

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO**

ALEXANDRA DE FARIA DO AMARAL

**EFICÁCIA DE UM FLAVONOIDE SINTÉTICO COMPARADO À MORFINA NA  
ANALGESIA DA DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA EM RATOS**

Campos dos Goytacazes

2015

ALEXANDRA DE FARIA DO AMARAL

**EFICÁCIA DE UM FLAVONOIDE SINTÉTICO COMPARADO À MORFINA NA  
ANALGESIA DA DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA EM RATOS**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal, na área de Concentração de Sanidade Animal.

ORIENTADORA: Professora Fernanda Antunes

Campos dos Goytacazes

2015

ALEXANDRA DE FARIA DO AMARAL

**EFICÁCIA DE UM FLAVONOIDE SINTÉTICO COMPARADO À MORFINA NA  
ANALGESIA DA DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA EM RATOS**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal, na área de Concentração de Sanidade Animal.

Aprovada em \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Bárbara Freitas Rodrigues - UENF

---

Prof. Dr<sup>a</sup> Paula Alessandra di Filippo - UENF

---

Prof. Dr Edmundo Jorge Abílio – UENF

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Juliana Montani Raimundo - UFRJ

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Antunes

## AGRADECIMENTOS

Há tanto para agradecer...

À Deus, que me permitiu a vida e chegar aqui hoje. Não posso chamar de missão, mas de presente.

Aos meus filhos, Ana Francisca e Bernardo. Inspiração, alegria, felicidade e força para seguir frente. Foram o motivo de eu querer vir, buscar novos horizontes, servir de exemplo, construir um futuro... E hoje são a certeza de que está na hora de voltar.

Ao meu marido Ricardo, amor de uma vida inteira. Sempre foi minha força e meu coração. Nada foi, é ou será possível sem seu apoio, sua serenidade e seu companheirismo. À sorte de ter a pessoa mais generosa ao meu lado.

Aos meus pais, Flávio e Laise, início de tudo. Onde aprendi o valor do estudo e do trabalho honesto. Onde tive apoio sempre que necessário e orações que me mantiveram de pé.

Ao meu irmão Alfredo, carinho em forma pessoa, que resguarda minhas viagens e minhas ansiedades. Ombro querido e tradução mais forte da palavra irmão.

À minha irmã Adriana, força em forma de pessoa com seu jeito particular de amar. Aquela com quem se pode contar.

Ao Professor, exemplo e amigo Edmundo Jorge Abílio, que teve a generosidade de me guiar até aqui. Há pessoas que aparecem na nossa vida sem um porque, mas pelas quais agradecemos todos os dias por fazer parte dela. Lhe conhecer foi um daqueles presentes que ganhamos ao longo da vida. Amizade e respeito para sempre.

À Professora, orientadora e amiga Fernanda Antunes. Sorriso fácil e disponível a qualquer hora. Foram tantos anos de convivência, alegrias, confidências... Parece estranho dizer que acabou, mas aí percebo que encerrada a parte acadêmica, fica a amizade, maior conquista de todos esses anos. E a mais valiosa sempre.

À querida amiga Priscilla, capaz de despertar o maior carinho por alguém que se conhece há tão pouco tempo. Companheira de trabalho, de idéias e de sorrisos. daquelas pessoas que parece que conhecemos há anos

ou que já fazem parte de nossa vida sempre. Aquela que tornou meus dias em Campos mais felizes. Mais um dos presentes que levo para a vida.

Ao amigo Guilherme Vieira, possuído de companheirismo, disponibilidade e alegria o tempo todo. Sorriso fácil de se encontrar aqui.

À todos os companheiros de pós-graduação, especialmente Kenas Amaral, Gabriel Barbosa, Daniel Faustino, Flávio Sofiati, Guilherme Monteiro, André Gimenez, Ana Carolina Beliene, Anderson Nunes e todos os que fizeram desses anos os mais felizes que uma pós-graduação pode ser.

À querida amiga Márcia Cristina, âncora desde os primeiros dias aqui. Tem a grandeza de quem abre sua porta para alguém que acaba de conhecer e ampara nas dores que a distância de casa pode causar. Exemplo de perseverança, retidão e amizade. Para sempre.

À amiga Marília, que mais que uma profissional competente, está sempre disponível a ajudar com seu sorriso largo e seu jeito de tornar as coisas fáceis.

À todos que cruzaram meu caminho todos esses anos, fazendo parte de um jeito ou de outro do que me tornei hoje. Sei que cheguei aqui diferente do que vou embora e espero que tenha me tornado alguém melhor, porque feliz foi esta jornada.

Aos membros da banca, Prof<sup>a</sup> Ana Bárbara Freitas Rodrigues, Prof<sup>a</sup> Paula Alessandra di Filippo, Prof. Edmundo Jorge Abílio e Prof<sup>a</sup> Juliana Montani Raimundo pela disponibilidade de estarem presentes neste dia.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, que me propiciou engrandecimento acadêmico e apoio financeiro.

## RESUMO

Atualmente há várias classificações didáticas no que diz respeito à dor, visando facilitar sua identificação e tratamento. A dor neuropática crônica é uma doença comum na prática clínica, e prejudica a qualidade de vida dos pacientes. Este trabalho visou desenvolver no Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Experimental dois modelos experimentais de dor neuropática: lesão do nervo espinhal e injúria de constrição crônica. Além disso, procurou determinar a eficácia de um flavonoide sintético fornecido pelo departamento de química da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - LCQUI - no controle da dor neuropática induzida em ratos wistar. Foram avaliadas pressão arterial e o traçado do eletrocardiograma dos animais que receberam a amostra. Na segunda fase do trabalho, foram realizados dois modelos experimentais para dor neuropática: Modelo de Injúria de Constrição Crônica (ICC) e Modelo de Lesão do Nervo Espinhal (LNE). Após a realização dos modelos os animais permaneceram em ambiente controlado durante sete dias a fim de que se estabelecesse a dor neuropática. Posteriormente foi administrada amostra via intraperitoneal a cada 24 horas, durante 7 dias. O grupo controle recebeu administração de morfina, na mesma dose, considerada padrão ouro no controle da dor. Os animais foram avaliados para dor através do método Von Frey em três momentos. Antes de serem operados, sete dias após a cirurgia, quando já estava estabelecida a dor neuropática e sete dias após a administração da amostra e da morfina. Após os resultados estatísticos, concluímos eficiência dos modelos experimentais para o controle da dor e selecionamos a dose de  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  da amostra para os experimentos de controle da dor. A amostra de flavonoide cedida demonstrou-se eficaz no controle da dor neuropática desenvolvida a partir de modelos experimentais, sendo mais eficiente no modelo de Injúria de Constrição Crônica, que no modelo de Lesão do Nervo Espinhal. Desta forma, concluímos que a amostra analisada pode ser um caminho para o desenvolvimento de novo analgésico, sobretudo no controle da dor neuropática, necessitando para isto de novos estudos.

Palavras-chave: modelo experimental, opioide, plantas, nervo

## ABSTRACT

Currently there are several classifications teaching with regard to pain, and to facilitate their handling. Chronic neuropathic pain is a common disease in clinical practice, and affects the quality of life of patients. This work aimed to develop in Experimental Physiology and Pharmacology Laboratory two experimental models of neuropathic pain: injury to the spinal nerve injury and chronic constriction. In addition, examined the effectiveness of a synthetic flavonoid provided by the chemical Northern State University Fluminense Darcy Ribeiro department - LCQUI - in control of neuropathic pain induced in Wistar rats. We evaluated blood pressure and animal electrocardiogram tracing receiving the sample. In the second phase of work, there were two experimental models of neuropathic pain: Injury Model of Chronic Constriction (ICC) and Injury Model Spinal Nerve (LNE). After completion of the models the animals remained in a controlled environment for seven days in order to be established neuropathic pain. Subsequently the sample was administered intraperitoneally every 24 hours for 7 days. The control group received morphine at the same dose, considered the gold standard in pain control. The animals were evaluated for pain by Von Frey method in three stages. Before being operated seven days after surgery, when it was already established neuropathic pain and seven days after administration of the sample and morphine. After the statistical results, we conclude efficiency of experimental models for pain control and selected the dose of 10 mg.kg<sup>-1</sup> sample for pain control experiments. The sample courtesy flavonoid been shown effective in controlling neuropathic pain developed from experimental models, being more efficient in Constriction Injury model Chronicle that the Injury Spinal Nerve model. Thus, we conclude that the analyzed sample can be a way for the development of new analgesic, especially in controlling neuropathic pain, need for this new studies.

Keywords: experimental model, opioid, plants, nerve

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Mecanismos bioquímicos na sensibilização de nociceptores.....	19
Figura 2: Bases neuroanatômicas da dor.....	20
Figura 3: Vias ascendentes e descendentes da dor.....	21
Figura 4: Foto do biotério.....	24
Figura 5: Estrutura química da Morfina.....	29
Figura 6: Mecanismo de ação da morfina.....	30
Figura 7: Estrutura molecular dos principais flavonoides e suas principais famílias.....	33
Figura 8: Fórmula química molecular e estrutural da amostra de flavonoide avaliada.....	36
Figura 9: Indução anestésica utilizando máscara adaptada acoplada ao aparelho de anestesia inalatória. a - indução; b- manutenção.....	37
Figura 10: Dissecção da artéria carótida, separando-a do nervo vago, para fixação de cânula arterial para a mensuração da pressão arterial invasiva nos momentos pré-estabelecidos.....	38
Figura 11: Foto do Equipamento Animal Bioamp 7 da Adinstruments para codificação de pressão arterial e eletrocardiograma.....	39
Figura 12: Ilustração da localização anatômica da artéria carótida e da veia jugular.....	40
Figura 13: Gráfico da variação da pressão arterial no momento de administração do DMSO (controle) e da amostra, gerado pelo programa LabChart 7.....	41
Figura 14: Gráfico da variação do Eletrocardiograma (ECG) no momento de administração do DMSO (controle) e da amostra 1, gerado pelo programa LabChart 7.....	42
Figura 15: Demonstração da sequência de realização do modelo de dor neuropática ICC, iniciando com a incisão da pele, dissecção dos músculo e exposição do nervo ciático. Posteriormente os fios de sutura são posicionados sob o nervo e são realizadas as quatro ligaduras frouxas. A sequência se encerra com a sutura da pele.....	44
Figura 16: Foto demonstrativa da região de incisão e exposição da saída	

do nervo ciático na altura de L5 para a realização do modelo LNE. Finalmente a região já suturada.....	45
Figura 17: Modelos de ligadura de nervos para avaliação de dor neuropática.....	46
Figura 18: Teste de pressão crescente na pata de ratos (método Von Frey).....	47
Figura 19: Gráfico da variação da pressão arterial no momento de administração do DMSO (controle) e da amostra na concentração de 10mg.kg de amostra, gerado pelo programa LabChart 7.....	49
Figura 20: Gráfico comparativo das variações de pressão arterial média nos momentos antes de aplicar do DMSO, após a aplicação do DMSO e após aplicação de 10mg.kg da amostra diluída em DMSO.....	51
Figura 21: Gráfico do eletrocardiograma durante a aplicação do controle e da amostra na concentração de 10mg.kg, gerado pelo programa LabChart 7.....	51
Figura 22: Gráfico da variação da pressão arterial no momento de administração do DMSO (controle) e da amostra na concentração de 25mg.kg de amostra, gerado pelo programa LabChart 7.....	52
Figura 23: Gráfico comparativo das variações de pressão arterial média nos momentos antes de aplicar do DMSO, após a aplicação do DMSO e após aplicação de 25mg.kg da amostra diluída em DMSO.....	53
Figura 24: Gráfico do eletrocardiograma durante a aplicação do controle e da amostra na concentração de 25mg.kg, gerado pelo programa LabChart 7.....	54
Figura 25: Gráfico da variação da pressão arterial no momento de administração do DMSO (controle) e da amostra na concentração de 30mg.kg de amostra, gerado pelo programa LabChart 7.....	54
Figura 26: Gráfico do eletrocardiograma durante a aplicação do controle e da amostra na concentração de 25mg.kg, gerado pelo programa LabChart 7.....	55
Figura 27: Gráfico comparativo das variações de pressão arterial média nos momentos antes de aplicar do DMSO, após a aplicação do DMSO e após aplicação de 30mg.kg da amostra diluída em DMSO.....	56
Figura 28: Gráfico descrevendo a estatística de comparação entre o	

controle e a morfina para o controle da dor neuropática, no dia de realização do modelo ICC, sete dias após, quando iniciou-se o tratamento, e quatorze dias após.....	57
Figura 29: Gráfico descrevendo a estatística de comparação entre o controle e a amostra para o controle da dor neuropática, no dia de realização do modelo ICC, sete dias após, quando iniciou-se o tratamento, e quatorze dias após.....	58
Figura 30: Gráfico descrevendo a estatística de comparação entre o controle e a morfina para o controle da dor neuropática, no dia de realização do modelo LNE, sete dias após, quando iniciou-se o tratamento, e quatorze dias após.....	59
Figura 31: Gráfico descrevendo a estatística de comparação entre o controle e a amostra para o controle da dor neuropática, no dia de realização do modelo LNE, sete dias após, quando iniciou-se o tratamento, e quatorze dias após.....	59

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Opções medicamentosas nas dores neuropáticas periféricas e centrais..... 28

Tabela 2: Distribuição do número total de animais quanto ao tipo de modelo experimental e sexo dos animais..... 47

Tabela 3: Variação da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM) antes da administração de DMSO, após a administração de DMSO e após a administração da amostra diluída em DMSO na dose de 10mg/kg.....50

Tabela 4: Variação da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM) antes da administração de DMSO, após a administração de DMSO e após a administração da amostra diluída em DMSO na dose de 25mg/kg.....53

Tabela 5: Variação da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM) antes da administração de DMSO, após a administração de DMSO e após a administração da amostra diluída em DMSO na dose de 30mg/kg..... 55

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	15
2.1. Dor: .....	15
2.2. Vias da dor: .....	18
2.3. Anatomia do Nervo Periférico: .....	22
2.4. Modelos de dor neuropática: .....	23
2.4.1. Modelo de Injúria de Constrição Crônica (ICC): .....	25
2.4.2. Modelo de Lesão do Nervo Espinhal (LNE): .....	26
2.4.3. Modelo de Axotomia (secção completa do nervo ciático) .....	24
2.4.4. Ligadura parcial do nervo ciático (PSL) .....	25
2.4.5. Lesão do nervo poupado (SNI) .....	25
2.5. Morfina: .....	27
2.6. Flavonoides: .....	31
3. OBJETIVO .....	35
4. JUSTIFICATIVA .....	35
5. MATERIAL E MÉTODOS .....	36
5.1. Avaliação da viabilidade das amostras: .....	36
5.2. Realização de modelo experimental: .....	42
5.2.1 Modelo de Injúria de Constrição Crônica (ICC): .....	42
5.2.2. Modelo de Lesão do Nervo Espinhal (LNE): .....	45
5.3. Avaliação da dor: .....	46
5.4. Teste da amostra: .....	47
6. RESULTADOS .....	49
6.1. Avaliação da viabilidade da amostra: .....	49
6.2. Avaliação do controle da dor: .....	57
7. DISCUSSÃO .....	62

8. CONCLUSÃO.....	64
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	65
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	66

## 1. INTRODUÇÃO

A dor foi conceituada pela primeira vez em 1986, pela Associação Internacional para o Estudo da Dor, como uma experiência sensorial ou emocional desagradável, que está associada a lesões reais ou potenciais.

Atualmente há várias classificações didáticas no que diz respeito à dor, visando facilitar sua compreensão e tratamento. Segundo a Sociedade Brasileira para o Estudo da dor, inicialmente a dor deve ser dividida entre aguda e crônica. Dor aguda é aquela que se manifesta transitoriamente durante um período relativamente curto, de minutos a algumas semanas, associada a lesões em tecidos ou órgãos, ocasionadas por inflamação, infecção, traumatismo ou outras causas. Normalmente desaparece quando a causa é corretamente diagnosticada e quando o tratamento recomendado pelo especialista é seguido corretamente pelo paciente. A dor constitui-se em importante sintoma que primariamente alerta o indivíduo para a necessidade de assistência médica. Como exemplo considera-se a dor pós-operatória (que ocorre após uma cirurgia); a dor que ocorre após um traumatismo; a dor durante o trabalho de parto; a dor de dente; etc. Já a dor crônica tem duração prolongada, que pode se estender de vários meses a vários anos e que está quase sempre associada a um processo de doença crônica. A dor crônica pode também pode ser consequência de uma lesão já previamente tratada. Exemplos: dor ocasionada pela artrite reumatoide (inflamação das articulações), dor do paciente com câncer, dor relacionada a esforços repetitivos durante o trabalho, dor nas costas e outras.

A dor neuropática crônica é uma doença comum na prática clínica, e prejudica a qualidade de vida dos pacientes. É definida como dor iniciada ou causada por uma lesão primária ou disfunção do sistema nervoso. A dor neuropática é uma síndrome complexa, com mecanismos biológicos pouco esclarecidos, envolvendo teorias inflamatórias e imunes. Clinicamente, sua causa está relacionada, na maioria dos casos, ao comprometimento dos nervos periféricos, por isso a utilização de modelos animais de lesão nervosa periférica é amplamente aceita para o seu estudo (GUEDES, 2007). Mesmo em

humanos, a dor é uma condição clínica prevalente, sendo a dor neuropática a mais comumente diagnosticada e tratada. Além disso, a dor está associada a vários resultados negativos para a saúde (GOREN et al., 2012).

Atualmente, as várias classes de fármacos analgésicos estão disponíveis para o controle da dor neuropática, como os antiinflamatórios não esteroidais (AINES), opioides, anestésicos locais, ansiolíticos e antipsicóticos, relaxantes musculares, antidepressivos, corticosteroides, anticonvulsivantes, alfa-2 agonistas, e bloqueadores de glutamato. No entanto, essas drogas têm eficiência limitada no tratamento da dor crônica ou os seus usos são acompanhados de severos efeitos adversos. Desta forma, há evidente necessidade de descobrir novos agentes analgésicos atuando de forma mais eficiente em alvos conhecidos ou em novos alvos, de forma tolerável pelo paciente.

Em função de sua grande biodiversidade, o Brasil tem obtido destaque no campo dos estudos fitoquímicos, motivando o estudo de suas espécies (PEIXOTO et al., 2003). Dentre as substâncias estudadas, destacam-se os flavonoides, substâncias biologicamente ativas com destacado efeito antioxidante.

