

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Avaliação do efeito analgésico e anti-inflamatório do biseugenol em modelos de dor e hiperalgesia em ratos

Ludmila Malva Silva

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Biotecnologia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do
grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia – MG

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Avaliação do efeito analgésico e anti-inflamatório do biseugenol em modelos de dor e
hiperalgesia em ratos

Ludmila Malva Silva

Orientador(a): Prof^a. Dra. Celina Monteiro da Cruz Lotufo

Homologado pela coordenação do Curso
de Biotecnologia em ___/___/___.

Prof. Dr. Nilson Nicolau Júnior

Uberlândia – MG

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Avaliação do efeito analgésico e anti-inflamatório do biseugenol em modelos de dor e
hiperalgesia em ratos

Ludmila Malva Silva

Orientador(a): Prof^a. Dra. Celina Monteiro da Cruz Lotufo

Banca examinadora:

Prof^a Dr^a Celina Monteiro da Cruz Lotufo (UFU)

Dr^a Débora de Oliveira Santos (UFU)

Dr. Bruno Antonio Ferreira (UFU)

Uberlândia – MG

2023

Agradeço a Deus por possibilitar meu desenvolvimento pessoal e profissional, capacitando-me diariamente para a elaboração desta monografia. Sua força tem sido essencial para vivenciar cada momento singular ao longo desta jornada acadêmica.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Uberlândia, ao Instituto de Biotecnologia e à Coordenadoria do Programa de Graduação em Biotecnologia, expresso minha gratidão pela estrutura e suporte fornecidos para a realização deste trabalho.

À minha orientadora, Prof. Dra. Celina Lotufo, expresso profunda gratidão pela oportunidade e confiança que depositou em mim e no meu trabalho ao longo do desenvolvimento deste projeto. Agradeço a orientação, inspiração, paciência e suporte, elementos fundamentais para o meu amadurecimento científico.

Agradeço ao grupo de pesquisa em Neurofisiologia por todo o auxílio e compreensão proporcionados durante a elaboração deste projeto.

Agradeço à Rede de Biotério da Universidade Federal de Uberlândia (REBIR), pela dedicação excepcional e cuidado exemplar com os animais.

A todos os professores que estiveram presentes nesta fase, expresso minha gratidão por ensinarem tudo o que sei e por serem fontes inspiradoras de dedicação.

Agradeço aos membros da banca examinadora por concordarem em avaliar nosso trabalho, enriquecendo-o com seus conhecimentos e experiências.

Agradeço à minha família por nunca julgar minhas escolhas e por apoiar meus sonhos.

Agradeço aos meus amigos de longa data por permanecerem presentes até os dias atuais, oferecendo apoio e incentivo a cada passo desta jornada.

Agradeço aos amigos que conquistei nesta fase tão especial da minha vida, principalmente ao Topper, por tornarem meus dias mais leves e divertidos. A experiência na faculdade não seria a mesma sem vocês.

"Somos assim. Sonhamos o voo, mas tememos as alturas. Para voar é preciso amar o vazio. Porque o voo só acontece se houver o vazio. O vazio é o espaço da liberdade, a ausência de certezas. Os homens querem voar, mas temem o vazio. Não podem viver sem certezas. Por isso trocam o voo por gaiolas. As gaiolas são o lugar onde as certezas moram."

- Rubens Alves

RESUMO

Individualmente, a descoberta de novos medicamentos, ou de medicamentos acessíveis, pode determinar a melhoria da qualidade de vida nas doenças crônicas ou a própria sobrevivência do paciente acometido. Socialmente, a descoberta de fontes naturais e locais de compostos químicos geralmente importados e/ou o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos de fabricação nacional podem ter consequências econômicas significativas, além de permitir autonomia a cada país na gestão de suas políticas de saúde. Ao longo dos anos, vários medicamentos com efeitos terapêuticos foram desenvolvidos para inibir as COXs. No entanto, os inibidores da COX-1, como o ibuprofeno e o diclofenaco, podem causar toxicidade gástrica indesejada e efeitos nefrotóxicos, enquanto os inibidores da COX-2, como o celecoxibe, apresentam menos efeitos colaterais. Nesse contexto, os fenilpropanóides e as lignanas/neolignanas pertencem a uma classe mais ampla de metabólitos especializados utilizados no desenvolvimento de anti-inflamatórios como o ibuprofeno (Souza et al., 2020). O desidrodieugenol (DDE), também conhecido como biseugenol, é um metabólito secundário da classe das neolignanas caracterizada por ser um ortodímero do eugenol que pode ser preparado sinteticamente por uma reação de oxidação. Os neolignanos, como o biseugenol, são compostos capazes de modular o processo inflamatório, alterando inclusive alguns componentes-chave da angiogênese e do reparo tecidual, de forma a favorecer a resposta inflamatória. Além disso, em estudos recentes (Taguchi et al., 2023) demonstraram pela primeira vez num modelo in vivo de enfisema pulmonar que o eugenol e o biseugenol, ambos isolados de *N. leucantha*, reduziram a destruição alveolar e, conseqüentemente, a inflamação pulmonar e as citocinas inflamatórias. Alguns possíveis mecanismos destes compostos podem estar relacionados com a redução do estresse oxidativo, especialmente a inibição de iNOS e NF.

Assim, considerando a urgente necessidade de descoberta de fármacos para doenças crônicas e inflamatórias, torna-se relevante avaliar os efeitos e possíveis mecanismos de ação do biseugenol em modelo experimental de dor e hiperalgesia em ratos.

Palavras-chave: Biseugenol, Neolignanas, Produtos Naturais, Resposta Inflamatória, Dor.

ABSTRACT

Individually, the discovery of new drugs, or accessible drugs, can determine the improvement of the quality of life in chronic diseases or the very survival of the affected patient. Socially, the discovery of natural and local sources of usually imported chemical compounds and/or the development of domestically manufactured herbal medicines can have significant economic consequences, in addition to enabling autonomy for each country in managing its health policies. Over the years, several drugs with therapeutic effects have been developed to inhibit COXs. However, COX-1 inhibitors such as ibuprofen and diclofenac can cause unwanted gastric toxicity and nephrotoxic effects, whereas COX-2 inhibitors such as celecoxib have fewer side effects. In this context, phenylpropanoids and lignans/neolignans belong to a broader class of specialized metabolites used in the development of anti-inflammatories such as ibuprofen (Souza et al., 2020). Dehydrodieugenol (DDE), also known as bis-eugenol, is a secondary metabolite of the class of neolignans characterized by being an ortho dimer of eugenol that can be synthetically prepared by an oxidation reaction. Neolignans, such as dehydrodieugenol, are compounds capable of modulating the inflammatory process, even altering some key components of angiogenesis and tissue repair, in order to favor the inflammatory response. Also, in recent studies (Taguchi et al., 2023) demonstrated for the first time in an in vivo model of pulmonary emphysema that eugenol and biseugenol, both isolated from *N. leucantha*, reduced alveolar destruction and, consequently, pulmonary inflammation and pulmonary cytokines. Some possible mechanisms of these compounds may be related to the reduction of oxidative stress, especially iNOS and NF inhibition.

Thus, considering the urgent need to discover drugs for chronic and inflammatory diseases, it becomes relevant to evaluate the effects and possible mechanisms of action of biseugenol in an experimental model of pain and hyperalgesia in rats.

Key-words: Biseugenol, Neolignans, Natural Products, Inflammatory response, Pain.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1- Sensibilização dos neurônios	9
Figura 2- Representação das características estruturais do gânglio da raiz dorsal	12
Figura 3- Gânglio da Raiz Dorsal.	17
Figura 4- Representações das estruturas químicas das moléculas de Eugenol e Biseugenol.	19
Figura 5- Representação do equipamento de pletismometro para avaliação do edema na pata	25
Figura 6- Efeito do biseugenol sobre o influxo de cálcio induzido por capsaicina nas culturas primárias de GRD.	26
Figura 7- Efeito do Biseugenol sobre o potencial de repouso em neurônios sensoriais primários.....	27
Figura 8- Efeito do biseugenol sobre o potencial de repouso em células da glia.....	28
Figura 9- Teste de nocicepção induzida pela capsaicina.	29
Figura 10- Teste de hiperalgesia induzida por carragenina.	30
Figura 11- Teste de avaliação do edema da pata.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs	Anti-inflamatórios não Esteroides
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina Trifosfato
Ca ²⁺	Cálcio
CGS	Célula Glial Satélite
CO ₂	Gás Carbônico
COX	Enzima Ciclo-Oxigenase
DDE	Desidrodieugenol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
Fluo 3-AM	Fluoróforo
GABA	Ácido γ-aminobutírico
GRD	Gânglio da Raiz Dorsal
GT	Gânglios Trigeminais
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
I.Ig	Injeção intraganglionar
IASP	A International Association for the Study of Pain
IL-1β	Interleucina 1 beta
iNOS	Óxido Nítrico Sintase
L5	5º Gânglio da raiz dorsal região lombar
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LNRP	Limiar Nociceptivo de Retirada da Pata

NF	
NMDA	N-metil-D-aspartato
OH	Radicais Hidroxila
P2X4	Receptores Ionotrópicos Purinérgicos
P2X7	Purinoceptor 7
PGE2	Postaglandina
PGI2	Prostaciclina
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNF α	Fator de necrose tumoral α
TRP	Receptor Potencial Transitório
TRPV1	Receptor de Potencial Transitório Vaniloide tipo 1
TXA2	Tromboxanos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	11
2.1 Dor e nocicepção	11
2.2 Receptor TRPV1	14
2.3 Glânglio da Raiz Dorsal	16
2.4 Biseugenol	18
3. OBJETIVO	20
3.1 Objetivo geral	20
3.2 Objetivos específicos	20
3.2.1 O potencial analgésico da molécula será avaliado utilizando o teste da capsaicina em patas de ratos.....	20
3.2.2 O potencial anti-inflamatório do biseugenol será avaliado através do modelo de inflamação induzida pela injeção de carragenina na pata de ratos. Neste modelo, serão avaliados a hiperalgesia mecânica e o edema inflamatório.	20
3.2.3 O possível efeito do biseugenol sobre a ativação do receptor TRPV1 através do influxo de cálcio induzido por capsaicina em culturas primárias de gânglio da raiz dorsal de ratos.	20
4. METODOLOGIA.....	20
4.1 Animais	20
4.2 Drogas.....	21
4.3 Administração de drogas	21
4.4 Experimento <i>in vitro</i>	21
4.4.1 Coleta de gânglios	21
4.4.2 Cultura de gânglios primários	22
4.4.3 Microscopia confocal	22
4.5 Testes comportamentais <i>in vivo</i>	23
4.5.1. Teste de nocicepção induzido por capsaicina.....	23
4.5.2. Teste de hiperalgesia inflamatória induzido por carragenina: von Frey eletrônico	23
4.5.3 Edema de pata	24
4.6 Análise estatística	25

5. RESULTADOS	25
5.1 Experimentos <i>in vitro</i>	25
5.2 Experimentos <i>in vivo</i>	28
5.2.1 Teste de nocicepção induzido por capsaicina.....	28
5.2.2 Teste de hiperalgesia induzido por carragenina	29
5.2.3 Teste de avaliação do edema da pata.....	30
6. DISCUSÃO	31
7. CONCLUSÃO	34
6. REFERÊNCIAS	34

1. INTRODUÇÃO

Durante o processo de seleção natural, os animais desenvolveram vários mecanismos fisiológicos que permitiram a sua sobrevivência (BARROSO et al., 2014), dentre eles um dos mais importantes está a dor, pois é através deste sintoma que os animais e humanos tem consciência de que sua integridade está sendo ameaçada (CRUVINEL et al., 2010). Além deste aspecto protetor, a dor é um relevante problema de saúde, sendo uma razão bastante comum para a procura de atendimento clínico e uso de fármacos (BRENNAN et al., 2006). A dor gera um profundo impacto na qualidade de vida dos pacientes, levando a consequências tanto em nível fisiológico (aumento de complicações pós operatórias, desenvolvimento de dor crônica) psicológico (aparecimento de transtornos psiquiátricos como a depressão e ansiedade), social (menor capacidade de trabalho levando ao desemprego, menor renda familiar e interação social) e econômico (gastos com cuidados médicos e medicamentos) (BASSOLS et al., 2002; FISHMAN, 2007; LOHMAN et al., 2010).

