

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<sup>ª</sup>. 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<sup>ª</sup>. Dra. Celina Monteiro da Cruz Lotufo

Banca examinadora:

---

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Celina Monteiro da Cruz Lotufo (UFU)

---

Dr<sup>ª</sup> 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

**Introdução:** A descoberta de novos fármacos é crucial para melhorar a qualidade de vida em doenças crônicas e garantir a sobrevivência dos pacientes. Enquanto alguns medicamentos, como o ibuprofeno e o diclofenaco, inibidores da COX-1, podem causar efeitos colaterais indesejados, como toxicidade gástrica e nefrotoxicidade. Por isso, o uso de produtos naturais como alternativas seguras vem sendo usado a fim de minimizar qualquer dano potencial aos indivíduos e reduzindo seus efeitos adversos. **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. **Métodos:** Foi avaliado o efeito da molécula biseugenol como analgésico e anti-inflamatório em modelos de dor e hiperalgesia em ratos. Além do efeito do biseugenol sobre a ativação de receptores TRPV1 em culturas primárias de gânglios sensoriais de ratos, as alterações no potencial de repouso foram avaliadas por microscopia confocal através do uso do indicador Fluo 3-AM. O efeito biseugenol em antagonizar o receptor TRPV1 foi avaliado nos gânglios da raiz dorsal, em testes comportamentais, sendo estes os testes da capsaicina, hiperalgesia mecânica induzida por injeção de carragenina e volume no edema da pata de ratos. **Resultados:** A prévia administração de biseugenol, nas concentrações de 10  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ , conseguiu inibir os efeitos da capsaicina nos níveis de cálcio intracelular em culturas primárias de gânglios da raiz dorsal. Neurônios apresentaram uma resposta reduzida à capsaicina, enquanto células da glia demonstraram um aumento no cálcio intracelular após a administração de capsaicina. No teste comportamental com capsaicina, animais expostos à concentração mais elevada de biseugenol (50  $\mu\text{M}$ ) exibiram uma redução significativa na resposta nociceptiva em comparação com os animais controle que receberam apenas a solução de capsaicina com o veículo. Entretanto, no teste de sensibilidade mecânica, o biseugenol não teve um impacto significativo na hiperalgesia induzida pela carragenina, embora tenha mostrado uma tendência na inibição da hiperalgesia com a dose de 50  $\mu\text{g}$  de biseugenol. Quando administrado isoladamente, o biseugenol aumentou o limiar, sugerindo uma redução na sensibilidade mecânica basal dos animais. No entanto, na avaliação do edema da pata, a administração intraplantar de biseugenol não conseguiu inibir o desenvolvimento do edema. **Conclusões:** Com base nos resultados obtidos, é possível concluir que o biseugenol demonstrou a capacidade de diminuir a nocicepção induzida pela administração de capsaicina na pata de ratos. Isso sugere um efeito analgésico ou anestésico direto sobre os neurônios. Nas concentrações de 10 e 100  $\mu\text{M}$ , o biseugenol reduziu a ativação

do receptor TRPV1 pela capsaicina, inibindo o influxo de cálcio nos nociceptores. Além disso, provocou um aumento na resposta das células satélites gliais à aplicação da capsaicina, o que confirma seu efeito neuronal. Embora a administração intraplantar do biseugenol pareça induzir analgesia, não foram observadas alterações no teste de edema da pata em ratos.

**Palavras-chave:** Biseugenol, Produtos Naturais, Resposta inflamatória, Dor.

**ABSTRACT**

**Introduction:** The discovery of new drugs is crucial to improving the quality of life in chronic diseases and ensuring patient survival. While some medications, such as ibuprofen and diclofenac, COX-1 inhibitors, can cause unwanted side effects, such as gastric toxicity and nephrotoxicity. Therefore, the use of natural products as safe alternatives has been used in order to minimize any potential harm to individuals and reduce their adverse effects. **Objective:** To evaluate the effect of the biseugenol molecule as an analgesic and anti-inflammatory in models of pain and hyperalgesia in rats. In addition, evaluate the effect of biseugenol on the activation of TRPV1 receptors in primary cultures of rat sensory ganglia. **Methods:** The effect of the biseugenol molecule as an analgesic and anti-inflammatory in models of pain and hyperalgesia in rats was evaluated. In addition to the effect of biseugenol on the activation of TRPV1 receptors in primary cultures of rat sensory ganglia, changes in resting potential were evaluated by confocal microscopy using the Fluo 3-AM indicator. The biseugenol effect in antagonizing the TRPV1 receptor was evaluated in the dorsal root ganglia, in behavioral tests, these being the capsaicin tests, mechanical hyperalgesia induced by carrageenan injection and volume in paw edema in rats. **Results:** Previous administration of biseugenol, at concentrations of 10  $\mu\text{M}$  and 100  $\mu\text{M}$ , managed to inhibit the effects of capsaicin on intracellular calcium levels in primary cultures of dorsal root ganglia. Neurons showed a reduced response to capsaicin, while glial cells demonstrated an increase in intracellular calcium after capsaicin administration. In the behavioral test with capsaicin, animals exposed to the highest concentration of biseugenol (50  $\mu\text{M}$ ) exhibited a significant reduction in the nociceptive response compared to control animals that received only the capsaicin solution with the vehicle. However, in the mechanical sensitivity test, biseugenol did not have a significant impact on carrageenan-induced hyperalgesia, although it showed a tendency to inhibit hyperalgesia with a dose of 50  $\mu\text{g}$  of biseugenol. When administered alone, biseugenol increased the threshold, suggesting a reduction in the animals' basal mechanical sensitivity. However, in the evaluation of paw edema, intraplantar administration of biseugenol failed to inhibit the development of edema. **Conclusions:** Based on the results obtained, it is possible to conclude that biseugenol demonstrated the ability to reduce nociception induced by administration of capsaicin in the paw of rats. This suggests a direct analgesic or anesthetic effect on neurons. At concentrations of 10 and 100  $\mu\text{M}$ , biseugenol reduced the activation of the TRPV1 receptor by capsaicin, inhibiting the influx of calcium into nociceptors. Furthermore, it caused an increase in the response of glial satellite cells to the application of capsaicin, which confirms its neuronal