Este trabalho visa reproduzir dois modelos experimentais utilizados para desenvolver a dor neuropática em ratos wistar. Além disto procura determinar a eficácia de flavonoides sintéticos no controle da dor neuropática induzida em ratos wistar, além de sua especificidade e toxicidade. A justificativa deste trabalho apoia-se na importância do tratamento da dor, tanto nas espécies animais quanto no ser humano, que pode vir a ser beneficiado com o prosegimento das pesquisas em animais de experimentação.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Dor:

Embora a dor esteja presente desde a antiga história da humanidade, ainda hoje, os modernos tratamentos farmacológicos são limitados e nem sempre eficazes.

Para os homens primitivos as doenças dolorosas ou causadas por objetos estranhos eram atribuídas a fluidos mágicos, demônios ou espíritos. Na Grécia Antiga, Hipócrates postulou a existência de quatro humores: sangue, flegma, bile amarelada e bile negra que, quando desequilibrados resultavam em dor (PORTNOI,1999). As ideias de Hipócrates foram disseminadas por todo o mundo então conhecido, especialmente em Alexandria, no Egito, quando a permissão da prática da dissecação permitiu a Herófilo e Esistrato encontrarem existências anatômicas de que o cérebro era parte do sistema nervoso e que possuía dois tipos de nervos: motores e sensitivos (REY,1995). A partir daí, os estudos anatômicos combinados com análises fisiológicas vêm se desenvolvendo e proporcionando um conhecimento não só de como esse mecanismo funciona, mas de como podemos interferir no mesmo para diminuir ou cessar a sensação dolorosa. Ainda assim, até a década de sessenta, no século passado, a dor era considerada uma resposta sensorial inevitável à lesão tecidual. Essas pesquisas continuam ainda hoje, no século XXI e este trabalho se enquadra nesta busca.

A evidência de que animais sentem dor se confirma pelo fato de que estes evitam ou tentam escapar de um estímulo doloroso e quando apresentam limitação de atividade física pela presença da dor, esta é eliminada ou melhorada com o uso de analgésicos. Para muitos filósofos, a consciência (capacidade de sofrer ou sentir prazer ou felicidade) fornece ao animal um valor moral intrínseco, dado que há interesses que emanam desses sentimentos (LUNA, 2008). A percepção da dor para os animais é uma experiência sensorial e emocional ruim que os leva a adquirir um comportamento protetor específico para sua espécie e pode modificar o comportamento social, causando alterações fisiológicas, como: vocalização, alterações posturais, tremores, agitação, depressão, perturbações nos ciclos

de sono, inapetência, agressividade, aumento das frequências respiratória e cardíaca, elevação da pressão arterial, midríase, salivação, supressão do sistema imunológico e alterações do sistema endócrino (DAY, 2008; DUNNING et al., 2005; LORENZ et al., 2011; MEIJ et al., 2010). Além disto, pesquisas realizadas com animais visam não só estabelecer bem estar a estas espécies, mas também permitem desenvolver pesquisas para o tratamento de seres humanos.

No estado agudo simples, a dor é geralmente proporcional ao estímulo. Um pequeno trauma leva a uma breve sensação de dor. Se este progride para a próxima fase da inflamação, tal como a dor induzida por cirurgia, a sensibilização periférica ocorre e a dor é mantida. Esta é a fase em que devemos tratar, aliviar ou prevenir a dor induzida pela cirurgia, por exemplo. Se o estado inflamatório não for tratado e a dor for mantida, alterações do sistema nociceptivo podem ocorrer e levar a uma codificação ou processamento anormais do estímulo nociceptivo, que é onde a dor aguda progride para dor crônica. Nesta fase, a estreita correlação entre a lesão e dor foi perdida (GURNEY, 2012). O tempo em que a dor persiste, dependente ou não do estímulo que a gerou, é o que define uma dor como aguda ou crônica

A dor neuropática crônica é uma doença comum na prática clínica, e prejudica a qualidade de vida dos pacientes. É definida como dor iniciada ou causada por uma lesão primária ou disfunção do sistema nervoso. Ela se desenvolve como consequência de uma lesão ou doença que afeta as vias somatossensoriais no sistema nervoso periférico ou central, e ocorre em muitas doenças neurológicas (por exemplo, neuropatia periférica, radiculopatia, lesão medular, acidente vascular cerebral e diabetes). A dor neuropática afeta de 6% a 8% da população humana em geral e seu impacto na qualidade de vida, humor e sono excede o peso do causador da doença. Ela tem sido considerada um problema clínico difícil, devido à falta de um padrão de diagnóstico ouro e à resposta não satisfatória ao tratamento (MAGRINELLI et al., 2013).

Doenças crônicas muitas vezes requerem longos períodos de tratamento, aumentando significativamente os gastos com saúde em humanos (LIMA et al. 2009), fato que pode ser facilmente extrapolado para os cuidados com animais.

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 é uma doença propriamente dita, sendo nociva e independente ao estímulo que a gerou (KLAUMANN et al., 2008). A dor espontânea, causada pela hiperexcitabilidade do nervo periférico após a lesão, é considerada como sendo a característica principal da patofisiologia da dor crônica associada com a síndrome neuropática (PORRECA et al., 1999). No entanto, dor como um sintoma subjetivo sensorial não é visível, difícil de medir, e envolve não somente aspectos físicos, mas também psicológicos e componentes emocionais.

Atualmente a dor crônica pode ser classificada em três categorias: dor devido a dano tecidual (dor nociceptiva, como osteoartrite), dor causada por doença ou dano no sistema somatossensorial, aquele responsável por fazer a relação do indivíduo com o meio externo através de estruturas neurais especializadas (dor neuropática) e a coexistência de dor nociceptiva e dor neuropática (dor mista) (BARON et al., 2010). A dor nociceptiva resulta da ativação direta de nociceptores da pele e outros tecidos em resposta a uma lesão tecidual, acompanhada de inflamação.

Nociceptores são terminações nervosas de vias aferentes de fibras  $A\alpha$ ,  $A\beta$  e C que transformam qualquer estímulo (mecânico, térmico ou químico) em sinal elétrico. Tais terminações nervosas podem estar presentes tanto em tecidos superficiais como em outros mais profundos (periósteo, superfície articular ou músculo esquelético). A dor pode ser gerada por estimulação direta de seus receptores (dor neuropática) ou por substâncias liberadas pela lesão celular (dor inflamatória). O termo nocicepção está relacionado com o reconhecimento de sinais, no sistema nervoso, que se originam em receptores sensoriais (nociceptores) e que fornecem informações relacionadas ao dano tissular. Apesar dessa diferença relevante e significativa na definição, o termo dor é usado igualmente em animais e seres humanos, tanto pela comunidade médica como pelo público leigo (HELLEBREKERS, 2002).

Dor decorrente de desordens do SNC ou do sistema nervoso periférico são tradicionalmente classificados pela localização anatômica ou pela patologia

subjacente (geralmente degeneração axonal, desmielinização axonal ou ambos). O sistema de classificação pode ainda ser baseado em uma etiologia presumida como dor metabólica (diabetes, hipotireoidismo ou amiloidose), por compressão (tumor), tóxica (várias drogas) ou infecciosa (pós-operatória). Outras causas da dor neuropática estão relacionadas com degeneração ou idade. Muitos dos mecanismos que desencadeiam a via da dor não dependem da causa da doença. O mesmo mecanismo pode ser encontrado em doenças diferentes, por exemplo, na neuralgia pós-herpética e na polineuropatia dolorosa (BARON et al., 2010).

## **2.2. Vias da dor:**

A dor neuropática ou neurogênica é produzida pelo dano ao tecido nervoso. Caracteriza-se pela aparição de hiperalgesia, dor espontânea, parestesia ou alodinia mecânica e por frio (PISERA, 2005; SCHAIBLE, 2006). O sistema somatossensorial é composto por mecanorreceptores, termorreceptores, nociceptores, receptores de propriocepção e de vísceras, proporcionando a percepção consciente de informações sensoriais da pele, sistema músculo-esquelético e as vísceras. Além disso, aferentes somatossensoriais estão envolvidos em numerosas vias reflexas autonômicas e do sistema motor e “loops” de “feedback” com os centros de retransmissão na medula espinhal, tronco cerebral e prosencéfalo (HAANPÄÄ et al., 2011). A lesão de nervos periféricos induz descargas rápidas e intensas por períodos mais ou menos prolongados, na ausência de estímulos. Estes estímulos parecem produzir a ativação de receptores NMDA, um receptor ionotrópico ativado pelo ácido glutâmico (glutamato)/Aspartato e seu agonista exógeno NMDA. A ativação dos receptores de glutamato resulta na abertura de um canal iônico não seletivo. Isso permite o fluxo de  $\text{Na}^+$  e de pequenas quantidades de  $\text{Ca}^{2+}$  para dentro da célula e de  $\text{K}^+$  para fora da célula, originando o fenômeno de “windup” nos neurônios do corno dorsal da medula. Logo depois, a indução de processos inflamatórios faz com que certos mecanismos desencadeantes da dor neurogênica sejam comuns aos da dor nociceptiva (KLAUMANN et al., 2008).

No caso da dor inflamatória, as primeiras substâncias liberadas são bradicinina e prostaglandinas, que ativam e sensibilizam o nociceptor. Esta ativação libera a substância P, um potente degranulador da histamina presente nos mastócitos dos tecidos adjacentes. A histamina estimula diretamente os nociceptores. Além disso, a substância P provoca o extravasamento de plasma, levando ao edema, o que aumenta a liberação de bradicinina. Há também liberação de calcitonina juntamente com a substância P, provocando dilatação de vasos sanguíneos periféricos (SKOLNIK; MENICHELLO, 2009) (figura 1).

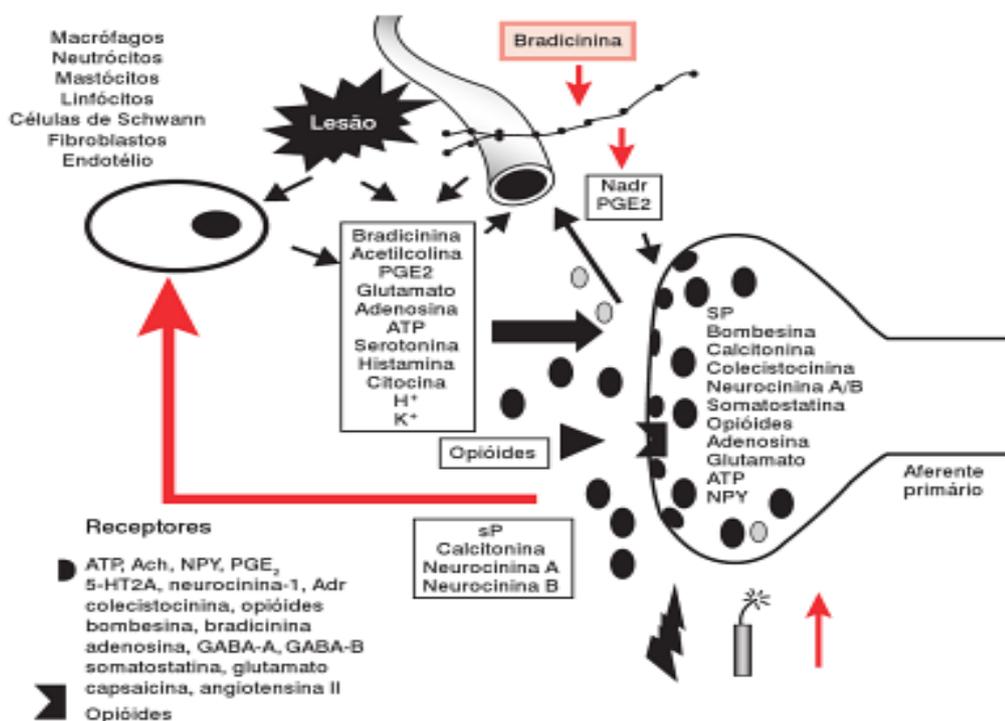


Figura 1: Mecanismos bioquímicos na sensibilização de nociceptores. Fonte: Modificado de TEIXEIRA et al., 2001

Os estímulos periféricos são propagados em direção à medula espinhal por três tipos de fibras: fibras A $\alpha$  e A $\beta$  (mielinizadas e de alta velocidade de condução) e fibras C (amielinizadas e de baixa velocidade de condução). Os estímulos aferentes propagados pelas fibras C estimulam diretamente os neurônios de 2<sup>a</sup> ordem que projetam os estímulos algícos para o encéfalo. Simultaneamente, estas fibras diminuem a atividade dos interneurônios cuja

ativação inibe os neurônios de projeção. As fibras  $A\alpha$  estimulam diretamente os interneurônios inibindo os neurônios de 2ª ordem, assim como, as fibras  $A\beta$ , também denominadas não-nociceptivas. Este processo representa um importante mecanismo de interrupção da transmissão da dor a nível medular. Não se conhece com exatidão a forma com que os interneurônios inibem os neurônios de 2ª ordem, entretanto, durante a sua ativação há liberação de encefalinas que atuam como moduladores da dor.

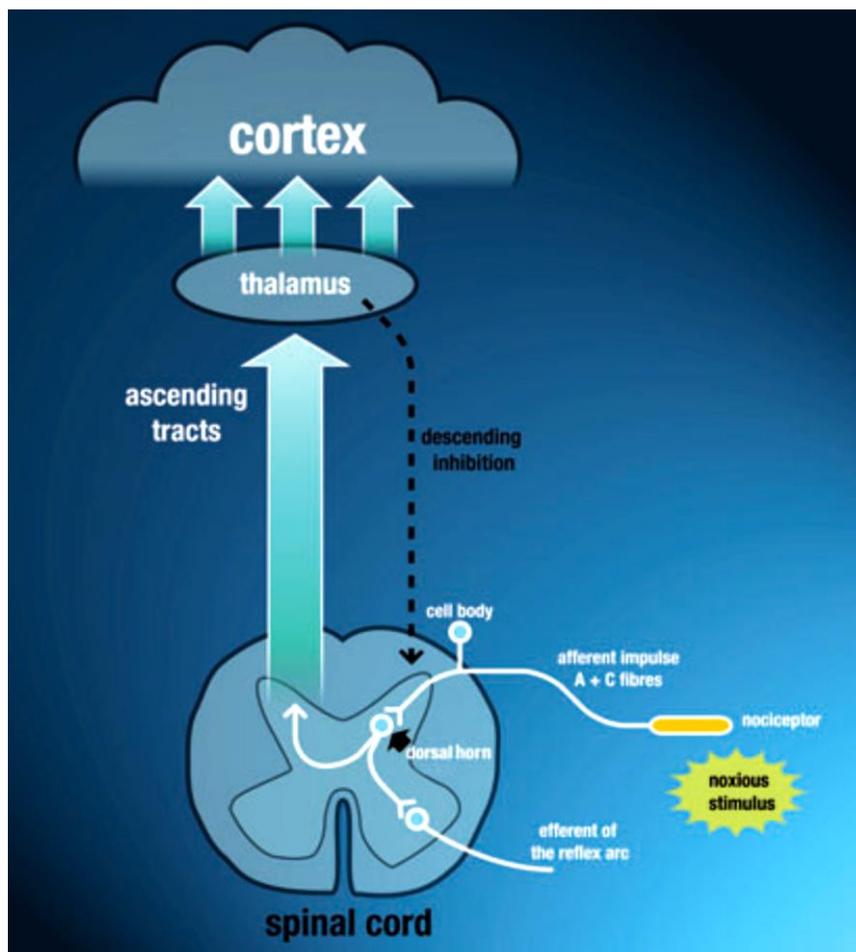


Figura 2: Bases neuroanatômicas da dor. Fonte: [www.saude.hsw.uol.com.br](http://www.saude.hsw.uol.com.br)

A projeção do estímulo doloroso para o encéfalo após a ativação do neurônio de 2ª ordem se faz através de quatro vias: trato espinotalâmico, trato espinoreticular, trato espinomesencefálico e o trato espinolímbico. Os corpos celulares das células que originam o trato espinotalâmico estão localizados nas lâminas I, IV, V e VI. As fibras cruzam para o lado oposto e ascendem na posição anterolateral da medula e se dirigem para a região do tálamo ventral e posterior. Algumas fibras também se projetam para a região medial do tálamo.

As informações que trafegam pelo trato espinotalâmico são de dor, temperatura e tato. Do tálamo, as fibras terminam na área somatossensorial do córtex localizada no girus póscentral. A chegada deste impulso por esta via permite que o indivíduo perceba e identifique a localização do estímulo (percepção da dor) sem, no entanto, interpretar como um estímulo nódico (figura 2).

O trato espinoreticular é sensível ao estímulo nódico e a sua principal função é ativar mecanismos homeostáticos através do sistema autonômico. As células de origem estão localizadas nas porções profundas do corno dorsal e nas lâminas VII e VIII do corno ventral. Os alvos desta via são os núcleos da formação reticular da medula e a ponte. Alguns neurônios que recebem as fibras do trato espinoreticular estão envolvidos com a modulação descendente da dor (KANDEL et al., 2000).

O trato espinomesencefálico nasce nas lâminas I, IV, VI e X e se projeta para uma série de núcleos localizados no mesencéfalo incluindo a substância cinzenta periaquedutal, o cuneiforme e colículo superior. As células destes núcleos têm um complexo processo de recepção de estímulos que podem ser nódicos ou não-nódicos. O trato espinomesencefálico tem múltiplas funções. Podem iniciar um comportamento aversivo e podem modular uma resposta consequente a um estímulo aferente nódico (KANDEL et al., 2000). Assim, pode ativar uma via descendente de inibição da dor na região da coluna dorsal da medula (figura 3).

O trato espinolímbico nasce nas lâminas I e V e se dirige para a região da amígdala. É responsável pelo aspecto emotivo-motivacional antes de projetar para o córtex somato-sensorial. Esta via é também responsável pelo comportamento de medo, memória vívida a dor e reações autonômicas (midríase, aumento da atividade cardiorespiratória).