De maneira geral, a dor pode ser classificada em fisiológica ou patológica. A primeira requer uma estímulo nocivo, e geralmente é transitória, pois tende a desaparecer quando o estímulo nocivo é cessado (dor aguda). Esse tipo de dor fornece o alerta ao organismo, ocasionando respostas comportamentais e reação de retirada ou afastamento do membro sujeito ao estímulo nocivo. A dor inflamatória também tem uma função fisiológica que é a proteger o local lesionado e facilitar a recuperação. Já o segundo tipo de dor, a dor patológica, possui como característica a persistência, mesmo na ausência do estímulo. As dores patológicas podem estar associadas a inflamação crônica do tecido advindo de uma lesão (dor inflamatória) ou a lesões do sistema nervoso periférico ou central, dor neuropática (PARISI, 2016). Atualmente, o termo dor nociplástica foi designado para este tipo de dor patológica que parece ser causado por alterações plásticas no sistema nervoso (NIJS et al., 2021).

Embora a dor possa ser entendida como o sintoma de inúmeras condições patológicas, no momento em que se torna crônica, esse sintoma é “promovido” à doença. Por isso, precisa de tratamento específico, sob pena de incapacitar o paciente para o trabalho ou para realizar tarefas simples do dia a dia. Em 50% dos casos, a dor crônica compromete seriamente a rotina, atingindo um nível de 6 na escala visual analógica (EVA, escore 0 sem dor; escore 10 dor máxima) de dor, representando uma dor forte ou suficiente para atrapalhar as atividades cotidianas (SBED, 2018).

A dor de origem inflamatória é o resultado da interação entre o tecido danificado e os neurônios sensoriais nociceptivos periféricos, por meio da participação de mediadores inflamatórios. A dor inflamatória aguda é resultado da sensibilização dos neurônios periféricos por mediadores inflamatórios. As alterações causadas por mediadores inflamatórios, especialmente prostaglandinas, ocorrem devido a uma ativação metabotrópica (mudança metabólica) em todo o neurônio sensorial. Essas mudanças na excitabilidade neuronal são induzidas por mediadores inflamatórios liberados diretamente pelas células danificadas ou por células ativadas a partir do reconhecimento de um agente estranho ao organismo (HARDY J et al, 1950; FERREIRA SH, 2009).

Visto que, os nociceptores podem expressar um ou mais receptores para estes mediadores pró-inflamatórios e pró-nociceptivos, eles são capazes de reconhecer e responder a cada um deles. É justamente a ativação destes receptores presentes na superfície dos nociceptores que aumenta a excitabilidade da fibra nervosa, conseqüentemente, aumentando a sua sensibilidade, como, por exemplo, à temperatura ou ao toque (BASBAUM et al., 2009). Este aumento na sensibilidade resulta em uma hipersensibilidade da percepção dolorosa frente a estímulos que normalmente não causariam dor em situações não patológicas, como leve toque, a qual é referida como alodinia. Além disso, esta hipersensibilidade também resulta em uma percepção exacerbada frente a estímulos normalmente dolorosos, os quais passam a induzir dor com uma intensidade maior ainda, fenômeno esse referido como hiperalgesia (Figura 1) (WOOLF e SALTER, 2000).

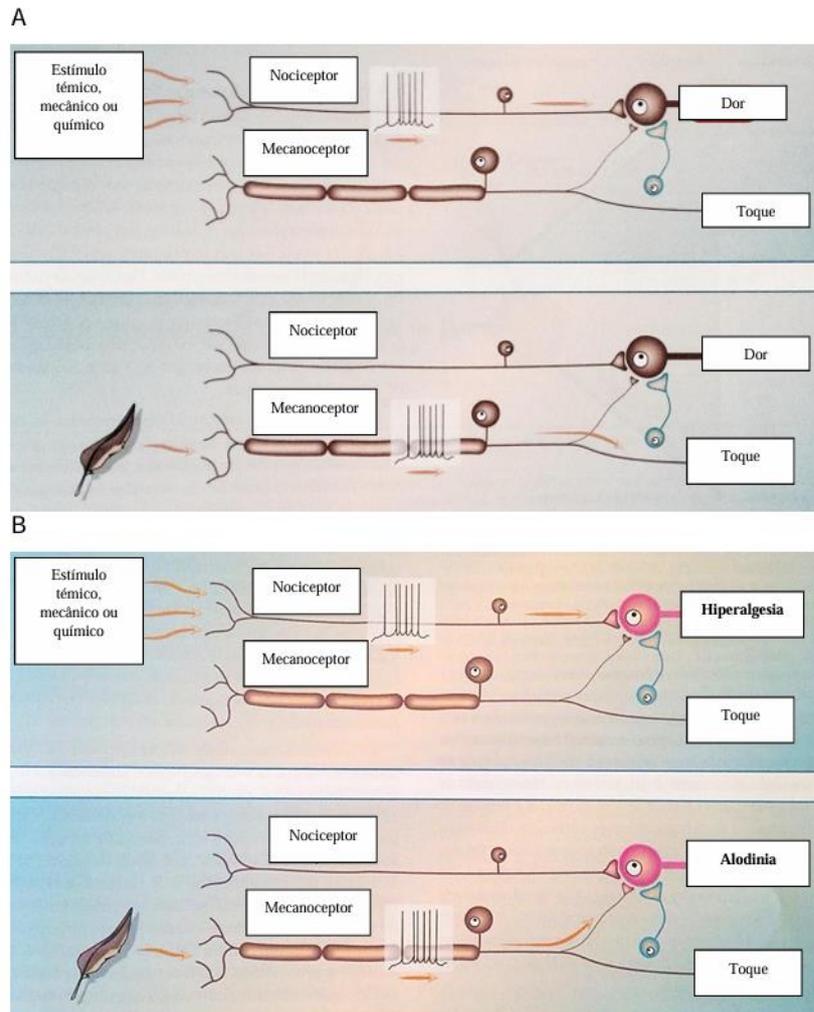


Figura 1- Sensibilização dos neurônios. A: Demonstração dos fenômenos de uma sensibilização normal e B: Demonstração entre os fenômenos de hiperalgisia e alodinia. Adaptado de BEAULIEU, 2013.

Assim, a inflamação aguda é um processo finito que resulta no retorno da homeostase tecidual. No entanto, se as respostas inflamatórias forem persistentes ou se houver falha na resolução da inflamação aguda, o processo torna-se crônico. A forma crônica ou a falha na resolução da inflamação está diretamente relacionada com a patogênese de uma série de doenças crônicas inflamatórias (LIBBY, 2007; NATHAN; DING, 2010). No estado crônico, a dor perde a função protetora e torna-se fisicamente debilitante, comprometendo funções básicas como a mobilidade e o sono, além de provocar sobrecarga emocional, podendo levar à ansiedade, depressão, irritabilidade e raiva (BRENNAN; CARR; COUSINS, 2007). A dor é considerada crônica quando persiste ou se repete por mais de 3 a 6 meses apesar da presença ou ausência de um estímulo nocivo (HARVEY, 2006; TREEDE et al., 2015), ou seja, quando alterações patofisiológicas propagam a dor de forma independente do estímulo deflagrador (LEE, 2013).

O tratamento farmacológico de doenças crônicas inflamatórias e da dor persistente de diferentes origens ainda é um algo problemático (FERREIRA SH et al, 2009). Atualmente estas são comumente tratadas com fármacos desenvolvidos para controlar a resposta inflamatória por meio da inibição de enzimas, bloqueio de receptores ou antagonismo de ligantes específicos (FREITAS et al., 2019). Os fármacos de primeira linha de tratamento atualmente prescritos são os AINEs, glicocorticoides e opioides, apesar de já terem sido introduzidos há muito tempo, os seus mecanismos principais permanecem os mesmos (FERREIRA SH et al, 2009; BOTZ B et al, 2017). A ação farmacológica dos AINEs é baseada na inibição das isoformas da enzima ciclo-oxigenase (COX), especialmente, COX-1, COX-2 e COX-3. A COX-1 é constitutivamente expressa em diversos tecidos, como as plaquetas, as células endoteliais e gastrointestinais. A COX-2 é induzida no processo inflamatório pelo estímulo de citocinas e fatores de crescimento e contribui significativamente para desenvolvimento dos sinais clínicos característicos. Desta forma, o efeito terapêutico dos AINEs está relacionado principalmente com a inibição da produção de prostaglandinas inflamatórias como a PGE2. Por outro lado, a inibição da produção de tromboxanos (ex. TXA2) e prostaglandinas envolvidas em funções fisiológicas relevantes (como a PGI2) contribui para a ocorrência de efeitos colaterais (FREITAS et al., 2019).

Embora haja muitas opções de tratamento disponíveis, não há um consenso universal sobre qual é o melhor e, muitos deles têm efeitos adversos contraproducentes. Os opioides, por exemplo, são frequentemente usados no tratamento da dor crônica, mas sua eficácia é apenas moderada (em média, uma melhora de 30%) e eles podem causar vários efeitos colaterais, principalmente relacionados ao sistema nervoso central. Além disso, eles criam uma forte tolerância e existe o risco de dependência, o que é especialmente preocupante no controle da dor crônica. Portanto, há uma necessidade urgente de encontrar novos alvos biológicos que permitam o desenvolvimento de medidas terapêuticas mais eficazes para lidar com a dor crônica.

Os produtos naturais, especialmente aqueles derivados de plantas e microorganismos, possuem relevância histórica como fonte de descoberta de novas substâncias ativas com atividade farmacológica. Assim, as plantas são ainda consideradas fonte de investigação de novos fármacos em potencial. As substâncias ativas obtidas das plantas são usadas como protótipos para o desenvolvimento de novos medicamentos, além de proporcionar a identificação de uma nova possibilidade de tratamento terapêutico. Então, os produtos naturais são considerados como sendo importantes alvos para a descoberta de novos analgésicos, além de terem sido importantes para a descoberta de vias de modulação da dor e de receptores envolvidos nestas vias

e analgésicos ainda hoje usados na clínica (CALIXTO et al., 2000; YUNESSET al., 2005; NEWMAN E CRAGG, 2007)

A utilização de plantas medicinais como forma terapêutica é dita como uma arte de cura muito antiga, na qual está relacionada com os primórdios da medicina e com fundamento no acúmulo das informações entre diversas gerações. No decorrer dos séculos, os produtos de origem natural constituíram a base para o tratamento de diversas doenças (BORGES et al., 2018). O conhecimento adquirido pela população sobre a utilização de plantas como recursos terapêuticos proporciona a população um empoderamento, já que muitas plantas utilizadas por estes já tem uma eficácia comprovada cientificamente, sendo muito efetiva no controle de diversas enfermidades (LEITE, 2019). Assim, o Brasil por possuir uma das maiores biodiversidades mundial, possui um grande grupo de população que detém do conhecimento sobre a cura advinda de extratos, sucos e chás de plantas que funcionam como agentes medicamentosos (FERNANDES et al., 2017).

Neste contexto, podemos compreender que existem diferentes tipos de dor que surgem devido a uma ampla variedade de processos moleculares e celulares, que podem atuar separadamente ou em conjunto com os sistemas nervosos periférico e central. Por isso, é extremamente importante compreender esses mecanismos subjacentes à geração, manutenção e controle da dor, além de identificar as células e substâncias envolvidas, para promover a descoberta de novos tratamentos para alívio da dor. Isso inclui explorar o uso de produtos naturais como alternativas seguras, minimizando qualquer dano potencial aos indivíduos e reduzindo seus efeitos adversos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Dor e nocicepção

A International Association for the Study of Pain (IASP) define dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de lesão semelhante”. Embora esta definição seja aceita universalmente, a dor é difícil de definir devido à subjetividade que lhe é imputada pelos seus componentes sensitivo, emocional, cognitivo e social (ELLISON DL, 2017; DOWLATI E, 2017). Assim, a dor é uma experiência individual, modulada centralmente por mecanismos fisiológicos e psicológicos

bem como por fatores externos e é também um mecanismo de proteção essencial ao desenvolvimento e aprendizagem do homem. O ser humano defende-se quando a dor é gerada por um estímulo externo, afastando-se dos estímulos dolorosos.