effect. Although intraplantar administration of biseugenol appears to induce analgesia, no changes were observed in the paw edema test in rats.

**Key-words:** Biseugenol, 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 <sup>2+</sup>	Cálcio
CGS	Célula Glial Satélite
CO <sub>2</sub>	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
NMDA	N-metil-D-aspartato
OH	Radicais Hidroxila
P2X4	Receptores Ionotrópicos Purinérgicos
P2X7	Purinoceptor 7
PGE2	Prostaglandina
PGI2	Prostaciclina
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TNF	Fator de Necrose Tumoral

TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$
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).

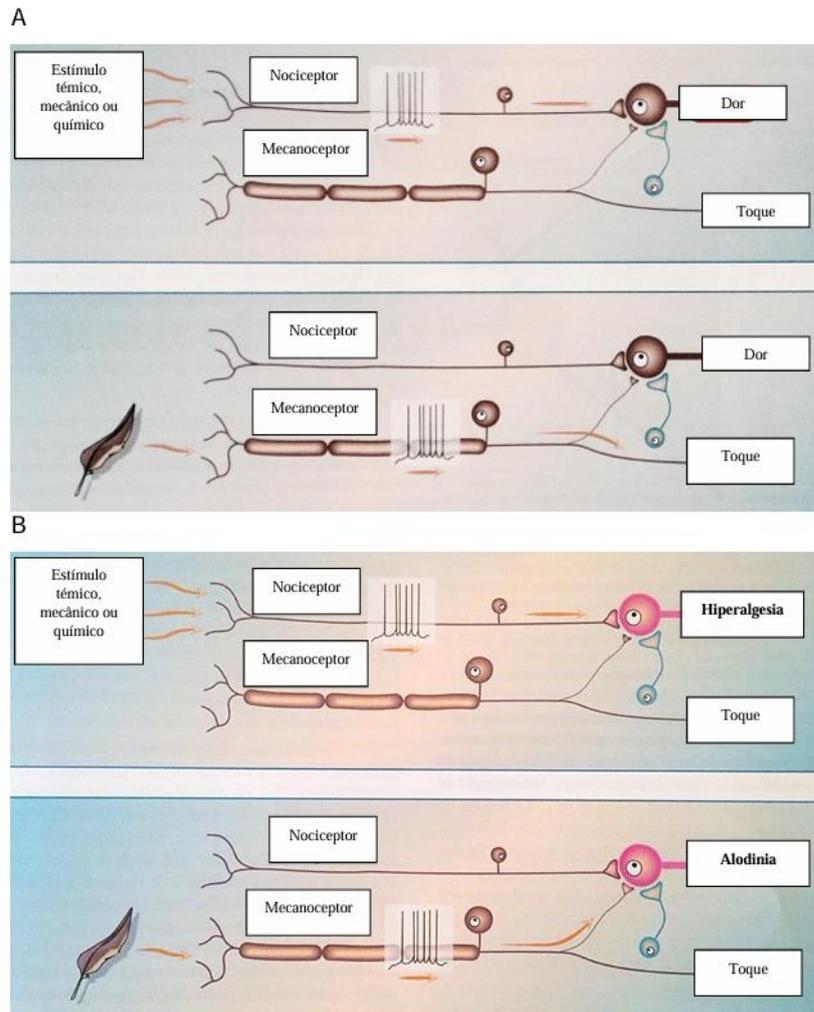
De maneira geral, a dor pode ser classificada em fisiológica ou patológica. A primeira requer uma estímulo nocivo, e geralmente é transitória, pois tende a desaparecer quando o estímulo nocivo é cessado (dor aguda). Esse tipo de dor fornece o alerta ao organismo, ocasionando respostas comportamentais 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, quando 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, está 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 hiperalgesia 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 do 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 PGE<sub>2</sub>. Por outro lado, a inibição da produção de tromboxanos (ex. TXA<sub>2</sub>) e prostaglandinas envolvidas em funções fisiológicas relevantes (como a PGI<sub>2</sub>) 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 microrganismos, 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; Yuneset al., 2005; Newman E Cragg, 2007)