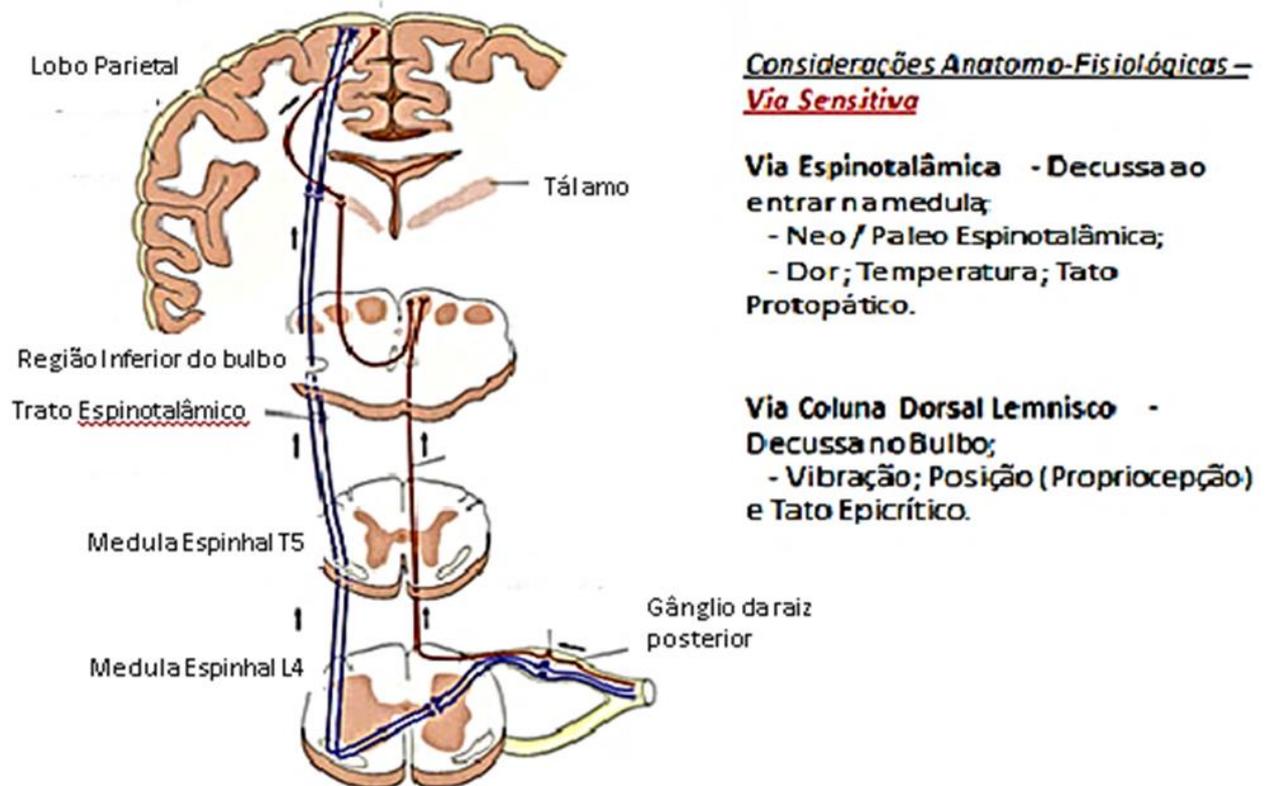


Figura 3: Vias ascendentes e descendentes da dor. Fonte: [www.semiologiaortopedica.com.br](http://www.semiologiaortopedica.com.br)

### 2.3. Anatomia do Nervo Periférico:

Os nervos periféricos são cordões esbranquiçados subdivididos em 3 componentes importantes: axônios, células de Schwann e tecido conjuntivo. Os axônios dos nervos periféricos são agrupados em feixes paralelos, conhecidos como fascículos, revestidos por bainhas de tecido conjuntivo frouxo, que fornece suporte à regeneração axonal. O tecido que reveste cada axônio individualmente é o endoneuro, que possui matriz de colágeno frouxo, onde as fibras de colágeno irão formar as paredes de proteção dos tubos endoneurais. Os feixes de axônios são revestidos pelo perineuro, separando as fibras nervosas em fascículos, e contendo fibroblastos, macrófagos, mastócitos, linfócitos e adipócitos. Dentro dos feixes, as fibras são envolvidas pelo neurilema (bainha de Schwann). Ao redor do neurilema há tubos endoneurais constituídos por redes delicadas de fibrilas, associadas com uma substância intercelular amorfa. O tecido que reveste todo o tronco nervoso e que tem como função proteger os fascículos de traumas externos é denominado epineuro, constituído de tecido conjuntivo frouxo que se estende ao longo de todo o nervo (SIQUEIRA, 2007).

#### 2.4. Modelos de dor neuropática:

Devido à etiologia variada da dor neuropática, foram criados diversos modelos que atendessem a essas causas e conseguissem mimetizar seus efeitos a fim de facilitar os estudos a cerca dessa patologia. Os modelos ideais devem resultar em déficits sensoriais, como alodinia reprodutíveis, hiperalgesia e dor espontânea ao longo de um período sustentado. Assim, através do estabelecimento de alterações de sensibilidade em animais, várias condições fisiopatológicas observadas em seres humanos e animais podem ser modeladas, permitindo a avaliação da farmacoterapia.

A experimentação animal nas pesquisas científicas tem contribuído sobremaneira para o desenvolvimento da ciência e tecnologia, promovendo ao longo dos anos a descoberta de medidas profiláticas e tratamentos de enfermidades que acometem os seres humanos (CHORILLI et al., 2007). Os animais foram responsáveis por descobertas que permitiram o uso terapêutico de antibióticos e o tratamento de diversas doenças, evitando assim epidemias e epizootias, bem como o desenvolvimento de técnicas de transplantes de órgãos e a possibilidade do uso de fármacos anestésicos, antidepressivos, entre outros (FAGUNDES e TAHA, 2004; ANDRADE, 2006).

Os ratos Wistar são uma linhagem albina da espécie *Rattus norvegicus*, desenvolvida no Instituto Wistar na Filadélfia. Esta linhagem foi a primeira a ser utilizada como organismo-modelo numa época em que pesquisadores utilizavam primariamente camundongos da espécie *Mus musculus* (CLAUSE, 1998). A maioria das linhagens de ratos de laboratório descende de uma colônia estabelecida no Instituto Wistar em 1906 pelo fisiologista americano Henry Donaldson, pelo administrador científico Milton Greenman e a embriologista Helen Dean King (The Wistar Institute, 2007).

A linhagem Wistar é uma das mais utilizadas mundialmente em pesquisas de laboratório e sua importância deve-se ao fato de o Dr. Donaldson e sua equipe terem realizado inúmeras pesquisas para obter dados fundamentais, principalmente curvas de crescimento do animal, do crânio, do esqueleto e de vários órgãos individualmente.

Ratos Wistar são caracterizados pelas orelhas alongadas, cabeça grande e comprimento da cauda sempre menor que o comprimento corporal. A gestação dura de 20 a 22 dias e o desmame ocorre com 17 a 19 dias de idade. São considerados animais dóceis, de fácil manipulação e têm boa capacidade de aprendizado. Apresentam, em geral, baixa incidência tumoral e a alopecia, algumas vezes temporária, é uma característica comum (TUFIK, 2004).

Desta forma, o rato wistar foi eleito, não só para este como para vários trabalhos de experimentação animal, não só pelos fatores descritos acima, como conhecimento anatômico, fisiológico, comportamental, mas também pela facilidade de aquisição, já que os animais utilizados na pesquisa foram todos provenientes do biotério do próprio Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Experimental da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (figura 4).



Figura 4: Foto da câmara de manutenção dos animais do biotério do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Experimental da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Fonte: Arquivo pessoal

#### **2.4.1. Modelo de Injúria de Constrição Crônica (ICC):**

Bennett e Xie (1988) desenvolveram um modelo de mononeuropatia periférica em ratos por Injúria de Constrição Crônica (ICC) para o nervo ciático, o que é um dos modelos animais mais frequentemente utilizado de dor neuropática. Esta constrição do nervo ciático é associada com edema intraneural, isquemia focal, e degeneração waleriana, processo resultante do corte ou esmagamento de uma fibra nervosa, no qual a parte do axônio que é separada do corpo do neurônio degenera distalmente em relação à lesão. Os sinais comportamentais de dor espontânea, tanto leve como moderada, relatam lambedura excessiva, claudicação da pata ipsilateral e evitar colocar peso sobre o lado da lesão. As mudanças comportamentais, como hiperalgesia mecânica, térmica ou química e alodinia foram observados, desenvolvendo-se dentro de uma semana para comportamentos relacionados à dor máxima, como assimetrias posturais durante a segunda semana de pós-operatório (DE VRY et al., 2004). Essas alterações de dor neuropática persistem por pelo menos sete semanas após a cirurgia (DOWDALL et al., 2005).

Estudos eletrofisiológicos revelaram a diminuição da velocidade de condução nervosa e estudos histopatológicos sugeriram maior dano à mielina em comparação com os axônios não mielinizados (CARLTON et al., 1999). No entanto, já foi demonstrado que o dano parcial do nervo leva à sensibilização de ambas as fibras A e C, desempenhando assim um papel na iniciação e manutenção do comportamento da dor (GABAY e TAL, 2004).

O modelo ICC produz mononeuropatia periférica unilateral, e tem-se observado que os sintomas no modelo do rato correspondem a causa ou síndrome da dor regional complexa em pacientes humanos (BENNETT e XIE, 1988). O modelo CCI tem sido amplamente utilizado para a pesquisa sobre dor espontânea e sensação anormal. Além disso, também tem sido útil para a análise dos sintomas sensoriais associados com diversas neuropatias (NAKAMURA e ATSUTA, 2006).

#### **2.4.2. Modelo de Lesão do Nervo Espinhal (LNE):**

Kim e Chung (1992) desenvolveram um modelo experimental animal de mononeuropatia periférica por LNE.

Neste modelo, alterações comportamentais, tais como alodinia mecânica, alodinia fria, hiperalgesia térmica, e dor espontânea foram observados, desenvolvendo-se num período de 24-48 h e persistindo durante aproximadamente 10-16 semanas. Em relação ao modelo ICC, o local de ligação e intensidade da ligação é mais consistente neste modelo. Além disso, neste modelo existe uma vantagem de ter segmentos espinhais lesionados e intactos separados. No entanto, este modelo requer procedimentos cirúrgicos mais extensos em comparação com o anterior. O modelo LNE tem sido o modelo de escolha quando uma grande magnitude e estabilidade do comportamento da dor é necessária (JAGGI et al., 2009).

#### **2.4.3. Modelo de Axotomia (secção completa do nervo ciático):**

Este é o modelo mais antigo da dor neuropática em animais e envolve transecção completa do nervo ciático em nível médio da coxa. Neste modelo, o nervo ciático é seccionado transversalmente, desenvolvendo-se um neuroma na extremidade proximal. O grau da autotomia depende do método e da localização da neurectomia. Tem havido um debate considerável se a autotomia é um reflexo da dor espontânea ou o resultado de preparação excessiva em resposta à ausência tecidual.

A principal limitação desse modelo é que uma secção completa do nervo é uma lesão incomum em pacientes, sendo vista geralmente apenas em amputações, tais como dor do membro fantasma. Além disso, considerações éticas também estão envolvidas (JAGGI et al., 2009).

#### **2.4.4. Ligadura parcial do nervo ciático (PSL):**

Este modelo foi desenvolvido por Seltzer et al. em 1990.[28] e é um dos modelos mais freqüentemente empregados de neuropatia. Há exposição do

nervo ciático no nível superior da coxa e realizada sutura firme com fio de seda 8.0 na região imediatamente distal às ramificações nervosas.

Há alterações comportamentais tais como alodinia fria, hiperreatividade química e hiperalgesia mecânica após uma semana de cirurgia. A maior parte das alterações persistem por seis semanas (KIM et al., 1997).

#### **2.4.5. Lesão do nervo poupado (SNI):**

Neste modelo descrito por Decosterd e Woolf em 200 há exposição dos três ramos do nervo ciático: o sural, o fibular comum e os nervos tibiais. Os nervos tibial e fibular comum são então ligados firmemente com fio de seda 5.0 seguido por axotomia. Desta forma, o nervo sural é poupado, sendo apenas os outros dois axotomizados, provindo daí o nome da técnica. As variações deste modelo de dor neuropática advem de diferentes combinações entre as transecções nervosas, podendo também serem poupados os nervos tibial ou o fibular, em função do local da pata que se pretenda verificar.

A hiperalgesia mecânica e térmica e alodinia foram observados após 4 dias da injúria, que persiste por semanas até seis meses (BOURQUIN et al., 2006).

Este modelo é diferente de outros modelos de lesão de nervos periféricos, como ICC, PSL, e LNE porque permite a comparação da diferença entre sensibilidade mecânica e térmica nas regiões adjacentes à áreas denervadas. Esta característica é importante porque permite que as mudanças experimentais simultâneas em ambos os neurônios sensoriais primários feridos e os não alterados sejam investigados para a fisiopatologia da dor. Neste modelo as alterações na sensibilidade mecânica e térmica são ocorrem por um tempo prolongado perto de imitar muitas características da dor neuropática clínica (LINDIA, 2005).

#### **2.5. Fármacos para tratamento da dor neuropática:**

Estudos recentes mostram que a maioria dos pacientes tratados para dor neuropática recebem medicação de eficácia não-demonstrada ou em subdoses da medicação apropriada. A dor neuropática costuma responder pobremente aos analgésicos comuns, sendo os fármacos antidepressivos tricíclicos e anticonvulsivantes os principais representantes no tratamento deste

tipo de dor, seja de origem periférica ou central, conforme descrito na tabela 1 (RICHEIMER et al., 1997).

Tabela 1 - Opções medicamentosas nas dores neuropáticas periféricas e centrais (RICHEIMER et al., 1997).

Dor neuropática	Fármaco
Periférica	Tricíclicos
	Gabapentina
	Pregabalina
	Tramadol
	Oxicodona
	Lidocaína tópica
	Carbamazepina
Central	Tricíclicos
	Lamotrigina
	Carbamazepina

### 2.5.1. Morfina:

A morfina, opioide denominado de acordo com o deus grego dos sonhos, Morfeu, é derivada do resíduo seco do exsudato da cápsula da semente não madura da papoula, *Papaver sonniferum*.

Entre os analgésicos, a morfina é um fármaco largamente usada no tratamento da dor moderada a severa. Há uma controvérsia considerável de analgésicos opióides no tratamento da dor crônica, sendo os opiáceos relatados como ineficazes em alguns pacientes com dor neuropática ao passo que outras observações sugerem sua eficácia para atenuar a dor neuropática. No entanto, a depressão respiratória, sedação, obstipação e tolerância são os efeitos secundários mais importantes de opióides que limitam a sua aplicação clínica em dor neuropática (SAGHAEI et al., 2012). É considerada padrão ouro no tratamento de dor severa. No entanto, seus efeitos secundários, tais como náuseas, retenção de urina, dependência de drogas e depressão respiratória podem ser significativos (SUDO et al., 2009), o

que inspira a busca por substâncias cada vez mais potentes e com menos efeitos colaterais.

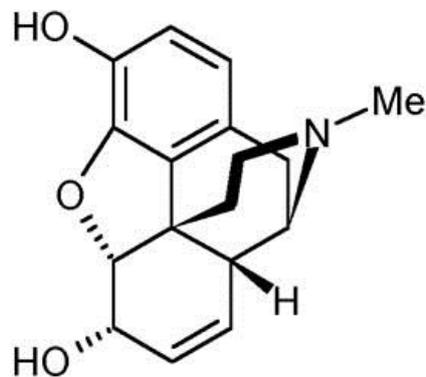


Figura 5: Estrutura química da Morfina. Fonte: [www.opioids.com](http://www.opioids.com)

Basic-Kes et al. (2009) testaram várias drogas para o controle da dor neuropática, entre as quais antidepressivos e anticonvulsivantes, sendo os opioides a classe que obteve maior êxito no controle da dor neuropática. No entanto, seus efeitos colaterais não devem ser desconsiderados, tais como náuseas, constipação, tontura e sonolência. Ainda numa comparação entre os quatro opioides estudados, morfina, oxicodona, metadona e levorfanol, a morfina foi a que apresentou os melhores resultados.

A substância cinzenta do mesencéfalo periaquedutal (PAG) é rica em receptores opiáceos e opioides endógenos e é um dos principais alvos da ação analgésica no sistema nervoso central. Tem sido proposto que o efeito analgésico de opioides na PAG ocorre por influência da supressão inibitória do neurotransmissor GABA (aminobutírico) em neurônios que formam parte da via descendente antinociceptiva. Opioides inibem a transmissão mediada pelo GABA na sinapse no PAG e em outras regiões do cérebro, reduzindo a probabilidade de liberação de neurotransmissores pré-sinápticos, mas os mecanismos envolvidos permanecem incertos (VAUGHAN et al., 1997) (figura 6).

Receptores opioides são farmacologicamente distintos e estreitamente relacionados a proteínas de membrana que compartilham características comuns por terem evoluído de um ancestral comum, o receptor acoplado à proteína G. Três tipos de receptores opioides foram identificados em mamíferos: mu, kappa e delta. Cada uma das três proteínas-receptoras é

codificada por genes independentes. Morfina é um agonista opioide seletivo de receptor mu, com afinidade muito baixa para receptores kappa. Medicamentos opioides diferentes se ligam a distintos receptores opioides com graus variáveis de afinidade e têm diferentes durações de ação, que resultam em diferentes perfis farmacológicos (MADDISON et al., 2010).

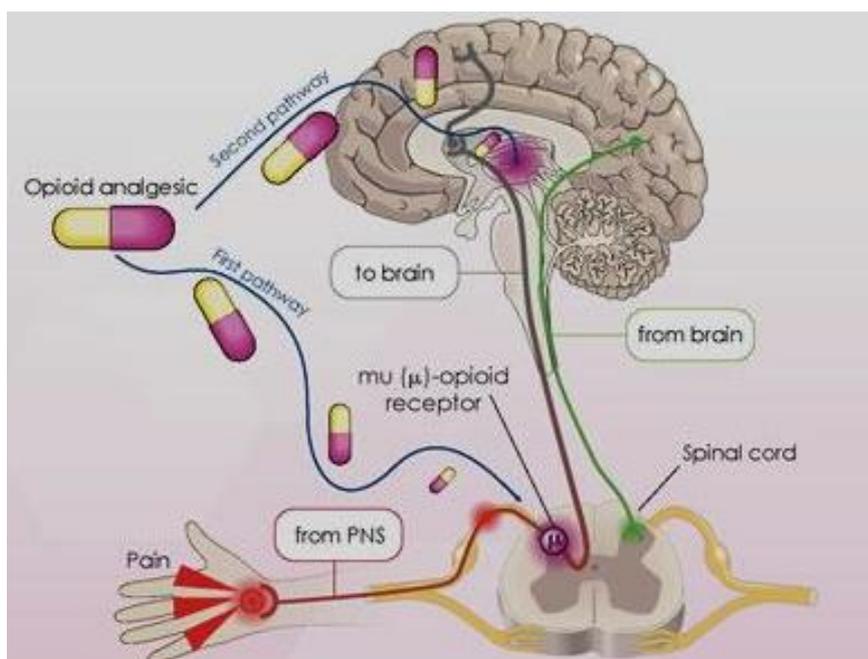


Figura 6: Mecanismo de ação da morfina. Fonte: [www.sites.google.com](http://www.sites.google.com)

Experimentos em animais e humanos sugerem que algumas enzimas metabolizadoras de drogas e transportadoras podem desempenhar um papel significativo no metabolismo de opioides, bem como influenciar o fluxo de opioides para dentro e para fora dos locais alvo. Estes processos parecem ter potencial para afetar de forma significativa as diferenças interindividuais nas concentrações de opioides no corpo e no cérebro (HOWARD, 2008).

