

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**

**EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO EXTRATO DE *Cissus gongylodes*
(Baker) Planch., DA SUBSTÂNCIA ISOLADA (ÁCIDO MÁLICO) E A
PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA CANABINOIDE E DA VIA NO/GMPc/K_{ATP}**

Marla Oliveira Calazans

BELO HORIZONTE

2021

Marla Oliveira Calazans

**EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO EXTRATO DE *Cissus gongylodes*
(Baker) Planch., DA SUBSTÂNCIA ISOLADA (ÁCIDO MÁLICO) E A
PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA CANABINOIDE E DA VIA NO/GMPc/K_{ATP}**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do grau de Mestra em Ciências Biológicas, com área de concentração em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Perez.

BELO HORIZONTE

2021

043

Calazans, Marla Oliveira.

Efeito antinociceptivo do extrato de *Cissus gongylodes* (Baker) Planch., da substância isolada (ácido málico) e a participação do sistema canabinoide e da via NO/GMPc/K_{ATP} [manuscrito] / Marla Oliveira Calazans. – 2021.

121 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Perez.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Farmacologia. 2. Plantas medicinais. 3. *Maliçum Acidum*. 4. Canabinoides. 5. Dor. 6. Analgesia. 7. Óxido nítrico. 8. GMP Cíclico. 9. Canais KATP. I. Perez, Andréa. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DISSERTAÇÃO N° 536 DE MARLA OLIVEIRA CALAZANS

"EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO EXTRATO DE *Cissus gongylodes* (Baker) Planch., DA SUBSTÂNCIA ISOLADA (ÁCIDO MÁLICO) E A PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA CANABINOIDE E DA VIA NO/GMPc/KATP"

MARLA OLIVEIRA CALAZANS

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **11 de março de 2021**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Profa. Dra. Daniella Bonaventura, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais

Profa. Dra. Andrea de Castro Perez, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais - Orientadora

Belo Horizonte, 11 de março de 2021.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Carlos Pinheiro de Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 17/06/2021, às 15:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniella Bonaventura, Professora do Magistério Superior**, em 18/06/2021, às 16:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andrea de Castro Perez, Professora do Magistério Superior**, em 30/06/2021, às 16:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0789250** e o código CRC **94909AF0**.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Andréa de Castro Perez, minha orientadora, por me abrir as portas do mundo acadêmico com tranquilidade e sabedoria.

À Profa. Dra. Lúcia Pinheiro Santos Pimenta, por confiar ao meu trabalho o seu próprio, com toda disposição possível.

Ao Prof. Dr. Igor Dimitri Gama Duarte, por distribuir todo seu conhecimento e experiência a quem está ao seu redor.

Ao Prof. Dr. Thiago Roberto Lima Romero, pelas ideias e entusiasmo contagiantes na rotina do laboratório.

A todo o corpo docente do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, pela competência aplicada às salas de aula e ao dia-a-dia no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

À minha família de sangue, meu pai Anibal Roberto Calazans (*in memoriam*, obrigada por tudo, pai!), minha mãe Maria Gorete Oliveira Calazans, minha irmã Karen Oliveira Calazans e meu irmão Rodolfo Oliveira Calazans, pelo orgulho, apoio e por sempre confiarem na minha capacidade.

Ao meu filho, Dante Chaves Calazans, meu grande “companheirinho” nessa última década, por todo amor e confiança em mim depositados e por quem faço tudo. Minha sobrinha Laila Calazans, por toda graça e esperteza que são inspiradoras.

À minha família de espírito, que me escolheu e por mim foi escolhida, minhas grandes amigas e amigos. Mesmo não sendo possível pontuar todas e todos, agradeço em especial “aZamiga” Isadora Sepúlveda, Ludmila Hufnagel, Luiza Guimarães e Luiza Vidal; Rafael Rodrigo dos Santos, Bárbara Zaidan, Kelly Gonçalves Primo, Bruna Carvalhais Santiago, pela amizade e parceria de longa data. À toda a Família Biológica da UFMG, à Família Interbio e, especialmente, à COSom, que nos últimos 6 anos enche minha vida de alegria e aprendizados.

Ao meu grande amor, meu eterno namorado, Pedro Caldeira de Barros, por todo incentivo, cuidado, paciência e compreensão ao longo desses 8 anos juntos. À família do Pedro, à Eliane, ao Lincoln e à Sílvia, Ana e Luísa, pelo apoio e auxílio incondicionais.

À todas as companheiras e companheiros do Laboratório de Dor e Analgesia (LDA), pela determinação, coragem e resiliência em tempos tão adversos para com a Ciência: Adriane Aparecida Pereira, Daniel Portela Dias Machado, Cristina da Costa Oliveira, Flávia Cristina Sousa Fonseca, Douglas Lamounier de Almeida, Bárbara Formiga, Raquel Rodrigues Santos, Vanessa Meinertz Kaiser, Wallace Barra Pinto, Mariana Nathuê Lôbo Prata, Amanda Cristina Reis Gonzaga, William Valadares Campos Pereira, Danielle Diniz Aguiar, Aline Gouveia Gomes e, em especial, Renata Cristina Mendes Ferreira, por todo apoio na reta final do trabalho.

Ao pessoal da secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Fisiologia e Farmacologia, pela disponibilidade e prontidão.

Aos bioteristas Rinaldo e Wellington, por cuidarem dos nossos animais de experimentação.

Aos órgãos de fomento CNPq, CAPES e FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

E, finalmente, aos próprios animais de experimentação, por doarem suas vidas em prol da Ciência.

"An apple a day keeps the doctor away."

Provérbio britânico

RESUMO

Cupá - *Cissus gongylodes* (Baker) Planch – é uma liana cosmopolita, encontrada no Brasil em diversos estados, Minas Gerais incluso. É dito que cupá tem propriedades para alívio da dor, então o presente trabalho teve por objetivo demonstrar este potencial analgésico, no intuito de validar o conhecimento tradicional e elucidar a via farmacológica participante deste evento.

Foram utilizados camundongos Swiss machos (30g - 40g, n=5). A ação antinociceptiva de EE foi avaliada pelo teste de formalina. Os animais foram submetidos ao pré-tratamento oral com extrato diluído nas concentrações 0, 10, 30, 100, 300 e 1000 mg/kg (extrato/peso animal), administração única. Formalina 2% - agente hiperalgésico – foi administrada na pata e o tempo de lambida desta foi registrado nos períodos da dor nociceptiva, 0-5 min depois da formalina, e dor inflamatória, 15-30 min. EE demonstrou efeito antinociceptivo de forma dose-dependente.

Cinco frações deste extrato (F1, F2, F3, F4 e F5) foram testadas, por meio do teste de retirada de pata submetida a compressão no analgesímetro, com o hiperalgésico prostaglandina E₂ (PGE₂), para avaliação do limiar nociceptivo. F1 obteve resultados mais satisfatórios e, portanto, submetida à uma caracterização química identificando o ácido málico como o composto majoritário da fração.

Ácido L-málico puro e ácido DL-málico (mistura racêmica) também foram testados pelo método de retirada de pata (50, 100 e 200 µg/pata). Ácido L-málico demonstrou o melhor perfil de efeito antinociceptivo dose-dependente, sendo 100 µg suficiente para o efeito máximo.

Não vimos participação do sistema opioidérgico na antinocicepção por L-málico 100 µg. Contudo, verificamos o envolvimento dos receptores canabinoideérgicos CB₁ e do endocanabinoide anandamida (AEA).

Verificamos também a participação da via NO/GMPc/canais K_{ATP} no efeito antinociceptivo de L-málico, pela utilização de inibidores e bloqueadores específicos. Sugerimos que ácido L-málico poderia ser uma nova indicação para possível uso terapêutico para tratamento de dores comuns.

Palavras-chave: Antinocicepção, plantas medicinais, L-málico, sistema canabinoide, NO/GMPc/K_{ATP}

ABSTRACT

Cupá - *Cissus gongylodes* (Baker) Planch - is a cosmopolitan vine, found in Brazil in several states, including Minas Gerais. It is been said that cupá has pain-relieving properties, so this study aimed to demonstrate its analgesic potential, in order to validate traditional knowledge and elucidate the pharmacological pathway that participates in this event.

Male Swiss mice (30g - 40g, n = 5) were used. The antinociceptive action of EE was assessed by the formalin test. The animals were submitted to oral pretreatment with diluted extract in concentrations 0, 10, 30, 100, 300 and 1000 mg / kg (extract / animal weight), one administration. 2% formalin - hyperalgesic agent - was administered at the paw and licking time was recorded through periods of nociceptive pain, 0-5 min after formalin, and inflammatory pain, 15-30 min. EE demonstrated a dose-dependent antinociceptive effect.

Five fractions of this extract (F1, F2, F3, F4 and F5) were tested, using the paw withdrawal test submitted to compression on the analgesimeter, with the hyperalgesic prostaglandin E2 (PGE2), to assess the nociceptive threshold. F1 obtained more satisfactory results and, therefore, subjected to a chemical characterization identifying malic acid as the major compound of the fraction.

Pure L-malic acid and DL-malic acid (racemic mixture) were also tested using the paw withdrawal method (50, 100 and 200 µg/paw). L-malic acid showed the best dose-dependent antinociceptive effect profile, with 100 µg sufficient for the maximum effect.

We did not see the participation of the opioidergic system in antinociception by L-malic 100 µg. However, we verified the involvement of cannabinoidergic CB₁ receptors and endocannabinoid anandamide (AEA).

We also verified the participation of the NO/cGMP/K_{ATP} channels in the antinociceptive effect of L-malic, through the use of specific inhibitors and blockers. We suggest that L-malic acid could be a new indication for possible therapeutic use for the treatment of common pain.

Keywords: Antinociception, medicinal plants, L-malic, cannabinoid system, NO/cGMP/K_{ATP}

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Classificação dos tipos de dor.....	19
Figura 2: Axônios aferentes primários.....	20
Figura 3: Representação esquemática da via ascendente da dor.....	21
Figura 4: Representação esquemática do “Portão da dor”.....	22
Figura 5: Distribuição anatômica dos receptores canabinoideiros no corpo humano	25
Figura 6: Esquema do efeito duplo do óxido nítrico na dor	27
Figura 7: Imagens de <i>Cissus gongylodes</i>	30
Figura 8: 2D e 3D dos enantiômeros do ácido málico.....	32
Figura 9: Esquema ilustrativo simplificado do Ciclo de Krebs	33
Figura 10: Esquema ilustrativo das fases de purificação do material vegetal de <i>C. gongylodes</i>	41
Figura 11: Fluxograma representativo das etapas para a obtenção dos subprodutos (EE e frações) de <i>C. gongylodes</i>	42
Figura 12: Espectro de ressonância magnética nuclear de F1.....	43
Figura 13: Vias de administração utilizadas neste trabalho	45
Figura 14: Câmara de acrílico do teste de formalina.....	48
Figura 15: Procedimento experimental realizado no teste de formalina.....	49
Figura 16: Aparelho (Rota-rod).....	49
Figura 17: Fotos do manuseio do camundongo no analgesímetro.....	51
Figura 18: Procedimento experimental do teste de retirada de pata	52
Figura 19: Ação de EE de <i>C. gongylodes</i> no teste da formalina	56
Figura 20: Ação de EE de <i>C. gongylodes</i> no teste de coordenação motora em camundongos.....	57
Figura 21: Estômagos dos animais em tratamento oral	58
Figura 22: Curva do efeito antinociceptivo de F1	60
Figura 23: Curva do efeito antinociceptivo de F2	62
Figura 24: Curva do efeito antinociceptivo de F3	63
Figura 25: Curva do efeito antinociceptivo de F4	65
Figura 26: Curva do efeito antinociceptivo de F5	66
Figura 27: Curva do efeito antinociceptivo de ácido DL-málico.....	68
Figura 28: Curva do efeito antinociceptivo de ácido L-málico	70

Figura 29: Exclusão de efeito antinociceptivo de ácido L-málico	71
Figura 30: Ação da naloxona sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo ácido L-málico.....	72
Figura 31: Ação do AM251 sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo ácido L-málico	74
Figura 32: Ação do MAFP sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo ácido L-málico	75
Figura 33: Ação do JZL184 sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo ácido L-málico	76
Figura 34: Ação do L-NOArg sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo ácido L-málico.....	78
Figura 35: Ação do L-NIL sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo ácido L-málico	79
Figura 36: Ação do L-NPA sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo ácido L-málico	80
Figura 37: Ação do L-NIO sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo ácido L-málico	81
Figura 38: Ação do ODQ sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo ácido L-málico	83
Figura 39: Ação do zaprinast sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo ácido L-málico.....	84
Figura 40: Ação do TEA sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo ácido L-málico.....	86
Figura 41: Ação da glibenclamida sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo ácido L-málico.	87
Figura 42: Esquema gráfico representativo do potencial analgésico do extrato de <i>C. gongylodes</i> e dos supostos mecanismos de antinocicepção do ácido L-málico	99

LISTA DE ABREVIATURAS

2-AG - 2-araquidonoil glicerol

AEA - araquidonil etanolamina (anandamida)

AHA - alfa-hidroxiácidos

AIE - anti-inflamatório esteroidal

AINE - anti-inflamatório não esteroidal

AMPc - adenosina monofosfato cíclica

ANOVA - análise de variância (do inglês *analysis of variance*)

ASIC - canais iônicos sensíveis ao ácido (do inglês *acid sensitive ionic channels*)

ATP - adenosina trifosfato

BICBIO-2 - Centro de Bioterismo

Ca²⁺ - íon cálcio

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CB₁ - receptor canabinoide do tipo 1

CB₂ - receptor canabinoide do tipo 2

CCD - cromatografia em camada delgada

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

cNOS – enzimas óxido nítrico sintases constitutivas

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

COX - ciclo-oxigenase

DAG - diacilglicerol

DMSO - dimetilsulfóxido

DRG - gânglio da raiz dorsal (do inglês *dorsal root ganglion*)

EE – extrato etanólico 80% de *Cissus gongylodes*

eNOS - óxido nítrico sintase endotelial

EPM - erro padrão da média

et al. - e outros (do latim *et alii*)

etOH - etanol

FAAH - amida hidrolase de ácidos graxos (do inglês *fatty acid amide hydrolase*)

FAPEMIG - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

FDA - Food and Drug Administration

GABA - ácido gama-aminobutírico (do inglês *gamma-aminobutyric acid*)

GC - guanilato ciclase solúvel

Glu - glutamato

GMPc - guanosina monofosfato cíclica

GPCR - receptores acoplados a proteína G (do inglês *G protein coupled receptors*)

GTP - guanosina trifosfato

HGLEA - homo- γ -linolenoiletanolamida

i.p. - intraperitoneal

i.pl. - intraplantar

IASP - Associação Internacional para o Estudo da Dor (do inglês *International Association for the Study of Pain*)

ICB - Instituto de Ciências Biológicas

iNOS - óxido nítrico sintase induzível

IUPAC – União Internacional de Química Pura Aplicada (do inglês *International Union of Pure Applied Chemistry*)

IUPHAR – União Internacional de Farmacologistas (do inglês *International Union of Pharmacologists*)

K_{2P} - canais para K⁺ de dois poros

K_{ATP} - canais para potássio sensíveis ao ATP

K_{Ca} - canais para K⁺ ativados por cálcio

K_{ir} - canais para K⁺ retificadores de influxo

K_v - canais para K⁺ dependentes de voltagem

LDA - Laboratório de Dor e Analgesia

LOX - lipoxigenases

MAC - metabolismo ácido das crassuláceas

MAGL - monoacilglicerol lipase

mGluR - receptor metabotrópico de glutamato

n - número de animais experimentais

nNOS - óxido nítrico sintase neuronal

NO - óxido nítrico

NOS - óxido nítrico sintase

PDE - fosfodiesterase

PEA - palmitoiletanolamida

PG - prostaglandina

PGE₂ - Prostaglandina E₂

PKA - proteína quinase A

PKB - proteína quinase B

PKG - proteína quinase G

PNPIC - Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

RMN - ressonância magnética nuclear

rpm - rotações por minuto

s.c. - via subcutânea

SCP - substância cinzenta periaqueductal

SisGen - Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

SNC - sistema nervoso central

SP - substância P

SUS - Sistema Único de Saúde

THC - Δ^9 -tetrahydrocannabinol

TNL - terminações nervosas livres

TrkA - receptor de tirosina quinase A (do inglês *tyrosine kinase A receptor*)

TRP - receptor de potencial transitório (do inglês *transient receptor potential*)

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

Unesp – Universidade Estadual de São Paulo

v.o. - via oral

SUMÁRIO

1. Introdução	16
1.1. Algumas considerações sobre o estudo da dor	17
1.2. Bases fisiológicas da dor	20
1.3. Modulação endógena da dor e sistema opioide	22
1.4. Sistema endocanabinoide	24
1.5. Sistema nitrérgico	26
1.6. Canais para potássio (K⁺)	27
1.7. Tradição e plantas medicinais	28
1.8. <i>Cissus gongylodes</i> (Baker) Planch.	30
1.9. O ácido málico	31
1.9.1. <i>Apresentação</i>	31
1.9.2. <i>Bioquímica</i>	32
1.9.3. <i>Segurança e toxicidade</i>	33
1.9.4. <i>Aplicações médicas</i>	34
2. Justificativa	35
3. Objetivos	38
4. Material e Métodos	40
4.1. Material vegetal de <i>Cissus gongylodes</i> (Baker) Planch.	41
4.2. Subprodutos de <i>Cissus gongylodes</i> (Baker) Planch.: extrato etanólico (EE), frações (F1, F2, F3, F4 e F5) e Ácido Málico	41
4.3. Animais de experimentação	43
4.4. Cálculo do n amostral:	44
4.5. Vias de administração:	45
4.6. Fármacos e solventes	45
4.6.1. <i>Fármacos hiperalgésicos</i>	45
4.6.2. <i>Fármacos controle:</i>	46
4.6.3. <i>Fármacos dos sistemas endógenos de controle da dor:</i>	46
4.6.4. <i>Agentes antinociceptivos em estudo:</i>	47
4.7. Teste de formalina	47
4.8. Teste de coordenação motora (Rota-rod)	49
4.9. Teste de retirada da pata sob compressão	50
4.9.1. <i>Medida do limiar hiperalgésico</i>	51

4.9.2. Procedimento Experimental.....	51
4.9.3. Exclusão do efeito sistêmico do ácido málico.....	52
4.10. Eutanásia dos animais	53
4.11. Análise Estatística	53
5. Resultados.....	54
5.1. Efeito antinociceptivo do Extrato Etanólico 80% de <i>Cissus gongylodes</i> (Baker) Planch. (EE):	55
5.2. Análise da mucosa estomacal dos animais tratados com EE 1000 mg/kg por via oral:	58
5.3. Efeito antinociceptivo das frações eluídas de EE 80% ante a hiperalgesia induzida por prostaglandina E₂ (PGE₂):	59
5.4. Efeito antinociceptivo do ácido málico ante a hiperalgesia induzida por prostaglandina E₂ (PGE₂):	67
5.5. Análise do envolvimento do sistema opioide na antinocicepção mediada pelo ácido L-málico:	72
5.6. Análise do envolvimento do sistema canabinoide na antinocicepção mediada pelo ácido L-málico:	73
5.7. Análise do envolvimento da via L-arginina/NO/GMPc na antinocicepção mediada pelo ácido L-málico:	77
5.8. Análise do envolvimento de canais para potássio na antinocicepção mediada pelo ácido L-málico:	85
6. Discussão	88
Referências Bibliográficas	100
Anexos	118

1. Introdução



1.1. Algumas considerações sobre o estudo da dor

A definição de “dor” foi retificada pela Associação Internacional do Estudo da Dor (IASP) no ano de 2020 e hoje é compreendida como “uma experiência sensitiva e emocional desagradável associada, ou semelhante àquela associada, a uma lesão tecidual real ou potencial”. A dor é um dos sintomas mais comuns da medicina: ocorre em uma gama enorme de condições clínicas e existem várias subespecialidades médicas e especialistas envolvidos no tratamento (Cox *et al.*, 2010).