A utilização de plantas medicinais como forma terapêutica é 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). 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**

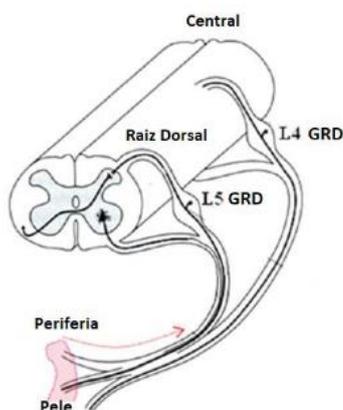
### **2.1 Dor e nocicepção**

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, 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 em um 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 trigeminiais (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 (CSGs). A superfície dos corpos neuronais é densamente revestida de microvilos, que adentram nas lamelas da CSG para aumentar a área de superfície neuronal. Esta morfologia já sugeria que deveria existir uma interação importante entre neurônios e CSGs. 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 lâmina anatomicamente e fisiologicamente distintas. Os nociceptores A $\delta$  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 inofensivos 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 nociceção, 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 do 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  $\text{Ca}^{2+}$  (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 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 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 o 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.

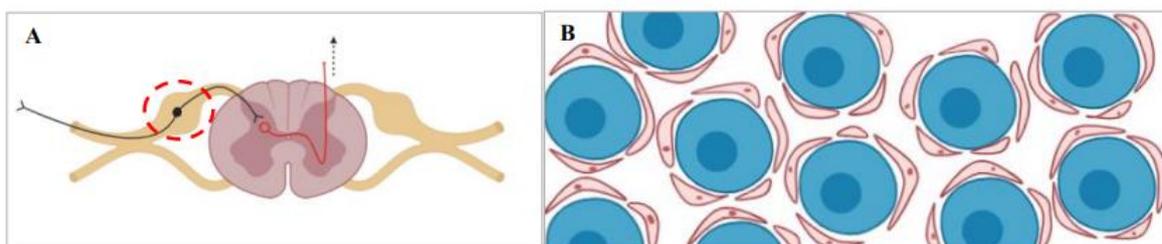
### **2.3 Glânglio da Raiz Dorsal**

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 na transdução 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 $\delta$  (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 podem 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 dele, 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 (P2X4) na microglia, causando maior liberação de ATP microglial e fator neurotrófico derivado do cérebro nos neurônios da lâmina espinhal.

#### **2.4 Biseugenol**

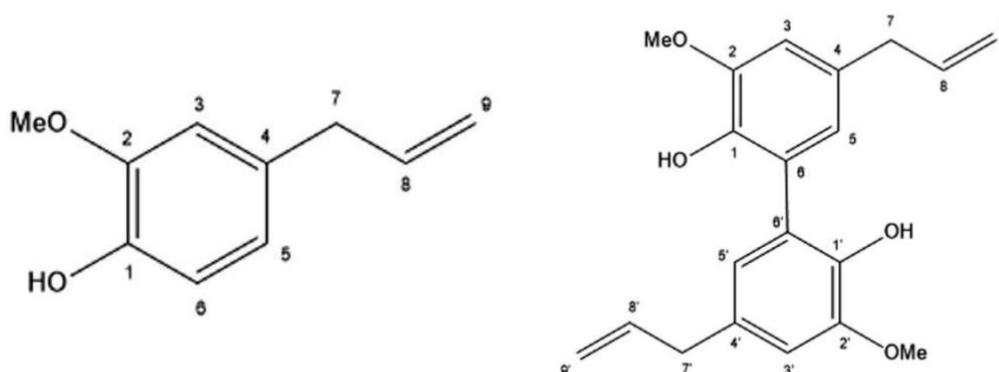
A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece a importância da fitoterapia, sugerindo ser uma alternativa viável e importante também às populações dos países em desenvolvimento, já que seu custo é diminuído. As plantas medicinais têm um importante papel na saúde mundial. Apesar dos grandes avanços observados 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  $\gamma$ -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 neolignanas 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 pulmonares. Alguns possíveis mecanismos desses compostos podem estar relacionados à redução do estresse oxidativo, especialmente iNOS e inibição do NF. 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 ( $\text{OH}^\bullet$ ). Adicionalmente, parece constituir um material de

estabilização promissor na síntese de novos bifenilos, 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 combate 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** O potencial analgésico da molécula será avaliado utilizando o teste da capsaicina em patas de ratos.

**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.

**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.

### **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 e colocados em 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, sendo todos os experimentos realizados de acordo com as normais 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 Purificado (EP) de Desidrodieugenol B
- 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 (10 µg) e o teste de hiperalgesia inflamatória induzido pela carragenina (100 µg), o biseugenol foi administrado nas doses de 5 e 50 µg.

