dos anos 1800, foram propostas muitas teorias a respeito do processamento da dor. Charles Bell, em 1811, formulou a ideia de que os nervos sensoriais eram especializados em sua função, ou seja, adaptados para detectar e transmitir a informação gerada por um determinado estímulo. Vários outros fisiologistas estenderam os conhecimentos da época, e por volta dos anos 1880, várias propostas já suportavam o papel essencial de um mecanismo espinal de condução da informação gerada por um estímulo doloroso. O modo de detecção desse estímulo nocivo, no entanto, foi proposto por Charles Sherrington em 1906, como sendo devido a estruturas sensoriais específicas, mais tarde denominadas nociceptores (para revisão ver PERL, 2007). A partir daí inicia-se uma intensa busca pelo entendimento dos processos envolvidos na transdução, transmissão e percepção da dor, sendo relatados inúmeros estudos que culminam com os conhecimentos atuais.

Assim, o primeiro passo na sequência dos eventos que originam o fenômeno doloroso é a transformação dos estímulos nocivos em potenciais de ação (transdução sensorial) que, das fibras nervosas periféricas, são transferidos para o SNC (transmissão sensorial). O segundo estágio é referente ao processamento elaborado dessa informação nociceptiva, levando à percepção consciente da dor (BASBAUM, 2009).

### 1.5.1 Nociceptores

De acordo com a proposta de Sherrington, o processo de transdução ocorre a partir do estímulo de estruturas periféricas específicas para dor, os nociceptores. Estes são as terminações nervosas livres das fibras aferentes sensoriais de primeira ordem, presentes nos neurônios nociceptivos (pseudounipolar) (BASBAUM, 2009). Eles são ativados quando o estímulo é intenso (possuem alto limiar de ativação), ou seja, nem toda fibra sensorial conduz informação dolorosa (MILLAN, 1999; BASBAUM, 2009). Dessa forma, a função básica dos nociceptores é de transmitir informações sobre a lesão tecidual ocasionada por estímulos nocivos aos neurônios de ordem superior (FÜRST, 1999; BASBAUM, 2009).

Os nociceptores estão amplamente distribuídos na pele, vasos, músculos, articulações e vísceras (JULIUS, BASBAUM, 2001). Dividem-se em quatro classes: os *mecanoceptores*, sensíveis a estímulos mecânicos intensos; os *termoceptores*, sensíveis a estímulos térmicos (igual ou acima de 42°C ou menor que 5°C), os *polimodais*, sensíveis tanto a estímulos mecânicos, térmicos e químicos (TEIXEIRA, CORREA, PIMENTA, 1994; BESSON, 1999) e os chamados nociceptores silenciosos (*silente* ou *sleeping*) que normalmente não respondem a estímulos. No entanto, quando estimulados por mediadores inflamatórios ou após a administração de agentes flogísticos (pró-inflamatórios), estes nociceptores apresentam atividade espontânea ou tornam-se sensibilizados e, assim, passam a responder a estímulos sensoriais mecânicos e térmicos nociceptivos e não nociceptivos (este último representando a alodínia). As estimativas são de que 40% das fibras C e 30% das fibras A $\delta$  contribuem com nociceptores silenciosos (JULIUS, BASBAUM, 2001; FEIN, 2011).

### 1.5.2 Transdução sensorial

O neurônio nociceptivo possui uma região especializada, onde o receptor sensorial detecta o estímulo, o qual para os nociceptores é o estímulo nocivo (que ocasiona ou pode ocasionar uma lesão tecidual). Tal estímulo provoca uma alteração conformacional no receptor, o que dispara o processo de transdução levando a uma mudança do potencial de repouso de membrana na célula receptora.

A alteração resultante neste potencial de repouso é denominada potencial de receptor (FEIN, 2011).

Potencial de repouso de membrana é o potencial de membrana não alterado pela geração de potenciais de ação. O potencial de repouso tem um valor negativo [-70mV (miliVolts)], o que por convenção significa que há uma diferença de potencial elétrico, sendo que o interior da célula se encontra mais negativo. Por sua vez, o potencial de ação é uma onda de descarga elétrica que percorre a membrana de uma célula. São essenciais para a vida porque transportam rapidamente informações entre e dentro dos tecidos. Eles podem ser gerados por muitos tipos de células, mas são utilizados mais intensamente pelo sistema nervoso (KANDEL, SCHWARTZ, JESSELL, 2000).

No neurônio nociceptivo, a parte da célula onde a transdução sensorial ocorre, muitas vezes, é distante do terminal sináptico. Portanto, o potencial de receptor precisa ser convertido em uma série de potenciais de ação propagados, o qual por sua vez carrega a informação nociceptiva ao longo do axônio. Os nociceptores não estimulados disparam poucos potenciais de ação e a sua resposta ao estímulo nocivo é um aumento da taxa de disparo da propagação dos potenciais de ação no axônio, o que implica a necessidade de despolarização da membrana. Assim, a transdução sensorial é a conversão do estímulo nocivo em disparo padronizado de potenciais de ação (FEIN, 2011).

### 1.5.3 Canais iônicos

Os estímulos nociceptivos de origem mecânica, térmica ou química podem ativar diferentes receptores [por ex., um canal iônico, um receptor acoplado à proteína G (GPCR, sigla em inglês)] presentes nos terminais periféricos de fibras aferentes nociceptivas. A ativação destes receptores gera correntes despolarizantes que, dependendo da intensidade, iniciam os disparos dos potenciais de ação por ativação de canais iônicos específicos também presentes na membrana neuronal (Figura 2). Estes são os canais de íons controlados por voltagem (VGICs, sigla em inglês) e dentre os mais ativamente envolvidos nos eventos elétricos nos neurônios temos os canais de sódio controlados por voltagem de subunidade alfa ( $NaV\alpha$ ) e os canais de potássio controlados por voltagem (KV) (FEIN, 2011).

Em resposta ao estímulo despolarizante, parte dos canais NaV se abrem permitindo o influxo de Na<sup>+</sup>, levando a membrana a atingir o seu limiar. A entrada de Na<sup>+</sup> causa a abertura de mais canais NaV e, assim, mais despolarização. Os canais NaV rapidamente assumem um estado fechado (estado inativo) e assim permanecem por alguns milissegundos antes de retornarem ao estado de repouso, quando podem novamente ser ativados. A partir disso, os canais KV se abrem, conduzindo a célula à repolarização. A hiperpolarização ocorre pelo fechamento lento desses canais, com conseqüente retorno da membrana ao repouso. Dessa forma, os canais KV levam ao encerramento do potencial de ação (BARRET et al., 2014).

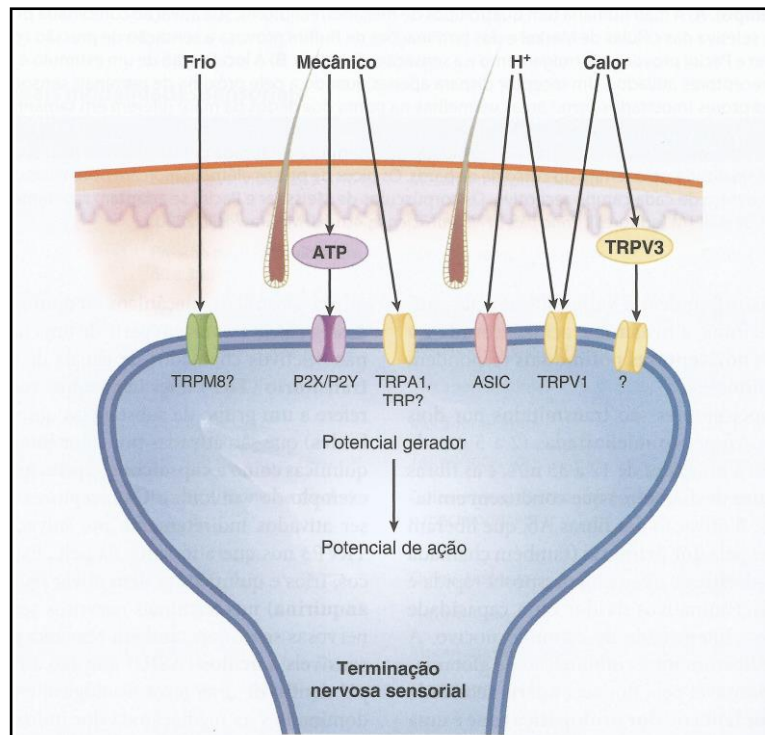


Figura 2: Alguns receptores em terminais nociceptivos e sua interação com diferentes estímulos.

Os estímulos nociceptivos (p. ex., calor) podem ativar alguns receptores diretamente (p. ex., receptores de potencial transitório membro 1 vanilóide (TRPV1) ou indiretamente (p. ex., por ativação de TRPV3 nos queratinócitos). Os mecanorreceptores podem também ser ativados pela liberação de mediadores inflamatórios (p. ex., ATP) que se liga em receptores purinérgicos. A ativação desses receptores leva a um influxo de íons (não mostrado na figura), o qual conduzem às alterações na polaridade da membrana, gerando, assim, o potencial de ação. ASIC, canal iônico sensível a ácido; P2X, receptor purinérgico ionotrópico; P2Y, receptor purinérgico acoplado à proteína G. Fonte: Adaptado de BARRET et al., 2014).

#### 1.5.4 Fibras nociceptivas

Os estímulos de natureza mecânica, térmica ou química são detectados por fibras aferentes primárias periféricas e transmitidos ao SNC através das mesmas, para o processamento da informação nociceptiva (FEIN, 2011).

As fibras sensoriais somáticas são provenientes de corpos celulares localizados no gânglio trigeminal (GT) ou no gânglio da raiz dorsal (GRD) (gânglios espinais), inervando a região da cabeça ou do corpo, respectivamente (BASBAUM et al., 2009). Já as fibras aferentes vagais, que inervam a maioria dos tecidos viscerais, possuem seus corpos celulares nos gânglios nodoso (GN) e jugular (GJ) (BLACKSHAW et al., 2010). As fibras sensoriais possuem tanto um ramo axonal periférico, inervando tecidos periféricos, quanto um ramo axonal central, fazendo a conexão com a medula espinal (BASBAUM et al., 2009), e são classificadas em grupos, com base em critérios anatômicos e funcionais.

Dessa forma, fibras A $\alpha$  e A $\beta$  representam os proprioceptores e receptores mecânicos de baixo limiar e são especializadas na condução do estímulo mecânico inócuo, apresentam velocidade de condução rápida e são particularmente abundantes na derme e epiderme. Por outro lado, algumas fibras com diâmetros menores (A $\delta$  e C) são terminações nervosas livres periféricas, mostram alto limiar de ativação e são responsáveis por detectar estímulos nocivos, ou seja, nocicepção (Figura 3). Devido à diferença na velocidade de condução entre as fibras A $\delta$  e C, o sinal das fibras A $\delta$  chega à medula espinal antes das fibras C demonstrando que o estímulo doloroso evoca duas sensações de dor sucessivas e possivelmente distintas. Assim, fibras A $\delta$  são responsáveis pela detecção da dor rápida e aguda (“primeira dor”/dor em picada), enquanto que as fibras C são condutoras da dor lenta e difusa (“segunda dor”/dor em queimação) (MILLAN, 1999; JULIS, BASBAUM, 2001; BASBAUM et al., 2009). Estudos de eletrofisiologia mostraram que as fibras A $\delta$  são subdivididas em dois grupos: Tipo I, as quais respondem tanto a estímulos químicos quanto mecânicos, com limiar de ativação térmico elevado (>50°C), e Tipo II, as quais apresentam menor limiar de ativação térmico (<43°C), porém elevado limiar de ativação mecânica (BASBAUM et al., 2009). As fibras C também apresentam heterogeneidade, podendo ser divididas em peptidérgicas (liberam glutamato, substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e expressam o receptor NK-1R) e não-peptidérgicas (expressam o receptor

purinérgico P2X<sub>3</sub>, apresentam ligação para a isolectina B4) (BASBAUM et al., 2009). Importante ressaltar que nem todas as fibras C são nociceptivas, algumas respondem à sensação de refrescância (*cooling*) e outras à inócua sensação do acariciar da pele. Estas últimas parecem mediar o toque prazeroso (OLAUSSEN et al., 2008). Além da diferenciação anatômica, as fibras nociceptivas também diferem na expressão de receptores seletivos e canais iônicos, o que confere certa especificidade dos nociceptores a determinados estímulos (JULIUS, BASBAUM, 2001).


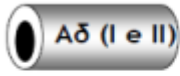

Tipo de fibra	 Aα e Aβ	 Aδ (I e II)	 C
Mielinização	Muita	Pouca	Ausente
Diâmetro	10µm	2 - 6µm	0.4 - 1.2µm
Velocidade de condução	30 - 100m/s	1.2 - 30m/s	0.5 - 2m/s
Temperatura	Não reconhece	Tipo I > 53°C Tipo II > 43°C	> 43°C
Tipo de sinal	Propriocepção Toque leve	Nocicepção (térmica, mecânica e química)	Nocicepção (térmica, mecânica e química)

Figura 3: Representação esquemática das diferenças anatômicas e funcionais das fibras sensoriais aferentes primárias.

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



### 1.5.5 Transmissão sensorial

Este processo é caracterizado pela transmissão dos potenciais de ação gerados na periferia até os centros superiores.

A organização arquitetônica da medula espinal permite distinguir anatomicamente as lâminas (lâminas de Rexed) onde cada tipo de fibra aferente primária (oriunda da periferia) termina. As lâminas de I a VI fazem parte do corno dorsal, as lâminas VII a IX constituem o corno ventral e a lâmina X representa as células organizadas ao redor do canal medular (MILLAN, 1999).

Na transmissão sensorial, as fibras aferentes primárias (ou neurônios aferentes primários) projetam-se ao corno dorsal da medula espinal (CDME) de maneira específica e organizada. O CDME possui uma organização laminar, sendo que cada lâmina é distinta anatômica e funcionalmente. As fibras A $\delta$  e C inserem-se nas camadas mais superficiais [lâminas I (marginal) e II (substância gelatinosa - SG), respectivamente] ou no caso das fibras A $\delta$ , também na lâmina V (em menor quantidade), enquanto as fibras responsáveis primariamente pelo tato e propriocepção (fibras A $\alpha$  e A $\beta$ ) inserem-se nas lâminas III – V, mais profundas (Figura 4) (BASBAUM et al., 2009). A parte mais interna da lâmina II, onde se inserem as fibras C não-peptidérgicas, é caracterizada pela presença de interneurônios excitatórios que expressam a isoforma *gamma* da proteína cinase C (PKC), envolvida na dor persistente induzida por lesões (MALMBERG et al., 1997). Neurônios que fazem sinapses na lâmina V são excitados por estímulos de intensidade variável e por isso, são denominados de neurônios de amplo espectro dinâmico (MILLAN, 1999).

O CDME funciona como uma estação de controle da transmissão nociceptiva. Nesta região, os neurônios sensoriais primários liberam mediadores como glutamato, substância P e CGRP transmitindo o sinal nociceptivo a neurônios de segunda ordem (neurônios sensoriais secundários), que por sua vez formam vias ascendentes que transmitem a informação a centros supraespinais, como o tálamo e córtex, ocorrendo, assim, a interpretação e localização da dor (MILLAN, 2002). É interessante destacar que os neurônios de segunda e terceira ordem passam a ser do tipo unipolar (com seus corpos celulares no corno dorsal da medula e tálamo, respectivamente) e que a diferenciação em mielinizado/não mielinizado e fibras C/A $\delta$  é somente na periferia. A partir dos neurônios de segunda ordem, todas as fibras

são mielinizadas (chamadas agora de tratos), e se projetam contíguas às fibras periféricas com que fizeram sinapse (BASBAUM et al., 2009).

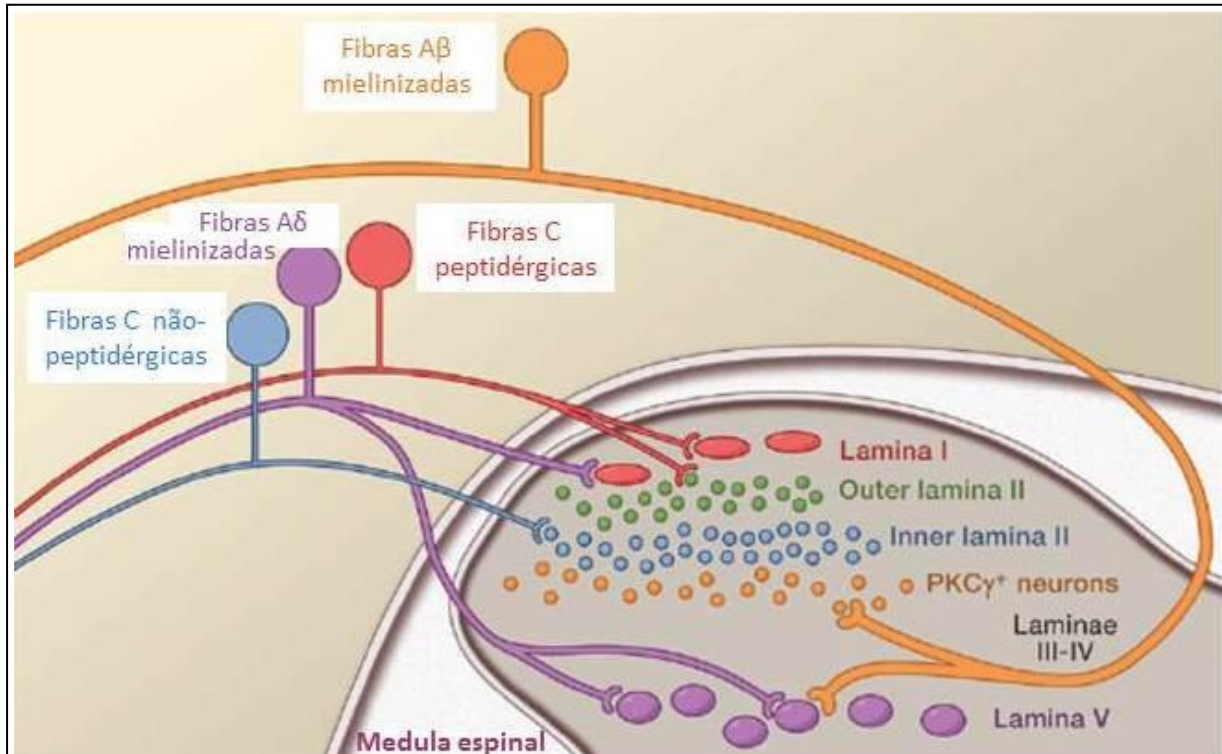


Figura 4: Representação esquemática da inserção das fibras sensoriais aferentes primárias no corno dorsal da medula espinal.

Organização laminar do corno dorsal da medula espinal. Fibras nociceptivas A $\delta$  e C terminam mais superficialmente (lâminas I e II), onde fazem sinapses com neurônios de segunda ordem, sendo que as fibras A $\delta$  também se projetam para a lâmina V. As fibras não-nociceptivas (fibras A $\beta$ ) projetam-se para as camadas intermediárias, representadas pelas lâminas III – V. Fonte: Adaptado de BASBAUM et al., 2009.

#### 1.5.5.1 Vias da transmissão nociceptiva

A partir da transmissão da informação nociceptiva ao neurônio de segunda ordem, esta acenderá para múltiplas áreas supraespinais através de tratos neuronais específicos (vias de projeção da dor ou trato anterolateral da medula espinal). As principais vias de condução da dor no SNC são o *trato espinotalâmico*, *trato espinoreticular* e o *trato espinomesencefálico (espinoparabraquial)* (Figura 5).

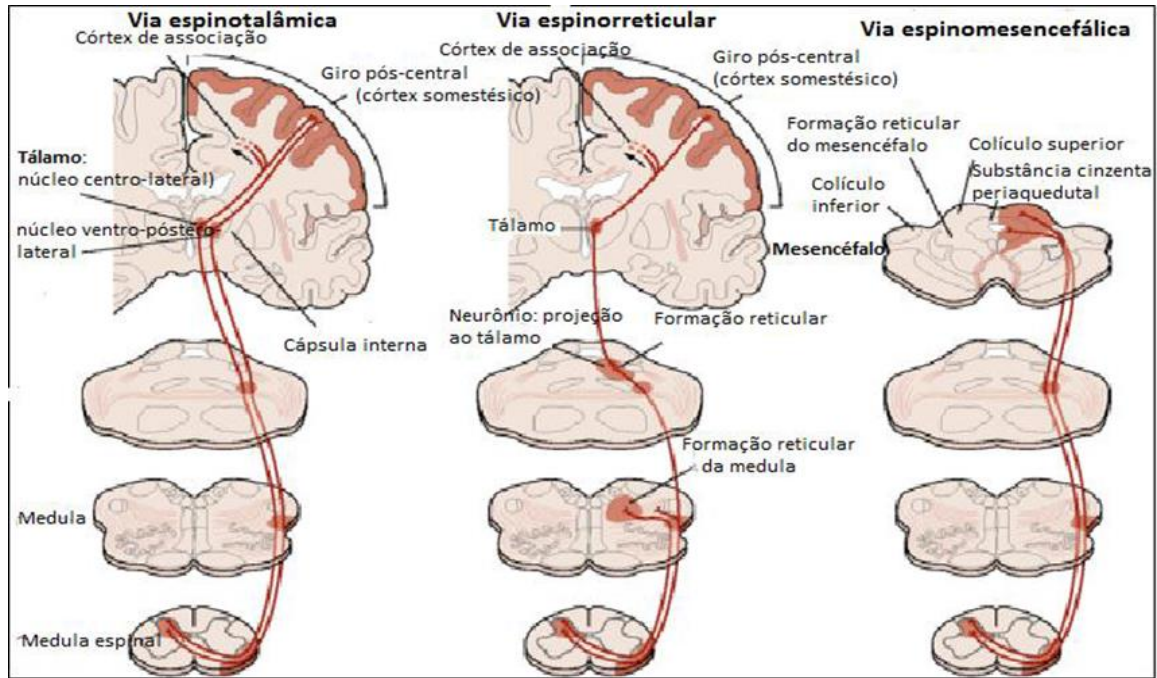


Figura 5: Três das principais vias ascendentes que transmitem a informação nociceptiva a partir da medula espinal aos centros superiores.

O trato espinotalâmico é a mais proeminente via nociceptiva ascendente na medula espinal. A informação nociceptiva ascende por um ou por uma combinação desses tratos. Fonte: Adaptado de KANDEL, SCHWARTZ, JESSELL, 2000.

O trato espinotalâmico transmite informações da medula espinal para o tálamo sobre dor, temperatura, pressão e tato. Cursa lateralmente no tronco encefálico, envia projeções ao núcleo ventrobasal do tálamo projetando-se para o córtex somatosensorial. É dividido em neoespinotalâmico e paleoespinotalâmico (LOESER et al., 1999; BASBAUM, JESSEL, 2000).

A via neoespinotalâmica é a via clássica da dor. Transmite a dor rápida, formada por fibras contíguas às fibras A $\delta$ , chega a pontos específicos do tálamo e filogeneticamente é a via mais evoluída. O glutamato é o principal neurotransmissor. A sensação dolorosa percebida por esta via é epicrítica, ou seja, é precisa, bem definida, bem localizada, intensificada e discriminada. Possui poucas estações sinápticas e se projeta no núcleo ventral póstero-lateral do tálamo, cujos neurônios recebem o nome de terciários (neurônios de terceira ordem), os quais projetam-se para o córtex somatosensorial, onde ocorre o processamento da informação nociceptiva (BEAR, CONNORS, PARADISO, 1996; BASBAUM et al., 2009).

A via paleoespinotalâmica é a via que transmite a dor lenta, formada por fibras contíguas às fibras C e possui várias estações sinápticas. Nesta via há

envolvimento de glutamato, SP e CGRP. A informação é gradativa, prolongada e muito difusa. Uma parte das fibras vai ao tálamo e deste ao córtex somestésico, mas a maioria se dirige à formação reticular mesencefálica e, a partir destas áreas, a informação é enviada para o córtex límbico e frontal, hipotálamo e núcleos motores. O sistema límbico é responsável pela resposta de alerta e fuga e respostas emocionais desagradáveis ao estímulo doloroso (BEAR, CONNORS, PARADISO, 1996; LOESER, MELZACK, 1999; BASBAUM, JESSEL, 2000). Esse tipo de dor não consegue ser analisada com precisão, nem sua localização, intensidade e características, uma vez que a sensação dolorosa percebida por esta via é protopática (primitiva, sem refinamento) (LOESER et al., 1999; BASBAUM, JESSEL, 2000).

O trato espinoreticular é anatomicamente menos individualizado. Os neurônios deste trato se originam da lâmina V e sobem no quadrante contralateral conjuntamente com fibras do trato paleoespinalâmico. Este trato representa um papel importante na sensação da dor, especialmente na dor crônica intensa. Cursa medialmente no tronco encefálico e está ligado ao Sistema Reticular Ativador Ascendente (SARA) e a Substância Cinzenta Periaquedutal (PAG, sigla em inglês). Envia projeções difusas para o tálamo, córtex somestésico e estruturas do sistema límbico (RUSSO, BROSE, 1998).

O trato espinomesencefálico (espinoparabraquial) é também uma via cruzada que ascende em associação com o trato espinotalâmico, conduzindo informação nociceptiva. A informação é transmitida ao córtex insular e cingulado, através da amígdala, contribuindo para o componente emocional da percepção da dor (BASBAUM et al., 2009).

#### 1.5.6 Percepção e processamento da dor

O tálamo desempenha um papel fundamental na integração do impulso doloroso. É nele que ocorre a percepção da informação dolorosa, porém não há processamento para indicar as características desse estímulo nociceptivo, ou seja, é uma percepção vaga. A partir do tálamo, neurônios de terceira ordem transmitem impulsos para o córtex somatossensorial e cingular. No córtex somatossensorial ocorre o processamento que resulta em consciência da dor (FÜRST, 1999) e no

córtex cingular é processada a qualidade emocional ou afetiva da dor, enviando impulsos de volta para o córtex somatossensorial. Neste processo originam-se qualidades mais precisas, como tipo de dor, localização e ansiedade emocional. Dessa maneira, a informação nociceptiva alcança as áreas sensoriais do córtex somestésico, onde aspectos como qualidade, intensidade, localização e duração do estímulo nociceptivo serão integrados e componentes afetivos e emocionais serão interpretados e contextualizados, levando à percepção consciente e discriminada do estímulo nociceptivo (RUSSO, BROSE, 1998; MILLAN, 1999, BASBAUM et al., 2009).

### **1.6 Mediadores inflamatórios e nocicepção: sensibilização periférica e central**

Como vimos, o primeiro passo na sequência dos eventos que originam o fenômeno doloroso é a transformação dos estímulos nocivos (mecânico, térmico ou químico) em estímulos elétricos (potenciais de ação) que, das fibras nervosas periféricas, são transferidos para o SNC (BESSION, PERL, 1969; BASBAUM et al., 2009). Contudo, muitas vezes tal estímulo provoca uma lesão tecidual seguida de um processo inflamatório com conseqüente hipersensibilidade, a qual normalmente desaparece quando há o controle ou a resolução da inflamação. No entanto, certas situações clínicas como, por exemplo, doenças neurodegenerativas e reumáticas, câncer, diabetes e neuropatias e até mesmo processos dolorosos agudos, acabam por instalar um processo inflamatório, onde a estimulação constante dos nociceptores leva a alterações neuroplásticas no SNC e periférico (SNP) conduzindo à manutenção do estado álgico (WOOLF, SALTER, 2000; McMAHON et al., 2005). Isso ocorre, uma vez que os mediadores gerados nesta atividade inflamatória ativam diretamente ou indiretamente os nociceptores (sensibilizando-os - diminuindo seu limiar de ativação e/ou aumentando a responsividade a eles). Dessa forma, quando há a sensibilização dos nociceptores instala-se o processo conhecido por sensibilização periférica e quando ocorre, além da sensibilização periférica, um aumento na transmissão sináptica na medula espinal, verifica-se a sensibilização central, fenômenos estes que são os principais mecanismos que contribuem para a gênese e manutenção da dor inflamatória, muitas vezes acompanhada de

hipersensibilidade térmica e mecânica (WANG, WOOLF, 2005; BASBAUM et al., 2009).

Dessa forma, uma das metas na investigação da dor é identificar os mediadores químicos que são liberados nos tecidos lesionados e responsáveis pela ativação direta ou sensibilização dos nociceptores favorecendo o aparecimento da hipersensibilidade, assim como novas substâncias/moléculas que sejam capazes em inibir sua síntese, liberação ou ligação em seus receptores.

### 1.6.1 Sensibilização periférica

Após a lesão tecidual, o processo inflamatório se inicia com alterações no fluxo sanguíneo e na permeabilidade vascular, ativação e migração de células do sistema imune e alterações na liberação de fatores tróficos e fatores de crescimento (DRAY, 1995). Além disso, há uma acumulação de fatores endógenos liberados a partir de nociceptores ativados ou de células não neuronais que residem ou se infiltram na área lesionada (como mastócitos, basófilos, plaquetas, macrófagos, neutrófilos, células endoteliais, queratinócitos e fibroblastos). Coletivamente, estes fatores endógenos são chamados de “sopa inflamatória” e representam uma ampla ordem de moléculas sinalizadoras, que incluem neurotransmissores excitatórios (glutamato), neuropeptídeos (SP, CGRP e galanina), eicosanoides [prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>), prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), tromboxanos e leucotrienos], aminas (serotonina, histamina), cininas (bradicinina), purinas (ATP), adenosina (a partir da degradação do ATP), proteases (serina-triptase, tripsina, trombina), neurotrofinas [fator de crescimento neuronal (NGF)], óxido nítrico (NO), citocinas [interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )], quimocinas (fractalquina), bem como prótons extracelulares (MILLAN, 1999; JULIUS, BASBAUM, 2001; GRIFFIS, COMPTON, DOERING, 2006; BASBAUM et al., 2009).

Os nociceptores, por sua vez, expressam receptores para cada uma dessas substâncias pró-inflamatórias/pró-álgicas, sendo que essas interações aumentam a excitabilidade das fibras nervosas, levando ao aumento da sensibilidade mecânica e térmica, caracterizada pelos quadros de hiperalgesia e alodínia, coletivamente referidos como hipersensibilidade (DRAY, 1995; McMAHON et al., 2008; BASBAUM et al., 2009). Alguns exemplos de receptores presentes nas fibras sensoriais



primárias capazes de interagir com os mediadores inflamatórios incluem canais iônicos de potencial transitório (TRPs) e canais iônicos sensíveis a ácido (ASICs) [ambos ionotrópicos (controlados por ligantes)], receptores acoplados a proteína G (GPCRs) e receptores de tirosina cinase (TrK), ambos metrabotrópicos (JULIUS, BASBAUM, 2001; BASBAUM et al., 2009) (Figura 6).

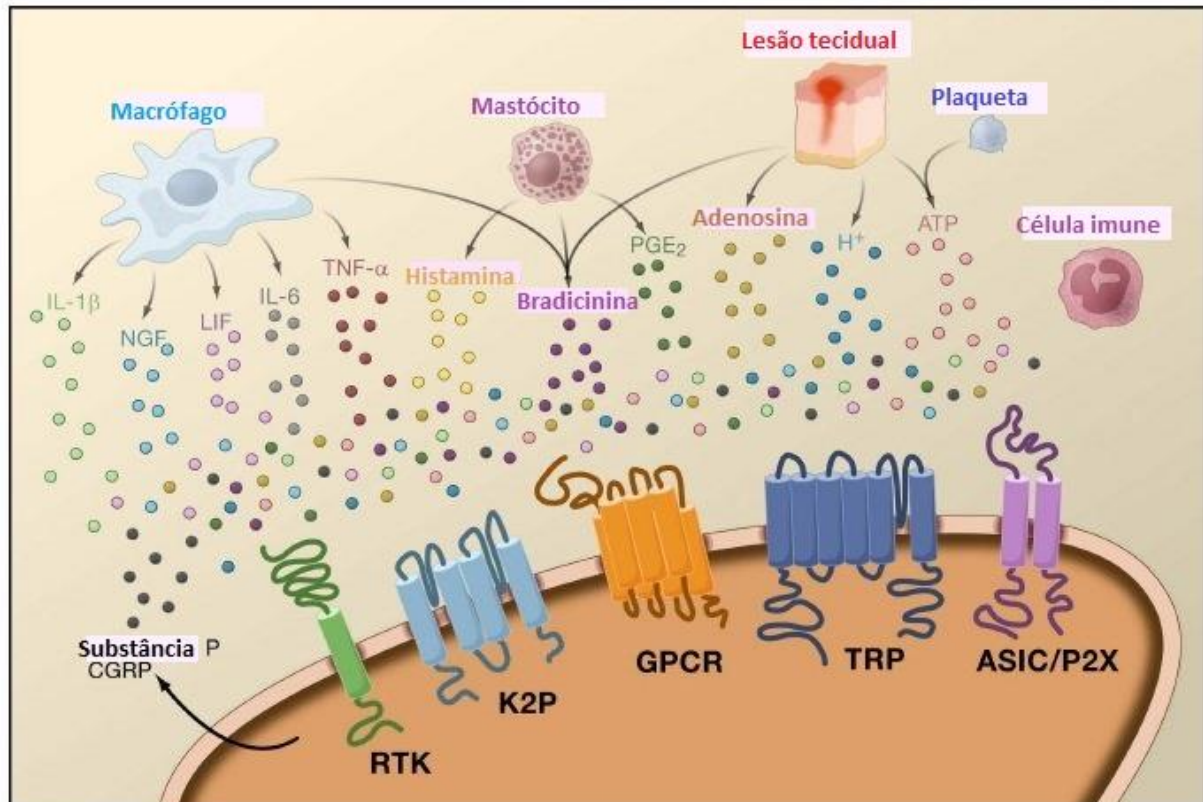


Figura 6: Principais mediadores periféricos da inflamação.

Lesão tecidual promove a liberação de mediadores inflamatórios através da ativação de nociceptores e células não neuronais. Esta “sopa inflamatória” inclui diversas moléculas sinalizadoras que atuam diretamente no nociceptor (ou sensibilizando-o) através da ligação em um ou mais receptores celulares, incluindo GPCRs, TRPs, ASICs, TrKs e canais de potássio de dois poros (K2P). Fonte: Adaptado de BASBAUM et al., 2009.

Alguns mediadores inflamatórios são capazes de modular diretamente canais iônicos (por exemplo, prótons extracelulares ativando ASICs e TRPV1), enquanto outros se ligam a seus receptores específicos em aferentes primários, ativando cascatas de sinalização intracelular que culminam com a ativação e modulação de canais iônicos. Um exemplo clássico deste tipo de modulação é a bradicinina, cuja ligação ao receptor B<sub>2</sub> induz a ativação da via da fosfolipase C (PLC), que por sua vez pode induzir a ativação da via adenilato ciclase/AMPc, levando à ativação de

proteínas cinases como a PKC. Esta, por sua vez, pode levar à ativação de canais TRPV1 (pela sua ligação em sítios de fosforilação), envolvidos na hipersensibilidade térmica que acompanha os estados inflamatórios (LIEBMANN, BOHMER, 2000; WANG et al., 2008; BASBAUM et al., 2009). A sensibilização dos nociceptores é um dos principais fatores para o desenvolvimento da hipersensibilidade, tanto mecânica quanto térmica, decorrente da inflamação crônica. Embora os mecanismos não sejam ainda totalmente compreendidos, há evidências de que eventos como fosforilação de proteínas cinases, mobilização de cálcio e ativação de canais de sódio, aliado à diminuição das correntes de potássio, contribuem para a sensibilização dos nociceptores e consequente diminuição do seu limiar de ativação (CUNHA et al., 1999; VILLARREAL et al., 2009). Desta forma, algumas das principais vias de sinalização que parecem estar envolvidas nesta sensibilização são as vias da PKA e PKC e também das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK), em especial as cinases reguladas por sinal extracelular 1 e 2 (ERK 1/2) (ALEY et al., 2001; LEVY, STRASSMAN, 2002; VILLARREAL et al., 2009). Alguns estudos comportamentais demonstram que mediadores como a PGE<sub>2</sub> e histamina produzem hiperalgesia mecânica por meio de ativação da cascata AMPc/PKA, enquanto outros mediadores, como por exemplo a adrenalina, endotelinas e a bradicinina, parecem envolver a ativação da PKC para o desenvolvimento da hiperalgesia (KHASAR et al., 1999; ALEY et al., 2001; LEVY, STRASSMAN, 2002; SACHS et al., 2009).

Uma vez ativadas, as proteínas cinases fosforilam sítios específicos em proteínas-alvo, levando a mudanças transcricionais ou pós-translacionais, que por sua vez produzem várias respostas fisiológicas, incluindo a percepção da dor (YAJIMA et al., 2003). Estudos demonstram que a ativação da via AMPc/PKA está relacionada a pelo menos três eventos modulatórios de canais iônicos voltagem-dependentes, que culminam com o aumento da excitabilidade dos nociceptores: 1) aumento das correntes de Na<sup>+</sup> em canais resistentes à tetrodotoxina, expressos em uma subpopulação de fibras sensoriais de pequeno diâmetro; 2) supressão das correntes retificadoras sustentadas de K<sup>+</sup>, que acredita-se serem responsáveis pela modulação do limiar de disparo; e 3) aumento das correntes de cátion ativadas por hiperpolarização, que acredita-se serem responsáveis pela facilitação do disparo repetitivo (LEVY, STRASSMAN, 2002). Desta forma, a sensibilização de nociceptores mediada por PKA, bem como o recrutamento de aferentes inicialmente



insensíveis a estímulos mecânicos (*silente*) contribuiriam para a diminuição do limiar de ativação dessas fibras, levando à hiperalgesia e à alodínia (CUNHA et al., 1999; LEVY, STRASSMAN, 2002). Há que se considerar, no entanto, que os mecanismos envolvidos na sensibilização dos nociceptores são complexos e muitas vezes inter-relacionados, de modo que a ativação de PKA pode aparecer como um fenômeno prévio à ativação de PKC, ou vice-versa, ou ainda ambas as vias podem culminar na ativação da cascata das MAPKs. Outros estudos sugerem ainda, que a ativação de ERK 1/2 participa do desenvolvimento da hipersensibilidade por meios independentes da ativação de PKA ou PKC. Desta forma, sabe-se que essas vias de sinalização estão envolvidas no aumento da excitabilidade dos nociceptores, embora os mecanismos exatos desta ação não sejam totalmente esclarecidos (ALEY et al., 2001; JI, WOOLF, 2001; WANG et al., 2008; SACHS et al., 2009; VILLARREAL et al., 2009).

A abordagem mais comum para reduzir a dor inflamatória envolve a inibição da síntese ou acumulação de componentes da “sopa inflamatória”. Esta ação é bem exemplificada pelo uso de drogas anti-inflamatórias não-esteroidais, tais como aspirina e ibuprofeno, os quais reduzem a dor inflamatória e a hiperalgesia através da inibição das enzimas cicloxigenases (Cox-1 e Cox-2) envolvidas na síntese de PGE<sub>2</sub>; uma segunda abordagem constitui o bloqueio dos mediadores diretamente no nociceptor (BASBAUM et al., 2009).

Importante lembrar que a inflamação neurogênica (resultado da ativação periférica dos neurônios aferentes sensoriais liberando mediadores inflamatórios) resulta da estimulação antidrômica. Esta se caracteriza pela condução dos potenciais de ação em sentido oposto ao normal (ortodrômica), o qual é conduzido através das ramificações terminais do nociceptor (arborização) (Figura 7). A inflamação neurogênica, como vimos, amplifica e sustenta a reação inflamatória e a ativação de fibras aferentes nociceptivas que a acompanha. A despolarização do terminal periférico do neurônio aferente primário leva a liberação dos neuropeptídeos – SP e CGRP – que, por sua vez, atuam em células alvo na periferia, como os mastócitos e o músculo liso vascular, produzindo a inflamação caracterizada pelo eritema, rubor e edema (SCHMELZ, PETERSEN, 2001; RICHARDSON, VASKO, 2002; RANG et al., 2011).