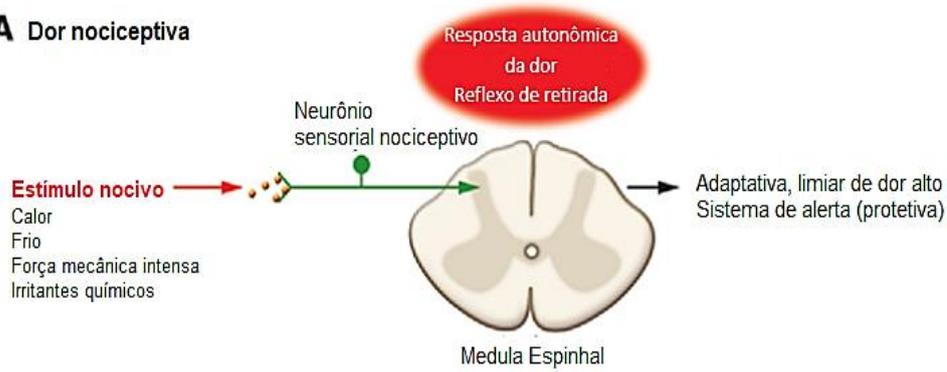
O reflexo sensorial da dor é de extrema importância, pois indica alguma anormalidade ocorrendo no organismo, o que leva o indivíduo a buscar e tentar interromper sua causa. Sua ausência é perigosa, como ocorre em algumas condições hereditárias, podendo levar a danos irreversíveis aos tecidos, amputações e até mesmo à morte (Indo *et al.*, 2001; Cox *et al.*, 2006; Woolf, 2010).

O termo “dor” abrange os componentes fisiológicos, emocionais, sociais e cognitivos dessa sensação desagradável. No contexto médico, é vista como malefício, mas se considerarmos a dor como ferramenta ritualística de passagem, comum em sociedades tradicionais espalhadas pelo mundo, essa conotação maléfica se inverte. Para os Nandi, tribo do Quênia, o jovem se qualifica guerreiro após passar pela circuncisão sem anestésicos; entre os Mandan, tribo indígena norte-americana, este ritual envolve perfurações pelo corpo. Os jovens indígenas da tribo Sateré-Mawé, da região amazônica, são submetidos ao ritual da tocandira *waumat*, onde introduzem a mão em uma luva cheia de formigas tocandiras, cuja picada é extremamente dolorosa (Alvarez, 2005; Meira, 2009).

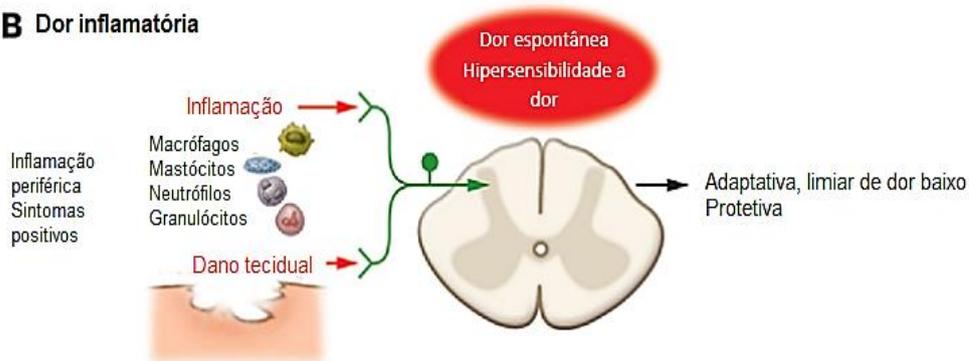
Em relação aos animais de experimentação, é de conhecimento que estes também têm todos os fatores emocionais e cognitivos da dor. Entretanto, em laboratório, avaliamos um desses fatores, a nocicepção. Nocicepção é o processo neural que codifica e interpreta os estímulos nocivos detectados pelos nociceptores e envia para o sistema nervoso central. Dessa forma, para os animais de experimentação usamos os termos “nocicepção” e “antinocicepção” (Julius e Basbaum, 2001; Klaumann *et al.*, 2008).

A dor é classificada, simplificadamente, em quatro tipos: dor nociceptiva, dor inflamatória, dor neuropática e dor disfuncional. A dor nociceptiva é adaptativa e protetiva e se configura pelo sinal de alerta fisiológico do organismo, essencial ao detectar e minimizar o contato com o estímulo nocivo e danoso (quando tocamos algo afiado ou muito quente, por exemplo). A dor inflamatória, um dos sinais cardinais da inflamação, também é adaptativa, protetiva e de alerta, pois sinaliza um dano tecidual ao sensibilizar a região acometida. A dor neuropática e a dor disfuncional não são adaptativas nem protetivas, resultando do mau funcionamento do sistema nervoso. Podem se originar após uma lesão real do tecido, no caso da dor neuropática e para a dor disfuncional, de um desbalanço do sistema nervoso, que ocorre em condições em que não há nem inflamação nem dano aparente deste (Woolf, 2010) (Fig.1).

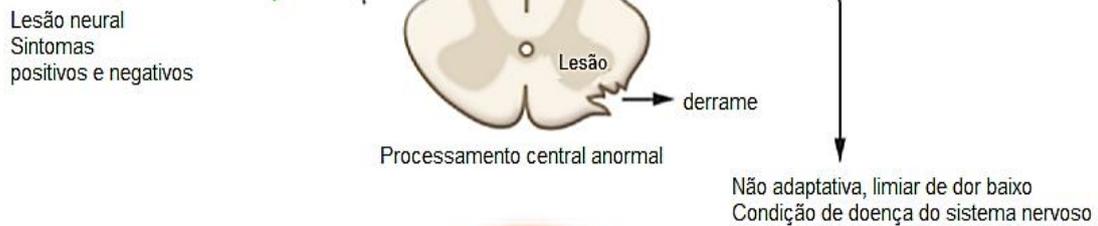
A Dor nociceptiva



B Dor inflamatória



C Dor neuropática



D Dor disfuncional



Figura 1: Classificação dos tipos de dor. (Retirado e adaptado de Woolf, 2010)

1.2. Bases fisiológicas da dor

A princípio a dor é percebida pelas terminações nervosas livres (TNL), ou nociceptores, que são a porção terminal de fibras nervosas especializadas que têm ampla distribuição pelo corpo, innervando pele, mucosas, tecido conjuntivo, músculos, ligamentos, tendões, entre outros. Estes nociceptores são receptores sensoriais de alto limiar do sistema nervoso somatossensorial periférico capazes de transduzir e codificar estímulos nocivos. Estudos de eletrofisiologia demonstraram que o calor intenso, pressão intensa ou fortes irritantes químicos são capazes de ativar os nociceptores. Por outro lado, um toque leve ou um calor confortável não têm ação sobre estes. Neste caso, os receptores sensoriais de baixo limiar de estímulo é que são responsivos (McMahon e Koltzenburg, 1990; Julius e Basbaum, 2001).

Receptores sensoriais podem ser classificados em três tipos, sendo: a) fibras $A\alpha$ e $A\beta$, mielinizadas, largo diâmetro, rápida velocidade de condução do estímulo; b) $A\delta$, pouco mielinizadas, diâmetro médio e condução média; e c) fibras C, amielinizadas, finas e de condução lenta. Via de regra, os estímulos nocivos são, em sua maioria, percebidos pelas fibras $A\delta$ e C, mas alguns estudos já demonstraram que as fibras $A\beta$ podem participar da nocicepção (revisado por Millan, 1999; Lawson, 2002). A Figura 2 mostra diferentes fibras sensoriais detectando diferentes tipos de estímulo sensorial:

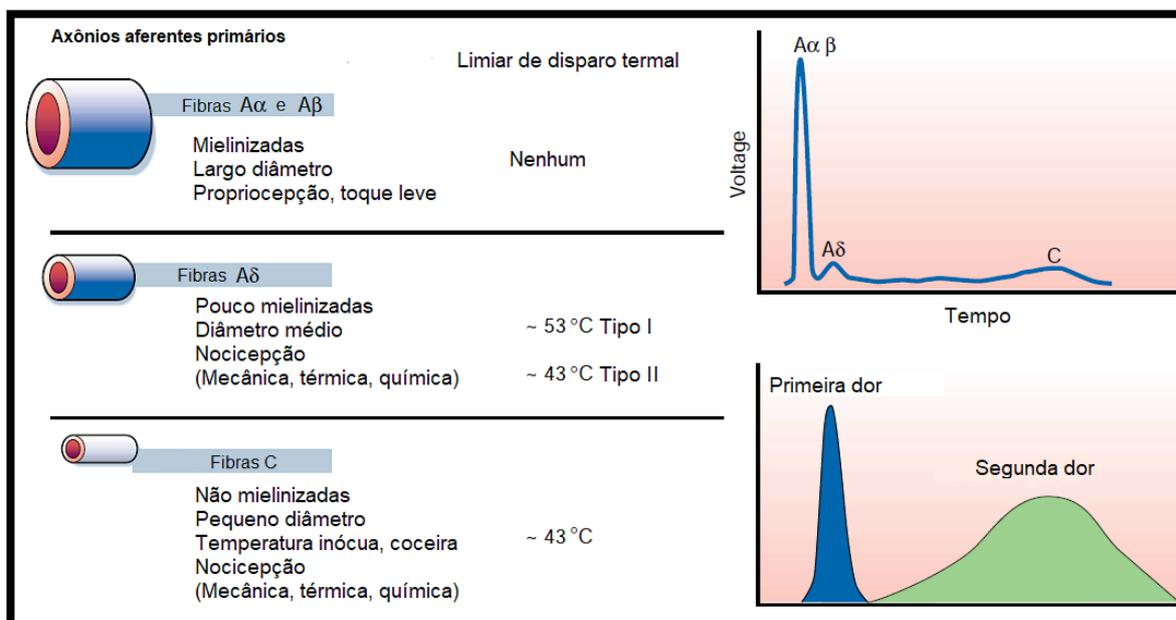
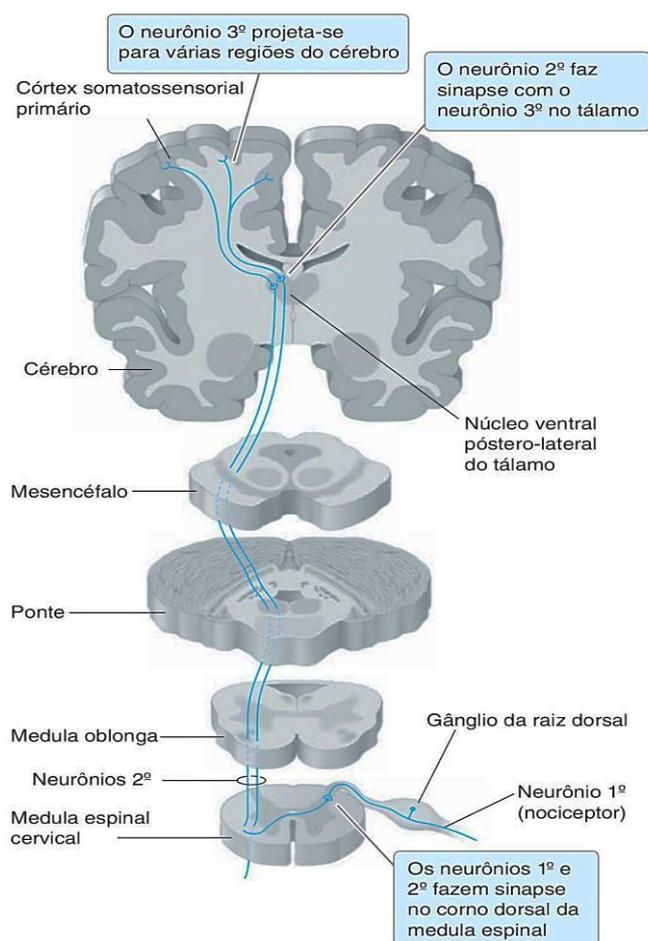


Figura 2: Axônios aferentes primários. Fibras $A\alpha$, $A\beta$, $A\delta$ e C. Velocidade de condução do estímulo e relação com a primeira e segunda dor. (retirado e adaptado de Julius e Basbaum, 2001)

O estímulo nocivo percebido é transformado em potencial de ação, em um processo denominado transdução, desencadeado por receptores e canais iônicos dos terminais periféricos dos nociceptores. Entre estes canais e receptores estão os canais TRPs, canais iônicos sensíveis ao ácido (ASIC), receptores de serotonina, receptor de tirosina quinase A (TrkA), entre outros.

O processo seguinte é a transmissão, que consiste na passagem de potenciais de ação do terminal periférico ao longo dos axônios até o sistema nervoso central, pelas fibras nervosas A δ e C. As fibras A δ são responsivas a estímulos nocivos térmicos e/ou mecânicos, gerando sensação dolorosa localizada e específica, envolvendo principalmente pele e mucosas. Já as fibras C são responsivas a estímulos térmicos, mecânicos e químicos sendo, por isso, chamadas de receptores polimodais. Inervam principalmente tecidos e pele (Julius e Basbaum, 2001; Woolf, 2004; revisado por Vanderah, 2007).

A transmissão é conduzida pelos neurônios aferentes de primeira ordem até substância gelatinosa do corno dorsal da medula espinhal. Lá realizam sinapses com neurônios aferentes de segunda ordem, que são os de condução,



que ascendem pela medula contralateral até o tálamo. No tálamo ocorre interação com os neurônios aferentes de terceira ordem, que se projetam para o córtex somatossensorial, local onde os estímulos nociceptivos são traduzidos ao nível da consciência (Fürst, 1999; revisado por Vanderah, 2007)) (Fig 3).

Figura 3: Representação esquemática da via ascendente da dor. (retirado de Golan *et al.*, 2014).

1.3. Modulação endógena da dor e sistema opioide

Até meados da década de 1960 existiam duas fortes teorias sobre a dor, que derivavam dos mesmos conceitos propostos por von Frey e Goldscheider em 1894, mas eram mutuamente excludentes. Em suma, a teoria da especificidade assumia a existência de receptores específicos de dor, distribuídos pelo corpo, e que sempre que estes receptores fossem ativados existiria a sensação dolorosa, independente do caráter psicológico associado. Já a teoria do padrão propunha que não existia especificidade nos receptores e o determinante para a sensação de dor era o tipo de estímulo nocivo aplicado (revisado por Melzack e Wall, 1965). Hoje sabemos que a primeira teoria peca ao excluir o caráter psicológico da dor, enquanto a segunda peca em desconsiderar a alta especialização das fibras nervosas nociceptivas.

Em 1965 Melzack e Wall propuseram a “Teoria do portão da dor” como uma alternativa a esse embate da época. De acordo com o proposto, as fibras de maior diâmetro ($A\alpha$ e $A\beta$) e as fibras de menor diâmetro ($A\delta$ e C) se projetam para o corno dorsal da medula espinal e interferem mutuamente na transmissão dos impulsos nervosos. As fibras táteis ($A\alpha$ e $A\beta$), uma vez estimuladas, ativariam interneurônios inibitórios na região que inibiriam a transmissão nociceptiva, como se fechasse o portão para a passagem do impulso nervoso. Em contrapartida, o estímulo das fibras nociceptivas inibiria estes interneurônios inibitórios, abrindo o portão para a passagem do impulso (Fig 4).

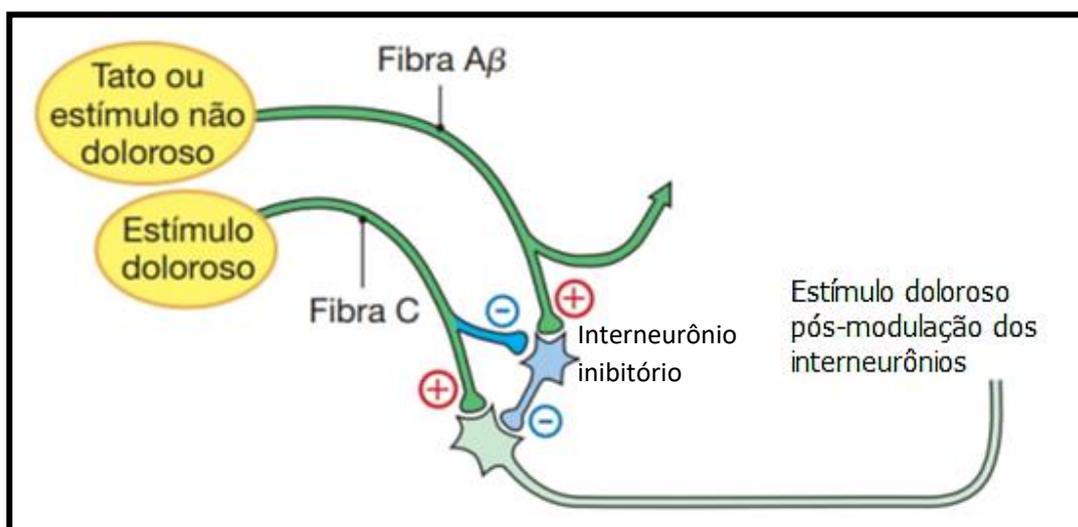


Figura 4: Representação esquemática do “Portão da dor”. (+) = estímulo; (-) inibição. Retirado e adaptado de Silverthorn, 2017.

Em 1969 Reynolds conseguiu demonstrar experimentalmente a existência deste controle endógeno da dor (também chamada de via descendente). Ao estimular a substância cinzenta periaqueductal (SCP) de ratos, Reynolds induziu processos analgésicos nos animais em cirurgia, que não haviam sido anestesiados, sem alterar suas outras respostas comportamentais. Desde então, vários outros sítios antinociceptivos supraespinhais foram identificados, como o hipotálamo, o locus coeruleus, o núcleo do trato solitário, entre outros (Hosobuchi *et al.*, 1977; Sandkühler, 1996; revisado por Millan, 2002).

A partir dessas descobertas, a modulação endógena da dor passou a ser amplamente investigada, começando pelo sistema opioidérgico. Este nome é derivado de “ópio”, um extrato purificado da papoula que por milênios foi utilizado para alívio doloroso. Hoje é sabido que do ópio se extraem moléculas analgésicas poderosas, como a morfina e a codeína. Em contrapartida, opiáceos de um modo geral tem reações adversas limitantes como a prisão de ventre, sedação, depressão respiratória, tolerância e dependência, chegando a ser problema de saúde pública nos Estados Unidos (Holden *et al.*, 2005; Kolodny *et al.*, 2015).