A dor pode ser compreendida como três eventos neurobiológicos distintos, sendo classificada então em: nociceptiva ou fisiológica, inflamatória e patológica. A dor fisiológica é o sistema de proteção rápido contra estímulos nocivos, desencadeada no tocar de objetos frios ou quentes, agentes químicos irritantes ou força mecânica intensa. A dor inflamatória, desencadeada por mediadores do sistema imune, dano tecidual ou em uma infecção, é essencial para o processo de reparação tecidual, pois desencoraja o contato físico e o movimento, por exemplo, no caso de uma ferida cirúrgica. A dor patológica pode ocorrer devido ao dano do sistema nervoso (dor neuropática), mas também na ausência de danos ou inflamação (dor disfuncional), como, na cistite intersticial crônica, na fibromialgia, na síndrome do intestino irritável, na cefaleia de tensão e na disfunção temporomandibular e dor orofacial (WOOLF, 2010).

As vias nervosas especializadas em detectar a presença de estímulos nocivos são conhecidas como vias nociceptivas, compostas por neurônios sensoriais primários denominados nociceptores. Essas células possuem morfologia, denominada pseudo-unipolar. Seus corpos celulares, localizados nos gânglios das raízes dorsais (GRDs) ou nos gânglios trigeminais (GT), emitem um axônio que se divide em dois ramos (Figura 2). O ramo periférico percorre os nervos sensitivos e termina nos diversos órgãos (para GRD) e regiões orofaciais (para GT), onde recebem estímulos sensoriais através de terminações nervosas. O ramo central se dirige para o corno dorsal da medula espinhal ou para o núcleo do trato espinhal do trigêmeo, onde o estímulo nervoso é enviado ao sistema nervoso central (SNC) (HUANG et al, 2013).

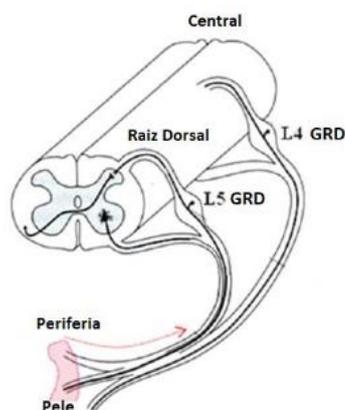


Figura 2- Representação das características estruturais do gânglio da raiz dorsal. Gânglio da raiz dorsal L4 e L5. Adaptado de HUANG et al (2013).

Os corpos celulares desses neurônios não possuem dendritos e não realizam sinapses típicas nos gânglios sensoriais. No entanto, existem células gliais posicionadas circunjacentes a esses, denominadas de células satélites gliais (CGS). A superfície dos corpos neuronais é densamente revestida de microvilos, que adentram nas lamelas da CGS para aumentar a área de superfície neuronal. Esta morfologia já sugeria que deveria existir uma interação importante entre neurônios e CGS. Estudos recentes mostram que o sinal nociceptivo é modulado através desta comunicação entre neurônios e células satélites gliais através da liberação de diversos mediadores e neurotransmissores como o glutamato (FERRARI et al., 2014), o ATP (NEVES et al., 2020; LEMES et al., 2018) e fractalquina (SOUZA et al., 2013), entre outros (HANANI; SPRAY, 2020).

Os nociceptores, através de seus prolongamentos, chegam de forma organizada em uma região da medula espinhal, conhecida como corno dorsal da medula espinhal (PURVES et al., 2010). Essa região atua como uma estação para a transmissão dolorosa, onde os neurônios aferentes primários realizam sinapses excitatórias com neurônios de transmissão ou de segunda ordem (OLIVEIRA, 2008). O corno dorsal da medula espinhal é estruturado em seis lâminas anatomicamente e fisiologicamente distintas. Os nociceptores A δ fazem sinapses com neurônios de segunda ordem nas lâminas I e V enquanto as fibras C projetam-se para as lâminas I e II (BASBAUM et. al., 2009).

Na membrana plasmática dos nociceptores existem famílias de proteínas transmembrana que constituem receptores e canais que participam da transdução de sinais nociceptivos (OLIVEIRA, 2008). Estas células expressam nos seus terminais periféricos canais iônicos sensíveis a estímulos mecânicos e térmicos de alta intensidade, além de canais sensíveis a alterações de pH, e sensíveis a algumas moléculas exógenas como a formalina (EID; CORTRIGHT, 2009). Quando estímulos antes inócuos passam a causar dor (alodínia) devido à facilidade de despolarização (diminuição do limiar de excitabilidade) dos neurônios aferentes nociceptivos polimodais acontece o fenômeno chamado de hiperalgesia, ou seja, um aumento da sensibilidade dolorosa, uma resposta exacerbada a um estímulo nocivo (JENSEN; FINNERUP, 2014).

Fenômenos paralelos podem acompanhar a dor como a hiperalgesia, que resulta da sensibilização das fibras neuronais sensoriais responsáveis pela detecção dos estímulos nocivos capazes de ativar o sistema nociceptivo. Essa sensibilização tem como característica a diminuição do limiar de excitabilidade neuronal (RIEDEL; NEECK, 2001), devido à ação de mediadores inflamatórios produzidos no sítio do dano tecidual (HUANG; ZHANG; MCNAUGHTON, 2006; VERRI et al., 2006). A hiperalgesia inflamatória é um fenômeno comum a todas as dores

de origem inflamatória e é induzida pela sensibilização dos nociceptores por mediadores inflamatórios liberados no sítio do dano tecidual (COUTAUX et al., 2005). Esses mediadores inflamatórios, através da ativação de seus respectivos receptores, induzem alterações metabólicas neuronais que resultam na sensibilização dos nociceptores. Portanto, ao contrário da nocicepção, que é considerada um fenômeno puramente iônico, a hiperalgesia é um fenômeno metabólico (CATERINA; JULIUS, 2001; LEWIN; LU; PARK, 2004; RAJA; HAYTHORNTHWAITE, 1999; SNIDER; MCMAHON, 1998).

Embora a inatividade temporária e o comportamento protetor como resposta à dor subaguda possam trazer benefícios, a dor persistente pode levar a um estado de depressão semelhante ao desencadeado por estímulos estressantes inevitáveis, não podendo ser considerada como uma resposta adaptativa. Estados dolorosos prolongados estimulam persistentemente os aferentes nociceptivos induzindo alterações que aumentam os efeitos deletérios da dor crônica, introduzindo então o conceito de dor patológica. Enquanto a dor aguda é um sintoma de alguma doença, a dor crônica pode ser considerada uma doença em si, sendo nociva e, na maior parte dos casos, independente ou desproporcional ao estímulo que a gerou (KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008).

Portanto, a dor compreende três mecanismos básicos: a transdução, caracterizada pela ativação dos nociceptores; a transmissão, o conjunto de vias sensitivas e mecanismos que permitem o impulso nervoso, gerado ao nível de nociceptores e conduzido para estruturas do sistema nervoso central (SNC) comprometidas com o reconhecimento da dor; e a modulação, que envolve o mecanismo de supressão da sensação dolorosa e que pode ser desencadeado pelas próprias vias nociceptivas (FERNANDES, 2011).

2.2 Receptor TRPV1

A superfamília de receptor potencial transitório (TRP) codifica proteínas de membrana que funcionam como canais iônicos. A partir da homologia de proteínas, os membros da família de canais TRP podem ser subdivididos em subfamílias. Os membros desta família são encontrados em leveduras, invertebrados e vertebrados (NILIUS; OWSIANIK, 2011). Funcionalmente, os TRP podem ser caracterizados como canais catiônicos, não-seletivos, embora em sua maioria apresentem características de permeabilidade a íons, sendo alguns deles altamente seletivos para Ca^{2+} (MINKE; COOK, 2002), podendo ser ativados por uma diversidade de estímulos com graus diferentes de seletividade. Os canais TRP quando ativados permitem o influxo

de cátions para a célula, provocando uma despolarização, que por sua vez, pode gerar um potencial de ação ou não, devido a sua característica transitória (CLAPHAM, 2003). Estas contribuições são essenciais para diversos processos fisiológicos, que vão desde as funções sensoriais, como: transdução, nocicepção e sensação de temperatura e funções homeostáticas (MINKE; COOK, 2002).

O primeiro canal descoberto em neurônios sensoriais de mamíferos foi o Receptor de Potencial Transitório do tipo Vanilóide 1 (TRPV1). Este canal é o receptor para a capsaicina, e também o receptor alvo para o calor nocivo ($>42^{\circ}\text{C}$). O TRPV1 é encontrado em neurônios sensoriais nociceptivos de diâmetro médio e pequeno (fibras C). Sua expressão em neurônios do gânglio da raiz dorsal, gânglio trigeminal e gânglio nodoso, particularmente em associação com outras fibras aferentes nociceptivas, junto com sua ativação pelo calor, ácido e compostos vanilóides pungentes, fortemente indica seu papel importante na detecção e integração de estímulos nocivos. Análises em camundongos com deleção gênica para o receptor TRPV1 confirmaram que este canal contribui para percepção de estímulos químicos e térmicos. Em particular, os camundongos com deleção gênica para o receptor TRPV1 mostraram respostas reduzidas aos estímulos de calor nocivo e completa indiferença à vanilóides pungentes. Portanto, a identificação do TRPV1 foi o maior catalisador que lançou os campos da pesquisa de transdução somatossensorial e dor para nível molecular (PEREIRA, 2013).

A inibição do canal de cátions do TRPV1 parece ser uma abordagem lógica para produção de analgesia, entretanto, a situação não é simples já que os receptores TRPV1 não são expressos somente nos nociceptores, como também em uma variedade de outros tipos de células, incluindo: os queratinócitos, as células pancreáticas, as células endoteliais, os linfócitos, os macrófagos e as células de diferentes regiões do cérebro. Sua presença, em todos esses tipos de células e em diferentes partes do corpo, sugere que o TRPV1 é estimulado normalmente por um ligante endógeno (endovanilóide). É importante salientar, que existem evidências que sugerem a ativação do TRPV1 por seu ligante endógeno sendo essencial para a manutenção da temperatura corporal, sendo improvável então que possam ser desenvolvidos para utilização sistêmica, como agente específico no tratamento da dor (FEIN, 2011). Ainda, estudos demonstram que a hiperalgesia crônica induzida por lesão nervosa libera mediadores inflamatórios que ativam ou sensibilizam os receptores TRPV1 de maneira constante (KISSIN; FREITAS; BRADLEY, 2007).

Segundo (RAMI et al., 2006; CHIZH et al., 2007; LEHTO et al., 2008), os antagonistas seletivos do receptor TRPV1 induzem efeitos anti-hiperalgésicos em modelos de nocicepção em animais e em humanos. Entretanto, um importante efeito adverso relacionado

aos antagonistas do receptor TRPV1 é o desenvolvimento de hipertermia severa, como descrito para o composto AMG-517 (GAVVA et al., 2008). Assim, a identificação de novos antagonistas do receptor TRPV1 que não promovam o desenvolvimento de hipertermia seria interessante, sendo estes alvos promissores como novos agentes analgésicos (WONG E GAVVA, 2009). Uma das fontes que poderia ser explorada para a descoberta de novos antagonistas do receptor TRPV1 seriam os produtos naturais. É descrito que os compostos isolados de plantas são considerados como um alvo relevante para a descoberta de novas drogas, incluindo compostos analgésicos (CALIXTO et al., 2000; CALIXTO et al., 2005; KOEHN E CARTER, 2005). Além disso, diversos compostos derivados de produtos naturais que são capazes de modular receptor TRPV1, como a capsaicina, podem ser usados no tratamento da dor e de sintomas relacionados às doenças respiratórias (CORSON e CREWS, 2007; ADCOCK, 2009; SCHUMACHER, 2010). E também, compostos isolados de plantas já foram caracterizados como potentes antagonistas do receptor TRPV1 com atividade antinociceptiva (NEACSU et al., 2010; ROSSATO et al., 2011). Dessa forma, o desenvolvimento de novos antagonistas do receptor TRPV1, a partir de produtos naturais, pode ser uma fonte útil para a descoberta de analgésicos mais eficazes e seguros.

2.3 Glânglio da Raiz Dorsal

Os gânglios sensoriais emergem como centros cruciais de modulação da dor antes que ela seja encaminhada à medula espinhal e retransmitida para as regiões corticais do sistema nervoso central. Nos últimos tempos, essa estrutura ganhou destaque como um local essencial para o processamento de informações sensoriais, tornando-se, assim, objeto de intenso interesse em várias investigações relacionadas ao campo da dor.

