

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR.

AMANDA SODRÉ MOTA

Poderia um óleo atuar como analgésico opioide?
OLÉO DE *Plukenetia polyadenia*: ELUCIDAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO.

Belém
(2016)
Amanda Sodré Mota

Poderia um óleo atuar como analgésico opiáceo?
OLÉO DE *Plukenetia polyadenia*: ELUCIDAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, da Universidade Federal do Pará, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Área de concentração: Neurociência.

Orientador(a): Dra Gilmara de Nazareth Tavares Bastos.

Coorientador(a): Dra Cristiane do Socorro Ferraz Maia.

BELÉM

(2016)

Amanda Sodré Mota

Poderia um óleo atuar como analgésico opiáceo?
OLÉO DE *Plukenetia polyadenia*: ELUCIDAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO.

Belém, 05 de Setembro de 2016

Orientador: Prof. Dra. Gilmara de Nazareth Tavares Bastos, UFPA

Coorientador: Prof. Dra. Cristiane do Socorro Ferraz Maia, UFPA

Banca Examinadora:

Prof. Dr Eneas de Andrade Fontes Junior, UFPA

Prof. Dra. Elizabeth Sumi Yamada, UFPA

Coordenador do PPNBC:

Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva

BELÉM
(2016)

Dedico este trabalho aos meus pais, em especial pela dedicação e apoio em todos os momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

É difícil traduzir em palavras os sentimentos que mais me preenchem. Me parece fria e distante essa impressão vazia de letras em papel. Parece injusto ter apenas algumas páginas para descrever uma sensação indescritível e reconhecer pessoas que merecem bem mais do que alguns parágrafos.

Hoje eu acordei disposta a escrever o agradecimento perfeito e percebi que ele não pode ser traduzido em nada que não seja sentimento. E sentimento se retribui com sentimento. Portanto, a vocês que me apoiaram em todos os momentos da minha vida, principalmente nesta que foi uma etapa longa e difícil, a minha eterna gratidão.

Aos meus pais: Eu caminhei no doce balanço que vocês me ensinaram a caminhar. Passando por um ano de ausência durante a graduação, por esses dois anos de aprendizado na pós graduação, por uma vida inteira de amor, respeito e carinho. E de repente, a música que vocês me ninaram quando eu era pequena, nunca fez tanto sentido. Eu passei minha vida inteira no doce balanço a caminho de um futuro brilhante que vocês me ajudaram a obter. Obrigado por serem meu mar, meu caminho, minha força, meus pais.

À família: Eu não seria nada sem a força motriz que me impulsiona para a vitória. Vocês estiveram presentes nas minhas quedas e me fizeram ver que o mundo não se acaba em um desafio. Ao meu irmão Renan, minha cunhada Adrielle, meus avós, meus tios, tias, primos e primas, o meu muito obrigada.

Ao meu amor: A você, meu amor, que me apresentou um sentimento novo e me apoiou em cada decisão tomada. Que se dedicou a mim e teve a paciência de suportar cada ausência minha. O meu agradecimento de todo o meu coração.

Aos meus amigos: Vocês que aceitaram a minha falta com compreensão. Que me motivaram a continuar apesar de todas as minhas dificuldades. Que me fizeram entender que amizade vai muito além de estar presente. É , na verdade, se fazer presente quando necessário. Um agradecimento especial para Bárbara, Ana Carolina, Rossana, Jéssica, Angélica, Jonathas, meninos do Alta cúpula, meninas do MPDC e família biomed 2010.

Aos meus colegas de laboratório: O companheirismo de vocês foi essencial para que esse trabalho fosse feito. Muito obrigado a família LNI pelo apoio e ajuda nas horas que mais precisei. Em especial quero agradecer a Aline pelo tempo em que se dispôs a passar comigo me ajudando nos experimentos. Dayane, Gustavo e Beth pelos vários momentos inesquecíveis dentro e fora do LNI. Agradeço imensamente por terem feito do meu trabalho algo tão prazeroso. Eu devo a vocês todas as minhas risadas, todas as lágrimas enxugadas e toda a vitória conquistada. Muito Obrigada!

Aos meus colegas de mestrado: Aqueles que estavam sempre no mesmo barco que eu. Obrigada por dividirem suas aflições, suas conquistas e seus momentos de descontração comigo. Obrigada a todos os membros do grupo Desunidos do PNBC em especial as meninas do Sisi que me deram uma oportunidade única: a de seguir o meu sonho de ser docente.

Às minhas orientadoras. Às grandes responsáveis pelo meu crescimento e amadurecimento profissional. Obrigada pela oportunidade de conviver com vocês e aprender com as grandes pesquisadoras, professoras e amigas que vocês são. A Cristiane Maia por ter aceitado o desafio de me coorientar no final do meu mestrado e a minha grande inspiração professora Gilmara Bastos, que mais do que orientadora virou minha mãe, pai, amiga e conselheira. Todos os nossos desafios foram materializados e hoje se tornam nossa maior vitória. Muito obrigado por todos os anos de orientação e confiança.

Aos meus colaboradores: Aos colegas do laboratório da Inflamação e do Comportamento, pelo suporte na execução de alguns experimentos, ao Prof^o Dr. José Guilherme Maia e a Prof.Dra Joyce Kelly da Silva do laboratório de Engenharia de produtos naturais, por me fornecerem o Pp-óleo.

Às minhas médicas: Aquelas que cuidaram da minha mente e do meu corpo. Que estiveram presentes quando eu pensei que não poderia mais. Que me ensinaram a respirar direito, a dominar o pânico até que ele virasse apenas uma lembrança. Que me ajudaram a entender que errar é humano, que perfeição não existe e que nem todo mundo vai gostar da gente do jeito que nós somos. Que me fizeram entender que todo sacrifício vale a pena quando é do seu sonho que estamos falando. Obrigada Dra Sônia Santos e Dra Adriana Lisboa.

Aos órgãos públicos : A CAPES, a Universidade Federal do Pará , ao Instituto de Ciências Biológicas, ao Programa de pós graduação em Neurociência e Biologia Celular pelo suporte financeiro, estrutural e acadêmico.

In Memoriam: Ao zelo em forma de anjo. Aqueles que me guiam com tanto amor e carinho. Aos meus avós maternos que, mesmo no plano espiritual, torceram e foram essenciais para a minha vitória. Obrigada pela infância inesquecível, pelas lições que me fazem hoje a adulta que sou, pelo companheirismo e pela presença constante na minha vida. Sei que vocês estão e estarão para sempre do meu lado. Meu eterno agradecimento e amor: Marieta e Diquinho.

“A dor é o pai, e o amor é a mãe da sabedoria.”

(Ludwig Börne)

RESUMO

O óleo de semente de *Pukenetia polyadenia* (Pp-óleo) é usado pelos povos amazônicos para artrite e reumatismo, espalhando-o nos braços e pernas. Baseando-se no conhecimento etnofarmacológico, procuramos investigar o mecanismo de ação do Pp-óleo. Materiais e métodos: O Pp-óleo foi obtido por prensagem e avaliado em sua atividade antinociceptiva em modelos de nocicepção (contorção abdominal induzida por ácido acético, placa quente e teste de formalina) em camundongos. A elucidação do mecanismo de ação foi feita a partir do modelo de contorção por ácido acético e adição de antagonistas do sistema opioide juntamente com drogas não seletivas para COX, nesse caso o AAS, e drogas seletivas para COX-2 sendo assim, utilizado o Celecoxibe. Também foram utilizados ensaios neurocomportamentais responsáveis pela avaliação de possíveis danos ao sistema locomotor, os quais foram escolhidos o modelo de campo aberto, rotarod e pole teste.

Resultados: Pp-óleo demonstrou um efeito antinociceptivo dependente de dose significativamente relevante ($p < 0,05$) na estimulação química provocada pelo ácido acético no teste de contorção abdominal. No entanto, o resultado do teste da placa quente e da primeira fase da formalina não foram significativos ($p > 0,05$), sugerindo que Pp-óleo tem uma atividade analgésica, a qual é de origem periférica putativo. Para validar essa afirmação foram realizados testes neurocomportamentais de avaliação do sistema central. Os quais os resultados mostram-se não significativos nos três testes aplicados confirmando que Pp-óleo não age na via central. Além disso, nos testes de elucidação do mecanismo de ação, a antinocicepção foi revertida pela naloxona.

Conclusão: Pp-óleo mostrou ter propriedades analgésicas. Além disso, os resultados sugerem que receptores opioides estejam envolvidos na sua ação antinociceptiva e que estejam agindo por uma via periférica.

Palavras-chaves: *Plukenetia polyadenia*, Euphorbiaceae, ácido-graxo, ácidos linoleico, a atividade antinociceptiva, toxicidade, neurocomportamento.

ABSTRACT

The seed oil of *Plukenetia polyadenia* (Pp-oil) is used by the Amazon people against arthritis and rheumatism, spreading it in the arms and legs. The fatty acid composition, antinociceptive effect and toxicity of Pp-oil were investigated.

Materials and methods: The Pp-oil was obtained by pressing and its antinociceptive activity was analyzed in models of nociception (acetic acid-induced abdominal writhing, hot plate and formalin tests) in mice and also mechanism of action was determined using acetic acid- induced abdominal writhing, open field, pole test and rotarod.

Results: Pp-oil demonstrated a significant dose dependent antinociceptive effect ($p < 0.05$) in the chemical stimulation and at the second phase of formalin. However, the result from the hot plate test, open field, pole test and rotarod were not significant ($p > 0.05$), suggesting that Pp-oil has an analgesic activity, which is putative of peripheral origin.

In the writhing test, the oil dosed at 25, 50 and 100 mg/kg reduced the abdominal writhes in a significant manner. In the hot plate test, the oil dosed at 200 mg/kg did not induced alterations in the latency time when compared to the control. At the dose of 100 mg/kg it did not show any difference in motor system proving that Pp-oil does not have any influence at central nervous system. In the formalin test, the oil dosed at 50 and 100 mg/kg reduced in a significant manner the second phase of the algic stimulus. Pp-oil at 100mg/kg did not show any alterations in motor system when analyzed with open field, pole test and rotarod ($p > 0.05$), which corroborates with previous results that affirm Pp-oil has no participation in central nervous system. In addition, its antinociception was reversed by naloxone in evaluation of the mechanism of action.

Conclusion: Pp-oil proved to have analgesic properties. Moreover, the results concerning mechanism suggest that opiod receptors are involved in the antinociceptive action of the Pp-oil using a peripheral pathway.

Keywords: *Plukenetia polyadenia*, Euphorbiaceae, fatty oil, linoleic and, antinociceptive activity, toxicity, neurobehavior.

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1. Escalas numéricas e visuais analógicas da dor (CARVALHO ; KOWAC, 2006).	15
Figura 2. "La Columna Rota" - 1944 (SIQUEIRA-BATISTA et al., 2014).	19
Figura 3. Sensibilidade dos receptores para calor e frio, indicando a frequência de atividade da fibra aferente (GUYTON; HALL, 2011).	27
Figura 4. Sementes os seis grupos do gênero de Plukenetia estudados na Amazônia peruana.	33
Figura 5. Efeito do Pp-óleo em modelo de contorção induzida por ác. acético.	39
Figura 6. Teste da placa quente.	40
Figura 7. Teste de formalina: Fase 1 e Fase 2.	41
Figura 8. Mecanismo de ação.	42
Figura 9. Avaliação do sistema motor com modelos neurocomportamentais.	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C.	Antes de Cristo
AAS	Ácido acetilsalicílico
AINEs	Antiinflamatórios não esteroidais
CHO	Colesterol total
COX	Enzima ciclooxigenase
cm	Centímetro
d.C.	Depois de Cristo
DOR	Receptores Delta opióides
et al.	et alii; e outros
Gi	Proteína G inibitória
Gs	Proteína G estimulatória
IASP	International Association for the study of pain
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-8	Interleucina 8
i.p	Intraperitoneal
kg	quilograma
KOR	Receptores Kappa opióides
mg	Miligramma
ml	Mililitros
MOR	Receptores Mu opióides
Nax	Naloxona
NMDA	N-metil-d-aspartato
PGE2	Prostaglandina E2
PGH2	Prostaglandina H2
PGI2	Prostaglandina I2
Pp-óleo	Óleo de <i>Plukenetia Polyadenia</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TRP	Receptores transientes de potencial
TRPA	Receptores transientes de pontecial repetidores da anquirina
TRPA1	Receptores transientes de pontecial repetidores da anquirina 1
TRPM	Receptores transientes de potencial relacionados a melastatina
TRPM8	Receptores transientes de potencial relacionados a melastatina
TRPV	Receptores transientes de potencial valinóide

TRPV1	Receptores transientes de potencial valinóide 1
TRPV2	Receptores transientes de potencial valinóide 2
TRPV4	Receptores transientes de potencial valinóide 4
s.c	Subcutâneo
v.o	Via oral
μ	Mu
κ	Kappa
δ	Delta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1. Dor	15
2.1.1 Dor: Um Aspecto Pessoal	15
2.1.2. Dor: Um aspecto Cultural	16
2.1.3. Dor: Um Aspecto Religioso	16
2.1.4. Dor: Um aspecto artístico	17
2.1.5. Dor: Um aspecto histórico e filosófico.....	19
2.1.6. Dor: Um Aspecto científico.....	22
2.2. CAPÍTULO II : ANTINOCICEPÇÃO	28
2.2.1. ANALGÉSICOS OPIÓIDES	28
2.2.2. DROGAS ANTINFLAMATÓRIAS NÃO ESTEROIDAIAS (AINEs)	29
2.2.3. PLUKENETIA POLYADENIA.....	30
3. OBJETIVO.....	32
3.1 OBJETIVO GERAL:	32
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO:.....	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1. DROGAS E PRODUTOS QUÍMICOS	33
4.2. ANIMAIS	33
4.3. O MATERIAL VEGETAL	33
4.4. ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA.....	33
4.4.1. Contorção induzida por ácido acético em camundongos.....	33
4.4.2. Teste da placa quente em camundongos	34
4.4.3. Teste de formalina	34
4.4.4. Avaliação do mecanismo de ação do Pp-óleo.....	34
4.5 MODELOS DE AVALIAÇÃO DO SISTEMA LOCOMOTOR.....	35
4.5.1 Campo aberto	35
4.5.2 Pole Test.....	35
4.5.3 Rotarod	35
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
5. RESULTADOS.....	37
5.1 CONTORÇÃO INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO EM CAMUNDONGOS.....	37
5.2 TESTE DA PLACA QUENTE EM CAMUNDONGOS.....	37
5.3 TESTE DA FORMALINA	38
5.4 ELUCIDAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO.....	39
6. DISCUSSÃO	42
7. CONCLUSÃO	47
8. REFERÊNCIAS	48
APÊNDICE A – MECANISMO DE AÇÃO.....	58
APÊNDICE B – ARTIGO CIENTÍFICO	64

1. INTRODUÇÃO

A prática que utiliza plantas medicinais para tratamento, prevenção e cura de doenças é antiga e de extrema importância para a caracterização da cultura e tradição de uma determinada população. A evolução da terapêutica se deu pela popularização desses “medicamentos” e pelo progresso da ciência. No entanto, para alguns grupos isolados e de difícil acesso a terapias comerciais, o conhecimento terapêutico tradicional torna-se a única forma de tratamento (MACIEL et al., 2002 ; VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Os ribeirinhos que vivem às margens de rios na Amazônia, são uma população altamente dependente das plantas medicinais, uma vez que, para terem acesso às medicações alopáticas é necessário que se desloquem até as cidades ou que os mesmos sejam levados até a comunidade. Nesse sentido, um dos tratamentos mais utilizados nessa região é o óleo da semente de *Plukenetia Polyadenia*. Esse óleo, rico em ácido graxo, é usado topicamente e espalhado nos membros superiores e inferiores a fim de combater a dor e a inflamação causada por artrite e reumatismos.

Os ácidos graxos são precursores primários de mediadores lipídicos importantes durante o processo inflamatório, como o ácido araquidônico, prostaglandinas, tromboxano e leucotrienos (GRIMBLE; TAPPIA, 1998 ; O'SHEA et al., 2004). Os ácidos graxos de cadeia longa n-3 poli-insaturados têm sido investigados para utilização no tratamento de doenças inflamatórias, tais como artrite reumatoide, psoríase e colite ulcerativa devido aos efeitos anti-inflamatórios presumidos. Embora, os efeitos anti-inflamatórios de n-3 ácidos graxos de cadeia longa foram originalmente atribuída a alterações na produção de prostaglandinas e leucotrienos, outros estudos têm enfatizado a produção reduzida de citocinas, como um mecanismo possível.

Apesar de seu uso frequente pela população, um único estudo de *Plukenetia polyadenia* foi relatado, com a avaliação toxicológica de seu óleo graxo e a determinação de sua composição em ácidos graxos (RIBEIRO, 2005).

Esse conhecimento aliado a dependência da população rural em plantas medicinais, bem como praticantes da medicina tradicional, particularmente em comunidades ribeirinhas da Amazônia, faz com que o óleo de *Plukenetia Polyadenia* seja um interessante produto de pesquisa. Nosso laboratório vem desenvolvendo estudos para elucidar o mecanismo de ação deste óleo com a intenção de confirmar sua utilização etnofarmacológica.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Dor

Descrita em diversas culturas e tida como um sinal universal de existência, a dor permanece envolta em mistérios e superstições. Embora avanços tenham sido significativos, certos aspectos ainda mantêm-se na obscuridade como, por exemplo, sua verdadeira natureza (PERL, 2007).

Derivada do grego antigo, a palavra “Pain” vem de “Poena” e significa penalidade. Já na mitologia, era usada como nome para o espírito romano da punição e pelo Deus grego da vingança. Apesar dos diferentes nomes em cada língua, a atribuição da palavra dor, converge para a lembrança de deuses responsáveis pelo caos e para significados intimamente ligados com as palavras, vingança, desequilíbrio, punição e tortura (KHAN; RAZA; KHAN, 2015).

É importante, porém, lembrar que a dor apresenta perspectivas diferentes diante de interpretações pessoais, culturais, religiosas, artísticas, históricas, filosóficas e científicas (THERNSTROM, 2011).

2.1.1 Dor: Um Aspecto Pessoal

A dor, mesmo sendo universal, diverge de acordo com a experiência vivida por cada indivíduo, tornando-se subjetiva e de necessária atenção quanto a sua mensuração perante a definição de uma conduta terapêutica (SOUSA, 2002; SOUSA et al., 2010).

Diante disso, temos as intensidades da dor que caracterizam as mais diversas escalas de avaliação como a escala verbal, escala visual analógica, escala de copos (WHALEY; WONG, 1987) e escala de faces de dor (Bieri et al, 1990) (Figura 1). Sem contar com outros métodos de avaliação como o questionário de dor McGill (FORTUNATO et al., 2013).



Figura 1. Escalas numéricas e visuais analógicas da dor (CARVALHO ; KOWAC, 2006).

Dessa forma, em uma mesma situação de trauma, pessoas podem relatar intensidades de dor diferentes e esse relato pode contribuir para uma melhor conduta terapêutica por parte da equipe médica (CARVALHO; KOWACS, 2006).

Entende-se, então, que a dor em um aspecto pessoal é uma experiência que não pode ser compartilhada, sendo assim subjetiva.

2.1.2. Dor: Um aspecto Cultural

A relação entre cultura e dor se torna evidente quando falamos de tolerância a dor. Esta vai muito além da definição de limiar da dor, uma vez que o limiar de percepção é semelhante entre os indivíduos. Ela difere de acordo com fatores genéticos, etnia, gênero, experiências anteriores, conhecimento, atitudes, humor, crenças e significado simbólico atribuído. Sendo assim, alguns estímulos insuportáveis para algumas pessoas podem ser perfeitamente suportáveis por outras (PIMENTA; PORTNOI, 1999 ; SARTI, 2001).

Os membros de diferentes culturas acabam assumindo duas posturas quando se trata de dor : A “aceitação da dor” e a “dor esperada”. A primeira é caracterizada pela boa vontade de se aceitar a dor e a segunda pela antecipação de uma dor que não se deve remediar. Um exemplo desses significados é a dor do parto. Em algumas culturas, o parto é somente uma experiência de dor esperada, uma vez que o uso de anestésicos faz com que a mulher não sofra tanto quanto as mulheres de culturas em que o parto é uma experiência de dor esperada e aceita. Essas mulheres não permitem o uso de anestésico, pois culturalmente aprenderam a aceitar essa dor. Esse aprendizado se dá na infância, na convivência com a sociedade e no ambiente familiar (ZBOROWSKI, 1952).

A forma de manifestação da dor também é influenciada pela cultura. É nela que encontramos as definições de “dor pública” e “dor privada” e é a partir dela que decidimos se traduzimos ou não as nossas manifestações de dor privada para pública. Sendo assim, o comportamento da dor de cada um é vivenciado de acordo com a cultura e com a sociedade a que o indivíduo pertence. A exemplo disso, temos algumas culturas em que a manifestação de dor é condenável em certos rituais de virilidade, portanto, neste caso, a dor permanece privada (PEREIRA; ZAGO, 1998).

Em grande parte das culturas, a dor sinaliza fatalidade. Logo, a maneira como o indivíduo aprende a lidar com esse sintoma se torna importante para a adesão e continuação do tratamento (PIMENTA; PORTNOI, 1999).

2.1.3. Dor: Um Aspecto Religioso

Percebe-se a grande intimidade entre dor e religião a partir de seu significado etiológico. Sempre associada a punição de divindades e entidades religiosas, a dor era e continua sendo, para algumas religiões, justificada como punição, provação e algo digno de merecimento. Tendo como objetivo a purificação e salvação da alma. Dentro desses fatores, encontram-se diversas formas de vivenciar, explicar e enfrentar a dor (MICELI, 2002 ; CARQUEJA, 2008). Para expor essas diferenças é importante analisar duas das maiores religiões do mundo: o cristianismo e o hinduísmo.

No cristianismo, a dor é considerada um merecimento, vista como punição para o pecado e, ao mesmo tempo, um lembrete para a humanidade de que vivê-la é uma chance dada por Deus de redenção da alma. Alguns cristãos aceitam dor por lembrar do sofrimento de Cristo enquanto outros se autoflagelam em seu nome (KHAN; RAZA; KHAN, 2015).

Diferentemente do cristianismo, o hinduísmo não vê a dor como punição, mas sim como “Karma”, ou seja, é uma consequência de más ações tanto nessa vida como em vidas passadas. A tradição hinduísta também prega que a forma humana está sujeita a dor pelas leis do universo. No entanto a alma não é afetada pela dor do corpo e isso conforta alguns pacientes, permitindo com que o tratamento continue a ser realizado. A dor não é vista como algo totalmente ruim, pois, na religião hinduísta nada é completamente bom ou completamente ruim e tudo é controlado e dado por Deus (WHITMAN, 2007; KHAN; RAZA; KHAN, 2015).

A religião, independentemente da classificação, é a primeira ou a segunda estratégia para o tratamento de dor, principalmente as recorrentes. Uma pessoa extremamente religiosa optará pela oração ou algum outro tipo de tratamento espiritual para aliviar o sintoma da dor mesmo fazendo, ou não, uso de alguma terapia médica em conjunto (LAGO-RIZZARDI; TEIXEIRA; SIQUEIRA, 2010).