O sistema opioidérgico é composto por três classes de receptores: μ (mi), κ (kappa) e δ (delta), que são ativados por uma família de peptídeos endógenos estruturalmente relacionados, a saber as β -endorfinas, dinorfinas e encefalinas. Apesar de haver afinidade maior de um peptídeo por um receptor, nenhum deles é específico (Dickenson, 1991; Kieffer, 1999). Em 1982 Watkins e Mayer demonstraram que essas vias endógenas analgésicas (opioide e também as não-opioide) poderiam ser manipuladas seletivamente com ferramentas farmacológicas, inibindo os tais processos analgésicos evocados pela estimulação elétrica na medula (Reynolds, 1969; Watkins e Mayer, 1982).

Desde então houve muito progresso no entendimento sobre a modulação endógena da dor, além de vários outros mediadores químicos que foram descobertos e descritos ao longo dos anos. Para citar alguns exemplos temos a noradrenalina, a serotonina, a dopamina, a acetilcolina e os endocanabinoides (Sandkühler, 1996).

1.4. Sistema endocanabinoide

Formulações a base de *Cannabis sativa* já são utilizadas como analgésicos há séculos, mas somente na década de 1960 seu princípio ativo majoritário foi isolado, o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (conhecido como THC). Além do THC, aproximadamente outros 100 diferentes canabinoides já foram isolados da *C. sativa*. Um deles é canabinol, que possui propriedades ansiolíticas, anticonvulsivantes, anti-inflamatórias e analgésicas significantes, mas sem os efeitos psicoativos do THC (Guy *et al.*, 2004; Woodhams *et al.*, 2017). No início da década de 1990 foram descobertos os receptores canabinoides e junto veio a descoberta de substâncias canabinoides endógenas (endocanabinoides) capazes de interagir com um ou mais subtipos de seus receptores (Devane *et al.*, 1992; Munro *et al.*, 1993; Mechoulam *et al.*, 1995).

O sistema canabinoide é composto por dois receptores principais, CB₁ e CB₂. Estes são receptores acoplados a proteínas G_i/G_o, cujo mecanismo de sinalização intracelular leva a inibição de adenilato ciclase solúvel e, conseqüentemente, redução das concentrações do segundo mensageiro adenosina monofosfato cíclica (AMPc) e da atividade da célula como um todo (Matsuda *et al.*, 1990; Munro *et al.*, 1993).

CB₁ é um receptor pré-sináptico que modula a liberação de neurotransmissores e inibe a transmissão sináptica, mediando a psicoatividade, regulação da dor, processamento de memória e controle motor. É expresso em maior quantidade no sistema nervoso central (SNC), sendo encontrado no cérebro nas regiões do córtex cerebral, hipocampo, amígdala, cerebelo (Herkenham, 1995; Howlett, 2002) e também na periferia nos neurônios aferentes primários, no gânglio da raiz dorsal (DRG), no corno dorsal da medula espinal e na substância cinzenta periaqueductal (Fig. 5). Receptores CB₁ são bastante expressos nos interneurônios inibitórios do ácido gama-aminobutírico (GABA), mas pouco expressos na maioria dos neurônios excitatórios. São encontrados também em células do sistema imune, como macrófagos, mastócitos e queratinócitos (Hill *et al.*, 2017).

Em relação aos receptores CB₂, estes são mais encontrados em tecidos e células do sistema imune, células hematopoiéticas, fígado, terminações

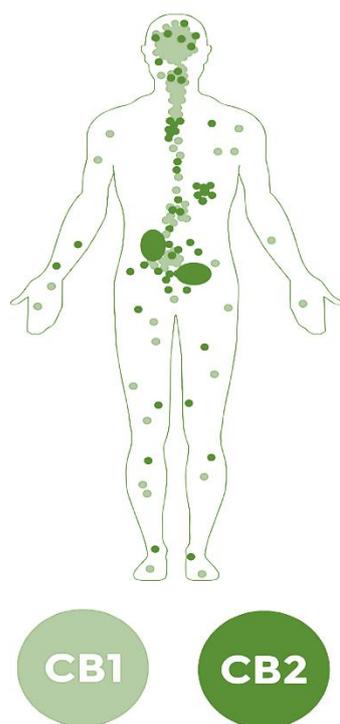


Figura 5: Distribuição anatômica dos receptores canabinoérgicos no corpo humano.

(retirado e adaptado de Inmed Pharmaceuticals, 2020)

nervosas periféricas, queratinócitos e nas micróglias (Fig 5) (Abrams e Guzman, 2015). A ativação de CB₂ não provoca os sintomas psicoativos nem circulatórios relativos a *Cannabis*. Além disso, quando ativados, ajudam a controlar processos inflamatórios e a modular a dor crônica. Na realidade, ambos CB₁ e CB₂ têm alguma participação em mecanismos anti-inflamatórios dos canabinoides (Kano, 2014; Niu *et al.*, 2017).

Após a descoberta de receptores canabinoides, foi discutida a existência de ligantes endógenos capazes de se ligar a esses receptores. A partir de então, o primeiro endocanabinoide identificado foi a araquidonoiletanolamida (AEA), ou anandamida e, pouco tempo depois, o 2-araquidonoilglicerol (2-AG). Outros canabinoides endógenos foram descritos, como a noladina (2-araquidonilgliceril), o PEA (palmitoiletanolamida) e o HGLEA (homo- γ -linolenoiletanolamida), mas os mais estudados atualmente

ainda são o AEA e o 2-AG. A anandamida tem maior afinidade por receptores CB₁, enquanto 2-AG se liga em ambos receptores CB₁ e CB₂ (Marzo e Bisogno, 2001; revisado por Howlett, 2002).

Os endocanabinoides são uma família de eicosanoides sintetizados somente sob demanda e não são armazenados em vesículas. A síntese ocorre a partir de precursores fosfolipídicos de membrana que são liberados dentro dos neurônios pós-sinápticos. Estes neurônios liberam os endocanabinoides na fenda logo após a síntese, que se ligam a receptores canabinoérgicos pré-sinápticos, em um tipo de sinalização retrógrada (Alger, 2002; Hillard e Jarrahian, 2003; Piomelli, 2003). Esse processo termina com a recaptação dos endocanabinoides para o interior dos neurônios, seguida da degradação por enzimas específicas. A AEA é degradada pela FAAH (*fatty acid amide hydrolase*, amida hidrolase de ácidos graxos), sendo convertida em ácido araquidônico e etanolamida, enquanto o 2-AG é degradado pela monoacilglicerol lipase

(MAGL), sendo convertido em ácido graxo e glicerol (revisado por Di Marzo, 2008; Long *et al.*, 2009).

Trabalhos do nosso grupo de pesquisa têm demonstrado nos últimos anos, que a ativação do sistema endocanabinoide leva a antinocicepção periférica (Romero *et al.*, 2012a; Ferreira *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2019). Além disso, a literatura também descreve que a via intracelular do óxido nítrico (NO) pode participar da antinocicepção iniciada pela ativação do sistema endocanabinoide (Azad *et al.*, 2001; Poblete *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2008).

1.5. Sistema nitrérgico

O óxido nítrico (NO) participa de vários fenômenos fisiológicos como vasorrelaxamento, inibição de agregação plaquetária, regulação da pressão sanguínea basal, microcirculação medular e glomerular, entre outros (Cerqueira e Yoshida, 2002). No entanto, níveis aumentados ou diminuídos de NO estão relacionados com uma série de patologias, como disfunções neurodegenerativas, metabólicas, cardiovasculares e inflamatórias (revisado por Lipina e Hundal, 2017).

O NO endógeno é produzido pela oxidação do aminoácido L-arginina, que é catalizado por uma das três isoformas de óxido nítrico sintases (NOS) encontradas nas células: a) a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), b) a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e c) a óxido nítrico sintase induzível (iNOS). As isoformas nNOS e eNOS são enzimas constitutivas (cNOS) dependentes de cálcio e calmodulina; em contrapartida, iNOS geralmente é ativada em resposta a algum estímulo pró-inflamatório (Knowles *et al.*, 1989; Bredt *et al.*, 1992; Salerno *et al.*, 1997).

Além das funções supracitadas, o NO tem importante papel na modulação da dor. Age como mensageiro intra e intercelular, nos sistemas nervosos central e periférico e tem papel crucial na indução e manutenção da hiperalgesia (Miyamoto *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010). Em contrapartida, também tem ação antinociceptiva, modulando a dor em nível central (Duarte e Ferreira, 1992; Freire *et al.*, 2009) e periférico (Duarte *et al.*, 1990; Romero *et al.*, 2012a) (Fig 6).

O óxido nítrico já foi identificado como ligante da guanilato ciclase (GC), enzima que quando ativada estimula a produção do nucleotídeo guanosina

monofosfato cíclica (GMPc), importante segundo mensageiro implicado na ativação da proteína quinase G (PKG). A ativação da PKG leva a abertura de canais para potássio, provocando o efluxo deste íon, reduzindo a excitabilidade neuronal e assim diminuindo a transmissão nociceptiva (Duarte *et al.*, 1990; McDonald e Murad, 1996; Esplugues, 2002).

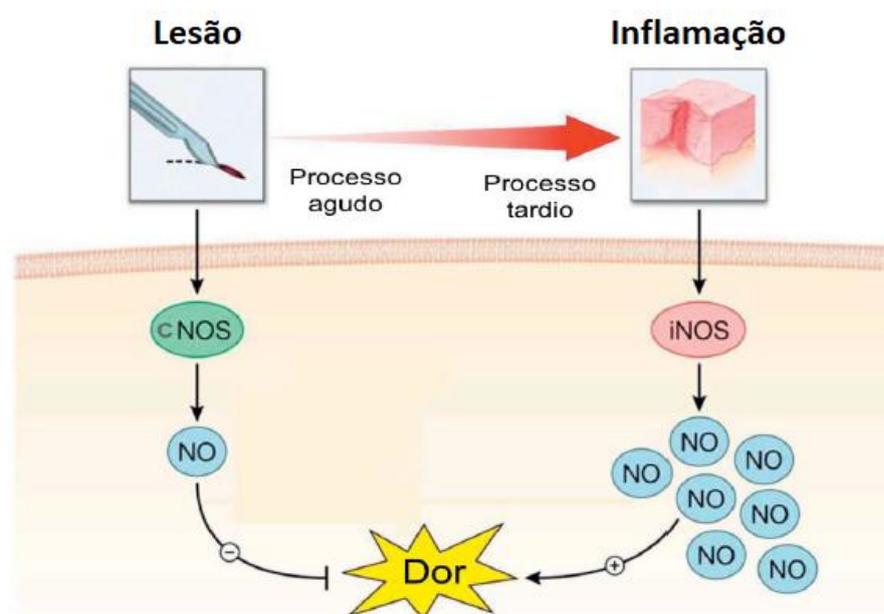


Figura 6: Representação esquemática do efeito duplo do óxido nítrico na dor. As cNOS são ativadas assim que ocorre a lesão no tecido, levam a um ligeiro aumento nas quantidades de NO, induzindo efeito antinociceptivo. Entretanto, na fase tardia, inflamatória, as iNOS estão ativas e superexpressas, aumentando NO, causando efeito hiperalgésico (retirado e adaptado de Hamza *et al.*, 2010).

1.6. Canais para potássio (K⁺)

Os canais para potássio (K⁺) permitem, seletivamente, uma difusão extremamente rápida do íon devido ao gradiente eletroquímico através da membrana plasmática. Estes canais têm papel crucial no controle da atividade neuronal e transmissão do sinal através do sistema nervoso (Shieh *et al.*, 2000; MacKinnon, 2003).

A União Internacional de Farmacologia (IUPHAR) propôs um padrão para a nomenclatura dos canais para potássio baseada na estrutura e relações filogenéticas das proteínas que constituem os canais. Esta nomenclatura diferencia 4 tipos de canais, sendo eles:

- i. Canais para K^+ dependentes de voltagem (K_v);
- ii. Canais para K^+ ativados por cálcio (Ca^+), de alta, intermediária e baixa condutância (KCa);
- iii. Canais para K^+ retificadores de influxo (K_{ir});
- iv. Canais para K^+ de dois poros (K_{2P}) (Vergara *et al.*, 1998; Ocaña, 2004).

Os canais para K^+ retificadores de influxo compreendem 7 famílias (K_{ir1} a K_{ir7}) e várias destas têm seus próprios subtipos. Sua estrutura é mais simples do que os K_v e os KCa , por exemplo, mas existem duas famílias particularmente importantes para a nocicepção: os K_{ir3} e os K_{ATP} (canais sensíveis a adenosina trifosfato) (Mark e Herlitze, 2000).

Ao longo dos anos diversos estudos demonstraram que a abertura destes canais têm um papel crucial na antinocicepção induzida por agonistas de muitos dos receptores acoplados a proteína G (GPCR) (receptores opioides, muscarínicos, serotoninérgicos, canabinoidérgicos etc.). Além disso, estes canais também estão envolvidos na antinocicepção induzida por medicamentos como os anti-inflamatórios não estereoidais (AINEs), os antidepressivos tricíclicos, ou os produtos naturais (Rodrigues e Duarte, 2000; Soares e Duarte, 2001; Alves e Duarte, 2002; Ocaña *et al.*, 2004).

1.7. Tradição e plantas medicinais

Desde os primórdios, em diversas regiões do mundo, curandeiros, sacerdotes, xamãs e outros representantes divinos empregavam remédios naturais e sacrifícios, junto às preces, para de alguma forma aliviar ou curar o sofrimento de quem buscasse ajuda. Para tanto, utilizavam uma gama de métodos como instrumentos terapêuticos, a citar a aplicação de calor, frio, fricção, ou ingestão de determinadas frutas, ervas e a manipulação destas em rituais (Rey *et al.*, 1995). Por exemplo, o papiro de Éber, a farmacopeia egípcia, àquela época já orientava sobre o uso de papoula e meimendo para doenças, cefaleias e dores em geral (revisado por Okada, 2009).

Atualmente, no Brasil, as comunidades tradicionais representadas por indígenas, ribeirinhos, caboclos e quilombolas desempenham um importante papel na transmissão falada do conhecimento de medicina popular. Na

comunidade quilombola de Tauerá-Açú, no Pará, pesquisadoras registraram o uso de mais de 90 espécies diferentes de plantas medicinais pela população, dentre elas a menta (*Mentha pulegium*) e o macassá (*Aeollanthus suaveolens*), originárias da África, o que demonstra que a herança da tradição atravessou um oceano (Pereira e Coelho-Ferreira, 2017). Já na terra indígena Kaxinawá, no Acre, o povo da etnia Huni Kuĩ usa dois exemplares do gênero *Annona* como tratamento: chá das sementes de araticum (*A. crassiflora*) para picada de cobra e a graviola (*A. muricata*) para diferentes dores do trato gastrointestinal (Lopes, 2017).

No que tange o conhecimento científico sobre a terapia com plantas, o ponto de partida é orientado pelo uso destas na medicina tradicional, visto que é mais provável encontrar atividade biológica em plantas já conhecidas do que naquelas escolhidas aleatoriamente. A investigação de produtos naturais como fonte de novas terapias no Ocidente teve um pico entre as décadas de 1970 e 1980 (Koehn and Carter, 2005). Nas últimas décadas do século XX quase um quarto dos medicamentos prescritos no mundo eram fitoterápicos de origem exclusivamente botânica ou drogas sintéticas obtidas de precursores botânicos. Entre alguns exemplos clássicos temos a digoxina, extraída de representantes do gênero *Digitalis*; morfina e codeína da *Papaver somniferum*, a papoula; atropina, da *Atropa beladonna*; e o ácido salicílico, da *Salix alba*, o salgueiro (revisado por Rates, 2001).

No Brasil, em 2006, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) institucionalizou as plantas medicinais, os fitoterápicos e a medicina tradicional no Sistema Único de Saúde (SUS) (Zeni *et al.*, 2017). No entanto, mesmo com esta política pública de incentivo ao uso, falta fomento para a pesquisa e produção de fitoterápicos no Brasil. A maior parte dos medicamentos encontrada nas farmácias brasileiras ainda é de fabricação estrangeira e de plantas estrangeiras. Este é um dado, no mínimo, paradoxal, quando consideramos que o Brasil é o detentor da maior biodiversidade de plantas no mundo, com mais de 46 mil espécies botânicas catalogadas, sendo quase a metade (43%) endêmica do território nacional. No mercado mundial os medicamentos fitoterápicos tiveram um crescimento de 15% nas vendas nos últimos anos, ultrapassando muito os 4% da venda dos sintéticos. No Brasil, os fitoterápicos movimentam em torno de R\$ 865 milhões anuais, o que mostra que

os mercados interno e externo estão bem abertos e propícios para essa categoria de medicamentos (revisado por Rodrigues, 2016; Fioravanti, 2016).

1.8. *Cissus gongylodes* (Baker) Planch.

O cupá - *Cissus gongylodes* (Baker) Planch – é um cipó encontrado na Colômbia, Venezuela, Peru, Bolívia, Brasil (estados do Pará, Maranhão, Ceará, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo), de acordo com a Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo (Shepherd e Giulietti, 2002). Foi descrito pela primeira vez pelo botânico John Gilbert Baker, em 1871 (Kerr *et al.*, 1978). *C. gongylodes* é um cipó de ramos suculentos, angulados e às vezes avermelhados. Possui muitas gavinhas que se ramificam várias vezes e possuem discos adesivos nas extremidades, que também podem ser avermelhados. As folhas são compostas trifolioladas, raramente são simples, com lobadas irregulares e margem denticulada. As folhas novas são papiroáceas e levemente carnosas. Floresce de janeiro a março e frutifica de fevereiro a agosto. Suas inflorescências são aplanadas, de base abaulada e secretora, com brácteas triangulares que, às vezes, apresentam bordos avermelhados. Seus frutos são em forma de baga, geralmente lisos, de cor púrpura (Fig 7) (revisado por Navarro, 2009).

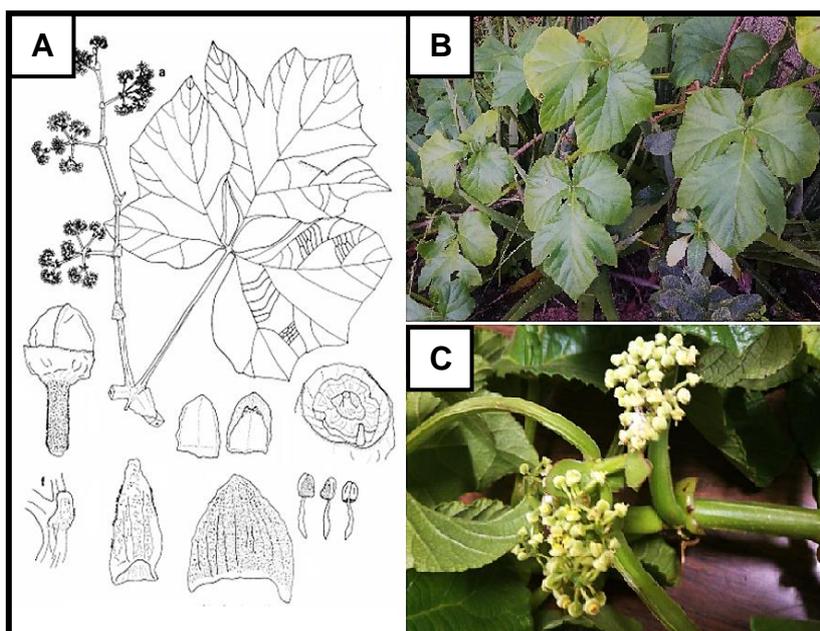


Figura 7: Imagens de *Cissus gongylodes*. [A] Desenho das folhas, ramos e estruturas reprodutivas (retirado e adaptado de Navarro, 2009); [B] Folhas. [C] Inflorescência. Fotos de acervo próprio.