O GRD é uma estrutura crítica tanto na transdução, quanto na modulação sensorial, incluindo a transmissão da dor. O GRD se encontra localizado dentro da bainha dural com apenas uma fina camada de líquido cefalorraquidiano (LCR), é uma estrutura bilateral encontrada em todos os níveis vertebrais situados nos forames intervertebrais, exceto os GRD sacrais, localizados dentro do canal vertebral, e os GRD coccígeos, que estão intramurais (DEVOR, 1999). O GRD é um alargamento da raiz dorsal que abriga os somas (corpos celulares) de neurônios sensoriais primários e conta com até 15.000 neurônios presentes. Os neurônios do GRD são de natureza pseudounipolar; um único axônio se projeta do corpo celular e se bifurca na junção em T única. A porção periférica do axônio estende-se até as terminações dos receptores na

periferia e é responsável pela sinalização aferente. A porção central do axônio se estende até o SNC e mostra arborizações axonais consideráveis na medula espinhal, terminando em sinapses ipsilaterais ou neurônios contralaterais de ampla faixa dinâmica, redes de interneurônios inibitórios e outros alvos no corno dorsal (LEIJNSE; D'HERDE, 2016). Os axônios dos neurônios sensoriais primários facilitam a comunicação sináptica com os neurônios na substância cinzenta espinhal; esses sinais são então modificados por neurônios de segunda e terceira ordem e por interneurônios inibitórios (WILTSE, 2000). Os neurônios sensoriais primários do GRD envolvidos na dor são principalmente do tipo C e A δ (POPE et al., 2013).

Os corpos neuronais do GRD encontram-se envolvidos por uma camada de células denominada de células satélites gliais (CSGs) que, em conjunto, formam uma bainha (ou envelope) ao redor de cada neurônio sensorial, resultando em unidades individuais (Figura 3). Entre estas unidades pode ser encontrado uma estreita camada de tecido conjuntivo que é majoritariamente observada em animais experimentais jovens. Na fase adulta, essas unidades encontram-se separadas por outra camada de células gliais. O número de CSGs envolvendo cada neurônio está relacionada com o volume do mesmo, que vai de encontro com uma das funções primordiais exercida pela glia, o de suporte metabólico. Porém, essa proporção pode ser alterada sob determinadas condições, como por exemplo durante uma lesão do nervo (axotomia), em que, o número de células satélites gliais ao redor do neurônio lesado no GRD é aumentado significativamente (Hanani, 2005)

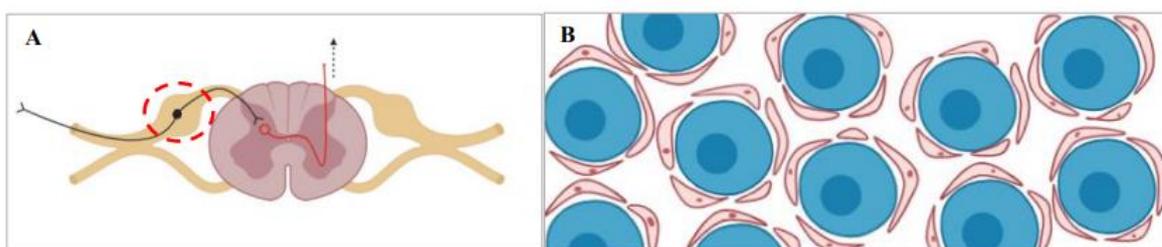


Figura 3- Gânglio da Raiz Dorsal. A: O GRD encontra-se em proximidade ao corno dorsal da medula espinhal, abrigando o corpo celular do neurônio sensorial. Seu ramo curto axonal estende-se em direção ao corno dorsal da medula, enquanto o ramo longo direciona-se para a periferia. B: Os corpos de neurônios sensoriais, envolvidos por um envelope de células laminares denominadas células satélites glias, são destacados em azul, enquanto estas últimas são representadas em cor rosa. Adaptado de LEMES, (2021).

Ainda, segundo (TIWARI; GUAN; RAJA, 2014) a ativação da glia também pode ter efeitos benéficos, incluindo a liberação e manutenção de fatores anti-inflamatórios que protegem contra a neurotoxicidade e restauram a sinalização normal da dor. Apesar da extensa investigação neste campo, os resultados pré-clínicos não se traduziram em melhores estratégias

terapêuticas para pacientes com dor crônica. Assim, uma compreensão dos mecanismos envolvidos nos papéis benéficos e patológicos da glia ativada é necessária para o desenvolvimento de terapias para a dor novas, seguras e eficazes. As interações neurônio-glia desempenham papéis críticos no desenvolvimento e manutenção da dor neuropática. Algumas questões fundamentais sobre as interações neurônio-glia na dor foram abordadas, como os sinais que levam à ativação glial após a lesão e como as células gliais afetam a atividade neuronal e promovem a hiperalgesia. Por isso, estudos propõem que a microglia estimulada por ATP envia sinais para neurônios de projeção de dor no corno dorsal da medula espinhal. O ATP derivado de neurônios então ativa os receptores ionotrópicos purinérgicos (P2X7) na microglia, causando maior liberação de ATP microglial e fator neurotrófico derivado do cérebro nos neurônios da lâmina espinhal.

2.4 Biseugenol

A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece a importância da fitoterapia, sugerindo ser uma alternativa viável e importante também às populações dos países em desenvolvimento, já que seu custo é diminuído. As plantas medicinais têm um importante papel na saúde mundial. Apesar dos grandes avanços observados na medicina moderna, nas últimas décadas, elas continuam sendo utilizadas e estima-se que 25 a 30% de todos os fármacos avaliados como agentes terapêuticos são provenientes de produtos naturais (CALIXTO, 2005). Individualmente, a descoberta de novos fármacos, ou fármacos acessíveis, pode determinar a melhoria da qualidade de vida em doenças crônicas ou a própria sobrevivência do paciente afetado. Socialmente, a descoberta de fontes naturais e locais de compostos químicos usualmente importados e/ou o desenvolvimento de fitoterápicos de fabricação nacional, podem ter consequências econômicas significativas, além de possibilitar autonomia de cada país no gerenciamento de suas políticas de saúde (RATES, 2001).

As plantas aromáticas produzem óleos essenciais que são misturas de compostos químicos voláteis e hidrofóbicos. Estudos relatam as propriedades terapêuticas dos óleos essenciais como antinociceptivo e anti-inflamatório (ALMEIDA et al., 2011; HUANG et al., 2013). O eugenol é um fenilpropanoide presente em muitas plantas aromáticas (ZHENG; KENNEY; LAM, 1992). Esse composto apresenta grande variedade de propriedades biológicas e tem sido amplamente utilizada como analgésico na odontologia (BURGOYNE et al., 2010).

O mecanismo de ação de suas propriedades neuroprotetoras ainda está em estudo, pesquisas *in vitro* demonstraram uma interação do eugenol com receptores vanilóides com potencial inibição da transmissão da dor pelo bloqueio deste receptor. Além disso, o eugenol parece

interagir com neurotransmissores envolvidos na sensibilidade à dor, com efeito agonista no ácido γ -aminobutírico (GABA) e efeito antagonista nos receptores de glutamato NMDA (N-metil-D-aspartato, ambos desempenhando papéis importantes na transmissão da dor (GUÉNETTE et al., 2007). A capacidade do eugenol em reduzir a nocicepção e agir no processo inflamatório tem ganhado grande destaque na comunidade científica, surgindo o interesse em pesquisar se o biseugenol, seu dímero orto-eugenol, também possui essas mesmas atividades (DANIEL et al., 2009; PARK et al., 2011; DAL BÓ, et al., 2012; PAULA-FREIRE et al., 2012).

O desidrodieugenol (DDE), também conhecido como biseugenol, é um metabólito secundário da classe das neolignan caracterizado por ser um dímero orto de eugenol (Figura 4) que pode ser preparado sinteticamente por uma reação de oxidação. As neolignanas, como o desidrodieugenol são compostos capazes de modular o processo inflamatório, alterando, inclusive, alguns componentes chave da angiogênese e do reparo tecidual, de modo a favorecer a resposta inflamatória. Ainda, em estudos recentes (TAGUCHI et al., 2023) demonstraram pela primeira vez em um modelo *in vivo* de enfisema pulmonar que o eugenol e o biseugenol, ambos isolados de *N. leucantha*, reduziram a destruição alveolar e, conseqüentemente, a inflamação pulmonar e as citocinas inflamatórias. Alguns possíveis mecanismos desses compostos podem estar relacionados à redução do estresse oxidativo, especialmente iNOS e inibição do NF-KB. Assim, considerando a necessidade urgente da descoberta de fármacos para doenças crônicas e inflamatórias, torna-se relevante a avaliação dos efeitos e possíveis mecanismos de ação do biseugenol em modelo experimental de dor e hiperalgesia em ratos.

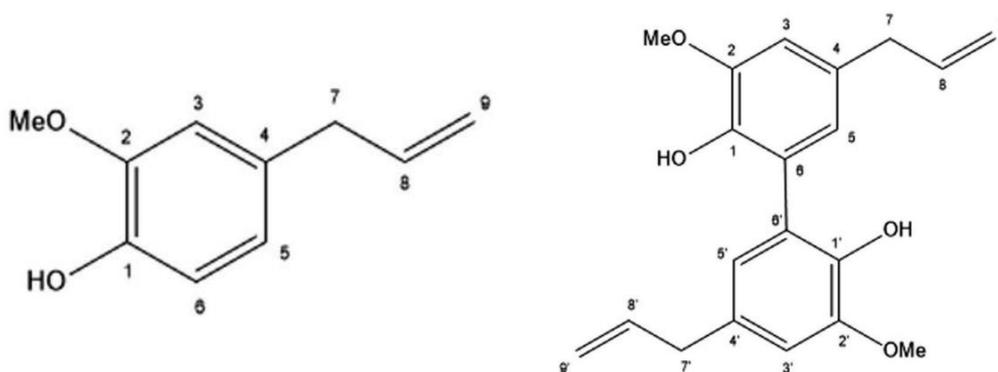


Figura 4- Representações das estruturas químicas das moléculas de Eugenol e Biseugenol. À esquerda temos a representação da estrutura do Eugenol, enquanto à direita temos a estrutura do Biseugenol. Adaptado de TAGUCHI et al. (2023)

De acordo com (PEANA et al., 2004), o biseugenol é caracterizado como menos tóxico que o eugenol, apresentando um efeito inibitório mais pronunciado na peroxidação lipídica.

Além disso, demonstra uma capacidade de eliminação mais robusta dos radicais superóxido em comparação com os radicais hidroxila (OH^\cdot). Adicionalmente, parece constituir um material de estabilização promissor na síntese de novos bifênilos, os quais exibem propriedades de relevância para atividade biológica.

Portanto, compreender os mecanismos do biseugenol é crucial para analisar sua interação com os receptores vanilóides e, possivelmente, com outros neurotransmissores envolvidos na transmissão da dor. Essa pesquisa é essencial para possibilitar a aplicação do biseugenol no tratamento à hiperalgesia.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

O presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito da molécula biseugenol como analgésico e anti-inflamatório em modelos de dor e hiperalgesia em ratos. Além de, avaliar o efeito do biseugenol sobre a ativação de receptores TRPV1 em culturas primárias de gânglios sensoriais de ratos.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Avaliar o potencial analgésico da molécula utilizando o teste da capsaicina em patas de ratos.

3.2.2 Avaliar o potencial anti-inflamatório do biseugenol através do modelo de inflamação induzida pela injeção de carragenina na pata de ratos. Neste modelo, serão avaliados a hiperalgesia mecânica e o edema inflamatório.

3.2.3 Avaliar o possível efeito do biseugenol sobre a ativação do receptor TRPV1 através do influxo de cálcio induzido por capsaicina em culturas primárias de gânglio da raiz dorsal de ratos.