A morfina é predominantemente metabolizada no fígado e no rim por meio de conjugação com o ácido glicurônico formando morfina-3-glicuronida (75 a 85%) e morfina-6-glicuronida (5 a 10%). Esses metabolitos são predominantemente excretados na urina e podem assim acumular-se nos pacientes com insuficiência renal. A morfina-6-glicuronida age nos receptores mu para produzir analgesia e depressão respiratória enquanto a morfina-3-glicuronida não tem ação farmacológica.

## 2.6. Flavonoides:

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários sintetizados pelas plantas através dos fosfatos, shikimato e fenilpropanoides. Eles formam os blocos de construção da lignina e que desempenham papel crucial na resistência de plantas a doenças e infecções. A lignina em si é um polímero natural essencialmente constituída por unidades de fenilpropano e derivados de guaiacol, p-hidroxifenol e siringol, todos interligados em uma ligação CC. Os compostos fenólicos estão diretamente envolvidos em vários processos fisiológicos da planta e em mecanismos de defesa da planta contra infecções microbianas. Além disso, sua atividade antimicrobiana, antioxidante, e suas várias outras propriedades nutricionais e farmacêuticas os torna altamente relevantes para as indústrias de alimentos e farmacêuticas (ADEBOYE et al., 2014).

Também agem como sinalizadores da nodulação, da fertilidade masculina, do transporte de auxina, bem como na coloração das flores como um sinal visual que atrai polinizadores (FERREYRA et al., 2012).

A estrutura básica de compostos fenólicos é um anel aromático tendo um ou mais grupos hidroxila. Os compostos fenólicos de plantas são classificados como fenóis simples ou polifenóis, com base no número de unidades de fenol na molécula. Assim, compostos fenólicos de plantas compreendem fenóis simples, cumarinas, ligninas, lignanas, taninos condensados e hidrolisáveis, ácidos fenólicos e flavonoides (KHODDAMI et al., 2013). Estruturalmente, os flavonoides constituem substâncias aromáticas com 15 átomos de carbono (C15) no seu esqueleto básico, sendo compostos fenólicos, que possuem nessa estrutura anéis aromáticos C6-C3-C6 (figura 7). O esqueleto C15 dos flavonoides é biogeneticamente derivado do fenilpropano (C6-C3) e três unidades de acetato (C6). Portanto, flavonoides são derivados de benzo-gama-pirona de origem vegetal, podendo haver facilmente interconversão entre eles (LOPES et al., 2000).

A preparação e extração de compostos fenólicos dependem principalmente da natureza do matriz da amostra e das propriedades químicas dos compostos fenólicos, incluindo a estrutura molecular, polaridade, concentração, o número de anéis aromáticos e grupos de hidroxila. A variação

na química dos compostos fenólicos em que uma amostra é relacionada com a concentração de compostos polifenólicos simples e complexos e as diferentes proporções de ácidos fenólicos, antocianinas, flavonoides, proantocianinas, entre outros, torna difícil escolher um único método de preparação e de extração de compostos fenólicos para muitos produtos vegetais (KHODDAMI et al., 2013). Apesar da conhecida função antioxidante dos flavonoides, cada vez mais estudos se apresentam a fim de determinar sua função analgésica. Antocianinas, flavonoides presentes em frutas vermelhas, têm sido investigadas por terem se apresentado como eficazes agentes analgésicos e anti-inflamatórios em animais, provocando significativa redução da dor induzida por ácido acético, formalina, calor ou retirada da cauda. Esta ação antinociceptiva ocorreria em receptores opioides tanto centrais quanto periféricos. (RAMIREZ et al., 2010).

Flavonoides são compostos fenólicos que atuam como pigmentos naturais presentes nos vegetais e que protegem o organismo do dano produzido por agentes oxidantes, como os raios ultravioletas, poluição ambiental, substâncias químicas presentes nos alimentos, etc. O organismo humano não pode produzir estas substâncias químicas protetoras, devendo então ser obtidas através da alimentação ou sob a forma de suplementos, já que representam componentes substanciais da parte não energética da dieta humana. (MARTÍNEZ-FLÓREZ et al., 2002).

Apesar do termo flavonoide derivar do latim, *flavus*, que significa amarelo, observa-se que os grupos flavonóis e flavonas são incolores e que a classe das antocianinas possuem substâncias que variam no seu espectro de coloração do verde ao azul (LOPES et al., 2000). Atualmente, já foram identificadas mais de quatro mil substâncias pertencentes ao grupo dos flavonoides (PETERSON; DWYER, 1998). Os pigmentos de cor da maioria das flores, frutos e sementes são flavonoides. Legumes e um pequeno número de plantas não leguminosas também são capazes de sintetizar flavonoides (FERREYRA et al., 2012).

Os flavonoides são um grupo de metabólitos secundários de plantas com estrutura fenólica variável e são encontrados em frutas, legumes, raízes, caules, flores, vinho e chá. São geralmente divididos em sete classes, incluindo flavonóis, flavonas, flavanonas, flavononol, flavonoides, isoflavonas e

antocianidinas. Até agora, mais de 5.000 flavonoides que ocorrem naturalmente foram extraídos de várias ervas medicinais e suas estruturas químicas foram confirmadas. Foram relatadas atividades de alguns destes flavonoides sobre o tratamento de diversas doenças, tais como as doenças do coração, câncer e infecção por vírus, bem como atividade protetora potencial contra dano artificialmente induzido no fígado (XIA, 2013). As funções biológicas dos flavonoides estão ligadas ao respectivo potencial de citotoxicidade e a sua capacidade de interagir com as enzimas através de complexação de proteína. Alguns flavonoides fornecem proteção ao estresse oxidativo (FERREYRA et al., 2012).

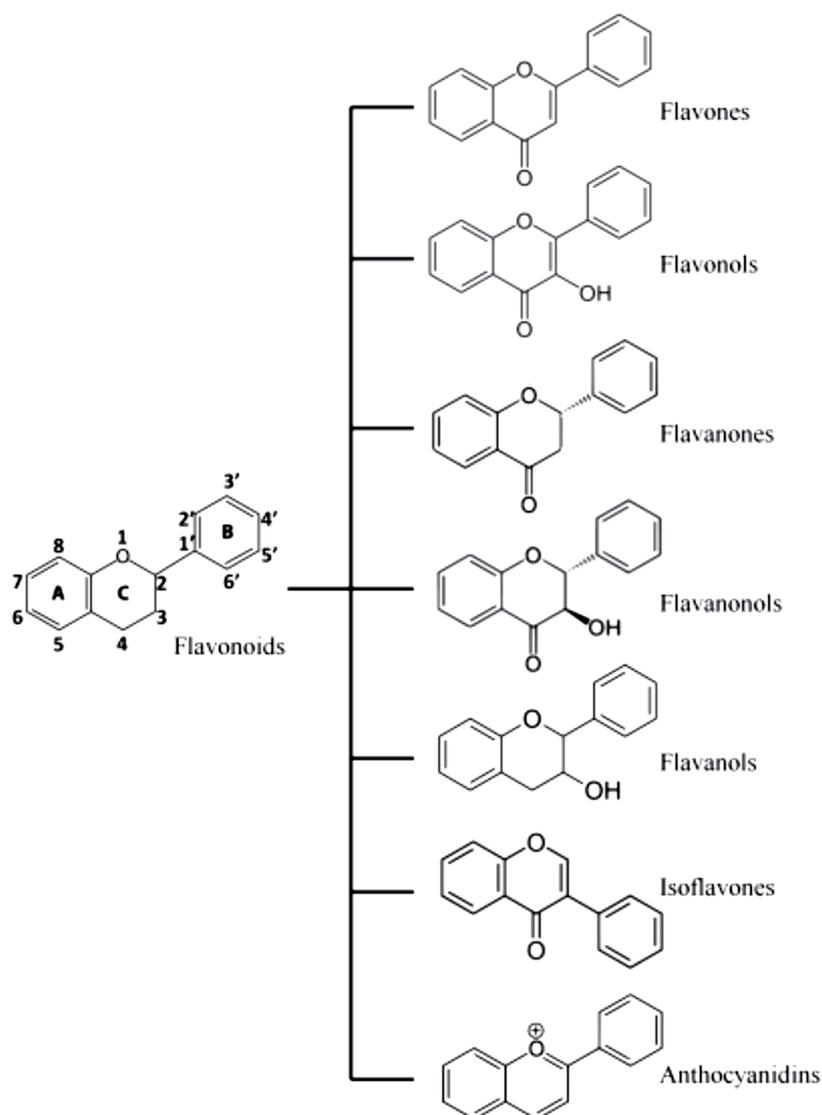


Figura 7: Estrutura molecular dos principais flavonoides e suas principais famílias. Fonte: XIA, 2013.

Recentes evidências demonstram um papel potencial dos flavonoides na redução de doenças cardiovasculares. Em particular, a ingestão de alimentos ricos em flavonoides tem sido utilizada para melhorar a função endotelial e a pressão arterial periférica. No entanto, o efeito benéfico dos flavonóides sobre a rigidez arterial é emergente, mostrando um efeito positivo que pode ser associado com melhora da função vascular, e em particular com a rigidez arterial avaliada pela medição da velocidade da onda de pulso carotídeo-femoral, padrão-ouro para avaliar a rigidez da aorta (LILAMAND, 2014). Alguns flavonoides são capazes de produzir relaxamento do endotélio vascular através da estimulação da produção de óxido nítrico (RAKOTOMALALA, 2013).

Bahmani (2014) avaliou a analgesia de algumas plantas medicinais e seus possíveis mecanismos de ação. Os flavonóides estudados reduziram o acúmulo de lipídios flutuantes necessários para sinalizar a dor inflamatória, inibindo a aglomeração de receptores da cascata hormonal que desencadeiam a inflamação. Também demonstraram-se eficientes na diminuição do estresse oxidativo. Vale resaltar que o óxido nítrico é um dos mediadores de hiperalgesia e sua diminuição leva à atividade analgésica. Também ficou comprovado o efeito direto de flavonoides na síntese de prostaglandinas. Além disso, flavonóides parecem interferir na dor por meio do sistema opioide e adrenérgico. A inibição de canais de cálcio é outro mecanismo capaz de inibir a liberação de neurotransmissores a partir das terminações nervosas do corno dorsal da medula espinhal, diminuindo assim a sensação dolorosa. Outros flavonoides apresentam atividade antiinflamatória por inibir a migração de glóbulos brancos para a área da inflamação e inibir a produção de mediadores inflamatórios dos neutrófilos. O uso comestível de alguns flavonoides determinou aumento do nível de cortisol no sangue, o que levou à diminuição da dor avaliada a partir do teste de formalina. Venkata et al. (2014) avaliou a ação de outro flavonoide no controle da dor neuropática induzida através do modelo experimental de injúria de constrição crônica, obtendo o mesmo resultado do grupo controle realizado pela pregabalina. Este efeito foi atribuído

às ações antioxidativa, neuroprotetora e moduladora de canais de cálcio destes compostos.

A avaliação da função analgésica e antiinflamatória de outro flavonoide foi avaliada inicialmente através do teste de formalina, onde a variação da dose administrada revelou resultados diferentes (efeito bifásico). Nesta fase de teste, foi determinada uma dose capaz de controlar a dor neurogênica causada na fase inicial. Essa dor é resultante da irritação direta de nociceptores de fibras aferentes primárias e na diminuição da substância P e neuropeptídeos envolvidos na resposta inflamatória central e periférica. Já no teste seguinte, de placa quente, que envolve estruturas supraespinhais, a dose ótima determinada no teste anterior não foi aquela que causou uma diminuição significativa na latência da resposta nociceptiva induzida pelo calor, sendo necessário nesse caso o dobro da dose anterior. Desta maneira pode-se determinar um efeito bifásico do flavonoide na resposta à dor (BASTING. 2014).

### **3. OBJETIVO**

Este trabalho visa determinar a dose e a eficácia de um flavonoide sintético fornecido pelo departamento de química da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - LCQUI - no controle da dor neuropática induzida em ratos wistar.

Também procura implementar dois modelos de dor neuropática na rotina do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Experimental: injúria de constrição crônica e lesão do nervo espinhal.

### **4. JUSTIFICATIVA**

O desenvolvimento deste estudo justifica-se por buscar uma alternativa ao uso de opioides, apesar de sua eficiência no controle da dor, visando diminuir os efeitos colaterais indesejáveis presentes em sua utilização. Revela-

se importante devido a incidência de dor neuropática na população como um todo.

Vale ressaltar que flavonoides são substâncias presentes em organismos vegetais, sendo o Brasil um dos países de maior biodiversidade no mundo. O surgimento de mais essa função em representantes de nossa flora nos faz não só ter mais uma opção de tratamento da dor neuropática, como também um novo viés de riqueza para o país.

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

O presente estudo foi enviado e aprovado pelo Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro através do protocolo 236.

Foram realizados testes em ratos (*Rattus norvegicus wistar*), provenientes da Unidade de Experimentação Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, machos e fêmeas, pesando entre 250 e 300g, mantidos num ambiente com temperatura controlada a 19 °C e umidade de 50 a 60%, ficando em um ciclo claro/escuro de 12 horas. Água e comida foram oferecidas ad libitum.

### **5.1. Avaliação da viabilidade das amostras:**

Uma amostra química foi cedida pelo laboratório de química (LCQUI) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Tal substância é um flavonoide que foi sintetizado artificialmente a partir de amostras naturais, tendo sua fórmula química molecular estrutural descrita na figura 8.

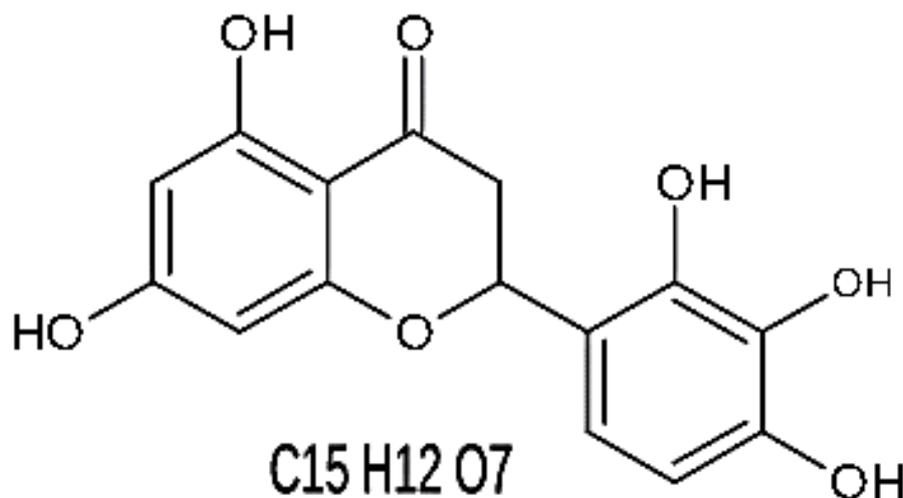


Figura 8: Fórmula química molecular e estrutural da amostra de flavonoide avaliada.

A substância foi solubilizada somente em dimetilsulfóxido (DMSO), na diluição suficiente a não ultrapassar 100µL/animal da solução. As concentrações das diluições serão definidas posteriormente.

As concentrações usadas foram definidas a fim de realizar um “screening” de fármacos. O termo screening denota levantamentos realizados com a função de confirmar ou não uma suspeita numa determinada área de interesse, através de técnicas que economizem tempo e investimento. Neste caso o screening foi realizado através de uma avaliação hemodinâmica, onde os parâmetros avaliados foram: pressão arterial sistólica, diastólica e média e eletrocardiograma.

Os animais foram anestesiados através de anestesia inalatória. A indução anestésica foi realizada com o auxílio de máscara inalatória elaborada a partir de uma garrafa “pet” e a manutenção anestésica contou com o auxílio de uma máscara menor, produzida a partir de uma seringa de 20 ml e preenchida com cal soldada a fim de minimizar a reinalação de CO<sub>2</sub>. Durante todo o procedimento a anestesia foi mantida com halotano (figura 9).



Figura 9: Indução anestésica utilizando máscara adaptada acoplada ao aparelho de anestesia inalatória. a - indução; b- manutenção. Fonte: Arquivo pessoal

Posteriormente os animais foram colocados em decúbito dorsal e contidos para canulação da artéria carótida comum esquerda, através da qual foi realizada a mensuração dos parâmetros analisados. Para manutenção da cânula, foi realizada tricotomia, antissepsia e posterior incisão na região cervical ventral do pescoço. Continuou-se com a dissecação dos músculos esterno hioideo e esternocleidomastóideo para exposição da artéria carótida comum esquerda, localizada paralelamente à traqueia. A artéria foi dissecada para separação do nervo vago (Figura 10).



Figura 10: Dissecção da artéria carótida, separando-a do nervo vago, para fixação de cânula arterial para a mensuração da pressão arterial invasiva nos momentos pré-estabelecidos. Fonte: Arquivo pessoal

Posteriormente foi canulada com cateter intravenoso radiopaco n° 24G (0,70X19mm) da marca Nipro Medical Ltda., onde foi conectado o sensor do

equipamento BioAmp (figura 11), que codifica as informações de pressão arterial e eletrocardiograma e amplifica o sinal na forma de gráficos para o computador, permitindo a análise destes dados. A cânula foi heparinizada com uma solução de heparina sódica e cloreto de sódio 0,9% a fim de evitar a coagulação do sangue dentro da cânula, impedindo ou dificultando a avaliação da pressão arterial.