#### **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 CO<sub>2</sub> 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 mcM: administrou-se Biseugenol (10 µM) e após 2 minutos administrou-se capsaicina (100 nM).
- Tratado com Biseugenol 100 mcM: 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 nocicepção 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 nocicepção 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 teste 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 mm<sup>2</sup> 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 (Figura 1). 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 mesmo 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**

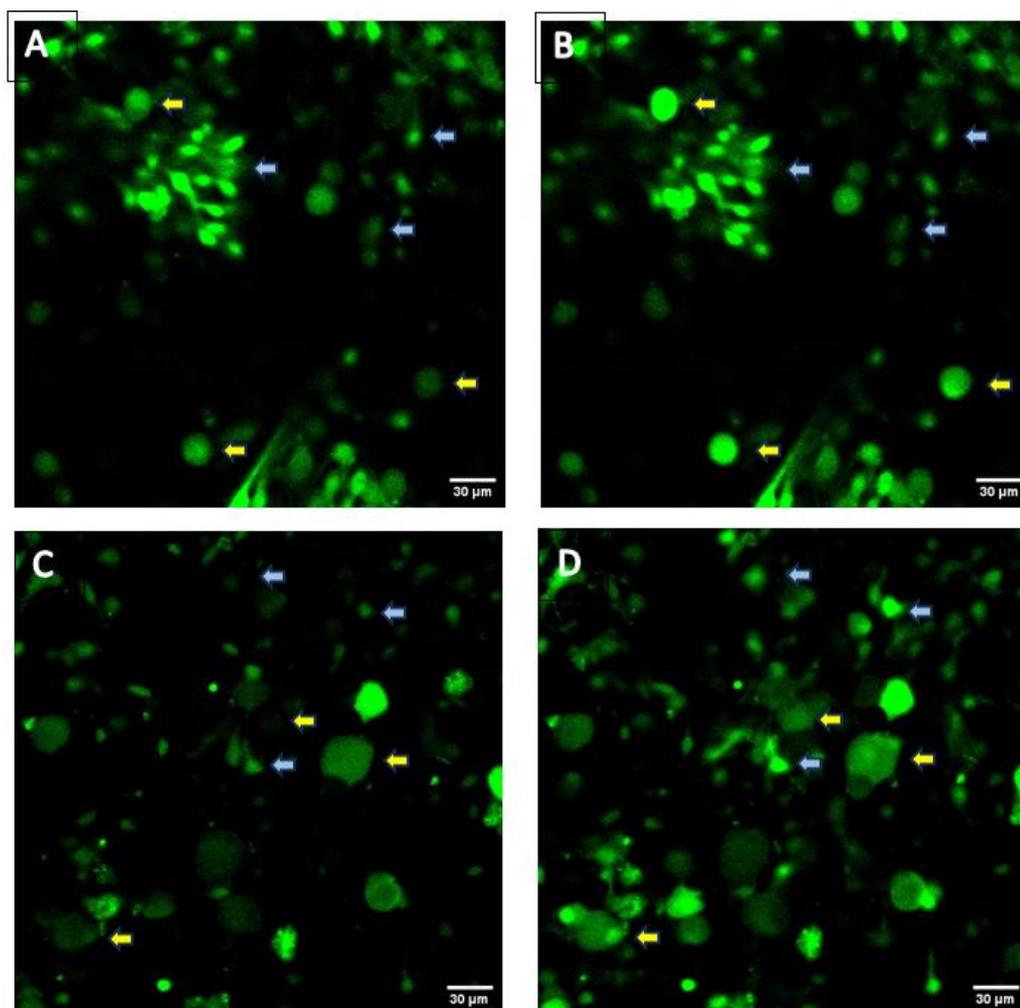
Nos testes *in vitro*, foi avaliada as variações máximas de fluorescência em cada neurônio ou célula glial submetido a análise. Já nos testes *in vivo*, os resultados foram apresentados de acordo com a média e o desvio padrão, derivados da análise do índice de dor proveniente da contagem de flinch ou 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  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  de biseugenol. A

Figura 6, ilustra os resultados obtidos por meio de microscopia confocal, na qual podemos observar o efeito da capsaicina na presença ou ausência de 100  $\mu\text{M}$  de biseugenol. Observamos que os neurônios apresentaram uma diminuição na resposta à capsaicina, enquanto pode-se notar um aumento de células da glia que apresentaram aumento de cálcio intracelular após administração de capsaicina.