Apesar de alguns tratamentos espirituais auxiliarem no tratamento do paciente (LAGO-RIZZARDI; TEIXEIRA; SIQUEIRA, 2010), existem casos em que a religião influencia de maneira crucial como, por exemplo, os episódios entre as testemunhas de Jeová e as transfusões de sangue (MALLA; SEETHARAM, 2015). Pessoas dessa religião acreditam fortemente na interpretação de passagens bíblicas que proíbem o consumo de sangue e não aceitam a transfusão de nenhum hemocomponente. Mais do que isso, esses religiosos consideram que, o consentimento de transfusão é uma violação grave à seus princípios e que qualquer sangue que tenha sido retirado é considerado impuro e deve ser eliminado. Por essas razões fundamentalmente religiosas, o tratamento desses pacientes é dificultado e em alguns casos podendo evoluir a óbito (TRZCINSKI et al., 2015).

Atualmente existem trabalhos que evidenciam um alívio da dor por meio da religião, inserindo assim, uma abordagem religiosa como um dos tratamentos paliativos complementares para a terapia de pacientes (CARQUEJA, 2008).

2.1.4. Dor: Um aspecto artístico

Assim como existem diversas formas de se encarar a dor, a sua expressão perante a sociedade também é distinta. Esse “desabafo” pode ser encontrado na arte, em pinturas que, através de cores intensas e desenhos bem elaborados, refletem as percepções desse sintoma, em trechos literários, que descrevem com detalhes as sensações sentidas pelo autor, em melodias, capazes de arrepiar e transparecer a tristeza profunda que esse desafio de enfrentar a dor é capaz de proporcionar.

Essas demonstrações artísticas da dor são um meio de expressar, de forma poética e ao mesmo tempo real, a situação em que o autor da obra se encontra perante a dor com o objetivo de passar para a

sociedade sua própria visão sobre esse sintoma. Dessa forma, acaba-se criando um estado de “mimeses artística”, onde imaginamos viver os sentimentos que estão sendo refletidos pela obra, seja ela de estímulo visual e/ou auditivo (SELIGMANN-SILVA, 2003).

Um grande exemplo dessa aliança entre a dor e a arte é vista na obra da famosa pintora mexicana Frida Kahlo.

Magdalena Carmen Frida Kahlo Calderón (1907 – 1954) foi uma grande artista do século XX e suas obras foram marcadas principalmente pela dor nelas representada. A pintora foi acometida de uma dor crônica, derivada de um acidente automobilístico, ainda jovem e conviveu com o sintoma até sua morte. Juntamente com o sofrimento físico, Frida passava por decepções dolorosas em sua vida pessoal, como o desejo de ser mãe e a incapacidade de levar uma gestação até o final, gerando vários abortos; a traição e a separação do marido e o preconceito, muito presente no século XX. Acredita-se que as obras de Frida, sempre retratando suas paixões e sofrimentos, eram uma forma de aguentar os desafios e suportar a dor. Suas telas refletiam imagens, muitas vezes, mórbidas e provocantes para a sociedade, como colunas partidas, sangue, cicatrizes e abortos (SIQUEIRA-BATISTA et al., 2014).

Uma de suas telas mais famosas, a “La columna Rota” é uma verdadeira retratação de sua dor. No quadro ela veste um colete semelhante ao colete de gesso que usava para suportar a dor das lesões e das diversas cirurgias feitas em sua coluna. A coluna vertebral, que fora substituída por uma coluna de edificação, mostra-se rachada, simulando os danos sofridos na mesma. O corpo aberto sugere as várias cirurgias as quais foi submetida. O deserto significando a solidão dolorosa em que ela se encontrava. Os pregos sobre a extensão do corpo, em conjunto com as lágrimas, fazem a combinação e representação perfeita da dor crônica sofrida pela pintora. Frida foi uma das artistas mais conhecidas por encontrar conforto na sua pintura. Evidenciando, assim uma ligação forte entre a dor e a arte (ORSINI et al., 2008 ; SIQUEIRA-BATISTA et al., 2014).



Figura 2. "La Columna Rota" - 1944 (SIQUEIRA-BATISTA et al., 2014).

2.1.5. Dor: Um aspecto histórico e filosófico

A humanidade, durante boa parte de sua existência, associou a dor à religião e não a sintomas e a doenças. Através da história, respostas foram encontradas e muitas dúvidas ainda estão pelo caminho. Por esse motivo, é importante a análise da história do estudo da dor e seus fundamentos filosóficos.

Uma das primeiras associações entre dor e doença está presente no caso 48 do papiro de Edwin Smith, no qual se analisa um paciente que sofrera traumatismo na espinha e sentia dor toda vez que fazia movimentos com os membros inferiores. Acredita-se que o documento data de 1.700 anos a.C. e é conhecido como o mais antigo documento sobre traumas e cirurgias já escrito. Diferentemente de outros papiros médicos da época, o papiro de Edwin Smith não relaciona as causas das doenças à divindades ou a lendas e sim a uma análise crítica da situação do paciente (STIEFEL; SHANER; SCHAEFER, 2006).

Associar a dor ao coração, como a dor de um coração partido, é resultado do legado de Aristóteles (384 – 322 a.C.) que vinculou a dor à emoções. Teorizando, com isso, que o centro das emoções era o coração, portanto, a dor está atrelada ao coração. Além disso, o filósofo e seu pupilo Platão (428/427 a.C. – 348/347 a.C.) consideravam que a dor e o prazer eram paixões da alma que residiam no coração, apesar de serem sensações opostas (PORTNOI, 1999 ; PERL, 2007).

O filósofo e médico romano de origem grega, Claudius Galeno (129 - 199 d.C.) revisitou a teoria humoral postulada por Hipócrates (460 a.C. – 377 a.C.), que acreditava que o corpo era composto de 4 humores que permaneciam em equilíbrio: o sangue, a fleuma, a bílis negra e a bílis amarela. A partir disso, Galeno, assim como Hipócrates, associou a dor ao influxo da bílis negra e da bílis amarela o que ocasionaria um desequilíbrio entre os humores endógenos. Apesar de ter feito observações grandiosas em seu tempo, Galeno ainda acreditava que o órgão responsável pela sensação de dor era o coração (PORTNOI, 1999 ; SCLiar, 2007 ; KHAN; RAZA; KHAN, 2015).

Diferentemente de seus antecessores, Avicenna (980 – 1037 d.C.) e René Descartes (1596 – 1650 d.C.) associaram a dor à sensações. O primeiro como sensações independentes e o segundo a comparava com a sensação de quente e frio. Partindo assim do princípio de que a dor não mais era associada a emoções e sim a sensações. Além disso, Descartes foi um dos primeiros a relacionar a dor ao cérebro, inferindo que a mesma era diretamente proporcional à lesão, o que acarretaria em rápidos movimentos de partículas de fogo que percorriam os nervos até alcançarem o centro da dor no cérebro (PERL, 2007 ;KHAN; RAZA; KHAN, 2015).

David Hartley (1705 – 1757) também chegou a mencionar a passagem de informações por nevos, criando assim, a teoria das vibrações, na qual afirmava que as sensações são resultados de vibrações aplicada sobre a medula e a intensidade dessas vibrações diferenciava as sensações. Com isso, Hartley acreditava que o prazer e a dor se diferenciavam quantitativamente e não qualitativamente. A vibração do prazer seria moderada enquanto a vibração da dor seria tão violenta capaz de ultrapassar o limiar do prazer (ALLEN, 1999 ; WADE, 2005). Por volta de 100 anos mais tarde , Wilhelm Erb (1840 – 1921), seguindo os

conceitos de Hartley, criou a teoria de intensidades da dor, na qual sugeria que a dor estaria presente em todo o sistema sensorial, uma vez que se atingisse a intensidade certa para que ocorresse (PERL, 2007 ; MOAYEDI; DAVIS, 2013).

Durante o século XIX , essa teoria de passagem de informação da dor por nervos foi revista e seriamente estudada principalmente por Charles Bell (1774 – 1842), François Magendie (1783 – 1855), Johannes Peter Müller (1801 – 1858), Emil Heinrich DuBois Reymond (1818 – 1896), Moritz Schiff (1823 – 1896) , Charles- Édouard Brown – Séquard (1817 – 1894), William Gowers (1845 – 1915), Magnus Blix (1849 – 1904), Alfred Goldscheider (1858 – 1935) e Maximilian Von Frey (1852 – 1932)(PERL, 2007).

Charles Bell, em seus estudos, deixou claro que diferentes partes do cérebro eram responsáveis por funções distintas. O neuroanatomista também revisitou a teoria de passagem de estímulos pelos nervos e propôs, em 1811, que diferentes porções da medula espinhal transmitiriam funções distintas. Assim sendo, a porção anterior da medula , conhecida como porção ventral da raiz, seria responsável pelo controle motor e contração dos músculos, enquanto que a porção posterior, sabidamente dorsal, seria responsável por respostas sensoriais, apesar de não descrever como esse processo aconteceria (PERL, 2007 ; TUBBS et al., 2012).

Foi apenas em 1822, com François Magendie, que a função sensorial da raiz dorsal foi reconhecida. Além de provar que estímulos elétricos no mesmo local levariam a variação da pressão sanguínea. Magendie, que foi criado dentro dos princípios iluministas de Jean Jacques Rousseau (1712-1778), é considerado um pioneiro na fisiologia experimental (TUBBS et al., 2008).

Ainda no século XIX, Johannes Peter Müller e Emil Heinrich DuBois Reymond fizeram descobertas relacionadas sobre a especificidade dos ramos sensoriais. Müller propôs que o tipo e a qualidade da sensação não dependiam do estímulo aplicado e sim de características do órgão sensitivo. Isso implicava que a dor dependia do tipo de nervo que a transmitia e do local do cérebro no qual era codificada (WARREN, 1921). Por sua vez, DuBois, pai da eletrofisiologia experimental e descobridor do potencial de ação, acreditava que devido a natureza eletroquímica dos impulsos nervosos, as fibras aferentes deveriam fornecer informações sobre a natureza do estímulo para o cérebro, contrapondo a proposta de Müller (WARREN, 1921).

Moritz Schiff , aluno de Magendie, continuou seus trabalhos com a medula e, em 1858, demonstrou que lesões na medula espinhal poderiam levar a reações independentes entre a perda de movimento e da sensação de dor. Propondo, o que uma vez foi estipulado por Avicenna, que a dor é uma sensação independente (PERL, 2007).

Seguindo a proposta de Schiff de lesões medulares, Charles-Édouard Brown – Séquard, comprovou que não haviam mudanças sensoriais uma vez que fosse lesionado uma parte da porção posterior da medula. No entanto, uma hemiseção transversa da medula espinhal, poupando apenas os ramos posteriores, poderia levar a uma perda de sensibilidade a dor na região contralateral e distal ao dano levando a acreditar que a paralisia do controle motor acontecia no lado em que a lesão havia sido feita, enquanto que a perda de

sensibilidade à dor, acontecia do lado oposto a lesão, indicando a existência de uma decussação entre as fibras nervosas. Essa proposta foi apoiada por William Gowers que visualizou a mesma resposta em humanos (LAPORTE, 2006 ; PERL, 2007).

Já no final do século XIX, Magnus Blix e Alfred Goldscheider demonstraram que pontos específicos da pele respondiam a diferentes estímulos como calor, frio, pressão e a dor. Sendo uma distribuição cutânea espaçada e descontínua que respondia de diferentes formas a diferentes estímulos. Esses achados foram comprovados por Maximilian Von Frey, que agrupou os estímulos em quatro modalidades somatosensoriais (frio, calor, dor e toque) afirmando que qualquer outro estímulo seria derivado dessas modalidades.

Von Frey ainda demonstrou que existem lugares diferentes para estímulos como: pressão inócua e pressão nociva e apresentou um modelo de mosaico da pele com a distribuição dos pontos de estímulo das quatro modalidades e ainda relacionou a distribuição dos pontos de pressão com a distribuição dos corpúsculos de Meissner enquanto que a localização dos pontos de dor foram relacionados com as terminações nervosas livres (PERL, 2007 ; MOAYEDI, 2012).

A visão de dor como derivada de um estímulo nocivo (mecânico, térmico e químico) e, portanto, desencadeando uma sinalização de nocicepção só foi proposta no século XX com Charles Scott Sherrington (1857 – 1952). O mesmo cunhou o termo nociceptor para designar as terminações nervosas capazes de codificar estímulos nocivos. Sherrington também foi responsável por criar o termo “*sinapse*” para descrever as correntes que transitavam entre o sistema nervoso central e o sistema nervoso periférico, e por trabalhar na distribuição dos dermatômos sensitivos (BREATHNACH, 2005 ; PERL, 2007 ; MOAYEDI, 2012).

Demonstrações de que áreas específicas do encéfalo como o tálamo e o giro cingulado participavam da sinalização da dor foram confirmadas por cientistas ao longo do século XX, porém a forma como a dor era modulada e transmitida para essas áreas só foi proposta por Ronald Melzack (1929 –) e David Wall (1925 – 2001) em 1965 com a “Teoria da Comporta” da dor.

A teoria propunha que, uma vez estimulada, as fibras aferentes produziram sinais que seriam levados para a substância gelatinosa, a coluna dorsal e as células transmissoras, todas localizadas na medula espinhal. No entanto, pra que esses sinais chegassem até as células transmissoras, ele deveria passar pelo sistema de comporta produzido pela substância gelatinosa da raiz do corno dorsal da medula. Esse mecanismo seria controlado por interneurônios inibitórios presente na substância gelatinosa. Se o sinal doloroso ultrapassasse o limiar de inibição dos interneurônios, os mesmos seriam “desativados” e a dor seria propagada para outros centros específicos no sistema nervoso central. Essa teoria eliminou a ideia de que existiria uma única e simples via dolorosa, ampliou as pesquisas e foi de fundamental importância para a descoberta de opiáceos endógenos responsáveis pela modulação inibitória da dor. Três anos depois de instituir a “Teoria da Comporta” da dor, Ronald Melzack propôs a “Teoria da Neuromatrix”, onde afirma que a dor é uma experiência multidimensional complexa gerada por impulsos nervosos produzidos por uma grande gama de rede neural que envolve o tálamo, o córtex e o sistema límbico (TICIANELI; BARAUNA, 2002 ; MOAYEDI, 2012 ; KHAN; RAZA; KHAN, 2015).

Os estudos nociceptivos deram continuidade e até hoje são responsáveis por grande parte da contribuição da comunidade científica. Tornando o reconhecimento histórico e filosófico imprescindível para futuras pesquisas na área.

2.1.6. Dor: Um Aspecto científico

Contamos lendas, pintamos quadros, choramos a sua chegada e suplicamos a sua partida. A dor é uma das experiências mais antiga conhecida pela humanidade, ainda sim é difícil defini-la. No entanto, uma descrição é necessária e, portanto, em 1979 a “International Association for the study of pain” (IASP) lançou uma lista de termos e definições a cerca desse assunto (MERSKEY et al., 1994).

Segundo a IASP, dor pode ser compreendida como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial ou descrita em termos que sugerem tal dano”. Diferentemente do conceito de nocicepção, que se relaciona com a codificação e processamento de estímulos nocivos e sua transmissão pelo sistema nervoso. Sendo assim, dor é uma percepção e nocicepção seria a sensação. Geralmente ambas estão associadas, porém podem incidir separadamente. Esses estímulos nocivos podem ser mecânicos, químicos ou térmicos e apenas resultam em uma sensação dolorosa se forem intensos o suficiente para estimularem os nociceptores (FEIN, 2011).

2.1.6.1 Dor aguda e Hiperalgisia

A dor, por mais que seja tratada como vilã, é uma importante ferramenta do organismo. Apresentada como aviso e usada com a finalidade de alertar que há algo de errado com o sistema. É um tipo de prevenção criada pelo próprio corpo para manter seu bom funcionamento (TREEDE, 2006).

O corpo consegue detectar as desordens graças ao sinal sensorial positivo da nocicepção, conhecida como hiperalgisia. Esta é distinguida em duas fases: a primeira, reconhecida como hiperalgisia primária, consiste na exacerbação da sensibilidade a dor, ou seja, a redução do limiar, acompanhada da excitabilidade dos nociceptores, o que pode levar a uma resposta desproporcional ao estímulo causado. A segunda, na qual mudanças no limiar dos mecanorreceptores geram uma alodinia, ou seja, estímulos como o toque, que antes não provocavam dor, passam a ser nocivos o suficiente para gerar uma sensação dolorosa. Essa estratégia do corpo é responsável pelo reconhecimento da origem da lesão e, assim, facilitar seu tratamento (CERVERO; LAIRD, 1996 ; MILLAN, 1999 ; TREEDE, 2006).

O processamento da dor acontece a partir da ativação dos nociceptores. Estes, são receptores de estímulos nocivos ou de estímulos que se tornarão nocivos, se prolongados por muito tempo. São classificados devido a sua velocidade de condução sináptica, ao limiar e a sensibilidade ao tipo de estímulo nocivo empregado. Com isso foram divididos em fibras aferentes sensitivas mielinizadas do tipo A e fibras aferentes sensitivas amielínicas do tipo C (MILLAN, 1999).

Nem todas as fibras do tipo A carregam apenas informações de estímulos nocivos. Existem subtipos dessa classe que são capazes de transportar informações de estímulos não nocivos ou inócuos. Portanto, as fibras da faixa A δ são reconhecidas como uma das fibras de terminação livre responsáveis pela condução do estímulo doloroso. Essas fibras, quando comparadas com os outros subtipos dessa classe, possuem um diâmetro menor e bainha de mielina escassa, o que favorece para uma condução sináptica mais lenta do que a dos outros tipos que compartilham a mesma categoria. No entanto, essa fibra não chega a ser a mais lenta entre os nociceptores. As fibras do tipo C são as terminações livres com condução sináptica mais lenta, uma vez que não possuem bainha de mielina. A partir disso, as fibras A δ são associadas a dores ditas rápidas ou agudas e as fibras C responsáveis pelo processamento da dor lenta ou crônica (PURVES et al., 2011).

A dor rápida pode ser desencadeada quando as fibras A δ , localizadas periféricamente, são ativadas por estímulos mecânicos ou térmicos em intensidades nocivas (SCHAIBLE, 2007). Essa ativação leva a codificação do estímulo em potencial de ação que será levado por essas fibras aferentes até sua condução pelo trato neoespinalâmico (FERNANDES; GOMES, 2011).

2.1.6.2. Dor crônica e Neuropática

Ao contrário da dor aguda, a dor crônica é transmitida pelas fibras C, que devido a sua ausência de mielina, torna essa condução mais lenta. A fibra C é capaz de ser sensibilizada por estímulos químicos, térmicos e de pressão (MILLAN, 1999).

Melanie Thernstrom em seu livro “Crônicas da dor” (2011) fez uma metáfora na qual comparou as dores aguda e crônica a um alarme de incêndio. Ela relata que, quando nossos receptores funcionam normalmente, eles respondem da mesma forma que um alarme, avisando quando há perigo, ou seja, quando uma lesão causa dor e precisa ser tratada. Quando esse estímulo é prolongado, vemos que a intensidade da dor parece não ter relação com o tamanho da lesão e então acontece a caracterização da dor crônica.

A lenta transmissão do estímulo doloroso e sua prolongação passam a promover respostas de outros sistemas do corpo, como o vascular e o endócrino. Esse comportamento mais agressivo deixa o indivíduo em estado de alerta, podendo elevar a pressão arterial e desregular o ritmo cardíaco, levando a um quadro muito mais sério do que o da dor aguda (MILLAN, 1999).

A persistência da dor, muitas vezes, pode levar a uma evolução do caso desencadeando uma dor Neuropática. Nesse caso, voltando para a metáfora de Melanie, o alarme pode ser disparado sem que haja uma causa aparente. Sendo comparado a um alarme quebrado que não cessa de tocar. Ele poderia ter sido acionado a muito tempo atrás e, mesmo depois do término do fogo, continuaria a tocar. Poderia, também, ter sido acionado por causas que não remetessem perigo e, por muitas vezes, ativados por razão nenhuma. A dor neuropática não é protetora como a dor aguda e pode acarretar em anedonia e indiferença ao ambiente, sintomas característicos de depressão causada por estresse (MILLAN, 1999 ; THERNSTROM, 2011).

2.1.6.3. Dor visceral e dor inflamatória

Enquanto, na dor somática sabemos exatamente o local da lesão, na dor visceral essa precisão é perdida. Isso se deve a hiperalgesia referida, característica desse tipo de dor. Nela, a dor parece se localizar em uma área distante daquela que realmente está lesionada. Além disso, a área referida apresenta sensibilidade aumentada como se estivesse realmente lesionada. Isso porque a transmissão da dor acontece, em parte, pela via visceral verdadeira e em parte pela via somatossensorial (LAIRD; CERVERO, 2011).

Os estímulos envolvidos podem ser causados por uma série de acontecimentos como isquemia do tecido visceral, espasmos da musculatura lisa, lesão química na superfície visceral ou qualquer outra dor que seja transmitida por fibras C presentes nas vísceras (CURI, 2009). Eles são capazes de sensibilizar terminações nervosas dispostas em áreas difusas das vísceras, transmitindo a informação dolorosa derivada de diferentes áreas ao mesmo tempo que há uma transmissão normal de informações. Elas acabam convergindo para um mesmo interneurônio no corno da raiz dorsal da medula espinhal, sendo assim, processadas (LAIRD, 1996; CERVERO; LAIRD, 1999 ; CURI, 2009).

Em outro tipo de dor, a dor inflamatória, vemos a participação de nociceptores silenciosos. Eles compõe 10- 20% da população de fibras C das juntas, da pele e das vísceras. São uma categoria que só apresenta atividade quando são estimulados por mediadores inflamatórios o que ocorre após uma exposição prolongada ao estímulo (CERVERO, 1995; MILLAN, 1999).

2.1.6.4. Sensação térmica

Além das fibras A δ e C, existem outras fibras da família A capazes de conduzir a informação de frio e quente. No entanto, apenas os nociceptores são estimulados em graus extremos de calor ou de frio (GUYTON ; HALL, 2011).

Localizados esparsamente sob a pele, esses receptores conseguem detectar variações mínimas na temperatura. Eles possuem um comportamento de troca ou de “on and off” no qual a intensidade do estímulo térmico é capaz de “desligar” um receptor e “ligar” outro que seja capaz de traduzir a nova faixa de temperatura apresentada (WERNER, 2015).

A determinação de um estímulo térmico nocivo, seja ele frio ou quente, é mediada pelos canais iônicos de receptores transientes de potencial (TRP) presente, também, nas fibras C e A δ . Seus diferentes subtipos estão relacionados ao tipo de sensação térmica codificada e traduzida (DIAZ-FRANULIC et al., 2016 ; GHOSH et al., 2016).

Em mamíferos, a subfamília de receptores transientes de potencial valinóide (TRPV), possui 3 receptores mais conhecidos, capazes de responder a estímulos térmicos de quentura. São eles o TRPV1, TRPV2 E TRPV4. Já o receptor de frio mais famoso está alocado nas subfamílias de receptores transientes de potencial relacionados a melastatina (TRPM) ,sendo ele o TRPM8 e a os receptores transientes de

potencial repetidores da anquirina (TRPA) sendo o mais notável o TRPA1 (ALMEIDA; VIZIN; CARRETTIERO, 2015 ; DIAZ-FRANULIC et al., 2016).