4. METODOLOGIA

4.1 Animais

Neste estudo foram utilizados ratos Wistar machos, provindos da Rede de Biotérios de Roedores (REBIR) da Universidade Federal de Uberlândia. Os animais foram alojados e mantidos no REBIR em temperatura climatizada em 25°C (temperatura ambiente) e ciclo de luminosidade controlado em 12h claro e 12h escuro, com acesso livre à água filtrada e ração *ad*

libitum. As caixas foram trocadas a cada 2 ou 3 dias preenchidos com maravalha autoclavada para esterilização. As caixas ficaram em estante ventiladas com exaustão de ar próprias para este fim, ainda, os animais foram mantidos em quantidade máxima de 5 animais por caixa. Tanto os testes comportamentais quanto os experimentos *in vitro*, foram realizados com ratos Wistar pesando entre 200 a 300g com aproximadamente 4 semanas, sendo todos os experimentos realizados de acordo com as normas de ética estabelecidas para experimentação animal recomendadas pela IASP (International Association for the Study of Pain) (ZIMMERMANN, 1983). Os procedimentos experimentais foram analisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (Processo nº 23117.028710/2023-97).

4.2 Drogas

- Extrato de Biseugenol
- Carragenina (Sigma®)
- Capsaicina (Sigma®)

4.3 Administração de drogas

As drogas utilizadas no presente estudo, nos testes comportamentais, foram administradas via intraplantar (i.pl.) subcutânea. As quais foram injetadas na pata traseira dos ratos por meio de uma agulha hipodérmica, conectada a uma seringa BD Ultra-fine II e inserida na porção central da pata, entre as cinco calosidades distais. Nos testes *in vitro* foram utilizadas a capsaicina na concentração de 100 nM, e o biseugenol nas concentrações de 10 e 100 µM, enquanto nos testes *in vivo*, teste de nocicepção induzido pela capsaicina e o teste de hiperalgisia inflamatória induzido pela carragenina, as mesmas foram utilizadas nas concentrações de 10 µg, 5 e 50 µg, respectivamente.

4.4 Experimento *in vitro*

4.4.1 Coleta de gânglios

Os gânglios da raiz dorsal foram obtidos a partir das regiões torácica e lombar dos animais, sendo coletados aproximadamente de 12 a 16 gânglios por animal. Para isso, os animais foram submetidos à anestesia, utilizando o anestésico geral Isoflurano 5% administrado por inalação por meio do sistema de anestesia inalatória da Bonther. Posteriormente, os animais foram decapitados e posicionados verticalmente para realização da exsanguinação. Em seguida,

foi feita a remoção da pele da região dorsal, exposição da coluna vertebral e seções das vértebras, os gânglios foram coletados e colocados em placas de cultura contendo uma solução estéril de Hank com um tampão de 10 mM de HEPES.

4.4.2 Cultura de gânglios primários

As células coletadas foram submetidas a uma dissociação enzimática, primeiro através de incubação a 37°C por 60 minutos em uma solução de Hanks/Hepes contendo 0,28 U/ml de colagenase e, após 20 minutos em uma solução contendo 0,25 mg/ml de tripsina. Em seguida, os gânglios foram lavados com meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1 mL de penicilina/estreptomicina. As células foram então dissociadas mecanicamente utilizando uma pipeta Pasteur de vidro e, em seguida, cultivadas no meio descrito anteriormente e em placas de cultura revestidas com Matrigel. As placas foram mantidas em uma estufa de cultura com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a uma temperatura de 37°C por um período de 72 horas.

4.4.3 Microscopia confocal

As culturas primárias de gânglios sensoriais foram estabelecidas em placas que continham uma lamínula de vidro aderida ao fundo, permitindo a visualização por microscopia confocal. Antes do experimento, as placas foram submetidas a uma lavagem com solução Hank's contendo 10 mM de HEPES (pH 7,4) e, em seguida, foram incubadas com 10 µM do indicador de cálcio intracelular Fluo 3-AM (Invitrogen) por 45 minutos, mantidas no escuro e à temperatura ambiente. Após este período, as culturas foram lavadas 3x com solução de Hank's/HEPES.

A avaliação da fluorescência emitida pelas células foi realizada por meio de séries temporais de imagens obtidas utilizando microscopia confocal (Zeiss LSM 510 Meta). Os dados foram apresentados como a razão ($\Delta F/F_0$), que representa a variação na intensidade de fluorescência ($\Delta F = F - F_0$) dividida pela fluorescência basal (F_0). Isso permitiu normalizar as variações na concentração do indicador fluorescente nas células.

Nesta etapa os tratamentos utilizados foram:

- Controle: administração de veículo (Hanks + 1% DMSO) e após 2 minutos administração de capsaicina (100 nM).
- Tratado com Biseugenol 10 µM: administrou-se Biseugenol (10 µM) e após 2 minutos administrou-se capsaicina (100 nM).

- Tratado com Biseugenol 100 μM : administrou-se Biseugenol (100 μM), após 2 minutos administrou-se capsaicina (100 nM).

A intensidade de fluorescência produzida pelas células foi avaliada por meio de sequências temporais com duração de 2 minutos, adquiridas utilizando um microscópio confocal (LSM 520 Meta, Zeiss). As imagens foram capturadas e submetidas à análise com o auxílio do software de imagens ImageJ (NIH), uma ferramenta de código aberto amplamente disponível e gratuita.

4.5 Testes comportamentais *in vivo*

4.5.1. Teste de nociceção induzido por capsaicina

O teste da capsaicina foi desenvolvido por Sakurada et al. (1992) com o propósito de investigar substâncias que impactam a dor de origem neurogênica. A introdução da capsaicina por meio de injeção direta estimula os neurônios nociceptivos, por ativar receptores TRPV1, levando à liberação de diversos neuropeptídios relacionados à transmissão da dor. Observou-se que a capsaicina induz a nociceção em um intervalo de 5 minutos, começando imediatamente após a injeção e desaparecendo completamente após 10 minutos. Os animais foram distribuídos em 4 grupos de 10 animais cada, assim, o biseugenol ou veículo (controle salina + 10% de DMSO) foi administrado localmente na pata traseira direita de cada animal, por via intraplantar, juntamente com a capsaicina (10 μg), em 50 microlitros de salina estéril. Sendo avaliado o efeito do biseugenol per se, na maior dose testada. Este controle é importante para que se possa avaliar se o biseugenol causa efeito nociceptivo direto. O comportamento dos animais foi observado durante 5 minutos após as administrações, conforme descrito no protocolo experimental. Ainda, foi registrado o número de vezes em que o animal produziu uma resposta nociceptiva como a sacudida (flinch) ou lambida de pata.

4.5.2. Teste de hiperalgesia inflamatória induzido por carragenina: von Frey eletrônico

O teste da carragenina é um modelo de inflamação utilizado para avaliação de potenciais agentes anti-inflamatórios. A carragenina é uma substância exógena que induz uma resposta inflamatória típica e bem conhecida na pata de ratos. Neste experimento, o biseugenol foi administrado ao mesmo tempo que a carragenina, de forma a avaliar o efeito do fitoquímico no desenvolvimento da resposta inflamatória. Cada grupo experimental contou com 4 animais, sendo os tratamentos administrados por via intraplantar com as seguintes diluições:

- Grupo 1: Carragenina
- Grupo 2: Biseugenol (5 µg) + carragenina
- Grupo 3: Biseugenol (50 µg) + carragenina
- Grupo 4: Biseugenol (50 µg)

Neste foi avaliado o efeito do biseugenol *per se*, na maior dose testada. Este controle é importante para que se possa avaliar se o biseugenol causa alguma resposta inflamatória ou sensibilização. A sensibilização mecânica foi avaliada por meio de um anesthesiômetro eletrônico (Von Frey eletrônico Insight), que consiste em um transdutor de pressão conectado a um contador digital de força expressa em gramas (g). O contato do transdutor de pressão à pata dos animais é realizado por meio de uma ponteira Universal Tips10mL (T-300, Axygen) adaptada ao aparelho. Os animais foram colocados em caixas de acrílico, cujo assoalho é uma rede de malha igual a 5 mm² constituída de arame não maleável de 1 mm de espessura. Espelhos são posicionados 25 cm abaixo das caixas de experimentação para facilitar a visualização das plantas das patas dos animais. Foi aplicada, por entre as malhas da rede, uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata do rato até que o animal produza uma resposta caracterizada como sacudida (“flinch”) da pata estimulada. O reflexo de retirada da pata é considerado representativo do limiar hipernociceptivo, ou seja, a força necessária aplicada à pata para que induza uma resposta aversiva a um estímulo nocivo (Limiar Nociceptivo de Retirada da Pata - LNRP). A intensidade de hipernocicepção é quantificada com base na pressão obtida antes e após o experimento, em gramas. O LNRP foi registrado 3 ou 4 vezes em cada animal antes e após 1h30 e 3h da administração intraplantar (pata direita traseira utilizando uma seringa BD Ultra-fine II; 100 µg/ 50 µL) das diluições, sendo considerada a média dos valores obtidos.

4.5.3 Edema de pata

O edema de pata foi avaliado nos mesmos animais do teste da carragenina, logo após cada avaliação da sensibilidade mecânica. Para avaliação do edema foi utilizado um pletismômetro, conforme representado pela Figura 5 (Ugo Basile), o qual permitiu avaliar o volume da pata pelo deslocamento de líquido causado pela imersão da pata do animal no aparelho, os resultados foram expressos com a variação do volume da pata em relação ao volume basal.



Figura 5- Representação do equipamento de plethysmometro para avaliação do edema na pata. Adaptado de COELHO (2009).

4.6 Análise estatística

Nos testes *in vitro*, foram avaliados as variações máximas de fluorescência em cada neurônio ou célula glial submetido á análise. Já nos testes *in vivo*, os resultados foram apresentados de acordo com a média e o desvio padrão, derivados da análise do índice de dor proveniente da contagem de flinch ou lambidas de cada animal. Em ambos os conjuntos de testes, as médias dos valores foram submetidas a comparação por meio de testes t, quando se tratava de duas médias comparadas, ou análise de variância (ANOVA), quando se tratava de mais de duas médias comparadas. Para tais testes o nível de significância estabelecido foi de 5%.

5. RESULTADOS

5.1 Experimentos *in vitro*

Com o objetivo de avaliar os efeitos do biseugenol na ativação do receptor TRPV1 em neurônios nociceptivos primários presentes em culturas de gânglio da raiz dorsal de ratos, conduzimos experimentos utilizando concentrações de 10 μ M e 100 μ M de biseugenol. A Figura 6, gerada por meio de microscopia confocal, revela um aumento significativo na fluorescência associado à concentração de 100 μ M de biseugenol.