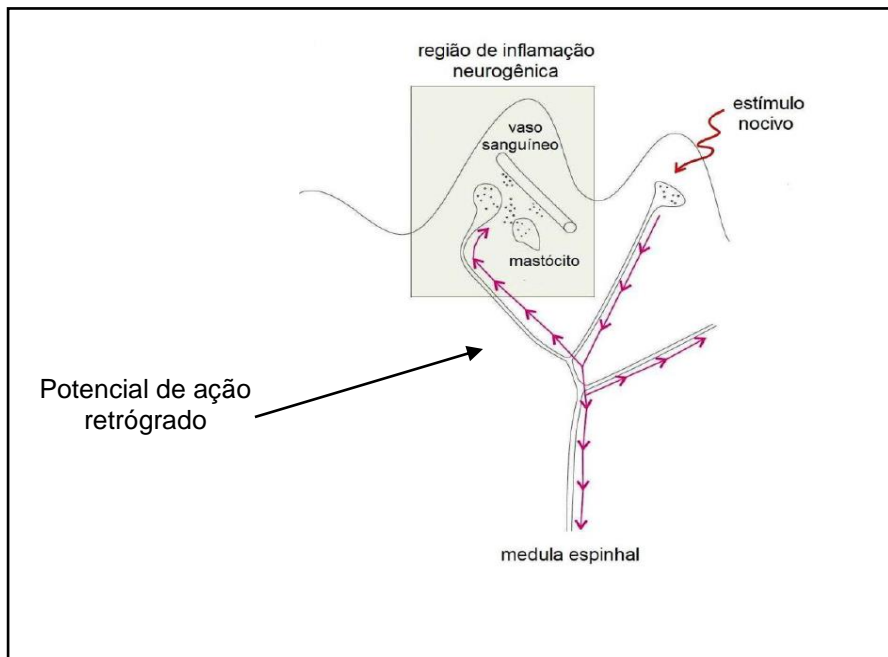


Figura 7: Esquema do processo de inflamação neurogênica

A inflamação neurogênica consiste na geração de potenciais de ação retrógrados com liberação de neuropeptídeos (SP, CGRP) contribuindo para a manutenção do processo inflamatório. Fonte: FEIN, 2011.

### 1.6.2 Sensibilização Central

Diversos neurotransmissores, aminoácidos e neuropeptídeos são liberados pelos terminais dos neurônios aferentes primários no corno dorsal da medula espinhal, onde exercem importante papel na transmissão nociceptiva. Entre tais substâncias destacam-se os aminoácidos excitatórios glutamato e aspartato e diversos outros neurotransmissores e neuropeptídeos, incluindo: SP, CGRP, neurocinina A (NKA) e neurocinina B (NKB), colecistocinina (CCK), somatostatina, óxido nítrico (NO), prostaglandinas e galanina (HILL, 2011).

A sensibilização central refere-se ao processo através do qual um estado de hiperexcitabilidade é estabelecido no SNC, conduzindo a um aumento no processamento dos sinais nociceptivos (WOOLF, 1983). Diversos são os mecanismos implicados na sensibilização central, sendo os principais: alteração na neurotransmissão glutamatérgica, perda do controle inibitório e interações glial-neuronais (Figura 8).

- *Sensibilização mediada por receptores glutamatérgicos/NMDA*: A liberação de glutamato pelos terminais centrais é uma das formas de sinalizar a informação nociceptiva, gerando correntes pós-sinápticas excitatórias nos neurônios de segunda ordem. Isto ocorre primariamente através da ativação de receptores pós-sinápticos AMPA e cainato (receptores glutamatérgicos ionotrópicos). Todavia, perante uma estimulação intensa ou lesão persistente, receptores NMDA *silente*, localizados também na membrana pós-sináptica, são ativados aumentando os níveis de cálcio intracelular e gerando uma ampla cascata de sinalização dependente de cálcio e segundos mensageiros, incluindo MAPK, PKA, PKC e Src. Esta cascata de eventos aumenta a excitabilidade neuronal facilitando a transmissão de mensagens nociceptivas ao cérebro (BASBAUM et al., 2009).

Em adição à aumentada excitabilidade neuronal (hipersensibilidade), a sensibilização central contribui para que estímulos outrora inócuos passem a ser percebidos como dolorosos através da participação de fibras A $\beta$ , as quais passam a fazer parte do circuito de transmissão nociceptiva resultando em profunda alodínia (BASBAUM et al., 2009).

- *Perda do controle GABAérgico e glicinérgico*: Interneurônios inibitórios GABAérgicos e glicinérgicos são densamente distribuídos no corno dorsal da medula e são a base para a teoria do portão de controle da dor, a qual postula que a perda de função desses interneurônios resultaria em aumentada nocicepção. A desinibição de interneurônios excitatórios conduz a um aumento na despolarização e excitação dos neurônios de projeção. Assim como na sensibilização central mediada por neurônios NMDA, a desinibição promove aumentada transmissão nociceptiva de estímulos nociceptivos e não nociceptivos, contribuindo para o desenvolvimento de alodínia mecânica (TORSNEY, MACDERMOTT, 2006; KELLER et al., 2007). Em parte, isso ocorre porque na desinibição fibras A $\beta$  fazem parte da circuitaria nociceptiva através da desinibição de interneurônios excitatórios que expressam a isoforma de PKC $\gamma$ , as quais são essenciais para o desenvolvimento da dor persistente (MIRAUCOURT et al., 2007).

A desinibição ainda pode ocorrer através da modulação glicinérgica em um mecanismo que envolve a ação de prostaglandinas na medula espinal (HARVEY et al., 2004). A lesão tecidual promove a liberação de PGE<sub>2</sub>, que atua em receptores EP<sub>2</sub> expressos em interneurônios excitatórios e neurônios de projeção. A resultante estimulação da via AMPc/PKA fosforila a subunidade do receptor de glicina (GlyRa3)

impedindo que os neurônios respondam aos efeitos inibitórios da glicina (BASBAUM et al., 2009).

- *Ativação microglial*: Em condições normais, a micróglia funciona como macrófagos residentes do SNC, os quais são homoganeamente distribuídos na medula espinal. Após algumas horas da lesão nervosa periférica há um acúmulo de micróglia na região medular em que terminam as projeções das fibras nervosas lesionadas. Esta ativação microglial libera várias moléculas sinalizadoras, incluindo citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6), as quais aumentam a sensibilização neuronal central, conduzindo a um estado de dor persistente (DeLEO et al., 2007), demonstrando que a ativação microglial é suficiente para ativar condições de dor sustentada (TSUDA et al., 2003). Um dos principais mediadores inflamatórios responsáveis pela ativação microglial é o ATP, o qual ativa receptores purinérgicos, especialmente P2X<sub>4</sub> (TSUDA et al., 2003), P2X<sub>7</sub> (CHESSELL et al., 2005) e P2Y<sub>12</sub> (HAYNES et al., 2006; KOBAYASHI et al., 2008). Além disso, foi demonstrado que a ativação de receptores P2X<sub>4</sub> pelo ATP induz à liberação do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) pela micróglia. O BDNF, por sua vez, atua em receptores TrkB presentes nos neurônios de projeção, gerando mudanças no gradiente de íons cloreto, o que induz uma mudança na ação de neurônios GABAérgicos, que em vez de hiperpolarizar a membrana, a despolariza, permitindo que haja a transmissão no sinal nociceptivo (BASBAUM et al., 2009).

Outro mediador inflamatório importante na ativação microglial é a quimocina fractalquina, que em situações normais liga-se ao receptor CXCL1 expresso em neurônios aferentes primários e secundários. Todavia, após uma lesão nervosa periférica a fractalquina liga-se em receptores CX3CR1 expressos na superfície da micróglia, consistindo em mais uma via pela qual a micróglia está envolvida na sensibilização central (LINDIA et al., 2005; ZHUANG et al., 2007).

Recentemente, muitos membros da família dos receptores “tipo Toll” (TLRs) são implicados na ativação microglial após uma lesão nervosa. Os TLRs são proteínas transmembrana expressos em células do sistema imune periférico e da glia. Estudos mostraram que a inibição genética ou farmacológica dos TLRs resulta na diminuição da ativação microglial e na hipersensibilidade gerada pela lesão nervosa periférica (KIM et al., 2007; OBATA et al., 2008).

A contribuição dos astrócitos no processo de sensibilização central é menos clara. Estas células são induzidas na medula espinal após lesão nervosa, porém, em

contraste com a micróglia, a ativação astrocitária é geralmente tardia e persistente. Dessa forma, acredita-se que os astrócitos apresentam um papel mais crítico na manutenção da sensibilização central, com consequente persistência da dor, em vez de sua indução (REN, DABNER, 2008).

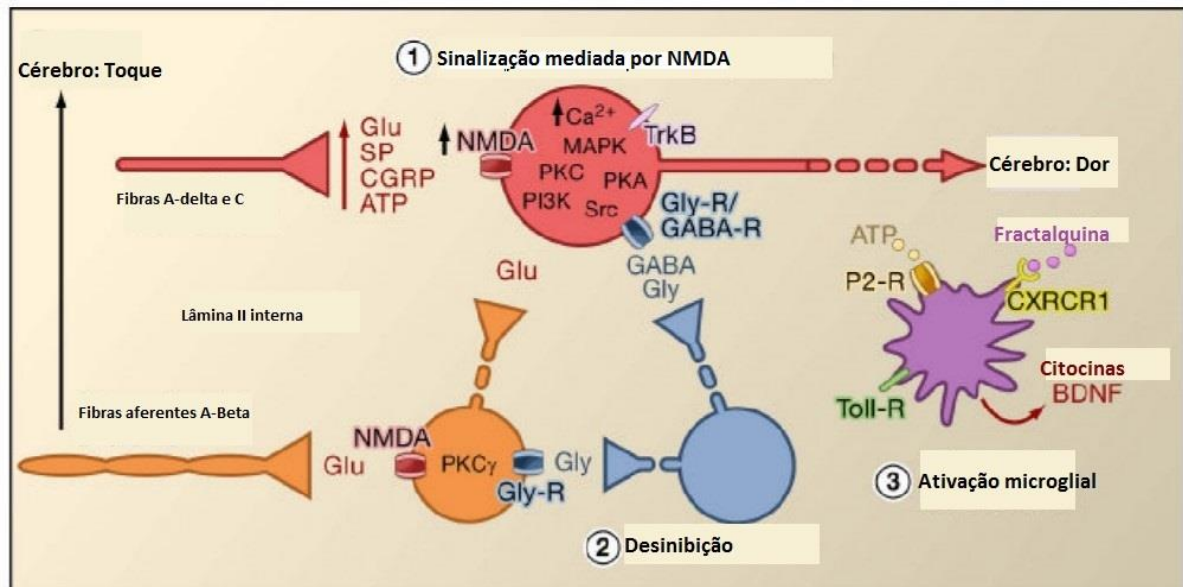


Figura 8: Sensibilização central: Medula espinal.

1- Sensibilização mediada por receptores glutamatérgicos/NMDA: Após intensa estimulação ou lesão persistente, fibras A $\delta$  e C liberam uma variedade de neurotransmissores (glutamato, SP, CGRP, ATP) na medula espinal. Como consequência, receptores NMDA *silente* são ativados, conduzindo a um aumento de cálcio intracelular e ativando diversas vias de sinalização dependente de cálcio e segundos mensageiros (MAPK, PKC, PKA e Src). Esta ativação aumenta a excitabilidade neuronal com consequente facilitação da transmissão do sinal nociceptivo. 2- Desinibição: Em condições normais, interneurônios inibitórios (azul) liberam GABA e glicina para diminuir a excitabilidade neuronal e modular a transmissão nociceptiva. Todavia, perante uma lesão esta inibição pode ser perdida e resultar em hiperalgesia. Adicionalmente, a desinibição pode permitir que fibras A $\beta$  participem da circuitaria nociceptiva, onde estímulos inócuos passam a ser percebidos como dolorosos. Isso ocorre, em parte, através da desinibição de interneurônios excitatórios que expressam a isoforma  $\gamma$  da PKC. 3- Ativação microglial: A lesão nervosa periférica promove a liberação de ATP e da quimocina fractalquina que estimulam células microgliais. A ativação do receptor purinérgico (CX3CR1) e de TLRs na micróglia (em roxo) resulta na liberação de BDNF, o qual promove aumento na excitabilidade neuronal e aumento nas respostas aos estímulos nocivos (hiperalgesia) e inócuos (alodínia). A micróglia ativada também libera citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) e outros fatores que contribuem para a sensibilização central. Fonte: Adaptado de BASBAUM et al., 2009).

## 1.7 Receptores de Potencial Transitório (TRP)

Conforme descrito anteriormente sobre a transmissão nociceptiva, as fibras aferentes primárias detectam os estímulos nociceptivos, sejam eles mecânicos, térmicos ou químicos, e os transmitem ao sistema nervoso na forma de corrente

elétrica. Para tanto, os terminais nociceptivos expressam uma variedade de receptores e canais iônicos, que uma vez ativados iniciam a transmissão do impulso nervoso. Dessa forma, danos teciduais, inflamação ou lesão nervosa são situações que, direta ou indiretamente (via liberação de mediadores) levam à ativação dos nociceptores (AKOPIAN, 2011). Dentre os diversos tipos de transdutores da informação nociceptiva, os membros da família de receptores de potencial transitório (TRPs) tem sido descritos como importantes moduladores na transdução de sinal no nociceptor (BASBAUM et al., 2009).

Os TRPs diferenciam-se de outros grupos de canais iônicos pela seletividade de íons, modos de ativação e função fisiológica. Baseado na sequência de aminoácidos, os membros da família TRP são classificadas em seis distintas subfamílias: TRPC (Canônico), TRPV (Vanilóide), TRPM (Melastatina), TRPP (Policistina), TRPML (Mucolipina) e TRPA (Anquirina). Em sua estrutura geral, os canais TRP possuem seis domínios transmembranares e pequenas variações nas sequências de aminoácidos. Além disso, as regiões N- e C-terminais são voltadas para o meio intracelular e os domínios transmembranares em conjunto formam um poro entre o domínio 5 e 6, por onde ocorre o influxo intracelular de íons (LEVINE, ALESSANDRI-HABER, 2007; MORAN et al., 2011).

Vários canais TRPs são ativados diretamente por substâncias naturais, e os canais das subfamílias vanilóide (em especial TRPV1, TRPV2, TRPV3 e TRPV4), melastatina (em especial TRPM8) e anquirina (TRPA1) são também referidos como *termorreceptores* ou *termo-TRPs*, uma vez que são capazes de responder a estímulos térmicos. Os canais TRPV estão associados à percepção do calor, sendo TRPV1 e TRPV2 ativados por calor nocivo (na faixa de 42°C e 52°C, respectivamente), enquanto TRPV3 e TRPV4 são ativados por calor não nocivo (de 34 a 38°C e de 27°C a 34°C, respectivamente). Já os canais TRPA1 e TRPM8 estão associados à percepção do frio, sendo TRPA1 ativado por frio nocivo (abaixo de 17°C) enquanto TRPM8 está associado com a sensação “refrescante” ocasionada por temperaturas ao redor de 23 a 26°C (CALIXTO et al., 2005; MONTELL, 2005; CORTRIGHT et al., 2007). Além disso, podem ser ativados por compostos químicos, osmolaridade, estimulação mecânica, luminosidade, estresse oxidativo, ácidos e feromônios. Os canais TRPs também estão envolvidos em uma diversidade de funções fisiológicas sensoriais, incluindo a visão, olfato e audição, além da

percepção mecânica e térmica (LEVINE, ALESSANDRI-HABER, 2007; WATANABE et al., 2008).

No campo da nocicepção, os canais TRPV1 e TRPA1 têm sido descritos como moduladores importantes na transdução e na sensibilização em neurônios somatossensoriais aferentes primários. A expressão desses canais nos neurônios sensoriais que se projetam ao CDME sugere seu potencial envolvimento na modulação da liberação sináptica de neurotransmissores (CORTRIGHT et al., 2007) e os tornam capazes de iniciar o impulso nervoso sensorial após a detecção de estímulos químicos, mecânicos e térmicos (MONTELL, 2005; STUCKY et al., 2009; MORAN et al., 2011). A Figura 9 ilustra os principais *thermo*-TRPs envolvidos na nocicepção, bem como seus potenciais ativadores.

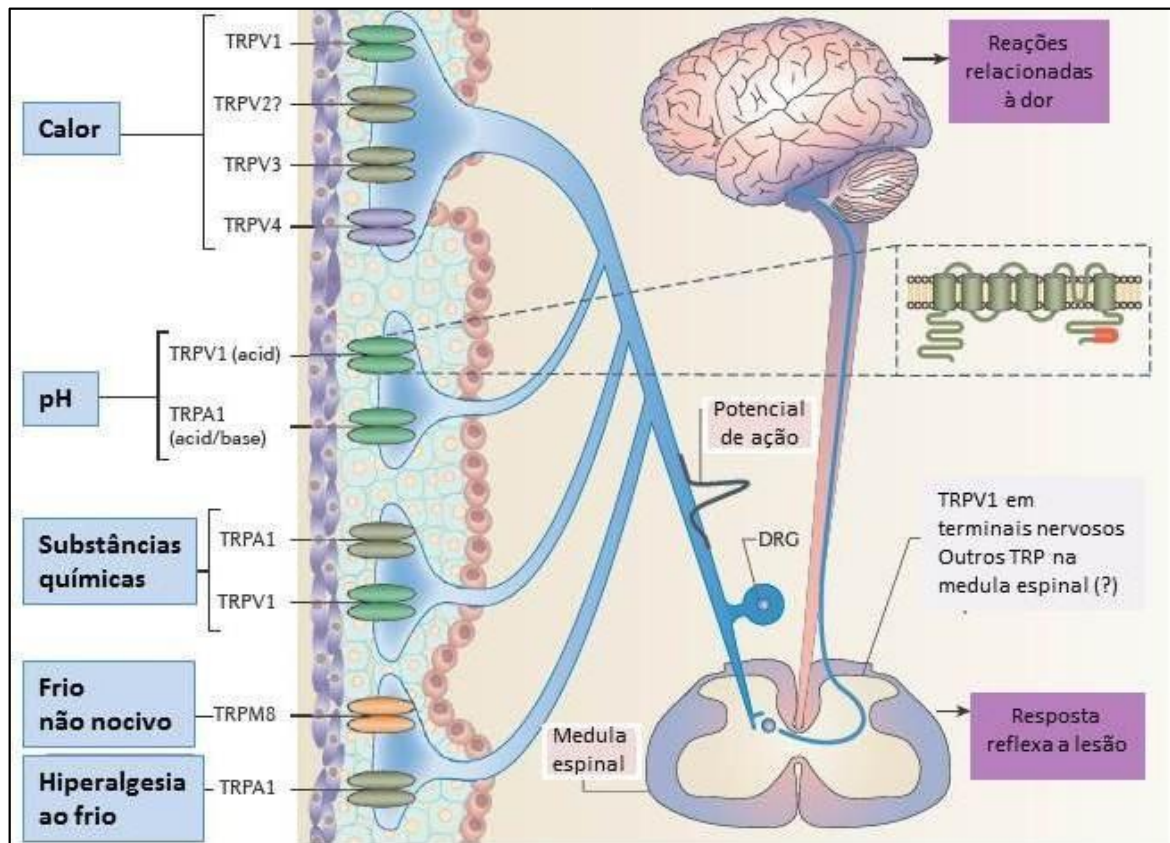


Figura 9: Principais *thermo*-TRPs envolvidos na transmissão nociceptiva e seus principais ativadores.

Múltipla expressão de TRPs nos neurônios sensoriais e seus principais ativadores. Membros da subfamília TRPV respondem a estímulos térmicos, sendo TRPV1 e TRPV2 responsivos ao calor nocivo, enquanto TRPA1 e TRPM8 respondem a estímulos frios. TRPV1 e TRPA1 são também ativados por substâncias químicas (por exemplo, capsaicina e cinamaldeído, respectivamente) e por alterações no pH. Fonte: Adaptado de MORAN et al., 2011.

### 1.7.1 TRPV1

É o canal de cátion do receptor de potencial transitório, da subfamília vanilóide, membro um. Os canais TRPV1 são canais de cátions não seletivos, com alta permeabilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$ , expressos nos terminais centrais e periféricos de neurônios sensoriais de pequeno diâmetro, principalmente fibras C (CATERINA et al., 1997; TOMINAGA et al., 1998; PREMKUMAR, ABOOJ, 2012). Estes canais funcionam como um receptor polimodal nos terminais nervosos periféricos, modulando a transmissão sináptica entre os neurônios do GRD, GT ou GN com os neurônios do corno dorsal, do núcleo trigeminal espinal caudal ou do núcleo do trato solitário. Seu principal ligante é a capsaicina, todavia, os canais TRPV1 são ativados diretamente também por prótons (pH abaixo de 5,5), temperaturas elevadas (igual ou superior a 42 °C), anandamida, cânfora e eugenol e, indiretamente, por mediadores pró-inflamatórios, como glutamato, bradicinina, serotonina,  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGI}_2$ , NGF, histamina e ATP, os quais sensibilizam os nociceptores ao diminuir seu limiar de ativação (WHITE et al., 2010; RANG et al., 2011; PREMKUMAR, ABOOJ, 2012). É interessante lembrar que os TRPV1 não são expressos somente em nociceptores, mas também em queratinócitos, células  $\beta$  pancreáticas, células endoteliais, linfócitos, macrófagos e células de diferentes regiões do encéfalo (FEIN, 2011).

Algumas situações patológicas, em especial as condições inflamatórias, podem reduzir o limiar térmico de ativação dos canais TRPV1, levando à sua ativação mesmo na temperatura corporal normal. A redução do pH do meio, aliado a um discreto aumento na atividade da PKC, pode resultar na ativação de correntes via canais TRPV1 a temperaturas próximas de 37°C (TOMINAGA et al., 1998; PREMKUMAR, AHERN, 2000; VELLANI et al., 2001; CORTRIGHT et al., 2007). A ativação de PKC sensibiliza profundamente as respostas mediadas por calor nos neurônios sensoriais, e essa resposta pode ser mimetizada por bradicinina e atenuada por inibidores da PKC. Além disso, as prostaglandinas liberadas na inflamação aumentam os níveis intracelulares de AMPc nos neurônios sensoriais, levando à ativação de PKA e subsequente sensibilização do canal TRPV1 (PREMKUMAR, ABOOJ, 2012) (Figura 10). Coletivamente, estes dados demonstram a habilidade de TRPV1 em ativar respostas em condições inflamatórias, onde ocorre acidificação do tecido e liberação de mediadores pró-inflamatórios. A potencialização



dos canais TRPV1, neste caso, leva à hipersensibilidade térmica (AHERN et al., 2005; AKOPIAN, 2011). Além disso, a ativação de TRPV1 em fibras sensoriais também libera neuropeptídeos como a substância P e CGRP, causando aumento do fluxo sanguíneo e edema (inflamação neurogênica) (CORTRIGHT et al., 2007).

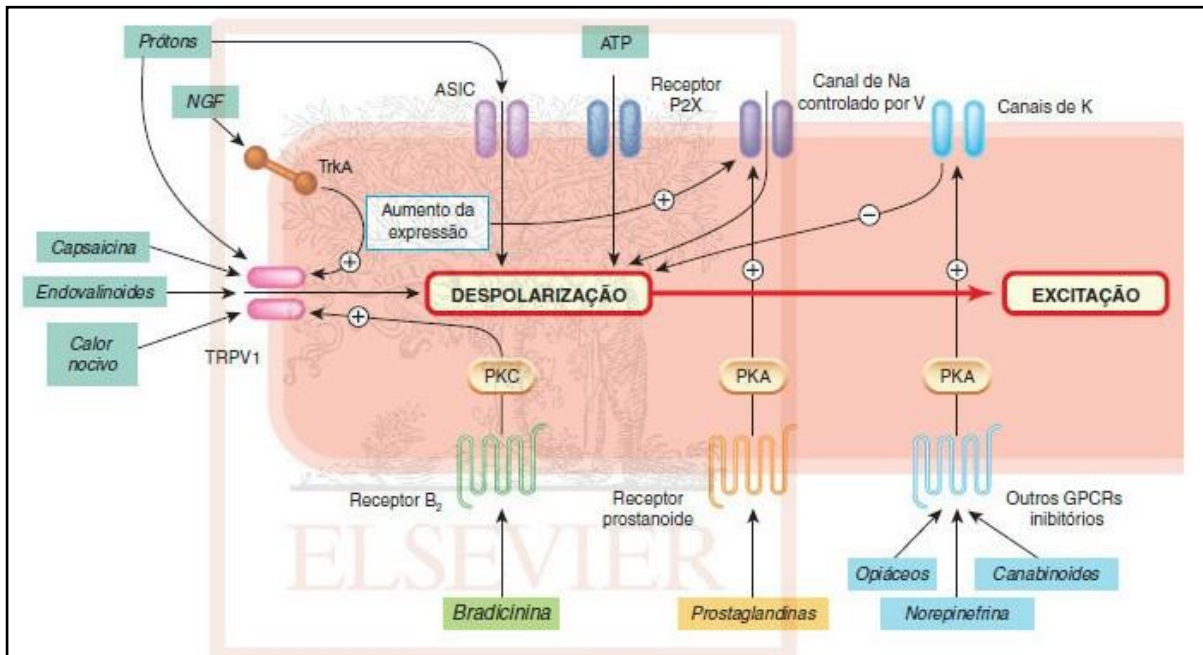


Figura 10: Canais, receptores e mecanismos de transdução de terminações aferentes nociceptivas.

Destaque para canais TRPV1: Podem ser ativados diretamente pela capsaicina, endovanilóides, prótons (que também ativam canais ASIC) e calor nocivo. Indiretamente podem ser ativados por mediadores inflamatórios, como a bradicinina, que ao se ligar em receptores B<sub>2</sub> ativam a via PLC/PKC sensibilizando canais TRPV1. A PGE<sub>2</sub>, ao ligar-se em receptores EP4 também ativa a via PLC/PKC (não mostrada na figura), enquanto ao ligar-se aos receptores EP1/EP2 ativa a via AMPc/PKA, ativando canais NaV e sensibilizando TRPV1 (não mostrado na figura). A ativação dos canais TRPV1 (qualquer que seja a via) leva a uma abertura do canal permitindo o influxo de íons (especialmente Ca<sup>2+</sup> e Na<sup>+</sup>, não mostrados na figura) gerando ondas despolarizantes com consequente excitação neuronal. Fonte: Adaptado de RANG et al., 2011.

## 1.8 Dor pós-operatória

A dor causada pela incisão é uma forma comum e singular de dor aguda, sendo um fenômeno frequente no pós-operatório podendo resultar em sofrimento e riscos desnecessários ao paciente. Mais de 73 milhões de cirurgias são realizadas anualmente nos Estados Unidos de acordo com pesquisas demonstradas pelo Centro Nacional de Estatísticas em Saúde (NCHS, do inglês, National Center for Health Statistics), e até 75% dos pacientes sentem dor após o procedimento

cirúrgico (SCHUG, LARGE, 1993; WARFIELD, KAHN, 1995; COUSINS, POWER, SMITH, 2000). No Brasil, o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2011) relata que o país é o segundo no ranking mundial de cirurgias plásticas, com mais de 1,7 mil anualmente, ou 71 operações estéticas por hora. Um estudo australiano estima que o encargo econômico no tratamento da dor crônica, que se desenvolve a partir da dor pós-operatória aguda, em indivíduos na faixa etária dos 30 anos, ao longo da vida, é de aproximadamente de um milhão de dólares (COUSINS, POWER, SMITH, 2000). Assim, a prevenção e o alívio eficaz da dor pós-operatória aguda podem melhorar os desfechos clínicos, evitando complicações clínicas, bem como economizando recursos com saúde e melhorando a qualidade de vida do paciente.

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

Em dois estudos nacionais que avaliaram o estado de gestão e atitudes em relação à dor pós-operatória, o primeiro obteve uma amostra aleatória de 500 pacientes e mostrou que, dentre estes, 77% tinham apresentado dor após a cirurgia: 19% apresentaram dor leve, 49% dor moderada, 23% dor intensa e 8% dor extrema (WARFIELD, KAHN, 1995). Similarmente, em outro estudo, APFELBAUM e colaboradores (2003) com uma amostra aleatória de 250 pacientes no total, verificaram que 82% dos pacientes apresentaram dor após a cirurgia, destes 13% apresentaram dor leve, 47% dor moderada, 21% dor intensa, e 18% dor extrema. O percentual de pacientes com dor global aumentou ligeiramente de um estudo para o outro, no entanto, em ambos os estudos em torno de 50% dos pacientes tinham dor moderada e a porcentagem de pacientes com dor extrema mais do que dobrou em comparação com os resultados de WARFIELD e KAHN (1995). Embora estes estudos tenham sido realizados aproximadamente há uma e duas décadas atrás, respectivamente, forneceram uma base para comparar a melhoria no tratamento da dor pós-operatória.

### 1.8.1 Incisão plantar

O modelo animal de incisão plantar mimetiza a dor pós-operatória em humanos. Inicialmente foi desenvolvido por BRENNAN, VANDERMEULEN e GEBHART (1996) para ratos e adaptado para camundongos por POGATZKI e RAJA (2003), sendo que da mesma forma que em humanos, a incisão cirúrgica no animal induz comportamento de dor espontânea em resposta a hipersensibilidade desenvolvida (RICHMOND, BROMLEY, WOOLF, 1993).

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

### 1.9 Controle da dor: Vias descendentes analgésicas

Além das grandes vias ascendentes apresentadas anteriormente, há vias descendentes bem desenvolvidas que visam suprimir as aferências nociceptivas. A modulação (facilitação ou inibição) da dor existe na forma de um circuito modulatório, com aferências em múltiplas áreas, incluindo o hipotálamo, a amígdala, o córtex cingulado anterior rostral (rACC), se dirige para a região da substância cinzenta periaquedutal (PAG), e com eferências da PAG para o bulbo. Os neurônios que se localizam no núcleo magno da rafe e no núcleo reticular gigantocelular, que estão incluídos no bulbo ventromedial rostral (RVM), se projetam para a medula espinal (corno dorsal) para, direta ou indiretamente, aumentar ou diminuir o tráfego nociceptivo, modificando a experiência da dor (OSSIPOV, DUSSOR, PORRECA, 2010) (Figura 11).

O mecanismo descendente pode modular a nociceção por interação com vários elementos neuronais no corno dorsal: (1) os próprios terminais das fibras aferentes primárias, (2) neurônios de projeção, (3) interneurônios excitatórios ou inibitórios e (4) terminais de outras vias descendentes. Os mecanismos que medeiam o controle descendente inibitório atenuam a liberação de mediadores pró-nociceptivos (ações pré-sinápticas) e, direta ou indiretamente (via interneurônios inibitórios), suprimem a excitação dos neurônios de projeção (ações pós-sinápticas) (MILLAN, 1999; MILLAN, 2002).

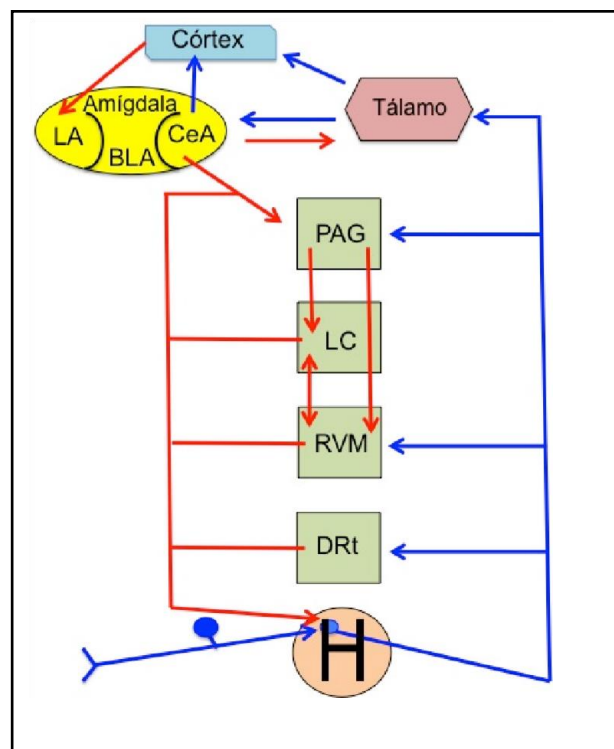


Figura 11: Representação esquemática do circuito modulatório da dor.

As aferências nociceptivas chegam ao corno dorsal da medula espinal pelas fibras aferentes primárias que realizam sinapses com os neurônios de transmissão. As projeções ascendentes têm como alvo o tálamo, e projeções colaterais se dirigem para os núcleos mesencefálicos (incluindo o DRt [núcleo reticular dorsal], o RVM [bulbo ventromedial rostral] e a PAG [substância cinzenta periaquedutal]). As projeções rostrais do tálamo têm como alvo o córtex e a amígdala. O CeA [núcleo central da amígdala] recebe aferências nociceptivas do tronco encefálico e medula espinal. Aferências do tálamo e córtex chegam na amígdala lateral (LA) e basolateral (BLA). O CeA envia eferências para o córtex e tálamo onde as percepções cognitivas e conscientes da dor são integradas. A inibição descendente da dor é mediada por projeções da PAG, que também recebe aferência de outros locais, incluindo o hipotálamo (não mostrado na figura), e se comunica com o RVM, bem como outros núcleos bulbares que enviam projeções descendentes para o corno dorsal da medula espinal. O locus coeruleus (LC), recebe aferências da PAG, se comunica com o RVM e envia projeções inibitórias descendentes noradrenérgicas para a medula espinal. Projeções antinociceptivas e pró-nociceptivas do RVM modulam negativamente e positivamente as aferências nociceptivas e formam um sistema regulatório endógeno da dor. Tratos ascendentes (azul) e descendentes (vermelho) são mostrados no esquema. O círculo com a letra H em seu interior representa a medula espinal. Fonte: Adaptada de OSSIPOV, DUSSOR, PORRECA, 2010.

O controle inibitório da dor também pode ocorrer na parte periférica do sistema nervoso, como ilustrado na figura 12.

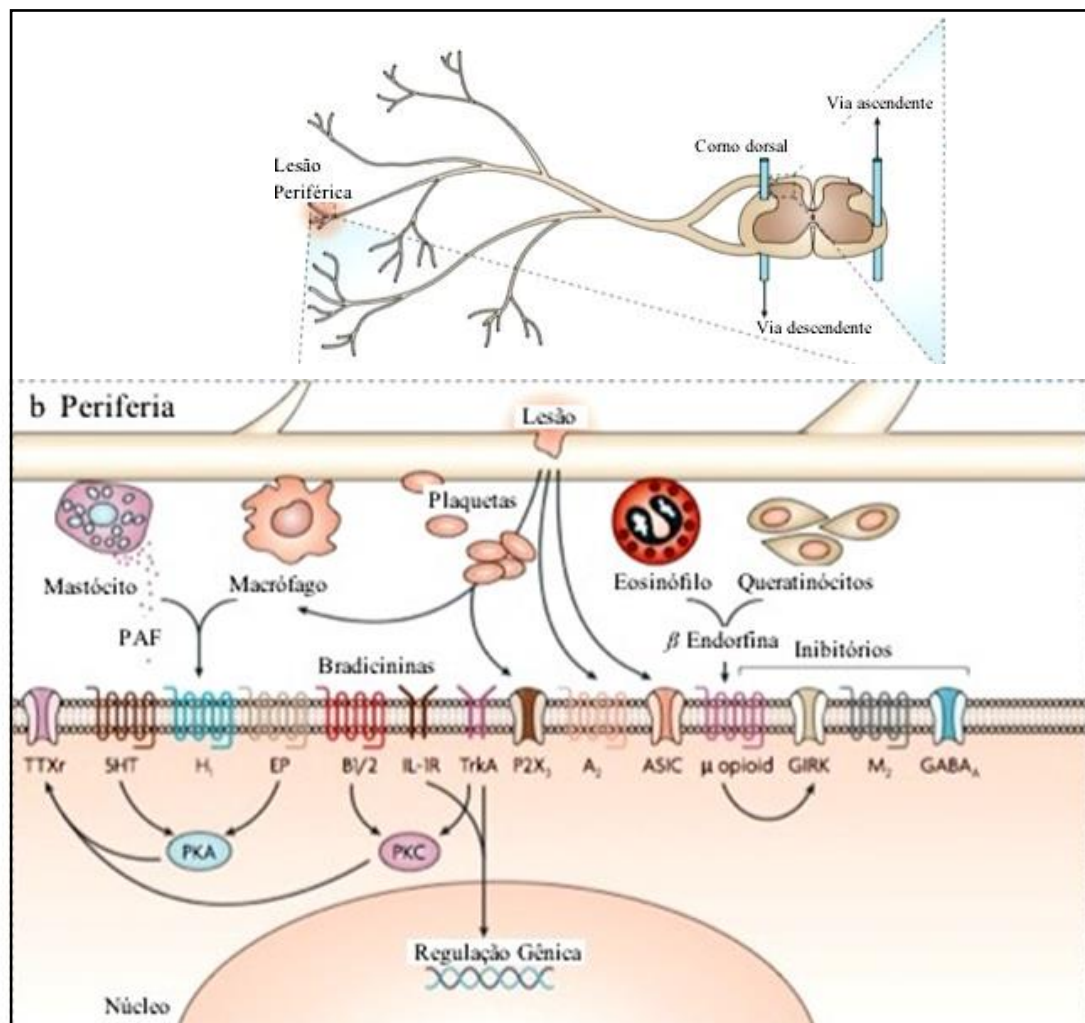


Figura 12: Ilustração de uma lesão periférica e do terminal periférico do neurônio aferente primário.

Os receptores periféricos são ativados por estímulo nocivo, lesão tecidual e inflamação aguda; e enviam informação aferente ao corno dorsal da medula espinal onde a transmissão sináptica para as vias ascendentes está sujeita a modulação das vias descendentes, circuitos neuronais locais e uma variedade de neuroquímicos. A inflamação leva à liberação de numerosas substâncias a partir de mastócitos, macrófagos e de células lesionadas que atuam diretamente ou indiretamente para alterar a sensibilidade dos receptores e canais iônicos nos terminais nervosos periféricos. Esses receptores liberam mensageiros secundários que ativam efetores como PKA e PKC que podem ativar outros receptores acoplados a membrana e a transcrição gênica. Queratinócitos e eosinófilos liberam  $\beta$ -endorfinas, opióides importantes no controle da dor. A<sub>2</sub>, receptor para adenosina A<sub>2</sub>, ASIC, canais iônicos sensíveis à ácido, B<sub>1/2</sub>, receptores 1 e 2 para bradicinina; EP, receptor para prostagandina E; GABA, ácido  $\gamma$ -aminobutírico; GIRK, proteína G acoplada a corrente retificadora de entrada de K<sup>+</sup>; H<sub>1</sub>, receptor H<sub>1</sub> para histamina; 5-HT, 5-hidroxitriptamina; IL, interleucina, IL<sub>1R</sub>, receptor 1 para interleucina, M<sub>2</sub>, receptor muscarínico M<sub>2</sub>, P<sub>2X</sub><sub>3</sub>, receptor purinérgico X<sub>3</sub>; PAF, fator de ativação plaquetária; PGs, prostaglandinas; TTXr, receptor tetrodotoxina; TrkA, receptor tirosina cinase A. Fonte: adaptada de WOODCOCK, WITTER, DIONNE, 2007.

Os principais moduladores no controle descendente da dor são o sistema opioidérgico, serotoninérgico, noradrenérgico, GABAérgico, dopaminérgico,

adenosinérgico, além dos canabinóides endógenos (BESSON, 1999; MILLAN, 2002; BASBAUM et al., 2009). Todavia, os efeitos do sistema modulatório descendente sobre o processo nociceptivo no corno dorsal da medula espinal é bastante complexo (BENARROCH, 2008), uma vez que, por exemplo, a noradrenalina, serotonina e dopamina podem exercer papéis duais na nocicepção, dependendo do tipo de receptor envolvido, do sítio (local) de ação no corno dorsal e/ou do cross talk (comunicação cruzada) entre a sinalização neuroquímica local e as vias descendentes, incluindo adenosina, opióides endógenos e óxido nítrico (NO) (MILLAN, 2002; PERTOVAARA, 2006). Na sequência será descrito o sistema opioidérgico.