Esses receptores possuem um comportamento alostérico. Capacitando sua ativação tanto pela temperatura quanto por estímulos químicos, a exemplo dos TRPV que são ativados tanto pelo calor quanto pela substância química presente na pimenta, a capsaicina. É por isso que, ao ingerir pimenta, sente-se a sensação de queimação e ardência. Os canais TRPV1, especificamente, são os mais estudados em relação a sua ativação por estímulos térmicos de calor acima de 43°C e estão presentes com mais intensidade nas fibras C tanto na periferia quanto em domínios centrais (TOMINAGA; CATERINA, 2004).

Em contraste, os canais TRPM8 e os canais TRPA1 são os mais estudados quando o assunto é estímulos nocivos térmicos abaixo de 25°C e abaixo de 17°C , respectivamente. Assim como os canais TRPV são sensíveis a capsaicina, os canais TRPM são ativados na presença de mentol, substância presente na menta. Por isso a sensação refrescante das balas de menta. Os TRPM8 são encontrados facilmente na membrana celular das fibras C do gânglio do trigêmeo e no corno da raiz dorsal (TOMINAGA; JULIUS, 2000 ; TOMINAGA; CATERINA, 2004 ; ALMEIDA; VIZIN; CARRETTIERO, 2015; POLETINI et al., 2015). Já os canais TRPA1 são encontrados em coexpressão com os canais TRPV1, porém não com o canal TRPM8, e em fibras e neurônios cuja a marcação do peptídeo do gene relacionado a calcitonina possa ser reconhecida. Além disso, TRPA1 não foi encontrado expresso em neurônios altamente mielinizados o que sugere que ele esteja presente em fibras Aδ e C (TOMINAGA, 2007 ; WETSEL, 2011 ; VAY; GU; MACNAUGHTON, 2012).

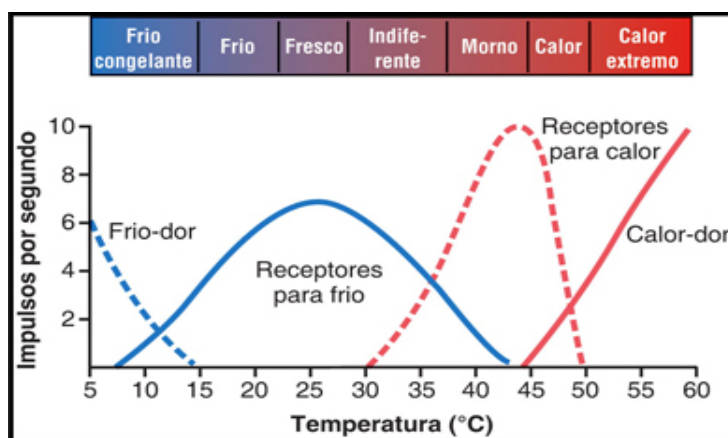


Figura 3. Sensibilidade dos receptores para calor e frio, indicando a frequência de atividade da fibra aferente (GUYTON; HALL, 2011).

2.1.6.5. Vias de transmissão dolorosa

A transmissão dolorosa envolve os componentes periféricos e centrais do sistema nervoso. Se percorrem a pele, sua transmissão se dá pelos os tecidos musculoesqueléticos e as vísceras até o córtex cerebral (RIEDEL; NEECK, 2001).

As terminações livres, responsáveis por captar os estímulos da dor, partem da periferia do tecido para o gânglio da raiz dorsal, dirigem-se até o corno da raiz dorsal e se distribuem por entre suas lâminas. Esse é o primeiro contato com o sistema nervoso central que poderá ser explorado ainda mais pelos tratos que se bifurcam na medula espinhal. São eles o trato neoespinotalâmico e o trato paleoespinotalâmico. No primeiro, as fibras A δ terminam na lâmina I e V dos cornos dorsais, excitam os neurônios de segunda ordem que, por sua vez, cruzam para o lado oposto e então ascendem ao tálamo e córtex. Já o trato paleoespinotalâmico comporta a transmissão das fibras C que terminam nas lâminas II e III, justamente na substância gelatinosa, se conecta com interneurônios que passam a informação para a lâmina V, cruzam a comissura anterior da medula e ascendem ao córtex pela via anterior lateral. É importante salientar que os nociceptores liberam neurotransmissores como o glutamato, principal neurotransmissor das fibras A δ e também liberado pela fibra C, e a substância P, somente liberada pelas fibras da dor lenta (IGGO; STEEDMAN; FLEETWOOD-WALKER, 1985 ; GUIRIMAND; BARS, 1996 ; DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010).

A via descendente da dor parte da substância cinzenta periaquidutal do mesencéfalo percorrendo várias áreas do tronco cerebral e envolvendo também o locus coeruleus e o núcleo ventromedial da medula espinhal. Ela é importante para a compreensão da resposta do organismo à transmissão dolorosa como, por exemplo, a liberação de substâncias ligadas a atividade antinociceptiva endógena do corpo (BANNISTER; DICKENSON, 2016).

2.1.6.6. Modelos experimentais de nociceção

A) Processo algico induzido por ácido acético.

Um dos métodos mais utilizados para estudo de dores viscerais é o modelo de contorção. Neste a dor é induzida pela administração de uma solução de ácido acético em concentração nociva, porém não fatal, capaz de promover reações como: expressões faciais de intensidade de dor, contrações musculares, espasmos com estiramento do corpo do animal, distensão abdominal e reflexo de proteção como a rigidez da parede abdominal. Nesse teste são avaliadas respostas comportamentais relacionadas a sensação de dor (LAIRD, 1996 ; MILLAN, 1999 ; LANGFORD et al., 2010).

B) Processo algico induzido por estímulo térmico

O modelo de placa quente é o mais utilizado para avaliar a resposta supraespinhal, evidenciada pelo pulo do animal, pela retirada e/ ou pelo lambar das patas. Ele consiste na aplicação de um estímulo térmico nocivo sobre a superfície corporal do animal, incluindo os quatro membros e a cauda, com o intuito de promover a tentativa de fuga do mesmo. O tempo em que o animal demora para perceber a temperatura nociva de 50- 55° C e a responder a esse estímulo com o comportamento já descrito, é conhecido como

tempo de latência, sendo o parâmetro avaliado (DIRIG et al.,1997; BANNON; MALMBERG, 2001; BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001).

C) Processo álgico induzido por formalina

O Teste de Formalina é conhecido como um teste que apresenta duas fases e é, portanto, chamado de Teste de Resposta Bifásica (SHIBATA et al., 1989). A primeira fase acontece nos primeiros cinco minutos, logo após a injeção intraplantar de solução de fomalina na pata do animal. Essa fase é conhecida como fase neurogênica. A segunda fase ocorre 20 minutos após a administração da solução e é conhecida como fase inflamatória.

Nas duas fases é avaliado o comportamento do animal refletido no tempo em que ele leva lambendo a pata lesionada (BANNON; MALMBERG, 2001 ; BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001 ; CAPONE; ALOISI, 2004).

2.1.6.7. Modelos neurocomportamentais de avaliação motora

Usados, nesse estudo, como validação da não participação do Pp-óleo em via central, os modelos neurocomportamentais de avaliação motora dependem que a substância analisada ultrapasse a barreira hematoencefalica para que se verifique a participação central. Eles, também, analisam a função motora do animal, que será afetada caso haja alguma influência sobre as áreas motoras do cérebro (OHNO et al., 1994 ; TATEM et al., 2014).

A) Campo aberto

O sistema de monitoramento de atividades no campo aberto é um dos testes comportamentais mais utilizados para avaliar o comprometimento da locomoção ou a melhora da mesma sob a utilização de uma droga terapêutica em análise (TATEM et al., 2014).

A avaliação do campo aberto fornece medidas de distância percorrida e número de vezes em que o animal fica sob duas patas, e que vão muito além das medidas de força muscular, sendo utilizadas para a avaliação da substância e sua participação ou não no sistema nervoso central (TATEM et al., 2014).

B) Pole teste

Desenvolvido para avaliar a bradicinesia na doença de Parkinson (MATSUURA et al.,1997 ; OHNO et al., 2008) o pole test é tido como uma ótima ferramenta para identificar e avaliar quantitativamente deficiências motoras causadas por tratamento com substâncias que tenham participação no sistema nervoso central como a bradicinesia causada por MTPT, uma neurotoxina dopaminérgica (OHNO et al., 1994).

C) Rotarod

O Rotarod, por sua vez, tem como objetivo avaliar a função locomotora relacionada com o equilíbrio, coordenação motora, planejamento e exploração natural. É um dos testes mais utilizados para quantificação de um déficit neurológico e, conseqüentemente, do sistema motor por sua sensibilidade e facilidade de uso (BROOKS; DUNNET, 2009).

2.2. CAPÍTULO II : ANTINOCICEPÇÃO

Muitas vezes a resposta à dor nos parece mais reflexa e automática do que a verdade por trás dos mecanismos analgésicos desenvolvidos pelo corpo. Sendo assim, foi dado o nome de Antinocicepção à capacidade de redução da sensibilidade a dor (MERSKEY, 1994). A busca pela ampliação dessa capacidade levou a descoberta de vários tipos de tratamentos, assim como, a evolução de terapias analgésicas a fim de promover uma melhora na qualidade de vida (MERSKEY, 1994).

2.2.1. ANALGÉSICOS OPIÓIDES

Os dois grandes moduladores da nocicepção e da antinocicepção são os receptores N-metil-D-aspartato (NMDAr) e os receptores opióides. O NMDAr, por ser um receptor de glutamato, principal neurotransmissor liberado durante a transmissão dolorosa, e os receptores opióides por serem ativados por analgésicos endógenos conhecidos pelas famílias: endorfinas, encefalinas e dinorfinas, e os exógenos conhecidos como morfínomiméticos (RIEDEL; NEECK, 2001; DUARTE, 2005).

O termo opióide, proposto por Acheson, refere-se a toda substância, seja ela endógena, exógena natural, semi-sintética ou sintética, com estrutura química comparável a da morfina. No qual, é composta de um anel de benzeno com um grupo hidroxilo de álcool na posição 6, uma hidroxila fenólica na posição 3 e um átomo de nitrogênio, que seja capaz de se ligar aos receptores opióides presentes no organismo atuando tanto como agonista quanto como antagonista (DUARTE, 2005 ; TRESCOT et al., 2008).

Os receptores opióides, por sua vez, compreendem 3 famílias: Mu (μ), Kappa (κ) e Delta (δ) e cada um possui a sua particularidade.

Os receptores μ (MOR), são os mais conhecidos alvos da terapia analgésica opióide. Estão presente mais predominantemente no tálamo medial e no tronco cerebral. Esses receptores estão acoplados a uma proteína G que, dependendo de sua isoforma, podem estar conectados por proteínas G_i , no caso da isoforma clássica, e G_s em alguns casos de mutação genética por splicing. A ativação desses receptores pode levar a respostas como: analgesia, sedação, euforia, dependência e em casos de overdose, depressão respiratória (TRESCOT et al., 2008; ROECKEL et al., 2016).

Já os receptores κ (KOR) são encontrados na medula espinhal, no sistema límbico e outras áreas do diencefalo. Assim como a família anterior, eles também possuem proteínas G_i acopladas. No entanto, sua potência analgésica é inferior aos MOR (AKIL et al., 1984 ; AUDET et al., 2010).

Os receptores δ (DOR), por sua vez, são encontrados esparsamente pelo encéfalo especialmente em regiões corticais e em áreas do sistema límbico como o hipotálamo, hipocampo e amígdala, o que faz com que o receptor exerça funções no comportamento, além da sua função natural de modulação de dor e analgesia (CHUNG ; KIEFFER, 2013). Acoplados a uma proteína G, podem causar depressão respiratória, constipação e dependência quando administrados em altas doses (TRESCOT et al., 2008 ; AUDET et al., 2010 ; GAVÉRIAUX-RUFF; KIEFFER, 2011).

Agonistas desses receptores têm sido utilizados como terapia na prática clínica a vários anos. Um dos tratamentos mais conhecidos pela humanidade, advém de uma planta conhecida como *Papaver Somniferum* . Essa espécie de papoia era usada desde os tempos antigos e era chamada de “planta da alegria” por proporcionar analgesia aos que dela provavam. Eram usadas as cápsulas de sementes com a finalidade de se obter o ópio. Com o tempo descobriu-se que o responsável por essa sensação era um alcaloide extraído do ópio: a morfina.

Esse analgésico é agonista dos receptores opióides, principalmente o MOR. E nele exerce a função de inibir as transmissões de impulsos nociceptivos através do corno da raiz dorsal além de inibir a liberação de substância P pelos nociceptores de fibra C (KART; CHRISTRUP ; RASMUSSEN, 2008).

Os opióides são os analgésicos mais potentes que existem no mercado porém seus efeitos adversos são tão graves que fazem com que esses tratamentos sejam o último recurso utilizado pelos profissionais da saúde. Os efeitos adversos incluem a diminuição da motilidade do trato gastrointestinal causando constipação, supressão de tosse, depressão respiratória, sedação, mudança de comportamento, aumento do tônus muscular liso e dependência. Devido esses efeitos indesejáveis, tornou-se preferível o uso de medicamentos classificados como antiinflamatórios não esteroídeos nos tratamentos de dores menos severas (CHRISTIE et al., 2000 ; TRESCOT et al., 2008).

2.2.2. DROGAS ANTINFLAMATÓRIAS NÃO ESTEROIDAIAS (AINEs)

Essa classe de medicamento é, geralmente, a escolhida para substituição dos analgésicos opióides no tratamento de dores leves e moderadas. Seu mecanismo de ação baseia-se na inibição da biossíntese de prostaglandinas (VANE; BOTTING, 1998).

As prostaglandinas são sintetizadas pelas cicloxigenases (COX), que são enzimas presentes, principalmente, nos retículos endoplasmáticos de células formadoras de prostaglandinas. Existem três isoformas muito importantes e com funções distintas. A isoforma dita constitutiva, conhecida como COX-1, tem a função de produzir e ativar a prostaglandina 1 (PGE1) responsável por liberar mucus e bicarbonato, dois poderosos protetores da mucosa gástrica. Além de promover a homeostase (CASHMAN, 1996 ; VANE; BOTTING, 1998; SLATER et al., 2010).

A COX-1b, também conhecida como COX-3, é uma variante da COX-1 derivada de um splicing no gene codificador. É encontrada em grande concentração no cérebro e, além da função de sintetizar

prostaglandina assim como a COX-1, ela também exerce desempenho na modulação da temperatura, principalmente em casos de febre, apesar de que esse mecanismo ainda não foi totalmente esclarecido (BOTTING, 2003 ; SIMMONS, 2003 ; HERSH; LALLY; MOORE, 2005)

Ao contrário da COX-1, que está presente no organismo, a COX- 2 é ativada apenas em células inflamatórias. Assim como as anteriores, sua função também é produzir prostaglandinas. No entanto, o tipo de prostaglandina produzido pela COX-2 é mais nocivo e consegue ativar os nociceptores, gerando assim uma transmissão dolorosa (VANE; BOTTING, 1998).

A produção de prostaglandinas é o ponto em comum entre todas as isoformas de COX. Acontece a partir da liberação de ácido aracdônico, que é essencial para a produção de muitas substâncias, entre elas os ácidos hidroxieicosatetraenoicos e os leucotrienos. Após a liberação, as isoformas de COX acrescentam grupos de 15- hidroxperoxi para formar as prostaglandinas G2 (PGE2) e hidroxí para a formação de prostaglandinas do tipo H2(PGH2). A PGE2 é a mais encontrada em casos de inflamação e é uma das responsáveis por sensibilizar os nociceptores (CASHMAN,1996 ; VANE; BOTTING, 1998).

Dessa forma, o mecanismo de ação dos AINEs se baseia na inibição das isoformas de COX, particularmente as COX-2. Essa ação faz com que haja uma supressão em um ou mais pontos na via de síntese de prostaglandinas, uma vez que a enzima responsável por sua produção está inibida. Consequentemente, os processos dolorosos, inflamatórios e piréticos são suprimidos junto com a inibição das COX (CASHMAN, 1996; MONTEIRO-STEAGALL; STEAGALL; LASCELLES, 2013).

2.2.3. PLUKENETIA POLYADENIA

Plukenetia é um gênero neotropical de dezenove espécies pertencentes a Euphorbiaceae. *Plukenetia polyadenia* Müll. Arg. (Euphorbiaceae) (The Plant List, 2010) é uma liana de árvores altas conhecida popularmente como “compadre de azeite”. Ela cresce em florestas de terras baixas e úmidas generalizada nas Guianas, Venezuela Oriental e a bacia do Amazonas no Equador, Peru, Bolívia e Brasil (GILLESPIE; ARMBUSTER, 1997).

A caracterização morfológica da semente de *Plukenetia polyadenia* foi feita por Rodríguez et al. (2011) e mostrou que, quando comparada com 5 outros tipos do mesmo gênero, a semente de *Plukenetia polyadenia* era maior e tinha o aspecto de borda lisa e acuminada.

Ao longo do rio Amazonas e seus afluentes o óleo de semente de *Plukenetia polyadenia* (Pp-óleo) é usado por ribeirinhos contra artrite e reumatismo. Eles o usam topicamente, espalhando-o nos braços e pernas.



Figura 4. Sementes os seis grupos do gênero de Plukenetia estudados na Amazônia peruana. (A) *P. brachybotrya* ; (B) *P. loretensis* ; (C) ;*P. volubilis* (procedente de San Martin) ; (D) *P. volubilis* (procedente de Cusco) ; (E) *P. huallaybambana* ; (F) *P. Polyadenia* (RODRÍGUEZ et al, 2011).

3. OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL:

Com base no uso do Pp-óleo em processos inflamatórios por parte da população nativa e com base nos estudos que nosso laboratório vem realizando em relação ao mesmo óleo, o objetivo deste estudo é analisar a toxicidade aguda, assim como a eficiência da atividade antinociceptiva do óleo de Pukenetia polyadenia, bem como seus efeitos centrais e a elucidação de seu mecanismo de ação.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO:

- Analisar a toxidade de Pp-óleo em modelos de toxicidade aguda.
- Caracterizar a eficiência de Pp-óleo nos modelos de nocicepcao química térmica e bifasica
- Elucidar o possível mecanismo de ação do Pp-óleo por modelo de dor induzida por sustância química.
- Observar os efeitos centrais do óleo através de modelos comportamentais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. DROGAS E PRODUTOS QUÍMICOS

Foram utilizados os seguintes medicamentos e químicos: morfina (Laboratório Cristália, Brasil), indometacina, naloxona (Laboratório Cristália, Brasil), ácido acético, formalina (Vetec, Brasil), ácido acetil salicílico (Sigma, Brasil), celecoxibe (Sigma, Brasil).

4.2. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos macho albino Swiss (20-25g). Estes animais foram obtidos a partir de colônias mantidas no biotério da Universidade Federal do Pará (Belém, Brasil). Os animais foram alojados em grupos de 5, em condições de ambiente controlado, com livre acesso a água e comida. O alimento foi retirado durante a noite antes de experimentos, enquanto a água foi fornecida ad libitum. No estudo neurocomportamental de avaliação motora foram utilizados 42 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos (150-180g) foram aclimatados por 7 dias antes do início do experimento.

Todos os experimentos foram aprovados pelo comitê de ética da Universidade Federal do Pará sob os números: CEPAE-UFPA 124-13 ; CEUA 6381230216.

4.3. O MATERIAL VEGETAL

Os frutos de *Plukenetia polyadenia* foram coletados em uma área de várzea perto do rio Guamá, no município de Santa Isabel do Pará, Pará, Brasil, durante o período chuvoso de abril de 2011. A planta foi identificada e depositada (N ° 170411 MG), em Herbário do Museu Emílio Goeldi, Belém, Pará, Brasil.

As sementes foram separadas dos frutos, secas à temperatura ambiente e em seguida moídas e submetidas à extração de óleo usando um Expeller tipo press e um extrator Soxhlet. O conteúdo das sementes foi calculado em um forno elétrico, até peso constante. O produto oleoso foi codificado como Pp-óleo e usado nos experimentos.

O óleo foi doado e processado no laboratório de engenharia de produtos naturais sob a orientação do Prof Dr. José Guilherme Maia e da Prof. Dra Joyce Kelly da Silva.

4.4. ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

4.4.1. Contorção induzida por ácido acético em camundongos

Para avaliar os possíveis efeitos periféricos do Pp-óleo como analgésico, o teste de contorção por ácido acético foi realizado em camundongos (KOSTER et al., 1959). Grupos de cinco camundongos foram mantidos em jejum antes do início do experimento, porém com livre acesso a água. Pp-óleo (25, 50 e 100 mg / kg), indometacina (5 mg / kg) ou volumes equivalentes de veículo (0,9% de solução salina, mais Tween 80 a 1%) foram injetados (via gavagem) 60 minutos antes da injeção de ácido acético (0,6%). A indometacina é um fármaco analgésico periférico bem conhecido e foi usado como controle positivo. Em

seguida, após a injeção de ácido acético, os camundongos foram colocados em uma caixa de observação e o número de contorções foi contado durante 30 minutos.

4.4.2. Teste da placa quente em camundongos

Os camundongos foram pré-selecionados na placa quente a $55 \pm 0,5$ °C. Os animais que apresentaram um tempo de reação (latência para lambar as patas traseiras ou saltar) superior a 20 segundos foram descartados. Em seguida , os animais selecionados foram tratados com o veículo (solução salina, via gavagem) , Pp-óleo (50 , 100 e 200 mg/kg, via gavagem) ou morfina (10 mg/kg , subcutânea) . O tempo de reação para cada animal foi determinada na placa quente , antes e depois da administração do medicamento, em intervalos de 30 minutos com um total de 120 minutos de experimento (MACDONALD et al. , 1946).

4.4.3. Teste de formalina

O teste de formalina foi conduzido de acordo Hunskaar e Hole (1987). Foram administrados 20 microlitros de formalina (1%) em camundongos por via intraplantar e imediatamente o tempo de lambida foi registrado durante 5 min (primeira fase, neurogênica). Quinze minutos depois de se iniciar a experiência (segunda fase, inflamatória), o tempo de lambida foi registrado durante mais 15 min . Para avaliar a possível participação do sistema opióide no efeito antinociceptivo , os animais foram pré – tratados com morfina (4 mg / kg , s.c)30 minutos antes da administração de formalina. Para verificar a atividade de Pp-óleo (50 e 100 mg/kg, via gavagem) o mesmo foi administrado 60 minutos antes da injeção de formalina. O mesmo aconteceu com o veículo (0,9 % de NaCl , 10 mL / kg, via gavagem).

4.4.4. Avaliação do mecanismo de ação do Pp-óleo

Para avaliar a possível participação do sistema opióide no efeito antinociceptivo, os camundongos foram pré-tratados com naloxona (Nax) (5 mg/kg, i.p), 30 minutos antes da administração de Pp-óleo (100 mg/kg, via gavagem) , e 15 minutos antes da administração de morfina (4 mg/kg, sc). Após 60 minutos foi injetado o ácido acético nos animais do grupo do Pp-óleo. E após 30 minutos foi injetado o ácido acético nos animais do grupo da morfina. Essa diferença se dá por causa das vias de administração diferentes já que Pp-óleo é de administração oral e morfina é administrada na via subcutânea.

Para avaliar a participação no bloqueio de COX foi utilizado o AAS (200mg/kg, i.p) que é um inibidor não específico de COX e para uma resposta seletiva de COX-2, foi utilizado o Celecoxibe (200mg/kg, i.p). Quando associados com Pp-óleo, tanto AAS quanto Celecoxibe foram administrados 30 minutos após a administração de Pp-óleo. Trinta minutos após a injeção dos medicamentos, iniciou-se a indução de dor por administração intraperitoneal de ácido acético a 0,6%.