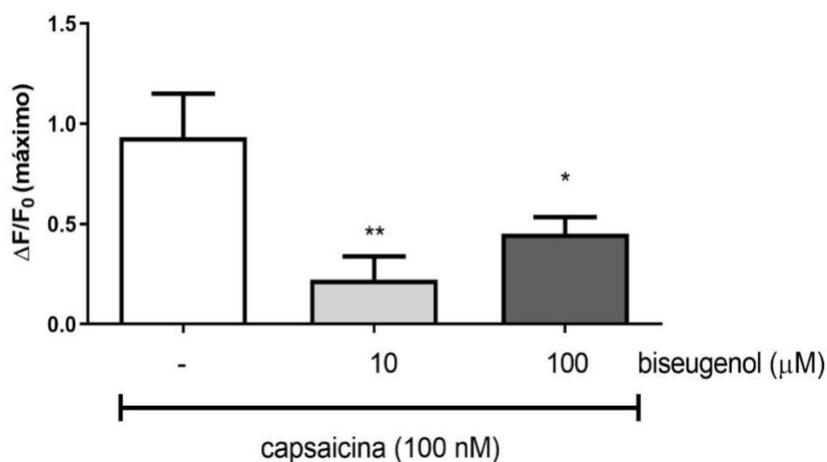


**Figura 6- Efeito do biseugenol sobre o influxo de cálcio induzido por capsaicina nas culturas primárias de GRD.** Imagens de microscopia confocal de células GRD primárias incubadas com o indicador intracelular Fluo 3-AM (Invitrogen), nas quais as setas amarelas representam os neurônios enquanto as setas azuis indicam células da glia. (A) Basal + veículo. (B) Capsaicina após o veículo. (C) Basal após Biseugenol 10  $\mu\text{M}$ . (D) Capsaicina após Biseugenol 100  $\mu\text{M}$ .

O gráfico ilustrado na Figura 7 indica que a administração prévia do biseugenol, em ambas as concentrações de 10  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ , conseguiu inibir o efeito da capsaicina. Notavelmente, a concentração de 10  $\mu\text{M}$  demonstrou induzir uma resposta mais pronunciada em comparação com a administração de biseugenol na concentração de 100  $\mu\text{M}$ . A

administração do biseugenol nas duas doses testadas não causou efeito *per se* nas concentrações intracelulares de cálcio em comparação à administração de veículo (dados não mostrados).

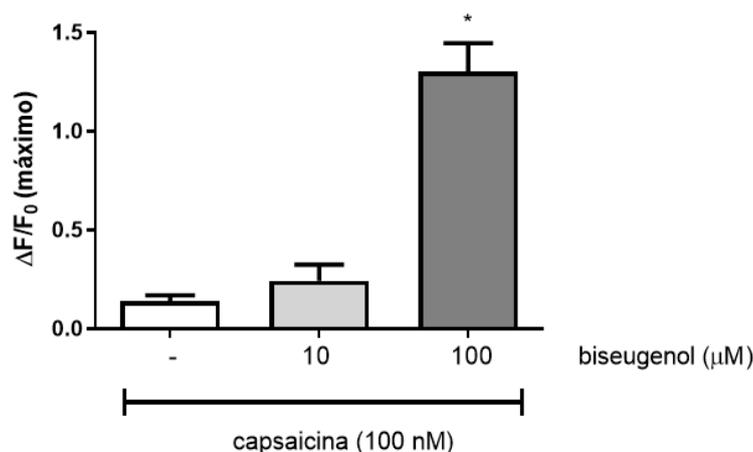
#### Efeito do biseugenol sobre a ação da capsaicina na ativação do receptor TRPV1



**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 capsaicina na presença do veículo (Hanks + 1%DMSO) 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. Na figura 8, constatamos que a aplicação de biseugenol na concentração de 100 μM induziu um aumento nas respostas das células satélites gliais após administração de capsaicina. Importante salientar aqui que as células satélites gliais não possuem receptores TRPV1, ou seja, o efeito observado é necessariamente um efeito indireto.

### Efeito do biseugenol associado a capsaicina sobre células da glia

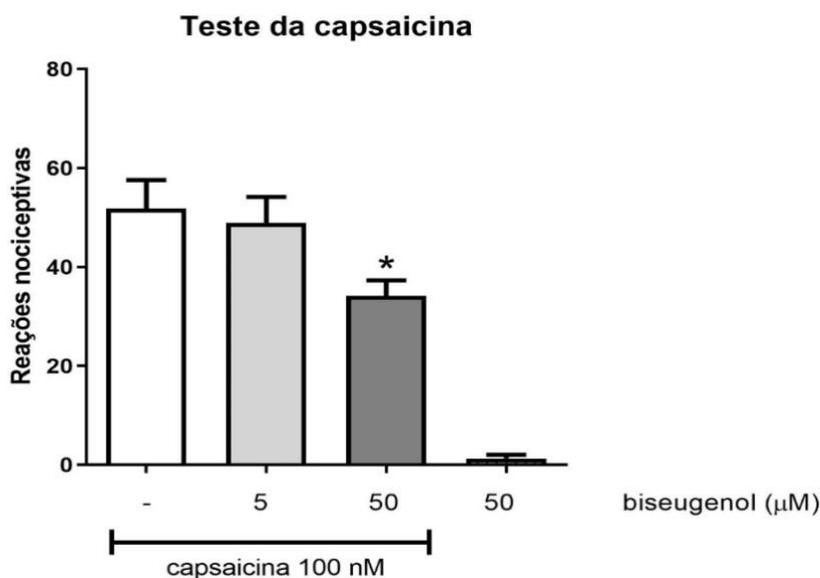


**Figura 8- Efeito do biseugenol sobre o potencial de repouso em células da glia.** A avaliação do potencial de repouso neuronal foi realizada por meio das variações na fluorescência emitida pelo indicador intracelular Fluo 3-AM (Invitrogen). Na figura, são apresentadas as mudanças na fluorescência provocadas pela administração de capsaicina na presença do veículo (Hanks+DMSO 1%) ou biseugenol (10 μM, 100 μM) ao longo de um período de 2 minutos.