No Peru, *C. gongylodes* é utilizada para tratamento de reumatismo, desinfecção, gastrite, diabetes, pedra nos rins, dor nas juntas, dor de estômago entre outras enfermidades (Pirker *et al.*, 2012). Já no Brasil sua utilização pelos indígenas é uma prática antiga. Utilizada principalmente como alimento, folhas e galhos são consumidos cozidos, assados ou em forma de farinha, que usam como farinha fina ou farinha para pão. Além disso, há registro de uso medicinal das folhas de outras espécies do gênero (Kerr *et al.*, 1978).

Recentemente um estudo utilizando o decocto das folhas de *C. gongylodes* demonstrou o potencial dessa planta em inibir as vias inflamatórias das ciclooxigenases (COX) e das lipoxigenases (LOX), além de facilitar a dissolução de cálculos renais (Salem *et al.*, 2020).

Uma análise do extrato de *C. gongylodes* utilizado no presente trabalho mostrou que uma das substâncias majoritárias na fração aquosa era o ácido málico.

1.9. O ácido málico

1.9.1. Apresentação

Descrito em 1785 por Carl Wilhelm Scheele, o ácido málico é um dos diversos ácidos orgânicos descobertos pelo químico sueco. A extração foi feita do suco de maçã (“*malum*” em latim), mas este ácido pode ser encontrado em várias outras plantas, sendo um dos mais comuns na maioria das frutas, tais como amora silvestre, pêra (Tucker, 1993), açaí e acerola (Scherer *et al.*, 2008). Sua fórmula molecular é $C_4H_6O_5$ e na nomenclatura *IUPAC* é conhecido como 2-hidroxiutanodioico. Ocorre de forma natural como o enantiômero levógiro L-málico e sua mistura racêmica DL-málico (1:1 D-málico:L-málico) foi sintetizada pela primeira vez em 1921 (revisado por Ortiz, 2018). Na Fig 8 as setas brancas apontam a diferença da posição espacial do grupo hidroxila, o que configura a isomeria óptica das substâncias. Em experimentos de isomeria óptica os compostos são expostos à uma luz planopolarizada e quando há desvio desta luz para a esquerda, dizemos que é um enantiômero levógiro (ou L); quando há desvio para a direita, dizemos que é um enantiômero dextrógiro (ou D) (Llorens, 2012).

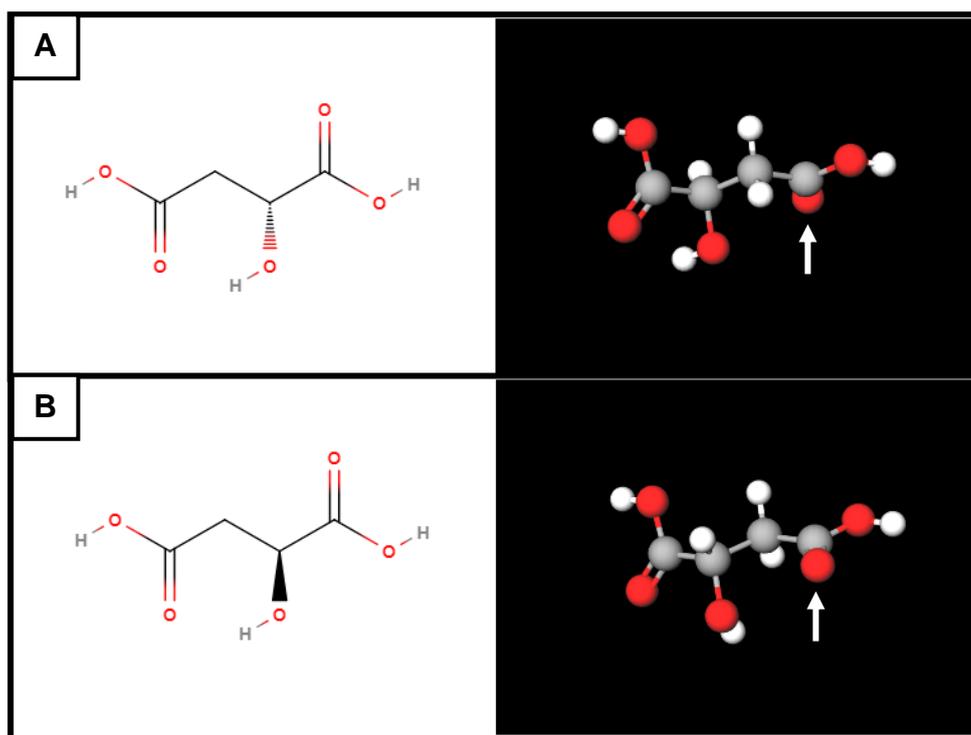


Figura 8: Representação em 2D e 3D dos enantiômeros do ácido málico. [A] D-málico; [B] L-málico. (retirado e adaptado de < <https://molview.org/>>, acessado em dezembro de 2020.)

1.9.2. Bioquímica

O ácido málico é abundante na natureza, principalmente em células-guarda das folhas. Nas fotossínteses C4 e MAC (metabolismo ácido das crassuláceas) o malato, a forma ionizada do ácido málico, é um importante intermediário para a fixação de carbono na produção de carboidratos pela planta (Sage, 2017). O malato também é metabólito do ciclo do ácido cítrico (ciclo de Krebs), sendo formado a partir da hidratação de fumarato pela fumarase, numa reação reversível (Nelson *et al.*, 2018). Este, então, é reduzido a malato pela malato desidrogenase NADH-dependente, também numa reação reversível (Diakou *et al.*, 2000) (Fig. 9). O ácido málico se encaixa na categoria dos alfa-hidroxiácidos (ou AHA), junto com os ácidos glicólico, cítrico, tartárico e láctico. São ácidos orgânicos fracos com um (ou mais) grupo hidroxila ligado ao carbono alfa, primeiro carbono que segue o grupo ácido (Tang e Yang, 2018).

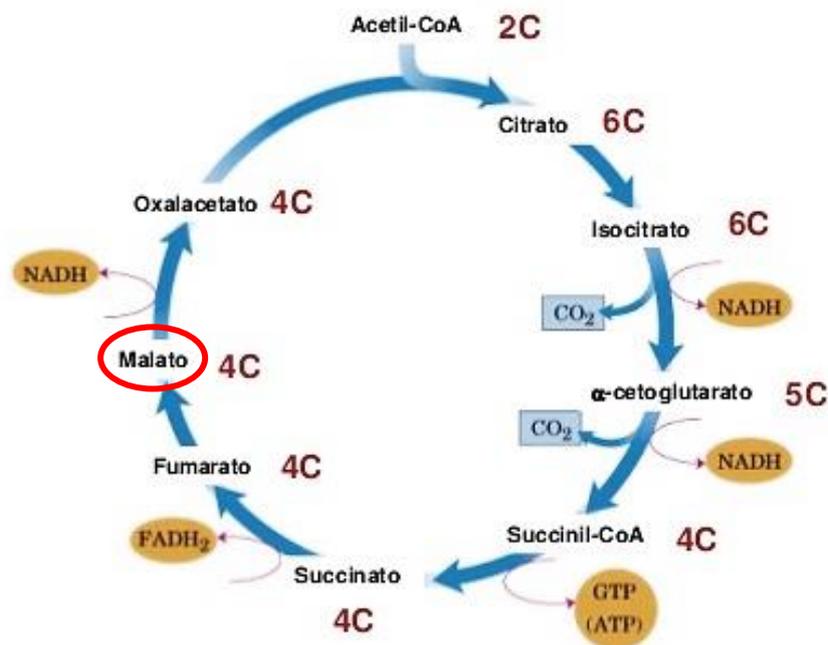


Figura 9: Esquema ilustrativo simplificado do Ciclo de Krebs com o malato em destaque. Exceto pelas reações de transformação do isocitrato em α -cetoglutarato e deste em succinil-CoA, todas as outras reações neste ciclo são reversíveis. (adaptado de Nelson *et al.*, 2018). 2C: 2 carbonos; 4C: 4 carbonos; 5C: 5 carbonos; 6C: 6 carbonos.

1.9.3. Segurança e toxicidade

Várias pesquisas sobre sua toxicidade foram desenvolvidas. Um estudo elaborado em 1971 pela TRW/Hazleton Laboratories demonstrou que a administração crônica de ácido málico (via oral) por 104 semanas não provocou nenhuma alteração dos parâmetros hematológicos ou de urina de ratos. Outro trabalho conduzido para a indústria farmacêutica, determinou-se a DL_{50} de aproximadamente 3 g/kg para camundongos, por meio de ensaio de toxicidade aguda por via oral (Patty, 1981). Análises histológicas e exames microscópicos também não observaram lesões significantes nos órgãos (Fiume, 2001).

A FDA (Food and Drug Administration) aprova a utilização do ácido málico desde 1984 (Fiume, 2001). Acerca da versão sintética, a importância do ácido DL-málico na indústria não se resume somente à alimentícia, onde é utilizado como conservante, realçador de sabor e, principalmente, acidulante (código E296). Essa mistura racêmica vem sendo utilizada também pelas indústrias química e farmacêutica (revisado por Ortiz, 2018), em formulações cosméticas como regulador de pH em produtos como esmalte, xampus, condicionadores e até produtos para bebês (Fiume, 2001).

1.9.4. Aplicações médicas

O termo “nutracêutico” foi cunhado em 1989 e diz respeito à uma categoria de alimentos, ou partes de alimentos, que trazem algum benefício médico ou de saúde incluindo a prevenção ou até mesmo tratamento de alguma enfermidade. Estão inseridos nesta categoria os nutrientes isolados, alguns suplementos, produtos herbais, entre outros (revisado por Andlauer e Fürst, 2002).

Na indústria farmacêutica o ácido málico tem aplicação como nutracêutico. A associação deste com o magnésio, por exemplo, é indicada para tratamento crônico da fibromialgia, uma condição generalizada de dor disfuncional (Abraham e Flechas, 1992). Um estudo recente demonstrou que o ácido málico (como carreador através da barreira hemato-encefálica) ligado a um nano-imunoconjugado facilitou a resposta imune do corpo contra gliomas cerebrais (Galstyan *et al.*, 2019). Entre outros benefícios do ácido málico descritos na literatura estão o aumento geral da energia para atividade física em adultos e a melhoria da salivação em pacientes transplantados que apresentam xerostomia (LaRiccia *et al.*, 2008; Bardellini *et al.*, 2019). De qualquer modo, existem muitas lacunas de informação acerca dos mecanismos envolvidos nos efeitos terapêuticos do ácido málico associados ao tratamento da dor. Sendo assim, mais estudos são necessários para elucidar a via farmacológica da ação deste AHA.

2. Justificativa



A experiência dolorosa desagradável expressa-se nos mais variados moldes e intensidades e costuma ser danosa a quem acomete. A dor pode causar piora na qualidade de vida, visto que há relação da sensação de impotência e incapacidade com o bem-estar geral da pessoa; pode, inclusive, desencadear outras patologias, tal como a depressão (Kempen *et al.*, 1997; Gureje, *et al.*, 1998; Baune *et al.*, 2008). Além disto, é considerada um problema de saúde pública, pois atinge o indivíduo nas esferas profissional e econômica, acarretando prejuízo social (Edwards *et al.*, 2016).

Males são tratados desde os primórdios com plantas. O registro escrito mais antigo do uso de plantas medicinais data de aproximadamente 5000 anos, em uma peça de argila suméria de Nagpur, na Índia (Petrovska, 2012). Aproximadamente 25 mil espécies de plantas são utilizadas em todo o mundo para produção de fitofármacos e fitoterápicos (Rodrigues, 2016). Eis uma vantagem do Brasil: com seus majestosos biomas, é detentor da maior biodiversidade de plantas do mundo, com mais de 46 mil espécies catalogadas, sendo quase a metade (43%) endêmica do território nacional (Fioravanti, 2016). Sabendo disso, a pesquisa da farmacologia da etnobotânica se revela como fonte virtualmente inesgotável de conhecimento e de possíveis tratamentos para dor.

A fusão destes dois “mundos” de pesquisa (dor e etnobotânica) foi o alicerce do nosso trabalho. Demos início à investigação de uma terapia alternativa para dor utilizando subprodutos de uma planta específica que, ao final, tem se mostrado promissora. A planta alvo de nosso estudo foi a *Cissus gongylodes* (Baker) Planch., conhecida popularmente como cupá, sofre-dos-rins-quem-quer, uva-do-mato, cipó-babão, entre outros. Como um dos próprios nomes populares já diz, essa planta é utilizada em algumas comunidades tradicionais como auxiliar no tratamento de moléstias que acometem os rins, principalmente a dor do cálculo renal. Por isso, testamos a hipótese de que, em um ambiente controlado e com a metodologia específica (no caso, o modelo animal para dor nociceptiva periférica), seria possível comprovar experimentalmente a eficácia da planta e seus subprodutos no controle da dor.

Dessa forma, ampliar os conhecimentos sobre a *C. gongylodes* é de grande valia para entender a sua ação terapêutica e, quiçá, levar ao desenvolvimento de novos medicamentos, a partir de fitoterápicos e/ou

fitofármacos. Também é de nosso interesse destacar a importância da tradição do conhecimento popular sobre plantas que podem amenizar as dores, principalmente aquelas que não respondem bem a tratamentos alopáticos e da medicina majoritariamente convencional.



3. Objetivos



3.1. Objetivo geral:

- ❖ Avaliar a atividade antinociceptiva dos subprodutos de *Cissus gongylodes* (Baker) Planch., bem como de uma de suas principais substâncias isoladas (o ácido málico) e alguns dos possíveis mecanismos farmacológicos envolvidos.

3.2. Objetivos específicos:

- Verificar o efeito da administração oral do extrato etanólico de *C. gongylodes* (EE) sobre as dores nociceptiva e inflamatória, através da análise do tempo de lambida de pata, no teste de formalina.
- Verificar se EE tem ação sedativa no sistema nervoso central, ao ser administrado via oral, aplicando o teste de coordenação motora em haste giratória.
- Verificar se as frações obtidas a partir de EE, administradas periféricamente, estimulam antinocicepção ante a hiperalgesia induzida por prostaglandina E₂, no modelo de retirada da pata de camundongo submetida à compressão, através de curvas tempo-efeito e dose-resposta.
- Verificar se o ácido málico, em seus dois estereoisômeros ativos, quando administrado na periferia, estimula antinocicepção ante a hiperalgesia induzida por prostaglandina E₂, no modelo supracitado.
- Excluir o efeito sistêmico do ácido málico injetado periféricamente, por meio do teste de exclusão de pata, realizado no modelo supracitado.
- Investigar a participação da via opioidérgica no mecanismo de ação antinociceptivo periférico induzido pelo ácido málico.
- Investigar a participação da via canabinoidérgica no mecanismo de ação antinociceptivo periférico induzido pelo ácido málico.
- Investigar a participação da via nitrérgica no mecanismo de ação antinociceptivo periférico induzido pelo ácido málico.
- Investigar a participação dos canais para potássio no mecanismo de ação antinociceptivo periférico induzido pelo ácido málico.

4. Material e Métodos



4.1. Material vegetal de *Cissus gongylodes* (Baker) Planch.

Cissus gongylodes (Baker) Planch. foi coletada na região noroeste de Belo Horizonte, capital de Minas Gerais, em 2016. A coleta foi feita pela Profa. Dra. Lúcia Santos Pinheiro Pimenta, do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A identificação foi feita pelo botânico Prof. Dr. Júlio Antônio Lombardi, do Departamento de Biodiversidade, no Instituto de Biociências da Unesp - Rio Claro. A autorização para uso desta planta em pesquisas, bem como do conhecimento tradicional relacionado, está registrada no SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado, sob o protocolo A683AE3) (vide Anexo I).

4.2. Subprodutos de *Cissus gongylodes* (Baker) Planch.: extrato etanólico (EE), frações (F1, F2, F3, F4 e F5) e Ácido Málico

Os galhos pulverizados de *C. gongylodes* (264,6 g) foram submetidos à extração com hexano (1,265 mL) em banho de ultrassom por 1h. O material

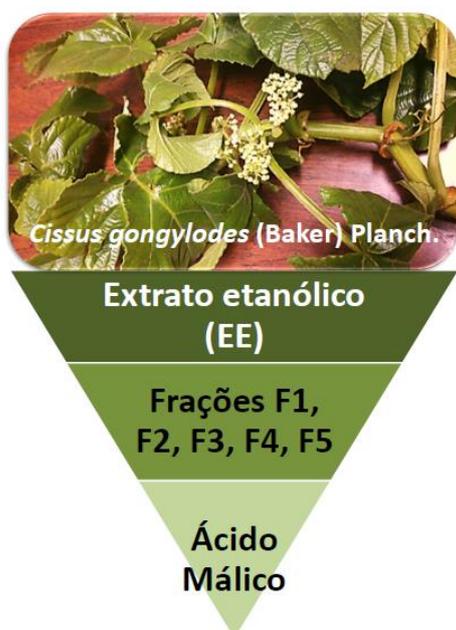


Figura 10: Esquema ilustrativo das fases de purificação do material vegetal de *C. gongylodes*.

vegetal foi filtrado a vácuo e novamente submetido à extração com hexano para retirada de todo material graxo - procedimento repetido quatro vezes. O hexano foi retirado e o material vegetal desengordurado foi submetido à extração com etanol 80% (1,1 L) por 3 vezes, obtendo-se o extrato hidroalcoólico. Quando o solvente foi removido sob pressão reduzida, houve precipitação de um sólido. Este sólido e o restante da fração constituíram o extrato etanólico (EE). Este extrato foi filtrado em sílica de fase reversa C18 com água; água:metanol 7:3; água:metanol 1:1; água:metanol 3:7;

metanol. Uma prospecção fitoquímica com as frações água; água:metanol 7:3; água:metanol 1:1; água:metanol 3:7 evidenciou a presença de açúcares, flavonoides e fenólicos. O filtrado aquoso foi submetido a cromatografia em coluna Sephadex LH-20 fornecendo 34 partições que, quando agrupadas, renderam 9 frações, de massas diferentes. Foi obtido massa suficiente de 5 destas frações (F1 a F5), as quais foram utilizadas nos testes farmacológicos. O esquema a seguir representa a descrição do método utilizado (Fig. 11):



Figura 11: Fluxograma representativo das etapas para a obtenção dos subprodutos (EE e frações) de *C. gongylodes*.

Análise da fração F1 por cromatografia em camada delgada (CCD) e comparação com padrão mostrou em sua composição o ácido málico como substância majoritária (Fig. 12). Foram obtidos os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) desta fração onde se comprovou a presença, além de ácido málico, de α e β -glicose e sacarose. O extrato etanólico, as frações e o ácido málico (na forma pura em L-málico ou racêmica como DL-málico) foram

gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Lúcia Pinheiro Santos Pimenta, do departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais.