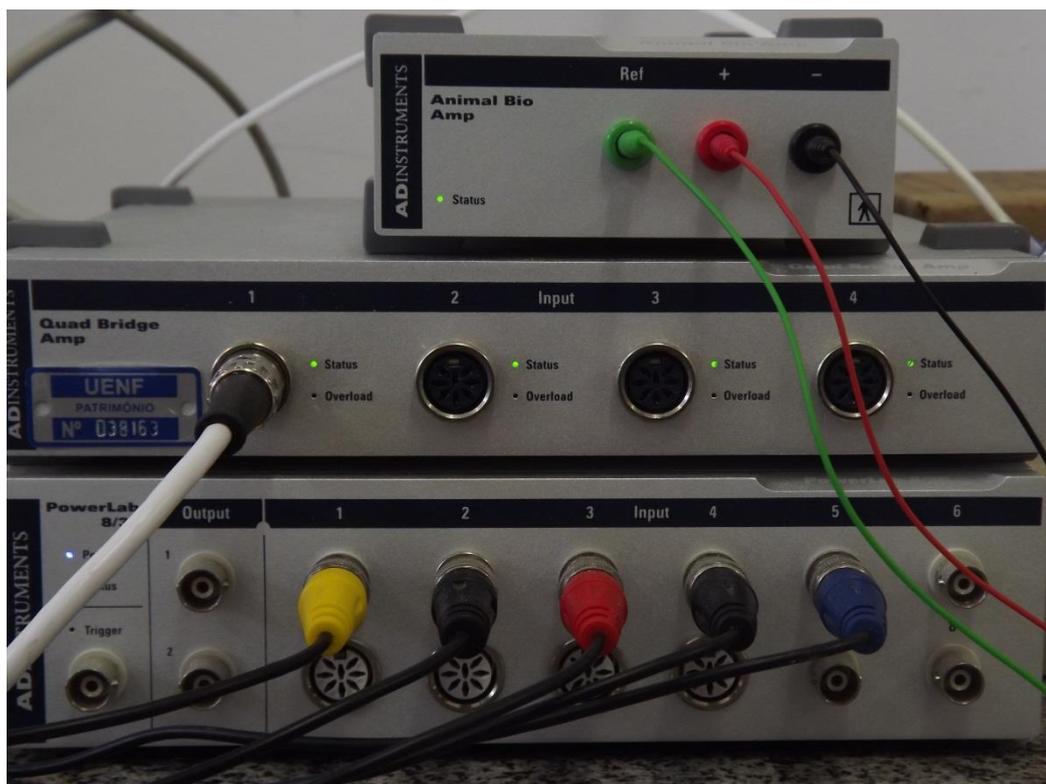


Figura 11: Foto do Equipamento Animal Bioamp 7 da Adinstruments para codificação de pressão arterial e eletrocardiograma. Fonte: Arquivo pessoal

A veia jugular foi canulada contralateralmente como uma via de administração das substâncias a serem testadas com um cateter intravenoso Tygon PE 10 da Cole-parmer do Brasil<sup>®</sup>. A exposição destas vias ocorreu após a dissecação dos músculos esternocleidomastóideo e hioideo, conforme demonstrado na figura 12.

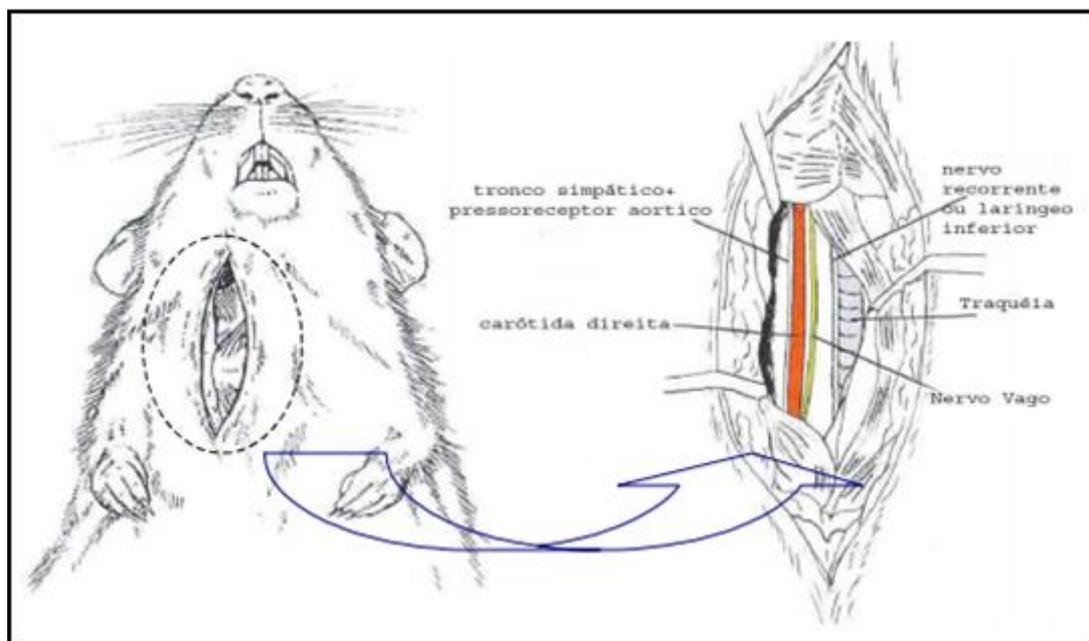


Figura 12: Ilustração da localização anatômica da artéria carótida e da veia jugular. Fonte: Pureza, 2006

Nesta fase do experimento foram utilizados 5 ratos Wistar para cada dose utilizada da amostra, perfazendo um total de 20 ratos, conforme os grupos descritos a seguir:

- 10 mg.kg<sup>-1</sup> → 5 animais
- 25 mg.kg<sup>-1</sup> → 5 animais
- 30 mg.kg<sup>-1</sup> → 5 animais
- 35 mg.kg<sup>-1</sup> → 5 animais

A solução foi administrada separadamente em ratos, por via intravenosa (IV), inicialmente na dose de 10 mg.kg<sup>-1</sup>. De acordo com as alterações as doses foram sendo aumentadas gradativamente para 25 mg.kg<sup>-1</sup>, 30 mg.kg<sup>-1</sup> e 35 mg.kg<sup>-1</sup>. Todas as concentrações de amostras foram diluídas em DMSO até completar o volume de 0,1ml.

Antes de todas as administrações foi infundido apenas DMSO na dose de 0,1ml, a fim de servir de controle, visando eliminar das avaliações os efeitos hipotensores do DMSO. Desta forma, a diferença apresentada nos dois momentos de aplicação é que foi considerada como responsável pelas alterações causadas pela amostra. Tanto a aplicação de DMSO quanto da amostra diluída em DMSO só foi realizada após o retorno da pressão arterial

ao nível em que se encontrava no início da aferição, conforme demonstrado nas tabelas 2, 3 e 4.

O ritmo cardíaco foi avaliado através do eletrocardiograma (ECG). Todos os parâmetros foram avaliados através do equipamento BioAmp e processados pelo programa LabChart 7 a fim de determinar a dose que causasse menores alterações cardiovasculares durante a experimentação, conforme demonstrado na figura, onde evidenciam-se os resultados de variação da pressão arterial (figura 13) e eletrocardiograma (figura 14).

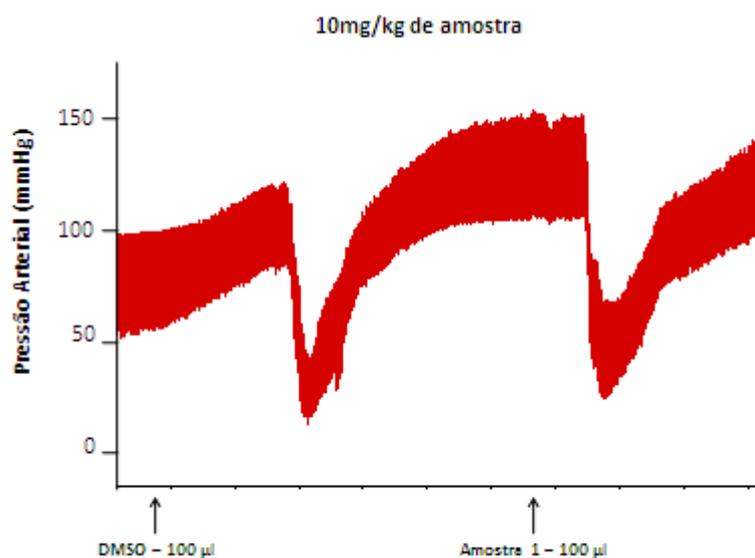


Figura 13: Gráfico da variação da pressão arterial no momento de administração do DMSO (controle) e da amostra, gerado pelo programa LabChart 7

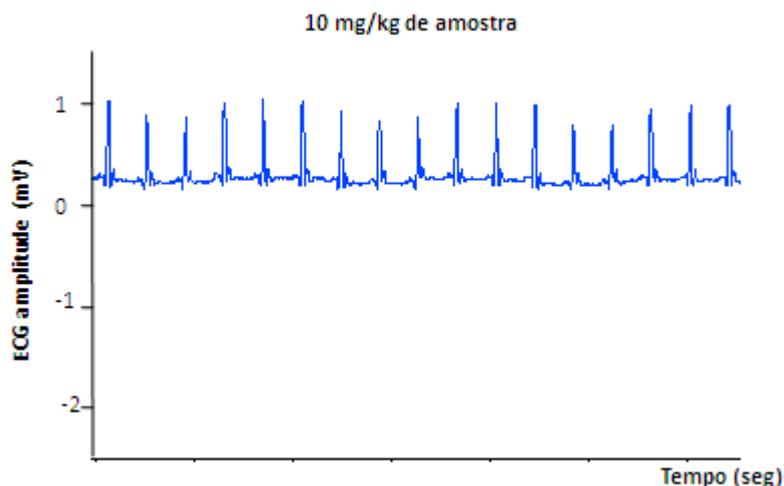


Figura 14: Gráfico da variação do Eletrocardiograma (ECG) no momento de administração do DMSO (controle) e da amostra 1, gerado pelo programa LabChart 7

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente através do programa Graphpad Prisma 5.

A análise determinou a dose de  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  como aquela de melhor resultado a ser usada para a continuação dos experimentos.

## 5.2. Realização de modelo experimental:

Esta fase do experimento visa a realização de modelo de dor neuropática periférica e central, a fim de determinar a eficácia ou não da amostra no controle da dor.

Os modelos ideais devem resultar em déficits sensoriais reprodutíveis, tais como alodinia e hiperalgesia espontânea por um período prolongado. Assim, através do estabelecimento de anormalidades sensoriais nos animais, várias condições fisiológicas observadas podem ser mimetizadas, auxiliando a avaliação de diversas farmacoterapias. Desta forma, foram criados diversos modelos animais a fim de atender a etiologia diversa da dor neuropática e suas manifestações.

### 5.2.1. Modelo de Injúria por Constrição Crônica (ICC):

Este modelo foi descrito por Bennet e Xie em 1988. Foram utilizados 12 ratos Wistar entre 250 a 300g, sendo 6 machos e 6 fêmeas. Inicialmente os

animais foram anestesiados através de anestesia inalatória por halotano seguindo a sequência anestésica da fase anterior, com indução e manutenção através de máscara. Os animais foram então colocados em decúbito lateral direito. Foi realizada tricotomia seguida de antissepsia por iodopovidona. Com bisturi nº 23 foi feita incisão da pele e dissecação do músculo bíceps femoral, permitindo a exposição do nervo ciático esquerdo (cerca de 15 mm) próximo à trifurcação do nervo ciático. Foram então realizadas quatro ligaduras levemente frouxas na porção sensitiva do nervo ciático, distinguida da motora por ser mais delgada e superficial. Houve cuidado para não se interromper a circulação epineural. O espaço entre as ligaduras foi de 1 mm, utilizando-se fio de algodão 3.0 (figura 15).



Figura 15: Demonstração da sequência de realização do modelo de dor neuropática ICC, iniciando com a incisão da pele, dissecção dos músculo e exposição do nervo ciático. Posteriormente os fios de sutura são posicionados sob o nervo e são realizadas as quatro ligaduras frouxas. A sequência se encerra com a sutura da pele. Fonte: Arquivo próprio

Após o procedimento, foi realizada a sutura da pele com fio nylon 3.0 e aplicado um antisséptico tópico. Os animais recuperaram-se em gaiolas individuais e posteriormente foram agrupados em duas gaiolas, ficando separados em grupos de machos e fêmeas (n=6). Este modelo tem a intenção de causar dor neuropática periférica, semelhante ao que ocorre naturalmente em indivíduos acometidos por essa patologia.

### 5.2.2. Modelo de Lesão do Nervo Espinhal (LNE):

Além do modelo de ICC, também foi utilizado o modelo de ligadura de nervo espinhal (LNE), descrito por Kim e Chung (1992). Foram utilizados 12 ratos Wistar entre 250 a 300g, sendo 6 machos e 6 fêmeas. Novamente os animais foram anestesiados através de anestesia inalatória por halotano seguindo a sequência anestésica da fase anterior, com indução e manutenção através de máscara. Os animais foram posicionados em decúbito esternal onde foi realizada tricotomia seguida de antissepsia por iodopovidona e seus músculos para-espínhas cuidadosamente separados na região das vértebras L5 a S1. O processo transversal de L6 foi retirado para a visualização dos nervos espinhais L4 e L5, os quais foram cuidadosamente separados para que fosse feita a ligadura firme do nervo ciático na saída do mesmo da medula na direção de L5. Foi utilizado fio seda 6.0, interrompendo assim todos os axônios do nervo. Após o procedimento, os músculos paraespínhas e a pele foram suturados e um antisséptico foi aplicado topicamente (figura 16). Os animais recuperaram-se em gaiolas individuais e posteriormente foram agrupados em duas gaiolas, ficando separados em grupos de machos e fêmeas (n=6). Este modelo tem a intenção de mimetizar a dor neuropática periférica que ocorre em função do acometimento dos nervos mais medianamente, ou seja, mais proximal ao sistema nervoso central.



Figura 16: Foto demonstrativa da região de incisão e exposição da saída do nervo ciático na altura de L5 para a realização do modelo LNE. Finalmente a região já suturada. Fonte: Arquivo pessoal

Após a realização dos dois modelos os animais permaneceram em ambiente controlado durante sete dias a fim de que se estabelecesse a dor neuropática.

Os dois modelos citados anteriormente estão demonstrados na figura esquemática 17, facilitando a visualização dos locais de ligadura dos nervos.

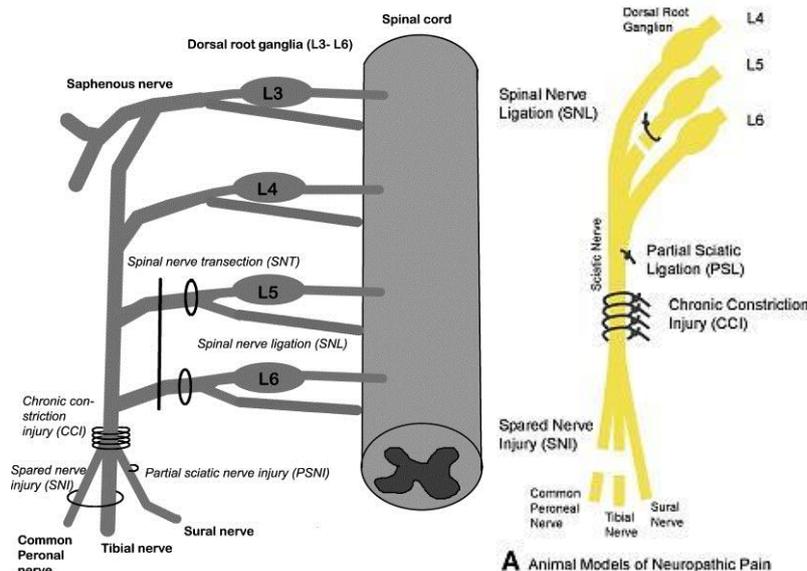


Figura 17: Modelos de ligadura de nervos para avaliação de dor neuropática Fonte: MC MORLAND, 2010.

### 5.3. Avaliação da dor:

Para avaliar modificações na sensação e no desenvolvimento da alodinia mecânica, foi utilizado o aparelho analgesímetro digital, versão digitalizada dos filamentos de Von Frey. Este teste tem como objetivo avaliar mudanças na sensibilidade tátil em resposta a um estímulo mecânico resultantes de um dano neural. O uso de filamentos de Von Frey é um método para avaliar a sensibilidade tecidual ao estímulo mecânico bastante utilizado clinicamente. Entretanto, tal método passou a ser utilizado também para experimentos laboratoriais, no sentido de avaliar a influência de drogas sobre a sensibilidade nociceptiva em animais. Essa técnica foi transformada em um método eletrônico usado primeiramente em humanos (JENSEN et al., 1986) e posteriormente em ratos (MÖLLER et al., 1998).

Este aparelho possui um braço transdutor de força ligado a um pino sensor, através do qual é realizada uma força de intensidade crescente contra a superfície da pata traseira do animal para que seja determinado o limiar de retirada da pata (pressão em que o animal retira a pata). O analgesímetro digital registra automaticamente a força máxima (g) na qual o animal responde

ao estímulo. Os animais foram colocados em caixas acrílicas individuais para aclimatização por 20-30 minutos antes do início do teste. Após este período, foram determinados os limiares de retirada das duas patas traseiras. Foram realizadas três aferições sequenciais com intervalo de 30 minutos entre elas para então ser realizada uma média e determinado o valor a ser considerado.



Figura 18: Teste de pressão crescente na pata de ratos (método Von Frey). Fonte: Arquivo pessoal

#### **5.4. Teste da amostra:**

A amostra foi testada em comparação com a morfina, considerada padrão ouro no controle da dor, de acordo com a tabela seguinte:

Tabela 2: Distribuição do número total de animais quanto ao tipo de modelo experimental e sexo dos animais

Modelo experimental		Morfina	Amostra
ICC	machos	3	3
	fêmeas	3	3
LNE	machos	3	3
	fêmeas	3	3
TOTAL		12	12

Todos os animais foram avaliados no analgesímetro pelo método Von Frey em três momentos experimentais diferentes:

- Antes de serem operados;
- Sete dias após a cirurgia e antes do primeiro tratamento, onde a dor neuropática já encontra-se totalmente instalada, fato este comprovado através do teste de Von frey. Neste dia iniciou-se também o tratamento. O tratamento foi realizado com administração da amostra na concentração de  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  diluída em DMSO, perfazendo um total de 0,1 ml. Já o grupo da morfina também recebeu a mesma quantidade de volume na dose de  $0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ . A administração foi realizada via intraperitonal com seringa de 1 ml, a cada 24 horas, durante sete dias;
- Quatorze dias após a cirurgia, ou seja, perfazendo sete dias de tratamento.

Em cada animal foi avaliada a pata no lado onde foi feita a lesão do nervo e no lado contralateral, teoricamente hígida, sendo realizadas três medições em cada pata. Posteriormente foi realizada a média dos três resultados. A medição da pata contralateral àquela do lado em que foi realizado o modelo experimental serviu de controle, havendo assim um controle para cada animal.

Após a última avaliação, com quatorze dias de realização dos modelos e sete dias após o início do tratamento, foi realizada eutanásia em todos os animais através de sobredose de ketamina associada com diazepam. Posteriormente foi realizada necropsia dos animais com visualização

macroscópica dos órgãos intraperitoniais, já que as substâncias foram administradas por essa via.

Os resultados foram analisados estatisticamente através do programa Graphpad Prisma 5.