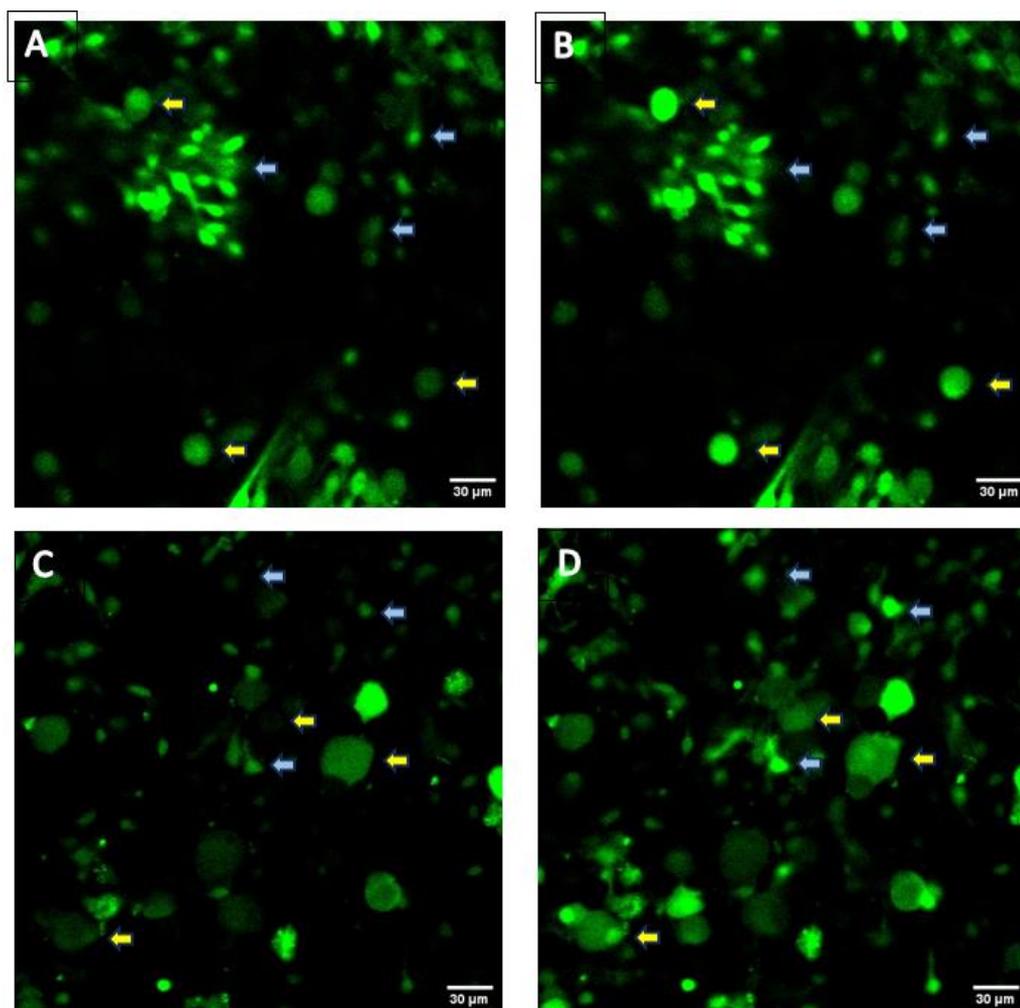


Figura 6- Efeito do biseugenol sobre o influxo de cálcio induzido por capsaicina nas culturas primárias de GRD. Imagens de microscopia confocal de células GRD primarias incubadas com o indicador intracelular Fluo 3-AM (Invitrogen), nas quais as setas amarelas representam os neurônios enquanto as setas azuis indicam células da glia. (A) Basal + veículo. (B) Capsaicina após o veículo. (C) Basal após Biseugenol 100 μ M. (D) Capsaicina após Biseugenol 100 μ M.

O gráfico ilustrado na Figura 7 indica que a administração do biseugenol, em ambas as concentrações de 10 mM e 100 mM, conseguiu inibir o efeito da capsaicina. Notavelmente, a concentração de 10 mM demonstrou induzir uma resposta mais pronunciada em comparação com a administração de biseugenol na concentração de 100 mM.

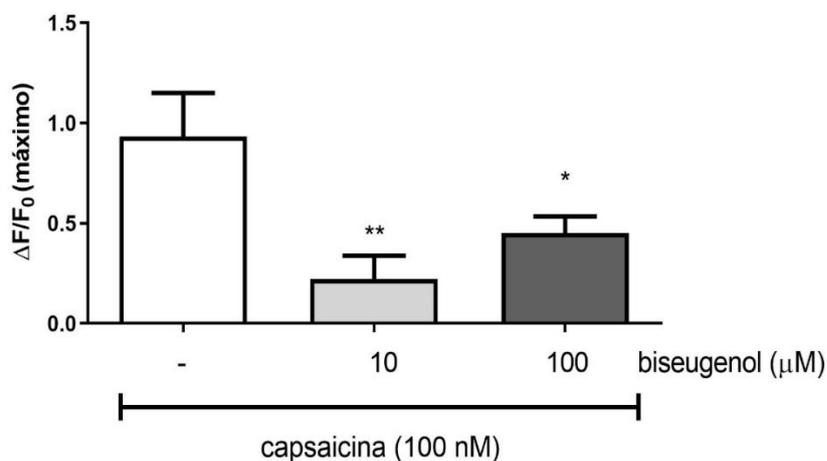
Efeito do biseugenol sobre a ação da capsaicina na ativação do receptor TRPV1

Figura 7- Efeito do Biseugenol sobre o potencial de repouso em neurônios sensoriais primários. A avaliação do potencial de repouso neuronal foi realizada por meio das variações na fluorescência emitida pelo indicador intracelular Fluo 3-AM (Invitrogen). Na figura, são apresentadas as mudanças na fluorescência provocadas pela administração do veículo (Hanks) ou o biseugenol (10 μM , 100 μM) ao longo de um período de 2 minutos.

Os efeitos da capsaicina nos níveis de cálcio intracelular foram avaliados em culturas primárias de gânglios da raiz dorsal, utilizando Fluo3-AM conforme descrito anteriormente. Ao incubar essas culturas com Fluo-3 AM para a observação do cálcio intracelular, o fluoróforo inicialmente alcança as células gliais satélites, acumulando-se nelas. Como resultado, a quantidade de Fluo-3 AM que atinge os neurônios é reduzida, resultando em uma fluorescência basal mais baixa. Ainda, conforme demonstrado na figura 8, constatamos que a aplicação de biseugenol na concentração de 100 μM provocou um aumento imediato nos níveis de cálcio intracelular nas células da glia.

Efeito do biseugenol associado a capsaicina sobre células da glia

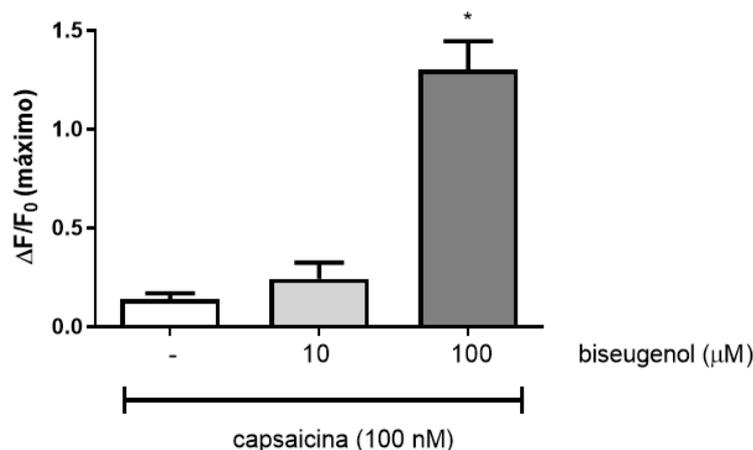


Figura 8- Efeito do biseugenol sobre o potencial de repouso em células da glia. A avaliação do potencial de repouso neuronal foi realizada por meio das variações na fluorescência emitida pelo indicador intracelular Fluo 3-AM (Invitrogen). Na figura, são apresentadas as mudanças na fluorescência provocadas pela administração do veículo (Hanks) ou biseugenol (10 μM, 100 μM) ao longo de um período de 2 minutos.

5.2 Experimentos *in vivo*

5.2.1 Teste de nocicepção induzido por capsaicina

No teste *in vivo*, destinado a avaliar o impacto da administração intraplantar de biseugenol na nocicepção induzida pela injeção de capsaicina nas patas de ratos, foi observado que os animais submetidos às concentrações mais elevadas de biseugenol (50 μM) manifestaram uma redução significativa na resposta nociceptiva em comparação com os animais controle, que receberam uma solução de capsaicina contendo apenas o veículo (Figura 9). Além disso, foi possível observar que a administração do biseugenol sozinho não foi capaz de induzir respostas nociceptivas nos animais testados.

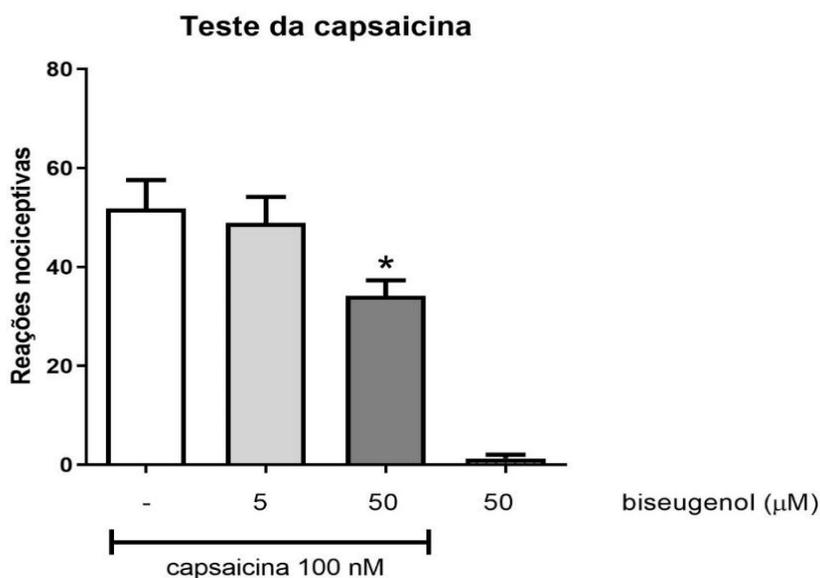


Figura 9- Teste de nociceção induzida pela capsaicina. As reações nociceptivas foram avaliadas durante 5 minutos após a administração de capsaicina, 10 μg em 50 μl (intraplantar). O biseugenol (5 μg ou 50 μg) e o veículo (1% DMSO) foram administrados juntamente com a capsaicina, na mesma injeção. Dados apresentados em média e EPM de 10 animais por grupo. *(p<0,05) significativamente diferente do grupo controle sem biseugenol (ANOVA seguida de teste de Dunnet)

5.2.2 Teste de hiperalgesia induzido por carragenina

Foram conduzidos testes para examinar os efeitos da administração de biseugenol no limiar hipernociceptivo dos animais. O limiar de sensibilidade mecânica foi avaliado em três momentos distintos: no estado basal, 1h30 após a administração intraplantar de carragenina (100 μg em 50 μl) e 3h posteriormente. A aplicação de biseugenol (5 μg ou 50 μg) ocorreu por via intraplantar, juntamente com a carragenina. Contudo, não se observou uma diferença significativa no limiar de sensibilidade mecânica entre os grupos de animais analisados, como ilustrado na Figura 10. Em outras palavras, o biseugenol não demonstrou ter impacto significativo na hiperalgesia induzida pela carragenina, embora seja possível observar uma tendência na inibição da hiperalgesia induzida pela carragenina na dose de 50 μg de biseugenol. Toda via, quando administrado de forma isolada o biseugenol foi capaz de aumentar o limiar, sugerindo uma redução na sensibilidade mecânica.

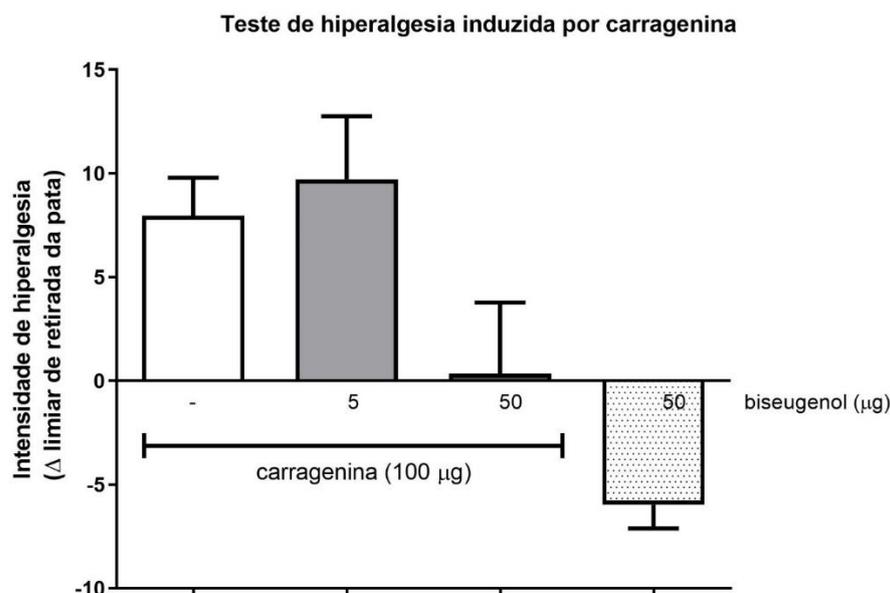


Figura 10- Teste de hiperalgesia induzida por carragenina. O limiar de sensibilidade mecânica foi avaliado em três momentos, sendo: basal, 1h30 depois da administração de carragenina (10 μg em 50 μl, intraplantar) e 3h. Dados apresentados em média e EPM de 4 animais por grupo.