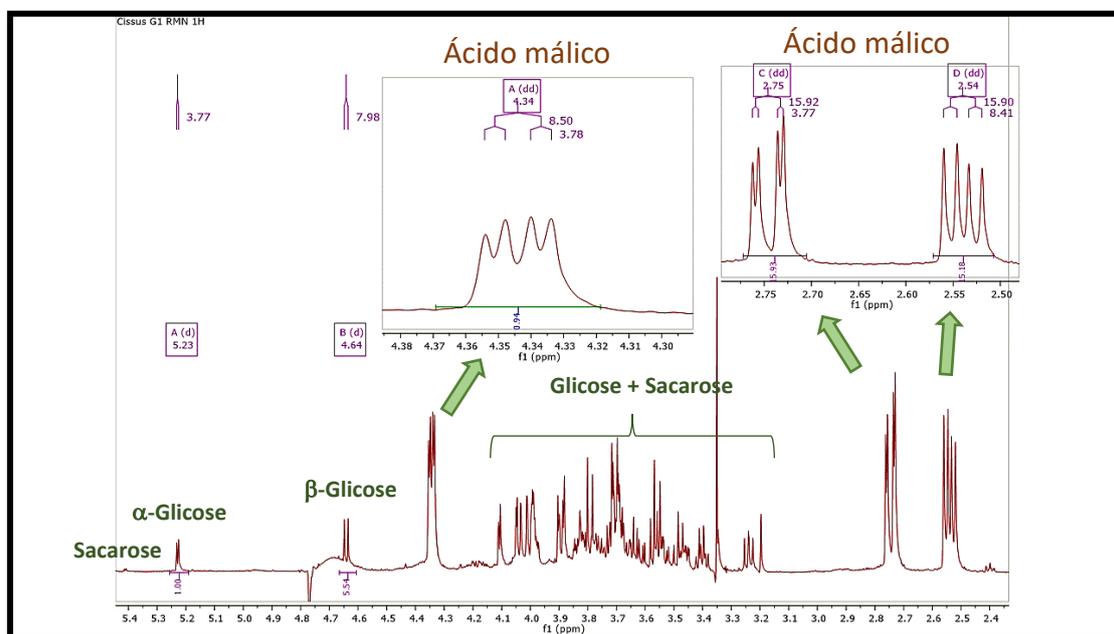


Figura 12: Espectro de ressonância magnética nuclear de F1.

4.3. Animais de experimentação

Os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA-UFMG), registradas pelos protocolos números 357/2019 e 98/2020 (Anexos II e III). Foram utilizados camundongos Swiss machos pesando entre 30 e 40 gramas, obtidos no Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (BICBIO-2 ICB/UFMG). Os animais ficaram acondicionados em gaiolas de dimensões 40 x 33 x 10 cm (comprimento x largura x altura), com forragem de maravalha; temperatura controlada ($24 \pm 2^{\circ}$ C); ciclo claro-escuro (06:00 – 18:00h); livre acesso a alimento e água - exceto no teste da formalina, quando foram submetidos ao tempo de adaptação em câmaras de acrílico 2 horas antes do teste. Foi utilizado um n amostral de 5 animais ($n = 5$) em todos os experimentos conforme descrito no cálculo do n amostral.

4.4. Cálculo do n amostral:

Para o cálculo estatístico do N amostral foi utilizada a seguinte fórmula:

$$n = \frac{2 \cdot \sigma^2 \cdot (Z_{\beta} + Z_{\alpha})^2}{E^2}$$

n = número amostral

σ = desvio padrão

Z_{β} = poder de teste de 80%

Z_{α} = nível de significância alfa = 0,05

E = erro absoluto

Considerando que a sugestão é de que os agentes estudados (subprodutos de *C. gongylodes*) teriam efeito restaurando o limiar nociceptivo normal dos animais, assume-se para o teste de hipóteses:

$$H_0: \mu_0 = \mu_1$$

$$H_1: \mu_0 < \mu_1$$

Logo, a distribuição é unicaudal à direita. Assumindo um poder de teste de 80% ($Z_{\beta} = 0,84$) e nível de significância alfa = 0,05 ($Z_{\alpha} = 1,64$), derivamos os tamanhos amostrais para os grupos, considerando grupos de mesmo tamanho, porém amostras não pareadas (razão = 1). A margem de erro absoluto foi assumida como sendo 12 g, um consenso entre experimentadores experientes que realizam a técnica rotineiramente. A partir de estudos pilotos prévios, o desvio padrão das médias foi calculado como sendo igual a 7,026 g. É importante ressaltar que os valores de confiabilidade e de erro absoluto foram selecionados de modo a atender os parâmetros estatísticos sem, entretanto, permitir que o valor do n amostral se apresentasse elevado, inviabilizando a realização do projeto.

$$n = \frac{2 \cdot (7,026)^2 \cdot (0,84 + 1,64)^2}{12^2}$$

$$n = 4,2168 \text{ (arredondamento para } n = 5)$$

$$\sigma = 7.026$$

$$Z_{\beta} = 0,84$$

$$Z_{\alpha} = 1,64$$

$$E = 12$$

4.5. Vias de administração:

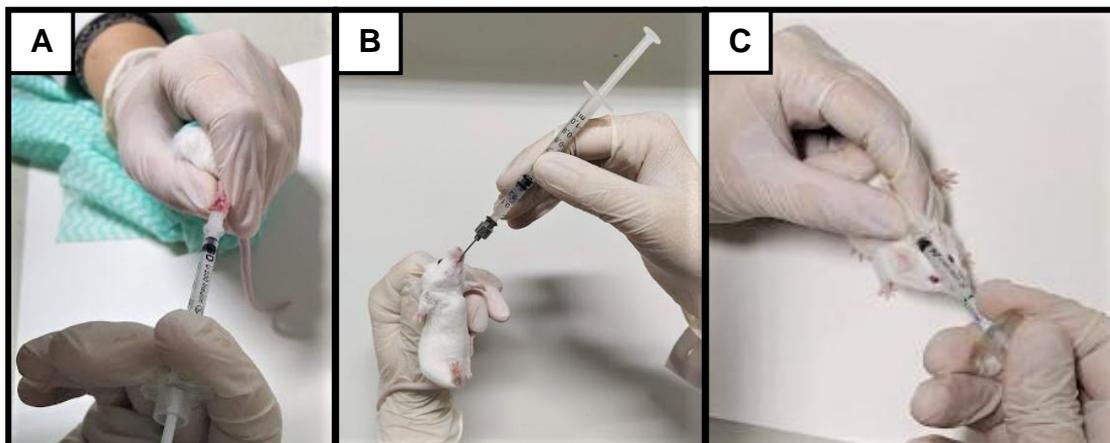


Figura 13: Fotos das vias de administração utilizadas neste trabalho. [A] Injeção intraplantar, no coxim da pata posterior direita do animal; [B] administração por gavagem; [C] injeção subcutânea no dorso do animal, próximo à nuca. Acervo próprio.

- Via intraplantar (i.pl.) (Fig. A): por meio de uma agulha 8,0 x 0,03 mm, a agulha é inserida no coxim plantar da pata posterior direita.
- Via oral (v.o.) (Fig. B): por meio de uma sonda gástrica adaptada inserida pela boca do animal, procedimento denominado de gavagem.
- Via subcutânea (s.c) (Fig. C): por meio de uma agulha 13,0 x 0,03 mm, a agulha é inserida, no tecido da região dorsal do animal.

4.6. Fármacos e solventes

4.6.1. Fármacos hiperalgésicos:

- Formalina [formaldeído (Labsynth, Brasil) diluído em solução aquosa de cloreto de sódio (NaCl) estéril a 0,9% (solução salina estéril), proporção de 1:50] preparada imediatamente antes das injeções, i.pl. 30 μ L.
- Prostaglandina E₂ (Sigma, EUA), dissolvida em etanol 100%, na concentração de 1 μ g/ μ L. Imediatamente antes das injeções, diluição em solução salina estéril (proporção 1:9), i.pl. 20 μ L.

4.6.2. Fármacos controle:

- Indometacina 2 mg/Kg [2-1-4-clorofenil carbonil-5-metoxi-2-metil-1H-indol-3-il acético (Sigma, EUA)], anti-inflamatório não esteroidal (AINE), dissolvida em tween, etanol e solução salina estéril (1:4:45), v.o., 300 µL.
- Morfina 5 mg/kg [cloridrato de 7,8-diidro-4,5-epoxi-17-metilmorfina-3,6-diol (Merck, Alemanha)], agonista opioide, diluída em solução salina estéril, s.c., 100 µL.
- Xilazina 16 mg/kg [hidrocloridrato de 2-(2,6-dimetilfenilamina)-5,6-dihidro-4H-tiazina] (Sigma, EUA)], relaxante muscular, sedativo e anestésico, diluído em solução salina estéril, s.c. 100 µL.

4.6.3. Fármacos dos sistemas endógenos de controle da dor:

Sistema opioidérgico:

- Naloxona (Nx, Sigma, EUA), antagonista não seletivo de receptores opioides, diluída em solução salina estéril, i.pl. 20 µL.

Sistema canabinoideérgico:

- AM251 (Tocris, EUA). Antagonista seletivo dos receptores canabinoides CB₁, diluído em DMSO 10% em solução salina estéril, i.pl. 20 µL.
- MAFP (Tocris, EUA). Inibidor da enzima ácido graxo amida hidrolase (FAAH, *fatty acid amide hydrolase*), diluído em acetato de metila 1% em solução salina estéril, i.pl. 20 µL.
- JZL 184 (Tocris, EUA). Inibidor da enzima monoacilglicerol lipase (MAGL), diluído em DMSO 1% em solução salina estéril, i.pl. 20 µL.

Sistema nitrérgico:

- L-NOArg (RBI, EUA). Inibidor não seletivo das enzimas óxido nítrico sintase (NOS), diluído em solução salina estéril, i.pl. 20 µL.
- L-NPA (Tocris, EUA). Inibidor seletivo da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), diluído em solução salina estéril, i.pl. 20 µL.

- L-NIL (Tocris, EUA). Inibidor seletivo da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), diluído em solução salina estéril, i.pl. 20 µL.
- L-NIO, (Tocris, EUA). Inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), diluído em solução salina estéril, i.pl. 20 µL.
- ODQ (Tocris, EUA). Inibidor seletivo da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), diluído em DMSO 10% em solução salina estéril, i.pl. 20 µL.
- Zaprinast (Cayman Chemical, EUA). Inibidor seletivo da enzima fosfodiesterase específica do monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), diluído em DMSO 10% em solução salina estéril, i.pl. 20 µL.

Canais para potássio:

- Tetraetilamônio, TEA (Sigma, EUA). Bloqueador não-seletivo dos canais para potássio, diluído em solução salina estéril, i.pl. 20 µL.
- Glibenclamida (Sigma, EUA). Bloqueador seletivo dos canais para potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}), diluído em solução salina estéril, i.pl. 20 µL.

4.6.4. Agentes antinociceptivos em estudo:

- Extrato etanólico de *C. gonylodes* (EE) diluído em solução salina estéril, v.o., 300 µL.
- Frações F1, F2, F3, F4 e F5 de EE, diluídas em solução salina estéril, i.pl. 20 µL.
- Ácido L-málico, diluído em solução salina estéril, i.pl. 20µL.
- Ácido DL-málico (mistura racêmica 1:1 D-málico:L-málico), diluído em solução salina estéril, i.pl. 20 µL.

4.7. Teste de formalina

O Extrato etanólico de *C. gonylodes* foi verificado por meio do teste da formalina, inicialmente descrito para ratos (Dubuisson & Dennis, 1977), posteriormente ajustado para camundongos (Hunskaar et. Al, 1985). Foram utilizadas as doses 10, 30, 100, 300 e 1000 mg/kg do extrato e para os grupos controles veículo EE, morfina e indometacina. Para adaptação, duas horas antes

do experimento, os animais foram alocados individualmente em gaiolas de acrílico transparentes padronizadas (20 x 13 x 12 cm), com um espelho



Figura 14: Câmara de acrílico utilizada para visualização do comportamento de lambida de pata dos animais no teste de formalina. Acervo próprio.

posicionado em ângulo de 45° na parte de baixo, para melhor visualização do comportamento dos animais (Fig. 14):

Após esse período, o pré-tratamento oral foi feito por gavagem com extrato diluído, por padrão, uma hora antes das medições. A administração dos fármacos controle obedeceu a cada protocolo (indometacina - 1 hora; morfina - 30 minutos antes do início das observações), sendo então os animais retornados às gaiolas de acrílico para aguardar o início do experimento.

A formalina foi injetada por via subcutânea na superfície ventral da pata traseira direita (coxim plantar). Imediatamente após esta injeção, o animal foi recolocado à câmara e iniciou-se o período de observação. O tempo que o animal permaneceu lambendo a pata com a injeção foi registrado em segundos durante os primeiros 5 minutos (1ª fase, dor nociceptiva) e de 15 a 30 minutos (2ª fase, dor inflamatória). A indometacina, um anti-inflamatório não estereoidal (AINE), foi utilizada como controle positivo apenas na 2ª fase. A morfina foi utilizada em ambas (nociceptiva e inflamatória). A figura 15 representa o procedimento experimental do teste:

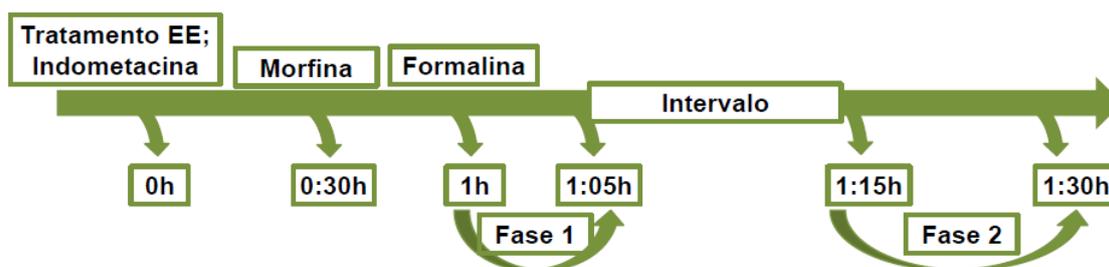


Figura 15: Fluxograma representativo do procedimento experimental realizado no Teste de Formalina.

4.8. Teste de coordenação motora (Rota-rod)

Para garantir que a EE não tenha efeitos sedativos, foi feito o teste de coordenação motora no aparelho Ugo Basile modelo 7600, conhecido como Rota-rod. A coordenação motora foi avaliada pelo tempo que o animal permaneceu se equilibrando e andando na haste giratória por 2 minutos (tempo de corte), no protocolo descrito por Dunham & Miya em 1957.

O dispositivo utilizado consiste em uma haste giratória horizontal, revestida com plástico antiderrapante, suspensa a uma altura de 25 - 30 cm e com rotação constante (16 rpm) (Fig. 16).

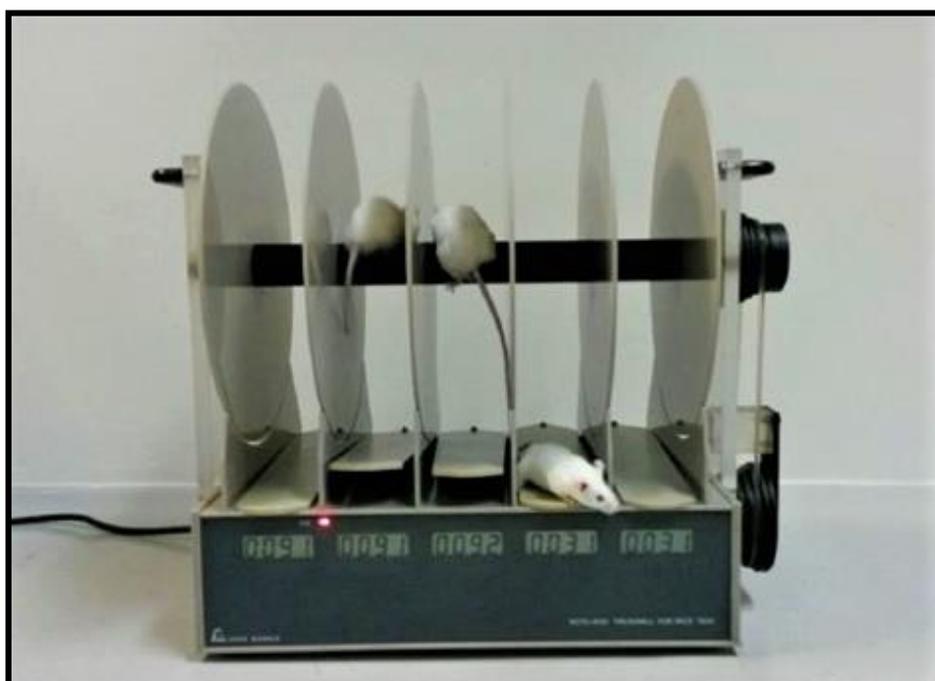


Figura 16: Aparelho (Rota-rod) utilizado para avaliação da coordenação motora dos animais. Acervo próprio.

Os camundongos foram submetidos à duas sessões de treinamento nos 2 dias anteriores aos experimentos. A coordenação dos animais foi avaliada nos tempos 0 (basal, imediatamente antes dos tratamentos), 30, 60 e 120 minutos após os tratamentos as administrações de EE, veículo e xilazina (fármaco controle).

4.9. Teste de retirada da pata sob compressão

O modelo experimental utilizado foi originalmente descrito por Randall e Selitto (1957) para ratos e, posteriormente, adaptado para camundongos por Kawabata *et al.* (1992). Esse método consiste em aplicar uma pressão progressiva na superfície plantar da pata traseira do camundongo, por meio de um analgesímetro. A resposta nociceptiva do animal, determinada como o reflexo da retirada da pata, é definida como o limiar nociceptivo, medido em gramas. O limiar nociceptivo de remoção da pata foi avaliado antes e após a administração do estímulo hiperalgésico e das substâncias em teste.

No teste, o animal é cuidadosamente contido em posição horizontal sobre o analgesímetro, por uma das mãos da experimentadora, enquanto a superfície plantar da pata a ser testada é exposta ao aparelho de medida. A parte compressora consiste em uma superfície plana e outra cônica (área de 1,75 mm²), pela qual se aplica uma força crescente, de forma que para cada centímetro percorrido na régua, 10 g é aplicado sobre a pata do animal. O dispositivo é acionado por um pedal pela experimentadora e, ao ser observada a resposta de “fuga” do animal, que é a retirada da pata do aparelho, a experimentadora interrompe a compressão e aí obtém-se o valor do limiar nociceptivo, indicado pela régua no aparelho, mas que é expresso em gramas. Utilizamos o valor de 150 g como limite máximo de pressão na pata a fim de evitar possíveis lesões. Os animais foram ambientalizados ao aparelho nos 2 dias anteriores ao teste, sob as mesmas condições do experimento propriamente dito. Na figura 17 está demonstrada a forma do manuseio do animal e do analgesímetro.