A resposta nociceptiva foi avaliada através das contorções induzidas por ácido acético e a avaliação do mecanismo de ação será determinada pela reversão do efeito antinociceptivo do Pp-óleo.

4.5 MODELOS DE AVALIAÇÃO DO SISTEMA LOCOMOTOR

4.5.1 Campo aberto

O modelo de campo aberto foi utilizado para verificar os padrões de distância total percorrida e o número de vezes que o animal ficou sob duas patas. Ambos são verificados com a finalidade de analisar a exploração espontânea e natural do animal. São importantes marcadores da participação central da substância estudada. Foram analisados dois grupos de sete animais cada, sendo um controle basal e o outro de Pp-óleo a 100mg/kg. Após 60 minutos da administração do Pp-óleo, os animais foram colocados, um de cada vez, em uma caixa de análise de campo aberto. Essa instrumento possui um piso enegrecido de 100 x 100 cm e dividido por linhas brancas em 25 quadrados de 20 x 20 cm. As paredes são igualmente pintadas de preto e com uma altura de 40 cm. Todo o campo foi coberto com Formica impermeável. No começo do teste, cada rato era posicionada no centro do campo e sujeito a gravação de vídeo durante todo o experimento. Foram analisados o número de levantamentos e a distância total percorrida.

4.5.2 Pole Test

O pole test foi empregado para quantificar o tempo de descida, padrão utilizado para identificar bradicinesia. Foram utilizados dois grupos (controle basal e Pp-óleo 100mg/kg) de sete animais cada. Depois da ambientação, cada animal foi avaliado individualmente.

O animal foi colocado no topo de uma haste vertical (2 x 50 cm) apoiada por uma base circular (1 cm de altura; $r = 25\text{cm}$) e foi quantificado o tempo que ele demorava para virar de cabeça para baixo e seguir em direção a base, ou seja, o tempo de descida do animal. Foram permitidas cinco tentativas em um intervalo de 60 segundo. O tempo de latência de escape, que se caracteriza pela não realização do teste de forma correta, também foi registrado como tempo de corte de 120s. Aos animais que não conseguiram realizar o exercício foi atribuído o tempo máximo de teste.

4.5.3 Rotarod

O modelo de Rotarod (Insight®, Brasil), se caracteriza por um aparelho composto de quatro baias de nove cm cada e uma base rotaria (oito cm de diâmetro e elevado a 16 cm de altura) para animais. Cada uma dessas baias possui um sistema de detecção de queda e cronômetro que estabelece quanto tempo o animal permaneceu na base realizando o exercício. Após ambientação, cada animal foi colocado em uma baia diferente e disposto na base rotatória na velocidade oito rpm por 120 segundos. Em um total de quatro sessões, foi avaliado o tempo de latência em que o exercício foi realizado. Esse modelo é importante na avaliação do planejamento, coordenação motora e na exploração natural do animal.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são expressos como a média $\pm$ S.E.M. A avaliação estatística foi realizada utilizando ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls, ou teste de Dunn, e os valores foram considerados significativamente diferentes quando $P < 0,05$.

Para as avaliações estatísticas dos testes de campo aberto, pole test e rotarod, foi utilizado o Teste t não pareado.

5. RESULTADOS

5.1 CONTORÇÃO INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO EM CAMUNDONGOS

A administração por gavagem do Pp-óleo (25, 50 e 100 mg / kg) reduziu significativamente o número de contorções em camundongos, que foi induzida por ácido acético, em comparação com os animais que receberam apenas o veículo (Figura 5). Sendo que a dose de 25 mg/kg produziu uma queda de aproximadamente 35% no número de contorções, a dose de 50 mg/kg gerou uma analgesia com a redução de 67% do número de contorções e, finalmente, o óleo nas doses de 100 mg/kg conseguiu determinar uma diminuição de, aproximadamente, 92% no número de contorções abdominais em camundongos. Estes efeitos do Pp-óleo foram dose-dependente e determinaram a dose de 100 mg/kg como a dose eficaz do Pp-óleo. Todas as doses foram comparadas o antiinflamatório padrão utilizado em modelos de contorção abdominal induzida por ácido acético, com a indometacina na dose de 5mg/kg. A mesma produziu uma redução de cerca de 70% nas contorções , número inferior ao obtido pelo Pp-óleo na dose de 100 mg/kg.

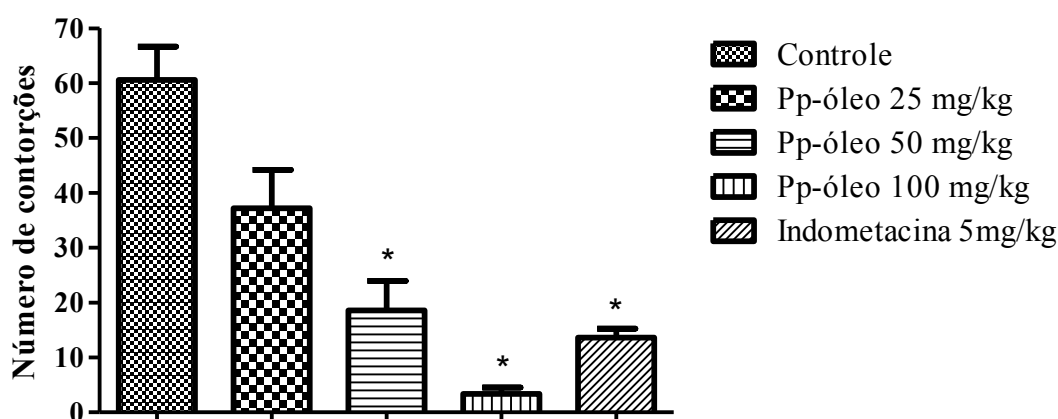


Figura 5. Efeito do Pp-óleo em modelo de contorção induzida por ác. acético. Ordenada, número de contorções. A média $\pm$ SEM*, significativamente diferente do controle ($p < 0,05$, ANOVA, teste t de Student- Newman-Keuls).

5.2 TESTE DA PLACA QUENTE EM CAMUNDONGOS

O teste da placa quente é importante na demonstração da participação das substâncias analisadas no sistema nervoso central. Por esse motivo, a escolha da morfina na dose de 10mg/kg como controle positivo. Pode-se observar a elevação do tempo de latência em mais de 50% no tempo 20 minutos e depois decaindo até finalmente chegar próximo do tempo inicial do teste. Embora haja esse decaimento é importante ressaltar que o tempo de latência permanece superior ao do controle basal e do Pp-óleo na dose de 200mg/kg. Esse último demonstrou comportamento semelhante ao controle basal, não produzindo elevação no tempo de latência e não gerando nenhuma alteração, quando comparado com este (Figura 6).

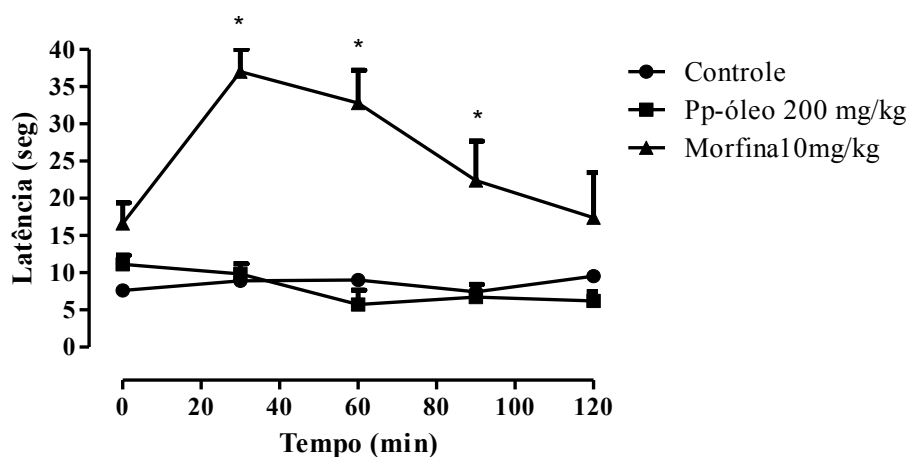
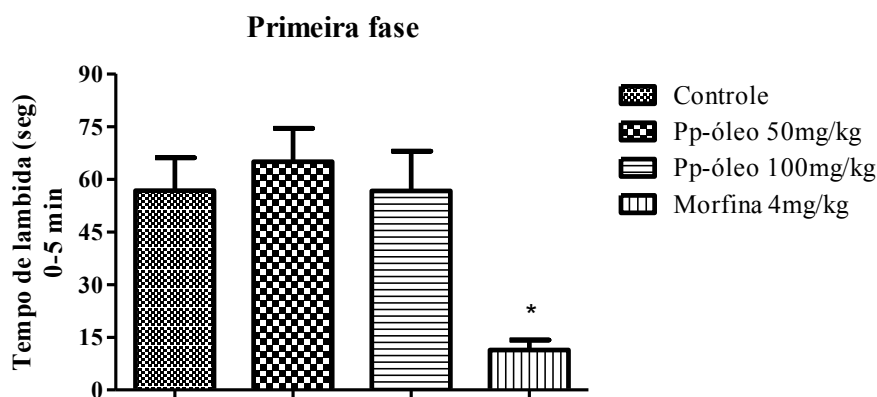


Figura 6. Teste da placa quente: curso de tempo dos efeitos do Pp-óleo sobre a nocicepção térmica. Abcissa tempo (min) após Pp-óleo(v.o), morfina (s.c). Tempo (s) de latência ordenada para a resposta a uma estimulação térmica ($55 \pm 0,5^\circ \text{C}$, a média $\pm$ SEM, $n=5$) para cada dose de Pp – óleo. *Significativamente diferente do controle ($p < 0,05$, ANOVA, teste t de Dunnett).

5.3 TESTE DA FORMALINA

Na primeira fase do teste da formalina, conhecida também como fase neurogênica, avalia-se os primeiros cinco minutos após a administração da substância química nociva, no caso a mistura de formaldeído e salina. Nesse primeiro momento, pode-se observar que o Pp-óleo, em suas doses de 50 e 100 mg/kg, não provocou a diminuição significativa no tempo de lambidas de pata dos animais avaliados quando comparados com o controle basal. Nota-se também que o controle positivo padrão, nesse caso a morfina na dose de 4mg/kg, demonstrou uma redução de 75% quando comparado ao controle basal.

Na segunda fase do teste, também conhecida como fase inflamatória, o Pp-óleo, em suas duas doses avaliadas, mostrou um efeito antinociceptivo significativo, reduzindo o tempo de lambida em 50% na dose de 50mg/kg e de 70% na dose de 100mg/kg, caracterizando uma redução dose dependente e aproximando-se da morfina que reduziu o tempo de lambida em 86% (Figura 7).



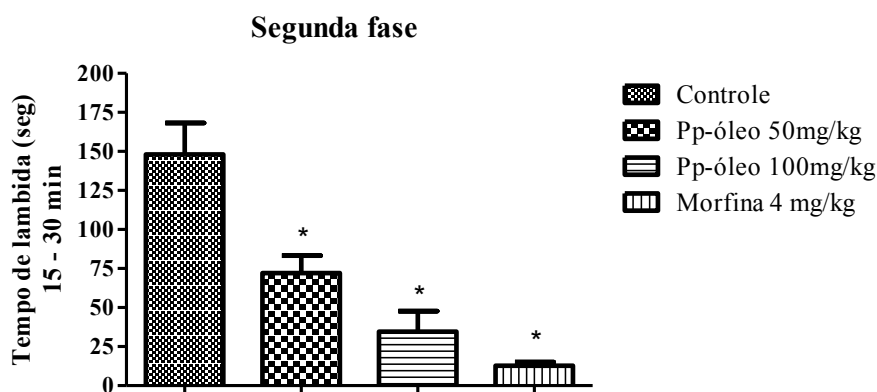


Figura 7. Teste de formalina: Fase 1 e Fase 2. Cada grupo representa média $\pm$ SEM de 5 animais. * $p < 0,05$ quando comparado com o valor do controle (ANOVA, teste de Student- Newman Kuel's).

5.4 ELUCIDAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO

Para a elucidação do mecanismo de ação utilizou-se o teste de contorção com a administração de Pp-óleo sozinho, na dose de 100mg/kg, e em associação com o ácido acetilsalicílico (AAS) a 200mg/kg, um antiinflamatório não seletivo de COX, Celecoxibe a 200mg/kg, um antiinflamatório seletivo para COX 2, e Naloxona a 5mg/kg, um antagonista opióide.

No primeiro gráfico (A), presente na figura 8, foi analisada a associação entre Pp-óleo e um antiinflamatório não seletivo de COX, o AAS. Apesar dessa associação ter gerado uma diminuição de aproximadamente 66% no número de contorções, não houve diferença significativa entre a administração em associação do Pp-óleo e a sua administração sozinho. Todas as substâncias testadas tiveram uma redução significativa quando comparadas ao controle.

No gráfico (B) demonstra-se a associação de Pp-óleo com o Celecoxibe, um antiinflamatório seletivo para COX-2. Essa associação, assim como a administração sozinho de Pp-óleo a 100mg/kg e a administração sozinho de Celecoxibe a 200mg/kg, reduziu significativamente o número de contorções abdominais. No entanto, essa associação quando comparada com a administração sozinho de Pp-óleo, não reduz significativamente o número de contorções o que não é observado quando se compara o Pp-óleo sozinho e a administração de Celecoxibe sozinho. No qual, podemos notar que Pp-óleo reduz cerca de 91% e Celecoxibe na dose de 200 mg/kg reduz aproximadamente 60% do número de contorções.

O pré-tratamento dos animais com naloxona (Nax), representado no gráfico (C), apresentou efeito significativo sobre a antinocicepção do teste de contorção. O desempenho da morfina e do Pp-óleo, quando administrados sozinhos, reduziu a partir de 90% o número de contorções abdominais. No entanto, Nax reverteu o efeito causado pela morfina em, aproximadamente, 29% e em Pp-óleo em cerca de 40%. O resultado dessa reversão é significativamente relevante para o entendimento do possível mecanismo de ação utilizado pelo Pp-óleo.

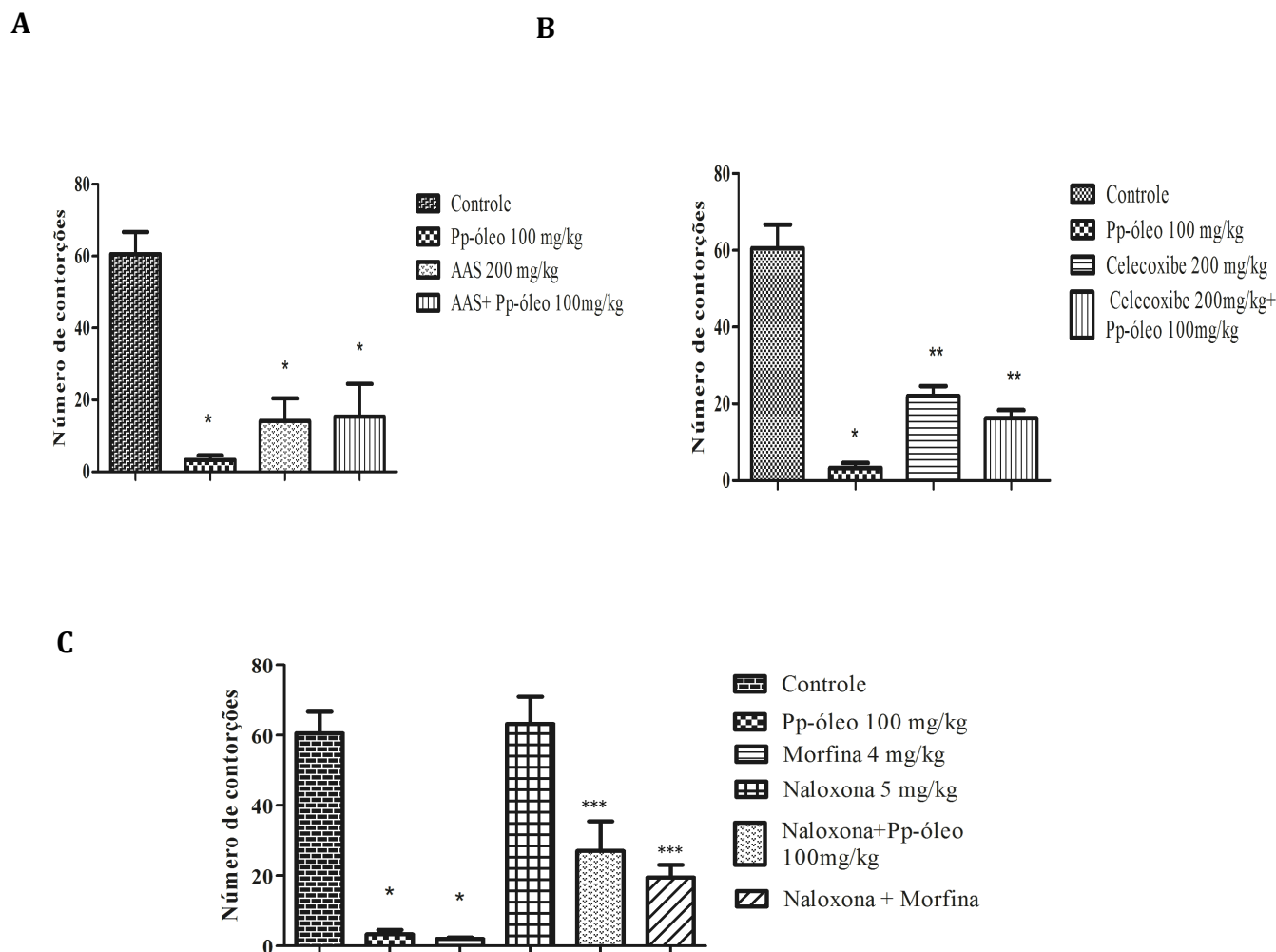


Figura 8. Mecanismo de ação. Cada grupo representa a média $\pm$ desvio padrão de 5 animais. * $p < 0,05$ quando comparado com o controle de valor; ** $p < 0,05$ para quando comparado com Pp-óleo; *** $p < 0,05$ quando comparado com agonista mais antagonista contra agonista sozinho.

Para verificar se o possível mecanismo opióide do Pp-óleo possui atividade central, foram utilizados testes neurocomportamentais de avaliação do sistema motor. Dentre os quais, foram escolhidos o campo aberto, o pole teste e o rotarod.

No gráfico (A) da figura 9, verifica-se a distância total percorrida pelo animal com administração de Pp-óleo a 100mg/kg em comparação com o controle basal. Não se encontrou diferença significativa, uma vez que ambos os grupos percorreram entre 10 a 15 metros no total. Já no gráfico (B), também de campo aberto, observou-se o número de vezes em que o animal ficou sobre duas patas. Mais uma vez não foi observada uma diferença significativa já que o número de levantamentos ficou em aproximadamente 5 para o controle basal e 7 para o grupo de animais que consumiu Pp-óleo a 100mg/kg.

O teste seguinte, apresentado no gráfico (C), foi o pole test e nele foi avaliado o tempo em que o animal levava para descer do topo de uma haste de madeira. Os animais que receberam o Pp-óleo levaram um pouco mais de 40 segundos enquanto que os animais do grupo controle levaram cerca de 60 segundos para descer. A pequena diferença não mostrou-se significativa no teste estatístico aplicado.

O último teste utilizado, o rotarod, usado para medir coordenação, planejamento e exploração natural, foi medido por tempo de latência, como pode ser observado no gráfico (D). As primeiras barras, denominadas treino, representam a ambientação do animal ao aparelho. As barras que se seguem mostram as quatro vezes em que o exercício foi imposto e analisado. Nota-se que as diferenças entre o grupo controle e o grupo do Pp-óleo são mínimas e geram um resultado de diferença não significativa.

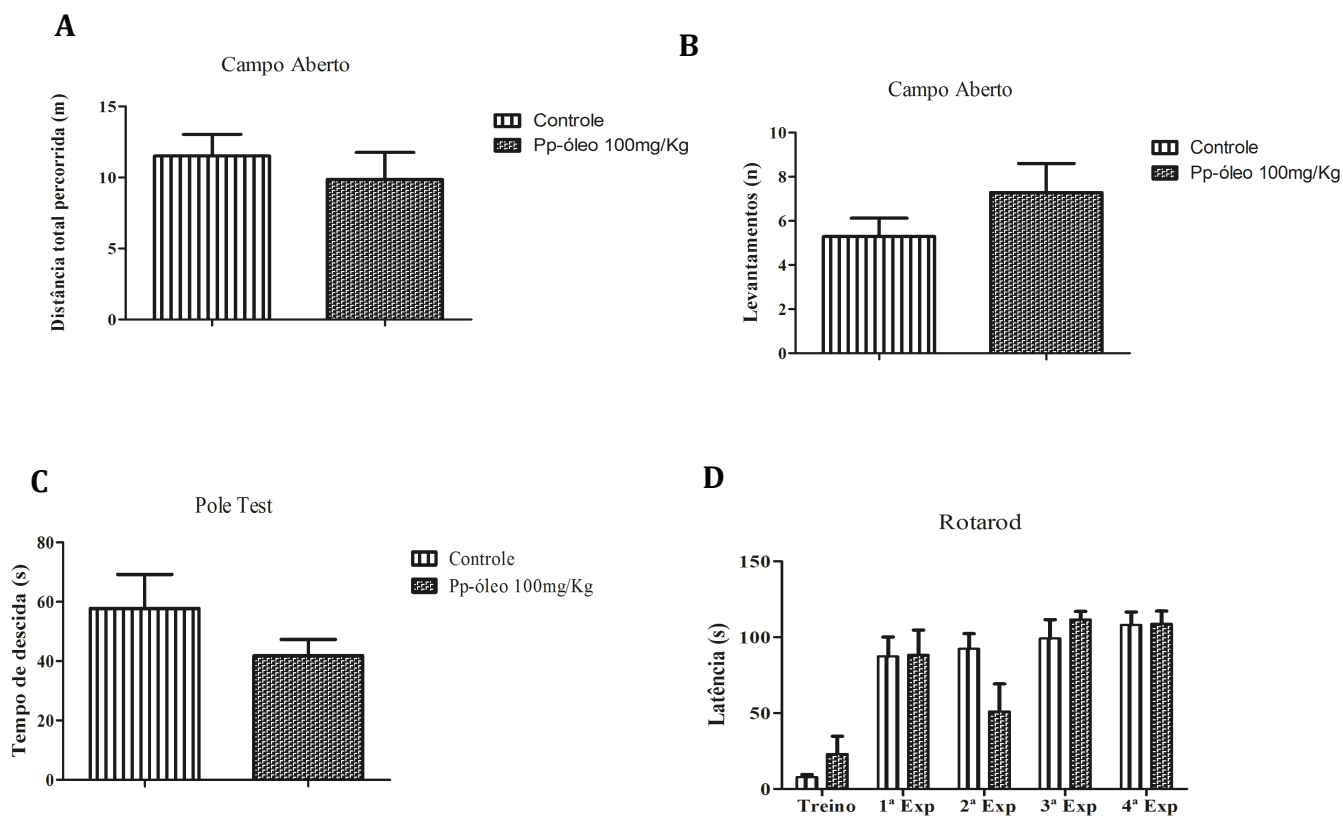


Figura 9. Avaliação do sistema motor com modelos neurocomportamentais: (A) Campo aberto; distancia percorrida , (B), Campo aberto; levantamento, (C) Pole test; tempo de descida, (D) Rotarod; tempo de latência. Teste – t não- pareado. Todos os grupos apresentaram $p > 0.05$.