5.2.3 Teste de avaliação do edema da pata

No ensaio de edema de pata induzido por carragenina, os resultados obtidos com os grupos tratados após 1h30 e 3h não apresentaram diferenças estatisticamente significantes em relação aos grupos controles (carragenina e salina), quando avaliados por ANOVA ($p < 0.05$) (Figura 11). A administração intraplantar de biseugenol nas patas direitas dos ratos não foi capaz de inibir o desenvolvimento do edema. Em outras palavras, as doses de 5 e 50 μg de biseugenol não demonstraram capacidade de reduzir a inflamação desencadeada pela carragenina nas patas dos animais tratados. Assim é possível observar que as frações de biseugenol usadas no ensaio não apresentaram ação anti-inflamatória em condições de tempo e dose específicas, no ensaio de edema de pata induzido por carragenina.

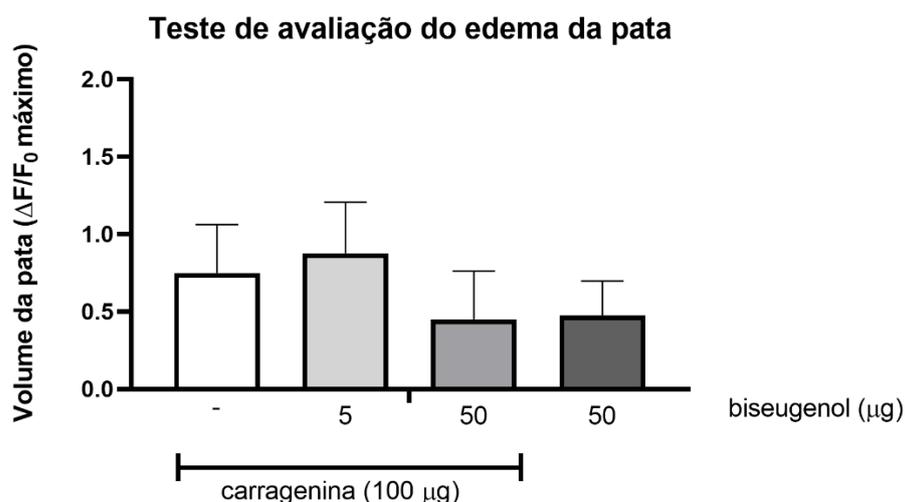


Figura 11- Teste de avaliação do edema da pata. O volume da pata foi avaliado em três momentos: basal, 1h30 depois da administração de carragenina (10 μg em 50 μl, intraplantar) e 3h. Dados apresentados em média e EPM de 4 animais por grupo.

6. DISCUSÃO

Neste estudo, exploramos as propriedades analgésicas e anti-inflamatórias do biseugenol, além de investigar seu impacto no influxo de cálcio em neurônios aferentes primários e células satélites gliais presentes nos gânglios da raiz dorsal de ratos, tanto em culturas quanto em avaliações comportamentais. O objetivo principal foi identificar potenciais antagonistas do receptor TRPV1 derivados de produtos naturais, visando à descoberta de analgésicos mais seguros e eficazes para o tratamento da hiperalgesia inflamatória. Os resultados desta pesquisa sustentam a ideia de que o biseugenol, um dímero do eugenol, exerce efeitos semelhantes a este composto, atuando como agente anestésico e analgésico. Dessa forma, identificamos as propriedades antinociceptivas e o mecanismo de ação do biseugenol em relação ao receptor TRPV1, evidenciando seu potencial anti-nociceptivo em modelos de dor aguda, como no teste de nocicepção induzido pela injeção intraplantar de capsaicina. Neste teste, observou-se que a administração do biseugenol em concentrações de 10 e 100 mM foi capaz de bloquear a ativação do receptor TRPV1 e inibir o efeito da capsaicina sobre o influxo de cálcio nos nociceptores. Enquanto, ao examinar a influência do biseugenol nas células da glia, notou-se que ele demonstrou a capacidade de induzir anestesia nos neurônios. O que resultou na liberação instantânea de ATP ao aplicar a capsaicina, intensificando a ativação das células gliais.

Paralelamente, estudos recentes conduzidos por nosso grupo de pesquisa (LEMES, et al., 2018), revelaram que a comunicação entre as células da glia e os neurônios sensoriais primários nos gânglios da raiz dorsal desempenha um papel crucial no processamento rápido da

dor aguda. Em neurônios cultivados, observou-se que a ativação pela capsaicina resulta na liberação de ATP, que, por sua vez, ativa o receptor P2X7, desencadeando transientes de cálcio nas células gliais circundantes. Em ratos, a administração de um antagonista P2X7 ou de um bloqueador de junções comunicantes diretamente nos gânglios da raiz dorsal (no nível L5) diminuiu o comportamento nocifensivo agudo provocado pela injeção intraplantar de capsaicina. Quando ambas as substâncias foram administradas antes da injeção intraplantar de formalina, apenas a fase inflamatória (fase 2) foi reduzida.

Nos gânglios sensoriais, a comunicação entre neurônios e glia tem sido associada à sensibilização neuronal e à manutenção da dor crônica. Relatos indicam que neurotransmissores como glutamato ou ATP são liberados por neurônios dentro dos gânglios da raiz dorsal, podendo ativar células gliais satélites. Durante experimentos, foi observado que, aproximadamente 8 segundos após as respostas neuronais, as células gliais satélites exibiram um transiente de cálcio. Esses dados sugerem que as células gliais satélites são ativadas pelo ATP liberado por neurônios excitados, e esse sinal pode ser transmitido através de células satélites vizinhas por meio de cálcio ou outras substâncias que atravessam junções comunicantes. Embora processos semelhantes tenham sido identificados anteriormente, este foi o primeiro relato dessa comunicação ocorrendo na nocicepção aguda. Em condições basais, as junções comunicantes que conectam as células gliais satélites são encontradas principalmente entre células que envolvem o mesmo neurônio. No entanto, após lesão nervosa ou inflamação, essa conexão também é observada entre células ao redor de neurônios vizinhos. Portanto, em condições basais, como na dor aguda, as células gliais satélites são mais propensas a fornecer um feedback positivo para o mesmo neurônio que foi excitado.

Outro modelo experimental clássico no estudo da dor é o teste da carragenina, que é um modelo para avaliação da hiperalgesia inflamatória. Neste caso, é avaliada a variação no limiar de sensibilidade mecânica na pata dos animais. A carragenina é um polissacarídeo extraído de algas, bastante utilizado na indústria alimentícia e que, quando injetado no tecido intraplantar dos animais induz uma resposta inflamatória aguda típica, com migração neutrofílica e liberação de mediadores inflamatórios, tais como TNF- α , IL-1 β e PGE2 (ARAÚJO, 2019). Dessa maneira, os resultados expostos neste estudo indicam que a administração intraplantar de biseugenol pode potencialmente induzir analgesia no modelo de hiperalgesia inflamatória, demonstrando a capacidade de aumentar o limiar de sensibilidade mecânica. Além disso, devido a problemas na primeira série de experimentos, incluindo a baixa quantidade de animais testa-

dos e as concentrações das drogas administradas, é necessário que este teste seja repetido posteriormente, aumentando tanto o número de animais quanto as concentrações. Pois, somente assim será possível a apresentação de resultados concretos e fidedignos.

No contexto do modelo de edema de pata, a formação do edema inflamatório é fortemente influenciada pelos aspectos microvasculares. O equilíbrio entre a pressão hidrostática intravascular, que favorece a saída do fluido dos vasos, e a pressão osmótica exercida pelas proteínas plasmáticas, que tende a reter o fluido dentro dos vasos (conhecido como a lei de Starling), regula o movimento do fluido na microcirculação. Durante a resposta inflamatória aguda, ocorre um aumento na pressão hidrostática na microcirculação, tornando os pequenos vasos mais permeáveis às proteínas plasmáticas. A saída dessas proteínas dos vasos para o interstício eleva a pressão osmótica, resultando na liberação adicional de fluido para o interstício. Esse processo leva à formação do edema e ao aumento da viscosidade sanguínea, que desacelera o fluxo sanguíneo (estase sanguínea) e favorece a adesão leucocitária. Assim, é originado o exsudato inflamatório, característica principal da resposta inflamatória aguda.

Em nossa pesquisa, o biseugenol, quando administrado isoladamente, não demonstrou ação anti-edematogênica. No entanto, a resposta observada não foi consistentemente proporcional à dose aplicada. O edema de pata induzido por carragenina serve como um modelo útil para avaliar o potencial anti-inflamatório de substâncias e investigar a contribuição de mediadores envolvidos nas alterações vasculares associadas à inflamação aguda. Embora esse modelo possa não ser eficaz para detectar o efeito anti-edematogênico de substâncias que inibem a síntese de prostaglandinas, isso não implica que ele seja capaz de expressar claramente uma relação dose-resposta da substância avaliada. O que a princípio não nos leva a ser capaz de comprovar o efeito anti-inflamatório até então sugerido, portanto, também se torna necessário conduzir o teste em novas concentrações e com um maior número de animais testados, uma vez que a falta estatísticas significativas se deu devido a imprevistos com a na primeira série de experimentos *in vivo* realizados.

Assim, a inflamação induzida por carragenina é aguda e auto-limitada, resolvendo-se sozinha. De fato, o edema causado pela carragenina apresenta volume máximo entre 3 e 4 horas após aplicação, diminuindo gradativamente nas horas seguintes. Essas reações são resultantes da ação de mediadores que podem ser gerados no local da inflamação ou trazidos por células que infiltram dos vasos, devido ao edema e aumento da permeabilidade vascular (SALVADOR, 2011).

7. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados nesse estudo permitem concluir que:

- O biseugenol em concentrações de 10 e 100 mM é capaz de bloquear a ativação do receptor TRPV1 e inibir o efeito da capsaicina sobre o influxo de cálcio nos nociceptores.
- O biseugenol, demonstra exercer efeitos semelhantes a seu dímero eugenol, atuando como agente anestésico e analgésico.
- O biseugenol, é capaz de induzir anestesia nos neurônios, resultando na liberação instantânea de ATP ao aplicar a capsaicina, intensificando a ativação das células gliais.
- A administração intraplantar de biseugenol pode potencialmente induzir analgesia no modelo de hiperalgesia inflamatória, demonstrando a capacidade de aumentar o limiar de sensibilidade mecânica.
- O biseugenol não foi capaz de demonstrar potencial anti-inflamatório e reduzir o edema da pata em ratos.

6. REFERÊNCIAS

ADCOCK JJ. TRPV1 receptors in sensitisation of cough and pain reflexes. *Pulm Pharmacol Ther* 2009; 22: 65-70.

ALMEIDA, R.N.; AGRA, M.D.E. F, MAIOR, F.N.; DE SOUSA, D.P. Essential oils and their constituents: anticonvulsant activity. *Molecules*, v.16, n.3, p.2726-2742, 2011.

BARROSO BATISTA J, A SOUSA, LOURENÇO M, BERGMAN ML, SOBRAL D, DEMENGEOT J, XAVIER KB. Gordo I The first stages of adaptation of *Escherichia coli* to the intestine are dominated by molecular scans *PLoS Genet*. 2014; 10(3):e1004182.

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

BASSOLS A, BOSCH F, BAÑOS JE. J Pain Symptom Manage. How does the general population treat your pain? Research in Catalonia, Spain 2002; 23(4):318-28.

BEAULIEU, P. La douleur. Guide Pharmacologique et Thérapeutique. Éditions Maloine, 2013

BORGES, F. V.; SALES, M. D. C. Políticas públicas de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil: sua história no sistema de saúde. Pensar Acadêmico, v. 16, n. 1, p. 13-27, 2018.

BOTZ B, BÖLCSKEI K, HELYES Z. Challenges to develop novel anti-inflammatory and analgesic drugs. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 2017; 9(3).

BRENNAN GP, FRITZ JM, HUNTER SJ. Impact of continuing education interventions on clinical outcomes of patients with neck pain who received physical therapy. Phys Ther. 2006; 86(9):1251-62.

BRENNAN, F.; CARR, D. B.; COUSINS, M. Pain management: A fundamental human right. Anesthesia and Analgesia, 2007

BURGOYNE, C.C.; GIGLIO, J.A.; REESE, S.E.; SIMA, A.P.; LASKIN, D.M. The efficacy of a topical anesthetic gel in the relief of pain associated with localized alveolar osteitis. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, v.68, n.1, p.144-148, 2010.