Para a avaliação dos resultados de variação de pressão arterial média foram utilizados os testes estatísticos de análise de variância e Newman-Keuls, enquanto para avaliar os dados aferidos pelo método Von Frey, foram utilizados os testes t de student e Bonfferoni.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Avaliação da viabilidade da amostra:

A análise estatística foi realizada com o programa GraphPad Prisma 5. Foram realizados os testes de Análise de variância seguido pelo teste de média Newman-Keuls, adotando um índice de confiabilidade de 95%.

Para facilitar a observação dos resultados obtidos, os mesmos foram divididos de acordo com a concentração avaliada:

#### **10 mg.kg<sup>-1</sup>:**

Nesta concentração, todos os animais (n=5) sobreviveram após a testagem. No que diz respeito à pressão arterial, o grupo de 10 mg.kg<sup>-1</sup> comportou-se inicialmente semelhante ao DMSO, porém na recuperação a curva da amostra apresentou-se mais longa, o que sugeria maior tempo de recuperação da hipotensão, conforme a figura 19.

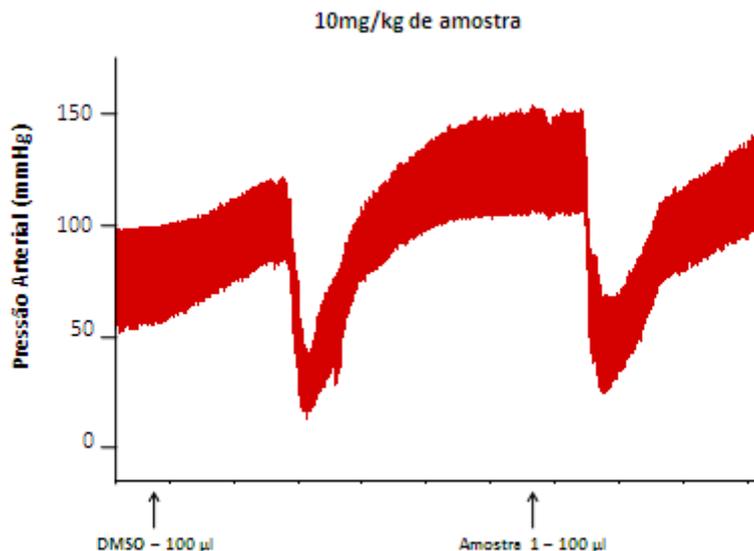


Figura 19: Registro da variação da pressão arterial no momento de administração do DMSO (controle) e da amostra na concentração de 10mg/kg de amostra, gerado pelo programa LabChart 7

Quando foi realizada a análise estatística, verificou-se que houve diferença estatística entre a mensuração da pressão arterial antes da administração do DMSO e depois da administração do mesmo. Tal resultado já era esperado em função do efeito hipotensor causado pela liberação de histamina causada pelo uso do DMSO (SANTIS; PRATA 2009). No entanto não houve diferença entre a queda de pressão arterial ocasionada pelo DMSO sozinho (controle) e da amostra diluída em DMSO, conforme mostra a tabela 2 e a figura 20.

Tabela 3: Variação da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM) antes da administração de DMSO, após a administração de DMSO e após a administração da amostra diluída em DMSO na dose de 10mg/kg.

PAS antes	PAS DMSO	PAS amostra
117,3430	42,29091	65,59384
121,9702	44,54177	52,63895
143,1952	61,79197	62,17725
118,3614	79,77570	22,68175
141,2882	102,91280	121,69750
PAD antes	PAD DMSO	PAD amostra
85,39125	17,02826	26,261130
98,56239	23,59264	23,779130
116,61770	24,25952	24,463940
95,48124	45,04776	10,378520
113,76850	78,56329	89,196490
PAM antes	PAM DMSO	PAM amostra
101,68550	24,13329	39,74418
109,78710	30,31290	33,10669
129,95770	39,21041	39,44710
106,56820	58,64195	14,05971
126,71510	89,81372	105,03420

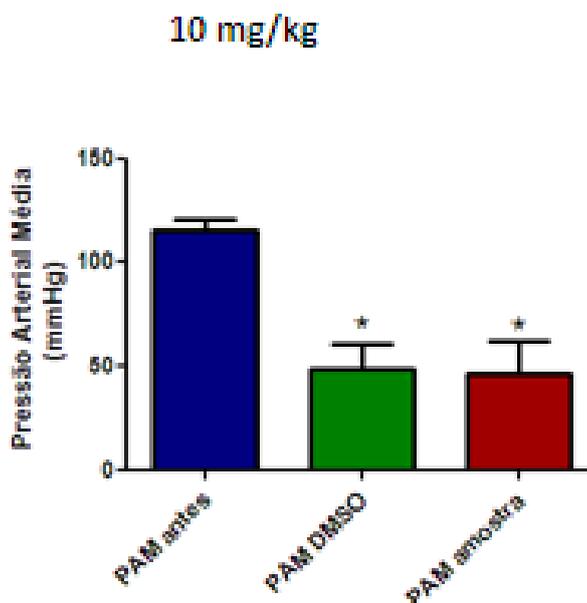


Figura 20: Gráfico comparativo das variações de pressão arterial média nos momentos antes de aplicar do DMSO, após a aplicação do DMSO e após aplicação de 10mg.kg da amostra diluída em DMSO.

No que diz respeito ao eletrocardiograma, não houve alteração de traçado após aplicação de DMSO (controle) ou da amostra diluída em DMSO (figura 21).

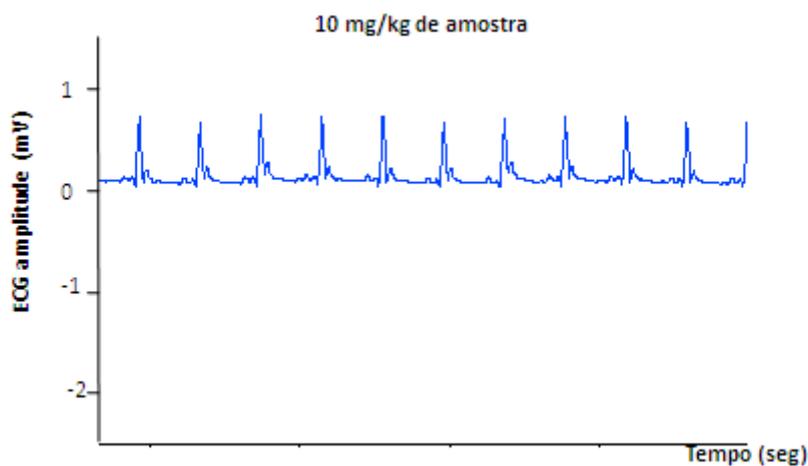


Figura 21: Gráfico do eletrocardiograma durante a aplicação do controle e da amostra na concentração de 10mg.kg, gerado pelo programa LabChart 7

### **25 mg.kg<sup>-1</sup>:**

Nos cinco animais avaliados nesta dose de amostra (n=5), dois vieram a óbito (40%). Dos que sobreviveram, o registro da pressão arterial foi avaliado estatisticamente.

Nesta concentração, o gráfico que descreve a recuperação da hipotensão demonstra uma maior demora no retorno à pressão arterial inicial (Figura 22).

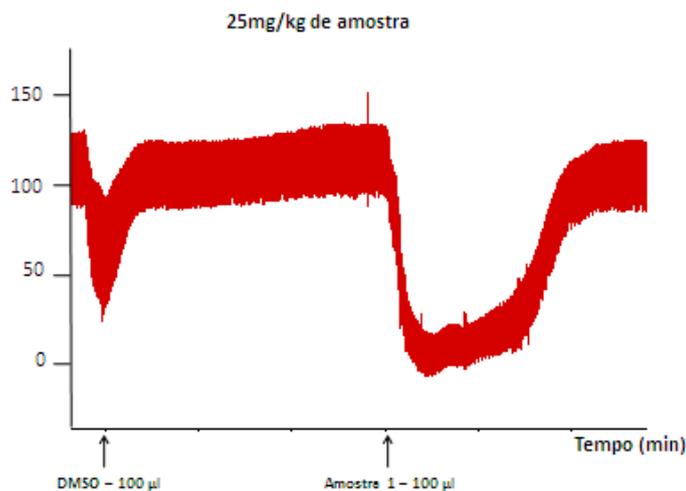


Figura 22: Registro da variação da pressão arterial no momento de administração do DMSO (controle) e da amostra na concentração de 25mg.kg de amostra, gerado pelo programa LabChart 7

Na análise estatística dos resultados nesta concentração de 25 mg.kg<sup>-1</sup> não houve diferença significativa entre nenhum dos três momentos. Nem na avaliação anterior a qualquer administração, nem quando da administração do DMSO ou da administração da amostra (tabela 3 e figura 23).

Tabela 4: Variação da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM) antes da administração de DMSO, após a administração de DMSO e após a administração da amostra diluída em DMSO na dose de 25mg/kg.

PAS antes	PAS DMSO	PAS amostra
118,7809	89,68410	27,20671
121,2312	98,09926	97,11650
160,1569	106,59910	113,63550
PAD antes	PAD DMSO	PAD amostra
90,12553	40,82965	13,31320
95,80072	70,34238	70,46673
121,69830	75,64946	76,88225
PAM antes	PAM DMSO	PAM amostra
104,7959	61,66837	17,78463
108,4195	84,34751	83,94070
140,4182	89,96928	93,46963

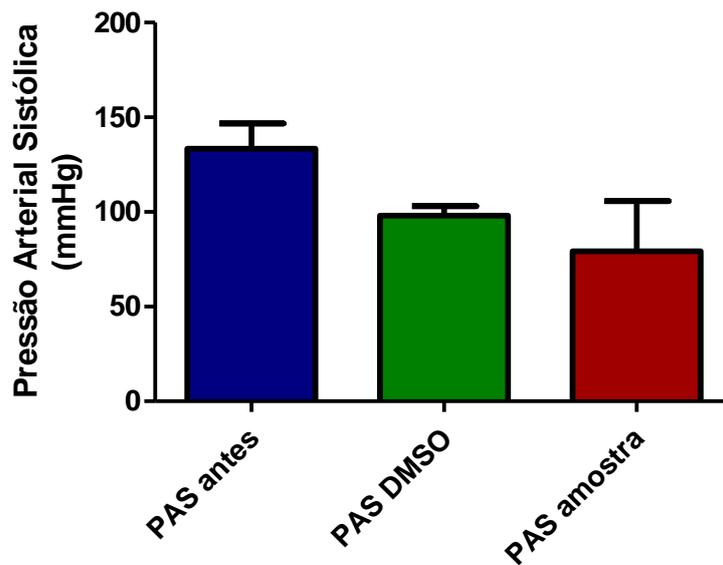


Figura 23: Gráfico comparativo das variações de pressão arterial média nos momentos antes de aplicar do DMSO, após a aplicação do DMSO e após aplicação de 25mg.kg da amostra diluída em DMSO.

No que diz respeito ao eletrocardiograma, também não houve alteração de traçado que mereça ser descrito (figura 24).

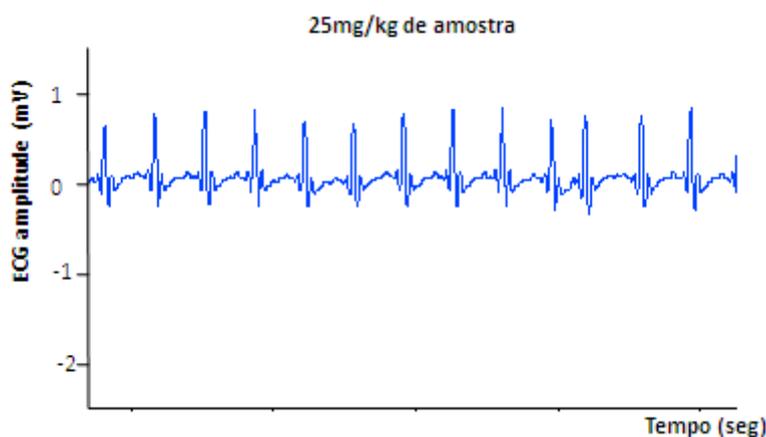


Figura 24: Gráfico do eletrocardiograma durante a aplicação do controle e da amostra na concentração de 25mg.kg, gerado pelo programa LabChart 7

**30 mg.kg<sup>-1</sup>:**

Nesta concentração não houve nenhum óbito. Observamos uma menor queda da pressão arterial e um traçado com retorno mais breve (figura 25).

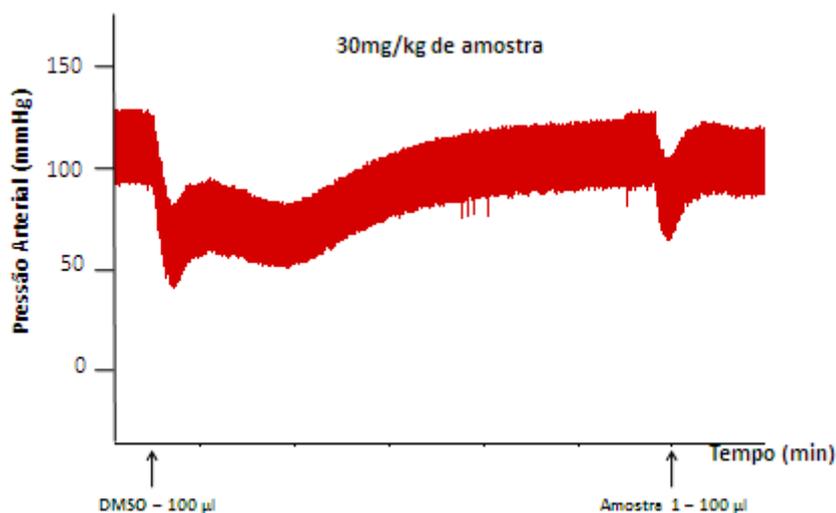


Figura 25: Registro da variação da pressão arterial no momento de administração do DMSO (controle) e da amostra na concentração de 30mg.kg de amostra, gerado pelo programa LabChart 7

A análise do eletrocardiogramam mostra que novamente, apesar da queda da pressão arterial, o traçado eletrocardiográfico não demonstra arritmia nem alteração da frequência cardíaca (figura 26).

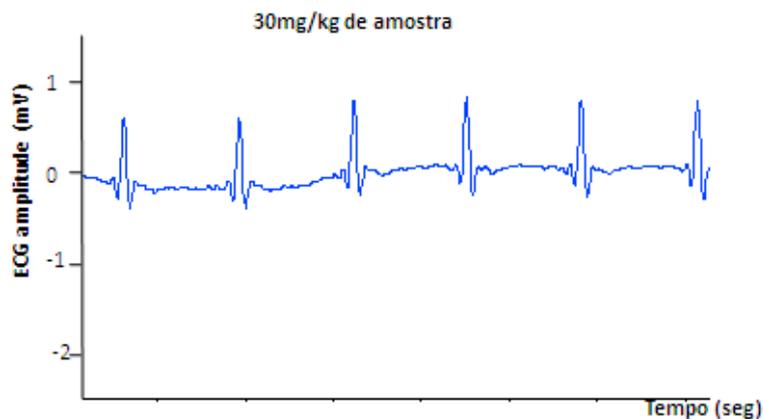
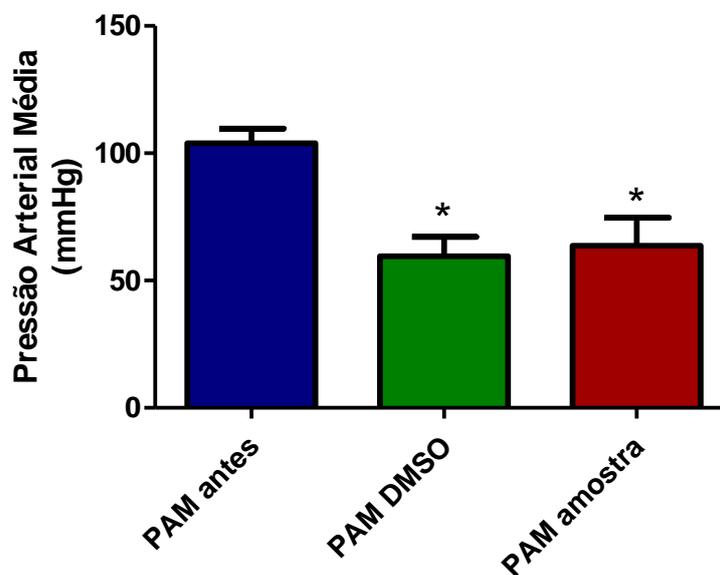


Figura 26: Gráfico do eletrocardiograma durante a aplicação do controle e da amostra na concentração de 25mg.kg, gerado pelo programa LabChart 7

Na análise estatística houve resultado semelhante à concentração de 10 mg.kg<sup>-1</sup>, onde houve diferença estatística entre a avaliação anterior a administração, porém não houve diferença entre os momentos de administração de DMSO e amostra (figura 277).

Tabela 5: Variação da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM) antes da administração de DMSO, após a administração de DMSO e após a administração da amostra diluída em DMSO na dose de 30mg/kg.

PAS antes	PAS DMSO	PAS amostra
112,69360	54,62664	61,65425
112,75330	75,40632	93,13794
118,31600	95,52842	93,44318
103,97220	84,72205	94,30694
138,96840	59,68537	38,70803
PAD antes	PAD DMSO	PAD amostra
89,10979	30,39068	37,858470
90,22635	48,67187	67,739180
90,85560	61,40299	65,870520
74,92197	58,21081	67,395890
111,47050	28,38510	19,239630
PAM antes	PAM DMSO	PAM amostra
100,34710	41,61565	49,26200
100,85550	61,99037	80,81016
103,91860	78,79004	80,04712
90,13688	72,52062	81,01201
124,70040	43,03366	27,37856



\* *versus* PAS antes ( $p < 0,01$ )

Figura 27: Gráfico comparativo das variações de pressão arterial média nos momentos antes de aplicar do DMSO, após a aplicação do DMSO e após aplicação de 30mg.kg da amostra diluída em DMSO.

35 mg.kg<sup>-1</sup>:

Dos cinco animais testados nessa concentração de amostra, quatro vieram a óbito (80%), não havendo, dessa forma, análise estatística. Esta concentração foi descartada para o tratamento dos animais.

## 6.2. Avaliação do controle da dor:

Diante dos resultados obtidos, iniciou-se o tratamento dos animais, com a dose de  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$ , porque foi a dose mais segura na avaliação hemodinâmica cardiovascular.

Para avaliação da eficácia da amostra no controle da dor foi realizada análise estatística com o programa GraphPad Prisma 5, realizando-se o teste t de student two way seguido pelo pós teste de Bonferroni ( $p < 0,05$ ).