## 5.2 Experimentos *in vivo*

### 5.2.1 Teste de nociceção induzido por capsaicina

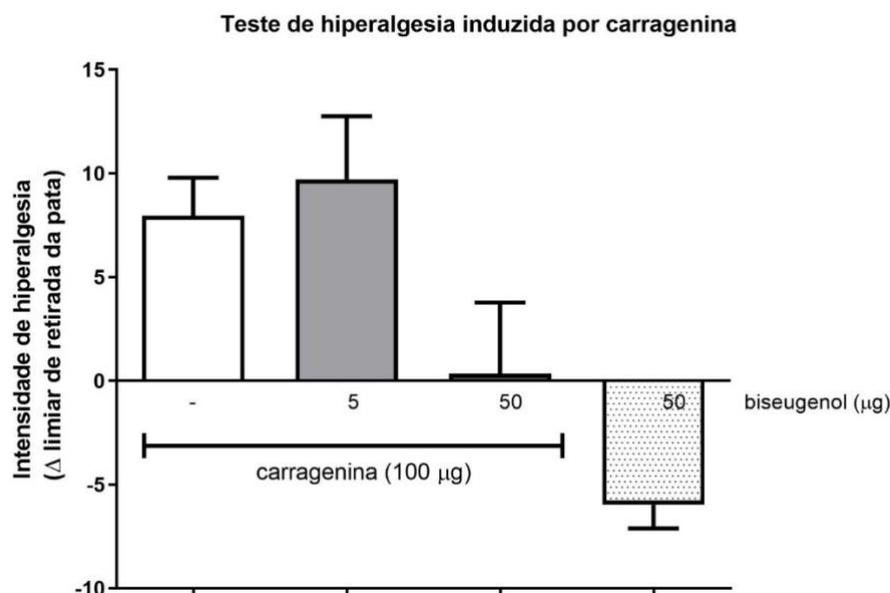
No teste *in vivo*, destinado a avaliar o impacto da administração intraplantar de biseugenol na nociceção induzida pela injeção de capsaicina nas patas de ratos, foi observado que os animais submetidos às concentrações mais elevadas de biseugenol (50 μM) manifestaram uma redução significativa na resposta 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 Dunnett).

### 5.2.2 Teste de hiperalgesia induzido por carragenina

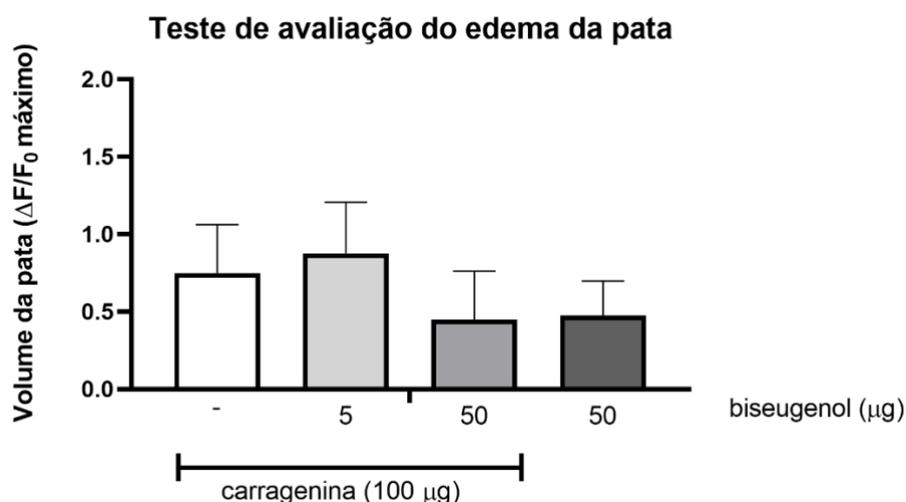
Foram conduzidos testes para examinar os efeitos da administração de biseugenol no limiar hipernociceptivo dos animais. O limiar de sensibilidade mecânica foi avaliado em três momentos distintos: no estado basal, 1h30 após a administração intraplantar de carragenina (100 μg em 50 μl) e 3h posteriormente. 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. Todavia, quando administrado de forma isolada o biseugenol foi capaz de aumentar o limiar, sugerindo uma redução na sensibilidade mecânica basal dos animais.



**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 (100 μg em 50 μl, intraplantar) e 3h. Dados apresentados em média e EPM de 5 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 (100 μg em 50 μl, intraplantar) e 3h. Dados apresentados em média e EPM de 5 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 induzido pela ativação de receptores TRPV1 em neurônios aferentes primários e células satélites gliais presentes nos gânglios da raiz dorsal de ratos. Os resultados desta pesquisa sustentam a ideia de que o biseugenol, um dímero do eugenol, exerce efeitos semelhantes a este último composto, atuando como agente anestésico e analgésico.