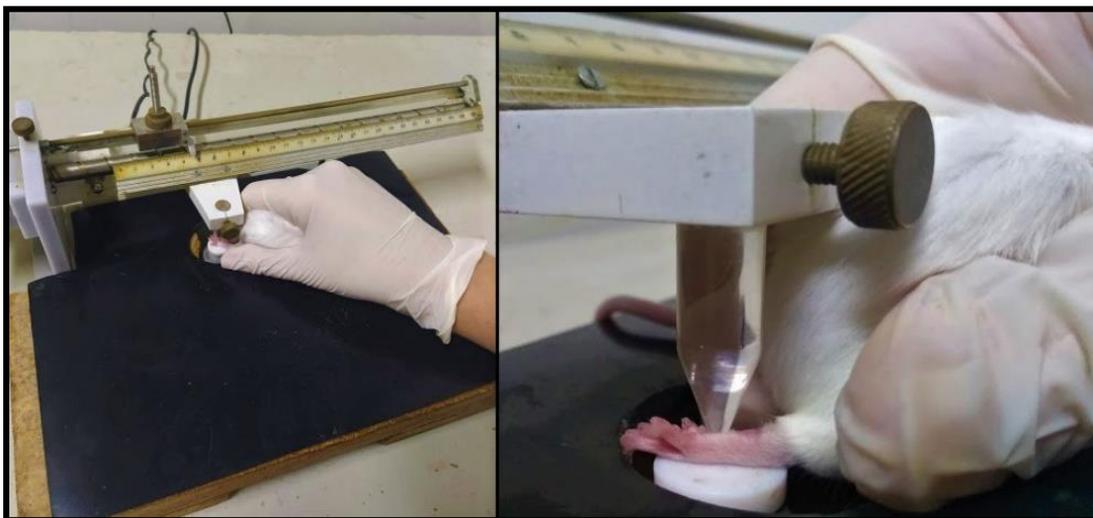


Figura 17: Fotos do manuseio do camundongo no analgesímetro, mostrando como a pata do animal é posicionada para medição do limiar nociceptivo quando o animal. Acervo próprio.

4.9.1. Medida do limiar hiperalgésico

A hiperalgesia é demonstrada pela diminuição do limiar nociceptivo em relação ao basal, então nos experimentos dos sistemas endógenos de modulação da dor optamos pela diferença (Δ) do limiar nociceptivo obtido no início do experimento, antes de qualquer injeção (tempo zero), em relação ao limiar medido na terceira hora da injeção de PGE_2 , momento este que coincidimos com o início do efeito máximo de cada agente estudado.

Se antes ou durante o desenvolvimento da hiperalgesia induzida pela PGE_2 for administrado um fármaco com ação antinociceptiva, será verificada uma diminuição do Δ do limiar hiperalgésico. Do mesmo modo, fármacos com capacidade de interferir na ação desses agentes antinociceptivos tendem a reverter esse efeito, ou seja, restaurar o Δ a valores mais altos, próximos àqueles obtidos quando se administra somente o agente hiperalgésico.

4.9.2. Procedimento Experimental

Nos experimentos com o analgesímetro, o limiar basal de cada animal foi determinado antes da administração do agente hiperalgésico e as medidas foram feitas após a administração dos fármacos. Para construção das curvas de

tempo-efeito e dose- resposta, PGE₂ foi injetada na pata traseira direita três horas antes do tratamento com as frações (F1 a F5) e ácido málico em suas duas formas: DL-málico e L-málico e posteriormente foi avaliado as respostas para a curva de tempo seguindo a figura 18. Os limiares foram sempre medidos três vezes, observando um intervalo mínimo de 10 segundos entre cada medida, sendo o resultado final a média dessas medidas.

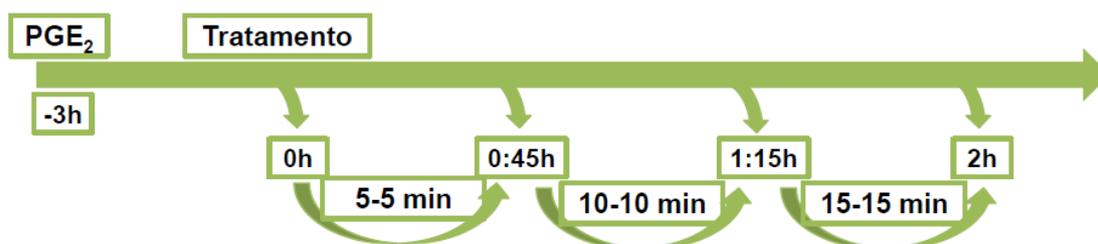


Figura 18: Fluxograma representativo do protocolo de medidas realizado no Teste de retirada de pata sob compressão quando da construção das curvas de tempo-efeito e dose-resposta.

O antagonista não seletivo dos receptores opioides (naloxona), foi administrado 30 minutos antes da injeção do ácido L-málico. O antagonista seletivo dos receptores CB₁ canabinoide e seus veículos, assim como o inibidor da enzima que degrada anandamida, MAFP, o inibidor da enzima que degrada 2-AG, JZL 184 e seus respectivos veículos, foram administrados 10 minutos antes do ácido L-málico (trinta minutos antes do pico hiperalgésico de PGE₂).

O inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase, L-NOArg, bem como os inibidores seletivos da enzima nNOS (L-NPA) e iNOS (L-NIL) e do inibidor não seletivo da enzima eNOS (L-NIO), foram administrados 30 minutos antes do ácido L-málico. ODQ, inibidor seletivo da guanilato ciclase solúvel, foi administrado 10 min antes do ácido L-málico; zaprinast, inibidor seletivo da fosfodiesterase PDE5, específica de GMPc, foi administrado 1 hora antes do ácido L-málico. Por último, o bloqueador de canais para potássio foi administrado 30 minutos antes da injeção do ácido L-málico.

4.9.3. Exclusão do efeito sistêmico do ácido málico

Para a exclusão do efeito sistêmico, o agente hiperalgésico foi administrado nas duas patas posteriores dos animais. Os animais também receberam na pata direita a droga testada (grupo avaliado) ou salina (grupo

controle). As medidas foram realizadas em ambas as patas. Foi considerado como efeito local (periférico) a dose que obteve resposta antinociceptiva somente na pata onde o fármaco foi administrado.

4.10. Eutanásia dos animais

Todos os animais foram eutanasiados ao final dos experimentos, com sobredose de anestésicos (cetamina 300 mg/Kg e xilazina 25 mg/Kg), de acordo com as Diretrizes Da Prática De Eutanásia Do Conselho Nacional De Controle De Experimentação Animal – CONCEA.

4.11. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada através do programa GraphPad Prism 8.0.2. Os resultados obtidos foram apresentados como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) e foram submetidos ao teste de análise de variância One-Way ou Two-Way ANOVA, seguida pelo teste de Bonferroni para comparações múltiplas. Valores considerados estatisticamente significativos foram de $p < 0,05$.

5. Resultados



5.1. Efeito antinociceptivo do Extrato Etanólico 80% de *Cissus gongylodes* (Baker) Planch. (EE):

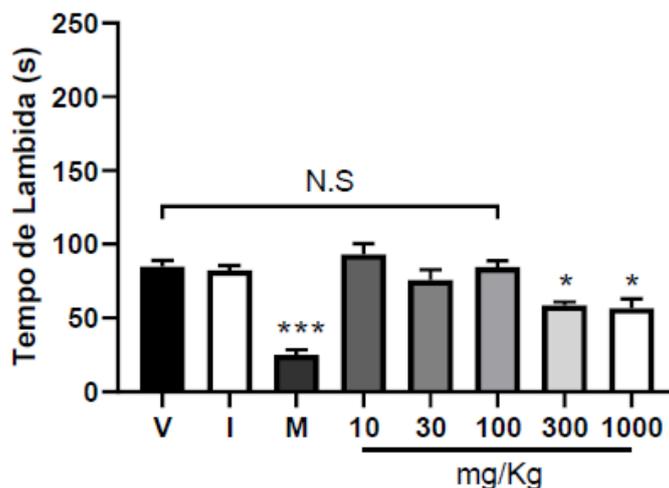
O extrato etanólico 80% de *Cissus gongylodes* (Baker) Planch. (EE) foi, a princípio, avaliado pelo teste de formalina, para que se apurasse a informação de que a infusão a frio desta planta traria alívio analgésico.

A primeira fase do teste, equivalente aos primeiros 5 minutos após a administração da formalina, mostrou que os animais tratados com EE tiveram o tempo de lambida de pata reduzido, de forma dose-dependente, nas maiores doses administradas (300 mg/kg e 1000 mg/kg, Figura 19 A). A segunda fase do teste, compreendida entre os minutos 15 e 30, também mostrou que os animais tratados com EE tiveram o tempo de lambida de pata reduzido, de forma dose-dependente, novamente nas maiores doses administradas (300 mg/kg e 1000 mg/kg, Figura 19 B).

Verificamos se o tratamento com EE provocaria algum efeito sedativo que alterasse a resposta motora dos animais. Para tal, foi realizado o teste de coordenação na haste giratória. Administrado na dose de 1000 mg/kg, p.o., EE não promoveu nenhuma alteração nesta resposta dos animais, ao contrário do observado no grupo controle de xilazina (16 mg/kg, s.c), que reduziu de modo significativo o tempo de permanência dos animais na haste, conforme visto na Figura 20.



A Fase 1 (Dor Nociceptiva)



B Fase 2 (Dor Inflamatória)

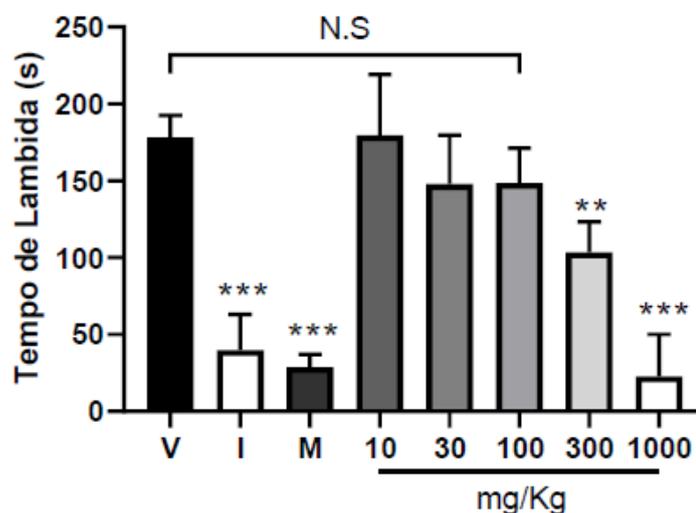


Figura 19: Ação do extrato etanólico dos galhos de *Cissus gongylodes* (Baker) Planch. nas Fases 1 (A) e 2 (B) do teste da formalina em camundongos. O tempo total (s) em que o animal lambeu a pata tratada foi medido nas Fases 1 e 2. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. (n amostral = 5 animais por grupo). * indica significância estatística $P < 0,05$; ** indica significância estatística $P < 0,01$; *** indica significância estatística $P < 0,001$ quando comparado ao grupo veículo (V, solução salina estéril 0,9%, p.o.). I (Indometacina; 10 mg/kg, p.o.) e M (Morfina; 5 mg/kg, s.c.).

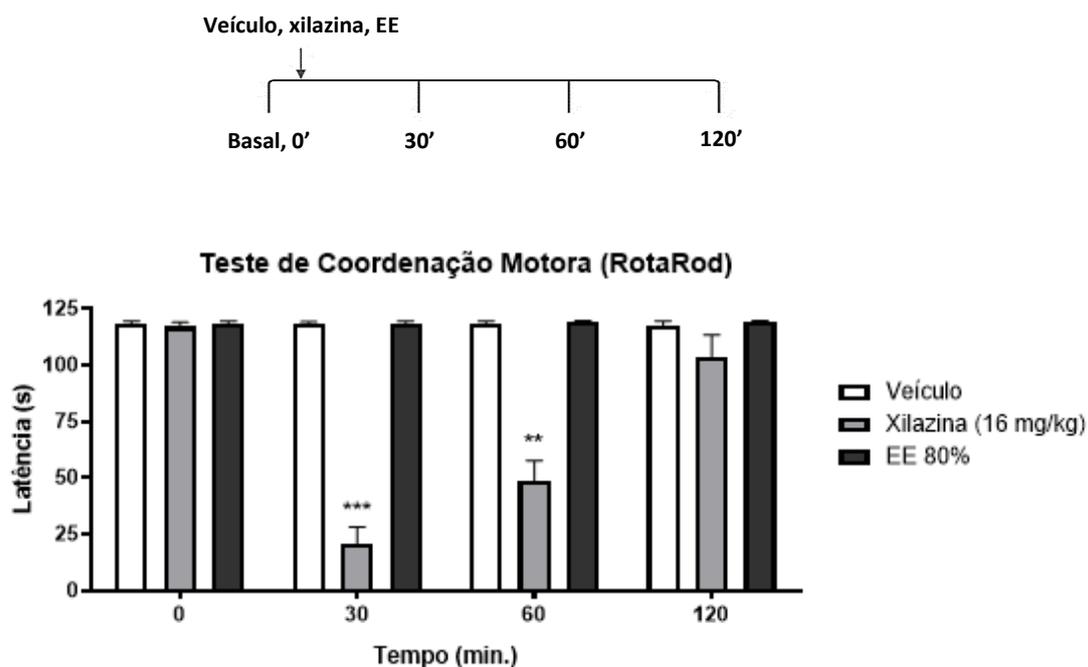


Figura 20: Ação do extrato etanólico dos galhos de *Cissus gongylodes* (Baker) Planch. no teste de coordenação motora em camundongos. O tempo (s) de permanência sobre a haste giratória foi medido em 0 (basal), 30, 60 e 120 minutos após a administração oral EE 80%. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. (n amostral = 5 animais por grupo). ** indica significância estatística $P < 0,01$; *** indica significância estatística $P < 0,001$ quando comparado ao grupo veículo (solução salina estéril, 0,9%). Xilazina; 16 mg/kg, s.c.

5.2. Análise da mucosa estomacal dos animais tratados com EE 1000 mg/kg por via oral:

Imediatamente após o teste de formalina os animais tratados com 1000 mg/kg de EE e os animais do grupo controle foram eutanasiados para, em seguida, ser feita a retirada e coleta dos estômagos, com o intuito de avaliar possíveis irritação e/ou lesão à mucosa estomacal. Após limpeza em solução salina estéril 0,9% e com o auxílio de uma lupa, foi possível observar que não houve lesão macroscópica aparente nas mucosas de nenhum dos animais tratados quando em comparação aos animais controle, que receberam veículo de EE por via oral (Fig. 21).

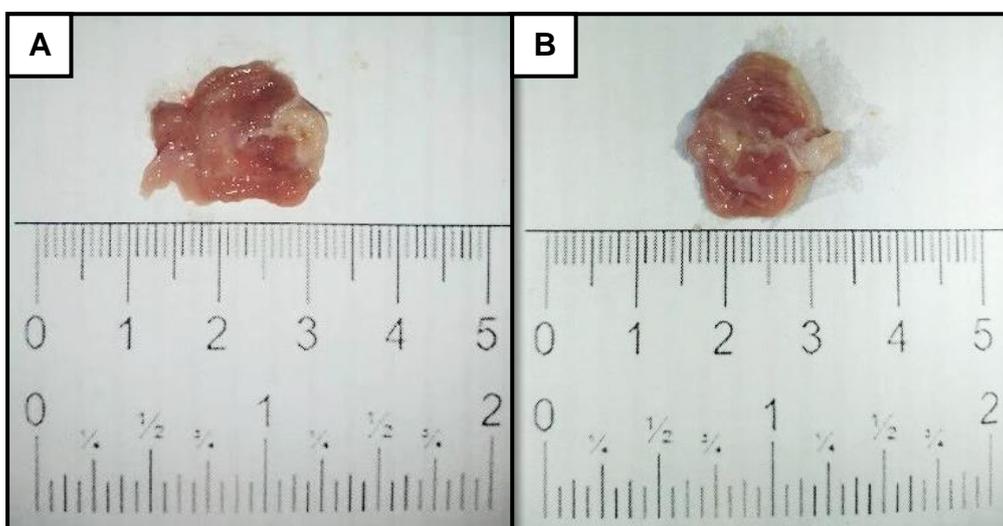


Figura 21: Estômagos dos animais submetidos ao tratamento oral no teste de formalina: [A] animal controle, veículo EE; [B] animal tratado com EE 1000 mg/kg.

5.3. Efeito antinociceptivo das frações eluídas de EE 80% ante a hiperalgesia induzida por prostaglandina E₂ (PGE₂):

Após averiguação do potencial analgésico de EE, este foi fracionado em Sephadex LH-20, resultando em 9 grupos, dos quais 5 houve foram analisados nos testes farmacológicos (F1 a F5).

Considerando o peso dos animais testados como 40 g, a dose de partida para os testes farmacológicos foi determinada pela proporção da dose mais eficaz de EE no teste de formalina (1000 mg/kg), para uma pata do animal, que equivale a 1% de sua massa corporal. Definiu-se, então, 400 µg/pata do animal, aumentando ou diminuindo, a partir da observação dos resultados preliminares.

Como controles para todas as frações (F1 a F5) foram utilizados animais com redução do limiar nociceptivo provocado por PGE₂ e animais sem sensibilização nociceptiva qualquer (veículo PGE₂ e veículo frações - etOH 10% e solução salina estéril, respectivamente).

Fração F1:

F1 mostrou reversão da hiperalgesia de PGE₂ de forma dose-dependente, com melhor resultado observado na dose de 400 µg/pata (Fig. 22) O pico de ação se deu em 40 minutos após a administração da mesma, perdurando por 15 minutos.

As doses de 200 e 100 µg/pata também foram capazes de reduzir o efeito nociceptivo de PGE₂, mas não de forma total, alcançando próximo de 65% e 15%, nesta ordem. As 3 doses utilizadas apresentaram resultados estatisticamente significantes ($p > 0,05$) em relação ao grupo controle hiperalgésico ao longo de praticamente todo o período, exceto pela última medição (2 horas após o tratamento com a fração), onde nenhum grupo tratado teve diferença estatística em relação ao controle PGE₂.

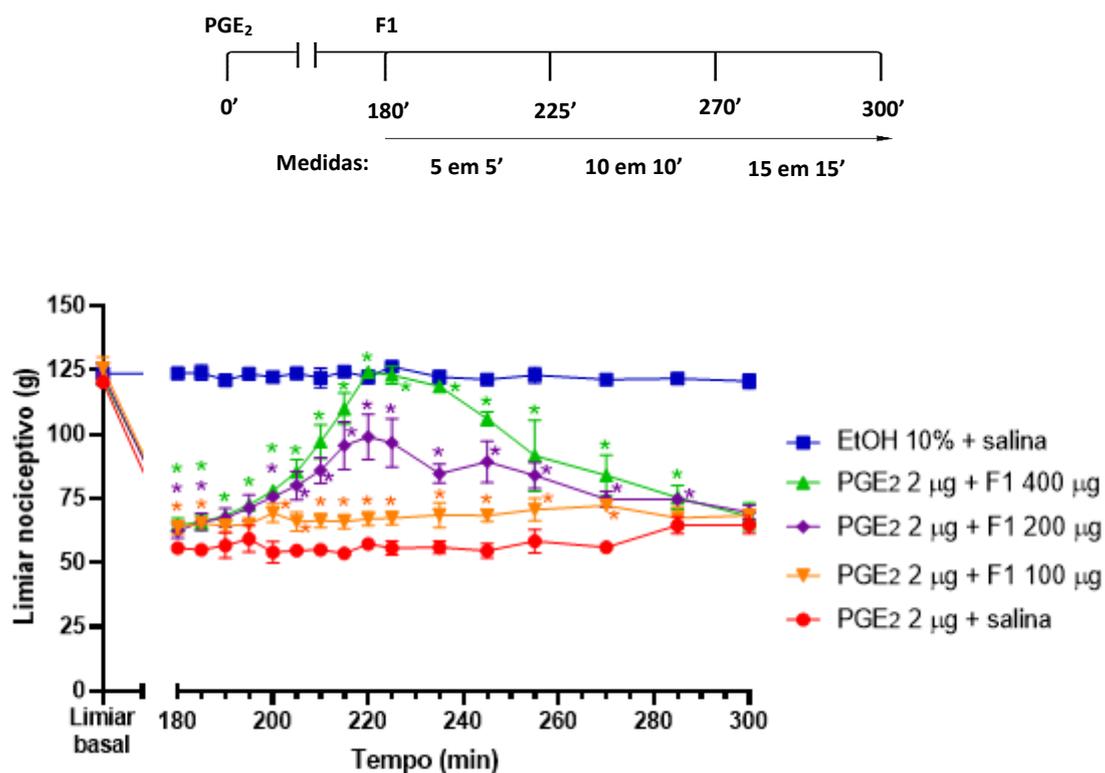


Figura 22: Curva dose-resposta por tempo do efeito antinociceptivo de F1 ante a hiperalgesia induzida por PGE₂ (2 µg) em camundongos. As medidas foram feitas em intervalos crescentes de tempo (ver diagrama acima do gráfico). Cada ponto na curva representa a média ± E.P.M. (n amostral = 5 animais por grupo). * indica significância estatística P<0,05 em relação ao grupo controle PGE₂ + salina. EtOH 10% + salina é o grupo controle de veículos de PGE₂ e F1, respectivamente.