6. DISCUSSÃO

Pp-óleo é muito utilizado pela população ribeirinha para o tratamento e alívio da dor provocada por artrite e reumatismos, muito embora sua eficácia ainda não tenha sido comprovada na literatura. Os estudos sobre esse gênero da família Euphorbiaceae detêm-se na sua caracterização morfológica e composição de seus óleos (GILLESPIE; ARMBUSTER, 1997 ; RIBEIRO, 2005; RODRÍGUEZ, 2011). Dessa forma, torna-se extremamente necessário esclarecer sua possível ação antinociceptiva e esclarecer por qual mecanismo de ação age.

Para se verificar a existência de antinocicepção é importante utilizar pelo menos três modelos diferentes de indução de dor. Portanto, para verificar a provável ação analgésica do Pp-óleo foram utilizados modelos de indução a dor por estímulo químico, nesse caso a contorção abdominal por ácido acético em concentrações nocivas porém não fatais, o estímulo térmico, característica do modelo de placa quente, e o estímulo bifásico provocado pelo teste de formalina. A razão disso se faz por que a dor se apresenta de diversas formas e utiliza caminhos diferentes para levar a informação de dor ao córtex. Além disso, essa informação é necessária para elucidar o possível mecanismo de ação do Pp-óleo.

O primeiro ensaio escolhido para verificar sua potencial ação antinociceptiva foi o modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético. Esse estudo é reconhecido e bastante utilizado na literatura como indutor de dor e importante rastreador de possíveis ações antinociceptivas (LANGFORD et al., 2010 ; SILVA et al., 2013 ; GUPTA et al., 2015 ; NAGHIZADEH; MANSOURI; GHORBANZADEH, 2015). Se caracteriza por uma irritação local, provocada por um agente químico em concentração nociva, aplicado na cavidade intraperitoneal.

Esse estímulo desencadeia uma variedade de mediadores, tais como bradicinina, substância P, assim como algumas citocinas, tais como IL-1 β , TNF- α e IL -8 e as prostaglandinas, especialmente PGI₂ que está bastante presente no trato gastrointestinal. (CORREA et al., 1996; RIBEIRO et al., 2000 ; UGWAH-OGUEJIOFOR et al., 2013). Estes mediadores podem provocar a diminuição do limiar doloroso e assim ativar nociceptores sensíveis que contribuem para o surgimento da dor inflamatória. Nesse modelo, Pp-óleo se mostrou capaz de reduzir a contorção em doses de 25, 50 e 100 mg/kg, sendo que esta última dose foi capaz de reduzir o número de contorções em pouco mais de 90%. Esse resultado sugere que existe uma atividade antinociceptiva e que esta poderia estar relacionada com a inibição da liberação de mediadores em resposta ao ácido acético. Além disso, Pp-óleo pode estar agindo na inibição da produção de uma série de proteínas inflamatórias, incluindo COX-2, NO síntase induzível, o TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12 em células endoteliais, monócitos, macrófagos e culturas de células dendríticas. É importante ressaltar que a redução do número de contorções ocorreu de forma dose-dependente e que a dose de melhor eficácia foi a de 100 mg/kg.

O modelo de placa quente é reconhecido na literatura como um importante método de screening de atividade antinociceptiva (SILVA et al., 2013). Ele objetiva analisar o tempo de latência em que o animal permanece na placa aquecida a 55° C até reagirem com o saltar ou o lambem de patas. Essas aferições de

tempo ocorrem em um período de 30 em 30 minutos durante duas horas. É um teste de antinocicepção central já que apenas analgésicos que agem a nível central conseguem aumentar o tempo de permanência do animal na placa, ou seja, elevam o limiar da dor em relação a temperatura. Em particular, os agentes opióides exercem os seus efeitos analgésicos via receptores supra-espinal e respondem bem a esse modelo. Por esse motivo, utilizou-se a morfina como controle positivo para esse teste (ZAKARIA et al., 2008 ; XU et al., 2014).

Nesse método, Pp-o óleo não alterou o tempo latência para saltar ou lambar quando comparado ao controle. Isso corrobora com as observações comportamentais dos animais que apresentavam piloereção quando colocados em contato com a placa quente. Já a morfina, exerceu uma analgesia central sendo capaz de aumentar o tempo de permanência do animal na placa quente quando comparado com o controle. Estes resultados são sugestivos de uma ação de antinocicepção Pp-óleo através de um mecanismo periférico, em vez de um mecanismo de ação central.

Em se tratando do teste de formalina, acredita-se que seja o modelo que se assemelha a dor clínica de forma mais estreita em comparação com outros testes antinociceptivos (TJØLSEN; HOLE, 1997; CAPONE; ALOISI, 2014). Este teste é caracterizado pela aplicação subcutânea de formalina a uma concentração nociva porém não fatal, na pata direita traseira do animal. Essa aplicação pode gerar um comportamento diferenciado, como lambar de patas. Esse comportamento é a resposta nociceptiva gerada pelo estímulo químico que a formalina causa ao estimular as fibras nociceptivas. Essa resposta acontece em duas fases distintas, cada uma envolvendo um mecanismo diferente e portanto, sendo chamado de modelo bifásico.

A primeira fase (dor neurogênica), que dura os primeiros cinco minutos após a aplicação de formalina intraplantar, resulta da estimulação química direta de fibras nociceptivas mielinizadas e não mielinizadas aferentes, principalmente fibras C, que podem ser suprimidos por medicamentos analgésicos opióides como a morfina (AMARAL et al., 2007 ; GONÇALVES et al., 2008). Após um período de quiescência de 10 minutos, acontece a segunda fase, conhecida como fase inflamatória, na qual mediadores inflamatórios nos tecidos periféricos, tais como as prostaglandinas, a histamina e a bradicinina, induzem alterações funcionais nos neurônios do corno da raiz dorsal da medula e que, a longo prazo, podem promover a facilitação da transmissão sináptica ao nível espinal (KHANNA; BHATIA, 2003 ; OLIVEIRA; SOUZA; ALMEIDA, 2008 ; WANG et al., 2014). Neste modelo, Pp-óleo inibiu a resposta de lambar de patas na segunda fase (Figura 7), apesar de não ter obtido nenhuma redução significativa no tempo de latência da primeira fase. Esse resultado sugere que Pp-óleo exerça sua atividade antinociceptiva em ligação com os mecanismos periféricos, uma vez que não obteve uma redução na resposta nociceptiva na fase neurogênica, que é caracterizada por estimulação direta dos nociceptores, enquanto que na fase inflamatória onde há a presença de mediadores inflamatórios, Pp-óleo obteve uma redução significativa na resposta nociceptiva.

Os três testes importantes para o reconhecimento de uma atividade analgésica foram realizados e obtiveram uma resposta positiva para a ação antinociceptiva do Pp-óleo. Uma vez determinada sua atuação como agente antinociceptivo natural, torna-se de extrema importância conhecer o mecanismo pelo qual Pp-óleo está exercendo sua atividade antinociceptiva.

Portanto, realizou-se novamente o teste de contorção induzida por ácido acético, por ser um teste de fácil manipulação e por proporcionar a associação entre Pp-óleo e medicamentos padrão para o tratamento de dor.

Primeiramente, estudou-se a possível chance do mecanismo utilizado ser via antiinflamatório não específico para COX, por esse motivo utilizou-se o AAS como controle positivo de antiinflamatório. Comparou-se, então, as respostas produzidas pelo Pp-óleo em administração sozinha na dose de 100mg/kg, a administração de AAS na dose de 200mg/kg e, por fim, uma associação entre Pp-óleo na dose de 100mg/kg (administrado primeiro) e AAS na dose de 200mg/kg. Tanto Pp-óleo a 100mg/kg quanto AAS a 200 mg/kg e a associação entre Pp-óleo e AAS, obtiveram redução significativa no número de contorções. No entanto, quando comparados entre si, não obtiveram uma redução significativa o que sugere que a atividade não esteja associada ao mecanismo de antiinflamatórios não seletivos.

O segundo grupo a ser testado foi o de antiinflamatórios seletivos a COX-2, justamente por sua seletividade, esse grupo foi escolhido para estudar a elucidação do mecanismo de ação de Pp-óleo. No entanto, apesar de todos os grupos apresentados (Pp-óleo 100mg/kg, Celecoxibe 200mg/kg, associação Pp-óleo 100mg/kg e Celecoxibe 200mg/kg) reduzirem significativamente o número de contorções, eles não reduziram significativamente o número de contorções quando comparados entre si. Apenas houve uma diferença significativa entre a administração sozinha de Pp-óleo e Celecoxibe. O qual apresenta o Pp-óleo como melhor escolha por reduzir cerca de 91% da resposta nociceptiva enquanto que Celecoxibe reduz aproximadamente 60% da mesma resposta. Esse resultado sugere, mais uma vez, que o mecanismo de Pp-óleo provavelmente não está associado com a via das ciclooxigenases.

Por último, foi analisado o grupo de opióides. Sendo então comparado Pp-óleo na dose de 100mg/kg, morfina na dose de 4mg/kg, naloxona (antagonista opióide) na dose de 5 mg/kg, associação entre morfina e naloxona e associação entre Pp-óleo e Naloxona. O objetivo do teste foi verificar se a naloxona associada com Pp-óleo provocaria uma reversão no quadro de contorções gerado pelo Pp-óleo sozinho, assim como ela faz com a morfina.

O antagonismo da Naloxona por receptores opióides já é conhecido na literatura e até mesmo utilizado em casos de overdose de opióides (STRANG et al, 2016). Sua administração pode provocar uma competição entre agonista e antagonista pelo sítio de ligação e assim reduzir o efeito do agonista opióide em questão.

A naloxona, mostrou uma influência significativa sobre a atividade antinociceptiva de Pp-óleo (100 mg / kg, p.o.), revertendo a inibição das contorções provocadas pela administração de ácido acético de 90% para 50% , um aumento, portanto, de cerca de 40% no número de contorções. A morfina teve

comportamento parecido quando associado a naloxona, revertendo a inibição da contorção em 29%. Esse resultado sugere a participação parcial do sistema opióide na modulação da dor provocada pela administração de Pp-óleo.

Apesar desse resultado significativo para a elucidação do mecanismo de ação, outros testes como a placa quente e a primeira fase da formalina sugerem que não há participação de Pp-óleo no sistema nervoso central, característica de um opióide como a morfina. Para validar esses testes e verificar se a participação de Pp-óleo está presente apenas na via periférica, foram aplicados os testes neurocomportamentais de análise de sistema locomotor: campo aberto, pole teste e rotarod (figura 9).

O modelo de campo aberto é um dos ensaios mais utilizados na literatura (WALSH; CUMMIS, 1976) e que quantifica o comportamento animal em vários padrões. Um dos mais conhecidos é a demonstração de comprometimento locomotor por avaliação de distância percorrida e número de vezes em que o animal fica sob duas patas. Em caso de uma influência negativa sobre o sistema nervoso central do animal, devido a uma substância que possa atravessar a barreira hematoencefálica ou alguma lesão comprometedora do sistema, a execução do exercício será afetada, de modo que o animal terá dificuldade de se locomover e de permanecer sobre duas patas. O que não foi observado quando foi administrado o Pp-óleo. Tanto a distância percorrida quanto o número de levantamentos não foram alterados quando comparados com o controle basal. Esse resultado infere que Pp-óleo não causa comprometimento locomotor e provavelmente não age a nível central.

O segundo modelo utilizado foi o pole test. Esse ensaio foi utilizado pela primeira vez para quantificar a bradicinesia presente na doença de Parkinson (MATSUURA et al.,1997 ; OHNO et al., 2008) e consistem em avaliar o tempo que o animal leva para descer do alto de uma haste disposta verticalmente até a base do aparelho. Esse tempo de descida é importante na avaliação da perda de movimentos automáticos, na lentidão dos movimentos e na dificuldade para se começar e executar o exercício. Caso haja algum comprometimento nos receptores de dopamina 2 (D2) do sistema motor, esse será identificado no teste como o aumento do tempo em que o animal demora para realizar o exercício ou a incapacidade do mesmo de realizá-lo. Esse comprometimento de D2 pode ser causado por lesões no sistema nervoso central, por algum antagonista de D2, depleção de dopamina, neurotoxinas ou substâncias capazes de atravessar a barreira hematoencefálica e se ligar aos receptores de forma a causar bradicinesia. Nesse teste, Pp-óleo na dose de 100mg/kg não demonstrou nenhuma alteração no tempo de descida comparado com o controle basal. O que demonstra, mais uma vez, sua não participação no sistema nervoso central, e ainda mais , uma possível não afinidade por receptores dopaminérgicos D2.

O último teste de validação e demonstração da não participação de Pp-óleo na via central do sistema nervoso, foi o rotarod. Esse teste, muito comum na avaliação de déficits neurológicos, se caracteriza por analisar a coordenação motora, a exploração natural e o planejamento de movimentos. Após ambientação, submete-se o animal a quatro treinos em que se mede o tempo de latência, ou resistência a queda, em que o animal permanece no treino. Quanto menor o tempo que o animal realiza, menor a latência e maior o

comprometimento do sistema locomotor, uma vez que mostra a dificuldade do animal em realizar o teste, que consistem em andar em uma base rotatória com velocidade padrão de oito rpm, sem cometer quedas. Pp-óleo não demonstrou nenhuma diferença significativa quando comparado ao grupo controle basal o que reforça ainda mais os resultados anteriores de que Pp-óleo não tem ação central.

Com todos os resultados apresentados é importante ressaltar que, por mais que não haja ação central por parte de Pp-óleo, ele ainda exerce uma significativa atividade antinociceptiva e com possível participação do sistema opióide. Sendo assim, Pp-óleo pode ser considerado um óleo com atividade analgésica de via periférica e com provável participação no sistema opióide.

7. CONCLUSÃO

Demonstrou-se que a Pp-óleo exibiu uma atividade antinociceptiva dose-dependente, quando avaliada em modelo químico, mas não em modelo térmico de nocicepção em camundongos. Pp-óleo tem atividade analgésica, a qual é provavelmente de origem periférica, uma vez que não houve alteração nenhuma nos padrões de locomoção dos animais submetidos a tratamento com Pp-óleo. Os mecanismos envolvidos não foram completamente compreendidos, no entanto, os resultados sugerem que os receptores opióides estão envolvidos na atividade antinociceptiva do Pp-óleo.

8. REFERÊNCIAS

ADAMS, R.P. **Identification of Essencial Oil Components by Gas Chromatography/ Mass Spectrometry**. 4th ed.; Allured Publishing Corporation: Carol stream, USA, 2007.

AKIL, H. et al. Endogenous Opioids: Biology and Function. **Annu. Rev. Neurosci.**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.223-255, mar. 1984. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ne.07.030184.001255>.

ALEXEEFF, G. V. et al. Characterization of the LOAEL-to-NOAEL Uncertainty Factor for Mild Adverse Effects from Acute Inhalation Exposures. **Regulatory Toxicology And Pharmacology**, [s.l.], v. 36, n. 1, p.96-105, ago. 2002. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/rtp.2002.1562>.

ALLEN, R.. **David Hartley on Human Nature**. New York: State University Of New York Press, 1999. 469 p. (SUNY series in the philosophy of psychology). ISBN: 0791442349, 9780791442340.

AMARAL, J. F. et al. Antinociceptive Effect of the Monoterpene R-(+)-Limonene in Mice. **Biol. Pharm. Bull.**, [s.l.], v. 30, n. 7, p.1217-1220, 2007. Pharmaceutical Society of Japan. <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.30.1217>.

ALMEIDA, M. C.; VIZIN, R. C. L.; CARRETTIERO, D. C.. Current understanding on the neurophysiology of behavioral thermoregulation. **Temperature**, [s.l.], v. 2, n. 4, p.483-490, out. 2015. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/23328940.2015.1095270>.

AUDET, N. et al. Sélectivité fonctionnelle des ligands des récepteurs opiacés. **Medecine/sciences**, Paris, v. 26, n. 8-9, p.734-739, ago. 2010. EDP Sciences. <http://dx.doi.org/10.1051/medsci/2010268-9734>.

BANNISTER, K.; DICKENSON, A. H.. What do monoamines do in pain modulation? **Current Opinion In Supportive And Palliative Care**, [s.l.], v. 10, n. 2, p.143-148, jun. 2016. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/spc.0000000000000207>.

BARS, D. L.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W.. Animal Models of Nociception. **Pharmacological Reviews**, [s.l.], v. 53, n. 4, p.597-652, dez. 2001.

BIERI, D. et al. The faces pain scale for the self-assessment of the severity of pain experienced by children: Development, initial validation, and preliminary investigation for ratio scale properties. **Pain**, [s.l.], v. 41, n. 2, p.139-150, maio 1990. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). [http://dx.doi.org/10.1016/0304-3959\(90\)90018-9](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3959(90)90018-9).

BOTTING, R.. COX-1 and COX-3 inhibitors. **Thrombosis Research**, [s.l.], v. 110, n. 5-6, p.269-272, jun. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0049-3848\(03\)00411-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0049-3848(03)00411-0).

BREATHNACH, C. S.. Charles Scott Sherrington (1857–1952). **Journal Of Neurology**, [s.l.], v. 252, n. 8, p.1000-1001, ago. 2005. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s00415-005-0950-5>.

BROOKS, S. P.; DUNNETT, S. B.. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. **Nature Reviews Neuroscience**, [s.l.], v. 10, n. 7, p.519-529, 10 jun. 2009. Nature Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn2652>.

CALDER, P. C.. Mechanisms of Action of (n-3) Fatty Acids. **Journal Of Nutrition**, [s.l.], v. 142, n. 3, p.592-599, 25 jan. 2012. American Society for Nutrition. <http://dx.doi.org/10.3945/jn.111.155259>.

CAPONE, F.; ALOISI, A. M.. Refinement of pain evaluation techniques. The formalin test. **Annali Dell'istituto Superiore di Sanità**, Rome, v. 40, n. 2, p.223-229, mar. 2004.

CARQUEIJA, E. A prática religiosa e a percepção do sofrimento: Um estudo em doentes com cancro e em doentes com dor crônica. **Cadernos de Saúde**, Lisboa, v. 2, n. 1, p.7-40. 2009. ISSN 1647-0559.

CARVALHO, D. S.; KOWACS, P. A.. Avaliação da intensidade de dor. **Migrêneas Cefaléias**, São Paulo, v. 9, n. 4, p.164-168, dez. 2006.

CASHMAN, J. N.. The Mechanisms of Action of NSAIDs in Analgesia. **Drugs**, [s.l.], v. 52, n. 5, p.13-23, nov. 1996. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.2165/00003495-199600525-00004>.

CERVERO, F.. Visceral Pain: Mechanisms of Peripheral and Central Sensitization. **Annals Of Medicine**, [s.l.], v. 27, n. 2, p.235-239, abr. 1995.

CERVERO, F.; LAIRD, J. M.. From acute to chronic pain: mechanisms and hypotheses. **Prog Brain Res**, [s.l.], v. 110, n. 1, p.3-15. 1996.

CERVERO, F.; LAIRD, J. M. A.. Visceral pain. **The Lancet**, [s.l.], v. 353, n. 9170, p.2145-2148, jun. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(99\)01306-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(99)01306-9).

CHRISTIE, M. J. et al. Cellular Actions Of Opioids And Other Analgesics: implications For Synergism In Pain Relief. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, [s.l.], v. 27, n. 7, p.520-523, jul. 2000. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1440-1681.2000.03291.x>.

CHRISTIE, W.W. Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. In **Advances in Lipid Methodology**; Christie, W.W., Ed.; Oil Press: Dundee, 1993.

CHUNG, P. C. S.; KIEFFER, B. L.. Delta opioid receptors in brain function and diseases. **Pharmacology & Therapeutics**, [s.l.], v. 140, n. 1, p.112-120, out. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.06.003>.

CORREA, C. R. et al. Antinociceptive profile of the pseudopeptide B2 bradykinin receptor antagonist NPC 18688 in mice. **British Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 117, n. 3, p.552-558, fev. 1996. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.1996.tb15226.x>.

CUNHA, T. M. et al. Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3K /AKT/nNOS/NO/KATP signaling pathway. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 107, n. 9, p.4442-4447, 10 fev. 2010. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0914733107>.

CURI, R. **Fisiologia basica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. 855 p.

DIAZ-FRANULIC, I. et al. Allosterism and Structure in Thermally Activated Transient Receptor Potential Channels. **Annu. Rev. Biophys.**, [s.l.], v. 45, n. 1, p.371-398, jul. 2016. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-biophys-062215-011034>.

DIRIG, D. M. et al. Characterization of variables defining hindpaw withdrawal latency evoked by radiant thermal stimuli. **Journal Of Neuroscience Methods**, [s.l.], v. 76, n. 2, p.183-191, out. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0165-0270\(97\)00097-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0165-0270(97)00097-6).

DUARTE, D. F.. Uma breve história do ópio e dos opióides. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, [s.l.], v. 55, n. 1, p.135-146, fev. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s0034-70942005000100015>.

DUBIN, A. E.; PATAPOUTIAN, A.. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **Journal Of Clinical Investigation**, [s.l.], v. 120, n. 11, p.3760-3772, 1 nov. 2010. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci42843>.

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

FERNANDES, B. H. P.; GOMES, C.r. G.. Mecanismos e aspectos Anatômicos da Dor. **Rev. Saúde e Pesquisa**, Maringá, v. 4, n. 2, p.237-246, ago. 2011. ISSN 1983-1870.

FORTUNATO, J. G. S. et al. Escalas de dor no paciente crítico: uma revisão integrativa. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, [s.l.], v. 12, n. 3, p.1-11, 30 set. 2013. Universidade de Estado do Rio de Janeiro. <http://dx.doi.org/10.12957/rhupe.2013.7538>.

GAVÉRIAUX-RUFF, C.; KIEFFER, B. L.. Delta opioid receptor analgesia: recent contributions from pharmacology and molecular approaches. **Behavioural Pharmacology**, [s.l.], v. 22, n. 5-6, p.405-414, set. 2011. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/fbp.0b013e32834a1f2c>.

GILLESPIE, J. L.; ARMBRUSTER, W. S.. **A contribution to the Guianan flora : Dalechampia, Haematostemon, Omphalea, Pera, Plukenetia, and Tragia (Euphorbiaceae) with notes on subfamily Acalyphoideae**. Series: Smithsonian contributions to botany. Washington, D.c: Smithsonian Institution Press, 1997. (86).

GHOSH, A. et al. Why individual thermo sensation and pain perception varies?: Clue of disruptive mutations in TRPVs from 2504 human genome data. **Channels**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.1-7, mar. 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/19336950.2016.1162365>.

GHS - **The Globally Harmonized System of classification and labelling of chemicals. Health and Environmental Hazards Classification Criteria for Substances**, 2nd ed., United Nations Economics Commission for Europe, 2007 (http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/GHS_presentations/English/health_env_sub_e.pdf).