### 1.9.1 Sistema opioidérgico

A proposta de que os opióides induzem analgesia e seus outros efeitos comportamentais através da interação com receptores específicos surgiu pela primeira vez na década de 1950, e baseava-se nos requisitos estruturais e estereoquímicos específicos e essenciais para essa atividade. Entretanto, somente com o desenvolvimento de moléculas com atividade antagonista (primeiro a nalorfina e depois a naloxona) que a noção de um receptor específico foi aceita. Martin e colaboradores propuseram a existência de três tipos de receptor, denominados mi ( $\mu$ ), kappa ( $\kappa$ ) e sigma ( $\sigma$ ) (atualmente  $\sigma$  não é mais considerado um receptor opióide). Posteriormente, outros dois receptores foram descobertos: o receptor delta ( $\delta$ ) e o receptor tipo opióide ( $ORL_1$ ), este último apresentando alto grau de homologia na sequência (> 60%) com os receptores  $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\delta$ . Os receptores opióides diferem entre si por diferentes afinidades aos ligantes opióides endógenos e também às drogas opióides exógenas (RANG et al., 2011). Os principais ligantes dos peptídeos opióides endógenos são as encefalinas, seletivas para receptores tipo delta; as dinorfinas, seletivas para receptores tipo kappa; e as endorfinas as quais possuem alta afinidade para receptores tipo delta e mi e baixa afinidade para receptores tipo kappa (LORD et al., 1977; MARTINS et al., 2012). Em humanos, os genes que codificam a transcrição destes receptores estão localizados no cromossomo 1 para os receptores  $\delta$ , no braço longo do cromossomo 8 para os receptores  $\kappa$  e no cromossomo 3 para os receptores  $\mu$  (DHAWAN et al., 1996).

Os receptores opióides pertencem à família de receptores acoplados à proteína G (Gi/Go), portanto, inibem a enzima adenilato ciclase, reduzindo o nível intracelular de AMPc. Ao ativarem a proteína G, exercem efeitos sobre os canais iônicos presentes na membrana neuronal, através do acoplamento direto da proteína G ao canal. Os opióides promovem a abertura de um tipo específico de canal de potássio (canal de potássio retificador interno) e inibem a abertura de canais CaV. Estes efeitos de membrana reduzem a excitabilidade neuronal (porque o aumento da condutância de K<sup>+</sup> causa hiperpolarização da membrana, sendo menos provável a célula disparar potenciais de ação) e reduzem a liberação de neurotransmissores (pela inibição da entrada de Ca<sup>2+</sup>). Em conjunto, estas ações bloqueiam parcialmente a transmissão do estímulo doloroso (RANG et al., 2011).

De forma geral, os receptores opióides são observados em áreas correlacionadas com percepção da dor (lâminas I, II e V), modulação do comportamento afetivo (amígdala, hipocampo, locus coeruleus e córtex) e a regulação do sistema nervoso autônomo e funções neurodegenerativas (bulbo e hipotálamo) (Figura 13). Todavia, de acordo com o subtipo dos receptores e sua localização no sistema nervoso, algumas ações são bem definidas. Os receptores  $\delta$  são responsáveis primariamente pela analgesia, mas também por modular funções cognitivas e de dependência química. São localizados nos núcleos pontinos, amígdalas, bulbo olfatório, córtex cerebral e nos neurônios sensitivos periféricos. Cabem aos receptores  $\kappa$  as funções de regulação da nocicepção, termorregulação, controle de diurese e secreção neuroendócrina. Estão localizados no hipotálamo, PAG, SG (medula espinal), além de neurônios sensitivos periféricos. Quanto aos receptores  $\mu$ , estes regulam funções como a nocicepção, o ciclo respiratório e o trânsito intestinal, estando localizados nas lâminas III e V da medula, no tálamo, PAG, SG e trato gastrintestinal (ARVIDSSON et al., 1995 a,b; DHAWAN et al., 1996; HARLAN, ELISABETH, 2002). A via descendente inibitória, portanto, é um local importante de ação para drogas analgésicas opióides, assim como vimos para os opióides endógenos. A PAG e a SG, por exemplo, são particularmente ricas em neurônios contendo encefalinas (RANG et al., 2011).

Resumidamente, podemos dizer que os opióides promovem analgesia em parte por ativarem as vias descendentes, em parte por inibirem a transmissão no corno dorsal, e em parte por inibirem a excitação das terminações nervosas sensoriais periféricas.



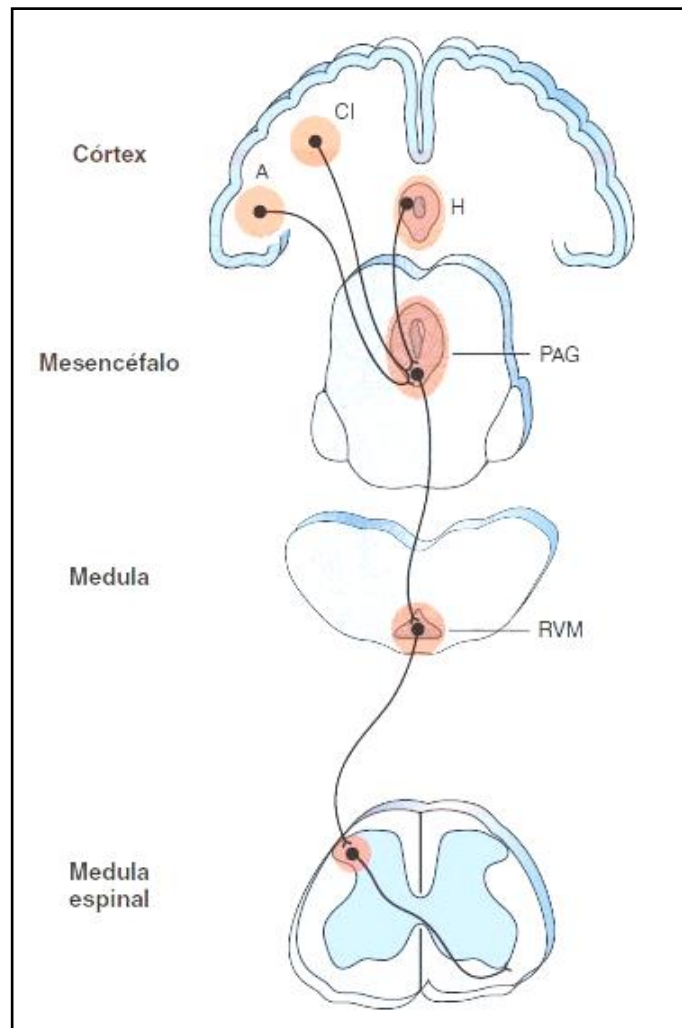


Figura 13: Sistema de controle descendente da dor e sítios de ação dos opióides

A PAG recebe estímulos dos centros superiores e é o principal centro de débito do sistema límbico. Ela se projeta para o bulbo rostroventral (RMV) e deste, as fibras inibitórias se projetam para o corno dorsal da medula espinal. As áreas sombreadas indicam as regiões que expressam os receptores opióides  $\mu$ . CI (córtex insular), A (amígdala), H (hipotálamo). Fonte: Adaptado de RANG et al., 2011.

### 1.10 Farmacologia da dor

Tratar a dor é um dever de todos os profissionais da saúde. Estes, ao exercerem suas atividades, devem prover ao indivíduo o controle dos sintomas e dar suporte à promoção da qualidade de vida. Como abordado anteriormente, o conceito de dor evidencia o envolvimento tanto de fatores sensoriais quanto emocionais, o que demonstra ser a avaliação e o tratamento das afecções dolorosas como desafiantes. Nesse cenário, devem contemplar métodos e procedimentos multipontos com abrangências multimodais e multidisciplinares. Por terapia multimodal, entende-se a utilização de diferentes modalidades terapêuticas



farmacológicas e/ou não-farmacológicas; enquanto por terapia multidisciplinar entende-se a avaliação e o tratamento por vários profissionais de especialidades diversas (TEIXEIRA et al., 2009b).

O tratamento farmacológico da dor não compreende apenas drogas analgésicas (opióides e anti-inflamatórios), mas também medicamentos que, além de alterar a sensibilidade ao estímulo nociceptivo, modifica o comportamento afetivo-emocional e as respostas reflexas à estimulação nociceptiva. Dentre os últimos podemos citar relaxantes musculares, ansiolíticos, anticonvulsivantes, antidepressivos, antipsicóticos, antiserotoninérgicos e anestésicos locais. Na sequência serão descritas as principais classes de fármacos utilizados no controle da dor.

- **Fármacos analgésicos opióides:** Compreendem uma classe de analgésicos muito utilizados em casos de dor moderada a intensa. Podem ser classificados como opiáceos (derivam do ópio), como a codeína, o tramadol e a morfina e opióides sintéticos, como a oxicodona e a metadona. A codeína e o tramadol são os mais usados para dor musculoesquelética, enquanto os opióides mais potentes (metadona, morfina e oxicodona) são utilizados para dores de forte intensidade como a dor oncológica e neuropatias. A morfina, por exemplo, além de apresentar atividade antinociceptiva, também reduz o comportamento afetivo da dor (refletindo sua ação supraespinal, possivelmente ao nível do sistema límbico). Os fármacos opióides se ligam nos receptores opioidérgicos distribuídos na periferia e centralmente. Apesar do seu potente efeito analgésico, os opióides apresentam importantes desvantagens, como tolerância e dependência.

- **Fármacos analgésicos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES):** Classe de fármacos com propriedades analgésicas para casos de dor leve a moderada, especialmente a originada de inflamação ou lesão tecidual. Na periferia reduzem a produção de prostaglandinas (induzidas pela COX-2) que sensibilizam os nociceptores para mediadores da inflamação como a bradicinina. Há também uma ação central, possivelmente na medula espinal, onde as lesões inflamatórias aumentam a atividade da COX-2, o que leva a uma liberação de PGs na medula, causando facilitação da transmissão nas fibras de dor eferentes para interneurônios do corno posterior. Os AINES mais utilizados são ácido acetil salicílico (AAS), ácido mefenâmico, diclofenaco, dipirona, indometacina, meloxicam, nimesulida,

paracetamol, piroxicam e tenoxicam. De maneira geral, a carga de efeitos colaterais é alta, provavelmente pelo fato de os AINES serem muito utilizados (não precisa de receita médica) e por períodos prolongados de tempo. Podemos citar: distúrbios gastrintestinais (como úlceras e hemorragias), insuficiência renal aguda, *rashes* cutâneos (exantema) e efeitos cardiovasculares (AVC e infarto do miocárdio).

- **Fármacos anti-inflamatórios esteroidais:** São usados na dor de origem traumática, inflamatória (doenças reumatológicas), neurológicas (neuropatia periférica e do SNC) e nas metástases ósseas, enquanto nas dores musculares são utilizados somente nas crises agudas ou decorrentes de traumas. Os mais comumente utilizados são: prednisona, meticortem, betametasona, hidrocortisona, dexametasona e deflazacort. Sua principal desvantagem é decorrente de seu uso prolongado, o que pode ocasionar Síndrome de Cushing (hiperadrenocorticismo).

Verifica-se, portanto, que o estudo da dor é algo extremamente complexo, pois além de apresentar seu aspecto sensorial de cunho anátomo-funcional também possui uma relação com as vias envolvidas com o comportamento emocional, podendo particularizar sua resposta em diferentes indivíduos. Isso acarreta uma dificuldade em seu tratamento, exemplificado pela utilização de diversas classes de medicamentos para o tratamento da dor. Além disso, os fármacos atualmente utilizados na terapêutica da dor apresentam diversos efeitos indesejáveis. Sendo assim, torna-se uma área de vasto conhecimento e de futuras perspectivas com o objetivo de se conhecer melhor e desenvolver novas formas de controle desse fenômeno.

Nesse sentido, estudos que envolvam diferentes terapias, como a fitoterapia, tornam-se uma ferramenta importante para o alívio dos processos dolorosos envolvidos em diferentes patologias.

## 2 Justificativa

Segundo dados da OMS, estima-se que cerca de 20% da população mundial adulta sofra de algum tipo de dor crônica, sendo que no Brasil 70% das buscas por consultas médicas estão relacionadas com algum tipo de dor. Em muitos casos, a falta de tratamento adequado ou a inexistência de um tratamento realmente efetivo acaba levando a disfunções e até mesmo incapacidade transitória ou permanente afetando substancialmente a qualidade de vida e a capacidade produtiva desses pacientes. Muitos dos medicamentos de uso convencional para o controle da dor apresentam tolerância (o que implica em doses maiores serem administradas) e dependência química. Neste sentido, a contínua busca por novas estratégias terapêuticas, que sejam eficazes e seguras, tem revelado alternativas bastante promissoras no controle da dor, relacionadas, por exemplo, ao exercício físico, terapia manual e acupuntura. No entanto, os medicamentos continuam a ser a principal ferramenta para o tratamento e controle dos estados dolorosos, e as plantas medicinais representam uma inesgotável fonte de substâncias para a pesquisa de produtos com potencial analgésico.

Há algum tempo, o desenvolvimento de fitoterápicos tem recebido muita atenção tanto por parte da comunidade científica, quanto pelas indústrias farmacêuticas. Apesar da grande aceitação e seu extenso uso terapêutico pela população em geral, as plantas medicinais têm sido pouco avaliadas cientificamente, sendo necessários, estudos mais detalhados no sentido de verificar e assegurar sua qualidade, segurança e eficácia.

O gênero *Condalia* apresenta ampla distribuição geográfica e grande variedade de espécies, além de seu uso na medicina popular no Brasil e em outros países da América do Sul. Em função das atividades farmacológicas mencionadas na medicina popular (como anti-inflamatória), da análise fitoquímica revelando compostos alcalóides (potentes analgésicos) e dos resultados antinociceptivos preliminares obtidos no Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFSM, realizados pela professora Doutora Eliane Maria Zanchet, a continuidade das pesquisas com *Condalia buxifolia* são de interesse, uma vez que não há nenhum estudo sobre a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória desta planta descrito na literatura. Além disso, o prosseguimento nos estudos pode fornecer uma perspectiva

favorável para a maior compreensão de seus efeitos farmacológicos e também para o possível desenvolvimento de um fitoterápico.

## 3 Objetivos

### 3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito antinociceptivo do extrato metanólico obtido da casca da raiz de *Condalia buxifolia* em modelos experimentais de nocicepção aguda em camundongos, bem como os possíveis mecanismos de ação envolvidos.

### 3.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a possível atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato bruto metanólico de *Condalia buxifolia* (EBMCb) em modelos agudos de nocicepção química e térmica;
- b) Avaliar o decurso temporal do possível efeito antinociceptivo do EBMCb;
- c) Avaliar o possível efeito do tratamento prolongado com o EBMCb em modelo de nocicepção agudo;
- d) Analisar o possível envolvimento do EBMCb sobre moléculas pró-inflamatórias;
- e) Investigar o possível envolvimento do sistema opióide e glutamatérgico no efeito antinociceptivo do EBMCb;
- f) Verificar o possível envolvimento de canais TRP e ASIC no efeito antinociceptivo do EBMCb;
- g) Analisar o possível envolvimento de fibras C na atividade antinociceptiva do EBMCb;

- h) Investigar o possível envolvimento do EBMCb na modulação de vias dependentes de proteínas cinases como mecanismo de seu efeito antinociceptivo;
- i) Verificar o possível efeito inespecífico do EBMCb sobre a atividade locomotora e exploratória.
- j) Avaliar o efeito do tratamento prolongado com EBMCb sobre parâmetros toxicológicos.

## 4 Artigos científicos

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de artigos científicos, os quais encontram-se aqui organizados. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas encontram-se nos próprios artigos. Os artigos estão dispostos na sequência em que foram ou publicado (**Artigo 1**) ou submetido (**Artigo 2**).

## **Artigo 1**



## Carta de aceite:

----- Mensagem original -----

**Assunto:**Your Submission

**Data:**08.07.2015 16:59

**De:**"Journal of Ethnopharmacology" <[jethnoph@chem.leidenuniv.nl](mailto:jethnoph@chem.leidenuniv.nl)>

**Para:**[adair.santos@ufsc.br](mailto:adair.santos@ufsc.br)

Ref.: Ms. No. JEP-D-15-01561R1

Pharmacological evidence favouring the folk medicine use of *Condalia buxifolia* Reissek in the relief of pain and inflammation in mice  
Journal of Ethnopharmacology

Dear Dr. Santos,

I am pleased to tell you that your work has now been accepted for publication in Journal of Ethnopharmacology.

Comments from the Editor and Reviewers can be found below.

When your paper is published on ScienceDirect, you want to make sure it gets the attention it deserves. To help you get your message across, Elsevier has developed a new, free service called AudioSlides: brief, webcast-style presentations that are shown (publicly available) next to your published article. This format gives you the opportunity to explain your research in your own words and attract interest. You will receive an invitation email to create an AudioSlides presentation shortly. For more information and examples, please visit <http://www.elsevier.com/audioslides>.

Thank you for submitting your work to this journal.

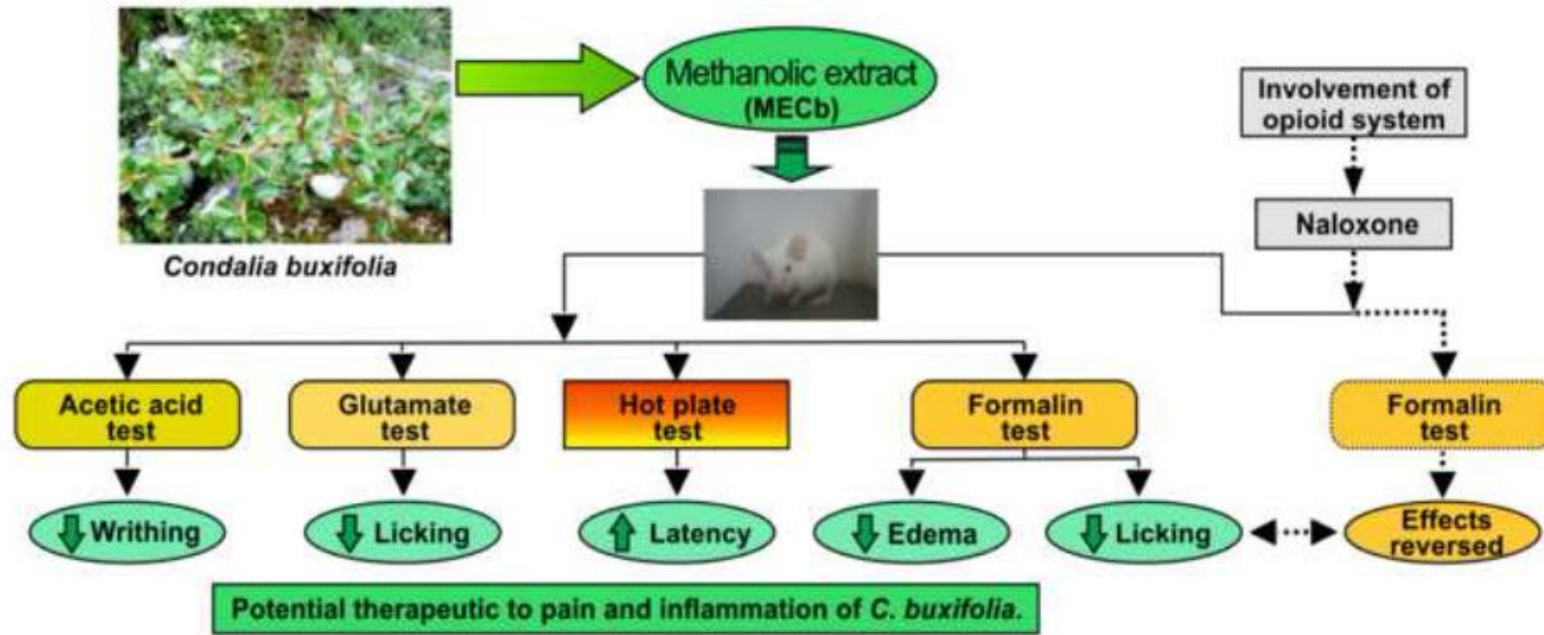
With kind regards

Guillermo Schmeda-Hirschmann, Dr.rer.nat.  
Associate Editor  
Journal of Ethnopharmacology

Comments from the Editors and Reviewers:

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

--



Pharmacological evidence favouring the traditional use of the root bark of *Condalia  
buxifolia* Reissek in the relief of pain and inflammation in mice

Simões, R.R.,<sup>1,2</sup>; Coelho, I.S.<sup>2</sup>, Junqueira, S.C.<sup>2</sup>, Maldaner, G.<sup>3</sup>; Morel, A.F.<sup>3</sup>; Venzke, D.<sup>4</sup>, Ruani, A.P.<sup>4</sup>, Pizzolatti, M.G.<sup>4</sup>, Zanchet, E.M.<sup>1\*</sup>; Santos, A.R.S.<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, SC, Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, SC, Brasil

<sup>4</sup>Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, SC, Brasil

\* Corresponding authors:

Tel.: + 55 48 37219352/206; fax: + 55 48 37219672.

E-mail: [adairrs.santos@gmail.com](mailto:adairrs.santos@gmail.com)

Tel.: + 55 55 32208096; fax: + 55 55 32208241

E-mail: [emzanchet@yahoo.com.br](mailto:emzanchet@yahoo.com.br)

## Abstract

*Ethnopharmacological relevance:* The *Condalia buxifolia* root bark infusion is used in traditional medicine in Brazil as antipyretic, anti-inflammatory and against dysentery. This study was designed to investigate whether the methanolic extract of the root bark of *Condalia buxifolia* (MECb) exhibits antinociceptive and anti-inflammatory effects in mice. Furthermore, also was investigated the involvement of glutamatergic and opioidergic system in the antinociceptive effect induced by MECb. *Materials and Methods:* The antinociceptive and anti-inflammatory effects of intra-gastric gavage (i.g.) administered MECb (10-300 mg/kg) were evaluated in mice subjected to chemical (formalin, acetic-acid, glutamate) or thermal (hot plate) models of pain. The involvement of opioid system in the antinociceptive effect of the MECb was investigated in formalin test. Furthermore, a nonspecific effect of MECb was evaluated by measuring locomotor activity and exploratory behavior in open field test. Finally, was performed a phytochemical analysis of MECb. *Results:* The phytochemical analysis of MECb was performed through HPLC analysis showing that the alkaloid Condaline-A is the main constituent. The intragastric administration of MECb (100–300 mg/kg) significantly inhibited the nociception caused by acetic acid ( $48\pm 2\%$ ), inflammatory phase ( $49\pm 3\%$ ) and paw edema ( $32\pm 6$ ) caused by formalin, and MECb (100 mg/kg, i.g.) also inhibited nociception caused by glutamate ( $41\pm 7\%$ ). In addition, MECb (100-300 mg/kg, i.g.) increased the paw withdrawal latency in hot-plate test, without affecting the locomotor activity and exploratory behavior in open field test. Finally, the antinociceptive effects of MECb (100 mg/kg, i.g.) were significantly reversed by naloxone (1mg/kg, i.p.) in the formalin test. *Conclusion:* These data show, for the first time, that MECb has significant antinociceptive and anti-inflammatory effects, which appear to be related to the inhibition of the

glutamatergic system and the activation of opioid mechanism, besides present central effects. These results support the use of *Condalia buxifolia* in traditional medicine and demonstrate that this plant has therapeutic potential for the development of phytomedicines with antinociceptive and anti-inflammatory properties.

Keywords: Anti-inflammatory; Antinociceptive; *Condalia buxifolia*; Rhamnaceae, Alkaloid, pain.

## 1. Introduction

The genus *Condalia* includes 18 American species distributed all over the continent, from North to South America (Johnston, 1962). Five of them are found in South America, one in Brazil (Johnston and Soares, 1972). Among them, *Condalia buxifolia* Reissek, which is a tree up to 4 m high and belongs to the Rhamnaceae family that grows in the wild in southern Brazil, Uruguay, and Argentina, where it is known popularly as “coronilha-folha-de-buxo” or “espinilho” (Johnston, 1962 and Morel et al., 2002). *Condalia buxifolia* is used in folk medicine (through the infusion of root bark) as antipyretic and anti-inflammatory effects, besides protective effect against dysentery (Bastos, 1989). Phytochemical studies carried out on the genus *Condalia* have demonstrated the occurrence of many classes of natural products including alkaloids (Morel et al., 2002) and anthocyanins (Frontera et al., 2000). From a pharmacological point of view, studies using crude extracts and alkaloids of this species showed its antibacterial activities (Morel et al., 2002). However, to date no pharmacological study has been performed concerning the antinociceptive and anti-inflammatory effect of this species.

The inflammatory response is a beneficial and physiological mechanism by which the body defends itself against infection and seeks to repair tissue damage or loss of function (Lawrence et al., 2002). This process involves several events including vasodilation, plasma extravasation, cell migration, and in many cases, the activation of the coagulation cascade (Sherwood and Toliver-Kinsky, 2004). After tissue injury, there is a release of neurotransmitters (as glutamate) and inflammatory mediators, which are important to install and maintain the pain state. Moreover, various alterations in the somatosensory system occurs during inflammation amplifying the response and sensitivity to peripheral stimuli, such that pain is now

activate by normally innocuous or low-intensity stimuli (Woolf and Costigan, 1999). Normally, inflammatory pain disappears after resolution of the initial tissue injury. Thus, this state is the main condition that leads subjects to seek for treatment.

Nowadays, non-steroidal anti-inflammatory, glucocorticoids and opioids are drugs that undoubtedly provide significant health benefits in the treatment of inflammation and pain. However, their prolonged use is followed by complications, including gastric perforations, stomach ulcers, bleeding, euphoria, and respiratory depression, beyond physical and psychological dependence (Silva et al., 2004 and Bruno et al., 2014). In this sense, the development of novel drugs to treat inflammatory and painful states, with minimal adverse effects, constitutes a challenge and is constantly under debate and research (Knowles, 2014). Therefore, the study of plants that have been traditionally used as pain killers should still be seen as a fruitful and logical research strategy, in the search for new analgesic drugs and pain mechanisms (Calixto et al., 2000). Accordingly, this study evaluated: (i) the chemical composition of the methanolic extract of *Condalia buxifolia* (MECb), (ii) the possible antinociceptive and anti-inflammatory effects of MECb on standard chemical and thermal models of pain in mice, (iii) the possible involvement of opioid system in the antinociceptive effects of MECb; and (iv) the nonspecific effect of MECb was evaluated by measuring locomotor activity and exploratory behavior in open field test.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Plant material**

The root bark of *Condalia buxifolia* was collected in Lavras do Sul (30° 48' 46" S 53° 53' 42" O), Rio Grande do Sul State, Brazil, in January to March 2013. The identification of botanical material was performed by M.Sc. Nelci Rolim Bastos-Záchia and compared with authentic sample deposited at the Herbarium of the

Department of Botany of the Federal University of Santa Maria (UFSM, Santa Maria, RS, Brazil), under the voucher specimen number SMDB 3196.

## 2.2 Extract preparation

The root bark (3.5 kg) of *Condalia buxifolia* was dried at a temperature of 50 °C and the grain was then grounded thin using Wiley mill. After this procedure, it was extracted with methanol using a Soxhlet apparatus for 12 hours. The resultant extract was filtered and the methanol was removed under reduced pressure to obtain the methanolic extract of *Condalia buxifolia* (MECb, yield 980 g; 28%).

## 2.3 HPLC-DAD profile of MECb

The High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analysis was performed using an Agilent 1260 Infinity Quaternary LC (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), equipped with a quaternary pump (model G1311B), UV diode array detector (model G4212B) monitoring at 254 nm, and manual injector with 20 µl sample loop. The OpenLab CDS software was used to control the analytical system, data collection and processing. The HPLC apparatus was equipped with a Supelcosil LC-18 column (4.6 mm×250 mm, 5 µm particle size) (Supelco, Bellefonte, PA, USA), used at 25°C. The mobile phase consisted of acetonitrile (A) and ammonium acetate (20 mM, pH~7.1) (B), with a flow rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup>. The following gradient elution was used: 0 – 10 min from 10% to 50% (A) (gradient), 10 – 30 min 50% (A) (isocratic), 30 – 40 min 100 (A) (gradient). A sample of the methanolic extract (1 mg mL<sup>-1</sup>) was dissolved in mobile phase, centrifuged, and the resulting supernatant was submitted to HPLC analysis.

The identity of the peaks relative to condaline-A was established by comparison of retention time and UV spectra. A quantitative analysis was performed



by the external standard method, plotting calibration curves at concentrations of 10 to 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  in mobile phase. The alkaloid was isolated and identified by NMR, MS and IR spectroscopy as previously described (Morel et al., 2002). Concentration is shown as percentage of condalinaline-A in methanolic extract from *Condalia buxifolia*.

#### 2.4 Drugs and reagents

The following substances were used: acetic acid (Merck, Darmsted, Germany), L-glutamic acid hydrochloride (glutamate), diclofenac sodium, (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), morphine hydrochloride and naloxone (Cristália, São Paulo, Brazil). Absolute ethanol and formalin were of analytical grade and obtained from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil). HPLC-grade acetonitrile was obtained from Panreac (Barcelona, Spain), ammonium hydroxide and acetic acid were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and ultrapure water was obtained from a Milli-Q Plus system (Millipore, Bedford, MA, USA). Drugs were immediately dissolved in 0.9% NaCl solution before administration, except MECb and diclofenac sodium that were dissolved in ethanol (5 %) and Tween 80 (0.5 %), respectively. The final concentration of ethanol and Tween 80 did not cause any effect when it was administered alone.

#### 2.5 Animals

The experiments were performed on a total of 309 female Swiss mice 2-month-old (25–35 g) obtained from the animal facility of the Federal University of Santa Catarina (Florianópolis, SC, Brazil) and housed in groups of 5 per cages at  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  and humidity (60–80%) under a 12-h light/dark cycle (lights on at 06:00 h), with access to standard laboratory diet and water *ad libitum*. Animals were habituated to laboratory conditions for at least 1 h before testing, and all experiments were

performed during the light phase of the cycle. The animals were randomly distributed between the experimental groups (8–11 animals per group), and all experiments reported in this study were carried out in accordance with current guidelines for the care of laboratory and ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals (Zimmermann, 1983) and was approved by the Ethics Committee for Animal Research of both the Federal University of Santa Catarina (protocol number PP00745) and the Federal University of Santa Maria (protocol number 046/2012). The number of animals (N= 8 to 11 per group) used and the intensity of the noxious stimuli were the minimum necessary to obtain reliable data.

## 2.6 Antinociceptive activity

### 2.6.1 Nociception induced by acetic acid

Nociception induced by acetic acid was evaluated as described previously (Santos et al., 1999), where animals received a single intraperitoneal (i.p.) injection of a 0.6% acetic acid solution (450  $\mu$ L) and the nociceptive response, observed as contractions of the abdominal muscle together with a hind limb stretching, were cumulatively counted during a period of 20 minutes. Intra-gastric gavage (i.g.) were orally administered on the animals with MECb (10-300 mg/kg, i.g.) or diclofenac (30 mg/kg, i.g., used as positive control) 1h before acetic acid injection, and control animals received the same volume of vehicle (10 ml/kg, i.g.). After the irritant injection, mice were placed into 20-cm diameter glass cylinders and the abdominal constrictions were cumulatively counted during a 20-minute period. A significant reduction in the number of abdominal writhing was considered as indicative of antinociceptive activity.

### 2.6.2 Nociception and paw edema induced by formalin

The experimental procedure was described by Hunskaar and Hole (1987). Animals received an intraplantar (i.pl.) injection (20  $\mu$ L) containing a 2.5 % formalin solution (0.92 % formaldehyde), in the ventral surface of the right hind paw. Mice were observed during the first 5 minutes (neurogenic phase) and during the 15<sup>th</sup> to 30<sup>th</sup> minutes (inflammatory phase). The animals were pretreated with MECb (30-300 mg/kg, i.g.) or diclofenac (30 mg/kg, i.g., used as positive control) 1 h before the formalin injection. The control mice were treated with vehicle (10 ml/kg, i.g.). Mice were placed individually in an observation acrylic chamber, and the time spent licking or biting the injected paw was recorded as an indicative of nociceptive behavior by using a chronometer. A significant reduction of time in nociceptive behavior was considered as indicative of antinociceptive activity.

In separate series of experiments, the time-course of the antinociceptive and antiedematogenic effects of MECb (100 mg/kg, i.g.) at time points 1, 2, 4, 6, and 8 h before formalin administration was investigated. Control animals received a similar volume of vehicle (10 mL/kg) and were observed over the same intervals of time. The assessment of paw thickness was measured before and after injection of formalin and were observed over the same intervals of time as mentioned above by using digital micrometer (MT-045B; Shangai Metal Great Tools Co., Shangai, China), and was expressed as the difference between paw thickness before and after formalin challenge ( $\Delta$  in paw thickness, in millimeters).

### 2.6.3 Nociception induced by glutamate

In an attempt to provide evidence concerning the possible interaction of MECb with the glutamatergic system, mice were submitted to the glutamate-induced licking or biting in the mouse paw. The procedure used was similar to the one previously

described (Meotti et al., 2010). A volume of 20  $\mu$ L of of glutamate (20  $\mu$ mol/paw), made up in sterile saline solution with the pH adjusted to 7.0 with NaOH, was injected intraplantarly (i.pl.) under the ventral surface of the right hindpaw. The animals were pretreated with MECb (100 mg/kg, i.g) or diclofenac (30 mg/kg, i.g., used as positive control) 1 h before glutamate injection, and control animals received the same volume of vehicle (10 ml/kg, i.g.). After the glutamate injection, mice were placed into 20-cm diameter glass cylinders, and the time spent licking or biting the injected paw was recorded during 15 min using a chronometer, this is indicative of nociceptive behavior. A significant reduction of time in nociceptive behavior was considered as indicative of antinociceptive activity.

#### 2.6.4 Thermal nociception induced by hot-plate test

The central analgesic activity of MECb was assessed using the hot plate test as previously described by Eddy and Leimbach (1953). In this test, the apparatus, which consists of a metal plate was heated to a temperature of 52°C (AVS system, cold-hot plate, São Paulo, SP, Brazil). First, an initial measurement was made to record the baseline latency of each animal. A cut-off of 30 seconds was adopted to prevent possible injuries caused by hot exposure for a long period of time to the animal paw. After this baseline measurement, animals were pretreated with MECb (100-300 mg/kg, i.g.) or morphine (5 mg/kg, s.c., used as positive control) 1 h before being placed in the hot-plate, and control animals received the same volume of vehicle (10 ml/kg, i.g.). A significant increase of the latency was considered as indicative of antinociceptive activity. The antinociceptive response was evaluated at time points 1, 2, 3 and 4 hours after administration of MECb, vehicle or morphine.

#### 2.6.5 Evaluation of a possible involvement of opioid system

To investigate the possible involvement of the opioid system in the antinociceptive effect of MCEb, the mice were pretreated with the nonselective opioid receptor naloxone (1 mg/kg, i.p.) (Santos et al., 1999). After 20 min, the animals received an injection of MCEb (100 mg/kg, i.g.), morphine (5 mg/kg, s.c., used as a positive control) or vehicle (10 ml/kg, i.g.). The other groups were pretreated with vehicle (10 ml/kg, i.p.) and received morphine, MCEb, or vehicle after 20 min. After 1 h, they received a formalin (2.5%) injection, and the time spent licking the injected paw was recorded for both the early and late phases of the model.

#### 2.6.6 Evaluation of locomotor and exploratory activity in the open field model

The open-field test was used to exclude the possibility that the antinociceptive action of MCEb could be related to non-specific locomotor and exploratory activity disturbances. The numbers of crossing (indicative of locomotor activity) and rearing (indicative of exploratory activity) was assessed in an open-field test, as described previously (Broadhurst, 1960). The apparatus consisted of wooden box with black PVC walls measuring 40 × 40 × 30 cm. The white floor of the arena was divided into 9 equal squares, and the numbers of squares crossed with all paws and rearing was counted in a 5-min session. The mice were treated with MCEb (30-300 mg/kg, i.g.) or vehicle (10 ml/kg, i.g.) 1h before the test, and the apparatus were disinfected after each test.

#### 2.7 Statistical analysis

The results are presented as the mean ± the standard error of mean (S.E.M.) and the data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) by Student-Newman–Keuls test or two-way ANOVA followed by Bonferroni test when

appropriate using GraphPad software (GraphPad software, San Diego, CA, USA). *P* values less than 0.05 were considered as indicative of significance.

### 3. Results

#### 3.1 Phytochemical analysis of MECb

The HPLC profile of MECb was obtained by analysis at 254 nm (Fig. 1). The chromatogram showed significant peaks for alkaloids at 6-18 min, which led to the identification of Condaline-A when compared with the calibration curves of condalina-A purified beforehand (Morel et al., 2002). The concentration of Condaline-A in the methanolic extract was 3.4%. The other peaks were not identified, but it can be considered that they account for alkaloids due to the method used to obtain the methanolic extract and also the phytochemical characteristic of the plant (Morel et al., 2002). Furthermore, the method for the HPLC analysis was used to highlight facing alkaloids.

#### 3.2 Acetic acid-induced nociception

The treatment of mice with MECb (10-300 mg/kg, i.g.) elicited a significant inhibition of acetic acid-induced writhing response, with inhibition of  $48 \pm 2\%$  at a dose of 300 mg/kg (Fig. 2). However, positive control diclofenac (30 mg/kg, i.g.) also inhibited acetic acid-induced abdominal constrictions in  $76 \pm 3\%$  as compared to control (Fig. 2).

#### 3.3 Formalin-induced nociception and paw edema

The results depicted in Fig. 3 show that MECb (30-300 mg/kg, i.g.) did not decrease the amount of time that the mice spent licking or biting the injected paw in the neurogenic phase of the formalin test (Fig. 3A). However, in the inflammatory

phase of the formalin test, MECb (30-300 mg/kg, i.g.) significantly diminished the nociceptive response compared with mice treated with vehicle (Fig. 3B), with inhibition of  $49 \pm 3\%$  at a dose of 300 mg/kg. In addition, the reference nonsteroidal analgesic and anti-inflammatory, diclofenac (30 mg/kg, i.g.) was able to significantly reduce ( $32 \pm 6\%$ ) only the inflammatory phase of formalin-induced nociception as compared with control group (see Fig. 3 A and B).

A time-course analysis of the antinociceptive effect of MECb (100 mg/kg) given orally is shown in Fig. 3, C and D. MECb reduced ( $53 \pm 2\%$ ) only the inflammatory phase as early as 1h after oral administration, an action that remained significant up to 6 h after administration. Thus, the administration of MECb orally (1 h before testing) was chosen for all further studies with independent groups of animals. In addition, MECb (100 mg/kg) also produced a significant inhibition, an effect that started in the 2<sup>nd</sup> hour and lasted until the 4<sup>th</sup> hour, of the paw edema formation associated with the inflammatory phase of formalin-induced nociception, with maximal inhibition of  $30 \pm 9\%$  (Fig. 3E). Furthermore, diclofenac (30 mg/kg, i.g.) significantly reduced ( $34 \pm 4\%$ ) the paw edema caused by formalin (data not shown).

#### 3.4 Glutamate-induced nociception

The results presented in Fig. 4 show that MECb (100 mg/kg, i.g.) and diclofenac (30 mg/kg, i.g.) caused a significant inhibition of the glutamate-induced nociception when compared to control group, with an inhibition of  $41 \pm 7\%$  and  $44 \pm 5\%$ , respectively.

#### 3.5 Thermal nociception induced by hot plate test

The results depicted in Fig. 5 show that pretreatment of animals with MECb (100-300 mg/kg, i.g.) caused a significant increase of the latency response in the hot-plate test in mice. The dose of 100 mg/kg was significant only in the second hour, while the dose of 300 mg/kg presented increase ( $32 \pm 1\%$ ) in latency as early as 1h after oral administration, an action that remained significant up to 3 h after administration. The positive control morphine (5mg/kg, s.c.) presented increase in latency in all hours analyzed, but the maximum effect was in the second hour ( $72 \pm 2\%$ ) (Fig. 5).

### 3.6 Involvement of the opioid system

The results presented in Fig. 6 show that the 20 min prior treatment of animals with the nonselective opioid receptor antagonist naloxone (1 mg/kg, i.p.) completely reversed the antinociceptive response caused by MECb (100 mg/kg, i.g.) and morphine (5 mg/kg, s.c., used as positive control), when analyzed against the inflammatory phase of formalin-induced pain (Fig. 6A and B).

### 3.7 Evaluation of locomotor and exploratory activity in the open field model

MECb treatment (30–300 mg/kg, i.g.) did not alter the locomotor and exploratory activity of mice in the open-field test, evaluated by counting the number of crossings and rearing when compared with animals that received vehicle (control group)(Fig. 7 A and B).