Frações F2 e F3:

No experimento piloto com a fração F2 verificou-se que esta não foi capaz de reverter totalmente o efeito nociceptivo em nenhuma das doses testadas (Fig. 23). Apesar disso, observa-se que a resposta do limiar nociceptivo dos animais aumentou de forma dose-dependente. F2 400 µg apresentou melhor resultado e pico de ação de 45 minutos, com aproximadamente 78% de reversão da hiperalgésia de PGE₂.

O experimento piloto de F3 foi feito com doses maiores (200, 400 e 600 µg, Fig. 24), visto que a dose de partida (400 µg) apresentou pico de ação mais rápido que as frações antes testadas e, apoiado nisto, surgiu o interesse em verificar a eficácia de uma dose ligeiramente maior. No entanto, nenhuma das doses foi capaz de reverter por completo a hiperalgésia de PGE₂. As doses de 200 e 400 µg tiveram pico de ação em 20 minutos, revertendo próximo de 51% e 54% da hiperalgésia, respectivamente; a dose de 600 µg teve pico de ação em 40 minutos, com aproximadamente 44% de reversão hiperalgésica.

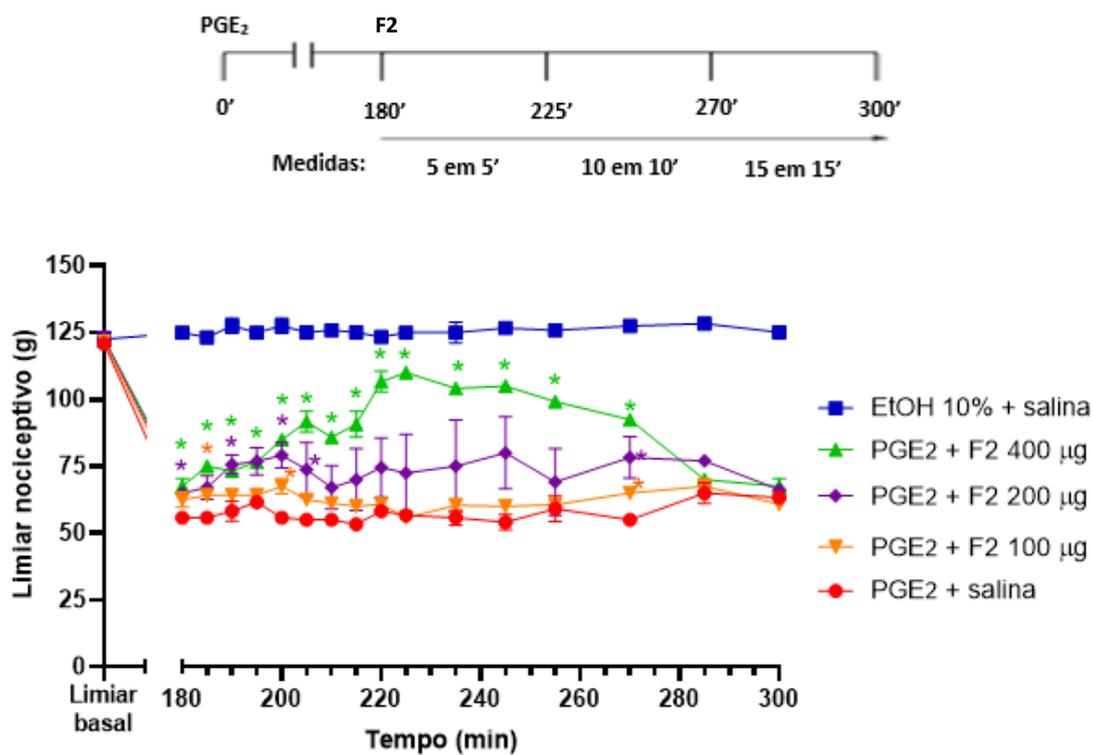


Figura 23: Curva dose-resposta por tempo do efeito antinociceptivo de F2 ante a hiperalgesia induzida por PGE₂ (2 µg) em camundongos. As medidas foram feitas em intervalos crescentes de tempo (ver diagrama acima do gráfico). Cada ponto na curva representa a média ± E.P.M. (n amostral = 3 animais por grupo, experimento piloto). * indica significância estatística P<0,05 em relação ao grupo controle PGE₂ + salina. EtOH 10% + salina é o grupo controle de veículos de PGE₂ e F2, respectivamente.

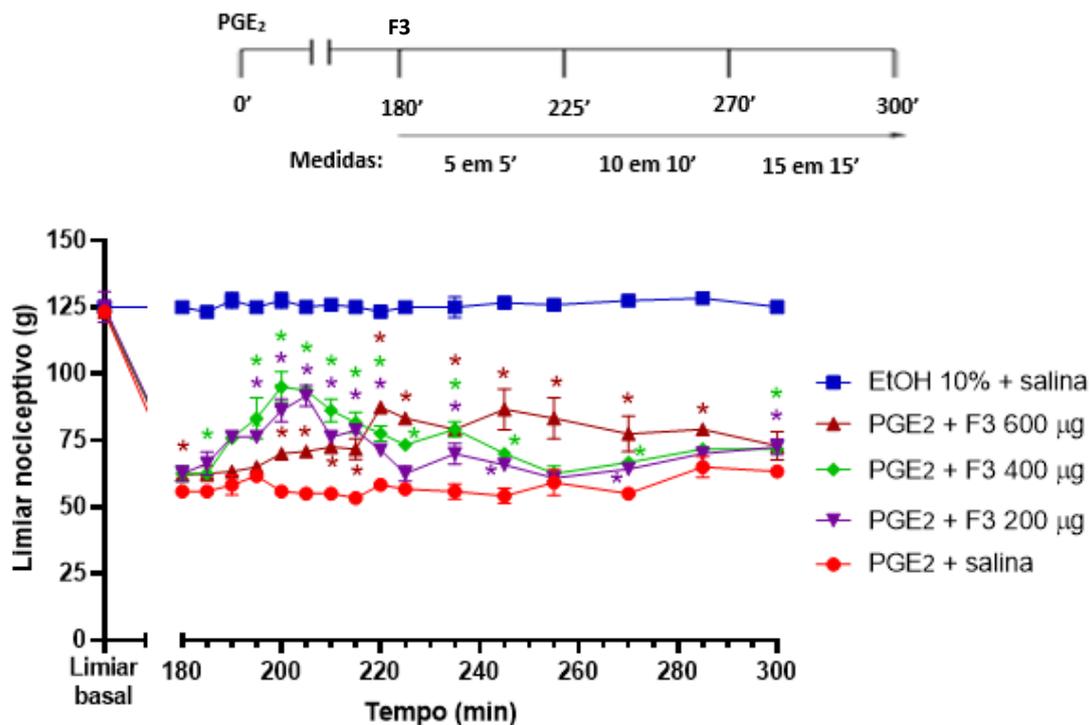


Figura 24: Curva dose-resposta por tempo do efeito antinociceptivo de F3 ante a hiperalgesia induzida por PGE₂ (2 µg) em camundongos. As medidas foram feitas em intervalos crescentes de tempo (ver diagrama acima do gráfico). Cada ponto na curva representa a média ± E.P.M. (n amostral = 3 animais por grupo, experimento piloto). * indica significância estatística $P < 0,05$ em relação ao grupo controle PGE₂ + salina. EtOH 10% + salina é o grupo controle de veículos de PGE₂ e F3, respectivamente. Para F3 a menor dose testada foi 200 µg e a maior foi 600 µg.

Fração F4:

A fração F4 (Fig. 25), assim como F3, foi testada em doses maiores pelo mesmo motivo (o pico de ação da dose de partida, 400 µg, foi mais rápido que o observado em frações anteriores). 600 µg foi capaz de reverter de forma integral a hiperalgesia induzida pela PGE₂, com pico de ação em 30 minutos após tratamento, perdurando por 15 minutos. A dose de 400 µg apresentou resultado intermediário, com pico de ação aos 25 minutos e aproximadamente 60% de reversão. A dose de 200 µg não mostrou resposta estatisticamente significativa em relação ao grupo controle hiperalgésico.

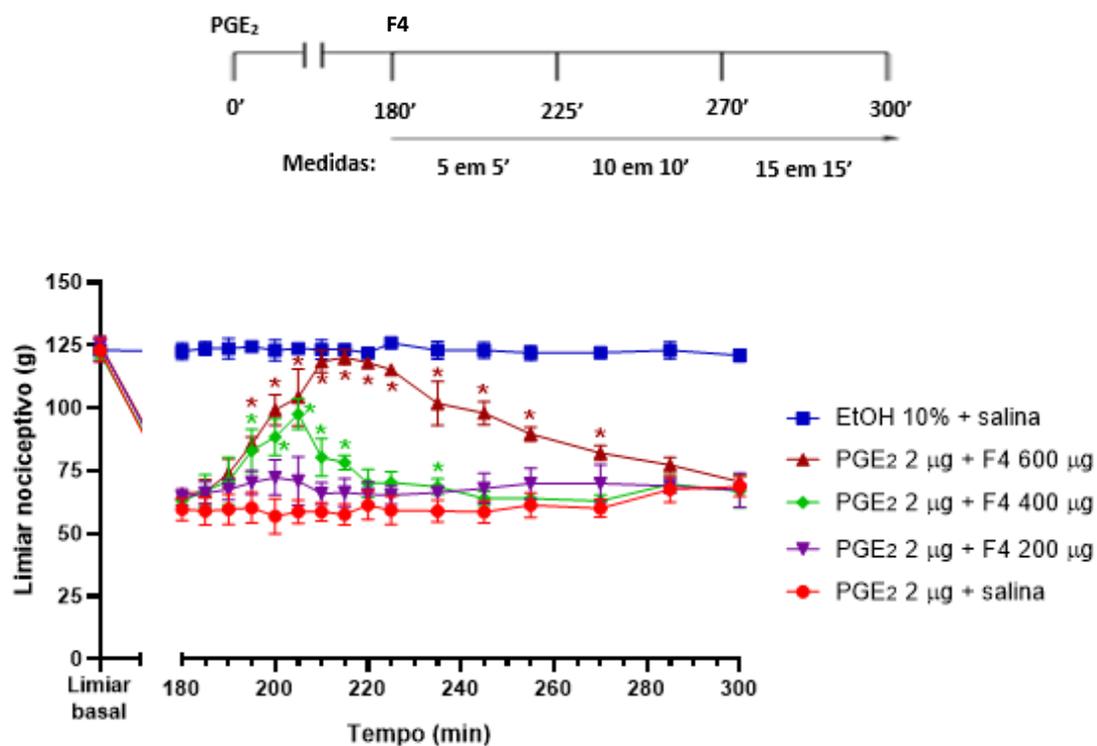


Figura 25: Curva dose-resposta por tempo do efeito antinociceptivo de F4 ante a hiperalgesia induzida por PGE₂ (2 µg) em camundongos. As medidas foram feitas em intervalos crescentes de tempo (ver diagrama acima do gráfico). Cada ponto na curva representa a média ± E.P.M. (n amostral = 5 animais por grupo). * indica significância estatística P < 0,05 em relação ao grupo controle PGE₂ + salina. EtOH 10% + salina é o grupo controle de veículos de PGE₂ e F4, respectivamente. Para F4 a menor dose testada foi 200 µg e a maior foi 600 µg.

Fração F5:

A última fração testada, F5, apresentou atividade antinociceptiva reduzida em todas as doses testadas (Fig. 26). Apesar disso, foi possível verificar diferença estatística em algumas medidas quando comparadas ao grupo controle de PGE₂.

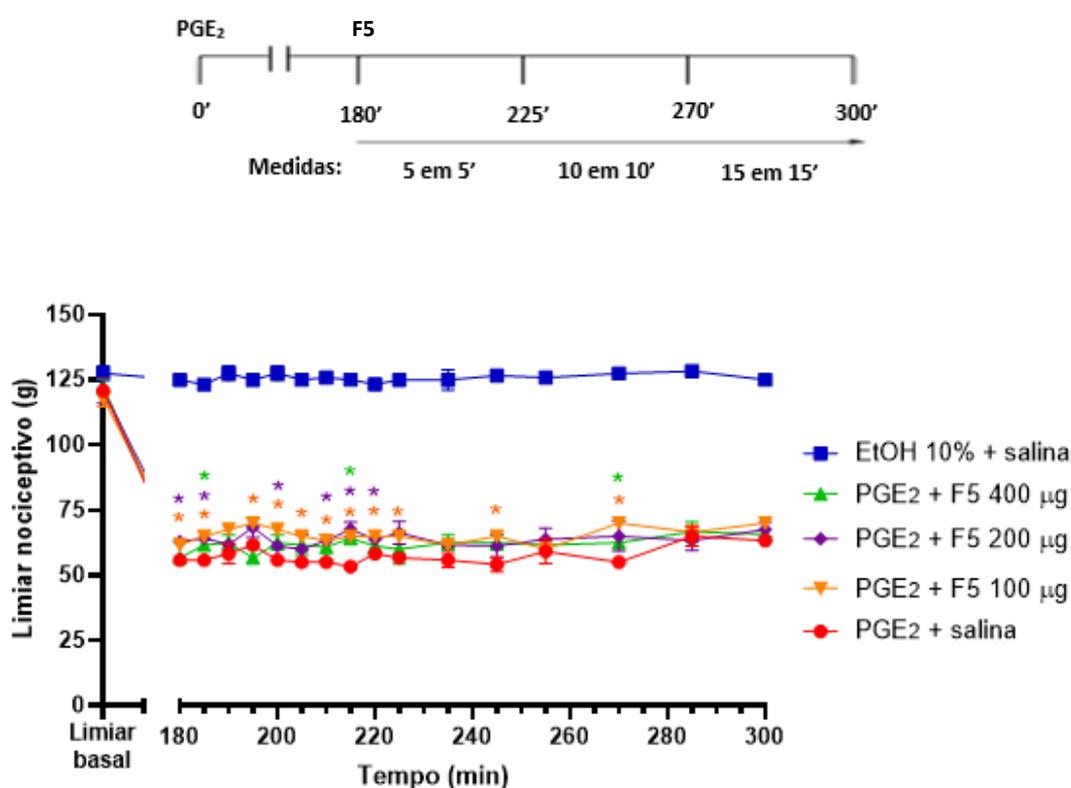


Figura 26: Curva dose-resposta por tempo do efeito antinociceptivo de F5 ante a hiperalgisia induzida por PGE₂ (2 µg) em camundongos. As medidas foram feitas em intervalos crescentes de tempo (ver diagrama acima do gráfico). Cada ponto na curva representa a média ± E.P.M. (n amostral = 3 animais por grupo, experimento piloto). * indica significância estatística P<0,05 em relação ao grupo controle PGE₂ + salina. EtOH 10% + salina é o grupo controle de veículos de PGE₂ e F5, respectivamente.

5.4. Efeito antinociceptivo do ácido málico ante a hiperalgesia induzida por prostanglandina E₂ (PGE₂):

Os resultados obtidos com as frações F1 a F5 de EE foram considerados, ponderados e, ao final, a fração F1 foi escolhida para análise mais profunda. Após análise química de F1 foi possível identificar a substância ácido málico como a majoritária em sua composição e, a partir disso, deu-se início aos testes com esta substância purificada.

O ácido L-málico ocorre de forma natural e é um metabólito comum em seres vivos. Sua mistura racêmica, DL-málico, sintética, é amplamente utilizada nas indústrias alimentícia, química e farmacêutica (Ortiz, 2018).

A dose de partida para ambos os compostos (DL-málico e L-málico) foi de 200 µg/pata, fundamentada na indicação médica de tratamento para fibromialgia (a partir de 400 mg por dia) (Russel *et al.*, 1995). Observados os resultados primários, foram estipuladas doses menores para efeito de construção da curva dose-resposta.

Mistura racêmica (1:1) dos estereoisômeros D-málico e L-málico (DL-málico):

A mistura racêmica DL-málico apresentou efeito antinociceptivo de forma dose-dependente (Fig. 27). A dose de partida, 200 µg, mostrou reversão parcial da hiperalgesia induzida por PGE₂. O pico de ação se deu aos 20 minutos, com aproximadamente 53% de efeito antinociceptivo. Em seguida, a dose de 100 µg foi testada e sua resposta foi semelhante à da dose de 200 µg: o pico de ação ocorreu aos 20 minutos, com reversão de aproximadamente 60% do efeito de PGE₂. Não houve diferença estatística entre as respostas de 100 e 200 µg em ambos os tempos de pico. Por fim, a dose de 50 µg foi testada e apresentou potencial antinociceptivo menor que as doses maiores. O pico de ação foi tardio, em 35 minutos, e a reversão foi de aproximadamente 34%. Foi possível observar efeito duradouro de todas as doses de DL-málico até 90 minutos depois de administradas, quando comparadas as respostas ao grupo controle PGE₂.