GONÇALVES, J. C. R. et al. Antinociceptive Activity of (-)-Carvone: Evidence of Association with Decreased Peripheral Nerve Excitability. **Biol. Pharm. Bull.**, [s.l.], v. 31, n. 5, p.1017-1020, 2008. Pharmaceutical Society of Japan. <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.31.1017>.

GRIMBLE, R. F.; TAPPIA, P. S.. Modulation of pro-inflammatory cytokine biology by unsaturated fatty acids. **Z Ernahrungswiss Journal**, [s.l.], v. 37, n. 1, p.57-65, set. 1998.

GUIRIMAND, F.; BARS, D. L.. Physiologie de la nociception. **Annales Françaises D'anesthésie Et de Réanimation**, [s.l.], v. 15, n. 7, p.1048-1079, jan. 1996. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0750-7658\(96\)89477-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0750-7658(96)89477-9).

GUNSTONE, F.D.; SHUKA, V.K.S. NMR of lipids. **Ann. Rep. NMR Spectrosc.** 1995, 31, 219-237.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E.. **Tratado de fisiologia médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 1216 p.

GUPTA, A. K. et al. Analgesic and Anti-Inflammatory Properties of Gelsolin in Acetic Acid Induced Writhing, Tail Immersion and Carrageenan Induced Paw Edema in Mice. **Plos One**, [s.l.], v. 10, n. 8, p.1-16, 14 ago. 2015. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0135558>.

HERSH, E. V.; LALLY, E. T.; MOORE, P. A.. Update on cyclooxygenase inhibitors: has a third COX isoform entered the fray?. **Current Medical Research And Opinion**, [s.l.], v. 21, n. 8, p.1217-1226, jul. 2005. Informa Healthcare. <http://dx.doi.org/10.1185/030079905x56367>.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K.. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, [s.l.], v. 30, n. 1, p.103-114, jul. 1987. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). [http://dx.doi.org/10.1016/0304-3959\(87\)90088-1](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3959(87)90088-1).

IGGO, A.; STEEDMAN, W. M.; FLEETWOOD-WALKER, S.. Spinal Processing: Anatomy and Physiology of Spinal Nociceptive Mechanisms. **Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences**, [s.l.], v. 308, n. 1136, p.235-252, fev. 1985. The Royal Society. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.1985.0024>.

KHAN, G.R.; SCHEINMANN, F. Some recent advances in physical methods for analysis and characterization of polyunsaturated fatty acids. **Prog. Chem. Fats other Lipids**, v.15, p.343-367.1978

KHAN, M. A.; RAZA, F.; KHAN, I. A.. Pain: history, culture and philosophy. **Acta Med Hist Adriat**, Ras Al Khaimah, v. 13, n. 1, p.113-130, jul. 2015

KHANNA, N.; BHATIA, J.. Antinociceptive action of Ocimum sanctum (Tulsi) in mice: possible mechanisms involved. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 88, n. 2-3, p.293-296, out. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-8741\(03\)00215-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-8741(03)00215-0)

KART, T.; CHRISTRUP, L.; RASMUSSEN, M.. Recommended use of morphine in neonates, infants and children based on a literature review: Part 2-Clinical use. **Pediatric Anesthesia**, [s.l.], v. 7, n. 2, p.93-101, 28 jun. 2008. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9592.1997.tb00488.x>.

KHALFOUN, B. et al. Docosahexaenoic and Eicosapentaenoic Acids Inhibit Human Lymphoproliferative Responses In Vitro but not the Expression of T Cell Surface Activation Markers. **Scandinavian Journal Of Immunology**, v. 43, n. 3, p.248-256, mar. 1996. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3083.1996.d01-42.x>.

KNOTHE, G.; KENAR, J. A.. Determination of the fatty acid profile by ¹H-NMR spectroscopy. **European Journal Of Lipid Science And Technology**, [s.l.], v. 106, n. 2, p.88-96, fev. 2004. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.200300880>.

KOSTER, R. ; ANDERSON, M.; DE BEER, E.J. Acetic acid for analgesic screening. **Fed. Proc**, v. 18, 412-418.1959.

LAGO-RIZZARDI, C. D.; TEIXEIRA, M. J.; SIQUEIRA, Srdt. Espiritualidade e religiosidade no enfrentamento da dor. **O Mundo da Saúde**, São Paulo, v. 34, n. 4, p.483-487. 2010.

LAIRD, J. M. A. New Methods for the Study of Acute and Chronic Visceral Pain in Experimental Animals. **Kopf Carrier Newsletter**, Tujunga, v. 42, n. 1, p.1-6, abr. 1996.

LAIRD, J. M. A.; CERVERO, F.. Looking at visceral pain: New vistas. **Scandinavian Journal Of Pain**, [s.l.], v. 2, n. 3, p.93-94, jul. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjpain.2011.05.002>.

LANGFORD, D. J. et al. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. **Nature Methods**, [s.l.], v. 7, n. 6, p.447-449, maio 2010. Nature Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1455>.

LAPORTE, Y.. Charles-Édouard Brown-Séquard. An eventful life and a significant contribution to the study of the nervous system. **Comptes Rendus Biologies**, [s.l.], v. 329, n. 1, p.363-368, maio 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.crv.2006.03.007>.

MACDONAL, A. D. et al. Analgesic action of pethidine derivatives and related compounds. **British Journal of Pharmacology**, v. 1, 4-14.1946.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, [s.l.], v. 25, n. 3, p.429-438, maio 2002. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422002000300016>.

MAKKAR, H. P. S. et al. Studies on Nutritive Potential and Toxic Constituents of Different Provenances of *Jatropha curcas*. **J. Agric. Food Chem.**, [s.l.], v. 45, n. 8, p.3152-3157, ago. 1997. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf970036j>.

MALLA, M.; SEETHARAM, M.. To treat or not to treat: A rare case of pseudo-thrombotic thrombocytopenic purpura in a Jehovah's Witness. **Transfusion**, [s.l.], v. 56, n. 1, p.160-163, set. 2015. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/trf.13285>.

MATSUURA, K. et al. Pole test is a useful method for evaluating the mouse movement disorder caused by striatal dopamine depletion. **Journal Of Neuroscience Methods**, [s.l.], v. 73, n. 1, p.45-48, abr. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0165-0270\(96\)02211-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0165-0270(96)02211-x).

MERSKEY, H. et al. **Classification of chronic pain**: Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. 2. ed. Seattle: Iasp Press, 1994. 238 p.

MICELI, A. V. P.. Dor crônica e subjetividade em oncologia. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 48, n. 3, p.363-373, jul. 2002.

MILLAN, M. J.. The induction of pain: an integrative review. **Progress In Neurobiology**, [s.l.], v. 57, n. 1, p.1-164, jan. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0301-0082\(98\)00048-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0301-0082(98)00048-3).

MILLER, L. C.; TAINTER, M. L.. Estimation of the ED50 and Its Error by Means of Logarithmic-Probit Graph Paper. **Experimental Biology And Medicine**, [s.l.], v. 57, n. 2, p.261-264, 1 nov. 1944. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.3181/00379727-57-14776>.

MOAYEDI, M.; DAVIS, K. D.. Theories of pain: from specificity to gate control. **Journal Of Neurophysiology**, [s.l.], v. 109, n. 1, p.5-12, out. 2012. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/jn.00457.2012>.

MONTEIRO-STEAGALL, B. P.; STEAGALL, P. V. M.; LASCELLES, B. D. X.. Systematic Review of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug-Induced Adverse Effects in Dogs. **Journal Of Veterinary Internal Medicine**, [s.l.], v. 27, n. 5, p.1011-1019, 19 jun. 2013. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/jvim.12127>.

NAGHIZADEH, B.; MANSOURI, M. T.; GHORBANZADEH, B.. Ellagic acid enhances the antinociceptive action of carbamazepine in the acetic acid writhing test with mice. **Pharmaceutical Biology**, [s.l.], v. 54, n. 1, p.157-161, 21 abr. 2015. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/13880209.2015.1025288>.

OHNO, Y. et al. Evaluation of bradykinesia induction by SM-9018, a novel 5-HT2 and D2 receptor antagonist, using the mouse pole test. **Pharmacology Biochemistry And Behavior**, [s.l.], v. 49, n. 1, p.19-23, set. 1994. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0091-3057\(94\)90451-0](http://dx.doi.org/10.1016/0091-3057(94)90451-0).

OHNO, Y. et al. Evaluation of the antibradykinetic actions of 5-HT1A agonists using the mouse pole test. **Progress In Neuro-psychopharmacology And Biological Psychiatry**, [s.l.], v. 32, n. 5, p.1302-1307, jul. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2008.04.005>.

OLIVEIRA, F. S.; SOUSA, D. P.; ALMEIDA, R. N.. Antinociceptive Effect of Hydroxydihydrocarvone. **Biol. Pharm. Bull.**, [s.l.], v. 31, n. 4, p.588-591, 2008. Pharmaceutical Society of Japan. <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.31.588>.

ORSINI, M. et al. Frida Kahlo: a arte como desafio à deficiência e à dor,: com enfoque napoliomielite anterior aguda. **Rev. Bras. Neurol**, [s.l.], v. 44, n. 3, p.5-12, set. 2008.

O'SHEA, M.; BASSAGANYA-RIERA, J.; MOHEDE, I. C.. Immunomodulatory properties of conjugated linoleic acid1,2,3. **Am J Clin Nutr**, [s.l.], v. 79, n. 6, p.1199-1206, jun. 2004.

PIMENTA, C. A. M. ; PORTNOI, A. G.. Dor e Cultura. In: CARVALHO, M. M. **Dor: um Estudo Multidisciplinar**. Summus, São Paulo, 1999, p.159-73.

PEREIRA, A. P. S.; ZAGO, M. M. F.. As influências culturais na dor do paciente cirúrgico. **Revista da Escola de Enfermagem da Usp**, [s.l.], v. 32, n. 2, p.144-152, ago. 1998. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0080-62341998000200008>.

PERL, E. R.. Ideas about pain, a historical view. **Nature Reviews Neuroscience**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.71-80, jan. 2007. Nature Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn2042>.

POLETINI, M. O. et al. TRP channels: a missing bond in the entrainment mechanism of peripheral clocks throughout evolution. **Temperature**, [s.l.], v. 2, n. 4, p.522-534, out. 2015. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/23328940.2015.1115803>.

PORTNOI, A. G.. **Dor, Stress e Coping: Grupos Operativos em Doentes com Síndrome de Fibromialgia**. 1999. 256 f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Instituto de Psicologia, São Paulo, 1999.

PURVES, D. et al. **Neuroscience**. 5. ed. [s.l.]: Sinauer Associates, 2011. 759 p.

RAMOS, L. C. S. et al. Variability for oil and fatty acid composition in castorbean varieties. **J Am Oil Chem Soc**, [s.l.], v. 61, n. 12, p.1841-1843, dez. 1984. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02540812>.

, A. F.. Chemical and toxicological evaluation of the fatty oil from *Plukenetia polyadenia* Müll. Arg. (Euphorbiaceae). **Master's Degree Dissertation**, Graduate Program in Chemistry, Universidade Federal do Pará, Belém, Brazil, 2005.

RIBEIRO, R. A. et al. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **European Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 387, n. 1, p.111-118, nov. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0014-2999\(99\)00790-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0014-2999(99)00790-6).

RIEDEL, W.; NEECK, G.. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. **Zeitschrift Für Rheumatologie**, [s.l.], v. 60, n. 6, p.404-415, dez. 2001. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s003930170003>.

ROECKEL, L-A. et al. Opioid-induced hyperalgesia: Cellular and molecular mechanisms. **Neuroscience**, [s.l.], (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.06.029>

RODRIGUEZ, Á. et al. Diferenciación morfológica y por ISSR (Inter simple sequence repeats) de especies del género *Plukenetia* (Euphorbiaceae) de la Amazonía peruana: propuesta de una nueva especie. **Rev. peru biol**, [s.l.], v. 17, n.3, pp. 325-330. ISSN 1727-9933. 2010.

SARTI, C. A.. A dor, o indivíduo e a cultura. **Saúde e Sociedade**, São Paulo, v. 10, n. 1, p.3-13, jul. 2001.

SCHAIBLE, H. G.. Peripheral and Central Mechanisms of Pain Generation. In: ROSENTHAL, W. **Analgesia**. 177. ed. Thuringen: Springer-verlag Berlin Heidelberg, 2007. p. 3-28. (Handbook of Experimental Pharmacology).

SCLIAR, M.. História do conceito de saúde. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 1, p.29-41, abr. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-73312007000100003>.

SELIGMANN-SILVA, M.. Arte, dor e Kátharsis ou variações sobre a arte de pintar o grito. **Alea: Estudos Neolatinos**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.29-46, jul. 2003. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1517-106x2003000100003>.

SERINI, S. et al. Dietary n-3 Polyunsaturated Fatty Acids and the Paradox of Their Health Benefits and Potential Harmful Effects. **Chem. Res. Toxicol.**, [s.l.], v. 24, n. 12, p.2093-2105, 19 dez. 2011. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/tx200314p>.

SIQUEIRA-BATISTA, R. et al. Art and pain in Frida Kahlo. **Revista Dor: Pesquisa, clínica e terapêutica**, [s.l.], v. 15, n. 2, p.139-144, jul. 2014. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.5935/1806-0013.20140018>.

SILVA, J. C. et al. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. **Revista Brasileira de Farmácia**, [s.l.], v. 94, n. 1, p.18-23, fev. 2013.

SIMMONS, D. L.. Variants of cyclooxygenase-1 and their roles in medicine. **Thrombosis Research**, [s.l.], v. 110, n. 5-6, p.265-268, jun. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0049-3848\(03\)00380-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0049-3848(03)00380-3).

SHIBATA, M. et al. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, [s.l.], v. 38, n. 3, p.347-352, set. 1989. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). [http://dx.doi.org/10.1016/0304-3959\(89\)90222-4](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3959(89)90222-4).

SLATER, D. et al. Pharmacology of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs and Opioids. **Semin Intervent Radiol**, [s.l.], v. 27, n. 04, p.400-411, nov. 2010. Thieme Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0030-1267855>.

SOUSA, F. A. E. F.. Dor: o quinto sinal vital. **Revista Latino-americana de Enfermagem**, [s.l.], v. 10, n. 3, p.446-447, jun. 2002. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0104-11692002000300020>.

SOUSA, F. F. et al. Escala Multidimensional de Avaliação de Dor (EMADOR). **Rev. Latino - Am. Enfermagem**, São Carlos, v. 18, n. 1, p.1-9, fev. 2010.

STIEFEL, M.; SHANER, A.; SCHAEFER, S. D.. The Edwin Smith Papyrus: The Birth of Analytical Thinking in Medicine and Otolaryngology. **The Laryngoscope**, [s.l.], v. 116, n. 2, p.182-188, fev. 2006. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1097/01.mlg.0000191461.08542.a3>.

STRANG, J. et al. Naloxone without the needle – systematic review of candidate routes for non-injectable naloxone for opioid overdose reversal. **Drug And Alcohol Dependence**, [s.l.], v. 163, n. 1, p.16-23, jun. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2016.02.042>.

TATEM, K. S. et al. Behavioral and Locomotor Measurements Using an Open Field Activity Monitoring System for Skeletal Muscle Diseases. **Journal Of Visualized Experiments**, [s.l.], n. 91, p.1-7, 29 set. 2014. MyJove Corporation. <http://dx.doi.org/10.3791/51785>.

TICIANELI, J. G.; BARAUNA, M. A.. Teoria da neuromatrix: uma nova abordagem para o entendimento da dor fantasia. **Rev. Fisioter. Univ. Sao Paulo**, São Paulo, v. 9, n. 1, p.17-22, jun. 2002.

TJØLSEN, A. ; HOLE, K.. Animal Models of Analgesia. In: ROSENTHAL, W. **The Pharmacology of Pain**. 130. ed. Thuringen: Springer-verlag Berlin Heidelberg, 1997. p. 1-20. (Handbook of Experimental Pharmacology).

THE PLANT LIST, www.theplantlist.org/tpl/record/kew-161498, accessed January 2014.

THERNSTROM, M.. **As crônicas da dor: Tratamentos, mitos, mistérios, testemunhos e a ciência do sofrimento**. Rio de Janeiro: Objetiva Ltda, 2011. 406 p. Tradução de "The Pain Chronicles".

TOMINAGA, M.; JULIUS, D.. Capsaicin Receptor in the Pain Pathway. **The Japanese Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 83, n. 1, p.20-24, 2000. Japanese Pharmacological Society. <http://dx.doi.org/10.1254/jjp.83.20>.

TOMINAGA, M.; CATERINA, M. J.. Thermosensation and pain. **Journal Of Neurobiology**, [s.l.], v. 61, n. 1, p.3-12, maio 2004. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/neu.20079>.

TOMINAGA, M.. Nociception and TRP channels. In: ROSENTHAL, W.. **Transient Receptor Potential (TRP) Channels**. 179. ed. Thuringen: Springer-verlag Berlin Heidelberg, 2007. Cap. 5. p. 489-505. (Handbook of Experimental Pharmacology).

TREEDE, R. D.. Pain and hyperalgesia: definitions and theories. In: CERVERO, F; JENSEN, T S. **Handbook of Clinical Neurology**. v. 81. Mainz: Elsevier, 2006. p. 3-10. (3rd).

TRESCOT, A. M. et al. Opioid Pharmacology. **Pain Physician**, [s.l.], v. 11, n. 2, p.133-153, abr. 2008.

TRZCINSKI, R. et al. Surgery in Jehovah's Witnesses – our experience. **Przegląd Gastroenterologiczny**, Lodz, v. 10, n. 1, p.33-40, fev. 2015. Termedia Sp. z.o.o.. <http://dx.doi.org/10.5114/pg.2014.47496>.

TUBBS, R. S. et al. François Magendie (1783–1855) and his contributions to the foundations of neuroscience and neurosurgery. **Journal Of Neurosurgery**, [s.l.], v. 108, n. 5, p.1038-1042, maio 2008. Journal of Neurosurgery Publishing Group (JNSPG). <http://dx.doi.org/10.3171/jns.2008.108.5.1038>.

TUBBS, R. S. et al. Sir Charles Bell (1774–1842) and his contributions to early neurosurgery. **Childs Nerv Syst**, [s.l.], v. 28, n. 3, p.331-335, 21 jan. 2012. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s00381-011-1666-8>.

UGWAH-OGUEJIOFOR, C. J. et al. Evaluation of the antinociceptive and anti-inflammatory effect of *Caralluma dalzielii*. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 150, n. 3, p.967-972, dez. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.09.049>.

VALADARES, M. C. **Revista Eletrônica de Farmácia**. [s.l.], v. 3, n.2, p.93-98, 2006.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M.. Mechanism of Action of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs. **Am J Med**, London, v. 104, n. 3, p.2-8, mar. 1998.

VAY, L.; GU, C.; MCNAUGHTON, P. A.. The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications. **British Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 165, n. 4, p.787-801, jan. 2012. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01601.x>.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M.. Plantas medicinais: cura segura?. **Química Nova**, [s.l.], v. 28, n. 3, p.519-528, jun. 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422005000300026>.

WADE, N.. The persisting vision of David Hartley (1705 - 1757). **Perception**, [s.l.], v. 34, n. 1, p.1-6. 2005. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1068/p3401ed>.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A.. The open-field test: A critical review.. **Psychological Bulletin**, [s.l.], v. 83, n. 3, p.482-504, 1976. American Psychological Association (APA). <http://dx.doi.org/10.1037/0033-2909.83.3.482>.

WANG, Y. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of extract and two isolated flavonoids of *Carthamus tinctorius* L. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 151, n. 2, p.944-950, fev. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.12.003>.

WARREN, H. C.. **A history of the association psychology**. New York: Scribner, 1921. 354 p.

WERNER, J.. Temperature receptors in cutaneous nerve endings are not thermostat molecules that induce thermoregulatory behaviors against thermal load. **Temperature**, [s.l.], v. 2, n. 3, p.338-338, jul. 2015. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/23328940.2015.1039690>.

WETSEL, W. C.. Sensing hot and cold with TRP channels. **International Journal Of Hyperthermia**, [s.l.], v. 27, n. 4, p.388-398, maio 2011. Informa Healthcare. <http://dx.doi.org/10.3109/02656736.2011.554337>.

WHALEY, L.; WONG, D. L.. **Nursing care of infants and children**. 3rd Ed. St. Louis: Mosby; 1987.

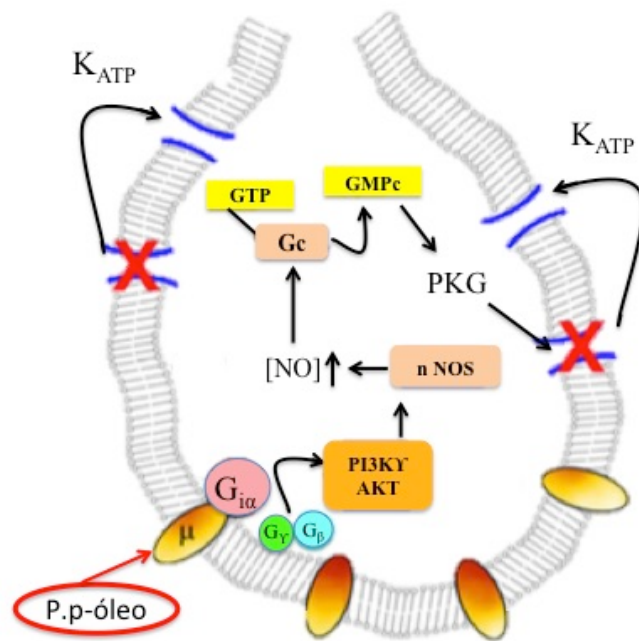
WHITMAN, S. M.. Pain and Suffering as Viewed by the Hindu Religion. **The Journal Of Pain**, [s.l.], v. 8, n. 8, p.607-613, ago. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpain.2007.02.430>.

XU, Q. et al. Anti-inflammatory and analgesic activity of aqueous extract of *Flos populi*. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 152, n. 3, p.540-545, mar. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.01.037>.

ZAKARIA, Z. A. et al. Antinociceptive, anti-inflammatory, and antipyretic properties of an aqueous extract of *Dicranopteris linearis* leaves in experimental animal models. **Journal Of Natural Medicines**, [s.l.], v. 62, n. 2, p.179-187, 12 jan. 2008. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s11418-007-0224-x>

ZBOROWSKI, M.. Cultural Components in Responses to Pain1. **Journal Of Social Issues**, [s.l.], v. 8, n. 4, p.16-30, abr. 1952. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1540-4560.1952.tb01860.x>.

APÊNDICE A – MECANISMO DE AÇÃO



(Adaptado de CUNHA et al., 2010)

APÊNDICE B – ARTIGO CIENTÍFICO

O presente trabalho foi publicado no periódico *Molecules* , volume 20, fascículo 5, páginas 7925 – 7939, no dia 30 de abril de 2015 sob o título : “Antinociceptive Activity and Toxicity Evaluation of the Fatty Oil from *Plukenetia polyadenia* Mull. Arg. (Euphorbiaceae)” e sob o doi: MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules20057925>.

Segue o artigo.