## 4. Discussion

The results presented here extend literature data and clearly demonstrate, for the first time, that *Condalia buxifolia* administered by oral route elicited a significant antinociception in a chemical model of inflammatory pain in mice, namely acetic-acid,



formalin and glutamate tests. The systemic (i.g.) administration of MECb also caused significant increase of the latency response in the hot plate test, a classical thermal model of nociception. Moreover, the antinociceptive action of the MECb in the formalin test was significantly reversed by i.p. treatment of animals with naloxone. In addition, the dose of the MECb that caused significant antinociception did not produce any statistically significant locomotor and exploratory dysfunction.

Despite advances in understanding of the mechanisms of pain development and maintenance, there are a few classes of effective analgesic and anti-inflammatory drugs. Moreover, the currently used therapeutic drugs present many undesirable side effects, beyond limited effectiveness (Calixto et al., 2000). Thus, it is very important and necessary that the search for new active products with fewer adverse effects is carried out. Besides, folk medicine has been an alternative, and several plants have shown effective results in the treatment of painful states (Calixto et al., 2000). In this sense, *Condalia buxifolia* is used in folk medicine for the treatment of several conditions including antipyretic and anti-inflammatory effects. However, there is presently no data in literature showing that *Condalia buxifolia* presents any antinociceptive or anti-inflammatory activity, which makes our work interesting, since it provides scientific basis for the ethnopharmacological use of *Condalia buxifolia*.

In the present study, was demonstrated that MECb has a significant antinociceptive effect on acetic acid-induced abdominal constrictions, a typical model used to search for new drugs with analgesic and anti-inflammatory properties (Collier et al., 1968, Derardt et al., 1980 and Le Bars et al., 2001). Its antinociceptive effects could occur via peripheral or central sites of action. It has been suggested that acetic acid acts by releasing endogenous inflammatory mediators of the nociceptive

neurons (Collier et al., 1968), such as bradykinin, prostaglandins and pro-inflammatory cytokines (Ribeiro et al., 2000 and Ikeda et al., 2001). In addition, the concentration of glutamate and aspartate in the cerebrospinal fluid increased after the injection of acetic acid (Feng et al., 2003). Furthermore, this test is sensitive to non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), narcotics and other centrally acting drugs (Collier et al., 1968 and Santos et al., 1998). Here, was confirmed these observations by demonstrating that diclofenac was effective in reducing pain caused by acetic acid. Also, the antinociception caused by MECb was unlikely to be secondary to its non-specific muscle relaxant, specific and/or non-specific depressant central effects as revealed by the lack of important motor dysfunction or detectable side effects in the open-field test.

Another interesting finding of the present study was the demonstration that the MECb also showed antinociceptive effects in the inflammatory phase (late phase) of formalin-induced nociception but did not inhibit the neurogenic phase (early phase). Moreover, the MECb given by oral route produced its maximum antinociceptive effect after 1 hour and it decreased in a gradual manner, remaining significant until 6 hours after administration. In addition, the MECb was also effective in reducing the formation of paw edema associated with inflammatory phase of formalin, an effect that started in the 2<sup>nd</sup> hour and lasted until the 4<sup>th</sup> hour after MECb administration. Inflammatory pain and edema are a consequence of the increase in the peripheral and spinal levels of different mediators, such as PGE<sub>2</sub>, excitatory amino acids, nitric oxide, histamine, serotonin, kinins among other peptides (Murray et al., 1988, Rujjanawate et al., 2003 and Almeida et al., 2013). Thereby, our data suggest that MECb inhibited the second phase and paw edema of formalin test by inhibiting the synthesis or release of these inflammatory mediators. Furthermore, functional

changes in the dorsal horn of the spinal cord are produced by inflammatory pain (Malmberg and Yaksh, 1995, Tjolsen et al., 1992 and Santos and Calixto, 1997). Experimental data indicate that formalin predominantly evokes activity in C-fibers (Heapy et al., 1987, Vanegas and Schaible, 2004, Almeida et al., 2013 and Tjolsen et al., 1992), although A $\delta$ -fibers are thought to be responsible for fast nociceptive transmission in the first phase of the pain response (Julius and Basbaum, 2001).

It is notable that the neurogenic pain produced by formalin is quite resistant to the majority of NSAIDs, such as acetylsalicylic acid, indomethacin, paracetamol, and diclofenac, as presented here. However, these drugs can attenuate the second phase of formalin-induced nociceptive behavior (Hunskar and Hole, 1987, Malmberg and Yaksh, 1995 and Santos et al., 1998) as showed by diclofenac, used as positive control, in this study. Moreover, it has also been reported that morphine, some tachykinin receptor antagonists, non-selective excitatory amino acid antagonists and both B1 and B2 bradykinin receptor antagonists are able to inhibit both phases of the formalin test (De Campos et al., 1996 and Santos and Calixto, 1997).

Our results also show that oral administration of the MECb produces a significant inhibition of the nociceptive response caused by intraplantar injection of glutamate into mouse hind paw. This nociceptive response caused by glutamate seems to involve peripheral, spinal and supra-spinal sites and its action is mediated by NMDA and non NMDA receptors, as well as by the nitric oxide release or some nitro derivate-regulate pathways (Beirith et al., 2002, Millan, 1999 and Fundytus, 2001). In addition, the MECb effects were similar to diclofenac in decrease the nociceptive behavior response caused by glutamate. Thus, the suppression of pain induced by injection of glutamate, acetic acid and formalin by MECB may be

associated, at least in part, by blocking the glutamatergic system. However, additional studies are necessary to confirm this hypothesis.

Given the significant effects evoked by MECb in different models of inflammatory pain, was investigated the central modulation effect of MECb on hot plate model, that is, one of the most common tests of nociception that are based on stimulus, acute and non-inflammatory (Mandegary et al., 2004). Thermal-induced pain by hot plate is specific for centrally mediated nociception and thought to involve opioids (Besra et al., 1996 and Aquino et al., 2013). In this test, MECb showed significant increase in hind paw latency to nociceptive response, and demonstrated a similar effectiveness compared to morphine, a positive control. On the basis of this finding, can be speculated that MECb may elicit an antinociceptive effect due to the release of endogenous opioids or act directly, activating opioid receptors. This assertion is supported by the demonstration that naloxone, a non-selective opioid receptor antagonist, completely inhibited the antinociceptive effect of both MECb and morphine when analysed in the inflammatory pain caused by formalin.

Finally, the phytochemical components responsible for *Condalia buxifolia* antinociceptive and anti-inflammatory effects are unknown, but preliminary chemical studies carried out with this MECb allow us to demonstrate the presence of cyclopeptide alkaloid, named condaline-A, confirming previous studies of the group (Morel et al., 2002). However, due to limited amount of this alkaloid, it was not possible to test them orally. Thus, further studies are necessary to chemically and pharmacologically isolate and characterize other active principle(s) present in *Condalia buxifolia*.

## **5. Conclusion**

In conclusion, our study demonstrated, for the first time, a potential therapeutic for *Condalia buxifolia* to pain and inflammation treatment. The intragastric administration of *Condalia buxifolia* results in pronounced antinociceptive effects in mice models of acute nociception and inflammation. Therefore, it is suggested that MECb acts, at least in part, by modulating glutamatergic and opioidergic system and at peripheral and central levels. Although further studies are required to better clarify these mechanisms. Thus, these findings support, at least partially, the use of *Condalia buxifolia*, in traditional medicine.

### **Conflict of interest**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

### **Acknowledgements**

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Apoio à Pesquisa Científica Tecnológica do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) and Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Thank Mrs. Nelci R. Bastos-Záchia, the botanist that made the identification of *Condalia buxifolia* possible.

## References

- Almeida, J.R., Souza, G.R., Silva, J.C., Saraiva, S.R., Júnior, R.G., Quintans, J. de S., Barreto, R. de S., Bonjardim, L.R., Cavalcanti, S.C., Quintans, L.J. Jr., 2013. Borneol, a bicyclic monoterpene alcohol, reduces nociceptive behavior and inflammatory response in mice. *The Scientific World Journal* 18, 1-5.
- Aquino, A.B. de, Cavalcante-Silva, L.H., Matta, C.B., Epifânio, W.A., Aquino, P.G., Santana, A.E., Alexandre-Moreira, M.S., de Araújo-Júnior, J.X., 2013. The Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of *Aspidosperma tomentosum* (Apocynaceae). *Scientific World Journal* 28, 1-8.
- Bastos, N.R., 1989. A família Rhamnaceae R. Br. no Rio Grande do Sul. Gêneros *Condalia* Cav. e *Scutia* Comm. *Pesquisa Botânica* 40, 69–84.
- Beirith, A., Santos, A.R.S., Calixto, J.B., 2002. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. *Brain Research* 924, 219–228.
- Besra, S.E., Sharma, R.M., Gomes, A., 1996. Anti-inflammatory effect of petroleum ether extract of leaves of *Litchi chinensis* Gaertn. (Sapindaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 54, 1–6.
- Broadhurst, P.L., 1960. Experiments in psychogenetics, in: Eisenk, H.J. (Ed), *Experiments in Personality*. Routledge and Kegan Paul, London, pp. 31-61.
- Bruno, A., Tacconelli, S., Patrignani, P., 2014. Variability in the response to non-steroidal anti-inflammatory drugs: mechanisms and perspectives. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 114, 56–63.
- Calixto, J.B., Beirith, A., Ferreira, J., Santos, A.R.S., Cechinel Filho, V., Yunes, R.A., 2000. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. *Phytotherapy Research* 14, 401–418.
- Collier, H.O., Dinneen, L.C., Johnson, C.A., Schneider, C., 1968. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy* 32, 295–310.
- De Campos, R.O., Alves, R.V., Kyle, D.J., Chakravarty, S., Mavunkel, B.J., Calixto, J.B., 1996. Antioedematogenic and antinociceptive actions of NPC 18521, a novel bradykinin B2 receptor antagonist. *European journal of pharmacology* 316, 277-286.
- Derardt, R., Jongney, S., Delvalcee, F., Falhout, M., 1980. Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. *European Journal of Pharmacology* 51, 17–24.
- Eddy, N.B., Leimbach, D., 1953. Synthetic analgesics II. Dithienyl-butenyl and dithienylbutylamines. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics* 107, 385–93.

- Feng, Y., Cui, M., Willis, W.D., 2003. Gabapentin markedly reduces acetic acid-induced visceral nociception. *Anesthesiology* 98, 729-733.
- Frontera, M.A., Tomás, M.A., Diez, A., Watson, C., Mulet, C., 2000. Phitochemical study of *Condalia microphylla* Cav. *Molecules* 5, 470-471.
- Fundytus, M.E., 2001. Glutamate receptors and nociception: Implications for the drug treatment of pain. *CNS Drugs* 15, 29–58.
- Heapy, C.G., Jamieson, A., Russel, N.J.W., 1987. Afferent C-fibres and A delta activity in models of inflammation. *British Journal of Pharmacology* 90, 164–170.
- Hunskar, S., Hole, K., 1987. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 30, 103-14.
- Ikeda, Y., Ueno, A., Naraba, H., Oh-ishi, S., 2001. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. *Life Sciences* 69, 2911–2919.
- Johnston, M.C., 1962. Revision of *Condalia* including *Microrhamus* (Rhamnaceae). *Britonia* 14, 332–338.
- Johnston, M.C., Soares, F. M. A., 1972. *Flora ilustrada Catarinense RAMN.* p. 1-50.
- Julius, D., Basbaum, A.I. 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413, 203-210.
- Knowles, R.G., 2014. Development of anti-inflammatory drugs- the research and development process. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 114, 7-12.
- Lawrence, T., Willoughby, D. A., Gilroy, D. W., 2002. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nature Reviews Immunology* 2, 787-795.
- Le Bars, D., Gozariu, M., Cadden, S.W., 2001. Animal models of nociception. *Pharmacological Reviews* 53, 597-652.
- Malmberg, A.B., Yaksh, T.L., 1995. Effect of continuous intrathecal infusion of omega-conopeptides, N-type calcium-channel blockers, on behavior and antinociception in the formalin and hot-plate tests in rats. *Pain* 60, 83-90.
- Mandegary, A., Sayyah, M., Heidari, M.R., 2004. Antinociceptive and antiinflammatory activity of the seed and root extracts of *Ferula gummosa* Boiss in mice and rats. *DARU* 12, 58–62.

Meotti, F.C., Coelho, I. dos Santos, Santos, A.R., 2010. The nociception induced by glutamate in mice is potentiated by protons released into the solution. *The Journal of Pain* 11, 570-578.

Millan, M.J., 1999. The induction of pain: an integrative review. *Progress in Neurobiology* 57, 161–164.

Morel, A.F., Araujo, C.A., da Silva, U.F., Hoelzel, S.C., Záchia, R., Bastos, N.R., 2002. Antibacterial cyclopeptide alkaloids from the bark of *Condalia buxifolia*. *Phytochemistry* 61, 561-568.

Murray, C.W., Porreca, F., Cowan, A., 1988. Methodological refinements to the mouse paw formalin test. An animal model of tonic pain. *Journal of Pharmacological Methods* 20, 175–186.

Ribeiro, R.A., Vale, M.L., Thomazzi, S.M., Paschoalato, A.B., Poole, S., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., 2000. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *European Journal of Pharmacology* 387, 111–118.

Rujjanawate, C., Kanjanapothi, D., Panthong, A., 2003. Pharmacological effect and toxicity of alkaloids from *Gelsemium elegans* Benth. *Journal of Ethnopharmacology* 89, 91–95.

Santos, A.R., Calixto, J.B., 1997. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. *Neuropeptides* 31, 381-389.

Santos, A.R.S., Vedana, E.M.A., Freitas, G.A.G. 1998. Antinociceptive effects of meloxicam in neurogenic and inflammatory nociceptive models in mice. *Inflammation. Research*, 47, 302-307.

Santos, A.R.S., Beirith, A., Calixto, J.B., Hess, S.C., Messana, I., Ferrari, F., Yunes, R.A., 1999. Study of the antinociceptive action of the ethanolic extract and the triterpene 24-hydroxytormentonic acid isolated from the stem bark of *Ocotea suaveolens*. *Planta Medica* 65, 50-55.

Sherwood, E. R., Toliver-Kinsky, T., 2004. Mechanisms of the inflammatory response. *Best practice & research. Clinical anaesthesiology* 18, 385-405.

Silva, N.S.F., Sakata, R.K., Issy, A.M., 2004. Effects of different spinal morphine doses in rats. *Revista Brasileira de Anesthesiologia* 54, 60-67.

Tjolsen, A., Berge, O.G., Hunskar, S., Rosland, J.H., Hole, K., 1992. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 51, 5-17.

Vanegas, H., Schaible, H., 2004. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? *Brain Research Reviews* 46, 295-309.



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

Woolf, C.J., Costigan, M., 1999. Transcriptional posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 96, 7723-30.

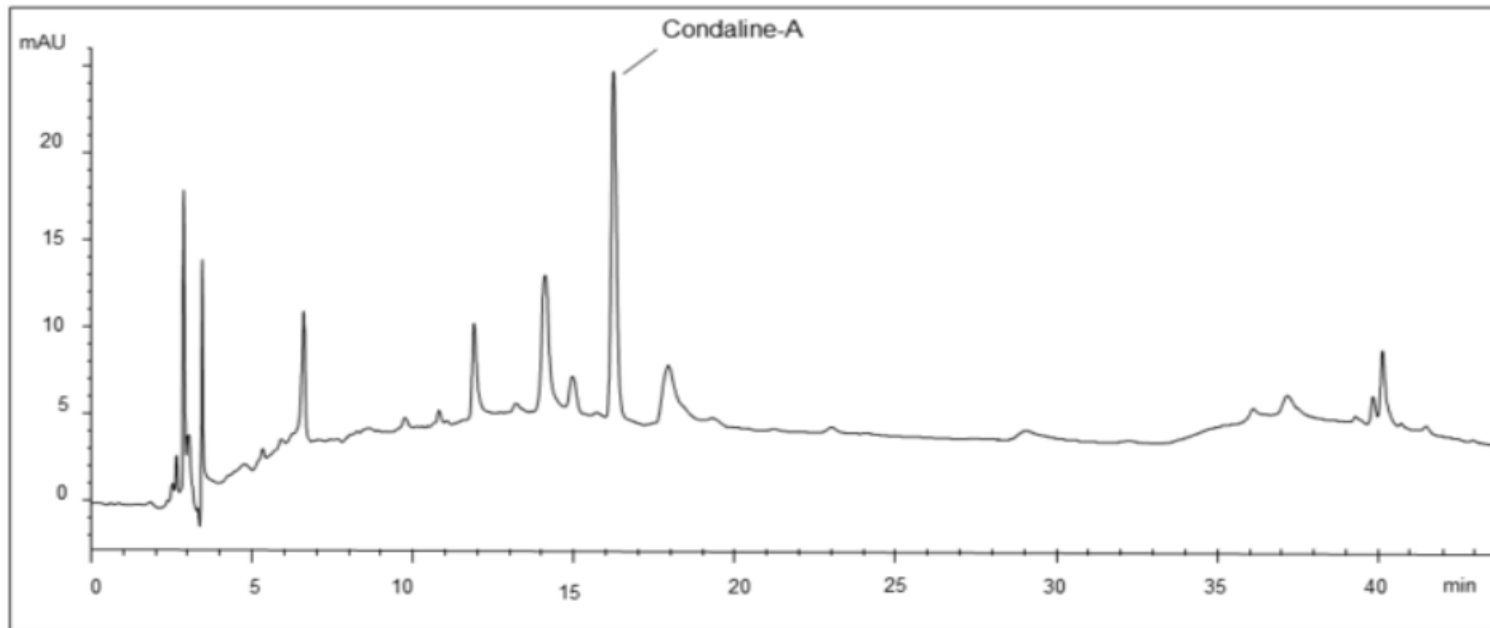
**FIGURES**

Fig. 1: HPLC chromatogram of the methanolic crude extract of *Condalina buxifolia*. The figure showed the condaline-A as main component.

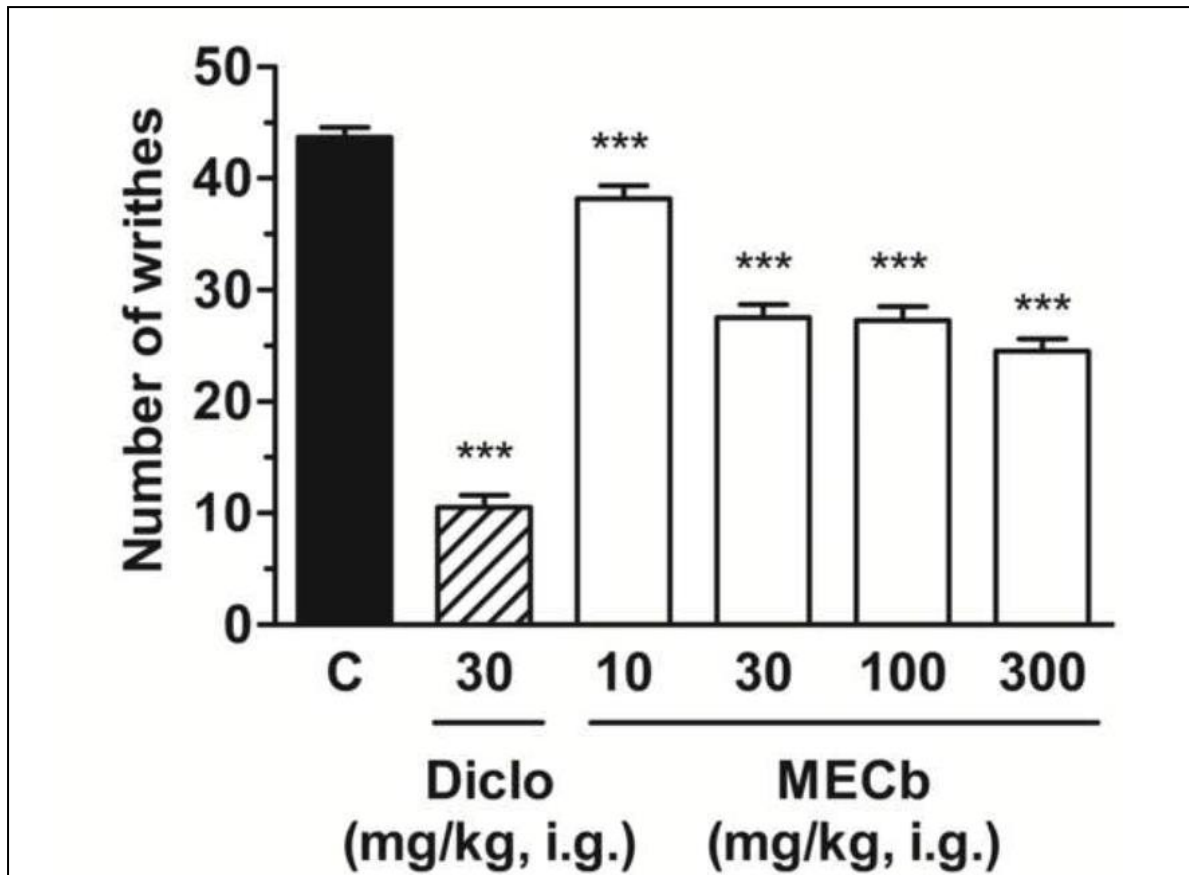


Fig. 2: Effect of MECb and diclofenac (Diclo) on the abdominal constriction caused by intraperitoneal injection of 0.6% acetic acid in mice. Each column represents the mean of 8 to 10 animals, and the vertical lines indicate the S.E.M. The asterisks denote the significance levels compared with the control group C. \*\*\*  $P < 0.001$  using one-way ANOVA by the Student Newman–Keuls test.

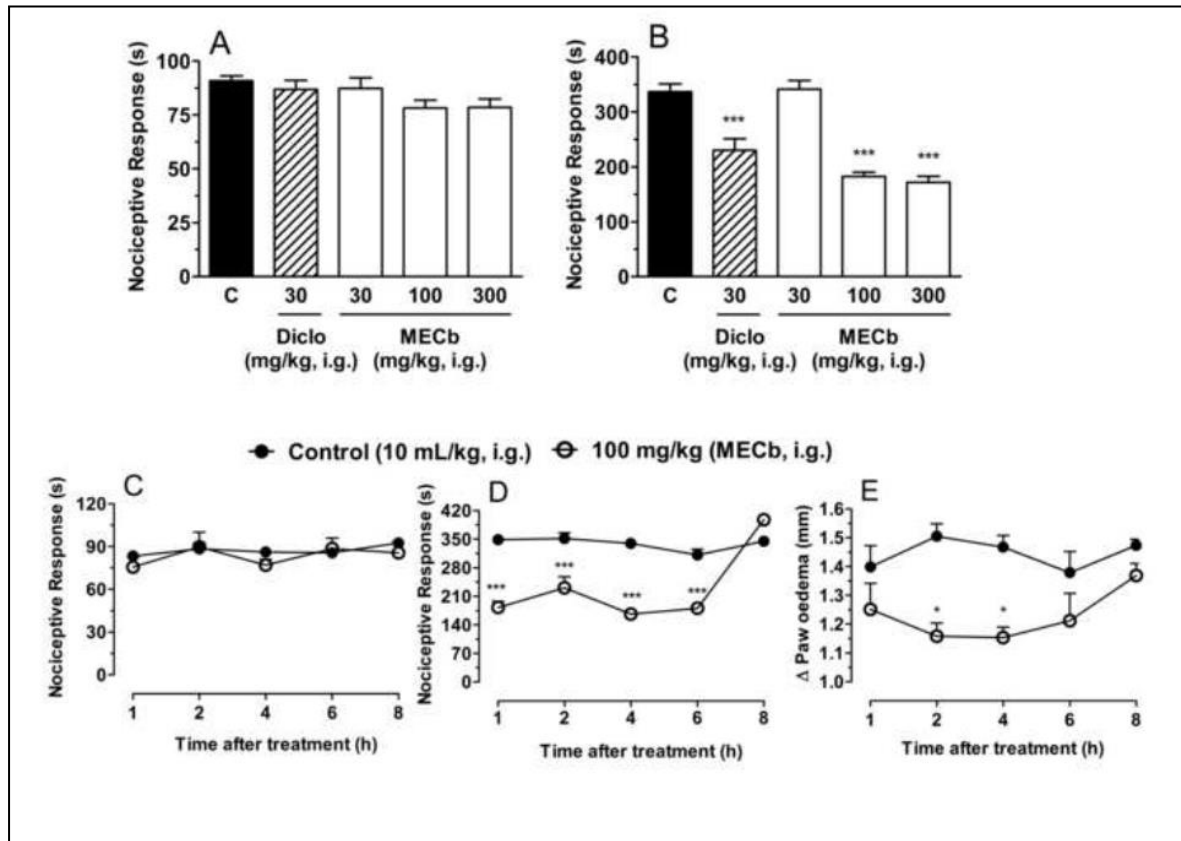


Fig. 3: Effect of MECb and diclofenac (Diclo) on the formalin-induced nociception (first phase, panel A and second phase, panel B) in mice. Each column represents the mean of 9 to 11 animals, and the vertical lines indicate the S.E.M. The asterisks denote the significance levels compared with the control group C. \*\*\*  $P < 0.001$  using one-way ANOVA by the Student Newman-Keuls test. The panel C, D and E represent the time course of the antinociceptive (first phase, panel C and second phase, panel D) and antiedematogenic (panel E) effect of MECb in the formalin test. MECb was administered orally (100 mg/kg) 1, 2, 4, 6, and 8 h before formalin injection. Each point represents the mean of 8 to 10 animals, and the error bars indicate the S.E.M. Control values indicate the animals injected with vehicle, and the asterisks denote the significance levels compared with control groups (two-way ANOVA followed by Bonferroni test; \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ ). In some cases, the error lines are hidden within the symbols.

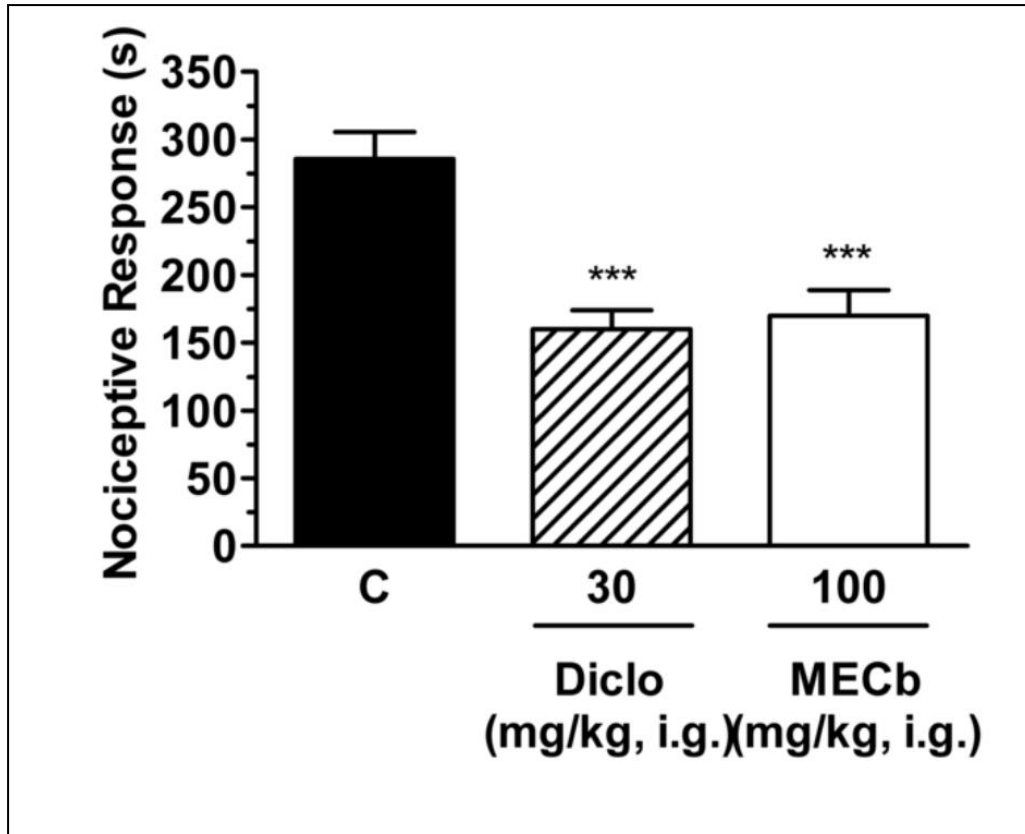


Fig. 4: Effect of MECb and diclofenac (Diclo) on the glutamate-induced nociception in mice. Each column represents the mean of 8 animals, and the vertical lines indicate the S.E.M. The asterisks denote the significance levels compared with the control group C. \*\*\*  $P < 0.001$  using one-way ANOVA by the Student Newman–Keuls test.

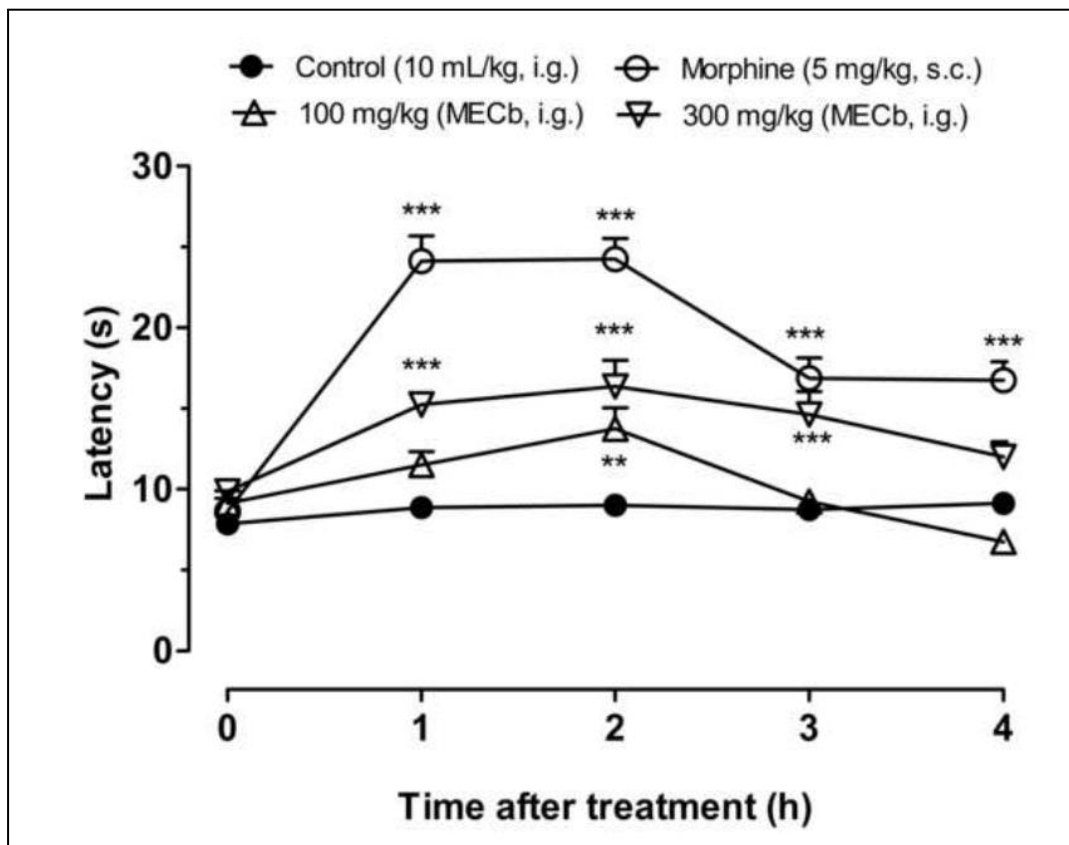


Fig. 5: Time course of the effect of MECb and morphine on paw withdrawal latency in hot plate test in mice. MCEb, morphine and vehicle was administered 1, 2, 3, and 4 h before hot plate test. Each point represents the mean of 8 animals, and the error bars indicate the S.E.M. Control values indicate the animals injected with vehicle, and the asterisks denote the significance levels compared with control groups (two-way ANOVA followed by Bonferroni test; \*\*P < 0.01 and \*\*\*P < 0.001). In some cases, the error lines are hidden within the symbols.

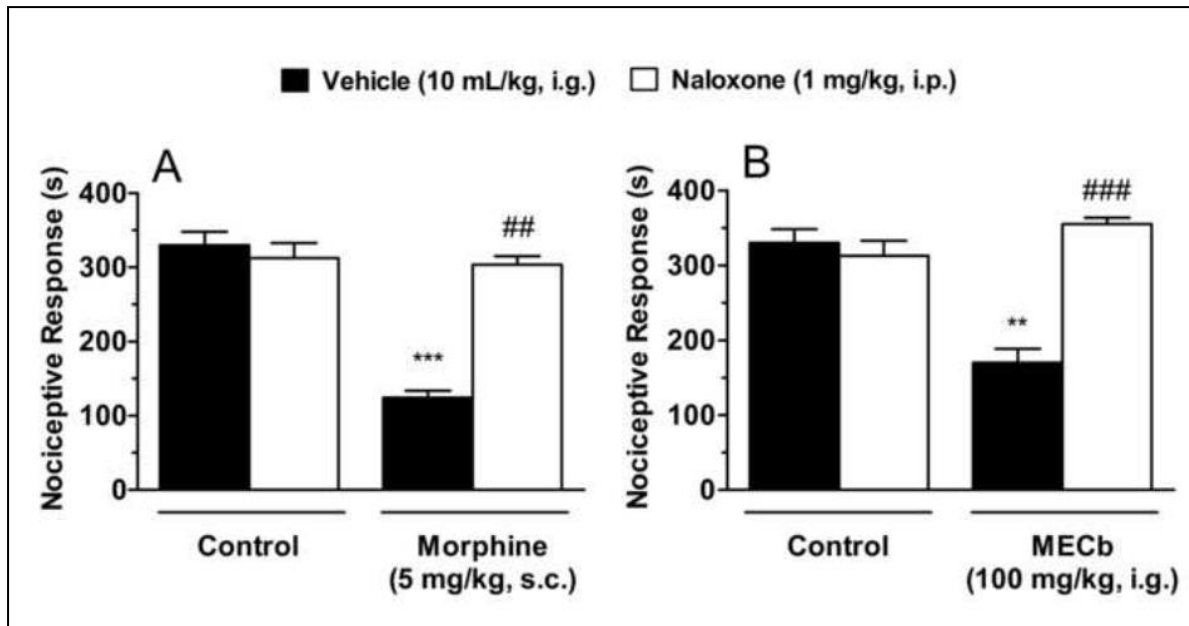


Fig. 6: Involvement of opioid receptors in antinociceptive effect of MECb. Effect of administration of MECb (100 mg/kg, i.g.), morphine (5 mg/kg, s.c.), or vehicle (10 ml/kg, i.g.) in mice previously treated with saline (10 ml/kg, i.p.) or naloxone (1 mg/kg, i.p., a nonselective opioid receptor antagonist) against the formalin-induced nociception (second phase). Each column represents the mean of 9 animals, and the vertical lines indicate the S.E.M. Asterisks denote significance levels compared with control groups (one-way ANOVA followed by Student Newman-Keuls test); \*\*P < 0.01 and \*\*\*P < 0.001. ##P < 0.01, ###P < 0.05 compared with agonists (MECb or morphine alone).

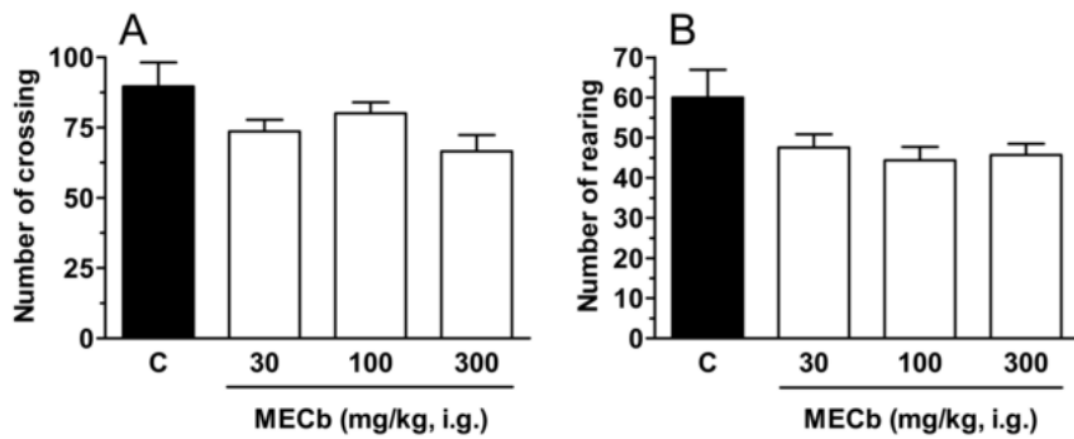


Fig. 7: Effects of MECb on open field [number of crossing (panel A) and rearing (panel B)] test in mice. Each column represents the mean of 6 to 8 animals, and the vertical lines indicate the S.E.M. No statistical difference compared with control group C (one-way ANOVA followed by Student Newman-Keuls test).



## **Artigo 2**

*Condalia buxifolia* reduces nociceptive and inflammatory pain by a mechanism dependent on TRPV1/ASICs channels

Simões, R.R.<sup>1,2</sup>; Coelho, I.S.<sup>2</sup>, do Espírito Santo, C.C.<sup>2</sup>, Morel, A. F.<sup>3</sup>; Zanchet, E.M.<sup>1</sup>; Santos, A.R.S.<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, SC, Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, SC, Brasil

\* Corresponding author:

Tel.: + 55 48 37219352/206; fax: + 55 48 37219672.

E-mail: [adairrs.santos@gmail.com](mailto:adairrs.santos@gmail.com)

## Abstract

*Ethnopharmacological relevance:* The *Condalia buxifolia* root bark infusion is used in traditional medicine in Brazil as antipyretic, anti-inflammatory and against dysentery and recently it has been shown its antinociceptive effect in animal models of acute pain. The present study investigated the antinociceptive effect of methanolic extract of *Condalia buxifolia* (MECb) in paw incision model of acute postoperative pain. In addition, we also investigated the possible antinociceptive effect of MECb on TRPV1, TRPA1, TRPM8, ASIC receptors as well as PMA, PGE<sub>2</sub> and forskolin induced-nociception and the involvement of the PKA signaling pathway in antinociceptive effect induced by MECb. *Materials and methods:* The effect of MECb administered orally (10-300 mg/kg, i.g.) in mice was assessed on hyperalgesia (mechanical, cold and heat) in postoperative pain model, in this paradigm we further analyzed the levels of cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10) and neurotrophic factor (NGF). Moreover we also investigated the participation of C-fibers, desensitizing mice with a high dose of intrathecal capsaicin. Furthermore, treatment of MECb (100 mg/kg, i.g.) was verified on nociception induced by capsaicin, cinnamaldehyde, menthol, acidified saline, PMA, PGE<sub>2</sub> and forskolin. We also perform the western blot to PKA phosphorylated induced by forskolin. In addition, we verified the effect of MECb (100 – 300mg/kg, i.g.) treatment on the toxicological parameters. *Results:* MECb showed marked reduction on mechanical and thermal heat hyperalgesia but not to thermal cold hyperalgesia. In addition, MECb reduced the levels of pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and NGF without alter the levels of anti-inflammatory cytokine IL-10. MECb antinociception was not altered by the dessentization induced by capsaicin. Moreover, MECb was able to reduce the nociception induced by capsaicin, acidified saline, PMA, PGE<sub>2</sub> and forskolin but not by nociception induced by cinnamaldehyde or menthol. Western blot analyses showed that MECb reduced the levels of PKA phosphorylation induced by forskolin in hind paws. Moreover MECb treatment did not alter indicators of toxicity. *Conclusion:* In accordance with its use in traditional medicine, these results confirm the antinociceptive and anti-inflammatory property of MECb in a clinical pain model in rodents. Also MECb produces antinociception against chemicals models of pain. The precise mechanism involved in their actions is not completely understood but this results point to the involvement of TRPV1/ ASICS receptors as well as PGE<sub>2</sub> signaling and to PKA/PKC pathways.

Keywords: *Condalia buxifolia*, TRPV1, postoperative pain, C fibers, heat hyperalgesia.

## 1. Introduction

Nociception is the process by which intense noxious or potentially injurious stimulus (thermal, mechanical or chemical) are detected by nociceptors, while pain involves not only the transduction of noxious environmental stimuli, but also cognitive and emotional processing by the brain (Basbaum and Jessell, 2000; Julius and Basbaum, 2001; Levine and Alessandri-Haber, 2007). Furthermore, pain has been recognized as a worldwide problem and postoperative pain is one of the most common forms of acute pain and can lead to mechanical hyperalgesia (Pogatzki and Raja, 2003). Epidemiological data reveal that approximately 80% of patients have acute –moderate to extreme- pain after surgery (Apfelbaum et al., 2003), which can be followed by persistent pain in 10-50% of cases (Kehlet et al., 2006), affecting recovery and quality of life of these patients.