Considerando o possível efeito do biseugenol em antagonizar o receptor TRPV1, avaliamos o efeito da administração desta molécula no teste da capsaicina. Este teste consiste na administração de capsaicina na pata traseira de ratos. Ao ativar receptores TRPV1 neste local, a capsaicina provoca respostas nociceptivas pela ativação direta de neurônios nociceptivos. Observamos que o biseugenol na maior dose testada (50 μg) foi capaz de reduzir a nocicepção induzida por capsaicina. Este resultado indica que o biseugenol possui atividade analgésica ou anestésica por uma atuação direta nos neurônios nociceptivos. Este resultado é esperado para uma substância que tenha ação como antagonista de receptores TRPV1 corroborando com a hipótese de que o biseugenol apresente ações semelhantes às observadas para o eugenol. Para melhor avaliar o possível efeito do biseugenol na ativação de receptores TRPV1, avaliamos o efeito desta substância sobre o influxo de cálcio induzido por capsaicina em culturas primárias de neurônios nociceptivos. A administração do biseugenol em

concentrações de 10 e 100  $\mu\text{M}$  foi capaz de reduzir o influxo de cálcio induzido pela ativação do receptor TRPV1 por capsaicina. Este resultado corrobora com a hipótese de um efeito do biseugenol em antagonizar receptores TRPV1.

Um resultado interessante foi observado ao examinar a influência do biseugenol nas células satélites gliais presentes na cultura primária. Na presença da maior concentração de biseugenol testada, a administração de capsaicina resultou em um intenso aumento de cálcio intracelular nas células gliais. Considerando que as células satélites gliais não possuem receptores TRPV1, o efeito observado necessariamente é um efeito indireto devido à ativação neuronal pela capsaicina. Este resultado provavelmente deve-se à liberação de ATP por neurônios nociceptivos ativados pela capsaicina, sendo este efeito já demonstrado em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa (Lemes et al., 2018). Durante os experimentos, foi observado que, aproximadamente 8 segundos após as respostas neuronais à capsaicina, as células gliais satélites exibiram um transiente de cálcio o qual é bloqueado pelo antagonista seletivo para receptores purinérgicos do tipo P2X7. Nos gânglios sensoriais, a comunicação entre neurônios e glia tem sido associada à sensibilização neuronal e à manutenção da dor crônica. Outros estudos também indicam que neurotransmissores como glutamato ou ATP são liberados por neurônios dentro dos gânglios da raiz dorsal, podendo ativar células gliais satélites. A nossa hipótese para o aumento de resposta à capsaicina observado nas células gliais considera o fato de que os neurônios em cultura apresentam uma ativação basal tônica de receptores TRPV1. Essa atividade basal provavelmente induz uma liberação basal e constante de ATP que resulta em uma ativação de receptores P2X7 na glia e possível dessensibilização parcial destes receptores. Deste modo, ao reduzir essa dessensibilização pela administração prévia de biseugenol na placa de cultura, ao administrar capsaicina, ainda que a resposta à capsaicina tenha sido reduzida, esta resposta promoveu uma liberação de ATP simultânea por vários neurônios e este neurotransmissor pôde ativar os receptores P2X7 presentes nas células gliais. Esta hipótese deverá ser testada posteriormente.

Outro objetivo deste projeto foi avaliar o potencial anti-inflamatório do biseugenol. Um modelo experimental clássico no estudo da dor inflamatória é o teste da carragenina. Neste caso, é avaliada a variação no limiar de sensibilidade mecânica na pata dos animais de forma a avaliar a presença de hiperalgesia mecânica inflamatória. 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- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e PGE2 (ARAÚJO, 2019). Problemas ocorridos no desenvolvimento dos experimentos não permitiram

que pudéssemos apresentar resultados conclusivos sobre o efeito do biseugenol no teste da carragenina. Um dos problemas ocorridos foi uma falta de animais experimentais, visto que um primeiro experimento realizado não pôde ser aproveitado devido a problemas técnicos. Deste modo, o experimento apresentado neste estudo está com um n amostral reduzido, de apenas 5 animais. O outro problema foi a reduzida resposta inflamatória apresentada pelos animais na dose de carragenina utilizada (100 µg). Estamos atualmente utilizando uma dose maior, de 200 µg, em outros estudos do grupo e verificamos que este aumento da dose é necessário para melhor avaliação da resposta inflamatória. Por este motivo, os experimentos para avaliação do efeito do biseugenol sobre a inflamação induzida por carragenina serão repetidos com um maior número de animais e com a dose aumentada de carragenina. Ainda assim, considerando os resultados apresentados neste trabalho, podemos verificar que existe um potencial do biseugenol em reduzir a hiperalgesia inflamatória induzida por carragenina e ainda, de forma muito interessante, o biseugenol parece ter um efeito em aumentar o limiar basal de sensibilidade mecânica na pata dos animais, na ausência de inflamação por carragenina. Este resultado pode indicar um efeito anestésico do biseugenol. Para avaliar este possível efeito analgésico iremos futuramente comparar o efeito da administração de biseugenol com o efeito da administração apenas do veículo (salina + 1% DMSO) na pata de ratos.