Article

Antinociceptive Activity and Toxicity Evaluation of the Fatty Oil from *Plukenetia polyadenia* Mull. Arg. (Euphorbiaceae)

Amanda S. Mota¹, Anderson B. de Lima^{1,2}, Thayana Lucy F. Albuquerque¹, Tiago S. Silveira², José Luiz M. do Nascimento³, Joyce Kelly R. da Silva^{2,*}, Alcy F. Ribeiro⁴, José Guilherme S. Maia^{5,6,*} and Gilmar N. T. Bastos^{1,*}

¹ Laboratório de Neuroinflamação, Universidade Federal do Pará (UFPA), 66075-900 Belém, PA, Brazil; E-Mails: amanda.sodre.mota@gmail.com (A.S.M.); andersonbentes@uol.com.br (A.B.L.); thayanalucy@gmail.com (T.L.F.A.)

² Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Pará (UFPA), 66075-900 Belém, PA, Brazil; E-Mail: silveira.t@gmail.com

³ Laboratório de Neuroquímica Molecular e Celular, Universidade Federal do Pará (UFPA), 66075-900 Belém, PA, Brazil; E-Mail: jlmm@ufpa.br

⁴ Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará (UNIFESSPA), 68507-590 Marabá, PA, Brazil; E-Mail: favacho@ufpa.br

⁵ Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Pará (UFPA), 66075-900 Belém, PA, Brazil

⁶ Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais, Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), 68035-110 Santarém, PA, Brazil

* Authors to whom correspondence should be addressed; E-Mail: joycekellys@ufpa.br (J.K.R.S.); bastosgnt@gmail.com (G.N.T.B.); gmaia@ufpa.br (J.G.S.M.); Tel./Fax: +55-91-3201-7545 (J.K.R.S. & G.N.T.B. & J.G.S.M.).

Academic Editor: Isabel C. F. R. Ferreira

Received: 20 December 2014 / Accepted: 3 April 2015 / Published: 30 April 2015

Abstract: Seed oil (Pp-oil) of *Plukenetia polyadenia* is used by native people of the Brazilian Amazon against arthritis and rheumatism, spreading it on the arms and legs to reduce the pain and inflammation. Pp-oil was obtained by pressing dried seeds at room temperature to give a 47.0% yield of oil. It was then subjected to fatty acid composition analysis. The principal fatty acids were linoleic acid (46.5%), α -linolenic acid (34.4%) and oleic acid (13.9%). Then, it was evaluated for its antinociceptive activity in mice, using the acetic acid-induced abdominal writhing, hot plate and formalin test models. Additionally,

its toxicity was determined. The Pp-oil proved to have no toxicological effects, showing dose-dependent antinociceptive effect under chemical stimulation. At oral doses of 25–100 mg/kg, Pp-oil significantly reduced the abdominal writhes in the writhing test. A higher oral dose of 200 mg/kg did not induce alterations in the latency time of the hot plate test when compared to the control, suggesting an analgesic activity of peripheral origin. At oral doses of 50 and 100 mg/kg, the Pp-oil significantly reduced the second phase of the algic stimulus in the formalin test. In addition, the antinociception of Pp-oil was reversed by naloxone in the evaluation of its mechanism of action. Therefore, the Pp-oil proved to be safe at very high doses and to show significant analgesic properties. The role of Pp-oil is still being investigated with respect the mechanism of action, but the results suggest that opiod receptors could be involved in the antinociception action observed for the oil of *P. polyadenia*.

Keywords: *Plukenetia polyadenia*; Euphorbiaceae; fatty oil; linoleic and α -linolenic acids; antinociception activity; toxicity

1. Introduction

Plukenetia L. is a neotropical genus of nineteen species belonging to the Euphorbiaceae. *Plukenetia polyadenia* Müll. Arg. [syn. *Elaeophora polyadenia* (Müll. Arg.) Ducke, *Elaeophora abutaefolia* Ducke and *Plukenetia abutaefolia* (Ducke) Pax & K. Hoffm.] [1] is a liana that climbs the canopy of tall trees, known as “compadre-de-azeite”. It grows in the wet lowland forests and is widespread in the the Amazon basins of the Guyanas, Venezuela, Ecuador, Peru, Bolivia and Brazil [2].

Some of the most common manifestations of diseases that affect millions of people worldwide are pain and inflammation. The dependence of the Amazon rural population with respect to medicinal plants is cultural, and the traditional medicine practitioners have used plants for their health care, particularly in the riparian communities. In Brazil, along the Amazon River and its tributaries, the seed oil of *P. polyadenia* (Pp-oil) is used by native people against arthritis and rheumatism. It is spread on the arms and legs to reduce the pain and inflammation. A single study of the seeds of *P. polyadenia* was previously reported, with the determination of its fatty acids composition and a preliminary toxicological evaluation [3].

Fatty acids are the primary precursors of important lipid mediators during the inflammatory process, such as arachidonic acid, prostaglandins, thromboxanes, and leukotrienes. Long chain n-3polyunsaturated fatty acids have been investigated for use in the treatment of inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis, psoriasis, and ulcerative colitis, because of the presumed anti-inflammatory effects of these fatty acids [4,5]. The anti-inflammatory effects of long chain n-3 polyunsaturated fatty acids have been formerly attributed to changes in the production of prostaglandins and leukotrienes, although other studies have emphasized the reduced production of cytokines, as a possible mechanism [6].

The aim of this study was to analyze the fatty acids composition of Pp-oil and evaluate their antinociceptive activity and toxicity, based on its traditional use by the Amazon native population to reduce pain and inflammation in arthritis and rheumatism.

2. Results and Discussion

2.1. Oil-Composition

The percentage of the oil of *P. polyadenia* obtained by pressing the dried seeds at room temperature was 36.2%. This rate increases to 47.0%, considering the moisture content retained in the seeds, which was 30%. The extraction with Soxhlet showed a value of 56.2%, when used the *n*-hexane as solvent. Only the pressed dried seed oil was utilized in the experiments. The methylated fatty acids of Pp-oil were identified by GC/FID and GC-MS and are listed in Table 1. In addition, the Pp-oil was analyzed by $^1\text{H-NMR}$, and the assignments of their proton signals match well with the signals of the same methylated fatty acids already described in the literature [7,8].

Table 1. Methylated fatty acids of the oil of *Plukenetia polyadenia*.

Constituents	RI _{Calc}	RI _{Lit}	Oil %	Identification
Palmitic acid, methyl ester	1925	1921	2.9	GC, MS
Linoleic acid, methyl ester	2097	2092	46.5	GC, MS
α -Linolenic acid, methyl ester	2104	2098	34.4	GC, MS
Oleic acid, methyl ester	2112	2107	13.9	GC, MS
Stearic acid, methyl ester	2129	2124	1.5	GC, MS
Arachidonic acid, methyl ester	2279	2274	0.8	GC, MS
Total			100.0	GC, MS

RI_{Calc} = Retention index on DB-5 capillary column using *n*-alkanes (C8-C30) as standards; RI_{Lit} = Retention; index on similar capillary column described in the literature [9,10]; GC = Gas chromatography analysis; co-elution with methylated fatty acid standards; MS = Mass spectra.

2.2. Acute Toxicity (LD₅₀)

Pp-oil did not demonstrate any behavior changes or mortality in mice at doses of 2000 mg/kg and 5000 mg/kg, during the three days of the experiment.

2.3. Clinical Chemistry and Histopathology

The results of total cholesterol (CHO), low-density lipoprotein (LDL), high-density lipoprotein (HDL) and triglycerides (TG) of rats subjected to the experiment, using Pp-oil at doses of 100 mg/kg/day and 200 mg/kg/day, are shown in Figure 1. Values are shown as mean $\pm$ S.E.M (s.e.m.) and did not indicate chemical alterations in mice, when compared to the control. The histopathological examination can be seen in Figures 2 and 3A–C, and also did not present any alteration in the morphology of the organs, at the used doses, when compared to the control.

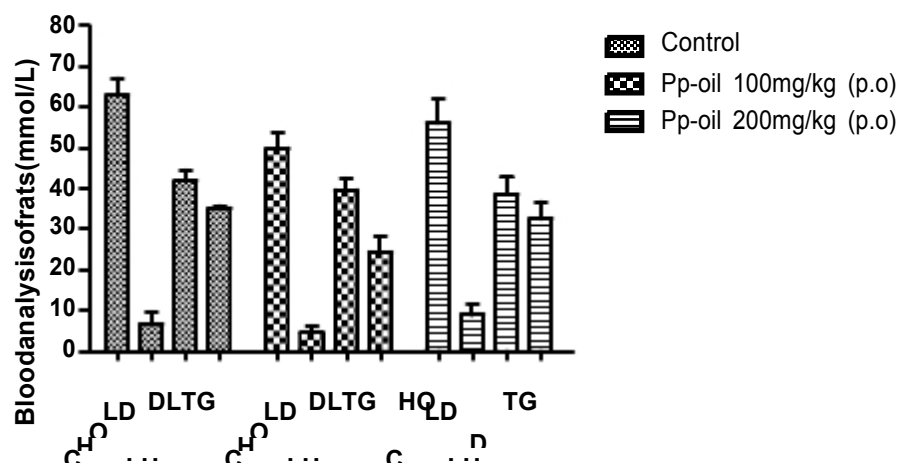


Figure 1. Clinical chemistry results for oral doses of 100 mg/kg and 200 mg/kg compared with control. Values are mean $\pm$ S.E.M (s.e.m.) and abbreviations: CHO, total cholesterol; LDL, low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein; TG, triglycerides.

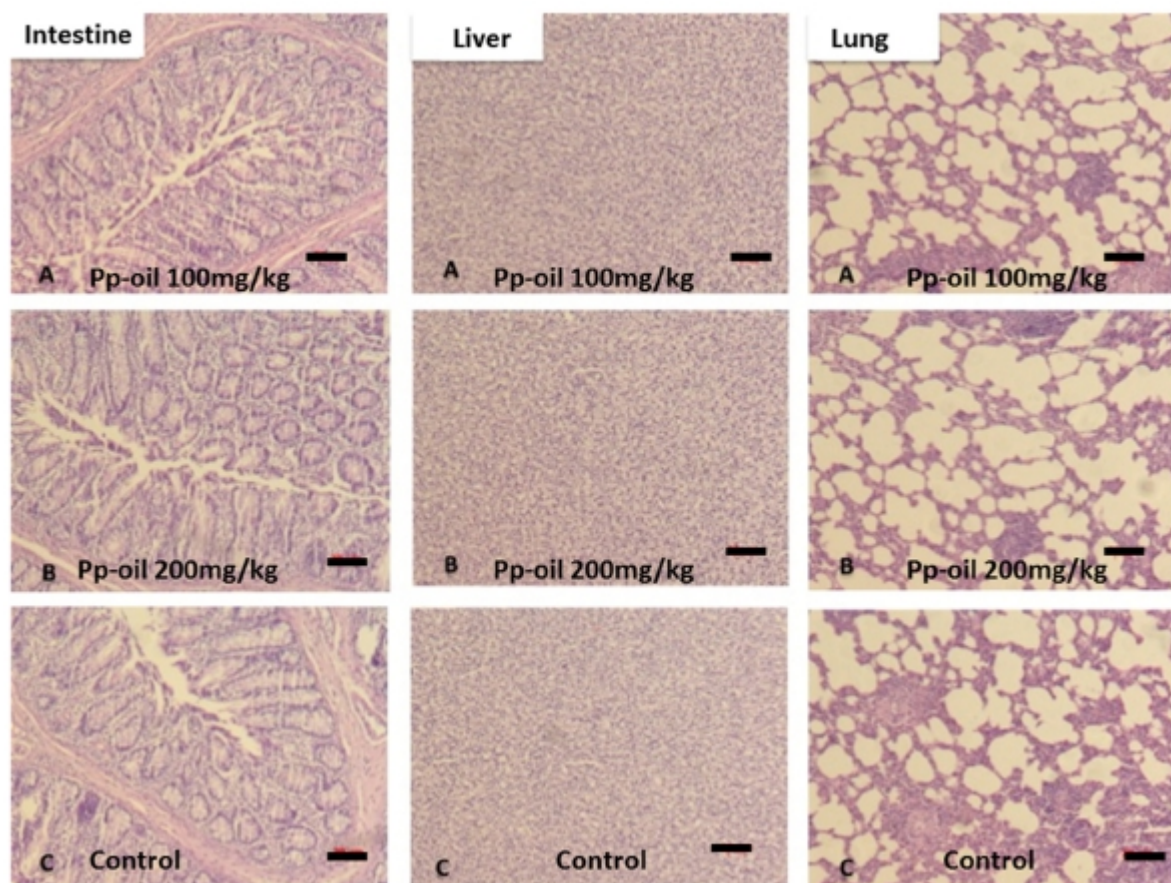


Figure 2. Histopathology of intestine, liver and lung: (A) 100 mg/kg; (B) 200 mg/kg and (C) control. Dark bar: 20 μ m.

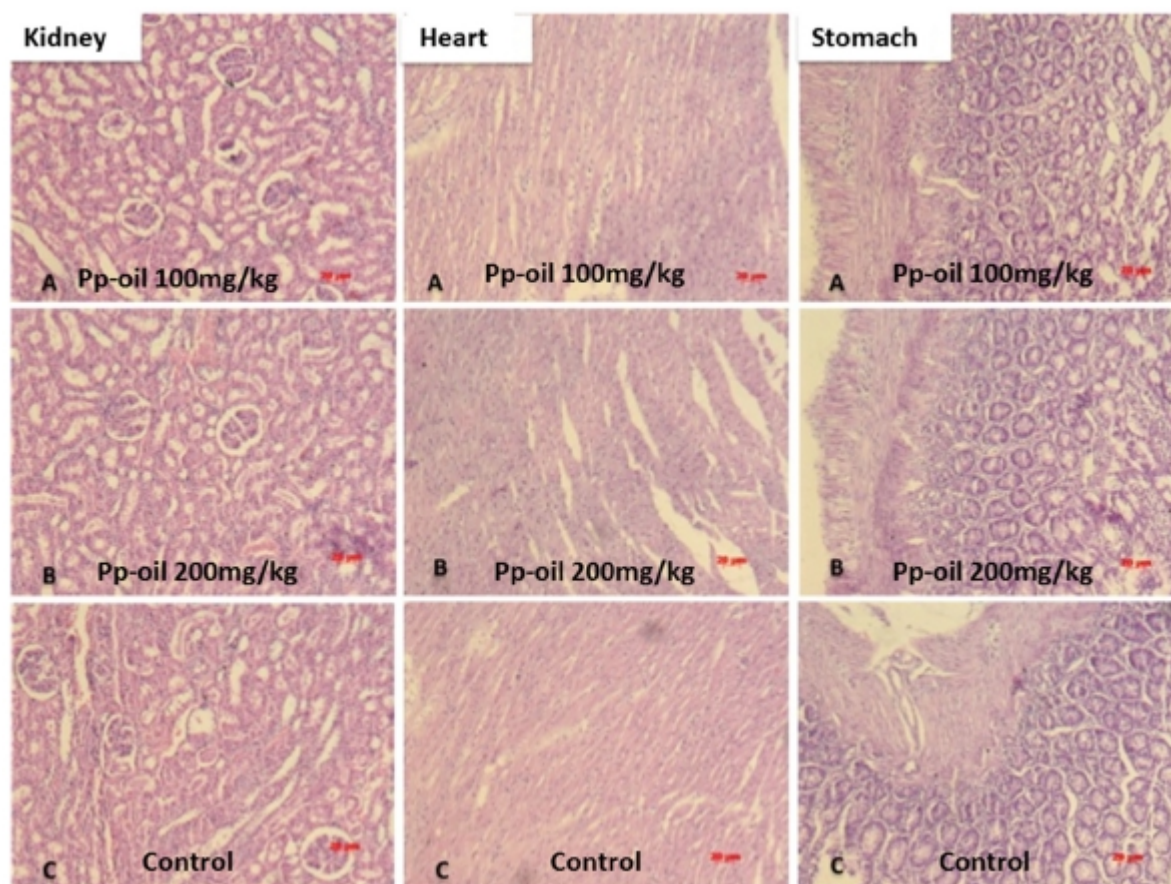


Figure 3. Histopathology of kidney, heart and stomach: (A) 100 mg/kg; (B) 200 mg/kg and (C) control. Dark bar: 20 μ m.

2.4. Acetic Acid-Induced Writhing

Oral administration of the Pp-oil (25, 50 and 100 mg/kg) significantly decreased the number of writhes in mice induced by acetic acid, in comparison to the animals that received only the vehicle (Figure 4). These effects were dose-dependent.

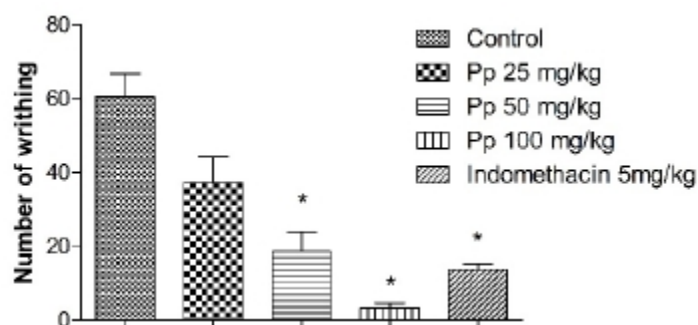


Figure 4. Effect of oral doses of Pp-oil on the nociception induced by intraperitoneal injection of acetic acid. Mean $\pm$ s.e.m., * Significantly different from the control ($p < 0.05$, $F = 22.59$, ANOVA, Student-Newman-Keuls t -test) at given a time.

2.5. Hot Plate Test

Administration of Pp-oil dosed at 200 mg/kg did not induce alterations in the latency time in mice, when compared to the control (Figure 5).

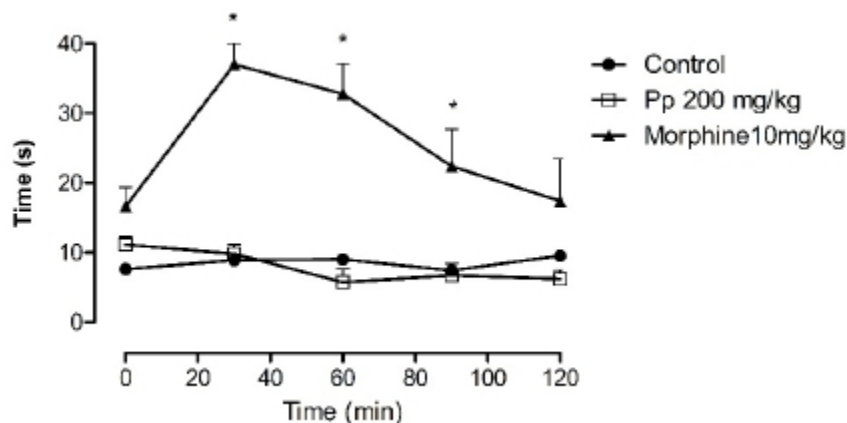


Figure 5. Hot plate test. Time-course of the effects of Pp-oil on thermal nociception. Abscissa time (min) after Pp-oil (oral), morphine (s.c.). Ordinate latency time (s) for the response to thermal stimulation (55 ± 0.5 °C, Mean $\pm$ s.e.m., $n = 5$) for each Pp-oil dose. * significantly different from the control ($p < 0.05$, $F = 15.96$; ANOVA, Dunnett's t -test) at given a time.

2.6. Formalin Test

The Pp-oil (50 and 100 mg/kg) injected in mice 60 min before formalin showed a significant antinociception effect, reducing the liking time in the second phase (inflammatory) in a dose-dependent manner (Figure 6).

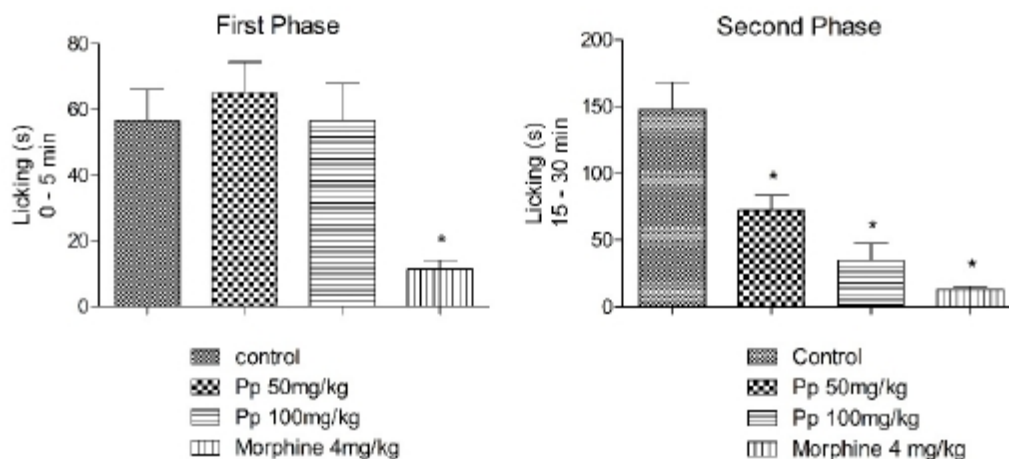


Figure 6. Formalin test: Phase 1 and Phase 2. Each group represents mean $\pm$ s.e.m. of 5 animals. * $p < 0.05$ when compared to the control value, $F = 29.04$ (ANOVA, Student-Newman Kuels' test).

2.7. Mechanism of Action

The pre-treatment of animals with naloxone showed a significant effect on the antinociception, during the writhing test. Naloxone reversed the effect caused by morphine and Pp-oil (Figure 7).

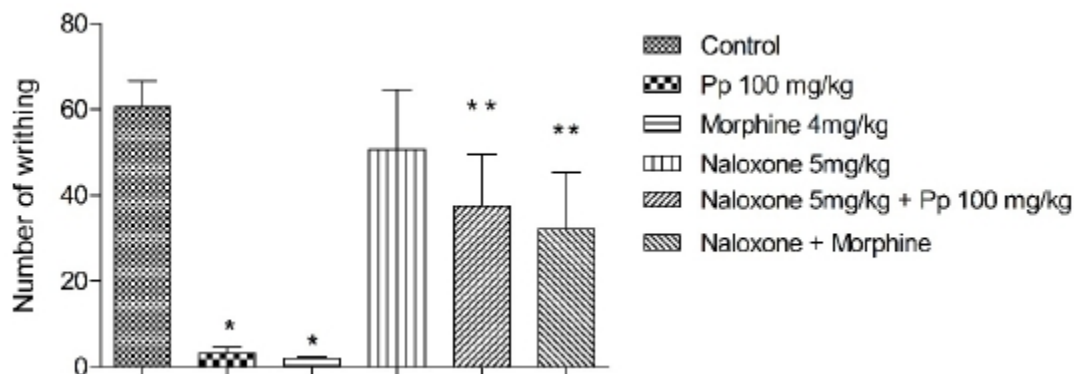


Figure 7. Mechanism of action. Each group represents mean $\pm$ s.e.m. of 5 animals. * $p < 0.05$ when compared to control value; ** $p < 0.05$ when compared to agonist plus antagonists vs. agonist alone, $F = 4.855$.

2.8. Discussion

The percentages of linoleic acid (LA, 18:2 n-6, omega-6, 46.5%) and α -linolenic acid (α -LNA, 18:3 n-3, omega-3, 34.4%) in Pp-oil were significant, in comparison to other fatty oils produced in the Brazilian Amazon region. Oleic acid (OA, 18:1 n-9, omega 9, 13.9%) was also present in the oil but with a lower content. Some oils from the Euphorbiaceae, such as *Ricinus communis* L. and *Jatropha curcas* L., contains triglycerides composed of fatty acids considered laxative and toxic [11,12]. It is not the case of Pp-oil, which is edible and composed only of fatty acids commonly found in vegetable oils used for cooking. Therefore, it was presumed that the administration of large quantities of PP-oil in mice would not elicit any toxic effects or death. This was confirmed by LD₅₀ values.