Several molecules and signaling pathways that contribute for noxious stimuli detection have already been characterized (Julius and Basbaum, 2001), especially involved in postoperative pain. Among them, the transient receptor potential (TRP), especially TRPV1, acid-sensitive (ASIC) ion channels, several inflammatory mediators, as prostaglandin (PGE<sub>2</sub>) and protons, and inflammatory cytokines appear to be molecular gateways in the sensory system that contribute to elicit nociceptive signals as well as to promote hyperalgesia and allodynia, collectively known as hypersensitivity. Indeed, hypersensitivity to heat, cold, and mechanical stimuli are well documented symptoms of inflammatory pain (Julius and Basbaum, 2001).

The transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channel is activated by the vanilloid capsaicin (Caterina et al., 1997), noxious heat (>43°C), low pH (Caterina et al., 1997; Tominaga et al., 1998), voltage (Gunthorpe et al., 2000), and various lipids (Julius and Basbaum, 2001). In cells, TRPV1 is inactivated by its binding to PIP<sub>2</sub> and is released from this block by PLC-mediated PIP<sub>2</sub> hydrolysis (Prescott and Julius, 2003). TRPV1 receptors are localized on nociceptors, in many other cell types and in various cortical and subcortical areas (Toth et al., 2005).

There are many signaling pathways that become activated (or inhibited) by the activation of TRPV1. Similar to many other channels, TRPV1 contains multiple phosphorylation sites in its amino acid sequence for protein kinase C (PKC) (Bhave et al., 2003; Premkumar et al., 2004), protein kinase A (PKA) (Bhave et al., 2002) and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII). These protein kinases can sensitize the receptors or amplify their responses by phosphorylating key residues in their structures, as well as of other proteins implicated in nociceptive signaling pathways in sensory neurons (Wood et al., 1988; Premkumar et al., 2000; Bhave et al., 2003).

There are several studies that have demonstrated the injuries in peripheral tissue or nerve produced by proinflammatory cytokines (Bernik et al., 2002), such as IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . These proinflammatory cytokines play important roles in mediating exaggerated pain states (Munro et al., 2012). The spinal cord TNF- $\alpha$  may promote central sensitization by increasing glutamate release from presynaptic terminals (Coderre et al., 1993). Anti-inflammatory cytokines could block the induction of proinflammatory cytokines and suppressed inflammation-induced NMDAR phosphorylation (Hains and Waxman, 2006).

Although a considerable number of antinociceptive drugs are available, novel substances could contribute to our current understanding of the nociceptive signaling pathways to improve the treatment of painful conditions. Many plants are attractive sources for developing new analgesic agents, among these, *Condalia buxifolia* displays anti-inflammatory and antinociceptive effects in rodents (Simões et al., 2015, Journal of ethnopharmacology), however lack further studies demonstrating the mechanisms that underlying its effects.

*Condalia buxifolia* Rissek belongs to the Rhamnaceae family, which is commonly found in American continent (Johnston, 1962) and is known popularly as “coronilha-folha-de-buxo” or “espinilho”. It is well established that *Condalia buxifolia* used in human medicine presents critical antipyretic and anti-inflammatory effects, besides protective effect against dysentery (Bastos, 1989). In this context, here we investigate the antinociceptive effect of methanolic extract of *Condalia buxifolia* (MECb) in a model of postoperative pain, where nociceptive and inflammatory components are found, and demonstrate a possible involvement of PKA/PKC/TRPV1 in signaling pathway in its mechanism of action.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant material

The root bark of *Condalia buxifolia* was collected in Lavras do Sul (30° 48' 46" S 53° 53' 42" O), in the Province of Rio Grande do Sul, Brazil. The identification of botanical material was performed by botanist and by comparison with existing sample in the Herbarium of the Department of Botany – Federal University of Santa Maria (UFSM) under number SMDB 3296.

### 2.2 Extraction of vegetal material

The methanolic extract was provided by the laboratory coordinated by Professor Dr. Ademir Farias Morel, from Department of Chemistry of UFSM. The root bark (3.5 kg) of *Condalia buxifolia* was dried at a temperature of 50 ° C and the grain was then grounded thin using Wiley mill. After this procedure, it was extracted with MeOH using a Soxhlet apparatus for 12 hours. The obtained extract was filtered and concentrated in vacuum to obtain 28 % of the crude residue methanolic of *Condalia buxifolia* (MECb).

### 2.3 Drugs and reagents

The following substances were used: Acetic acid (Merck, Darmsted, Germany), capsaicin, cinnamaldehyde, prostaglandin E<sub>2</sub>, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), camphor, menthol and amiloride (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), forskolin and AMG9810 (Tocris Bioscience, Missouri, EUA), ethanol (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil). MECb was dissolved in 5 % ethanol/0.25 % NaOH in saline, and the other drugs were dissolved as described within the parentheses: capsaicin (1 % ethanol/1% Tween 80 in saline), AMG 9810 and cinnamaldehyde (1 % Tween 80 in saline), camphor (1 % ethanol/5 % Tween 80 in saline), menthol (1.6 % ethanol/0.01 % Tween 80 in saline) and amiloride (5 % DMSO/5 % ethanol in saline), PMA and PGE<sub>2</sub> (stock solutions were prepared in absolute ethanol and the solution used in the animals did not exceed 0.5 % of ethanol in saline). Interleukin- 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumor necroses factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin- 10 (IL-10) and neural growth factor (NGF)

(R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Saline corresponds in a 0.9% NaCl solution. The final concentration of ethanol, DMSO and Tween 80 did not cause any effect when it was administered alone.

## 2.4 Animals

The experiments were performed on a total of 339 Swiss mice 2-month-old (25–35 g) (324 female and 15 male) obtained from the animal facility of the Federal University of de Santa Catarina (Florianópolis, SC, Brazil) and housed in groups of 5 per cages at  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  and humidity (60–80%) under a 12-h light/dark cycle (lights on at 06:00 h), with access to standard laboratory diet and water ad libitum. Animals were habituated to laboratory conditions for at least 1 h before testing, and all experiments were performed during the light phase of the cycle. The animals were randomly distributed between the experimental groups (5-10 animals per group), and all experiments reported in this study were carried out in accordance with current guidelines for the care of laboratory and ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals (Zimmermann, 1983) and was approved by the Ethics Committee for Animal Research of Federal University of Santa Catarina (protocol number PP00745). The number of animals used and the intensity of the noxious stimuli were the minimum necessary to obtain reliable data.

## 2.5 Nociceptive tests

### *2.5.1 Post-operative pain model: mechanical and thermal*

#### *2.5.1.1 Plantar incision surgery*

The plantar incision surgery (PIS) was performed as previously described (Pogatzki and Raja, 2003). Briefly, mice were anesthetized with 1%–2% isoflurane delivered via a nose cone. After sterile preparation of the right hind paw, a 5mm longitudinal incision was made through skin and fascia of the plantar surface using a number 11 scalpel blade. The incision started 2mm from the proximal edge of the heel and extended toward the toes. The underlying muscle was elevated with curved forceps, leaving the muscle origin and insertion intact. After wound homeostasis, the skin was apposed with a 6.0mm nylon mattress suture, and the wound was covered with 10 % povidone–iodine solution. Sham mice were anesthetized but no incision was made. Animals were allowed to recover in their cages after surgery.

### *2.5.1.2 Mechanical hyperalgesia*

The mechanical hyperalgesia was measured as described previously (Bortalanza et al., 2002). Mice were acclimated in individual clear boxes (9x7x11 cm<sup>3</sup>) on an elevated wire mesh (6 mm) platform (70x40 cm) to allow access to the ventral surface of the hind paws. The right hind paw was stimulated with a constant pressure of 0.4g von Frey filaments (VFF) (Stoelting, Chicago, USA). The response frequency to 10 applications was taken as the nociceptive behavior. The results are expressed as the percentage of withdrawal response. The day before surgery, the animals were subjected for testing to characterize the baseline response. Only animals that showed a response rate around 20% were selected. In post-operative pain (24 hours after surgery) model we investigated the time-course of MECb (30–100 mg/kg, i.g.) antinociceptive effect and the animals were evaluated 1, 2, 3 and 4 hours after treatment. Control animals received a similar volume of vehicle (10 mL/kg, i.g.). To investigate the effects of long-term pretreatment with MECb (100 mg/kg, i.g.), the treatment was repeated for 6 consecutive days (days 1st– 6th) after PIS.

### *2.5.1.3 Thermal hyperalgesia*

To assess thermal hyperalgesia to cold and hot stimulus in mice, the Cold/Hot Plate Analgesia Meter (Columbus Instruments, USA) was used according to a minor modification of the method described by Bennett and Xie (1988). Mice were placed in clear plastic chambers (7x9x11 cm<sup>3</sup>) on an elevated surface. They were acclimatized to the environment for 1 hour before testing. To analyze cold thermal hyperalgesia mice were placed on the cold plate (10±1 °C) and to analyze heat thermal hyperalgesia mice were placed in the hot plate (48±1° C). Mice were pretreated with MECb (100 mg/kg, i.g.) or vehicle (10 mL/kg, i.g.) 1 hour before the tests. The nociception was evaluated by the right hind paw withdrawal latency. The cut-off latency for cold plate test was 120 seconds and for hot plate was 60 seconds. The nociceptive behavior was tested 24 hours (heat) and 48 hours (cold) after PIS.

### *2.5.2 Cytokines levels quantification*



These measurements were made in a post-operative model, but in another set of experiment. The PIS model was performed as described above. 24 and 48 hours after surgery, animals received MECb (100 mg/kg, i.g.) or vehicle (10 mL/kg, i.g., control group) 1 h before von Frey test (using the same protocol above). Two hours after last MECb administration, mice were anesthetized with isoflurane and killed by decapitation and then the right paws plantar skins were removed. The skin and connective tissues of the plantar portion of the mice hind paws were removed and then subject to mechanical pulverization in liquid nitrogen using tissue pulverizers. The tissues were homogenized with a PBS solution containing Tween 20 (0.05%), 0.1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), 10 mM EDTA, 2 ng/mL aprotinin, and 0.1 mM benzemethonium chloride and centrifuged at 3000g for 10 min at 4 °C (Bobinski et al., 2011). The supernatant obtained was immediately stored at - 80° C and the total protein content were measured using the Bradford method. The levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL- 10 and NGF were determined using sample aliquots of 100  $\mu$ L and mouse cytokine ELISA kits according to the manufacturer's instructions. All results are expressed as pg/mg of protein.

### 2.5.3 Analysis of the Possible Mechanism of Action of MECb

#### *2.5.3.1 Nociception and paw oedema induced by capsaicin, cinnamaldehyde, menthol and acidified saline*

To verify whether TRPV1, TRPA1, TRPM8, and ASIC receptors are involved in the antinociceptive activity of MECb, we tested the effects of the later against nociceptive responses elicited by specific activators of each channel. In these tests, animals were pretreated with MECb (100 mg/kg, i.g.), vehicle (5 % ethanol in saline solution, 10 mL/kg, i.g., control group) or camphor (7.6 mg/kg, s.c., a TRPA1 antagonist) 0.5 (camphor) or 1 h before the algogenics injections, and 0.5 h before AMG 9810 (30 mg/kg, i.p., a TRPV1 antagonist), or amiloride (100 mg/kg, i.p., a ASIC antagonist). Then, following the pretreatments, mice received 20  $\mu$ L intraplantar (i.pl.) injection of either capsaicin (1.6  $\mu$ g/paw), cinnamaldehyde (10 nmol/paw) (Santos and Calixto, 1997), menthol (1.2  $\mu$ mol/paw) (Córdova et al., 2011) or acid saline (2% acetic acid in 0.9% saline, pH 5.0) (Meotti et al., 2010, with small changes) into the ventral surface of the right hind paw. Animals were placed

individually in an observation acrylic chamber and observed for 5 min (capsaicin and cinnamaldehyde), 15 min (acid saline) or 20 min (menthol). The amount of time spent licking/biting the injected paw was recorded and considered as indicative of nociception.

Additionally, the paw oedema measurements were made to capsaicin, cinnamaldehyde, and acid saline tests. The assessment of paw thickness was measured before and after injection of algogenic agents by using digital micrometer (MT-045B; Shangai Metal Great Tools Co., Shangai, China), and was expressed as the difference between paw thickness before and after algogenics challenge ( $\Delta$  in paw thickness, in millimeters).

#### *2.5.3.1.1 Combinatory antinociceptive effect: The administration of sub-effective dose of MECb and AMG 9810*

In another set of experiments, in order to evaluate the combinatory effect of MECb with AMG 9810, independent groups of animals received sub-effective doses of MECb (0.1 mg/kg, i.g.) and AMG 9810 (10 mg/kg, i.p.). One hour after the administration of MECb and 30 minutes after AMG 9810, the capsaicin test was carried out, as described previously.

The sub-effective dose of AMG 9810 was selected on the basis of a previous study from our laboratory.

#### *2.5.3.2 Nociception and paw oedema induced by PGE<sub>2</sub>, PMA and Forskolin (FSK)*

To evaluate the involvement of PGE<sub>2</sub>, PKC or PKA in the signaling pathway of MECb, animals received an intraplantar injection (20  $\mu$ L) containing a solution of PGE<sub>2</sub> (3 nmol/paw) (Kassuya et al., 2007), Phorbol Meristate Acetate (PMA) (500 pmol/paw, an activator of PKC) (Baggio et al., 2012) or FSK (50 nmol/paw) (data from our group) in the right hind paw. The animals were pretreated with MECb (100 mg/Kg, i.g.) or vehicle (5 % ethanol in saline solution, 10 mL/kg, i.g., control group) 1 h before PGE<sub>2</sub>, PMA or FSK injection. Animals were placed individually in an observation acrylic chamber and observed for 15 min (PGE<sub>2</sub>), 15–45 min (PMA) or 10 min (FSK). The amount of time spent licking/biting the injected paw was measured with a chronometer and considered as indicative of nociceptive behavior. The

protocol to paw oedema measurements was the same accomplished in TRP/ASIC models.

#### *2.5.3.2.1 Effect of MECb on PKA activation indirectly by stimulated FSK: protein expression*

After received MECb (100 mg/kg, i.g.) or Forskolin (50 nmol/paw) or vehicle (10 mL/kg, i.g.), the skin and connective tissues of the plantar portion of the mice hind paws were removed and then subject to mechanical pulverization in liquid nitrogen using tissue pulverizers. The disruption of tissue was performed in an ice-cold RIPA assay buffer containing protease and phosphatase inhibitors (100 mM Tris-HCl- pH 7.4; 2 mM EDTA; 2 µg aprotinin; 0.1 mM PMSF, 200 mM NaF and 2 mM of sodium orthovanadate; Cell signaling technology, USA). Then, the homogenate was centrifuged at 10.000 Xg for 15 min at 4 °C, the pellet was discarded and the supernatant was collected as a protein-rich fraction. The protein concentration was determined using the Bradford method (Sigma-Aldrich, USA). Equivalent amounts of proteins (40 µg per sample) were aliquotted in Laemmli buffer (Tris 200 mM, glycerol 10%, SDS 2%, β-mercaptoethanol 2.75 mM and bromophenol blue 0.04%) and boiled for 5 min. Aliquots were stored at -80 °C until required.

Western blot analysis was carried out adapted by Leal et al (2002) and Andre et al (2004). Proteins were resolved in sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel by electrophoresis (SDS-PAGE) at 12% for α-Tubulin (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, CA) and for Protein kinase A (PKA) phosphorylated (Thr198; 1: 1000; Santa Cruz Biotechnology, CA). After, the proteins were transferred on to nitrocellulose membranes, using 400 mA current (2 hours at 4°C) and equal protein loading was verified by Ponceau S staining, according to the manufacturer's instructions (Amersham, GE Healthcare, UK). Membranes were saturated by 2 h incubation with bovine serum albumin (BSA-5%) solution and then incubated overnight with the respective above cited antibodies at 4°C. After washed with TBS-T buffer (Tris 2 mM; NaCl 1 M; Tween-20 0.2% - pH 7.4) the membranes were incubated at room temperature with their respective adjusted secondary antibody (goat anti-mouse and goat anti-rabbit, respectively - 1:5000- Santa Cruz Biotechnology, CA) for 2 h at room temperature.

Band quantification was performed according to Motta et al (2015), using the image processing and analysis software Image J (available at <http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

### 2.5.3.3 *Involvement of Capsaicin-Sensitive Fibers*

To explore the role of capsaicin-sensitive fibers in the antinociceptive effect of MECb, adult mice were anesthetized with isoflurane 1-2 % and treated i.t. with capsaicin (10 $\mu$ g/5 $\mu$ L). The antinociceptive effect caused by MECb (100 mg/kg, i.g.), against the nociceptive response induced by von Frey hair in a model of postoperative pain, was analyzed after the capsaicin or vehicle treatment. The efficiency of the treatment of mice with capsaicin was confirmed by paw withdrawal latency in the hot plate test (50 °C, cut-off 60 s) (Cavanaugh et al., 2009).

## 2.6 Toxicological analysis

To verify if MECb (100 - 300mg/kg, i.g.) repeated treatment for 30 days induces any biochemical or physiological alteration, 15 h after the last administration the animals (male and female, n=5 per group) were anesthetized with isoflurane. Control group received vehicle (10 mL/kg, i.g.). After that blood samples were obtained from retro-orbital sinus to hemogram and biochemical analysis and were collected the following organs: liver, kidney, lung, spleen, heart, mesenteric lymphnodes, thymus, and right adrenal and salivary gland, uterus, ovary and testicle. The biochemical analyses made were: ALT, AST, GGT, urea, creatinine, uric acid, total, HDL and LDL cholesterol, triglycerides and glycemia. The Lab Test Kit was used to biochemical analyses and LDL was made using Friedwald method. In addition, the organs and body weight, food and water intake were measured and compared. The percentage of weight of the organs in relationship to body weight was calculated.

## 2.7 Statistical analysis

Results are presented as the mean  $\pm$  SEM of 5-10 mice per group. Statistical analysis of the results was carried out by using a one-way ANOVA followed, when required, by the Student-Newman-Keuls test for multiple comparisons or two-way ANOVA followed by the Bonferroni test for multiple comparisons. In all cases,

differences were considered significant when  $P < 0.05$ . Statistical parameters were computed using Graph Pad Prism statistical software (Graph Pad Software 5.1, Inc.).

### 3 Results

#### 3.1 Prolonged MECb administration reduces mechanical and thermal hyperalgesia after hind paw incision

##### 3.1.1 Mechanical hyperalgesia

The results obtained with mechanical hyperalgesia after PIS are given in Figure 1. These results show that MECb (30-100 mg/kg, i.g.) caused a significant inhibition of plantar incision-induced hyperalgesia (frequency of response) at dose of 100 mg/kg as compared to the vehicle-treated group. The effect was maintained by 3 hours after the treatment and the maximum inhibition was achieved at first hour ( $70 \pm 2$  %, Figure 1A). When prolonged administration (once a day) for 6 day, MECb (100mg/kg, i.g.) significantly reduced the mechanical hyperalgesia caused by plantar incision until the fifth day (when the control group show a recovery of the pain statement) (maximum inhibition at the second day,  $79 \pm 4$  %, Figure 1B).

##### 3.1.2 Thermal hyperalgesia

The plantar incision surgery induced a decreased of the paw withdrawal latency during a thermal stimulus (heat and cold) in comparison to non-injured mice (Figure 1C and 1D, respectively). Intra-gastric pretreatment with MECb (100 mg/kg) reduced only the heat thermal hyperalgesia induced by the incision. Furthermore, the latency to paw withdrawal was increased  $97 \pm 1$  % for the heat assessment.

#### 3.2 Effect of MECb on levels of pro- (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) and anti-inflammatory (IL- 10) cytokines, and neurotrophin (NGF) in the skin of the hind paw in the PIS model

PIS significantly increased levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and NGF, but decrease levels of IL- 10 in the skin of the hind paw (Figure 2A, B, C and D) when compared with the sham group (animals that not suffer PIS). Treatment with MECb (100 mg/kg,

i.g.) significantly reduced the levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and NGF, inhibitions of 57 $\pm$ 9%, 47 $\pm$ 5% and 46 $\pm$ 4%, respectively, but not increased the levels of IL- 10 when compared with the control group (see figure 2).

### 3.3 MECb reduces nociception and paw oedema induced by capsaicin and acidified saline, but not alters the responses activated by cinnamaldehyde and menthol

The results present in Figure 3 show the effect of MECb in capsaicin, cinnamaldehyde, menthol and acidified saline tests. The data show that MECb (100 mg/kg, i.g.) significantly reduced the nociception and paw oedema induced by i.pl. injection of capsaicin (55  $\pm$  2% and 19  $\pm$  6 %, respectively) (Figure 3A and 3B) compared to control. The same was observed with AMG 9810, a selective antagonist of TRPV1 receptor, which decreased the nociceptive response (22  $\pm$  9 %) and paw oedema (51  $\pm$  4 %) (see figure 3). In the cinnamaldehyde test, MECb (100 mg/kg, i.g.) did not reverse the nociception (Figure 3C) and the paw oedema (Figure 3D). The positive control, camphor, used in the cinnamaldehyde test, was able to significantly reduce the nociceptive response (48  $\pm$  6 %), but not paw oedema, as compared to control group (see figure 3). To the menthol test, MECb (100 mg/kg, i.g.) does not decreased the cold response induced by menthol (Figure 3E), compared to control group. Finally, in regard to acidified saline, the data show that MECb (100 mg/kg, i.g.) decreased the nociception and paw oedema induced by acidified saline, with inhibitions of 61  $\pm$  2 % and 23  $\pm$  4 %, respectively) (Figure 3F and 3G) when compared to control group. The positive control amiloride was able to significantly reduce the time that animals spent licking/biting the injected paw and paw oedema, with inhibitions of (78  $\pm$  1 % and 34  $\pm$  8 %, respectively, as compared control group (see figure 3).

#### 3.3.1 A sub-effective dose of MECb and AMG 9810 presents antinociceptive effects

A combinatory antinociceptive effect was observed when mice received the administration of sub-effective doses of MECb and AMG 9810 when compared to control group (Figure 4). The results showed a reduction in 35  $\pm$  9 % on the group that received sub-effective doses of MECb and TRPV1 antagonist.

### 3.4 MECb reduces nociception and paw oedema induced by PGE<sub>2</sub>, PMA and FSK

The data show that MECb (100 mg/kg, i.g.) decreased the nociception induced by PGE<sub>2</sub> ( $36 \pm 5$  %) and PMA ( $54 \pm 7$  %) (Figure 5A) compared to control. MECb was also able to reduce paw oedema induced by PGE<sub>2</sub> and PMA ( $10 \pm 2$  % and  $40 \pm 6$  %, respectively) (Figure 5B). The results shown in Figure 5C demonstrate that forskolin induced nociceptive behavior of licking the injected paw, was reduced in  $42 \pm 7$ % by pretreatment with MECb (100 mg/kg, i.g.), compared to control group.

#### 3.4.1 Western Blot Analysis of Protein Kinase A

Western blot analysis was performed to investigate the possible participation of PKA pathway on the antinociceptive effect of MECb. Injection of forskolin increased the phosphorylation of PKA compared with control group. In contrast, MECb (100mg/kg) pretreatment significantly reduced ( $53 \pm 1$ %) the phosphorylation of PKA induced by forskolin compared with the vehicle-pretreated group (Figure 6).

### 3.5 Involvement of Capsaicin-Sensitive Fibers

Before the pretreatment with MECb, animals were tested in hot plate ( $50^{\circ} \text{C}$ ) test to assess whether the desensitization was succeeded. Capsaicin-treated group showed increase in latency for nociceptive behavior to heat when compared to control group (Figure 7A) (vehicle-treated group  $18.25 \pm 0.99$  s, whereas the capsaicin-treated group  $28.88 \pm 1.12$  s). However, capsaicin-treatment does not change the mechanical hyperalgesia induced by PIS when compared with vehicle-treatment group (Figure 7B). Further, treatment with capsaicin did not influence the antinociceptive effect of MECb (100mg/kg) when compared with the vehicle treatment, with inhibition of  $76 \pm 6$ % and  $68 \pm 8$ % respectively.

### 3.6 Long-term treatment with MECb presents any toxicity

After 30 days of treatment with MECb, animals did not present any alteration in its body and organ weight, food and water intake (Table 1) as well as blood parameters analyzed when compared with vehicle-treated animals and between the

different doses tested (Table 2). So, the results indicate that MECb do not cause mortality or produce any remarkable haematological, biochemical and body and organs weight adverse effects in chronic toxicity studies in mice.

#### 4 Discussion

The present study confirms and extends previous data (Simões et al., 2015, Journal of ethnopharmacology), evidencing its antinociceptive effects, where methanolic extract crude of *Condalia buxifolia* (MECb) inhibited nociception caused by acetic acid and by intraplantar injection of formalin and glutamate, and increase the withdrawal latency of paw in hot plate test. These findings demonstrated that systemic (i.g.) administration of MECb elicits an inhibition of the nociceptive behavioural response in animal models of acute pain.

Neurotransmitters released by noxious stimuli may contribute to the enhanced excitability following surgical injury. Postoperative pain remains a major challenge to treatment following surgical procedures (Apfelbaum et al., 2003), and frequently pain management strategies often require the use of opioids, which have a multitude of adverse side effects including nausea, constipation, tolerance and addiction (Apfelbaum et al., 2003; Guignard et al., 2000). It is demonstrated that, in the peripheral tissues, neutrophils (Carreira et al., 2013), acidosis (Woo et al., 2004), nerve growth factor (NGF) (Spofford and Brennan, 2012), cytokines (IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ ) (Carvalho et al., 2012; Spofford and Brennan, 2012), EP<sub>1</sub>, B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub>, P2X, TRPV1, and ASIC3 receptors, nitric oxide (NO) synthase, lipoxygenase (Omote et al., 2001, Füredi et al., 2010, Deval et al., 2011) and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) (Miura et al., 2011) could contribute to postoperative pain.

Inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ) are increased in inflammatory pain models and produce peripheral and central sensitization and hyperalgesia (Watkins and Maier, 2002; Kraychete et al., 2006; Albertini et al., 2008). These cytokines have the ability to stimulate nociceptors, through their specific receptors, increasing nociceptive response. IL-1 $\beta$  has been shown to be increased in the spinal cord dorsal horn (Fu et al., 2006), in peri-incisional tissues (Buvanendran et al., 2006; Liang et al., 2008) and serum (Carvalho et al., 2008) of postoperative patients. IL-1 $\beta$  may cause hyperalgesia through the expression or release of pronociceptive compounds such as substance P (Skoff et al., 2009), prostaglandins, and NGF (Safieh-Garabedian et al., 1995). In contrast, IL-10 is an anti-inflammatory cytokine that is



increased in surgical wound exudates (Carvalho et al., 2008; Martin et al., 2008). Our results showed an increase of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and NGF after post-operative model and a decrease the levels of these cytokines, according to the literature; however, the levels of IL-10 was not altered by incision or treatment. Thus, we can suggest that the antinociceptive effect of MECb in inflammatory postoperative pain model is due to decreased production or release of pro-inflammatory cytokines and neurotrophin, and possibly another anti-inflammatory cytokine is involved.

Another interesting data of the present study is the demonstration, for the first time, that prolonged treatment of mice with MECb was able to reduce mechanical and thermal (heat) hyperalgesia in a mouse postoperative pain model. Studies have demonstrated that A $\delta$  and C fibers afferents innervating glabrous skin are sensitizes to mechanical and heat stimuli after skin incision (Banik and Brennan, 2009; Kang and Brennan, 2010), and these fibers present many receptors in their surface, as TRPs. The TRP, especially TRPV1 and TRPA1, ion channels are highly involved in the transduction and sensitization in primary afferent somatosensory neurons. It has been suggested that TRPV1 is important for generation of thermal (heat) (Pogatzki-Zahn et al., 2005; Barabas and Stucky, 2013) and TRPA1 in mechanical and cold hyperalgesia (Kobayashi et al., 2005; Ji et al., 2008; Caspani et al., 2009; McGaraughty et al., 2010) after skin incision. However, recent study showed that mechanical hyperalgesia is TRPA1 independent (Barabas and Stucky, 2013). Moreover, cold responses are binding to TRPA1 and TRPM8 receptors.

In our study, we performed a menthol test (a TRPM8 activator), which showed that MECb was not able to reduce the nociceptive response in menthol model. Some studies indicated that menthol (an active ingredient of peppermint) could lead to membrane depolarization and action potential firing on a subpopulation of primary afferent neurons through TRPM8 receptor activation (Okazawa et al., 2000; McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002). We also found that MECb inhibits the nociceptive response and paw oedema induced by i.pl. injection of capsaicin and acidified saline, but did not inhibit the response caused by cinnamaldehyde. Importantly, the nociceptive responses elicited by capsaicin, acidified saline, and cinnamaldehyde were inhibited by prior treatment with AMG 9810, amiloride, and camphor, blockers of TRPV1, ASIC, and TRPA1 channels, respectively, and are in agreement with other studies from literature (Córdova et al., 2011; Montrucchio et al., 2013).

TRPV1 presents several functions as a polymodal noxious receptor at peripheral nerve terminals (Premkumar and Abooj, 2013). Our results show that MECb prevented this action, most likely by reversing the capsaicin-induced activation of TRPV1, which in turn reduces the neurogenic inflammation, contributing to reduction of paw oedema, and the glutamate release (as showed in previous data), favoring to modulation of nociceptive transmission at spinal levels. Thus, the results from this study indicate the inhibition of TRPV1 receptors as a possible target of MECb.

ASICs ion channels are activated by protons and, especially ASIC3, have an important role in inflammatory pain (Deval et al., 2010), with their expression and activity potentiated by several pain mediators present in the inflammatory site (especially neural growth factor (NGF), serotonin, interleukin-1 $\beta$ , and bradykinin) (Voilley et al., 2001; Mamet et al., 2002), contributing to maintenance of the painful process. Some evidence suggests that ASIC and TRPV1 have complementary roles in the proton sensitivity of sensory neurons (Baggio et al., 2012). Thus, the development of blockers of these ion channels may be of clinical interest for the control of pain and inflammatory states. In this study, it was demonstrated that MECb inhibits the nociceptive response and paw oedema induced by local administration of acidified saline. Thus, this result confirms those from the capsaicin-induced nociception model and suggests that inhibition of ASICs is another possible target of MECb.

Additionally, MECb does not inhibit the nociceptive response and paw oedema caused by cinnamaldehyde. These results indicate that, although MECb presented an antinociceptive effect in the formalin test (since formalin activates the primary afferent sensory neurons through of the action on TRPA1) (Macpherson et al., 2007), this effect is not related to TRPA1 but to some pro-inflammatory mediators released in a formalin-triggered pathway, such as glutamate, PGE<sub>2</sub>, histamine and serotonin (Murray et al., 1988; Rujjanawate et al., 2003; Almeida et al., 2013; Rios et al., 2013). This finding, associated with data from cold plate and menthol, suggests that MECb is not involved in nociceptive responses to cold stimulation.

To go further, we performed another set of experiment in which was ablated TRPV1-positive fibers through of desensitization of the C fibers by intrathecal injection of capsaicin and evaluated the animals in hot plate (to confirm the desensitization) and von Frey hair (to evaluate mechanical hyperalgesia) after skin incision injury.

Our results showed that desensitization with capsaicin increased the latency in hot plate evidencing the important role of TRPV1 in heat hyperalgesia. In the same experiment, animals do not show alteration in mechanical response, which demonstrate mechanical hyperalgesia as TRPV1-independent. This result is in agreement with those from Cavanaugh et al (2009) and Uchytlova et al (2014), that showed ablation of TRPV1-positive fibers, and the use of TRPV1 antagonists, do not alter mechanical response, respectively; however, Cavanaugh et al (2009) evidencing that ablation of Mrgprd fibers abolished mechanical responses, but not in heat and cold. Moreover, in our study, animals desensitized that received MECb maintained decrease of response in von Frey hair test, possible trough of MECb interaction with some other mechanisms involved in mechanical hyperalgesia, as PGE<sub>2</sub> signaling, via EP1 receptor (Omote et al., 2002), together with p38 MAPK (Wen et al., 2009) and BDNF upregulation (Li et al., 2008). Thus, our results indicate that targeting TRPV1 receptors may have an analgesic effect in cases of post-surgical pain.

Thus, the next step in this work was to evaluate the possible involvement of the major inflammatory mediators released an inflammatory process, PGE<sub>2</sub>, which is known to play a critical role in the generation and maintenance of the nociceptive response, through EP receptors (Samad et al., 2002). PGE<sub>2</sub> have an important role in nociception by sensitization of TRPV1 through the PGE<sub>2</sub>/EP1/PKC and PGE<sub>2</sub>/EP4/PKA cascades (Kassuya et al., 2007; Zeilhofer, 2007; Kawabata, 2011). Moreover, it was demonstrated that paw oedema PGE<sub>2</sub>-induced is involved with PKC, SP and TRPV1 interactions, but not PKA (Claudino et al., 2006). Therefore, the blockade of PGE<sub>2</sub> receptors seems to be another approach for the development of analgesics and anti-inflammatory drugs or alternative therapies, as medicinal plants. In our study, it was demonstrated that MECb inhibits the nociceptive response and paw oedema induced by local administration of PGE<sub>2</sub>. Thus, these results suggest that inhibition of PGE<sub>2</sub> is also involved in the antinociceptive and antiedematogenic effect of MECb. From these results, we hypothesized whether the action of MECb could be related with the inhibition of PKA/PKC signaling.

In this study, MECb decreased the pain behaviours caused by i.pl. administration of both PMA (a PKC activator) and forskolin (FSK- an indirect activator of PKA), and decreased the paw oedema induced by PMA. Given the extensive evidence implicating PKC and PKA in signaling mechanisms leading to nociception and

hyperalgesia we hypothesized that this fact could constitute a potentially relevant target for the antinociceptive action of MECb. Therefore, the ability of MECb to inhibit PMA-, FSK- and PGE<sub>2</sub>-induced hypersensitivity in the mouse paw is closely related to inhibition of PKC and PKA pathway.

The levels of cAMP are increased by the activation of adenylate cyclase (AC), that can be activate by FSK, and high levels of cAMP is associated with activation of PKA (Tasken and Aandahl, 2004). Thus, the detection of PKA phosphorylation is useful evidence for PKA activation. Studies in cultured DRG neurons have shown that PKA potentiates heat, proton, capsaicin, and pro-inflammatory substance responses (Bhave et al., 2002; Mohapatra and Nau 2005; Vellani et al., 2008). Capsaicin and some other pain mediators stimulate PKA to induce phosphorylation of TRPV1 (Lee et al., 2012) which contains phosphorylation site in its amino acid sequence (at Ser116) for PKA (De Petrocellis et al., 2001; Bhave et al., 2002; Rathee et al., 2002). Thereby, to further confirm the role played by PKA in mechanism of MECb action, we carried out western blot analysis on samples of the FSK-injected paws. It has been reported previously that autophosphorylation of the PKA regulatory subunit occurs when PKA is activated by cAMP.

Our results showed that phosphorylation of PKA was decreased with pretreatment with MECb, suggesting an inhibitory role of MECb in this cascade of signaling. Thereby, as PKA is able to sensitize other molecules, as TRPV1 receptor, which once inhibited, could its activation be decreased, being this effect another contributor to antinociceptive property of MECb.

Additionally, the hypothesis of the involvement of TRPV1 receptors in MECb mechanism of action was reinforced with the synergistic antinociceptive effect observed by the administration of sub-effective dose of AMG 9810 and MECb. Despite the fact that precise mechanism involved in the synergistic effects observed in this study are not completely understood at this time, the results obtained with administration of MECb and AMG 9810, suggest *Condalia buxifolia* could be helpful in the treatment of pain states.

Finally, we showed that repeated treatment with *Condalia buxifolia* presents any toxicity, which indicate good safety and efficacy.

Collectively, these findings confirm and largely extend results from literature by giving new insights about the complex antinociceptive profile of *Condalia buxifolia*. In

addition to known antinociceptive mechanisms previously demonstrated, *Condalia buxifolia* appears modulate the activation of nociceptors by PGE<sub>2</sub>, TRPs and ASIC agonist (i.e. capsaicin and acidified saline), and probably could prevent the sensitization process in peripheral nociceptors through inhibition of PKC/PKA signaling pathways. Furthermore, *Condalia buxifolia* showed a significant effect in a model that mimics an important clinical condition of pain. Together, it is reasonable to propose that *Condalia buxifolia* might be of potential interest in the development of new clinically relevant drugs for the management of pain, besides also provides chronic toxicity data to corroborate clinical use of this plant.

Conflict of interest

None.

## 5 References

- Albertini, R., Villaverde, A.B., Aimbire, F., Bjordal, J., Brugnera, A., Mittmann, J., Silva, J.A., Costa, M., 2008. Cytokine mRNA expression is decreased in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low-level laser therapy. *Photomedicine and Laser Surgery* 26, 19–24.
- Almeida, J.R., Souza, G.R., Silva, J.C., Saraiva, S.R., Júnior, R.G., Quintans, J. de S., Barreto, R. de S., Bonjardim, L.R., Cavalcanti, S.C., Quintans, L.J. Jr., 2013. Borneol, a bicyclic monoterpene alcohol, reduces nociceptive behavior and inflammatory response in mice. *The Scientific World Journal* 18, 1-5.
- Andre, E., Ferreira, J., Malheiros, A., Yunes, R.A., Calixto, J.B., 2004. Evidence for the involvement of vanilloid receptor in the antinociception produced by the dialdehydes unsaturated sesquiterpenes polygodial and drimaniol in rats. *Neuropharmacology* 46, 590-597.
- Apfelbaum, J.L., Chen, C., Mehta, S.S., Gan, T.J., 2003. Postoperative pain experience: results from a national survey suggest postoperative pain continues to be undermanaged. *Anesthesia and Analgesia* 97, 534–540.
- Baggio, C.H., Freitas, C.S., Marcon, R., Werner, M.F., Rae, G.A., Smiderle, F.R., Sasaki, G.L., Iacomini, M., Marques, M.C., Santos, A.R., 2012. Antinociception of b-D-glucan from *Pleurotus pulmonarius* is possibly related to protein kinase C inhibition. *International Journal of Biological Macromolecules* 50, 872–877.
- Banik, R.K., Brennan, T.J. 2009. Trpv1 mediates spontaneous firing and heat sensitization of cutaneous primary afferents after plantar incision. *Pain* 141, 41–51.
- Barabas, M.E., Stucky, C.L., 2013. TRPV1, but not TRPA1, in primary sensory neurons contributes to cutaneous incision mediated hypersensitivity. *Molecular Pain* 2, 1-14.
- Basbaum, A.I., Jessell, T. 2000. Principles of Neuroscience, in: Kandel, E.R., Schwartz, J., Jessell, T. (Eds), *The perception of pain*. New York: Appleton and Lange, pp. 472–91.
- Bastos, N.R., 1989. A família Rhamnaceae R. Br. no Rio Grande do Sul. Gêneros *Condalia* Cav. e *Scutia* Comm. *Pesquisa Botânica*, v. 40, p.69–84.
- Bennett, G.J., Xie, Y.K., 1988. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33, 87–107.
- Bernik, T.R., Friedman, S.G., Ochani, M., DiRaimo, R., Ulloa, L., Yang, H., Sudan, S., Czura, C.J., Ivanova, S.M., Tracey, K.J., 2002. Pharmacological stimulation of the cholinergic antiinflammatory pathway. *The Journal of Experimental Medicine* 195, 781-788.
- Bhave, G., Hu, H.J., Glauner, K.S., Zhu, W., Wang, H., Brasier, D.J., Oxford, G.S., Gereau, R.W.T., 2003. Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not

activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 100, 12480–12485.

Bhave, G., Zhu, W., Wang, H., Brasier, D.J., Oxford, G.S., Gereau, R.W.T., 2002. cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation. *Neuron* 35, 721–731.

Bobinski, F., Martins, D.F., Bratti, T., Mazzardo-Martins, L., Winkelmann-Duarte, E.C., Guglielmo, L.G.A., Santos, A.R.S., 2011. Neuroprotective and neurodegenerative effects of low intensity aerobic exercise on sciatic nerve crush injury in mice. *Neuroscience* 194, 337-348.