Os resultados obtidos da eficácia no controle da dor realizada pelo método Von Frey foram analisados estatisticamente e geraram quatro gráficos. Os dois primeiros referem-se ao modelo de Injúria de Cronstrição Crônica (ICC), sendo o primeiro relativo ao resultado da morfina comparada ao controle, avaliado na pata contralateral ao modelo (figura 28) e o segundo referente ao resultado obtido pela amostra, também comparado ao lado contralateral ao modelo (controle) (figura 29).

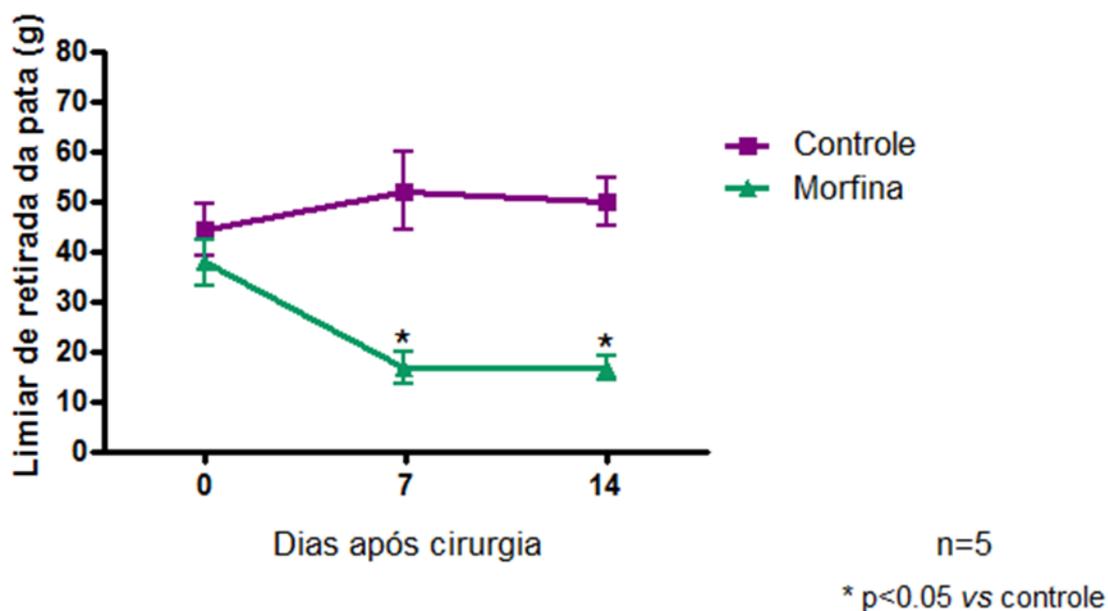


Figura 28: Gráfico descrevendo a estatística de comparação entre o controle e a morfina para o controle da dor neuropática, no dia de realização do modelo ICC, sete dias após, quando iniciou-se o tratamento, e quatorze dias após.

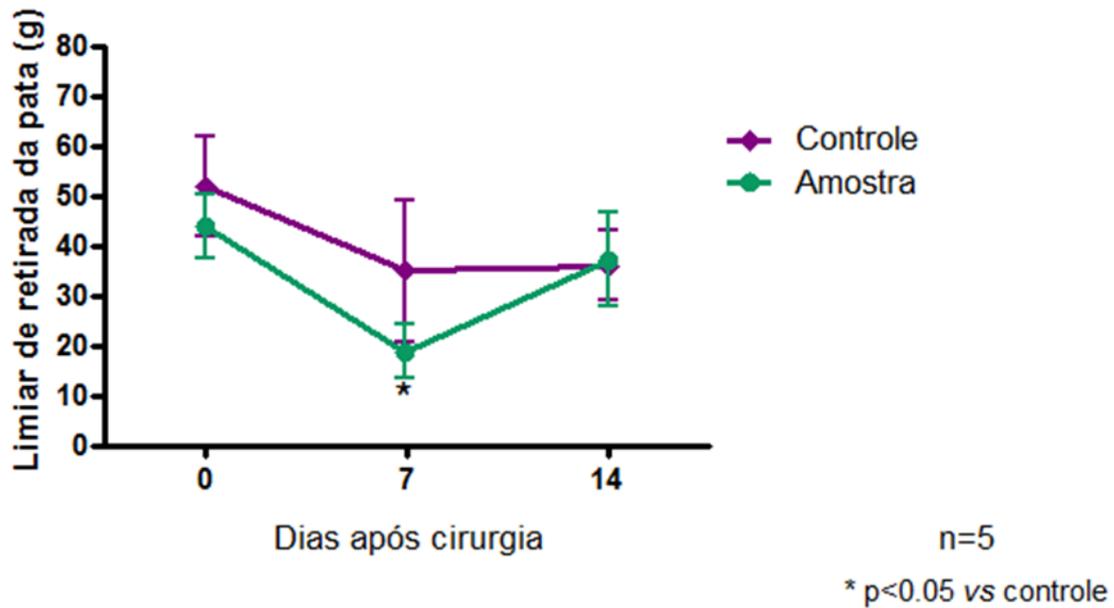


Figura 29: Gráfico descrevendo a estatística de comparação entre o controle e a amostra para o controle da dor neuropática, no dia de realização do modelo ICC, sete dias após, quando iniciou-se o tratamento, e quatorze dias após.

Os gráficos a seguir referem-se à análise estatística do resultado da eficácia no controle da dor realizada pelo método Von Frey após modelo de Lesão do Nervo Espinhal (LNE) para dor neuropática. O primeiro gráfico descreve a utilização da morfina comparada ao controle em cada animal representado pela avaliação da pata contralateral, após três medições em cada uma das patas, de onde foi retirada a média (figura 30). O segundo gráfico refere-se à avaliação da amostra de flavonoide (figura 31) após realização do modelo LNE. Novamente o controle refere-se à pata contralateral àquela ao lado em que foi realizado o modelo de cada animal.

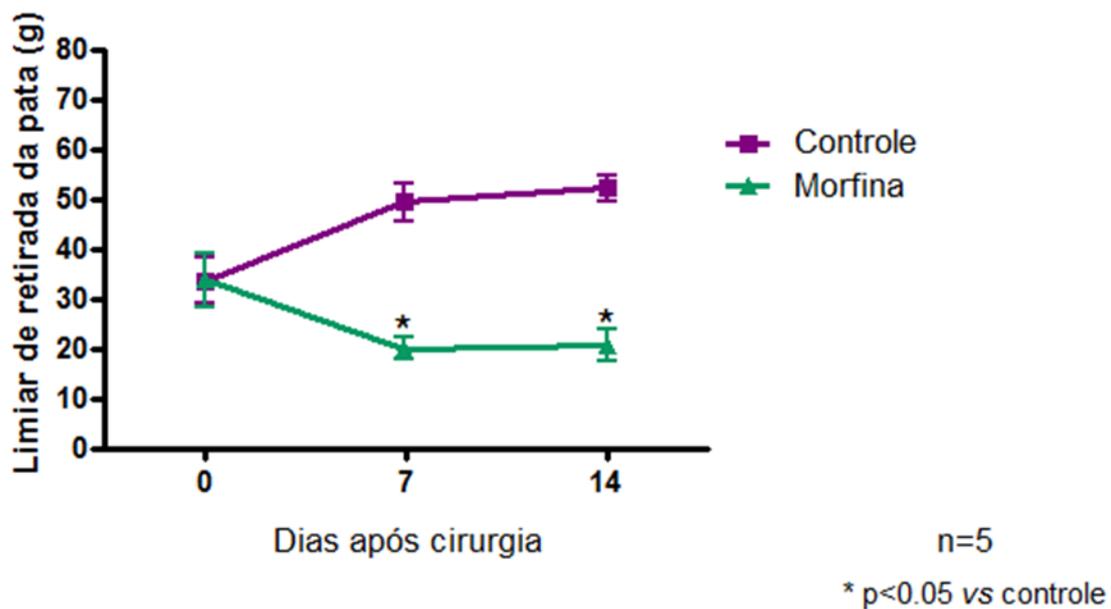


Figura 30: Gráfico descrevendo a estatística de comparação entre o controle e a morfina para o controle da dor neuropática, no dia de realização do modelo LNE, sete dias após, quando iniciou-se o tratamento, e quatorze dias após.

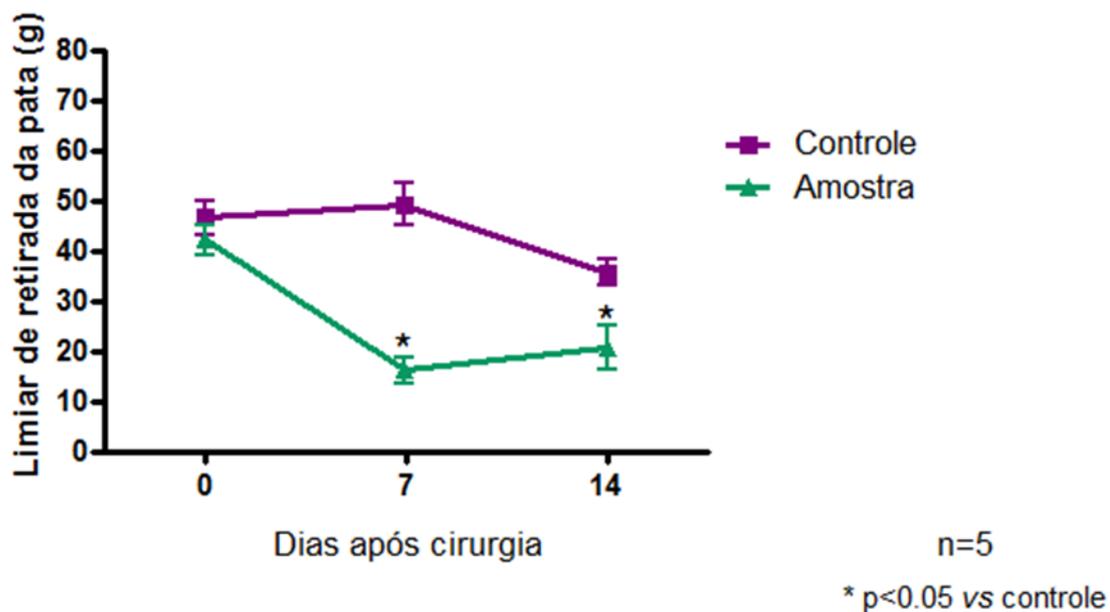


Figura 31: Gráfico descrevendo a estatística de comparação entre o controle e a amostra para o controle da dor neuropática, no dia de realização do modelo LNE, sete dias após, quando iniciou-se o tratamento, e quatorze dias após.

Avaliando-se o gráfico da figura 28, percebe-se que sete dias após a realização do modelo ICC houve diminuição do limiar para dor na pata referente ao nervo operado, o que demonstra efetividade na instalação da dor neuropática. Após estabelecida e confirmada a dor neuropática, iniciou-se o tratamento com a morfina, definida como padrão ouro no controle da dor e que servirá de comparação com o tratamento com a amostra, o que perdurou por mais sete dias. Ao final deste período foi realizada nova avaliação. Neste momento percebe-se que houve manutenção do limiar para a dor após o tratamento com morfina, o que confirma sua efetividade no controle da dor, impedindo a piora no quadro de diminuição do limiar. Percebe-se também que na pata que serve de controle dentro do experimento, ou seja, a contralateral ao nervo injuriado, num primeiro momento houve aumento do limiar para a dor, durante o período dos sete dias de estabelecimento da dor neuropática. Explicamos isto como um processo compensatório, visto que conforme o limiar para a dor vai diminuindo no membro operado, o mesmo vai aumentando naquele em que não houve a ligadura. Quando o tratamento com a morfina parece controlar a dor neuropática, o aumento do limiar para dor na pata contralateral também se mantém constante, confirmando mais uma vez o mecanismo compensatório.

O gráfico da figura 29 demonstra a realização do modelo ICC e o tratamento com a amostra de flavonoide. Mais uma vez a pata contralateral àquela do membro em que está o nervo ciático ligado serve de controle para cada um dos animais avaliados. Novamente houve diminuição do limiar para dor na pata em que foi realizado o modelo ICC nos sete primeiros dias, confirmando o estabelecimento da dor neuropática. No entanto, após o início do tratamento houve aumento gradativo deste limiar nos sete dias posteriores de tratamento, igualando-se ao final com o limiar do grupo controle, sem haver diferença estatística entre os dois grupos. Este resultado demonstra um efeito da substância superior ao da morfina no controle da dor neuropática periférica causada pelo modelo ICC.

O gráfico da figura 30 refere-se ao modelo de Lesão do Nervo Espinhal (LNE) e ao tratamento do mesmo com a morfina. O comportamento deste grupo é bem semelhante àquele observado no modelo ICC, onde há diminuição do limiar para dor na pata lateral ao nervo injuriado nos sete

primeiros dias e aumento no limiar para dor na pata contralateral, demonstrando um mecanismo compensatório. Nas duas patas, após o início do tratamento, houve manutenção do limiar para dor, demonstrando efetividade da morfina no controle da dor neuropática e confirmando o mecanismo compensatório.

Já a figura 31 traduz o grupo em que foi realizado o modelo LNE e tratado com a amostra do flavonoide. Nos primeiros sete dias o comportamento do grupo é bem semelhante ao grupo anterior, havendo diminuição do limiar para dor na pata lateral ao LNE e aumento compensatório da dor na pata contralateral. No entanto, enquanto no grupo da morfina a estabilização no limiar para dor após o tratamento, no grupo da amostra o limiar para a dor volta a subir, demonstrando maior efetividade no controle da dor. Além disso, na pata controle volta a haver uma diminuição do limiar para a dor, confirmando mais uma vez o mecanismo compensatório.

A necropsia realizada após a eutanásia não demonstrou nenhuma alteração macroscópica, nem na região peritoneal, onde foram administradas as substâncias, nem na região cirúrgica do modelo experimental.

]

## 7. DISCUSSÃO

A utilização da dose de  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  para a avaliação do controle da dor justifica-se por ser o início da curva dose-efeito. Esta curva é um delineamento farmacológico para definição da dose a ser utilizada. Busca-se a menor dose capaz de produzir um efeito, ou seja, no caso desta amostra, a menor dose em que os receptores se ligam suficientemente à amostra para causar analgesia sem que haja alteração hemodinâmica significativa.

A diferença estatística apresentada na pressão entre o início da mensuração e a administração do DMSO sozinho ou diluindo a amostra justifica-se pelo efeito hipotensor do DMSO em função da liberação da histamina conforme descrito por Santis e Prata em 2009. Desta forma, deduz-se que não há efeito hipotensor causado pela amostra em nenhuma das doses avaliadas. O dimetilsulfóxido (DMSO) é um solvente amplamente utilizado para diluição de medicamentos hidro e lipossolúveis e como preservante celular, além de ser empregado como medicamento para redução da pressão intracraniana e de lesões do sistema nervoso central, dentre outras aplicações (DEL MASTRO et al., 2001; JACOB et al., 2009). O DMSO é um composto higroscópico, polar, incolor e inodoro, usado pela indústria como solvente. Essa é uma substância de baixo peso molecular, composta por um grupo sulfóxido, que é hidrofílico, e dois grupos metila que são hidrofóbicos. Sua meia vida é de aproximadamente 20 horas. (CRIVELLENTI et al., 2013). O DMSO pode induzir a liberação de histamina, o que explicaria a hipotensão e as reações anafiláticas associadas a sua infusão. (SANTIS; PRATA 2009). As propriedades farmacológicas do DMSO incluem ação carreadora e potencializadora de outros fármacos, anti-inflamatória, vasodilatadora (STONE, 1993), antioxidante, analgésica, diurética, imunomoduladora, miorelaxante, antimicrobiana e citoprotetora (DEL MASTRO et al., 2001; JACOB et al., 2009). Independentemente da via de administração, a maior parte do produto é excretada por via urinária como dimetilsulfóxido inalterado e, em menor quantidade, sob a forma de dimetilsulfona, além do dimetilsulfato que é excretado por via respiratória. Quando indicado e sob dosagem correta, o DMSO aparentemente não resulta em efeitos adversos relevantes (BRAYTON, 1986; CRIVELLENTI et al., 2013).

A dose de 25 mg.kg<sup>-1</sup> causou óbito de 2/5 dos animais, além de descrever um gráfico de pressão arterial com visível demora no retorno da hipotensão após a administração da amostra em relação à administração de DMSO. No entanto, não houve diferença estatística significativa para corroborar esta análise. Já na dose de 30 mg.kg<sup>-1</sup> não houve óbito e o traçado do retorno da pressão após a administração da amostra foi mais sutil. No entanto, estatisticamente não houve novamente diferença entre a administração da amostra e do DMSO, atribuindo-se mais uma vez somente ao DMSO o efeito hipotensor causado.

Lilimand et al.(2014), já havia demonstrado um efeito benéfico dos flavonoides no que diz respeito à melhora da função vascular em função do controle da rigidez arterial, demonstrando, um efeito contrário em um dos mecanismos que levam ao aumento da pressão arterial. Já Rakotomalala (2013) determinou que alguns flavonoides são capazes de produzir relaxamento do endotélio vascular através da estimulação da produção de óxido nítrico, caracterizando mais uma vez o potencial antihipertensivo dos flavonoides. No entanto, a categoria de flavonoide por nos administrada não confirmou este efeito, talvez pelo tipo de flavonoide ou pela dose utilizada, já que comprovou-se que o efeito de hipotensão arterial observada devia-se somente ao DMSO.

A diferença de resultados entre a dose de 25 e 30 mg.kg<sup>-1</sup>, onde a dose menor causou óbito e a de 30 mg.kg<sup>-1</sup> não causou, sugere um comportamento bifásico do flavonoide, já citado por Basting (2014). Podemos também especular sobre este comportamento bifásico no que diz respeito ao controle da pressão arterial.

No que diz respeito à analgesia, como já foi descrito, iniciamos os testes com a dose de 10 mg.kg<sup>-1</sup>. Esta dose foi avaliada nos dois modelos experimentais realizados: Injúria de Constricção Crônica (ICC) e Lesão do Nervo Espinhal (LNE). O primeiro modelo visa avaliar uma dor neuropática de caráter mais periférico, visto que lesiona a parte sensitiva do nervo ciático, enquanto o modelo de LNE mimetiza melhor uma dor periférica, porém mais próxima, devido à injúria ser realizada próxima a saída da medula, conforme descrito por Xie em 1998.