CALIXTO JB, BEIRITH A, FERREIRA J, SANTOS AR, FILHO VC, YUNES RA. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. Phytother Res 2000; 14: 401-18.

CALIXTO JB, KASSUYA CA, ANDRÉ E, FERREIRA J. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. Pharmacol Ther 2005; 106: 179-208

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. J. Ethnofarmacol., v. 100, n. 22, 2005.

CATERINA, M. J.; JULIUS, D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. Annual review of neuroscience, v. 24, p. 487-517, jan. 2001.

CHIZH BA, O'DONNELL MB, NAPOLITANO A, WANG J, BROOKE AC, AYLOTT MC, BULLMAN JN, GRAY EJ, LAI RY, WILLIAMS PM, APPLEBY JM. The effects of the TRPV1 antagonist SB-705498 on TRPV1 receptor-mediated activity and inflammatory hyperalgesia in humans. *Pain* 2007; 132: 132-41.

CORSON TW, CREWS CM. Molecular understanding and modern application of traditional medicines: triumphs and trials. *Cell* 2007; 130: 769-74.

COUTAUX, A. et al. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme*, v. 72, n. 5, p. 359-71, out. 2005.

CRUVINEL WÄNDE M, MESQUITA D JR, ARAÚJO JA, CATELAN TT, DESOUSA AW, DASILVA NP, ANDRADE LE. Immunesystem -Part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. *Rev Bras Reumatol* 2010; 50 (4):434-61

DEVOR M. Unexplained peculiarities of the dorsal root ganglion. *Pain*. 1999 Aug; Suppl 6:S27-S35. doi: 10.1016/S0304-3959(99)00135-9. PMID: 10491970.

DOWLATI E. Spinal cord anatomy, pain, and spinal cord stimulation mechanisms. *Semin Spine Surg* [Internet]. 2017;29(3):136–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.semss.2017.05.002>

EID, S.R.; CORTRIGHT, D.N. Transient receptor potential channels on sensory nerves. Ellison DL. *Physiology of Pain. Crit Care Nurs Clin North Am* [Internet]. 2017;29(4):397–406. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cnc.2017.08.001>

FEIN A. Nociceptores: As células que sentem dor. *Dor On Line*, 2011. Disponível em: <<http://www.dol.inf.br/nociceptores>>.

FERNANDES, P.; BOFF, P. Medicinal plants in the family farms of rural areas in Southern Brazil: ecological and ethnobotanical aspects. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, v. 16, n. 5, p. 493-505, 2017.

FERRARI, L. F. et al. Inflammatory sensitization of nociceptors depends on activation of NMDA receptors in DRG satellite cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 111, n. 51, p. 18363–18368, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1420601111>. Disponível em: <https://www.pnas.org/content/111/51/18363>.

FERREIRA SH, FERRARI LF, CUNHA TM, NASCIMENTO PG, VERRI-JUNIOR W, CUNHA F. Dor inflamatória. In: Neto AO, Costa CM, Siqueira J, Teixeira M. *Dor: Princípios e Prática*. Porto Alegre: Artmed; 2009. 265-278

FISHMAN SM. Recognizing pain management as a human right: a first step. *Anesth Analg*. 2007; 105(1):8-9

GAVVA, N.R., TREANOR, J.J., GARAMI, A., FANG, L., SURAPANENI, S., AKRAMI, A., ALVAREZ, F., BAK, A., DARLING, M., GORE, A., JANG, G.R., KESSLAK, J.P., NI, L., NORMAN, M.H., PALLUCONI, G., ROSE, M.J., SALFI, M., TAN, E., ROMANOVSKY, A.A., BANFIELD, C., DAVAR, G.,. Pharmacological blockade of the vanilloid receptor TRPV1 elicits marked hyperthermia in humans. *Pain* 2008; 136, 202-10.

HANANI, M. (2005). Satellite glial cells in sensory ganglia: From form to function. *Brain Research Reviews*, 48(3), 457–476. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.09.001>

HANANI, M.; SPRAY, D. C. Emerging importance of satellite glia in nervous system-function and dysfunction. *Nature Reviews Neuroscience*, [s.l.] 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41583-020-0333-z>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41583-020-0333-z>.

Handbook of experimental pharmacology, v.194, p.261-81, 2009. https://doi.org/10.1007/978-3-540-79090-7_8

HARDY J, WOLFF H, GOODELL H. Experimental evidence on the nature of cutaneous hyperalgesia. *J Clin Invest*. 1950; 29(1):115–140

HARVEY, A. M. Classification of Chronic Pain—Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definitions of Pain Terms. *The Clinical Journal of Pain*, 2006.

HOLZER P. Acid-sensitive ion channels and receptors. *Handb Exp Pharmacol*. 2009;(194):283-332. doi: 10.1007/978-3-540-79090-7_9. PMID: 19655111; PMCID: PMC4359897.

HUANG, C.; LI, W.G.; ZHANG, X.B.; WANG, L.; XU, T.L.; WU, D.; LI, Y. Alpha-asarone from *Acorus gramineus* alleviates epilepsy by modulating A-Type GABA receptors. *Neuropharmacology*, v.65, p.1-11, 2013.

HUANG, J.; ZHANG, X.; MCNAUGHTON, P. A. Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia. *Current neuropharmacology*, v. 4, n. 3, p. 197-206, jul. 2006.

HUANG, J.; ZHANG, X.; MCNAUGHTON, P. A. Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia. *Current neuropharmacology*, v. 4, n. 3, p. 197–206, 2006. <https://doi.org/10.2174/157015906778019554>

JENSEN, T.S.; FINNERUP, N.B. Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: clinical manifestations and mechanisms. *The Lancet*, v.13(9), p. 924-935, 2014. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70102-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70102-4)

JULIUS D. TRP channels and pain. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2013; 29:355-84.
KISSIN, I.; FREITAS, C.F.; BRADLEY EL, J.R.; Perineural resiniferatoxin prevents the development of hyperalgesia produced by loose ligation of the sciatic nerve in rats. *Anesth Analg*, v.104, p.1210-1216, 2007

KOEHN FE, CARTER GT. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 206-20.

LEE, Y. C. Effect and treatment of chronic pain in inflammatory arthritis. *Current Rheumatology Reports*, 2013.

LEHTO SG, TAMIR R, DENG H, KLIONSKY L, KUANG R, LE A, LEE D, LOUIS JC, MAGAL E, MANNING BH, RUBINO J, SURAPANENI S, TAMAYO N, WANG T, WANG J, WANG J, WANG W, YOUNGBLOOD B, ZHANG M, ZHU D, NORMAN MH, GAVVA NR. Antihyperalgesic effects of (R,E)-N-(2-hydroxy-2,3-dihydro-1H-inden-4-yl)-3-(2-(piperidin-1-yl)-4-(trifluoromethyl)phenyl)-acrylamide (AMG8562), a novel transient receptor potential vanilloid type 1 modulator that does not cause hyperthermia in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 326: 218-29.

LEIJNSE JN, D'HERDE K. Revisiting the segmental organization of the human spinal cord. *J Anat.* 2016 Sep;229(3):384-93. doi: 10.1111/joa.12493. Epub 2016 May 12. PMID: 27173936; PMCID: PMC4974552.

LEITE, N. A. A utilização da etnobotânica na fisioterapia: conhecimentos e práticas do uso de plantas medicinais e fitoterápicos. 2019.

LEMES, J. B. P. et al. Participation of satellite glial cells of the dorsal root ganglia in acute nociception. *Neuroscience Letters*, [s.l.]v. 676, p. 8–12, mar. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.04.003>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304394018302581?via%3Dihub>.

LEWIN, G. R.; LU, Y.; PARK, T. J. A plethora of painful molecules. *Current opinion in neurobiology*, v. 14, n. 4, p. 443-9, ago. 2004.

LIBBY, P. Inflammatory Mechanisms: The Molecular Basis of Inflammation and Disease. *Nutrition Reviews*, 2007

LOHMAN D, SCHLEIFER R, AMON JJ. Access to pain treatment as a human right. *BMC Med.* 2010;8:8. measuring function beyond the immediate perioperative horizon. *Anesthesiology*, v. 91.

MICHEL, C. C.; CURRY, F. E. Microvascular Permeability. *Physiol. Rev.*, v. 79, n.3, p. 703-761, 1999. n. 4, p. 909-11, out. 1999.

NATHAN, C.; DING, A. Nonresolving InflammationCell, 2010

Neacsu C, Ciobanu C, Barbu I, Toader O, Szegli G, Kerek F, Babes A. Substance MCS-18 isolated from *Helleborus purpurascens* is a potent antagonist of the capsaicin receptor, TRPV1, in rat cultured sensory neurons. *Physiol Res* 2010; 59: 289-98.

NEVES, A. F. et al. Peripheral Inflammatory Hyperalgesia Depends on P2X7 Receptors in Satellite Glial Cells. *Frontiers in Physiology*, Uberlândia, v. 11, p. 1–13, maio 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00473>. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00473>. nociceptors. *Neuron*, v. 20, n. 4, p. 629-32, abr. 1998.

OLIVEIRA, L.M. DORES. In: Lente, R. *Neurociência da Mente e do Comportamento*. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara. Koogan. Cap 8, p. 183-201, 2008.

POPE JE, DEER TR, KRAMER J. A systematic review: current and future directions of dorsal root ganglion therapeutics to treat chronic pain. *Pain Med*. 2013 Oct;14(10):1477-96. doi: 10.1111/pme.12171. Epub 2013 Jun 26. PMID: 23802747.

PURVES, D. et al. *Neurociências*. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed. Cap. 10, p. 231-250, 2010.

RAJA, S. N.; HAYTHORNTHWAITE, J. A. Anesthetic management of the elderly:

RAMI HK, THOMPSON M, STEMP G, FELL S, JERMAN JC, STEVENS AJ, SMART D, SARGENT B, SANDERSON D, RANDALL AD, GUNTHORPE MJ, DAVIS JB. Discovery of SB-705498: a potent, selective and orally bioavailable TRPV1 antagonist suitable for clinical development. *Bioorg Med Chem Lett* 2006; 16: 3287-91

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, v.39, n.5, 2001.

RIEDEL, W.; NEECK, G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts.

ROSSATO MF, TREVISAN G, WALKER CI, KLAFKE JZ, DE OLIVEIRA AP, VILLARINHO JG, ZANON RB, ROYES LF, ATHAYDE ML, GOMEZ MV, FERREIRA J. Eriodictyol: a flavonoid antagonist of the TRPV1 receptor with antioxidant activity. *Biochem Pharmacol* 2011; 81: 544-51.

SBED. Sociedade Brasileira para Estudo da Dor.

SCHUMACHER MA. Transient receptor potential channels in pain and inflammation: therapeutic opportunities. *Pain Pract.* 2010; 10(3):185-200.

SOUZA, G. R. et al. Fractalkine mediates inflammatory pain through activation of satellite glial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 110, n. 27, p. 11193–11198, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1307445110>. Disponível em: <https://www.pnas.org/content/110/27/11193>.

TROWBRIDGE, H. O.; EMLING, R. C. *Inflamação: Uma revisão do processo*. 4. ed. São Paulo: Quintessence, 1996. p. 172.

VERRI, W. A. et al. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? *Pharmacology & therapeutics*, v. 112, n. 1, p. 116-38, out. 2006.

WILTSE LL. Anatomy of the extradural compartments of the lumbar spinal canal. Peridural membrane and circumneural sheath. *Radiol Clin North Am.* 2000 Nov;38(6):1177-206. doi: 10.1016/s0033-8389(08)70003-4. PMID: 11131629

WONG GY, GAVVA NR. Therapeutic potential of vanilloid receptor TRPV1 agonists and antagonists as analgesics: Recent advances and setbacks. *Brain Res Rev* 2009; 60: 267-77.

WOOLF, C. J. What is this thing called pain? *Journal Of Clinical Investigation*, [s. l.], v.120, n. 11, p. 3742-3744, nov. de 2010. Disponível em:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2965006/pdf/JCI45178.pdf>.

ZEITSCHRIFT FÜR Rheumatologie, v. 60, n. 6, p. 404-15, dez. 2001.

ZHENG, G.Q.; KENNEY, P.M.; LAM, L.K. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. *Journal of Natural Products*, v.55, n.7, p.999-1003, 1992.