Bortalanza, L.B., Ferreira, J., Hess, S.C., Delle Monache, F., Yunes, R.A., Calixto, J.B., 2002. Anti-allodynic action of the tormentic acid, a triterpene isolated from plant, against neuropathic and inflammatory persistent pain in mice. *European Journal of Pharmacology* 25, 203–208.

Buvanendran, A., Kroin, J.S., Berger, R.A., Hallab, N.J., Saha, C., Negrescu, C., Moric, M., Caicedo, M.S., Tuman, K.J., 2006. Upregulation of prostaglandin E2 and interleukins in the central nervous system and peripheral tissue during and after surgery in humans. *Anesthesiology* 104, 403–10.

Carreira, E.U., Carregaro, V., Teixeira, M.M., Moriconi, A., Aramini, A., Verri, W.A. Jr, Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., Cunha, T.M., 2013. Neutrophils recruited by CXCR1/2 signalling mediate post-incisional pain. *European Journal of Pain*, 17, 654-663.

Carvalho, B., Clark, D.J., Angst, M.S., 2008. Local and systemic release of cytokines, nerve growth factor, prostaglandin E2, and substance P in incisional wounds and serum following cesarean delivery. *The Journal of Pain* 9, 650–7.

Carvalho, B., Clark, D.J., Yeomans, D., Angst, M.S., 2012. Collecting and measuring wound exudate biochemical mediators in surgical wounds. *Journal of visualized experiment* 68, 1-5.

Caspani, O., Zurborg, S., Labuz, D., Heppenstall, P.A., 2009. The contribution of TRPM8 and TRPA1 channels to cold allodynia and neuropathic pain. *PLoS One* 4, e7383.

Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., Julius, D., 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389, 816–824.

Cavanaugh, D.J., Lee, H., Lo, L., Shields, S.D., Zylka, M.J., Basbaum, A.I., Anderson, D.J., 2009. Distinct subsets of unmyelinated primary sensory fibers mediate behavioral responses to noxious thermal and mechanical stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 106, 9075-9080.

Claudino, R.F., Kassuya, C.A.L., Ferreira, J., Calixto, J.B., 2006. Pharmacological and Molecular Characterization of the Mechanisms Involved in Prostaglandin E<sub>2</sub>-

Induced Mouse Paw Edema. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 318, 611-618.

Coderre, T.J., Katz, J., Vaccarino, A.L., Melzack, R., 1993. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. *Pain* 52, 259-285.

Córdova, M.M., Werner, M.F., Silva, M.D., Ruani, A.P., Pizzolatti, M.G., Santos, A.R., 2011. Further antinociceptive effects of myricitrin in chemical models of overt nociception in mice. *Neuroscience Letters* 495, 173-177.

De Petrocellis, L., Harrison, S., Bisogno, T., Tognetto, M., Brandi, I., Smith, G.D., Creminon, C., Davis, J.B., Geppetti, P., Di Marzo, V. 2001. The vanilloid receptor (VR1)-mediated effects of anandamide are potently enhanced by the cAMP-dependent protein kinase. *Journal of Neurochemistry* 77, 1660–1663.

Deval, E., Gasull, X., Noël, J., Salinas, M., Baron, A., Diochot, S., Lingueglia, E., 2010. Acid sensing ion channels (ASICs): pharmacology and implication in pain. *Pharmacology and Therapeutics* 128, 549–558.

Deval, E., Noël, J., Gasull, X., Delaunay, A., Alloui, A., Friend, V., Eschalier, A., Lazdunski, M., Lingueglia, E., Acid-sensing ion channels in postoperative pain. *Journal of Neuroscience* 31, 6059-66.

Fu, D., Guo, Q., Ai, Y., Cai, H., Yan, J., Dai, R., 2006. Glial activation and segmental upregulation of interleukin-1 $\beta$  in the rat spinal cord after surgical incision. *Neurochemical Research* 31, 333–40.

Füredi, R., Bölcskei, K., Szolcsányi, J., Petho, G., 2010. Comparison of the peripheral mediator background of heat injury- and plantar incision-induced drop of the noxious heat threshold in the rat. *Life Science* 86, 244-50.

Guignard, B., Bossard, A.E., Coste, C., Sessler, D.I., Lebrault, C., Alfonsi, P., Fletcher, D., Chauvin, M., 2000. Acute opioid tolerance: intraoperative remifentanyl increases postoperative pain and morphine requirement. *Anesthesiology* 93, 409-417.

Gunthorpe, M.J., Harries, M.H., Prinjha, R.K., Davis, J.B., Randall, A., 2000. Voltage- and time-dependent properties of the recombinant rat vanilloid receptor (rVR1) *Journal of Physiology* 525(Pt 3), 747–759.

Hains, B.C., Waxman, S.G., 2006. Activated microglia contribute to the maintenance of chronic pain after spinal cord injury. *Journal of Neuroscience* 26, 4308-4317.

Ji, G., Zhou, S., Carlton, S.M., 2008. Intact A $\delta$ -fibers up-regulate transient receptor potential A1 and contribute to cold hypersensitivity in neuropathic rats. *Neuroscience* 154, 1054–1066.

Johnston, M.C., Soares, F., M., A. 1972. *Flora ilustrada Catarinense RAMN*. p. 1-50.



Julius, D., Basbaum, A.I., 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413, 203-210.

Kang, S., Wu, C., Banik, R.K., Brennan, T.J. 2010. Effect of capsaicin treatment on nociceptors in rat glabrous skin one day after plantar incision. *Pain* 148, 128–140.

Kassuya, C.A., Ferreira, J., Claudino, R.F., Calixto, J.B., 2007. Intraplantar PGE<sub>2</sub> causes nociceptive behaviour and mechanical allodynia: the role of prostanoid E receptors and protein kinases. *British Journal of Pharmacology* 150, 727–737.

Kawabata, A., 2011. Prostaglandin E<sub>2</sub> and Pain- An Update. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 34, 1170-1173.

Kehlet, H., Jensen, T.S., Woolf, C.J., 2006. Persistent postsurgical pain: risk factors and prevention. *Lancet* 367(9522), 1618-1625.

Kobayashi, K., Fukuoka, T., Obata, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Tokunaga, A., Noguchi, K., 2005. Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with adelta/c-fibers and colocalization with trk receptors. *The Journal of Comparative Neurology* 493, 596–606.

Kraychete, D.C., Calasans, M.T.A., Valente, C.M.L., 2006. Citocinas pró-inflamatórias e dor. *Revista Brasileira de Reumatologia* 46, 199–206.

Leal, R.B., Cordova, F.M., Herd, L., Bobrovskaya, L., Dunkley, P.R., 2002. Lead-stimulated p38 MAPK-dependent Hsp27 phosphorylation. *Toxicology and Applied Pharmacology* 178, 44-5.

Levine, J.D., Alessandri-Haber, N., 2007. TRP channels: targets for the relief of pain. *Biochimica et Biophysica Acta* 1772, 989–1003.

Li, M.M., Yu, Y. Q., Fu, H., Xie, F., Xu, L. X., Chen, J., 2008. Extracellular signal-regulated kinases mediate melittin-induced hypersensitivity of spinal neurons to chemical and thermal but not mechanical stimuli. *Brain Research Bulletin* 77, 227-232.

Liang, D., Shi, X., Qiao, Y., Angst, M.S., Yeomans, D.C., Clark, J.D., 2008. Chronic morphine administration enhances nociceptive sensitivity and local cytokine production after incision. *Molecular Pain* 4: 7.

Macpherson, L.J., Xiao, B., Kwan, K.Y., Petrus, M.J., Dubin, A.E., Hwang, S., Cravatt, B., Corey, D.P., Patapoutian, A., 2007. An ion channel essential for sensing chemical damage. *The Journal of Neuroscience* 27, 11412-5.

Mamet, J., Baron, A., Lazdunski, M., Voilley, N., 2002. Proinflammatory mediators, stimulators of sensory neuron excitability via the expression of acid-sensing ion channels. *The Journal of Neuroscience* 22, 10662–10670.

Martin, F., Martinez, V., Mazoit, J.X., Bouhassira, D., Cherif, K., Gentili, M.E., Piriou, P., Chauvin, M., Fletcher, D., 2008. Antiinflammatory effect of peripheral nerve blocks after knee surgery: Clinical and biologic evaluation. *Anesthesiology* 109, 484–90.

McGaraughty, S., Chu, K.L., Perner, R.J., Didomenico, S., Kort, M.E., Kym, P.R., 2010. TRPA1 modulation of spontaneous and mechanically evoked firing of spinal neurons in uninjured, osteoarthritic, and inflamed rats. *Molecular Pain* 6,14.

McKemy, D.D., Neuhausser, W.M., Julius, D., 2002. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416, 52-8.

Miura, M., Sasaki, M., Mizukoshi, K., Shibasaki, M., Izumi, Y., Shimosato, G, Amaya F., 2011. Peripheral sensitization caused by insulin-like growth factor 1 contributes to pain hypersensitivity after tissue injury. *Pain* 152, 888-95.

Mohapatra, D.P., Nau, C., 2005. Regulation of Ca<sup>2+</sup>-dependent desensitization in the vanilloid receptor TRPV1 by calcineurin and cAMP-dependent protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 280, 13424–13432.

Montrucchio, D.P., Córdova, M.M., Santos, A.R.S., 2013. Plant Derived Aporphinic Alkaloid S-(+)-Dicentrine Induces Antinociceptive Effect in Both Acute and Chronic Inflammatory Pain Models: Evidence for a Role of TRPA1 Channels. *Plos One* 8, e67730.

Motta, K., Barbosa, A.M., Bobinski, F., Boschero, A.C., Rafacho, A., 2015. JNK and IKKb phosphorylation is reduced by glucocorticoids in adipose tissue from insulin-resistant rats. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 145, 1–12

Munro, G., Hansen, R., Erichsen, H., Timmermann, D., Christensen, J., Hansen, H., 2012. The alpha7 nicotinic ACh receptor agonist compound B and positive allosteric modulator PNU-120596 both alleviate inflammatory hyperalgesia and cytokine release in the rat. *British Journal of Pharmacology* 167, 421-435.

Murray, C.W., Porreca, F., Cowan, A., 1988. Methodological refinements to the mouse paw formalin test. An animal model of tonic pain. *Journal of Pharmacological Methods* 20, 175–186.

Okazawa, M., Terauchi, T., Shiraki, T., Matsumura, K., Kobayashi, S., 2000. I-Menthol-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increase and impulses in cultured sensory neurons. *Neuroreport* 11, 2151-5.

Omote, K., Kawamata, T., Nakayama, Y., Kawamata, M., Hazama, K., Namiki, A., 2001. The effects of peripheral administration of a novel selective antagonist for prostaglandin E receptor subtype EP(1), ONO-8711, in a rat model of postoperative pain. *Anesthesia and analgesia* 92, 233-8.

Omote, K., Yamamoto, H., Kawamata, T., Nakayama, Y., Namiki, A., 2002. The effects of intrathecal administration of an antagonist for prostaglandin E receptor

subtype EP(1) on mechanical and thermal hyperalgesia in a rat model of postoperative pain. *Anesthesia and Analgesia* 95, 1708-1712.

Peier, A.M., Moqrich, A., Hergarden, A.C., Reeve, A.J., Andersson, D.A., Story, G.M., Earley, T.J., Dragoni, I., McIntyre, P., Bevan, S., Patapoutian, A., 2002. *Cell* 108, 705-7015.

Pogatzki, E. M.; Raja, S. N., 2003. A mouse model of incisional pain. *Anesthesiology* 99, 1023-7.

Pogatzki-Zahn, E.M., Shimizu, I., Caterina, M., Raja, S.N., 2005. Heat hyperalgesia after incision requires TRPV1 and is distinct from pure inflammatory pain. *Pain* 115, 296–307.

Premkumar, L.S, Ahern, G.P., 2000. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature* 408, 985-990.

Premkumar, L.S., Abooj, M., 2013. TRP channels and analgesia. *Life Science* 92, 415–424.

Prescott, E.D., Julius, D., 2003. A modular PIP<sub>2</sub> binding site as a determinant of capsaicin receptor sensitivity. *Science*, 300, 1284–1288.

Rathee, P.K., Distler, C., Obreja, O., Neuhuber, W., Wang, G.K., Wang, S.Y., Nau, C., Kress, M., 2002. PKA/AKAP/VR-1 module: a common link of Gs-mediated signaling to thermal hyperalgesia. *The Journal of Neuroscience* 22, 4740–4745.

Rios, E.R., Rocha, N.F., Carvalho, A.M., Vasconcelos, L.F., Dias, M.L., de Sousa, D.P., de Sousa, F.C., Fonteles, M.M., 2013. TRP and ASIC channels mediate the antinociceptive effect of citronellyl Acetate. *Chemico-Biological Interactions* 203, 573–579.

Rujjanawate, C., Kanjanapothi, D., Panthong, A., 2003. Pharmacological effect and toxicity of alkaloids from *Gelsemium elegans* Benth. *Journal of Ethnopharmacology* 89, 91–95.

Safieh-Garabedian, B., Poole, S., Allchorne, A., Winter, J., Woolf, C.J., 1995. Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. *British Journal of Pharmacology* 115, 1265–75.

Samad, T,A., Sapirstein, A., Woolf, C.J., 2002. Prostanoids and pain: unraveling mechanism therapeutics targets. *Trends in Molecular Medicine* 8, 390–396.

Santos, A.R., Calixto, J.B., 1997. Ruthenium red and capsazepine antinociceptive effect in formalin and capsaicin models of pain in mice. *Neuroscience letters* 235, 73-76.

Simões, R.R., Coelho, I.S., Junqueira, S.C., Maldaner, G., Morel, A.F., Venzke, D., Ruani, A.P., Pizzolatti, M.G., Zanchet, E.M., Santos, A.R.S., 2015. Pharmacological evidence favouring the traditional use of the root bark of *Condalia buxifolia* Reissek in the relief of pain and inflammation in mice. *The Journal of Ethnopharmacology*.

Skoff, A.M., Zhao, C., Adler, J.E., 2009. Interleukin-1alpha regulates substance P expression and release in adult sensory neurons. *Experimental Neurology* 217, 395–400.

Spofford, C.M., Brennan, T.J., 2012. Gene expression in skin, muscle, and dorsal root ganglion after plantar incision in the rat. *Anesthesiology* 117, 161-172.

Tasken, K., Aandahl, E.M., 2004. Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiology Reviews* 84, 137–167.

Tominaga, M., Caterina, M.J., Malberg, A.B., Rosen, T.A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B.E., Basbaum, A.I., Julius, D., 1998. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21, 531–543.

Toth, A., Boczan, J., Kedei, N., Lizanecz, E., Bagi, Z., Papp, Z., Edes, I., Csiba, L., Blumberg, P.M., 2005. Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 135, 162–168.

Uchytlova, E., Spicarova, D., Palecek, J., 2014. TRPV1 antagonist attenuates postoperative hypersensitivity by central and peripheral mechanisms. *Molecular Pain* 10: 67.

Vellani, V., Petrosino, S., De Petrocellis, L., Valenti, M., Prandini, M., Magherini, P.C., McNaughton, P.A. 2008. Functional lipidomics. Calcium-independent activation of endocannabinoid/endovanilloid lipid signalling in sensory neurons by protein kinases C and A and thrombin. *Neuropharmacology* 55, 1274–1279.

Voilley, N., De Weille, J., Mamet, J., Lazdunski, M., 2001. Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors. *The Journal of Neuroscience* 21, 8026–8033.

Watkins, L.R., Maier, S.F., 2002. Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states. *Physiological Reviews* 82, 981–1011.

Wen, Y. R., Suter, M. R., Ji, R. R., Yeh, G. C., Wu, Y. S., Wang, K. C., Kohno, T., Sun, W. Z., Wang, C. C., 2009. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase

in spinal microglia contributes to incision-induced mechanical allodynia. *Anesthesiology* 110, 155-165.

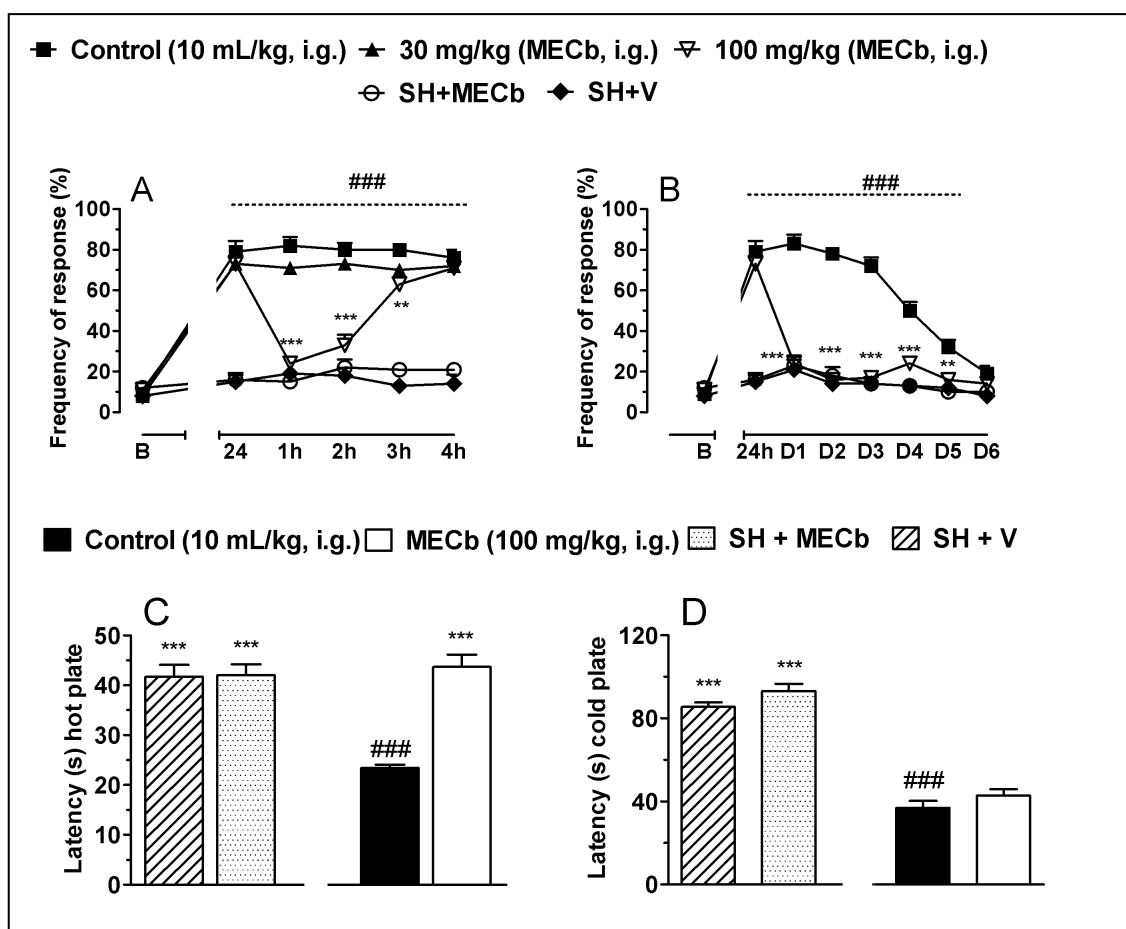
Woo, Y.C., Park, S.S., Subieta, A.R., Brennan, T.J., 2004. Changes in tissue pH and temperature after incision indicate acidosis may contribute to postoperative pain. *Anesthesiology* 101, 468-475.

Zeilhofer, H.U., 2007. Prostanoids in nociception and pain. *Biochemical Pharmacology* 73, 165–174.

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

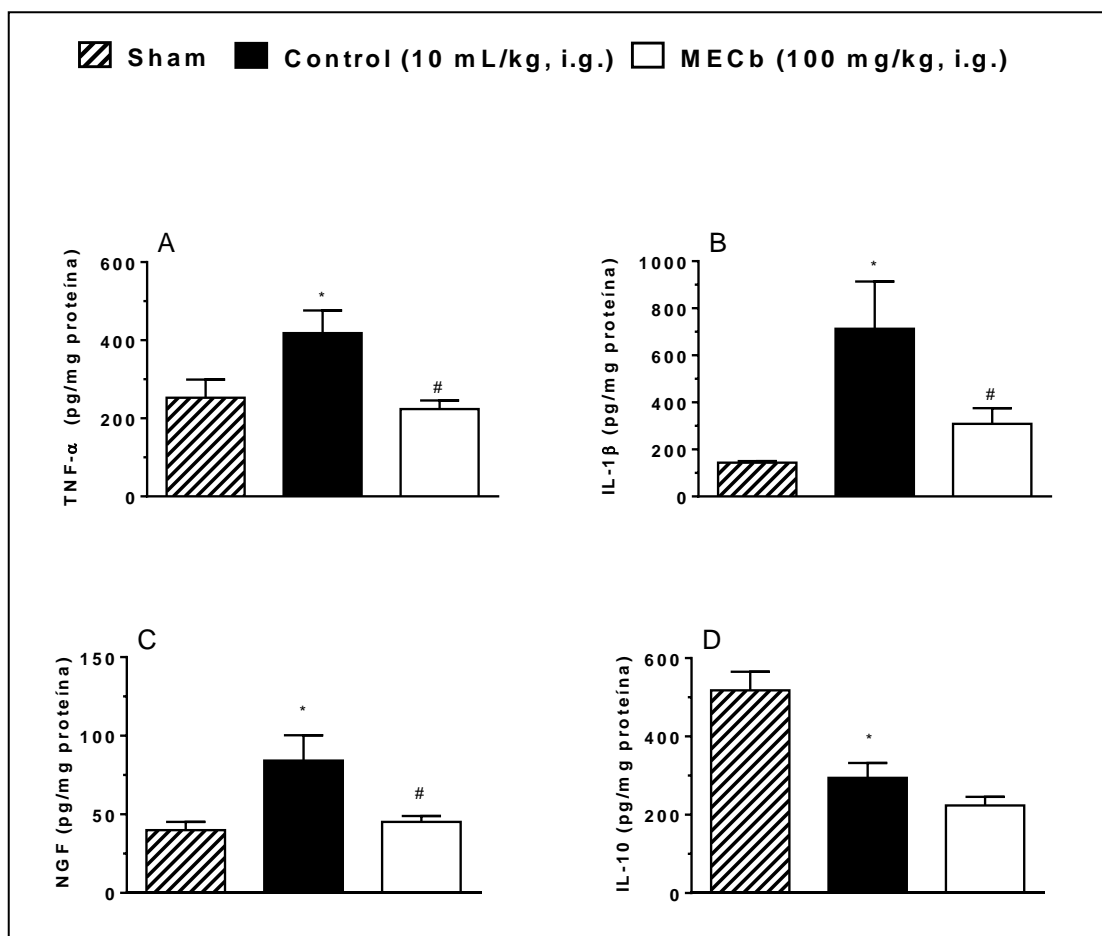
## FIGURES

FIGURE 1



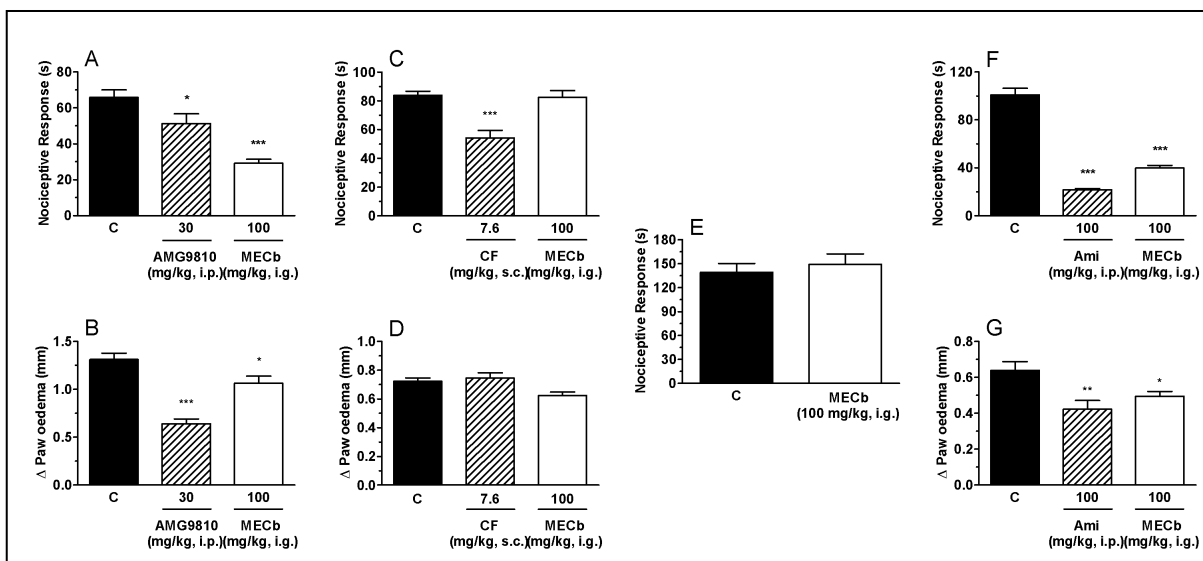
**Fig. 1:** Methanolic extract of *Condalia buxifolia* (MECb) administered orally decreases postoperative pain. Time-course of the antihyperalgesic effect of MECb on the mechanical nociception (panel A). Daily treatment with MECb on the mechanical hyperalgesia (panel B). The hyperalgesic behavior was tested from the 1st (heat, panel C) to the 2nd (cold, panel D) days after paw incision, 1 hour after treatment with MECb. Each point or column represents the mean of the values obtained in 10 animals. SH- group sham, V- group vehicle. Results are means  $\pm$  S.E.M. \*\*P < 0.01 and \*\*\*P < 0.001 when compared with control group or ### P < 0.001 when compared with non-injured mice (Two-way ANOVA followed by Bonferroni's test for multiple comparisons). B: Baseline withdrawal threshold.

FIGURE 2



**Fig. 2:** Effect of MECb on levels of TNF- $\alpha$  (panel A), IL-1 $\beta$  (panel B), NGF (panel C) and IL-10 (panel D) in a model of postoperative pain mice. Results are means  $\pm$  S.E.M. \*  $P < 0.05$  versus sham group or #  $P < 0.05$  versus control group. One-way ANOVA followed by the Student Newman-Keuls test. N=6-7 for each group.

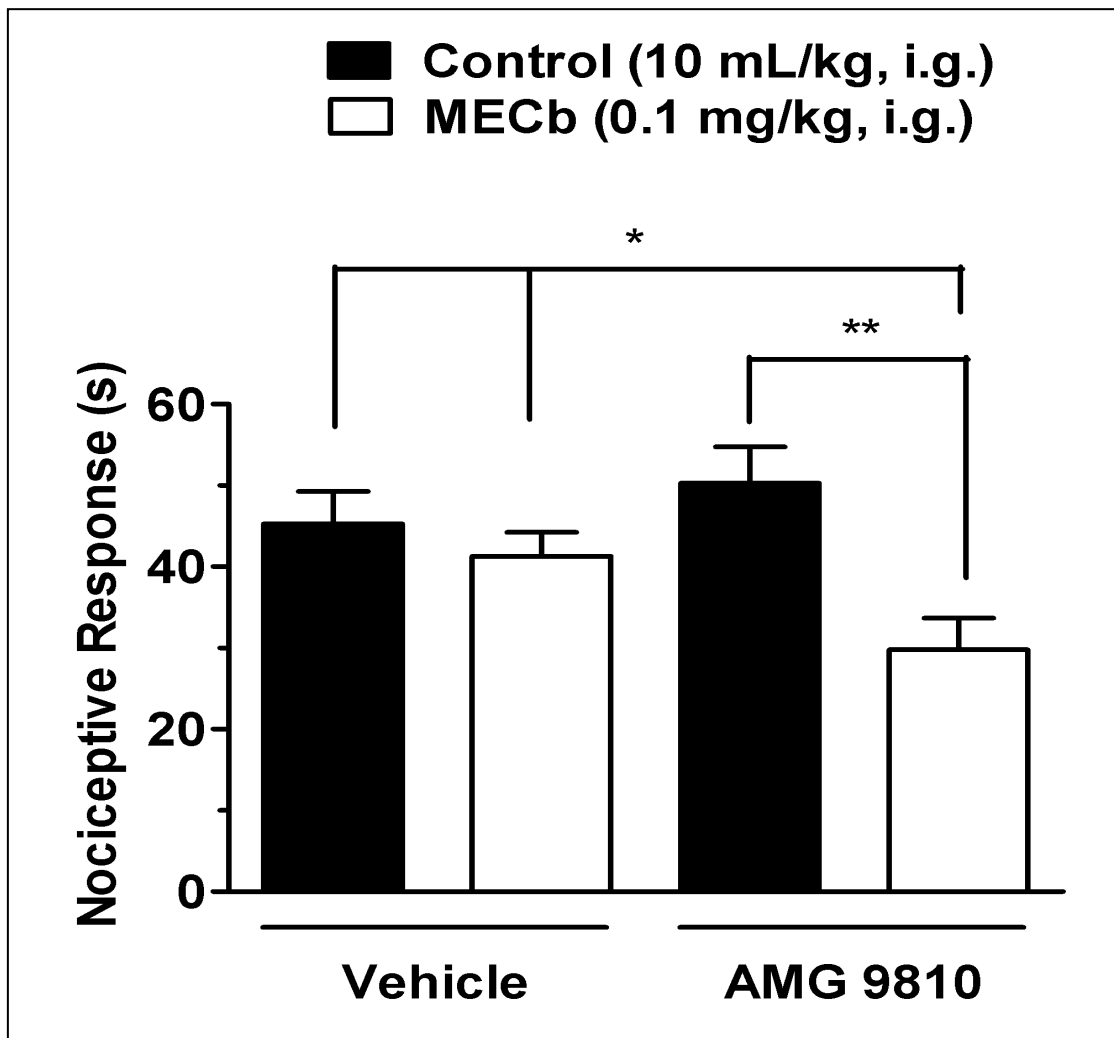
FIGURE 3



**Fig. 3:** Effect of the intragastric administration of MECb on the licking and paw oedema response caused by the intraplantar injection of capsaicin (TRPV1 activator, panel A and B), cinnamaldehyde (TRPA1 activator, panel C and D), menthol (TRPM8 activator, panel E), and acidified saline (ASIC activator, panel F and G) in mice. The respective positive controls are represented in each panel [AMG 9810- TRPV1 antagonist, CF (camphor)- TRPA1 antagonist, Ami (amiloride)- ASIC antagonist]. Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 7-10$ ). Significance levels when compared to the control group are indicated by \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*  $P < 0.001$  (One-way ANOVA followed by Newman–Keuls test).

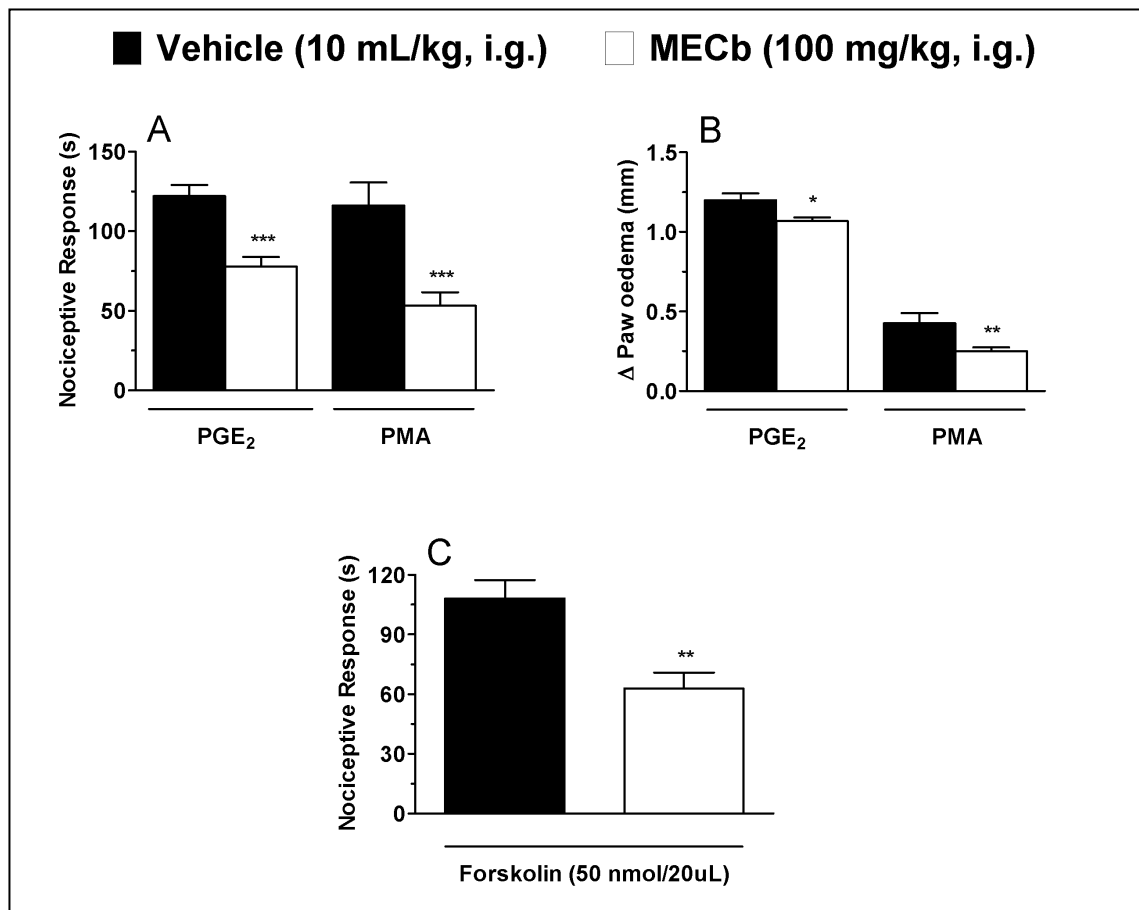


FIGURE 4



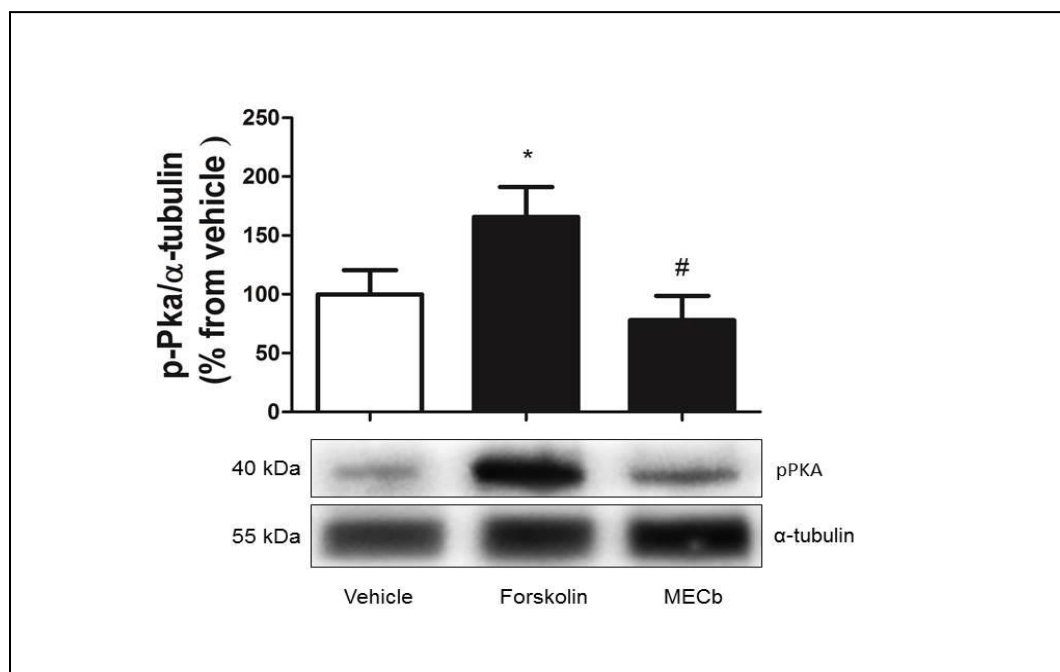
**Fig. 4:** Combinatory antinociceptive effect between sub-effective doses of MECb and AMG9810 (a TRPV1 antagonist). Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M ( $n = 8-10$ ). Significance levels when compared to control group are indicated by \*  $P < 0.05$  and \*\*  $P < 0.01$  (One-way ANOVA followed by Student Newman-Keuls test).

FIGURE 5



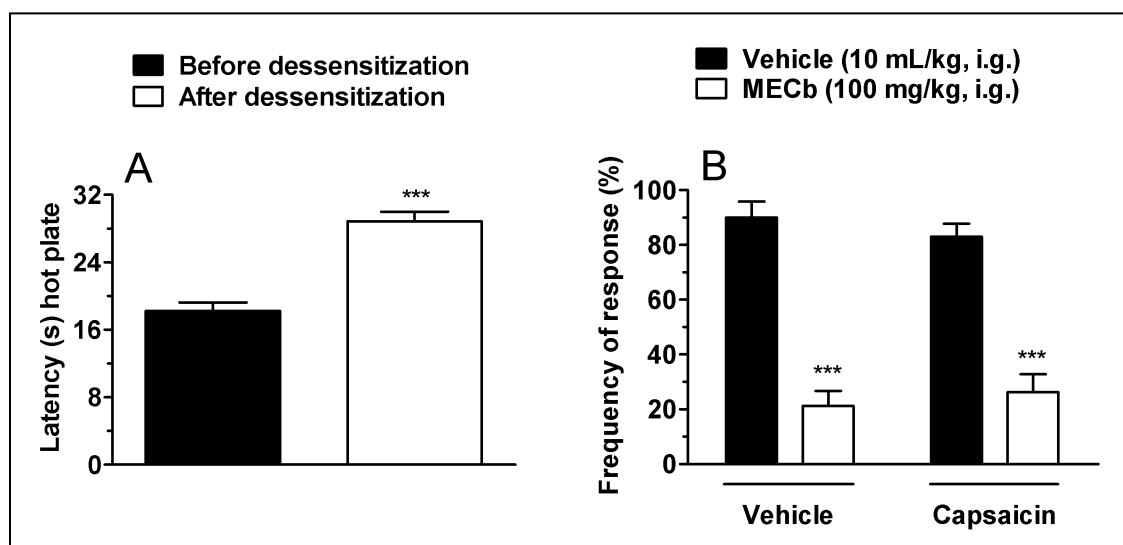
**Fig. 5:** Effect of the intragastric administration of MECb on the licking and paw oedema response caused by the intraplantar injection of PGE<sub>2</sub> and PMA (panel A and B), and forskolin (panel C) in mice. Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M ( $n = 7-10$ ). Significance levels when compared to control group are indicated by \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*  $P < 0.001$  (One-way ANOVA followed by Student Newman–Keuls test).

FIGURE 6



**Fig. 6:** Effect of pretreatment with MECb on PKA phosphorylation after forskolin injected i.pl. in mice. Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M ( $n = 5-7$ ). Significance levels when compared to vehicle group are indicated by \*  $P < 0.05$  or #  $P < 0.05$  when compared with forskolin treated group (One-way ANOVA followed by Student Newman-Keuls test).

FIGURE 7



**Fig. 7:** Effect of capsaicin injected intratecally (i.t.) on ablation of C fibers. Panel A shows the response to hot plate to confirm the desensitization. Results are means  $\pm$  S.E.M (n=8). Significance levels when compared before and after the desensitization are indicated by \*\*\*  $P < 0.001$  (test t comparison). Panel B represents animals submitted to postoperative pain model after the desensitization and evaluate the frequency of withdrawal of paw when pretreated with MECb. Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M (n = 7-8). Significance levels when compared to vehicle group are indicated by \*\*\*  $P < 0.001$  (Two-way ANOVA followed by Bonferroni's test for multiple comparisons).

## TABELAS

### TABELA 1

**Table 1.** Effect of *Condalia buxifolia* on the absolute and relative organ and body weight, food and water intake under the chronic toxicity (30 days). Absolute weight in grams (g).