Os resultados apontam para um controle da dor neuropática causada, tanto pelo modelo ICC quanto pelo modelo LNE, maior com a amostra de flavonoide do que com a morfina. No entanto, a diferença entre os dois modelos aponta um maior efeito no modelo ICC. Este fato pode ser explicado por ser este um modelo de dor neuropática periférica, causando menor injúria que o modelo LNE, que visa desenvolver uma dor neuropática central. O mecanismo de ação envolvido nesse controle não foi definido no presente trabalho, no entanto Bahmani (2014) descreve a ação de alguns flavonoides analgésicos em vários mecanismos de ação, como a diminuição do óxido nítrico, um dos mediadores da hiperalgesia, na síntese de prostaglandinas, na interferência no sistema opioide e adrenergico e na inibição dos canais de sódio, inibindo a liberação de neurotransmissores no corno dorsal da medula espinhal. Dessa forma confirma-se a ação dos flavonoides no controle da dor neuropática, independente da injúria ter sido mais próxima ou distal do sistema nervoso central, de acordo com os resultados obtidos em nossa experimentação. O tipo de flavonoide envolvido pode interferir no tipo de controle mais eficiente, de dor neuropática.

Resultados obtidos concordam com Venkata (2014), concluindo o efeito de um flavonoide no controle da dor neuropática induzida pelo modelo experimental de injúria de constrição crônica semelhante à pregabalina.

## **8. CONCLUSÃO**

Após o término dos experimentos e análise dos resultados, pudemos concluir que os modelos experimentais para avaliação de dor neuropática ICC e LNE são eficientes para desenvolver esta qualidade de dor.

A morfina foi efetiva na diminuição ou estabilização do limiar de dor neuropática, sendo confirmada como controle do experimento e padrão ouro no controle da dor.

A amostra de flavonoide cedida é eficaz no controle da dor neuropática desenvolvida a partir de modelos experimentais, sendo mais eficiente no modelo de Injúria por Constrição Crônica (ICC), do que no modelo de Lesão do Nervo Espinhal (LNE).

## **9. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O trabalho realizado promoveu o treinamento de técnicas de avaliação da dor neuropática dentro do laboratório, abrindo espaço para o desenvolvimento de diversos outros trabalhos nessa linha de pesquisa.

Além disso, a amostra analisada mostrou-se como um caminho para o desenvolvimento de um novo analgésico, sobretudo no controle da dor neuropática, necessitando para tal de novos estudos.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEBOYE, P. T.; BETTIGA, M.; OLSSON L. The chemical nature of phenolic compounds determines their toxicity and induces distinct physiological responses in *Saccharomyces cerevisiae* in lignocellulose hydrolysates. **AMB Express**, v. 4, p. 46, 2014

ANDERSEN, M. L.; D'ALMEIDA, V.; KO, G. M.; KAWAKAMI, R.; MARTINS, J. F.; MAGALHÃES, L. E.; TUFIK, S. **Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação**. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, 2004. 167p.

ANDRADE, S.F. Manual de terapêutica veterinária. 3.ed. Roca: São Paulo, 2006.

BAHMANI, M; SHIRZAD, H.; MAJLES, M.; SHAHINFARD, N.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. A review study on analgesic applications of Iranian medicinal plants Asian Pacific. **Journal of Tropical Medicine Asian**, v. 7, s. 1, 2014

BARON, R.; BINDER, A.; WASNER, G. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. **The Lancet Neurology**, v.9, p.807-819, 2010.

BASIC-KES, V.; ZAVOREO, I.; BOSNAR-PURETIC, M.; IVANKOVIC, M.; BITUNJAC, M.; GOVORI, V.; DEMARIN, V. Neuropathic Pain. **Acta Clinica Croatica**, v.48, p. 359-365, 2009.

BASTING, R.; NISHIJIMA, C.; LOPES, J.; SANTOS, R. C.; LUCENAPÉRICICO, L.; STEFANLAUFER, B.; COSTA, M.; SANTOS, L.; ROCHA, L. R. M.; VILEGAS, W.; SANTOS, A. R. S.; SANTOS, C.; HIRUMA-LIMA, C. Antinociceptive, anti-inflammatory and gastroprotective effects of a hydroalcoholic extract from the leaves of *Eugenia punicifolia* DC in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**. V.157, p. 257–267, 2014.

BENNET, G. J.; CHUNG, J. M.; HONORE, M.; SELTZER, Z. Models of Neuropathic Pain in the Rat. **Current Protocols in Pharmacology**, v. 5, p. 32, 2003.

BENNET, G. J.; XIE, Y. K. A peripheral mononeuropathy in the rat produced disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, v. 3, p. 87-107, 1988.

BOGDUK, N.; MERSKEY, H. **Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms**. Seattle: IASP press, 1994. 222p.

BOURQUIN A.F.; SU" VEGES M.; PERTIN M.. Assessment and analysis of mechanical allodynia-like behavior induced by spared nerve injury (SNI) in the mouse. **Pain**, 2006.

BRAYTON, C.F. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. **Cornell Veterinary**. v.76-90, 1986.

CARLTON S. M., DOUGHERTY P. M., POVER C. M., COGGESHALL R. E. Neuroma formation and numbers of axons in a rat model of experimental peripheral neuropathy. **Neurosci. Lett.** v.131, p. 88–92, 1999.

CHORILLI, M., MICHELIN, D.C. e SALGADO, H.R.N. Animais de laboratório: o camundongo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, p. 11-23, 2007.

CHUNG, J. M.; KIM, H. K.; CHUNG, K. Segmental spinal nerve ligation model of neuropathic pain. **Methods in molecular medicine**, v. 99, p. 35-45, 2004.

CLAUSE, B. T. The Wistar Institute Archives: rats (not mice) and history. **Mendel NewsI**, v. 7, p. 2-7, 1998.

CRIVELLENTI, L. Z.; CRIVELLENTI, S. B.; CARVALHO, M. B. Toxicidade do dimetilsulfóxido em cães hígidos e doentes renais crônicos. **Ciência Rural**, v. 43, p. 1831-1837, 2013.

DAY, M. J.. Basic Immunology In: Clinical Immunology of the Dog and Cat, 2th ed. London: **Manson Publishing**, 2008, p. 11-60.

DECOSTERD I.; WOOLF C.J. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. **Pain**, 2000.

DE VRY J., KUHL E., FRANKEN-KUNKEL P., ECKEL G. .Pharmacological characterization of the chronic constriction injury model of neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology** v.49, p. 137–148, 2004.

DEL MASTRO, L.; VENTURINI, M.; VISCOLI, C.; BERGAGLIO, M.; SIGNORINI, A.; BIGHIN, C.; BERTELLI, G.; SEMINO, C.; PIETRA, G.; BERTOGLIO, S.; SERTOLI, M.R.; LAMBIASE, A.; ROSSO, R. Intensified chemotherapy supported by DMSO-free peripheral blood progenitor cells in breast cancer patients. **Annals of Oncology**, 2001.

DOWDALL T., ROBINSON I., MEERT T.F. Comparison of five different rat models of peripheral nerve injury. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v.80, p. 93–108, 2005.

DUNNING, D., HALLING, K. B., EHRHART, N. Rehabilitation of medical and acute care patients. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, V. 35, p. 1411-1426, 2005.

FAGUNDES, D.J.; TAHA, M.O. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.1, p. 59-65, 2004.

FERREYRA M. L. F.; RIUS, S. P.; CASATI, P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions and biotechnological applications. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, p. 222, 2012.

GABAY E., TAL M. Pain behavior and nerve electrophysiology in the CCI model of neuropathic pain. **Pain**. v.110, p. 354–360, 2004.

GOREN, A.; GROSS, H. J.; FUJII, R. K.; PANDEY A.; MOULD-QUEVEDO, J. Prevalence of pain awareness, treatment, and associated health outcomes across different conditions in Brazil. **Revista da dor**, v.13, 2012.

GUAY, D.R. Oxcarbazepine, topiramate, zonisamide, and levetiracetam: potential use in neuropathic pain. **American Journal of Geriatric Pharmacotherapy**, v.1, p.18-37, 2003.

GUEDES, R. **Efeito da secção do nervo ciático, como modelo de dor neuropática, sobre marcadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes na medula espinal de ratos.** Rio Grande do Sul: Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007. 102p.

GURNEY, M. A. Pharmacological options for intra-operative and early postoperative analgesia: an update. **Journal of Small Animal Practice**, v. 53, p. 377-386, 2012.

HAANPÄÄ, M.; ATTAL, N.; BACKONJA, M.; BARON, R.; BENNETT, M.; BOUHASSIRA, D.; CRUCCU, G.; HANSSON, P.; HAYTHORNTHWAITE, J.A.; IANNETTI, G.D.; JENSEN, T.S.; KAUPPILA, T.; NURMIKKO, T.J.; RICE, A.S.; ROWBOTHAM, M.; SERRA, J.; SOMMER, C.; SMITH, B.H.; TREEDE, R.D. NeuPSIG guidelines on neuropathic pain assessment. **Pain**, v.1, p.14-27, 2011.

HARGREAVES, K.; DUBNER, R.; BROWN, F.; FLORES, C.; JORIS, J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. **Pain**, v.1, p.77-88, 1988.

HELLEBREKERS, L. **Dor em animais**. São Paulo: Ed. Manole Ltda., 172 p., 2002.

HOWARD, S. S. Variations in Opioid Responsiveness. **Pain Physician**, v. 11, p. 237-248, 2008.

JACOB, S.W.; TORRE, J.C. Pharmacology of dimethyl sulfoxide in cardiac and CNS damage. **Pharmacological Reports**, v.61, p.225-235, 2009.

JAGGI, A. S.; VIVEK, J.; SINGH, N. Animal models of neuropathic pain. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 25, p. 1-28, 2009.

JENSEN, K.; ANDERSEN, H.O.; OLESEN, J.; LINDBLOM, U. Pressure-pain threshold in human temporal region. Evaluation of a new pressure algometer. **Pain**, p. 313-323, 1986.

JEONG, Y.; HOLDEN, J. E. Commonly used preclinical models of pain. **West J Nurs Res**, v.30, p. 350-364, 2008.

KANDEL, E.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M. **Principles of Neural Science**. New York: Ed. McGraw-Hill, 2000.

KHODDAMI, A.; WILKES, M. A.; ROBERTS, T. H. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. **Molecules**, v.18, p. 2328-2375, 2013.

KIM, S. H.; CHUNG, J.M. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. **Pain**, v.50, p. 355-363, 1992.

KIM K.J.; YOON Y.W.; CHUNG J.M.. Comparison of three rodent neuropathic pain models. **Exp. Brain Res**, 1997.

KLAUMANN, P.; WOUK F.; SILLAS, T. Patofisiologia da dor. **Archives of Veterinary Science**, v.13, p.1-12, 2008.

KRAYCHETE, D.; GOZZANI, J.; KRAYCHETE, A. Dor neuropática - aspectos neuroquímicos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.58, p.5, 2008.

LILAMAND, M.; KELAIDITI, E.; GUYONNET, S.; ANTONELLI, I. R.; RAYNAUD-SIMON, A.; VELLAS, B.; CESARI, M. Flavonoids and arterial stiffness: Promising perspectives. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**. V. 24, p. 698 – 704, 2014.

LINDIA J.A., KOHLER M.G., MARTIN W.J., ABBADIE C.. Relationship between sodium channel NaV1.3 expression and neuropathic pain behavior in rats. **Pain**, 2005.

LIMA, M. G.; BARROS M. B. A.; CÉSAR, C. L. G.; GOLDBAUM, M.; CARANDINA, L.; CICONELLI, R. M. Impact of chronic disease on quality of life among the elderly in the state of São Paulo. **Rev Panam Salud Publica**, v.25, 2009.

LOPES, R. M.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S. Farmacologia de flavonoides no controle hiperlipidêmico em animais experimentais. **Biociência**, v.17, p. 18-22, 2000.

LORENZ, M. D., COATES, J.R., KENT, M. Pain. In: Handbook of veterinary neurology. 5th ed. Missouri: Elsevier Saunders, 2011.

LUNA, S. P. L.. Dor, ciência e bem-estar em animais. **Ciência veterinária nos trópicos**, 2008.

MADDISON, J. E.; PAGE, S. W.; CHURCH, D. B. **Farmacologia clínica de pequenos animais**. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2010.

MAGRINELLI, F.; ZANETTE, G.; TAMBURIN, S. Neuropathic pain: diagnosis and treatment. **Practical Neurology**, v.1, 2013.

MARÇO, P.H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, 2008.

MARTÍNEZ-FLÓREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J. M.; Tuñón, M. J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrición Hospitalaria**, v 17, p. 271-278, 2002.

MCMORLAND,G.; SUTER, E.; CASHA, S.; PLESSIS,S.J.; HURLBERT,R.J. Manipulation or Microdisectomy for Sciatica? A Prospective Randomized Clinical Study. **Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics**, v.33, p.576-584, 2010.

MEIJ, B. P., KOOISTRA, H.S., RIJNBERK, A. Hypothalamus-pituitary system. In: Clinical Endocrinology of dog and Cats. 2th ed. Hannover: Schlutersche, 2010, p.13-54.

MOGIL, J. Animal models of pain. **Neuroscience**, v.10, p. 283, 2009.

MOLLER, K.A.; JOHANSSON, B.; BERGE, O.G. Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer. **Journal of Neuroscience Methods**, p. 41-47, 1998.

NAKAMURA S., ATSUTA Y. The effects of experimental neurolysis on ectopic firing in a rat chronic constriction nerve injury model. **Journal of Hand Surgery**. v.31, p. 35–39, 2006.

PEIXOTO, A. L. Coleções botânicas: documentação da biodiversidade brasileira. **Ciência Cultural**, v. 55, 2003.

PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, v. 18, p. 1995-2018, 1998.

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

PORRECA, F.; LAI, J.; BIAN, D.; WEGERT, S.; OSSIPOV, M.H.; EGLIN, R.M.; KASSOTAKIS, L.; NOVAKOVIC, S.; RABERT, D.K.; SANGAMESWARAN, L.; HUNTER, J.C. A comparison of the potential role of the tetrodotoxin-insensitive sodium channels, PN3ySNS and NaNySNS2, in rat models of chronic pain. **National Academy of Sciences**, v. 96, p. 7640–7644, 1999.

PORTNOI, A. G. **Dor, stress e coping: grupos operativos em doentes com síndrome da fibromialgia**. 1999. 292p. Tese (Doutorado em Psicologia) – Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

PUREZA, D. Y. **Modulação autonômica cardíaca em repouso e durante o exercício em ratos diabéticos: avaliações hemodinâmicas e morfométricas de gânglios parassimpáticos cardíacos**. São Paulo: Universidade de São Judas Tadeu, 2006.

RAKOTOMALALA, C.; AGARD, P.; TONNERRE, A.; TESSE, S.; DERBRÉ, S.; MICHALET, J.; HAMZAOUI, M.; RIO, C.; CARIO-TOUMANIANTZ, P.; RICHOMME, B.; CHARREAU, G.; LOIRAND P.; PACAUD. Extract from *Mimosa pigra* attenuates chronic experimental pulmonary hypertension. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 148, p. 106–116, 2013.

RAMIREZ, M. R.; GUTERRES, L.; DICKEL, O. E.; CASTRO, M.R.; HENRIQUES, A. T.; SOUZA, M. M.; BARROS, D. M. Preliminary Studies on the Antinociceptive Activity of *Vaccinium ashei* Berry in Experimental Animal Models. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, 2010.

REY, R. The history of pain. **N Engl J Med**, v. 334, p. 408-409, 1995.

RICHEIMER, S.H.; BAJWA, Z.H.; KACHRAMANN, S,S,; RANSIL, B.J.; WARFIELD, C.A.. Utilization patterns of tricyclic antidepressants in a multidisciplinary pain clinic: a survey. **Clin J Pain**, 1997.

SAGHAEI, E.; ZANJANI, T. M.; SABETKASAEI, M. NASERI, K. Enhancement of Antinociception by Co-administrations of Nefopam, Morphine, and Nimesulide in a Rat Model of Neuropathic Pain, *Korean J Pain*, **v.25, p. 7-15, 2012.**

SANTIS, G. C.; PRATA, K. L. Criopreservação de células-progenitoras hematopoiéticas. **Medicina**, v. 42, p. 36-47, 2009.

SCHAIBLE, H. G. Pathophysiology of pain. **Orthopade**, v. 36, p. 8-16, 2006.

SELTZER, Z.; DUBNER R.; SHIR Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. **Pain**, 1990.

SIQUEIRA, R. Lesões nervosas periféricas: uma revisão. **Revista de Neurociências**, v.15, p.226-233, 2007.

SKOLNIK, N.; MENICHELLO, G. Opioid Therapy in Chronic Noncancer Pain. **Rheumatology News**, 2009.

STONE, R.W. Clinical updates on the use of dimethyl silfoxide. **Canine Pract.**, v.18, p.16-19, 1993.

SUDO, R. T., CALASANS-MAIA, J. A., GALDINO, S. L., LIMA, M. C. A., ZAPATA-SUDO G., HERNANDES, M. Z., PITTA, I. R. Interaction of Morphine with a New  $\alpha_2$ -Adrenoceptor Agonist in Mice. **The Journal of Pain**, v.1, p. 71-78, 2009.

TEIXEIRA J., YENG L. T., KAZIYAMA H. H. S., RAMOS C. A. Fisiopatologia da dor músculo-esquelética. **Revista de Medicina de Ribeirão Preto**. p. 63-77, 2001.

TUFIK, S. Princípios Éticos e Práticos do Uso de Animais de Experimentação. São Paulo: **Unifesp – Universidade Federal de São Paulo**, 2004

VAUGHAN, C. W.; INGRAM, S. L.; CONNOR, M. A.; CHRISTIE, M. J. How opioids inhibit GABA-mediated neurotransmission. **Nature**, v. 390, p. 611-614, 1997.

VENKATA, R. K.; THIAGARAJA, N.; PALANICHAMY SHANMUGA, M., UMA, M.; KRISHNA, N.; ARUNACHALAM, M. Ameliorative potential of *Vernonia cinerea* on chronic constriction injury of sciatic nerve induced neuropathic pain in rats. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v.86, p. 1435-1449, 2014.

VISCUSI, E.R.; GOLDSTEIN, S.; WITKOWSKI, T.; ANDONAKAKIS, A.; JAN, R.; GABRIEL, K.; DU, W.; TECHNER, L.; WALLIN, B. Alvimopan, a peripherally acting mu-opioid receptor antagonist, compared with placebo in postoperative ileus after major abdominal surgery. **Surgical Endoscopy**, v.20, p. 64-70, 2005.

XIA, J.; GAO, J.; INAGAKI, Y.; KOKUDO, N.; NAKATA, M; TANG W. Flavonoids as potential anti-hepatocellular carcinoma agents: Recent approaches using HepG2 cell line. **Drug Discoveries & Therapeutics**, v.7, p. 1-8, 2013.