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 não demonstrou ação anti-edematogênica. 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. Se considerarmos que o biseugenol apresenta efeito analgésico ou anestésico por meio do antagonismo de receptores TRPV1 seria esperado pouco efeito desta substância sobre o edema inflamatório. Embora a liberação de neurotransmissores

como o CGRP e a substância P possa resultar em aumento de permeabilidade vascular, a participação da inflamação neurogênica no edema induzido por carragenina é provavelmente pequeno demais para ser verificado nos experimentos realizados. Ademais, ressaltamos que a resposta inflamatória obtida pela administração de carragenina na dose utilizada neste trabalho foi pequena e pode ter prejudicado a análise de um possível efeito do biseugenol sobre o edema. Por este motivo, a avaliação do efeito do biseugenol sobre o edema inflamatório deverá ser realizado novamente utilizando uma quantidade maior de animais experimentais e uma dose mais alta de carragenina.

Em conjunto, os resultados obtidos neste trabalho nos permitem sugerir que o biseugenol é uma substância com excelente potencial para uso clínico e que deve ser investigada em maior profundidade. Os dados apresentados indicam um efeito analgésico e/ou anestésico do biseugenol e que parecem ocorrer por antagonismo de receptores do tipo TRPV1 em neurônios nociceptivos. Estes resultados sugerem um perfil de efeitos do biseugenol que se assemelham àqueles observados para o eugenol.

## 7. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados nesse estudo permitem concluir que:

- O biseugenol reduziu a nocicepção induzida por administração de capsaicina na pata de ratos, sugerindo um efeito analgésico ou anestésico direto em neurônios.
- O biseugenol em concentrações de 10 e 100  $\mu\text{M}$  é capaz de reduzir a ativação do receptor TRPV1 por capsaicina, inibindo o influxo de cálcio nos nociceptores.
- O biseugenol, induziu aumento da resposta das células satélites gliais ao aplicar a capsaicina, corroborando com um efeito neuronal do biseugenol.
- A administração intraplantar de biseugenol parece induzir analgesia no modelo de hiperalgesia inflamatória, indicando a necessidade de mais experimentos para comprovação.
- O biseugenol não foi capaz de alterar o edema da pata em ratos, resultado que também precisa ser confirmado com novos experimentos.

## 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.

ARAÚJO, D. F. DE. Estudo da analgesia induzida por administração de antagonista de receptores nmda – comparação entre a administração central (intratecal) e periférica (gânglio da raiz dorsal) em modelos de dor e hiperalgesia em ratos. [s.l.] Universidade Federal de Uberlândia, 25 jul. 2019.

BARROSO BATISTA J, A SOUSA, LOURENÇO M, BERGMAN ML, SOBRAL D, DEMENGEOT J, XAVIER KB. The first stages of adaptation of *Escherichia coli* to the intestine are dominated by molecules. *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, DESOUZA  
AW, DASILVA NP, ANDRADE LE *Immunessystem -Part I. Fundamentals f 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.

DOW-LA-TI 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, B. H. P. Mecanismos e aspectos anatômicos da dor. 2011.

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

FREITAS, P. R. et al. Abordagens Terapêuticas Nas Doenças Inflamatórias: Uma Revisão. *Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia*, v. 7, n. 2, p. 318–324, 30 set. 2019.

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.

GUÉNETTE, S. A. et al. Pharmacokinetics of eugenol and its effects on thermal hypersensitivity in rats. *European Journal of Pharmacology*, v. 562, n. 1–2, p. 60–67, 7 maio 2007.

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](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.

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

KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. *Patofisiologia da dor*. 2008.

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.

NIJS, J. et al. Nociceptive pain criteria or recognition of central sensitization? Pain phenotyping in the past, present and future. Journal of Clinical Medicine MDPI, , 1 ago. 2021.

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.

PARISI, J. R. Participação dos receptores de potencial transiente vanilóide do tipo 1 (trpv1) no controle da dor neuropática. [s.l: s.n.].

PEANA, A. T. et al. Eugenol, bis-eugenol and synthesized related-dimer compounds produce antinociception in the acetic acid-induced-writhing responses Current Topics in Phytochemistry. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/244484772>>.

PEREIRA, W. B. Relação dos canais iônicos receptores de potencial transitorio (TRP) e a dor: uma revisão. 2013.

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, GUNTORPE 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>.

SOUZA, R. A. C. et al. Dehydrodieugenol B and hexane extract from *Endlicheria paniculata* regulate inflammation, angiogenesis, and collagen deposition induced by a murine sponge model. *Fitoterapia*, v. 147, 1 nov. 2020.

TAGUCHI, L. et al. Both eugenol and biseugenol treatments reduced lung alterations in an experimental model of elastase-induced pulmonary emphysema. *Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine*, v. 6, 1 mar. 2023.

TIWARI, V.; GUAN, Y.; RAJA, S. N. Modulating the delicate glial-neuronal interactions in neuropathic pain: Promises and potential caveats. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* Elsevier Ltd, , 2014.

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.