Organ	Parameter	<i>Condalia buxifolia</i> Reissek (mg/kg)					
		Female (n=5 per group)			Male (n=5 per group)		
		C	100	300	C	100	300
Liver	Absolute weight	1.573 ± 0.078	1.571 ± 0.092	1.439 ± 0.113	1.728 ± 0.059	1.522 ± 0.07	1.494 ± 0.059
	Relative weight	0.041 ± 0.001	0.043 ± 0.001	0.011 ± 0.007	0.040 ± 0.001	0.036 ± 0.001	0.026 ± 0.005
Kidney	Absolute weight	0.219 ± 0.012	0.206 ± 0.01	0.196 ± 0.012	0.251 ± 0.028	0.24 ± 0.009	0.236 ± 0.015
	Relative weight	0.005 ± 0.0001	0.005 ± 0.0001	0.005 ± 0.0002	0.005 ± 0.00006	0.005 ± 0.0001	0.005 ± 0.0003
Lung	Absolute weight	0.226 ± 0.009	0.220 ± 0.008	0.234 ± 0.023	0.251 ± 0.024	0.239 ± 0.017	0.213 ± 0.009
	Relative weight	0.005 ± 0.00001	0.006 ± 0.0002	0.006 ± 0.0004	0.005 ± 0.0004	0.005 ± 0.003	0.004 ± 0.0002
Spleen	Absolute weight	0.138 ± 0.01	0.145 ± 0.003	0.129 ± 0.013	0.126 ± 0.007	0.128 ± 0.009	0.114 ± 0.003
	Relative weight	0.003 ± 0.0001	0.0039 ± 0.0001	0.003 ± 0.0002	0.002 ± 0.0001	0.003 ± 0.0002	0.002 ± 0.0001
Heart	Absolute weight	0.129 ± 0.008	0.126 ± 0.0052	0.12 ± 0.009	0.155 ± 0.008	0.137 ± 0.004	0.129 ± 0.005
	Relative weight	0.003 ± 0.0001	0.003 ± 0.00001	0.003 ± 0.0002	0.003 ± 0.0001	0.003 ± 0.0001	0.002 ± 0.0001
Mesenteric Lymphnode	Absolute weight	0.055 ± 0.010	0.063 ± 0.001	0.054 ± 0.009	0.049 ± 0.015	0.055 ± 0.005	0.05 ± 0.004
	Relative weight	0.001 ± 0.0003	0.001 ± 0.0001	0.003 ± 0.001	0.001 ± 0.0003	0.001 ± 0.0001	0.001 ± 0.0001
Thymus	Absolute weight	0.144 ± 0.0009	0.099 ± 0.006	0.084 ± 0.012	0.076 ± 0.019	0.082 ± 0.006	0.075 ± 0.002
	Relative weight	0.002 ± 0.0003	0.002 ± 0.0001	0.002 ± 0.0002	0.001 ± 0.0004	0.002 ± 0.0002	0.001 ± 0.0006
Right adrenal Gland	Absolute weight	0.006 ± 0.0004	0.023 ± 0.015	0.006 ± 0.0004	0.005 ± 0.0006	0.005 ± 0.0004	0.006 ± 0.0005
	Relative weight	0.0001 ± 0.00002	0.0002 ± 0.00001	0.0001 ± 0.00001	0.001 ± 0.0001	0.001 ± 0.001	0.001 ± 0.0001
Right salivary Gland	Absolute weight	0.077 ± 0.003	0.066 ± 0.003	0.065 ± 0.008	0.0604 ± 0.002	0.08 ± 0.018	0.09 ± 0.005
	Relative weight	0.002 ± 0.00001	0.001 ± 0.0001	0.001 ± 0.0002	0.003 ± 0.002	0.001 ± 0.0004	0.002 ± 0.0001
Uterus + ovary	Absolute weight	0.202 ± 0.01	0.248 ± 0.036	0.255 ± 0.072			
	Relative weight	0.005 ± 0.0002	0.006 ± 0.0009	0.006 ± 0.001			
Right testicle	Absolute weight				0.14 ± 0.024	0.14 ± 0.014	0.12 ± 0.015
	Relative weight				0.03 ± 0.0006	0.003 ± 0.0003	0.002 ± 0.0003

---

Food intake (g)	5.500 ± 0.1806	5.480 ± 0.1879	5.670 ± 0.2227	6.300 ± 0.1523	6.440 ± 0.1571	6.500 ± 0.1116
Water intake (mL)	5.100 ± 0.1674	5.140 ± 0.1762	5.180 ± 0.2035	4.930 ± 0.1191	4.970 ± 0.1212	5.100 ± 0.08756
Body weight (g)	37.80 ± 1.241	36.20 ± 1.241	36,00 ± 1,414	42.60 ± 1.030	41.00 ± 1.000	42,80 ± 0,7348

---

The values are expressed as mean ± S.E.M. The statistic analysis were made comparing treated group with respective sex control group. One-way ANOVA followed by Student Newman-Keul's test.

**TABELA 2**



**Table 2.** Haematological and biochemical parameters in plasma of Swiss mice fasting to 12 h (treated with *Condalia buxifolia*. 1x/day) under the chronic toxicity test of 30 days.

Parameters	<i>Condalia buxifolia</i> Reissek (mg/kg)					
	Female (n=5 per group)			Male (n=5 per group)		
	C	100	300	C	100	300
Glucose (mg/dL)	100.4 ± 1.97	105 ± 7.04	105.6 ± 3.59	120.1 ± 2.65	119.3 ± 3.75	122.4 ± 2.79
Urea (mg/dL)	39.57 ± 4.83	40.26 ± 5.21	41.13 ± 6.18	36.91 ± 3.71	33.33 ± 1.31	29.97 ± 4.18
Creatinine (mg/dL)	0.92 ± 0.12	0.79 ± 0.14	0.88 ± 0.10	0.91 ± 0.07	0.77 ± 0.09	0.73 ± 0.10
Uric acid (mg/dL)	3.31 ± 0.08	3.21 ± 0.05	3.22 ± 0.06	3.14 ± 0.08	3.33 ± 0.04	3.26 ± 0.13
AST (U/L)	3.74 ± 0.31	3.44 ± 0.08	3.70 ± 0.21	3.63 ± 0.24	3.24 ± 0.30	3.83 ± 0.24
ALT (U/L)	35.28 ± 6.43	40.58 ± 2.19	42.63 ± 2.46	45.97 ± 2.00	36.06 ± 3.45	42.39 ± 4.15
γGT (U/L)	12.69 ± 1.05	10.92 ± 0.85	11.31 ± 1.55	12.00 ± 1.20	9.538 ± 0.77	10.67 ± 0.83
Total cholesterol (mg/dL)	106.2 ± 6.58	100.1 ± 3.20	107.7 ± 7.57	121.7 ± 5.46	125.3 ± 5.69	114.2 ± 2.71
HDL cholesterol (mg/dL)	22.06 ± 1.61	19.48 ± 0.72	22.02 ± 1.44	23.87 ± 1.88	20.47 ± 1.24	22.37 ± 1.59
LDL cholesterol (mg/dL)	57.39 ± 5.64	52.58 ± 3.02	59.67 ± 6.15	73.59 ± 5.81	76.23 ± 3.25	62.88 ± 3.88
Lymphocytes %	76.40 ± 1.0620	78.34 ± 0.6353	75.84 ± 1.5090	78.36 ± 1.3090	76.04 ± 0.5946	77.58 ± 0.8634
Monocytes %	2.860 ± 0.1860	2.780 ± 0.2596	2.620 ± 0.1463	2.660 ± 0.1435	2.900 ± 0.1000	2.940 ± 0.1778
Granulocytes %	21.82 ± 0.9058	19.72 ± 0.5276	21.54 ± 1.4170	19.78 ± 1.0030	20.10 ± 0.5459	22.48 ± 0.7658
Erythrocytes (cells x 10 <sup>6</sup> /μL)	8.354 ± 0.2642	8.874 ± 0.1580	8.790 ± 0.0929	8.656 ± 0.1252	8.894 ± 0.1042	8.964 ± 0.0940
Hemoglobin (g/dL)	140.2 ± 6.9380	147.4 ± 5.4460	140.2 ± 2.7090	147.6 ± 4.1790	144.0 ± 2.0740	142.2 ± 0.1778
Hematocrit %	41.72 ± 2.3310	46.16 ± 1.7740	45.26 ± 0.6454	47.76 ± 1.9230	43.78 ± 0.5324	44.86 ± 3.4410
Platelets (cells x 10 <sup>3</sup> /μL)	633.0 ± 31.400	580.2 ± 29.760	668.2 ± 16.360	618.8 ± 38.080	655.8 ± 22.390	654.0 ± 36.900

The values are expressed as mean ± S.E.M. The statistic analysis were made comparing treated group with respective sex control group. One-way ANOVA followed by Student Newman-Keul's test.

## 5 Discussão

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

Os dados apresentados neste trabalho confirmam, pelo menos em parte o seu uso popular, e demonstram que o extrato bruto metanólico de *Condalia buxifolia*, quando administrado pela via intragástrica, apresenta importante efeito antinociceptivo (analgésico). Além disso, até o presente momento não há nenhum dado na literatura evidenciando que esta planta possua atividade antinociceptiva, apenas relatos passados de geração para geração, o que torna nosso trabalho relevante, uma vez que fornece bases científicas para o uso de *Condalia buxifolia* na terapêutica. Neste sentido, o presente estudo optou por usar o extrato bruto desta planta porque é a forma usada empiricamente pela população.

As primeiras abordagens utilizadas foram de caráter fitoquímico, com o objetivo inicial de caracterizar o extrato da casca da raiz. Embora a composição fitoquímica da casca da raiz seja conhecida, sendo composta por triterpenóides (taraxerol e lupeol) e o esteróide  $\beta$ -sitosterol (MALDANER, 2005), após a extração da planta, para este estudo, observou-se que o extrato metanólico apresentou uma grande quantidade de alcaloides, os quais apresentam importantes ações analgésicas.

Os resultados iniciais dessa avaliação são descritos no artigo "Pharmacological evidence favouring the traditional use of the root bark of *Condalia buxifolia* Reissek in the relief of pain and inflammation in mice

(SIMÕES et al., 2015), aceito para publicação no periódico “Journal of Ethnopharmacology”. Além da abordagem fitoquímica, este artigo discute os primeiros resultados da atividade antinociceptiva do extrato utilizado.

Para essa abordagem inicial, o modelo da formalina foi utilizado para avaliar uma possível atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato bruto metanólico de *Condalia buxifolia*. O teste da formalina (2,5%) é considerado como um modelo clássico para a avaliação clínica de nocicepção através de uma resposta bifásica (WHEELER-ACETO, COWAN, 1991; TJOLSEN et al., 1992). A primeira fase resulta de uma estimulação química direta sobre as fibras aferentes nociceptivas, principalmente fibras C, e pela liberação de substância P (HEAPY, JAMIESON, RUSSEL, 1987; VANEGAS, SCHAIBLE, 2004; ALMEIDA et al., 2013), enquanto a segunda fase é associada com o desenvolvimento de uma resposta inflamatória com a liberação de mediadores álgicos como prostaglandinas, serotonina, histamina e glutamato (MURRAY, PORRECA, COWAN, 1988; RUJJANAWATE, KANJANAPOTHI, PANTHONG, 1998; ALMEIDA et al., 2013), bem como pela estimulação de receptores opióides periféricos (OLUYOMI, HART, SMITH, 1992) e TRPA1 e ASICs (MCNAMARA et al., 2007). Assim, a segunda fase é inibida por AINEs (como evidenciado pela resposta ao diclofenaco sódico usado neste estudo como controle positivo), glicocorticóides e analgésicos de ação central (SHIBATA et al., 1989; OHKUBO et al., 1990; DOAK, SAWYNOK, 1997; FRANÇA et al., 2001; PARADA et al., 2001). Os resultados deste estudo mostram que o extrato bruto metanólico de *Condalia buxifolia* (EBMCb) resultou em um efeito antinociceptivo somente na segunda fase, sugerindo que o EBMCb é efetivo em promover antinocicepção pela inibição da síntese/liberação de mediadores inflamatórios e que seu efeito é evidente em reduzir um processo inflamatório agudo.

Neste mesmo modelo foi realizado um decurso temporal, o qual visou avaliar a duração do efeito antinociceptivo do EBMCb ao longo do tempo (1-8 h). Assim, foi observado que o efeito do extrato teve uma ação antinociceptiva relativamente duradoura, ou seja, até a 6ª h, o que indica que o extrato tem uma importante ação anti-inflamatória de longa duração. Neste sentido, avaliamos o edema de pata induzido pela formalina, o qual é um modelo simples de inflamação aguda, sendo usado como teste inicial para avaliar agentes anti-inflamatórios (GREENWALD, 1991). O EBMCb mostrou um significativo efeito inibitório no desenvolvimento do edema, o qual pode ter sido pela inibição da síntese de histamina, serotonina ou

prostaglandinas, principais mediadores presentes no edema de pata induzido por formalina (PARVEEN et al., 2007), sugerindo assim, que o EBMCb atua inibindo componentes inflamatórios durante um processo nociceptivo.

Para confirmação do efeito antinociceptivo foi utilizado o modelo do ácido acético (0,6 %), um modelo clássico de dor somato-visceral utilizado na triagem de substâncias com potencial analgésico. A resposta nociceptiva ao ácido acético pode envolver uma estimulação direta das fibras aferentes pelo agente algésico ou indiretamente, através de uma reação inflamatória aguda provocada pela liberação de mediadores endógenos como glutamato, serotonina, bradicinina e, principalmente, prostaglandinas, além de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e interleucina 8 (IL-8) - liberadas por macrófagos e mastócitos residentes na cavidade peritoneal (COLLIER et al., 1968; RIBEIRO et al., 2000; IKEDA et al. 2001) que estimulam ou sensibilizam os neurônios nociceptivos resultando no comportamento de contorções abdominais (TRONGSAKUL et al., 2003). Além disso, a irritação no local da injeção também pode ser mediada pela dissociação de prótons os quais estimulam canais TRPV1 e ASICs, localizados nas fibras aferentes primárias (IKEDA, 2001; JULIUS, BASBAUM, 2001; COUTAUX et al., 2005). Este tipo de teste, embora considerado de baixa especificidade, apresenta uma alta sensibilidade e poder preditivo de eficácia clínica, uma vez que as doses efetivas médias (DE50) obtidas em roedores geralmente são semelhantes às doses analgésicas médias em humanos (COLLIER et al., 1968; DUBINSKY et al., 1987; LE BARS et al., 2001). Neste modelo de nocicepção, o EBMCb mostrou-se eficiente ao reduzir significativamente o número de contorções em todas as doses testadas, assim como o diclofenaco sódico (usado como controle positivo). Dessa forma, podemos sugerir que o EBMCb atua através da inibição da síntese e/ou liberação desses mediadores inflamatórios.

Os resultados também mostram que a administração intra-gástrica do EBMCb produz uma inibição significativa da resposta nociceptiva causada pela injeção intraplantar de glutamato na pata de camundongos. Esta resposta nociceptiva parece envolver sítios periféricos, espinais e supraespinais e a sua ação é mediada por receptores glutamatérgicos (metabotrópicos ou ionotrópicos) bem como pela dissociação de óxido nítrico ou algumas vias derivadas do mesmo (MILLAN, 1999, BEIRITH et al., 2002; FUNDYTUS, 2001). Além disso, os efeitos do diclofenaco sódico (controle positivo) foram semelhantes aos do EBMCb em diminuir a resposta do comportamento nociceptivo causada pelo glutamato. Assim, a supressão da dor

induzida pela injeção de glutamato, ácido acético e formalina pelo EBMCb pode ser associada, pelo menos em parte, pelo bloqueio do sistema glutamatérgico.

Durante o modelo de nociceção induzida no teste da placa quente, o EBMCb mostrou aumento significativo no tempo de latência para lambar ou morder qualquer uma das patas posteriores; e demonstrou uma efetividade similar comparada à morfina, usada como controle positivo. Este modelo de nociceção é considerado para o estudo da atividade antinociceptiva central de substâncias frente a um estímulo nociceptivo agudo e não inflamatório, sendo sua ação influenciada por opióides (De AQUINO et al., 2013). Logo, a ação do EBMCb em prolongar a latência da resposta nociceptiva, indica sua habilidade em influenciar mecanismos centrais da dor. Conjuntamente, estes dados apontam o EBMCb como um composto interessante para a investigação do potencial antinociceptivo.

Ainda como avaliação preliminar, foi investigada a possível participação do sistema opioidérgico no efeito observado do EBMCb. O sistema opióide tem sido implicado no mecanismo de ação de muitas drogas analgésicas. O presente estudo mostrou que o sistema opioidérgico parece estar envolvido na ação antinociceptiva do EBMCb. Isso pode ser demonstrado pelo fato de que o pré-tratamento dos animais com naloxona, um antagonista não seletivo de receptores opióides, foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo do EBMCb, assim como da morfina, um agonista não seletivo de receptores opióides.

Finalmente, o EBMCb, nas doses que causaram significativo efeito antinociceptivo, não produziu nenhuma alteração na atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto. Isto pode ser interpretado como o efeito antinociceptivo não ser derivado de efeitos não específicos sobre a performance motora ou por sedação (BAGGIO et al., 2012).

Considerando o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório nos modelos anteriores, o questionamento seguinte foi se o EBMCb seria efetivo em um modelo de nociceção prolongada (modelo de dor pós-operatória), a qual está associada com envolvimento de diversas moléculas pró-inflamatórias, bem como com hipersensibilidade mecânica e térmica (comumente envolvidas em estados inflamatórios). Os resultados desta avaliação, bem como uma proposta de mecanismos de ação, são descritos no manuscrito intitulado "*Condalia buxifolia* reduces nociceptive and inflammatory pain by a mechanism dependent on TRPV1/ASICs channels", submetido para publicação no periódico "Journal of

Ethnopharmacology”.

Os estados inflamatórios normalmente estão associados à dor patológica, e podem ser decorrentes de dano tecidual, de exposição a estímulos químicos ou de processos autoimunes (SCHIENE et al., 2011). Independente da origem da inflamação, este processo envolve a liberação de mediadores inflamatórios como bradicinina, prostaglandinas, histamina e citocinas, os quais por sua vez levam à dor persistente por meio de ativação sustentada e sensibilização de nociceptores primários e de neurônios de ordem superior envolvidos na transmissão do impulso nociceptivo (JULIUS, BASBAUM, 2001; MARCHAND et al., 2005). Esses processos, por sua vez, levam à sensibilização central com consequente hipersensibilidade (SCHIENE et al., 2011). Neste trabalho, o modelo utilizado para mimetizar um estado de dor prolongada foi o modelo de dor pós-operatória, induzida pela incisão plantar da pata posterior direita, sendo as concentrações de moléculas pró-inflamatórias avaliadas pelo método de ELISA e a hipersensibilidade por meio da aplicação de filamentos de von Frey (hipersensibilidade mecânica) e dos testes da placa quente e fria (hipersensibilidade térmica).

Como visto anteriormente, a dor causada pela incisão é uma forma comum e singular de dor aguda (prolongada), sendo um fenômeno frequente no pós-operatório, que pode resultar em diminuição da qualidade de vida do paciente. Dados da literatura tem demonstrado que nos tecidos periféricos, várias moléculas contribuem com a manutenção da dor pós-operatória. Dentre elas podemos destacar: neutrófilos (CARREIRA et al., 2013), fator de crescimento do nervo (NGF) (SPOFFORD, BRENNAN, 2012), citocinas (IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ ) (CARVALHO et al., 2012; SPOFFORD, BRENNAN, 2012) e óxido nítrico, além da ativação de diversos receptores, como EP<sub>1</sub>, B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, P2X, TRPV1 e ASIC3 (OMOTE et al., 2001, FÜREDI et al., 2010, DEVAL et al., 2011). Citocinas, como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , estão aumentadas em processos inflamatórios, como aqueles observados na dor pós-operatória. Essas moléculas são importantes no desenvolvimento da sensibilização central e periférica, especialmente a IL-1 $\beta$ , a qual favorece a liberação de SP, PGEs e NGF, e contribui na manutenção do processo doloroso (WATKINS, MAIER, 2002; KRAYCHETE et al., 2006; ALBERTINI et al., 2008). No estudo em questão, as concentrações de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e NGF aumentaram nos animais que tiveram a incisão na pata, por outro lado, nos animais tratados com o EBMCb, o extrato foi capaz de prevenir este aumento, sugerindo que o EBMCb interaja diretamente na liberação/ação dessas

moléculas. Entretanto, ao contrário do que é encontrado na literatura, as concentrações de IL-10, importante citocina anti-inflamatória, não foi aumentada durante o processo e nem o EBMCb levou a uma alteração no seu perfil. Sugere-se que esta resposta pode ser dependente da ação do EBMCb com outras citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-13 ou o Fator Transformador de Crescimento  $\beta$  (FTC $\beta$ ).

Tem sido demonstrado que os canais de TRPV1 e TRPA1 desempenham um papel chave na sensibilização central em relação à hipersensibilidade mecânica (TRPA1) e térmica (TRPV1) (ECKERT, JULIUS, BASBAUM, 2006; MAZARIO, BASBAUM, 2007; DA COSTA et al., 2010), e na capacidade de detectar temperaturas frias ou quentes (abaixo de 17 °C (TRPA1) ou acima de 42 °C (TRPV1)), particularmente as temperaturas nocivas (CATERINA et al., 1997; CATERINA et al., 1999; CATERINA et al., 2000; OBATA et al., 2005). Neste modelo relevante, foram encontrados resultados muito interessantes, os quais demonstram que o tratamento agudo ou prolongado com o EBMCb foi capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica e térmica (calor) no modelo de dor pós-operatória. Além disso, este efeito anti-hiperalgésico perdurou por até 3 horas após a administração do EBMCb quando analisados na hiperalgesia mecânica da pata com incisão e que o tratamento diário reduziu a nocicepção até o quinto dia de tratamento. Assim, o EBMCb pode ser útil em tratar processos dolorosos agudos associado a dor pós-operatória. Dessa forma, considerando os nossos resultados obtidos no teste de formalina, principalmente em relação à inibição na fase inflamatória, bem como os dados da placa quente no modelo de dor pós-operatória (o qual apresenta envolvimento de TRPV1), procurou-se investigar o envolvimento das fibras C sensíveis à capsaicina, bem como dos canais TRPV1 e TRPA1 no efeito antinociceptivo do EBMCb.

Com o intuito de explorar o envolvimento das fibras sensíveis à capsaicina no efeito antinociceptivo do EBMCb foi realizada a dessensibilização dos animais com capsaicina pela via intratecal (levando à ablação de grande parte da população das fibras C positivas à capsaicina) e, posteriormente, os animais foram submetidos ao modelo de dor pós-operatória e, então, testada a hipersensibilidade mecânica, utilizando o aparato de von Frey. Os dados mostraram que a hiperalgesia mecânica é independente de fibras C e que a dessensibilização não alterou o perfil de ação do EBMCb. Sugere-se, portanto, que a ação do extrato em reduzir a frequência de

resposta frente ao estímulo mecânico pode estar relacionada à ação do EBMCb nas concentrações de mediadores inflamatórios, como as citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , além da neurotrofina NGF, especialmente envolvidos na manutenção da dor no modelo de incisão plantar. Dessa forma, este resultado vai ao encontro dos resultados obtidos com estes mediadores, onde o EBMCb reduziu as concentrações dos mesmos no modelo de dor pós-operatória.

Está estabelecido que o TRPA1 é um canal de cátions não seletivo, expresso nas fibras C e A $\delta$  que também expressam TRPV1, o que demonstra uma possível interação funcional desses canais. De fato, 97% dos neurônios que expressam TRPA1 também expressam TRPV1, enquanto apenas 30% de fibras expressando TRPV1 também expressam TRPA1 (STORY et al., 2003; KOBAYASHI et al., 2005; JULIUS, 2013). Pode-se então sugerir que os canais TRPA1 e TRPV1 são importantes para a excitação neuronal levando a liberação de neuropeptídeos inflamatórios e ao aumento da sensibilidade dolorosa. Ambos os canais também são ativados pela liberação de agentes inflamatórios a partir de células não neuronais (como queratinócitos, mastócitos, dentre outras) na área da lesão do tecido (HUANG, ZHANG, MCNAUGHTON, 2006; BAUTISTA, PELLEGRINO, TSUNOZAKI, 2013). MCNAMARA e COLABORADORES (2007) ressaltam que o TRPA1 é o principal local onde a formalina interage para produzir a dor característica do teste. Estes autores demonstraram que o formol excita neurônios sensoriais ativando diretamente TRPA1, desempenhando um papel muito importante na dor inflamatória (juntamente com os canais TRPV1).

Nossos resultados mostram que o EBMCb reduziu o edema de pata e o tempo em que os animais lambiam ou mordiam a pata injetada com capsaicina, um potente ativador de receptores TRPV1, sendo o mesmo observado com o AMG9810, antagonista seletivo destes canais. Logo, os dados do presente estudo indicam que o EBMCb atua inibindo canais TRPV1, indicando este como um outro possível mecanismo de ação do extrato. Por outro lado, o EBMCb não foi efetivo em reduzir o tempo de lambida ou mordida ou o edema de pata induzido pela injeção i.pl. de cinamaldeído (agonista TRPA1), ao contrário da cânfora, antagonista desses canais, que foi efetiva em diminuir o tempo de resposta nociceptiva. Relacionando esse dado ao resultado da formalina, podemos sugerir que, embora o EBMCb tenha demonstrado efeito antinociceptivo na segunda fase da formalina, este efeito não está relacionado com a inibição de TRPA1, mas sim pela interação do EBMCb com



mediadores pró-inflamatórios liberados frente ao estímulo doloroso (RIOS et al., 2013). Além disso, como os canais TRPA1 estão envolvidos também na resposta ao frio nocivo, e como o EBMCb não aumentou a latência na placa fria (no modelo de dor pós-operatória), decidimos investigar o possível envolvimento de canais TRPM8, os quais estão associados nas respostas ao frio não nocivo. Nossos dados mostram que o EBMCb não previne a resposta nociceptiva induzida pela injeção i.pl. de mentol (agonista TRPM8). Juntos, esses dados evidenciam que a ação do EBMCb é independente de receptores TRPM8 e que o mesmo não previne respostas ao frio lesivo ou mesmo refrescante.

O pH da solução injetada no teste da salina acidificada é 5,0 e interage com ASICs, o que leva ao comportamento nociceptivo. Muitos estudos tem demonstrado que a expressão de ASICs é aumentada por mediadores pró-inflamatórios (VOLLEY et al., 2001; MAMET et al., 2002) e, junto com o TRPV1 ativado, desempenham papéis complementares na sensibilização/ativação dos neurônios sensoriais por prótons (BAGGIO et al., 2012). No estudo em questão, o EBMCb preveniu a nocicepção induzida pela salina acidificada, além de diminuir o edema de pata, assim como o controle positivo, amilorida. Este efeito indica que a inibição de canais ASICs é outro possível mecanismo de ação do EBMCb.

Além destes sistemas clássicos de facilitação da dor, deve-se considerar ainda que a transmissão nociceptiva pode envolver diversas outras vias de sinalização, mediadas por segundos mensageiros (JULIUS, BASBAUM, 2001). As lesões teciduais levam à liberação de diversos mediadores químicos, incluindo aminoácidos excitatórios, peptídeos, prótons e citocinas, que ao se ligarem a seus receptores específicos, ativam cascatas de sinalização mediadas por proteínas cinases como PKA e PKC, além da proteína cinase dependente de cálcio/calmodulina (CaMK) e das MAPKs (OTUKI et al., 2005; PINTO et al., 2008).

As proteínas cinases, as quais constituem uma das maiores famílias de genes codificados pelo genoma humano, apresentam um importante papel regulatório em diversas funções das células eucarióticas, incluindo a divisão celular, crescimento, diferenciação e morte celular, além de participar da regulação de vias envolvidas na memória e nocicepção (TAYLOR et al., 2008). Dentro da superfamília das proteínas cinases, a proteína cinase dependente de AMPc (PKA) é uma das mais bem compreendidas. A PKA constitui o principal alvo do AMPc, um dos segundos mensageiros intracelulares mais abundantes, e sua ativação é responsável pela

regulação de funções como o crescimento e diferenciação celular, condutividade de canais iônicos, liberação sináptica de neurotransmissores e transcrição gênica (SKALHEGG, TASKÉN, 1997; DOLAN, NOLAN, 2001; TAYLOR et al., 2008). A PKA é uma holoenzima tetramérica, formada por duas subunidades regulatórias (RI e RII) e duas subunidades catalíticas (C), sendo conhecidas três isoformas de C, amplamente expressas em tecidos neuronais e não neuronais: C $\alpha$ , C $\beta$  e C $\gamma$  (SKALHEGG, TASKÉN, 1997; TAYLOR et al., 2008). As subunidades regulatórias servem como receptoras de AMPc, apresentando dois duplos sítios de ligação ao AMPc na região carboxiterminal (SKALHEGG, TASKÉN, 1997). A ligação do AMPc às subunidades regulatórias da PKA leva à liberação das subunidades catalíticas, que uma vez livres, são capazes de fosforilar seus substratos proteicos em resíduo de serina e treonina. Tais substratos, alvos da fosforilação por PKA, incluem canais iônicos (como TRPV1) e proteínas associadas à liberação de neurotransmissores e aminoácidos excitatórios. Alguns estudos demonstram que a nocicepção induzida por carragenina, formalina e ácido acético pode ser revertida por inibidores ou por deleção gênica de PKA e/ou PKC evidenciando, portanto, a importância das cinases no processamento nociceptivo (MALMBERG et al., 1997; SKALHEGG, TASKÉN, 1997; KHASAR et al., 1999; DOLAN, NOLAN, 2001; PINTO et al., 2008; TAYLOR et al., 2008).

Como descrito anteriormente, a via de sinalização AMPc/PKA pode ser ativada por um grande número de diferentes receptores, que uma vez ativados por seus ligantes, transduzem o sinal da superfície celular por meio de interação com proteínas G (SKALHEGG, TASKÉN, 1997). Um exemplo deste tipo de ativação pode ser observado com a PGE<sub>2</sub>, um dos principais mediadores inflamatórios liberados no sítio de lesão tecidual. Os receptores E1 para prostanoídes (EP1), acoplados a uma proteína Gs, uma vez ativados pela PGE<sub>2</sub> levam à ativação da via de sinalização AMPc/PKA (TAIWO, LEVINE, 1991; MALMBERG et al., 1997; ALEY, LEVINE, 1999; MILLAN, 1999; KASSUYA et al., 2007; SACHS et al., 2009). Além desta via, a ativação da adenilato ciclase (AC) pela forskolina, está relacionada com aumento nos níveis de AMPc, o que leva à ativação de PKA. Uma vez que os ativadores da AC são capazes de aumentar a hipersensibilidade mecânica, enquanto tanto os inibidores do AMPc quanto os inibidores da PKA são capazes de reverter a hipersensibilidade induzida por PGE<sub>2</sub>, pode-se concluir que a PKA participa efetivamente no desenvolvimento da hipersensibilidade induzida por este mediador

inflamatório (MALMBERG et al., 1997; ALEY, LEVINE, 1999; KASSUYA et al., 2007; SACHS et al., 2009).

Além da PKA, outra cinase bastante envolvida no processamento nociceptivo é a PKC (SACHS et al., 2009). As PKCs compõem uma família de cinases de serina/treonina e são divididas em três grupos: 1) as PKCs convencionais, representadas pelas isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II e  $\gamma$ ; 2) as novas PKCs, representadas pelas isoformas  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  e  $\theta$ ; e 3) as PKCs atípicas, representadas pelas isoformas  $\xi$  e  $\lambda$ /I. As isoformas relacionadas à transmissão nociceptiva são aquelas já identificadas nas fibras aferentes primárias ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  e  $\xi$ ) e nas lâminas superficiais do CDME ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II e  $\gamma$ ) (VELÁZQUEZ et al., 2007). A ativação da via da PKC está relacionada aos efeitos nociceptivos causados por diversos estímulos, incluindo mediadores inflamatórios como a PGE<sub>2</sub> (via receptores EP4), bradicinina, endotelinas e adrenalina, sendo capaz de fosforilar componentes celulares como enzimas, canais iônicos (como TRPV1) e receptores de membrana (FERREIRA et al., 2005; SACHS et al., 2009). Assim, estudos os quais evidenciam a importância da PKC no processamento nociceptivo demonstram que inibidores da PKC são capazes de prevenir a fosforilação e ativação destes canais (TAIWO, LEVINE, 1991; PREMKUMAR, AHERN, 2000; BHAVE et al., 2003; FERREIRA et al., 2005; MEOTTI et al., 2006).

Outro dado que aponta para a importância desta proteína cinase no processamento nociceptivo é o fato de que ativadores da PKC, como o PMA, quando injetados periféricamente produzem nocicepção espontânea e hipersensibilidade térmica e mecânica em camundongos. Essas respostas nociceptivas estão associadas à translocação da PKC do citosol para a membrana das fibras aferentes primárias, indicando que a sua ativação está implicada na nocicepção periférica (FERREIRA et al., 2005; VELÁZQUEZ et al., 2007). De modo geral, a via da PKC também parece ser fundamental para o desenvolvimento da sensibilização periférica em fibras aferentes primárias, resultando posteriormente na hipersensibilidade térmica. Após uma lesão, a PKC parece aumentar a neurotransmissão excitatória e diminuir o tônus inibitório na sinapse dos aferentes primários no corno dorsal. Além disso, as isoformas  $\alpha$  e  $\epsilon$  parecem mediar a nocicepção periférica, enquanto a isoforma  $\gamma$  parece ser importante na nocicepção central (VELÁZQUEZ et al., 2007).

Portanto, considerando a importância da PKA e da PKC na transmissão nociceptiva e no desenvolvimento da hipersensibilidade após lesão tecidual, em especial do tipo inflamatória, foi investigado na sequência se o efeito antinociceptivo do EBMCb poderia ser devido à modulação destas vias. Para tanto, foi utilizado o modelo de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de ativadores das cascatas mediadas por PKA [PGE<sub>2</sub> e forskolina (FSK)] e por PKC (PGE<sub>2</sub>, PMA). Como resultado, foi observado que o pré-tratamento com o EBMCb foi capaz de prevenir a resposta nociceptiva pela PGE<sub>2</sub>, forskolina e PMA, bem como o edema de pata induzido por PGE<sub>2</sub> e PMA. Desta forma, os resultados apresentados sugerem que o EBMCb pode exercer seu efeito antinociceptivo por modulação das vias da PKC e PKA. Dessa forma, a fim de confirmar esta hipótese foi realizado ensaio de western blotting para verificar a ativação da PKA. Conforme descrito na sessão de resultados, a injeção intraplantar de FSK induziu o aumento da ativação da PKA na pata, observada como uma elevação nos níveis das subunidades catalíticas fosforiladas da PKA, e esse aumento foi prevenido pelo pré-tratamento dos animais com o EBMCb, sugerindo que um dos mecanismos pelos quais o composto exerce seu efeito antinociceptivo é pela inibição da ativação da via AMPc/PKA.

Adicionalmente, os dados obtidos até o momento, indicam fortemente o envolvimento de receptores TRPV1 no mecanismo de ação do EBMCb. Para tanto, na intenção de reforçar estes achados, realizamos um ensaio no qual avaliamos a ação sinérgica do EBMCb com seu antagonista seletivo, AMG9810, através da administração de doses subefetivas dos mesmos. Separadas, estas doses subefetivas não previnem a resposta nociceptiva quando é injetada capsaicina i.pl. nos animais, todavia, ao serem utilizadas juntas (EBMCb por via i.g. e AMG9810 por via i.p.) os efeitos se somam, resultando em diminuição da resposta nociceptiva frente ao estímulo álgico. Apesar do mecanismo exato pelo qual o sinergismo ocorre não esteja determinado, os dados apontam para uma ação do EBMCb para o tratamento de patologias que envolvam a participação dos canais TRPV1.

Por último, com relação a possíveis efeitos tóxicos, foi observado que o EBMCb administrado diariamente (30 dias) não alterou o ganho de peso dos animais em relação ao grupo controle, nem tampouco alterou o peso de órgãos importantes como coração, fígado, baço, rins e pulmões. Além disso, não houve mudança no perfil de ingestão de ração e água. Adicionalmente, a análise hematológica e bioquímica foi realizada para confirmar se o EBMCb não apresentava nenhuma

toxicidade. Os resultados mostraram, portanto, que não houve alteração no eritrograma e no leucograma, bem como nas dosagens bioquímicas realizadas (glicemia, ureia, creatinina, ácido úrico, AST, ALT, GGT, colesterol total, HDL e LDL). Estes dados, portanto, evidenciam a segurança no uso prolongado do EBMCb, o que reforça seu potencial terapêutico.

Coletivamente, os resultados apresentados demonstram que o extrato bruto metanólico de *Condalia buxifolia* possui importante efeito antinociceptivo em modelos agudos e prolongados de dor, com envolvimento inflamatório, e tal efeito parece ser mediado por interação com canais TRPV1 e ASIC, e com a via de sinalização AMPc/PKA e PLC/PKC, além da participação glutamatérgica e opioidérgica conforme ilustrado na Figura 14. Tais resultados evidenciam o uso de *Condalia buxifolia* na terapêutica e reforçam seu uso na medicina popular.

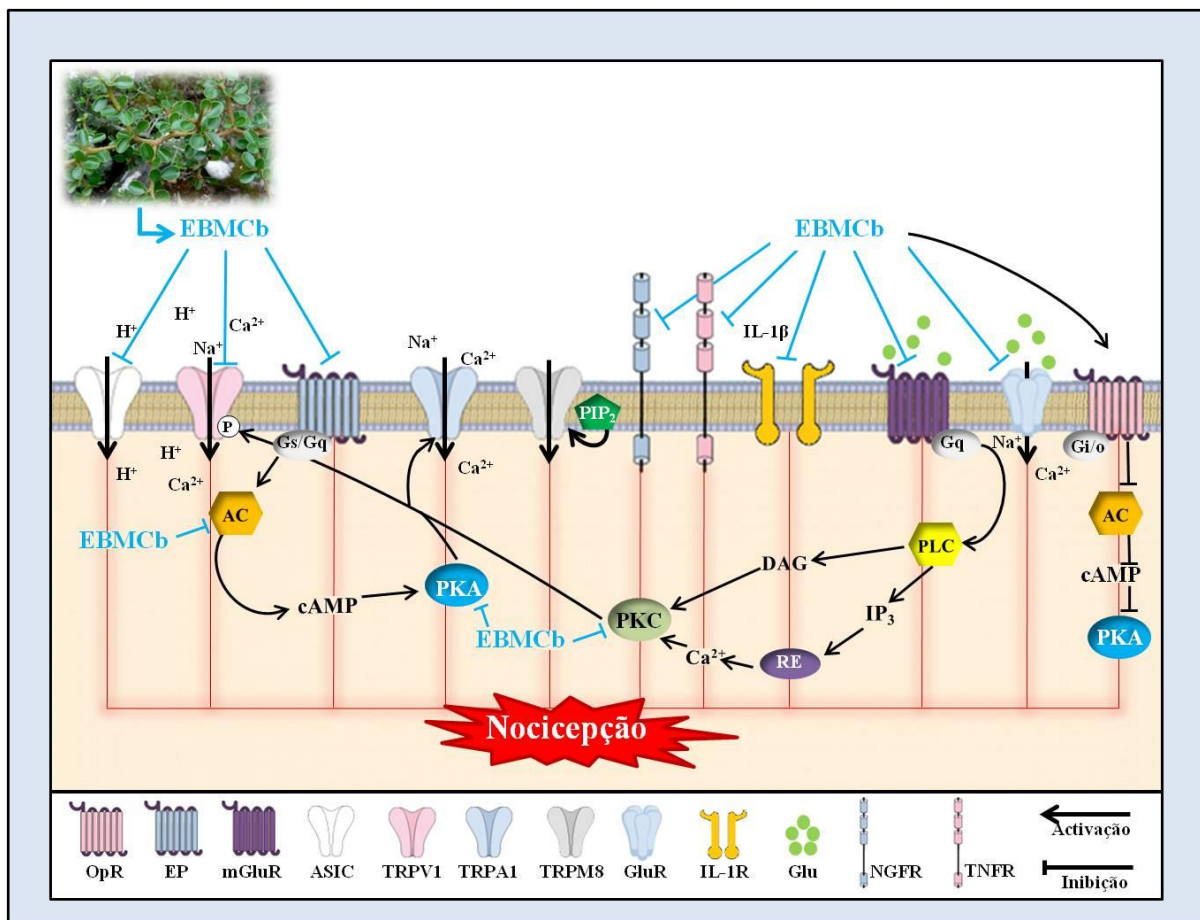


Figura 14: Representação esquemática dos possíveis mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo do EBMCb.