The possibility of health benefits associated with the association of an omega-3 diet (polyunsaturated fatty acids, ω -3 PUFAs) have been described for several chronic conditions, including cardiovascular, neurodegenerative and neoplastic diseases [13]. Ample evidence has emerged over the last few years to show the critical role played by inflammation in the pathogenesis of these illnesses. Previously, they were not related to inflammation. Recently has been hypothesized that the effects of ω -3 PUFAs may be linked to their direct anti-inflammatory activity, as well its metabolites, eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6) [13]. n-6 PUFAs belong to another important family of PUFAs, also used in dietary and mainly concentrated in vegetable oils. Among the components of these two classes of PUFAs (n-3 and n-6), α -linolenic acid (α -LNA, 18:3 n-3) and linoleic acid (LA, 18:2 n-6) are considered essential for the human diet. The mammalian cells do not possess the desaturases able to place the double bonds specifically in n-3 and n-6 positions on the fatty acid carbon chain, differently from vegetable cells, along the synthetic pathway. Various synthesis steps produce n-6 PUFA arachidonic acid (AA, 20:4 n-6). It is highly represented in the membranes

and is a precursor of the eicosanoids, the bioactive compounds that mediate the inflammatory process, as prostaglandins, thromboxanes, and leukotrienes.

The acute toxicity study was considerate as the initial phase of further sub-chronic studies. Doses up to 5000 mg/kg did not exhibit any mortality or any signs of toxicity after oral administration. This treatment may thus be considered as no-observed-adverse-effect level (NOAEL) [14]. The oral LD₅₀ value in mice, when higher than 5000 mg/kg is described as class five (nontoxic substances) of the globally harmonized classified system for chemical substances and mixtures [15].

Pp-oil produced antinociception effects in the studied nociception models. The acetic acid-induced writhing reaction in mice has been primarily used as a screening tool for the assessment of analgesic or anti-inflammatory properties of new agents and is described as a typical model for visceral inflammatory pain [16]. The local irritation provoked by a test agent in the intraperitoneal cavity triggers a variety of mediators, such as bradykinin, substance P and the prostaglandins, especially, prostacyclin (PGI₂), as well as some cytokines such as Interleukin-1 beta (IL-1 β), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), and Interleukin 8 (IL-8) [17–19]. These mediators can activate chemo-sensitive nociceptors that contribute to the onset of inflammatory pain. Pp-oil was able to reduce the writhing at doses of 25 and 50 mg/kg, suggesting that its antinociception effect could be related to inhibition of the release of mediators in response to acetic acid. The fatty oil could be inhibiting the production of a range of inflammatory proteins, including cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide (NO) synthase, TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, and IL-12 in cultured endothelial cells, monocytes, macrophages, and dendritic cells. These inhibitory effects of long-chain n-3polyunsaturated fatty acids (PUFAs) seem to involve the decrease of I κ B phosphorylation and reduce the activation of NF κ B. These effects are associated with a reduction in the activation of the signaling proteins such as mitogen-activated protein kinases [20,21].

The hot plate test is a particular central antinociception test in which opioid agents exert their analgesic effects via supraspinal and spinal receptors. It is useful for the evaluation of centrally acting analgesics that are known to elevate the pain threshold of mice towards heat [22,23]. The Pp-oil did not alter the increase in latency for jumping or licking. These results are suggestive of an antinociception action of Pp-oil via a peripheral mechanism rather than a central acting mechanism.

The formalin test is believed to resemble clinical pain more closely in comparison with other tests that employ mechanical or thermal stimuli [16,24]. This test is a model of nociceptive response in two distinct phases, involving different mechanisms. The first phase (neurogenic pain) results from the direct chemical stimulation of myelinated and unmyelinated nociceptive afferent fibers, mainly C fibers, which can be suppressed by opioid analgesic drugs like morphine [25,26]. In the second phase, inflammatory mediators in the peripheral tissues, such as prostaglandins, serotonin, histamine and bradykinin, induce functional changes in the neurons, of the spinal dorsal horn that, in the long term, promote facilitation of synaptic transmission at the spinal level [27–29]. In this model, Pp-oil inhibited the licking response of mice in the second phase (Figure 4), suggesting this compound exerts its antinociception effects connected with peripheral mechanisms. The α -linolenic acid and the linoleic acid are known also as inhibitors of COX-1 and COX-2 [30,31], as well the morphine can promote a peripheral analgesia [32]. To this respect, naloxone, an opioid antagonist, was tested in the acetic acid writhing. It showed an influence on the antinociception action of Pp-oil (100 mg/kg, p.o.). This fact

suggests the participation of the opioid system in the modulation of pain provoked by administration of Pp-oil.

The results of clinical chemistry and histopathology showed no significant difference between the two doses used and the control. Tissues were evaluated for the presence or absence of polymorphonuclear and mononuclear leukocyte; edema; apoptotic bodies and necrotic damage (see Figures 2 and 3).

3. Experimental Section

3.1. Drugs and Chemicals

The following drugs and chemicals were used: morphine (Laboratório Cristália, Itapira, SP, Brazil), indomethacin, sodium methoxide, boron trifluoride, *n*-alkanes (Sigma, St. Louis, MO, USA), naloxone (Laboratório Cristália), acetic acid, formalin, hexane, diethyl ether, methanol (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brazil).

3.2. Animals

Swiss male mice (20–25 g) were obtained from the Instituto Evandro Chagas (Belém, Pará, Brazil). They were randomly assigned to groups of ten animals and maintained in plastic boxes, with food and water *ad libitum*, under light and dark cycle (12 h, each). The room temperature was maintained at 22 ± 1 °C. The animals were acclimatized to the laboratory for at least 1 h before the experiments that were carried out between 8 h and 13 h in order to avoid circadian influence. All experiments reported in this study were conducted in accordance with current guidelines for the care of laboratory animals and ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals (CEPAE-UFPA 124-13). All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

3.3. Plant Material

The fruits of *P. polyadenia* were collected in a lowland area near of the Guamá River, and the municipality of Santa Isabel do Pará, Pará, Brazil, during the rainy season, April 2011. The plant was identified and deposited (MG 170411) in the Herbarium of Emilio Goeldi Museum, Belém, Pará, Brazil. The four seeds of the fruit were separated, dried at room temperature, then grinded and submitted to the oil extraction using an Expeller type press and a Soxhlet extractor. The moisture content of the seeds was calculated by drying in an electric oven until constant weight. The oil extracted from the pressed dried seeds was coded as Pp-oil and utilized in the experiments.

3.4. Fatty Acids Esterification

The Pp-oil (100 mg) was placed in a test tube (20 cm) with stopper. A methanol solution (3 mL) of sodium methoxide (3%) was added. The mixture was heated in a water bath at boiling temperature for 3 min. After, a methanol solution (3 mL) of boron trifluoride (10%) was added. The mixture was again heated in a water bath for other 3 min. The mixture was extracted with hexane (1 mL) and diethyl ether

(2 mL) in a volumetric flask (50 mL) containing distilled water. The organic layer was separated to a vial (5 mL), and the solvent evaporated. The Pp-oil esterification was done in duplicate [33,34].

3.5. Oil-Composition Analysis

The Pp-oil was analyzed in a THERMO DSQ II GC-MS instrument, under the following conditions: DB-5ms (30 m × 0.25 mm; 0.25 mm film thickness) fused-silica capillary column; programmed temperature: 60–240 °C (3 °C/min); injector temperature: 250 °C; carrier gas: helium, adjusted to a linear velocity of 32 cm/s (measured at 100 °C); injection type: splitless (2 mL of a 1:1000 hexane solution); split flow was adjusted to yield a 20:1 ratio; septum sweep was a constant 10 mL/min; EIMS: electron energy, 70 eV; temperature of ion source and connection parts: 200 °C. The quantitative data regarding the methylated fatty acids were obtained by peak area normalization using a FOCUS GC/FID operated under similar conditions of the GC-MS, except for the carrier gas, which was nitrogen. The retention index was calculated for all the constituents using a homologous series of *n*-alkanes (C₈–C₃₀, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA). Individual components were identified by comparison of both mass spectrum and GC retention data with authentic compounds which were previously analyzed and stored in a private library, as well as with the aid of commercial libraries containing retention indices and mass spectra of methylated fatty acids [9,10]. The standards of methylated fatty acids were purchased from Sigma-Aldrich Brazil.

3.6. NMR Analysis of Pp-Oil

The ¹H-NMR spectrum was obtained in a Varian Mercury NMR instrument at 300 MHz, using CDCl₃ as solvent.

3.7. Acute Toxicity (LD₅₀)

Sixty male mice were used, aged 47 ± 2 days, body mass index between 20 and 38 g. They were divided into five groups of twelve. Each group fasted for 12 h received oral doses of Pp-oil between 2000 to 5000 mg/kg according to the body weight of each animal. Initially, the animals were observed for four h and placed in cages with food and water *ad libitum* and, then, kept for an additional 48 h. A separate group of animals was used as a control group, with regular food and water. The experiment aimed to observe the number of deaths in each group relative to the total number of animals treated with the Pp-oil. The toxicological effect was based on mortality, which was expressed as the medium lethal dose (LD₅₀) [35,36].

3.8. 30-Day Chronic Oral Toxicity (Experimental Design)

This study was based on the enhanced OECD test, guideline 407 [37]. Briefly, rats at seven weeks of age were weighed and randomly assigned to four groups, with ten males and ten females in each cluster. Pp-oil was administered to the rats once daily by oral gavages at doses of zero (control), 100 and 200 mg/kg/day for at least 28 days, at a dosing volume of 5 mL/kg body weight. All animals were killed by exsanguinations under pentobarbital anesthesia between study days 31 and 32, and were autopsied. Blood samples for clinical chemistry were obtained from the abdominal aorta prior to necropsy.

3.9. Histopathology

All animals were subject to necropsy. Kidney, heart, stomach, liver, lung and intestine were fixed by immersion in neutral buffered formalin (10%). The samples were embedded in paraffin wax. Histological sections were stained with hematoxylin and eosin. The tissues were examined using light microscopy.

3.10. Clinical Tests

Blood samples for the hematology and biochemistry evaluation were collected from the retro-orbital plexus under light anesthesia induced by CO₂ inhalation. EDTA was used as an anticoagulant for the hematology samples in the routine blood test and lithium heparin for the blood biochemistry. Food was held for approximately 18 h before blood collection. The samples were collected early in the working day to reduce biological variation. The standard biochemistry tests were used to found out metabolism products. Serum biochemistry was performed using a spectrophotometer (Hitachi7180+ISE full automatic biochemical analyzer, Hitachi Ltd., Gaoke, Japan) for the following analyses: total cholesterol (CHO), low-density lipoprotein (LDL), high-density lipoprotein (HDL) and triglycerides (TG).

3.11. Antinociceptive Activity

3.11.1. Acetic Acid-Induced Writhing in Mice

To evaluate the possible peripheral effects of the Pp-oil as analgesic, the writhing test by acetic acid was performed in mice [38]. Groups of five mice were fasted overnight prior to starting the experiment while given free access to water. The Pp-oil (25, 50 and 100 mg/kg), indomethacin (5 mg/kg) or equivalent volumes of vehicle (0.9% saline plus 1% Tween 80) were orally administered in mice 60 min prior to the acetic acid injection (0.6%). Indomethacin is a well-known peripheral analgesic drug, and it was used as a positive control. Then, 10 min after the acetic acid injection, the mice were placed in an observation box, and the writhing number was counted for 30 min.

3.11.2. Hot Plate Test

Mice were pre-selected on the hot plate at 55 ± 0.5 °C. Animals when showing a reaction time (latency for licking the hind feet or jumping) greater than 20 s were discarded. Then, the selected mice were treated with vehicle (saline), Pp-oil (50, 100 and 200 mg/kg, p.o. via) or morphine (10 mg/kg, s.c.). The reaction time for each mouse was determined on the hot plate, before and after drug administration, at intervals of 30 min. A total period of 45 s was followed while measuring reaction time [39].

3.11.3. Formalin Test

The formalin test was carried out according Hunskaar and Hole (1987) [40]. Formalin (20 µL, 1%) was administered to mice via intraplantar route and immediately the licking time was registered for 5 min (first phase, neurogenic). Fifteen minutes after beginning the experiment (second phase, inflammatory), the licking time was recorded for another 15 min. The animals were pre-treated with

morphine (4 mg/kg, s.c.) to assess the possible participation of the opioid system in the antinociception effect, 15 min before administration of the Pp-oil (50 and 100 mg/kg, p.o.) or vehicle (0.9% NaCl, 10 mL/kg, p.o.). The algic responses caused by the first and the second phase of the formalin test were recorded 60 min after drug and vehicle administration. The other mice group received morphine 30 min before the formalin injection.

3.11.4. Evaluation of the Mechanism of Action

Mice were pre-treated with naloxone (5 mg/kg, i.p.) to assess the possible participation of the opioid system in the antinociception effect, 30 min before the Pp-oil administration (100 mg/kg, p.o.), and morphine (4 mg/kg, s.c.) 15 min before the Pp-oil administration. The nociception response was evaluated by the acetic acid-induced contortions, and the evaluation of the mechanism of action was determined by the reversion of the antinociception effect in the Pp-oil.

3.12. Statistical Analyses

Results are expressed as mean $\pm$ S.E.M. Statistical evaluation were made using ANOVA followed by Student-Newman-Keuls or Dunn's test, and the values were considered significantly different when $p < 0.05$.

4. Conclusions

In summary, at the oral doses tested, Pp-oil can be considered safe as it did not exhibit any lethality or adverse changes in the general behavior in the acute and sub-chronic toxicity studies in mice. It was demonstrated that Pp-oil exhibited dose-related antinociception when assessed in a chemical model, but not in thermal models of nociception in mice. Pp-oil has analgesic activity, which is probably of peripheral origin, according to the tests employed. The mechanisms involved were not yet completely investigated, although it seems that the opioid receptors could be involved in the antinociception action of the Pp-oil.

Acknowledgments

We are grateful for CNPQ, CAPES and FAPESPA/PA for their financial support.

Author Contributions

J.L.M.N., J.K.R.S., A.F.R., J.G.S.M., G.N.T.B.: participation in study designed; A.S.M., A.B.L., T.L.F.A., T.S.S., G.N.T.B.: conducting the study in the labs; G.N.T.B., A.S.M., A.B.L., A.F.R., J.K.R.S., J.G.S.M.: Data analyzing and manuscript preparation. All authors read and approved the final manuscript.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. The Plant List. Available online: <http://www.theplantlist.org/tpl/record/kew-161498> (accessed on 27 November 2014).
2. Gillespie, L.J.; Armbruster, W.S. *A Contribution to the Guianan Flora: Dalechampia, Haematostemon, Omphalea, Pera, Plukenetia and Tragia (Euphorbiaceae) with Notes on Subfamily Acalyphoideae*; Smithsonian Institution Press: Washington, DC, USA, 1997.
3. Ribeiro, A.F. Chemical and Toxicological Evaluation of the Fatty Oil from *Plukenetia polyadenia* Müll. Arg. (Euphorbiaceae). Master's Degree Dissertation, Graduate Program in Chemistry, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brazil, 15 March 2005.
4. Grimble, R.F.; Tappia, P.S. Modulation of pro-inflammatory cytokine biology by unsaturated fatty acids. *Z. Ernähr.* **1998**, *37*, 57–65.
5. O'Shea, M.; Bassaganya-Riera, J.; Mohede, I.C. Immunomodulatory properties of conjugated linoleic acid. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *79*, 1199–1206.
6. Calder, P.C. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale. *Biochimie* **2009**, *91*, 791–795.
7. Gunstone, F.D.; Shuka, V.K.S. NMR of lipids. *Ann. Rep. NMR Spectrosc.* **1995**, *31*, 219–237.
8. Knothe, G.; Kenar, J.A. Determination of the fatty acid profile by ¹H-NMR spectroscopy. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2004**, *106*, 88–96.
9. NIST (National Institute of Standards and Technology). *Mass Spectral Library (NIST/EPA/NIH, v. 2.0d)*; The NIST Mass Spectrometry Data Center: Gaithersburg, MD, USA, 2005.
10. Adams, R.P. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, 4th ed.; Allured Publishing Corporation: Carol stream, IL, USA, 2007.
11. Ramos, L.C.S.; Tango, J.S.; Savi, A.; Leal, N.R. Variability for oil and fatty acid composition in castor bean varieties. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1984**, *61*, 1841–1843.
12. Makkar, H.P.S.; Becker, K.; Sporer F.; Wink, M. Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 3152–3157.
13. Serini, S.; Fasano, E.; Piccione, E.; Cittadini, A.R.M.; Calviello, G. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and the paradox of their health benefits and potential harmful effects. *Chem. Res. Toxicol.* **2011**, *24*, 2093–2105.
14. Alexeeff, G.V.; Broadwin, R.; Liaw, J.; Dawson, S.V. Characterization of the LOAEL-to-NOAEL uncertainty factor for mild adverse effects from acute inhalation exposures. *Regul. Toxicol. Pharm.* **2002**, *36*, 96–105.
15. GHS—The Globally Harmonized System of classification and labelling of chemicals. *Health and Environmental Hazards Classification Criteria for Substances*, 2nd ed.; United Nations Economics Commission for Europe, 2007. Available online: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/GHS_presentations/English/health_env_sub_e.pdf (accessed on 11 December 2014).
16. Tjølsen, A.; Hole, K. Animal Models of Analgesia. In *The Pharmacology of Pain*; Dickenson, A., Besson, J., Eds.; Springer Verlag: Berlin, Germany, 1997; Volume 130, pp. 1–20.
17. Correa, C.R.; Kyke, D.J.; Chakravert, S.; Calixto, J.B. Antinociceptive profile of the pseudopeptide B2 bradykinin and receptor antagonist NPC 18688 in mice. *Br. J. Pharmacol.* **1996**, *117*, 552–558.

18. Ribeiro, R.A.; Vale, M.L.; Thomazzi, S.M.; Paschoalato, A.B.; Poole, S.; Ferreira, S.H.; Cunha, F.Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **2000**, *387*, 111–118.
19. Ugwah-Oguejiofor, C.J.; Abubakar, K.; Ugwah, M.O.; Njan, A.A. Evaluation of the antinociceptive and anti-inflammatory effect of *Caralluma dalzielii*. *J. Ethnopharmacol.* **2013**, *150*, 967–972.
20. Khalfoun, B.; Thibault, F.; Watier, H.; Bardos, P.; Lebranchu, Y. Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids inhibit *in vitro* human endothelial cell production interleukin-6. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1997**, *400*, 589–597.
21. Calder, P.C. Mechanism of action of (n-3) fatty acids. *J. Nutr.* **2012**, *142*, 592S–599S.
22. Zakaria, Z.A.; Ghani, Z.D.F.A.; Nor, R.N.S.R.M.; Gopalan, H.K.; Sulaiman, M.R.; Jais, A.M.M.; Somchit, M.N.; Kader, A.A.; Ripin, J. Antinociceptive, anti-inflammatory, and antipyretic properties of an aqueous extract of *Dicranopteris linearis* leaves in experimental animal models. *J. Nat. Med.* **2008**, *62*, 179–187.
23. Xu, Q.; Wang, Y.; Guo, S.; Shen, Z.; Wang, Y.; Yang, L. Anti-inflammatory and analgesic activity of aqueous extract of *Flos populi*. *J. Ethnopharmacol.* **2014**, *152*, 540–545.
24. Capone, F.; Aloisi, A.M. Refinement of pain evaluation techniques: The formalin test. *Ann. Ist. Super. Sanita* **2004**, *40*, 223–229.
25. Amaral, J.F.; Silva, M.I.G.; Aquino Neto, M.R.; Teixeira Neto, P.F.; Moura, B.A.; de Melo, C.T.V.; de Araújo, F.L.O.; de Sousa, D.P.; de Vasconcelos, P.F.; de Vasconcelos, S.M.M.; *et al.* Antinociceptive effect of the monoterpene *R*-(+)-limonene in mice. *Biol. Pharm. Bull.* **2007**, *30*, 1217–1220.
26. Gonçalves, J.C.R.; Oliveira, F.S.; Benedito, R.B.; Sousa, D.P.; Almeida, R.N.; Araújo, D.A.M.A.D. Antinociceptive activity of (–)-carvone: Evidence of association with decreased peripheral nerve excitability. *Biol. Pharm. Bull.* **2008**, *31*, 1017–1020.
27. Kanna, N.; Bathia, J. Antinociception action of *Ocimum sanctum* (Tulsi) in mice: Possible mechanisms involved. *J. Ethnopharmacol.* **2003**, *88*, 293–296.
28. Oliveira, F.S.; Sousa, D.P.; Almeida, R.N. Antinociceptive effect of hydroxydihydrocarvone. *Biol. Pharm. Bull.* **2008**, *31*, 588–591.
29. Wang, Y.; Chen, P.; Tang, C.; Wang, Y.; Li, Y.; Zhang, H. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of extract and two isolated flavonoids of *Carthamus tinctorius* L. *J. Ethnopharmacol.* **2014**, *151*, 944–950.
30. Anand, R.; Kaithwas, G. Anti-inflammatory potential of alpha-linolenic acid mediated through selective COX inhibition: Computational and experimental data. *Inflammation* **2014**, *37*, 1297–1306.
31. Jäger, A.K.; Petersen, K.N.; Thomasen, G.; Christensen, S.B. Isolation of linolenic and α -linolenic acids as COX-1 and -2 inhibitors in Rose Hip. *Phytother. Res.* **2008**, *22*, 982–984.
32. Cunha, T.M.; Roman-Campos, D.; Lotufo, C.M.; Duarte, H.L.; Souza, G.R.; Verri, W.A., Jr.; Funez, M.I.; Dias, Q.M.; Schivo, I.R.; Domingues, A.C; *et al.* Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3K γ /AKT/nNos/NO/Katp signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 4442–4447.
33. Khan, G.R.; Scheinmann, F. Some recent advances in physical methods for analysis and characterization of polyunsaturated fatty acids. *Prog. Chem. Fats Lipids* **1978**, *15*, 343–367.

34. Christie, W.W. Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. In *Advances in Lipid Methodology*; Christie, W.W., Ed.; Oil Press: Dundee, UK, 1993; pp. 69–111.
35. Miller, L.C.; Tainter, M.L. Estimation of the LD₅₀ and its error by means of logarithmic probit graph paper. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1994**, *57*, 261–264.
36. OECD. *Guidance Document on Acute Oral Toxicity*; Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24; Environment Directorate OECD: Paris, France, 2000.
37. OECD. *Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents*; Environment Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 407; Environment Directorate OECD: Paris, France, 1995.
38. Koster, R.; Anderson, M.; de Beer, E.J. Acetic acid for analgesic screening. *Fed. Proc.* **1959**, *18*, 412–418.
39. MacDonald, A.D.; Woolfe, G.; Bergel, F.; Morrison, A.L.; Rinderknecht, H. Analgesic action of pethidine derivatives and related compounds. *Br. J. Pharmacol.* **1946**, *1*, 4–14.
40. Hunskaar, S.; Hole, K. The formalin test in mice: Dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* **1987**, *30*, 103–114.

Sample Availability: Samples of fatty oil and pure compounds are available with the authors.

© 2015 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article

distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license

(<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).