O esquema representa um terminal nociceptivo com diversos receptores, os quais podem ser ativados por diferentes estímulos (térmicos, químicos ou mecânicos). Tais estímulos podem ativar o nociceptor através de canais iônicos (TRPs, ASICs, gluR), GPCRs (pela via de sinalização PLC/PKC e/ou AC/AMPc/PKA) e RTKs, promovendo assim a nocicepção. Por outro lado, o pré-tratamento com o EBMCb mostrou-se efetivo na prevenção da resposta à diferentes estímulos álgicos, e esse efeito parece estar envolvido na via PKA/AMPc e PLC/PKC, bem como favorece a ativação da via inibitória da dor a partir do sistema opióide. Fonte: Elaborado pela autora (2015); Criação e arte por Leandro Flores do Nascimento (2015).

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo mostram que o extrato bruto metanólico de *Condalia buxifolia*, administrado pela via intragástrica, apresentou os seguintes efeitos:

- Atividade antinociceptiva no modelo do ácido acético (reduziu o número de contorções abdominais) possivelmente por inibir a síntese e/ou liberação de mediadores inflamatórios;
- Através do modelo da formalina, observou-se que o EBMCb reduziu o tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata após a injeção do agente álgico, na fase inflamatória, possivelmente por inibir a síntese e/ou liberação de mediadores inflamatórios;
- O efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do EBMCb, após a injeção i.pl. de formalina (2,5 %) permanece até a sexta hora após o tratamento com o mesmo;
- Redução no edema de pata induzido pela injeção i.pl. de formalina, sendo esta redução significativa na segunda e quarta hora, evidenciando um efeito anti-inflamatório local;
- Aumentou a latência de retirada da pata no teste de placa quente, possivelmente evidenciando uma ação central;
- O EBMCb pode estar atuando através da inibição glutamatérgica, uma vez que preveniu a resposta nociceptiva induzida pela injeção i.pl. de glutamato;
- O EBMCb pode estar atuando através de receptores TRPV1/ASICs uma vez que reduziu o tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata após a injeção i.pl. de capsaicina e salina ácida, respectivamente;
- O tratamento prolongado com o EBMCb reduziu a hiperalgesia térmica e mecânica no modelo de dor pós-operatória, possivelmente através da interação com receptores TRPV1 e mediadores inflamatórios, como citocinas;

- A inibição da via de sinalização PGE<sub>2</sub>/PKC/PKA pode estar envolvida no mecanismo antinociceptivo do EBMCb;
- Os efeitos antinociceptivos do EBMCb são mediados por interação com um dos principais sistemas endógenos de controle descendente da dor – opióide;
- O efeito antinociceptivo do EBMCb não é decorrente de efeitos inespecíficos sobre a atividade locomotora e exploratória;
- A administração prolongada do EBMCb, durante 30 dias, não acarreta em alterações perceptíveis de toxicidade como ganho ou redução de peso, alteração macroscópica de órgãos como o coração, fígado, pulmão, rim e baço, bem como da ingesta diária de ração e água; além disso, não houve alteração sanguíneas que indicassem toxicidade.

Em conjunto os dados obtidos no presente estudo fornecem evidências científicas que suportam o uso popular da *Condalia buxifolia* e a aparente baixa toxicidade contribui para o seu potencial terapêutico e para continuidade de estudos pré-clínicos aprofundados, e futuramente ensaios clínicos, visando o desenvolvimento de um fitoterápico para o controle da dor.



## 7 REFERÊNCIAS

AGRA, M.F., FRANÇA, P.F., BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17(1), p. 114-140, 2007.

AHERN, G.P.; BROOKS, I.M.; MIYARES, R.L.; WANG, X.B. Extracellular cations sensitize and gate capsaicin receptor TRPV1 modulating pain signaling. **The Journal of Neuroscience**, v. 25, p. 5109-16, 2005.

AKERELE, O. Summary of WHO guidelines for assessment of herbal medicines. **Herbal Gram**, v. 28, p.13-19, 1993.

AKOPIAN, A.N. Regulation of the nociceptive transmission at the periphery via TRPA1-TRPV1 interactions. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 12, p. 89-94, 2011.

ALBERTINI, R., VILLAVERDE, A.B., AIMBIRE, F., BJORDAL, J., BRUGNERA, A., MITTMANN, J., SILVA, J.A., COSTA, M. Cytokine mRNA expression is decreased in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low-level laser therapy. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 26, p. 19–24, 2008.

ALEY, K.O.; LEVINE, J.D. Role of protein kinase A in the maintenance of inflammatory pain. **The Journal of Neuroscience**, v. 19, p. 2181-2186, 1999.

ALEY, K.O.; MARTIN, A.; McMAHON, T.; MOK, J.; LEVINE, J.D.; MESSING, R.O. Nociceptor sensitization by extracellular signal-regulated kinases. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, p. 6933-6939, 2001.

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

ALMEIDA, J.R.G. da S. et al. Borneol, a Bicyclic Monoterpene Alcohol, Reduces Nociceptive Behavior and Inflammatory Response in Mice. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1-5, 2013.

ALMEIDA, T.F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**, v. 1000(1-2), p.40-56, 2004.

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

ARVIDSSON, U. et al. Delta-opioid receptor immunoreactivity: distribution in brainstem and spinal cord, and relationship to biogenic amines and enkephalin. **Journal of Neuroscience**, v. 15(2), p.1215-1235, 1995a.

ARVIDSSON, U. et al. Distribution and targeting of mu-opioid receptor (MOR1) in brain and spinal cord. **Journal of Neuroscience**, v. 15(5), p.3328-3341, 1995b.

AXELROD, F.B.; HILZ, M.J. Inherited autonomic neuropathies. **Seminars in Neurology**, v. 23(4), p.381-90, 2003.

BAGGIO, C.H. et al. Antinociception of b-D-glucan from *Pleurotus pulmonarius* is possibly related to protein kinase C inhibition. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, p. 872–877, 2012.

BARRET, K.E., BARMAN, S.M., BOITANO, S., BROOKS, H.L. **Fisiologia Médica de Ganong**. Porto Alegre – RS: AMGH Editora LTDA; 752 p, 2014.

BARROT, M. Tests and models of nociception and pain in rodents. **Neuroscience** 211: 39-50, 2012.

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

BASBAUM, A.I.; JESSEL, T.M. The perception of pain. In: KANDEL, E.R.; SCHATZ, J.H.; JESSEL, T.M. (eds). **Principles of neural science**. 4ed. New York: McGraw-Hill, p. 472-491, 2000.

BASTOS, N.R. A família Rhamnaceae R. Br. no Rio Grande do Sul. Gêneros *Condalia* Cav. e *Scutia* Comm. **Pesquisa Botânica**, v. 40, p.69–84, 1989.

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

BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. **Neuroscience, exploring the brain**. New York: Williams & Wilkins Publishers, p. 340-345, 1996.

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

BESSON, J.M. The neurobiology of pain. **The Lancet**, v. 353(9164), p.1610–15, 1999.

BESSON, P.; PERL, E.R. Responses of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. **Journal of Neurophysiology**, v. 32, p. 1025-1043, 1969.

BHAVE, G.; HU, H.J.; GLAUNER, K.S.; ZHU, W.; WANG, H.; BRASIER, D.J.; OXFORD, G.S.; GEREAU, R.W. Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 100, p. 12480-12485, 2003.

BLACKSHAW, L.A.; BRIERLEY, S.M.; HUGHES, P.A. TRP channels: new targets for visceral pain. **Gut** 59: 126-135, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. **Proposta de Política Nacional de Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos**. Brasília, 2001.

BRASILIA. Política nacional de Plantas medicinais e Fitoterápicos. Série b. Textos básicos de saúde, 2006.

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

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

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CALIXTO, J.B.; KASSUYA, C.A.L.; ANDRÉ, E.; FERREIRA, J. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their function. **Pharmacology & Therapeutics**, v 106, p. 179-208, 2005.

CARLINI, E.A. et al. Treatment of drug dependence with Brazilian herbal medicines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 690-695, 2006.

CARREIRA, E.U., CARREGARO, V., TEIXEIRA, M.M., MORICONI, A., ARAMINI, A., VERRI, W.A. JR, FERREIRA, S.H., CUNHA, F.Q., CUNHA, T.M. Neutrophils recruited by CXCR1/2 signalling mediate post-incisional pain. **European Journal of Pain**, v. 17, p. 654-663, 2013.

CARVALHO, B., CLARK, D.J., YEOMANS, D., ANGST, M.S. Collecting and measuring wound exudates biochemical mediators in surgical wounds. **Journal of visualized experiment**, v. 68, p. 1-5, 2012.

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

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

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

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

CHAPMAN, C.R.; GAVRIN, J. Suffering: the contributions of persistent pain. **The Lancet**, v. 353(9171), p. 2233-2237, 1999.

CHESSELL, I.P., HATCHER, J.P., BOUNTRA, C., MICHEL, A.D., HUGHES, J.P., GREEN, P., EGERTON, J., MURFIN, M., RICHARDSON, J., PECK, W.L., et al. Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. **Pain**, v. 114, p. 386–396, 2005.

COLLIER, H.O. et al. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 32, p. 295–310, 1968.

CONSELHO REGIONAL DE FARMÁCIA DO ESTADO DE SÃO PAULO. Plantas Medicinais e Fitoterápicos, 2012.

CORTRIGHT, D.N.; KRAUSE, J.E.; BROOM, D.C. TRP channels and pain. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1772, p. 978-988, 2007.

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

COUTAUX, A.; ADAM, F.; WILLER, J.C.; LE BARS, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint, bone, spine: revue du rhumatisme**, v. 72, n.5, p. 359-371, 2005.

CUNHA, F.Q.; TEIXEIRA, M.M.; FERREIRA, S.H. Pharmacological modulation of secondary mediator systems – cyclic AMP and cyclic GMP – on inflammatory hyperalgesia. **Brazilian Journal of Pharmacology**, v. 127, p. 671-678, 1999.

DA COSTA, D.S.M.; MEOTTI, F.C.; ANDRADE, E.L.; LEAL, P.C.; MOTTA, E.M.; CALIXTO, J.B. The involvement of the transient receptor potential A1 (TRPA1) in the maintenance of mechanical and cold hyperalgesia in persistent inflammation. **Pain**, v. 148, p. 431-437, 2010.

DA CUNHA, A. P. Aspectos históricos sobre plantas medicinais, seus constituintes ativos e fitoterapia, 2003.

DAVIS A.J.; Perkins M.N. The involvement of bradykinin B1 and B2 receptor mechanisms in cytokine-induced mechanical hyperalgesia in the rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 113, p. 63-68, 1994.

De AQUINO, A.B. et al. The Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of *Aspidosperma tomentosum* (Apocynaceae). **Hindawi Publishing Corporation**, v. 218627, p. 1-8, 2013.

DEVAL, E., GASULL, X., NOËL, J., SALINAS, M., BARON, A., DIOCHOT, S., LINGUEGLIA, E. Acid sensing ion channels (ASICs): pharmacology and implication in pain. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 128, p. 549–558, 2010.

DHAWAN, B.N. et al. Classification of opioid receptors. **Pharmacological Review**, v. 48(4), p.567-592, 1996.

DIB-HAJJ, S.D., YANG, Y., WAXMAN, S.G. Genetics and molecular pathophysiology of Na(v)1.7-related pain syndromes. **Advances in Genetics**, v. 63, p. 85–110, 2008.

DOBKIN, P.L.; BOOTHROYD, L.J. Organizing health services for patients with chronic pain: when there is a will there is a way. **Pain Medicine**, v. 9, p. 881-889, 2008.

DOLAN, S.; NOLAN, A.M. Biphasic modulation of nociceptive processing by the cyclic AMP-protein kinase A signaling pathway in sheep spinal cord. **Neuroscience Letters**, v. 309, p. 157-160, 2001.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 75, p. 125-131, 1995.

DRAY, A. Kinins and their receptors in hyperalgesia. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 75(6), p. 704 – 712, 1997.

DREWES, A.M. The physiology of pain. **Ugeskrift for Laeger**, v.168, n. 20, p. 941-1943, 2006.

DUBINSKY, B.; GEBRE-MARIAM, S.; CAPETOLA, R.J.; ROSENTHALE, M.E. The antialgesic drugs: human therapeutic correlates of their potency in laboratory animal models of hyperalgesia. **Agents and Actions**, v. 20, p. 50-60, 1987.

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

ESTACION, M., DIB-HAJJ, S.D., BENKE, P.J., Te MORSCHE, R.H., EASTMAN, E.M., MACALA, L.J., DRENTH, J.P., WAXMAN, S.G. NaV1.7 gain-of-function mutations as a continuum: A1632E displays physiological changes associated with erythromelalgia and paroxysmal extreme pain disorder mutations and produces symptoms of both disorders. **Journal of Neuroscience**, v. 28, p. 11079–11088, 2008.

FEIN, A. **Nociceptores: as células que sentem dor**. Ribeirão Preto – SP: Dor On Line; 106 p, 2011.

FERREIRA, J. TRICHÊS, K.M.; MEDEIROS, R.; CALIXTO, J.B. Mechanisms involved in the nociception produced by peripheral protein kinase a activation in mice. **Pain**, v. 117, p. 171-181, 2005 .

FRONTERA, M.A., TOMÁS, M.A., DIEZ, A., WATSON, C., MULET, C. Phytochemical study of *Condalia microphylla* Cav. **Molecules**, v. 5, p. 470-471, 2000.

FUKAWA, K. et al. A method for evaluating analgesic agents in rats. **Journal of Pharmacological Methods**, v. 4, p. 251–259, 1980.

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

FÜREDI, R., BÖLCSKEI, K., SZOLCSÁNYI, J., PETHO, G. Comparison of the peripheral mediator background of heat injury- and plantar incision-induced drop of the noxious heat threshold in the rat. **Life Science**, v. 86, p. 244-50, 2010.

FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Research Bulletin**, v. 48(2), p.129-141, 1999.

GREENWALD, R.A. Animal models for evolution of arthritic drug. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, v. 13, p. 75–83, 1991.

GRIFFIS, C.A.; COMPTON, P.; DOERING, L. The effect of pain on leucocyte cellular adhesion molecules. **Biological Research Nursing**, v. 7(4), p.297-312, 2006.

GUILHON, C.C. et al. Characterization of the anti- inflammatory and antinociceptive activities and the mechanism of the action of *Lippia gracilis* essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, p. 406–413, 2011.

HALBERSTEIN, R.A.; SIRKIN, A.; OJEDA-VAZ, M.M. When less is better: a comparison of Bach Flower Remedies and Homeopathy. **Annals of epidemiology**, v. 20(4), p. 298-307, 2010.

HARLAN, E.S.; ELIZABETH, A.L. Comparison of the peripheral and central effects of the opioid agonists loperamide and morphine in the formalin test in rats. **Neuropharmacology**, v.4(2), p.253–261, 2002.

HARVEY, R.J., DEPNER, U.B., WASSLE, H., AHMADI, S., HEINDL, C., REINOLD, H., SMART, T.G., HARVEY, K., SCHUTZ, B., ABO-SALEM, O.M., et al. GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization. **Science**, v. 304, p. 884–887, 2004.

HAYNES, S.E., HOLLOPETER, G., YANG, G., KURPIUS, D., DAILEY, M.E., GAN, W.B., JULIUS, D. The P2Y12 receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. **Nature Neuroscience**, v. 9, p. 1512–1519, 2006.

HEAPY, C.G.; JAMIESON, A.; RUSSEL, N.J.W. Afferent C-fibres and A delta activity in models of inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 90, p. 164–170, 1987.

HILL, R.G. Molecular basis for the perception of pain. **Neuroscientist**, v. 7(4), p.282-292, 2001.

HUANG, J.; ZHANG, X.; MCNAUGHTON, P.A. Modulation of temperature-sensitive TRP channels. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 17, p. 638-645, 2006.

IKEDA, Y. et al. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Sciences**, v. 69, p. 2911–2919, 2001.

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

JOHNSTON, M.C. Revision of *Condalia* including *Microrhamus* (Rhamnaceae). **Brittonia**, v. 14(4), p. 332–338, 1962.

JOHNSTON, M.C.; SOARES, F., M., A. Flora ilustrada Catarinense RAMN. p. 1-50, 1972.

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

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413(6852), p.203-210, 2001.

KANDEL, E.R., SCHWARTZ, J.H., JESSELL, T.M. Principles of Neural Science, 4th ed. McGraw-Hill, New York, 2000.

KASSUYA, C.A.L.; FERREIRA, J.; CLAUDINO, R.F.; CALIXTO, J.B. Intraplantar PGE2 causes nociceptive behaviour and mechanical allodynia: the role of prostanoid E receptors and protein kinases. **British Journal of Pharmacology**, v. 150, p. 727-737, 2007.

KAZLAUCKAS, V. et al. Behavioral and cognitive profile of mice with high and low exploratory phenotypes. **Behavioural Brain Research**, v. 162, p. 272-278, 2005.

KELLER, A.F., BEGGS, S., SALTER, M.W., DE KONINCK, Y. Transformation of the output of spinal lamina I neurons after nerve injury and microglia stimulation underlying neuropathic pain. **Molecular Pain**, v. 3, p. 27, 2007.

KHASAR, S.G.; LIN, Y.H.; MARTIN, A.; DADGAR, J.; McMAHON, T.; WANG, D.; HUNDLE, B.; ALEY, K.O.; ISENBERG, W.; McCARTER, G.; GREEN, P.G.; HODGE, C.W.; LEVINE, J.D., MESSING, R.O. A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase C $\epsilon$  mutant mice. *Neuron*, v. 24, p. 253-260, 1999.

KIM, D., KIM, M.A., CHO, I.H., KIM, M.S., LEE, S., JO, E.K., CHOI, S.Y., PARK, K., KIM, J.S., AKIRA, S., et al. A critical role of toll-like receptor 2 in nerve injury-induced spinal cord glial cell activation and pain hypersensitivity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 14975–14983, 2007.

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

KOBAYASHI, K., YAMANAKA, H., FUKUOKA, T., DAI, Y., OBATA, K., NOGUCHI, K. P2Y12 receptor upregulation in activated microglia is a gateway of p38 signaling and neuropathic pain. **Journal of Neuroscience**, v. 28, p. 2892–2902, 2008.

KRAYCHETE, D.C., CALASANS, M.T.A., VALENTE, C.M.L. Citocinas pró-inflamatórias e dor. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 46, p. 199–206, 2006.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews**, v. 53 p. 597-652, 2001.

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

LEVY, D.; STRASSMAN, A.M. Distinct sensitizing effects of the cAMP–PKA second messenger cascade on rat dural mechanonociceptors. **Journal of Physiology**, v. 538, p. 483-493, 2002.

LIEBMANN, C.; BÖHMER, F.D. Signal transduction pathways of G protein-coupled receptors and their cross-talk with receptor tyrosine kinases: lessons from bradykinin signaling. **Current Medicinal Chemistry**, v 7, p. 911-943, 2000.

LINDIA, J.A., MCGOWAN, E., JOCHNOWITZ, N., ABBADIE, C. Induction of CX3CL1 expression in astrocytes and CX3CR1 in microglia in the spinal cord of a rat model of neuropathic pain. **Journal of Pain**, v. 6, p. 434–438, 2005.

LOESER, J.D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **The Lancet**, v. 353(9164), p.1607-1609, 1999.

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

LORD, J.A. et al. Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. **Nature**, v. 267(5611), p.495–99, 1977.



LORENZI, H. E.; MATOS, F.J. DE A. *Plantas medicinais no Brasil/Nativas e exóticas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2002. 512 p

LOTTEMBERG, A.M.P. Importância da gordura alimentar na prevenção e no controle de distúrbios metabólicos e da doença cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 53(5), p. 595-607.

LÜDTKE, R.; RUTTEN, A.L.B. The conclusions on the effectiveness of homeopathy highly depend on the set of analyzed trials. **Journal of Clinical Epidemiology**, v. 61, p. 1197-1204, 2008.

MALATYNSKA, E. Anhedonic-like traits and lack of affective deficits in 18-month-old C57BL/6 mice: Implications for modeling elderly depression. **Experimental Gerontology**, v. 47, p. 552-564, 2012.

MALDANER, G. **Estudo dos metabólitos secundários de *Condalia buxifolia* e *Scutia buxifolia* e suas atividades antimicrobianas**. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal de Santa Maria. 2005.

MALMBERG, A.B.; BRANDON, E.P.; IDZERDA, R.L.; LIU, H.; McKNIGHT, G.S.; BASBAUM, A.I. Diminished inflammation and nociceptive pain with preservation of neuropathic pain in mice with a targeted mutation of the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. **The Journal of Neuroscience** 17: 7462-7470, 1997.

MAMET, J. et al. Proinflammatory mediators, stimulators of sensory neuron excitability via the expression of acid-sensing ion channels. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, p. 10662–10670, 2002.

MARCHAND, F.; PERRETI, M.; McMAHON, S.B. Role of the immune system in chronic pain. **Nature Reviews Neuroscience**, p. 6, p. 521-532, 2005.

MARCHAND, J.; MONSEUR, X. Alcaloiïdes peptidiques, VII (5). Le myrianthines-A, B et C, alcaloiïdes du Myrianthus arboreus P. Beauv. (Urticacées). **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v. 26(12), p. 771–778, 1968.

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

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

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

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

McMAHON, S.B.; BENNETT, D.L.H.; BEVAN, S. Inflammatory mediators and modulators of pain. In: McMahon, S.B.; Koltzenburg, M. (eds). Wall and Melzack's textbook of pain. Elsevier: Philadelphia, p. 49-72, 2008.

McMAHON, S.B.; CAFFERTY, W.B.J.; MARCHAND, F. Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. **Experimental Neurology**, v 192, p. 444-462, 2005.

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

MENGUE, S.S., MENTZ, L.A., SCHENKEL, E.P. Uso de plantas medicinais na gravidez. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11(1), p.21-35, 2001.

MEOTTI, F.C.; LUIZ, A.P.; PIZZOLATTI, M.G.; KASSUYA, C.A.L.; CALIXTO, J.B.; SANTOS, A.R.S. Analysis of the antinociceptive effect of the flavonoid myricitrin: evidence for a role of the L-arginine-nitric oxide and protein kinase C pathways. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 316, p. 789-796, 2006.

MERSKEY, H. Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. **Pain**, v.3, p.S1-S226, 1986.

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

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

MIRAUCCOURT, L.S., DALLEL, R., VOISIN, D.L. Glycine inhibitory dysfunction turns touch into pain through PKC gamma interneurons. **PLoS One**, v. 2:e1116, 2007.

MONTELL, C. The TRP superfamily of cation channels. **Science's STKE** 272: re3, 2005.

MORAN, M.M.; MCALEXANDER, M.A.; BIRÓ, T.; SZALLASI, A. Transient receptor potential channels as therapeutic targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, p. 601620, 2011.

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

MOREL, A.F. et al. Antibacterial cyclopeptide alkaloids from the bark of *Condalia buxifolia*. **Phytochemistry**, v. 61(5), p. 561-568, 2002.

MOREL, A.F. et al. **Phytochemistry**, v.18, p. 473-477, 1979.

MOREL, A.F.; MACHADO, E.C.; WESSJOHANN, L.A. Cyclopeptide alkaloids of *Discaria febrifuga* (Rhamnaceae). **Phytochemistry**, v. 39(2), p. 431-434, 1995.

MUÑOZ-ABELLÁN, C.; ARMARIO, A.; NADAL, R. Do odors from different cats induce equivalent unconditioned and conditioned responses in rats? **Physiology & Behavior**, v. 99, p. 388-394, 2010.

MURRAY, C.W.; PORRECA, F.; COWAN, A. Methodological refinements to the mouse paw formalin test. An animal model of tonic pain. **Journal of Pharmacological Methods**, v. 20, p. 175–186, 1988.

NAKAMURA, M., NISHIWAKI, Y., SUMITANI, M., USHIDA, T., YAMASHITA, T., KONNO, S., TAGUCHI, T., TOYAMA, Y. Investigation of chronic musculoskeletal pain (third report): with special reference to the importance of neuropathic pain and psychogenic pain. **Journal of orthopaedic science**, v. 19, n. 4, p. 667-75, 2014.

NAYAK, C. et al. A prospective multi-centric open clinical trial of homeopathy in diabetic distal symmetric polyneuropathy. *Homeopathy*, v. 102(2), p. 130-138, 2013.

OBATA, K., KATSURA, H., MIYOSHI, K., KONDO, T., YAMANAKA, H., KOBAYASHI, K., DAI, Y., FUKUOKA, T., AKIRA, S., NOGUCHI, K. Toll-like receptor 3 contributes to spinal glial activation and tactile allodynia after nerve injury. **Journal of Neurochemistry**. 2008

OBATA, K.; KATSURA, H.; MIZUSHIMA, T.; YAMANAKA, H.; KOBAYASHI, K.; DAI, Y.; FUKUOKA, T.; TOKUNAGA, A.; TOMINAGA, M.; NOGUCHI, K. TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, p. 2393-2401, 2005.

OLAUSON, H., COLE, J., RYLANDER, K., MCGLONE, F., LAMARRE, Y., WALLIN, B.G., KRAMER, H., WESSBERG, J., ELAM, M., BUSHNELL, M.C., et al. Functional role of unmyelinated tactile afferents in human hairy skin: sympathetic response and perceptual localization. **Experimental Brain Research**, v. 184, p. 135–140, 2008.

OLIVEIRA, F.S.; DE SOUSA, D.P.; ALMEIDA, R.N. Antinociceptive effect of hydroxydihydrocarvone. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, p. 588–591, 2008.

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

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

OMOTE, K., KAWAMATA, T., NAKAYAMA, Y., KAWAMATA, M., HAZAMA, K., NAMIKI, A. The effects of peripheral administration of a novel selective antagonist for prostaglandin E receptor subtype EP(1), ONO-8711, in a rat model of postoperative pain. **Anesthesia and analgesia**, v. 92, p. 233-8, 2001.

OSSIPOV, M. H.; DUSSOR, G. O.; PORRECA, F. Central modulation of pain. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 120, n. 11, p. 3779-2787, 2010.

OTUKI, M.F.; FERREIRA, J.; LIMA, F.V.; MEYRE-SILVA, C.; MALHEIROS, A.; MULLER, L.A.; CANI, G.S.; SANTOS, A.R.S.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Antinociceptive properties of mixture of  $\alpha$ -amyrin and  $\beta$ -amyrin triterpenes: evidence for participation of protein kinase C and protein kinase A pathways. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 313, p. 310-318, 2005. **Pain** 137, p. 473-477, 2008.

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

PARVEEN, Z. et al. Antiinflammatory and analgesic activities of *Thesium chinense* Turcs extracts and its major flavonoids, kaempferol and kaempferol-3-O-glucoside. **The Pharmaceutical Society of Japan**, v. 127(8), p. 1275-1279, 2007.

PEREIRA, R.C., OLIVEIRA, M.T.R., LEMOS, G.C.S. Plantas utilizadas como medicinais no município de Campos de Goytacazes - RJ. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, p. 37-40, 2004.

PERL, E.R. Ideas about pain, a historical view. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, p. 71-80, 2007.

PERL, E.R. Pain mechanisms: a commentary on concepts and issues. **Progress in Neurobiology** 94: 20–38, 2011.

PERTOVAARA, A. Noradrenergic pain modulation. **Progress in Neurobiology**, v. 80, p. 53-83, 2006.

PINTO, L.G.; JESSE, C.R.; NOGUEIRA, C.W.; SAVEGNAGO, L. Evidence for the involvement of glutamatergic and GABAergic systems and protein kinase A pathway in the antinociceptive effect caused by p-methoxy-diphenyl diselenide in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 88, p. 487-496, 2008.

PISERA, D. Fisiologia da dor. In: **Dor Avaliação e Tratamento em Pequenos Animais**. OTERO, P. E. São Paulo:Interbook, p. 30-74, 2005.

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

PREMKUMAR, L.S.; ABOOJ, M. TRP channels and analgesia. **Life Sciences** 2012, in press.

PREMKUMAR, L.S.; AHERN, G.P. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. **Nature**, v. 408, p. 985-990, 2000.

RANG, H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M., FLOWER, R.J., HENDERSON, G. **Rang & Dale Farmacologia**. Rio de Janeiro – RJ: Elsevier; 778 p, 2011.

REN, K., DUBNER, R. Neuron-glia crosstalk gets serious: role in pain hypersensitivity. **Current Opinion in Anaesthesiology**, v. 21, p. 570–579, 2008.

RIBEIRO, R.A. et al. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 387, p. 111–118, 2000.

RICHARDSON, J.D., VASKO, M.R. Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 302(3), p.839-45, 2002.

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

RIOS, E.R.V. et al. TRP and ASIC channels mediate the antinociceptive effect of citronellyl Acetate. **Chemico-Biological Interactions**, v. 203, p. 573–579, 2013.

ROSA, C.; CÂMARA, S.G.; BÉRIA, J.U. Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica à saúde. **Ciências & Saúde Coletiva**, v. 16, n. 1, p. 311-318, 2011.

RUJJANAWATE, C.; KANJANAPOTHI, D.; PANTHONG, A. Pharmacological effect and toxicity of alkaloids from *Gelsemium elegans* Benth. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 91–95, 2003.

RUSSO, C.M.; BROSE, W.G. Chronic pain. **Annual Review of Medicine**, v.49, p.123-33, 1998.

SACHS, D.; VILLARREAL, C.F.; CUNHA, F.Q.; PARADA, C.A.; FERREIRA, S.H. The role of PKA and PKC $\epsilon$  pathways in prostaglandin E2-mediated hypernociception. **British Journal of Pharmacology**, v. 156, p. 826–834, 2009.

SANTOS, A.R.S. et al. Antinociceptive properties of the new alkaloid, cis-8, 10-di-N-propyllobelidiol hydrochloride dihydrate isolated from *Siphocampylus verticillatus*: evidence for the mechanism of action. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 289, p.417–26, 1999.

SCHIENE, K.; VRY, J.D.; TZSCHENTKE, T.M. Antinociceptive and antihyperalgesic effects of tapentadol in animal models of inflammatory pain. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 339, p. 537-544, 2011.

SCHMELZ, M.; PETERSEN, L.J. Neurogenic inflammation in human and rodent skin. **News in Physiological Sciences**, v. 16, p. 33-7, 2001.

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

SHAH, A.H. et al. **Fitoterapia**, v. 6, p. 57, 1986.

SHANG, A. et al. Are the clinical effects of homoeopathy placebo effects? Comparative study of placebo-controlled trials of homoeopathy and allopathy. **Lancet**, v. 366, p. 726-32, 2005.

SHIBATA, M. et al. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, v. 38, p. 347-352, 1989.

SIERRA, M.G., et al. Peptide alkaloids of *Scutia buxifolia*. **Phytochemistry**, v. 13, p. 2865-2869, 1974.

SIMÕES, R.R., COELHO, I.S., JUNQUEIRA, S.C., MALDANER, G., MOREL, A.F., VENZKE, D., RUANI, A.P., PIZZOLATTI, M.G., ZANCHET, E.M., SANTOS, A.R.S. Pharmacological evidence favouring the traditional use of the root bark of *Condalia buxifolia* Reissek in the relief of pain and inflammation in mice. **The Journal of Ethnopharmacology**, 2015.

SKALHEGG, B.S.; TASKÉN, K. Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway: differential expression, regulation and subcellular localization of subunits of PKA. **Frontiers in Bioscience**, v. 2, p. 331-342, 1997.

SOBRAL, M. et al. **Flora arbórea e arborescente do Rio Grande do Sul, Brasil**. São Carlos, RiMA/Novo Ambiente, 2006.

SPOFFORD, C.M., BRENNAN, T.J. Gene expression in skin, muscle, and dorsal root ganglion after plantar incision in the rat. **Anesthesiology**, v. 117, p. 161-172, 2012.

STORY, G.M.; PEIER, A.M.; REEVE, A.J.; EID, S.R.; MOSBACHER, J.; HRICIK, T.R.; EARLEY, T.J.; HERGARDEN, A.C.; ANDERSSON, D.A.; HWANG, S.W.; MCINTYRE, P.; JEGLA, T.; BEVAN, S.; PATAPOUTIAN, A. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. **Cell**, v. 112, p. 819-829, 2003.

STUCKY, C.L.; DUBIN, A.E.; JESKE, N.A.; MALIN, S.A.; MCKEMY, D.D.; STORY, G.M. Roles of transient receptor potential channels in pain. **Brain Research Reviews**, v. 60, p. 2-23, 2009.

TAIWO, Y.O.; LEVINE, J.D. Further confirmation of the role of adenylyl cyclase and of cAMP-dependent protein kinase in primary afferent hyperalgesia. **Neuroscience**, v. 44, p. 131-135, 1991.

TAYLOR, S.S.; KIM, C.; CHENG, C.Y.; BROWN, S.H.J.; WU, J.; KANNAN, N. Signaling through cAMP and cAMP-dependent protein kinase: diverse strategies for drug design. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1784, p. 16-26, 2008.

TEIXEIRA, M.J.; CORREA, C.F.; PIMENTA, C.A.M. **Dor: conceitos gerais**. São Paulo: Limay, p.72, 1994.

TEIXEIRA, M.J.; OKADA, M. Dor: Evolução histórica dos conhecimentos. In: NETO, O. A. et al. **Dor- Princípios e Práticas**. São Paulo: Ed. Artmed S.A., 2009a.

TEIXEIRA, M.J.; OKADA, M. Dor: Evolução histórica dos conhecimentos. In: OLIVEIRA, L.F. et al. **Dor- Princípios e Práticas**. São Paulo: Ed. Artmed S.A., 2009b.

TJOLSEN, A. et al. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, p. 5–17, 1992.

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

TORSNEY, C., MACDERMOTT, A.B. Disinhibition opens the gate to pathological pain signaling in superficial neurokinin 1 receptor-expressing neurons in rat spinal cord. **Journal of Neuroscience**, v. 26, p. 1833–1843, 2006.

TORTOSA, R. D.; NOVARA, L. J. Flora del Valle de Lerma. **Aportes botânicos de Salta- Ser. Flora**, v. 1, p, 1-21, 1992.

TRONGSAKUL, S. et al. The analgesic, antipyretic and anti-inflammatory activity of *Diospyros variegata* Kruz. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, p. 221–225, 2003.

TSCHESCHE, R., AMMERMANN, E. Scutianine-C, -D und -E, drei weitere cyclopeptidalkaloide aus *Scutia buxifolia* Reiss. **Chemische Berichte**, v. 107, p. 2274–2283, 1974.

TSCHESCHE, R.; AMMERMANN, E.; FEHLHABER, H.W. Alkaloide aus Rhamnaceae X. **Tetrahedron Letters**, v. 46, p. 4405–4408, 1971.

TSUDA, M., SHIGEMOTO-MOGAMI, Y., KOIZUMI, S., MIZOKOSHI, A., KOHSAKA, S., SALTER, M.W., INOUE, K. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. **Nature**, v. 424, p. 778– 783, 2003.

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? **Brain Research Reviews**, v. 46, p.295-309, 2004.

VEIGA, Jr. V. F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

VEIGA, Jr. V. F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: Cura segura? **Química Nova**, v. 28(3), p. 519-528, 2005.

VELÁZQUEZ, K.T.; MOHAMMAD, H.; SWEITZER, S.M. Protein kinase C in pain: involvement of multiple isoforms. **Pharmacological Research**, v. 55, p. 578-589, 2007.

VELLANI, V.; MAPPLEBECK, S.; MORIONDO, A.; DAVIS, J.B.; McNAUGHTON, P.A. Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide. **Journal of Physiology**, v. 534, p. 813-825, 2001.

VICTORIO, C.P.; LAGE, C.L.S. Uso de plantas medicinais. **Revista Arquivos FOG – Saúde, Sociedade, Gestão e Meio Ambiente**, v. 5 (1), p. 33-41, 2008.

VILLARREAL, C.F.; FUNEZ, M.I.; FIGUEIREDO, F.; CUNHA, F.Q.; PARADA, C.A.; FERREIRA, S.H. Acute and persistent nociceptive paw sensitization in mice: the involvement of distinct signaling pathways. **Life Sciences**, v. 85, p. 822-829, 2009.

VOILLEY, N. et al. Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, p. 8026–8033. 2001.

WANG, H. et al. Conditioned fear stress combined with single-prolonged stress: A new PTSD mouse model. **Neuroscience Research**, v. 73, p. 142-152, 2012.

WANG, H., WOOLF, C.J. Pain TRPs- Minireview. **Neuron**, v. 46, p. 9-12, 2005.

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

WATANABE, H.M. et al. TRP channel and cardiovascular disease. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 118(3): 337-51, 2008.



WATKINS, L.R., MAIER, S.F. Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 981–1011, 2002.

WHEELER-ACETO, H.; COWAN, A. Neurogenic and tissue mediated components of formalin-induced oedema: evidence for supraspinal regulation. **Agents Actions**, v. 34, p. 264–269, 1991;

WHITE, J.P.M. et al. Role of Transient Receptor Potential and Acid-sensing Ion Channels in Peripheral Inflammatory Pain. **Anesthesiology**, v. 112, p. 729-741, 2010.

WHO. World Health Organization. Traditional medicine. 2008.

WOOLF, C.J. Pain. **Neurobiological Disease**, v. 7(5), p.504-510, 2000.

WOOLF, C.J.; SALTER, M.W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v. 288, p. 1765-1768, 2000.

YAJIMA, Y.; NARITA, M.; SHIMAMURA, M.; NARITA, M.; KUBOTA, C.; SUZUKI, T. Differential involvement of spinal protein kinase C and protein kinase A in neuropathic and inflammatory pain in mice. **Brain Research**, v. 992, p. 288–293, 2003.

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

ZHUANG, Z.Y., KAWASAKI, Y., TAN, P.H., WEN, Y.R., HUANG, J., JI, R.R. Role of the CX3CR1/p38 MAPK pathway in spinal microglia for the development of neuropathic pain following nerve injury-induced cleavage of fractalkine. **Brain Behaviour Immunology**, v. 21, p. 642–651, 2007.

ZYGLADO, J.A., ABBURRA, R.E., MAESTRI, D.M., GUZMAN, C.A. Distribution of alkanes and fatty acids in the *Condalia montana* (Rhamnaceae) species complex. **Plant systematics and evolution**, v. 179, p. 89-93, 1992.

## **ANEXOS**

### **Anexo 1**

**Carta de aprovação CEUA-UFSM**



**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:** "Estudo complementar da atividade analgésica do extrato bruto metanólico da *Condalia buxifolia* ."

**Numero do Parecer:** 046/2012

**Pesquisador Responsável:** Eliane Maria Zanchet

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.

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

**DATA DA REUNIÃO DE APROVAÇÃO:**

Santa Maria, 18 de Junho de 2012.

Roselei Fachinetto  
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-UFSM

## **Anexo 2**

**Carta de aprovação CEUA- UFSC**



Universidade Federal de Santa Catarina  
 Pró-Reitoria de Pesquisa – PRPe  
 Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

**Resultado de Solicitação de Protocolo**

**Protocolo**

PP00745

**Título**

Protocolos dos modelos comportamentais utilizados no laboratório de neurobiologia da dor e da inflamação

**Data de Entrada**

13/06/2012

**Resultado:**

Aprovado

**Data/Prazo**

05/12/2014

**Considerações**

Ofício nº 223/CEUA/PROPESQ/2014

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais- CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a), Adair Roberto Soares dos Santos, Departamento de Ciências Fisiológicas - CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO adendo para utilização de dois mil e quarenta camundongos (*Mus musculus*)

Adita-se o Ofício nº 146/CEUA/PROPESQ/2014

Ofício nº 91/CEUA/PRPE/2012

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Adair Roberto Soares dos Santos, Departamento de Ciências Fisiológicas - CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

Os procedimentos elencados no parecer estão credenciados para uso no seu laboratório pelo período de quatro anos. Qualquer alteração destes, ou inclusão de novos, deverão ser apreciados pela CEUA-UFSC novamente.

Este credenciamento é válido para a utilização das espécies animais: doze mil e novecentos e sessenta camundongos (*Mus musculus*) e um mil trezentos e quarenta e quatro ratos (*Rattus Norvegicus*).

Procedência do animal: Biotério Central da UFSC

Por ocasião do término deste período de credenciamento, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais com estes procedimentos aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

**Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)**  
**Data 09/01/2017**

Data 08/12/2014

**Parecer(es):**



**Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.**  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC**  
**PRESIDENTE**