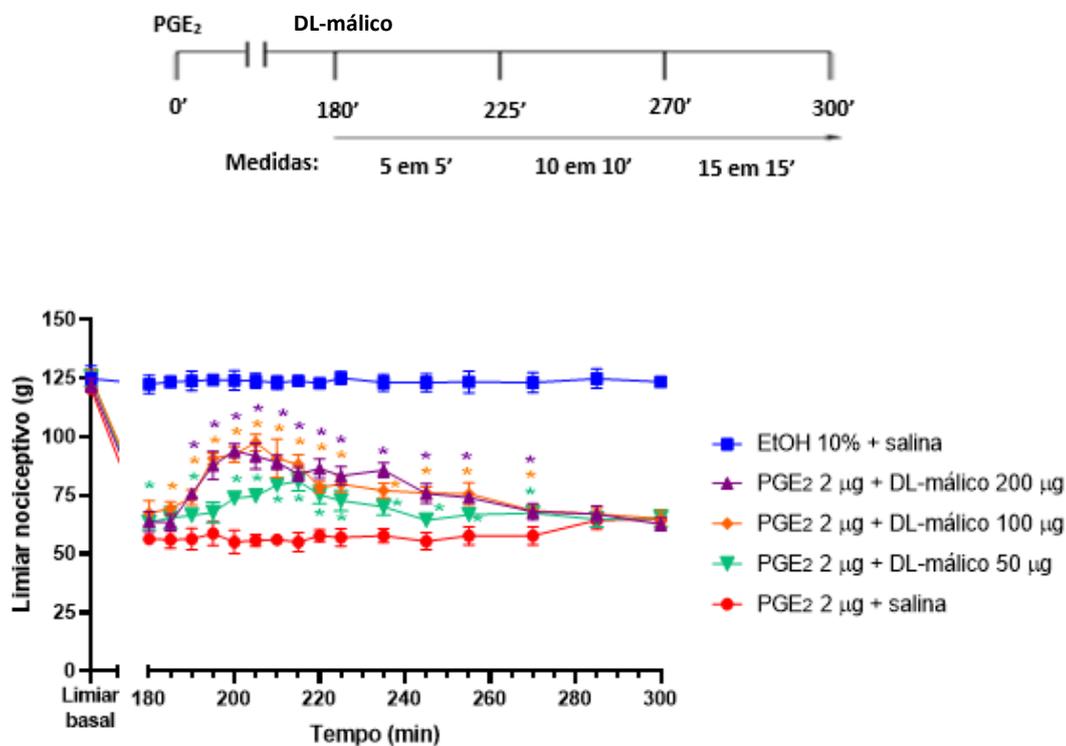


Figura 27: Curva dose-resposta por tempo do efeito antinociceptivo de ácido DL-málico (mistura racêmica) ante a hiperalgesia induzida por PGE₂ em camundongos. As medidas foram feitas em intervalos crescentes de tempo (ver diagrama acima do gráfico). Cada ponto na curva representa a média \pm E.P.M. (n amostral = 5 animais por grupo). * indica significância estatística $P < 0,05$ em relação ao grupo controle PGE₂ + salina. EtOH 10% + salina é o grupo controle de veículos de PGE₂ e ácido DL-málico, respectivamente.

Forma pura do estereoisômero L-málico:

O ácido L-málico apresentou efeito antinociceptivo de forma dose-dependente (Fig. 28). A dose de partida (200 µg) reverteu totalmente a hiperalgesia de PGE₂ em 20 minutos a partir do tratamento, gerando um platô de 35 minutos de efeito antinociceptivo. A seguir, a dose de 100 µg foi utilizada e também apresentou efeito antinociceptivo após 20 minutos, com platô de 25 minutos. Nova redução da dose, para 50 µg e, foi possível verificar o efeito intermediário, com pico de ação aos 20 minutos e aproximadamente 41% de reversão do efeito de PGE₂. Nas duas maiores doses (200 e 100 µg) o efeito de L-málico pôde ser observado até 90 minutos após administração; a dose de 50 µg mostrou efeito com significância estatística em relação ao grupo controle de PGE₂ até 65 minutos após administração. A partir desta descoberta, o ácido L-málico nas doses de 100 µg e 50 µg foram selecionados para as análises farmacológicas posteriores.

À continuidade, avaliamos se o ácido L-málico teria efeito antinociceptivo sistêmico mesmo quando administrado na periferia (Fig. 29). Para esta análise, PGE₂ foi injetada em ambas as patas dos dois grupos experimentais, teste e controle, enquanto o ácido L-málico (100 µg/pata) foi administrado somente na pata direita dos animais teste. Os resultados mostraram que L-málico reverteu totalmente a hiperalgesia na pata direita; todavia, não houve alteração da resposta do limiar da pata contralateral dos animais testados.

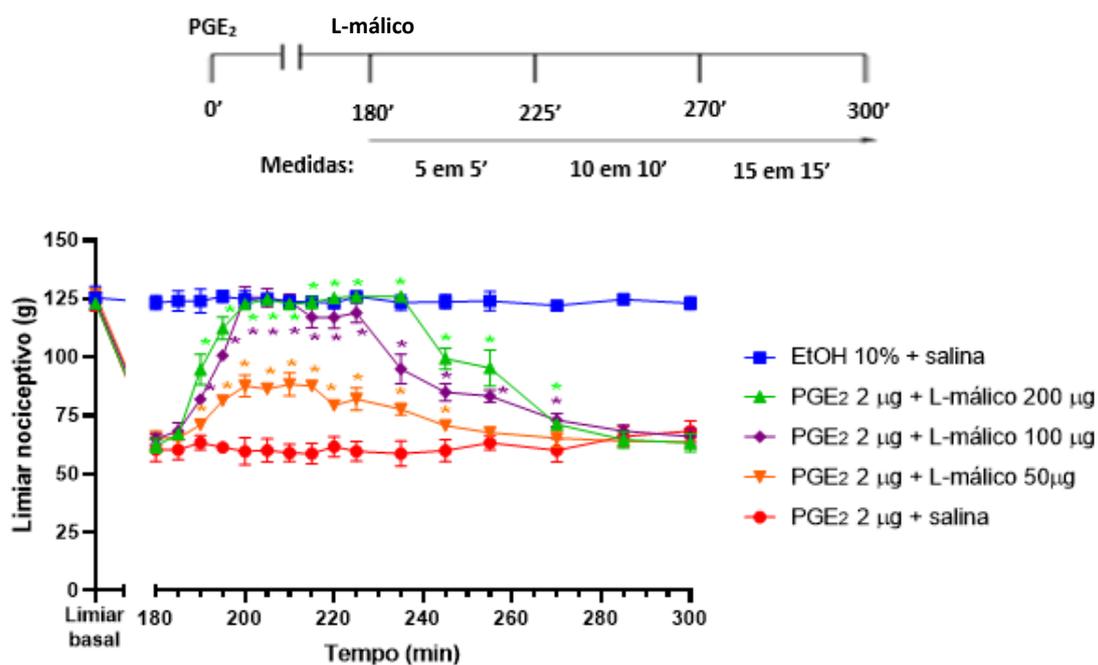


Figura 28: Curva dose-resposta por tempo do efeito antinociceptivo de ácido L-málico ante a hiperálgia induzida por PGE₂ (2 µg) em camundongos. As medidas foram feitas em intervalos crescentes de tempo (ver diagrama acima do gráfico). Cada ponto na curva representa a média ± E.P.M. (n amostral = 5 animais por grupo). * indica significância estatística P<0,05 em relação ao grupo controle PGE₂ + salina. ETOH 10% + salina é o grupo controle de veículos de PGE₂ e ácido L-málico, respectivamente.

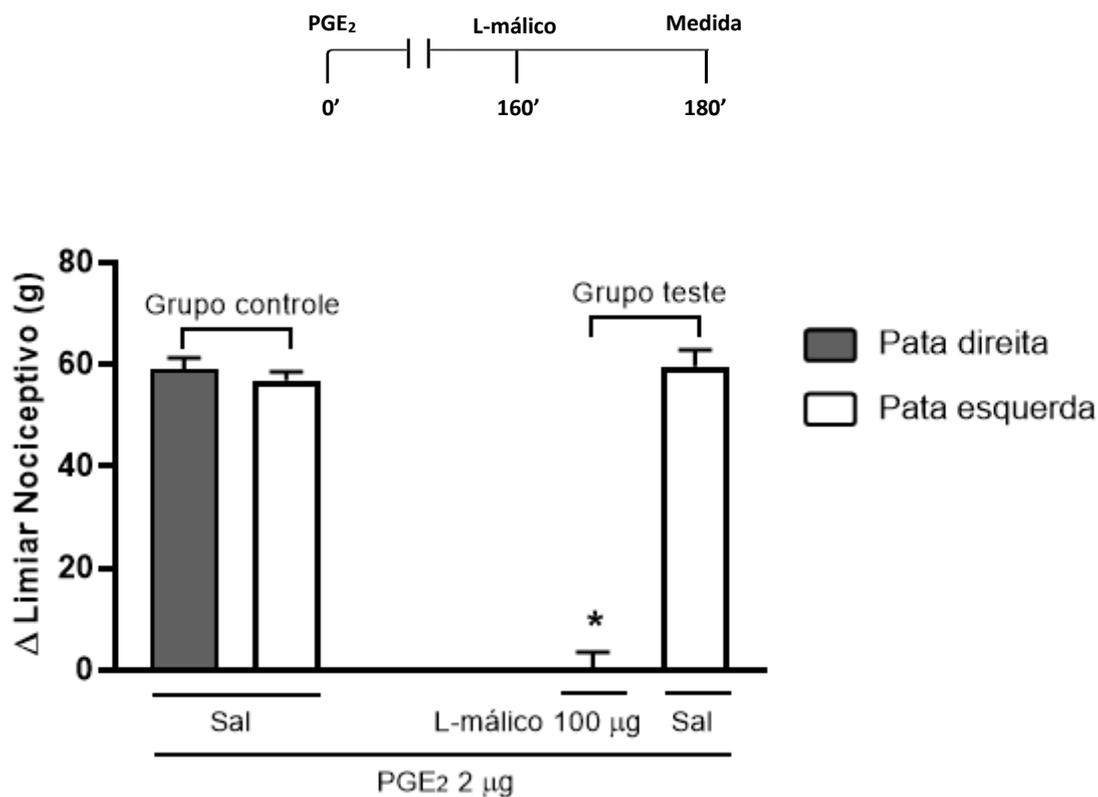


Figura 29: Exclusão de efeito antinociceptivo sistêmico do ácido L-málico (L-málico; 100 µg/pata). Após tratamento com PGE₂, L-málico 100 µg foi injetado (160 min.) apenas na pata posterior direita do grupo teste. As medidas foram feitas, em ambas as patas dos dois grupos, no tempo 180 min. (ver diagrama acima do gráfico). Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo, em gramas (g), para 5 animais por grupo. * indica significância estatística $P < 0,05$ em relação ao grupo controle PGE₂ + salina.

5.5. Análise do envolvimento do sistema opioidérgico na antinociceção mediada pelo ácido L-málico:

O sistema opioide foi o primeiro a ser avaliado neste trabalho. Naloxona, inibidor não-seletivo de receptores opioides, foi injetada na dose de 50 $\mu\text{g/pata}$, mas não reverteu o efeito antinociceptivo produzido por L-málico 100 $\mu\text{g/pata}$. O mesmo inibidor não provocou efeito hiperalgésico quando administrado sozinho, nem efeito antinociceptivo quando administrado junto a PGE_2 (Fig. 30).

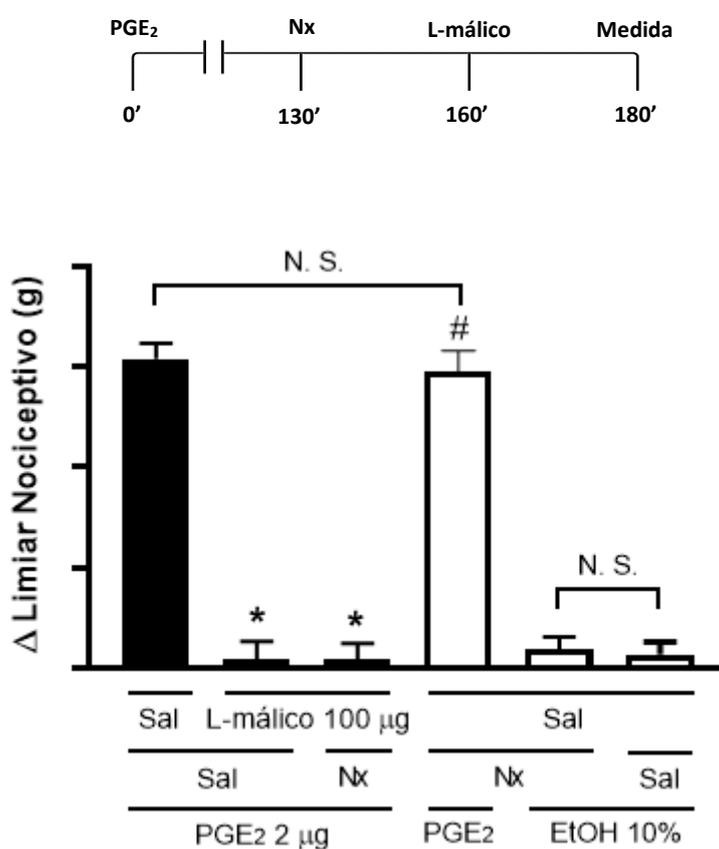


Figura 30: Ação da Naloxona (Nx), antagonista não seletivo de receptores opioides, sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo ácido L-málico. Naloxona (50 μg) e L-málico (100 μg) foram administrados nos tempos de 130 min e 160 min., respectivamente (ver diagrama acima do gráfico). Cada coluna representa a média \pm E.P.M. do Δ da medida do limiar nociceptivo expresso em gramas (g) referente a 5 animais. * indica significância estatística $P < 0,05$ em relação ao grupo $\text{PGE}_2 + \text{sal} + \text{sal}$; # indica significância estatística $P < 0,05$ em relação ao grupo $\text{PGE}_2 + \text{sal} + \text{L-málico } 100 \mu\text{g}$. N.S = diferença estatística não significativa. Sal = solução salina estéril 0,9%.

5.6. Análise do envolvimento do sistema canabinoide na antinociceção mediada pelo ácido L-málico:

AM251, antagonista seletivo de receptores canabinoide do tipo CB₁, foi injetado na dose de 80 µg/pata e foi capaz antagonizar parcialmente a antinociceção mediada por L-málico 100 µg (Fig. 31). Contudo, quando administrado sozinho, não provoca hiperálgia; e quando administrado junto a PGE₂, não promove efeito antinociceptivo desta.

Uma vez avaliada a participação do receptor CB₁ canabinoide no efeito antinociceptivo do ácido málico, foi avaliada a participação dos endocanabinoides neste evento e, para tanto, foram utilizados o inibidor da enzima FAAH que degrada a anandamida (MAFP), na dose de 0,5 µg/pata (Fig. 32) e o inibidor da enzima MAGL que degrada o 2-araquidonilglicerol (2-AG) (JZL184), na dose de 4 µg/pata (Fig. 33). Para que fosse possível verificar a potencialização do efeito de L-málico, foi utilizada uma dose intermediária, 50 µg/pata, elucidada pela figura 28. Observamos que o MAFP foi capaz de potencializar ao máximo o efeito da dose intermediária de L-málico; no entanto, JZL184 não foi capaz deste mesmo efeito. Nenhum dos inibidores de enzimas provocou hiperálgia quando administrado só, nem antinociceção ante PGE₂.

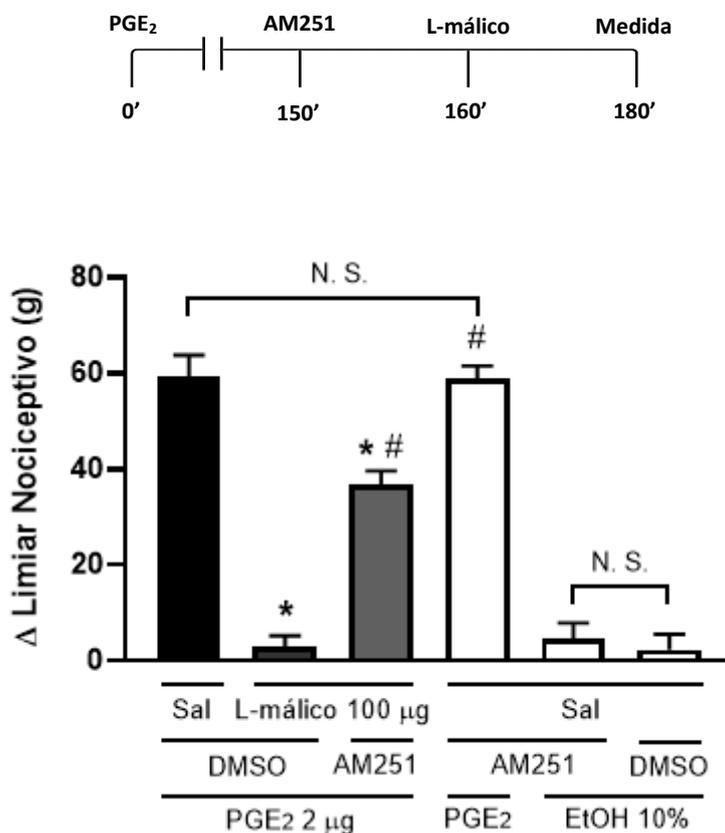


Figura 31: Ação do AM251, antagonista seletivo de receptores canabinoides CB₁, sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo ácido L-málico. AM251 (80 μg) e L-málico (100 μg) foram administrados nos tempos de 150 min e 160 min., respectivamente (ver diagrama acima do gráfico). Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ da medida do limiar nociceptivo expresso em gramas (g) referente a 5 animais. * indica significância estatística P<0,05 em relação ao grupo PGE₂ + DMSO + sal; # indica significância estatística P<0,05 em relação ao grupo PGE₂ + DMSO + L-málico 100 μg. N.S = diferença estatística não significativa. Sal = solução salina estéril 0,9%.

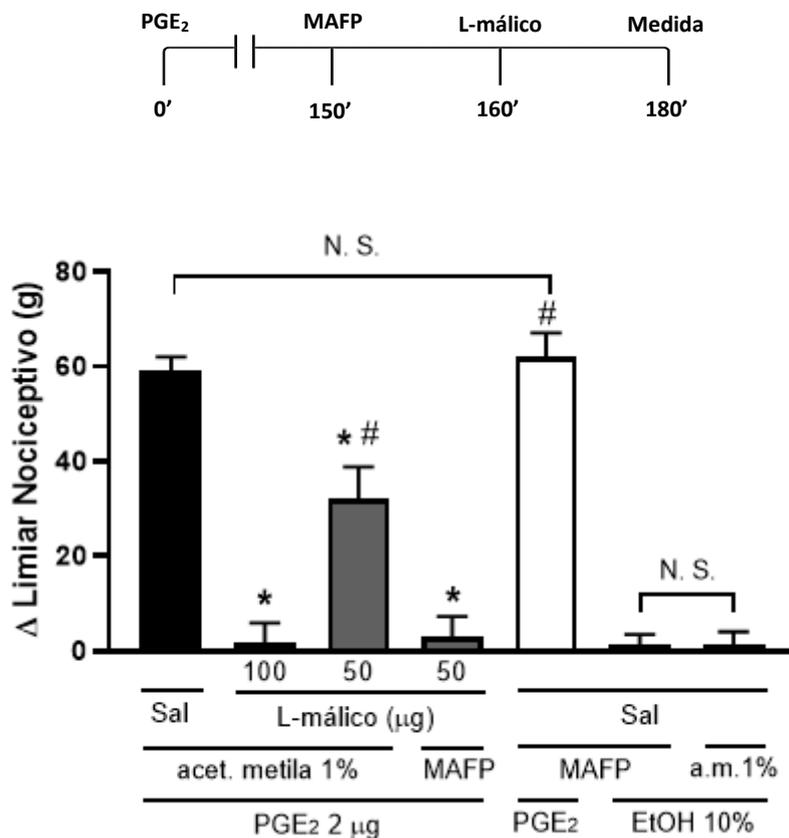


Figura 32: Ação do MAFP, inibidor irreversível de FAAH, sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo ácido L-málico. MAFP (0,5 μg) e L-málico (100 μg e 50 μg) foram administrados nos tempos de 150 min e 160 min., respectivamente (ver diagrama acima do gráfico). Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ da medida do limiar nociceptivo expresso em gramas (g) referente a 5 animais. * indica significância estatística $P < 0,05$ em relação ao grupo PGE₂ + acet. metila 1% + sal; # indica significância estatística $P < 0,05$ em relação ao grupo PGE₂ + a.m. 1% + L-málico 100 μg. N.S = diferença estatística não significativa. Sal = solução salina estéril 0,9%.

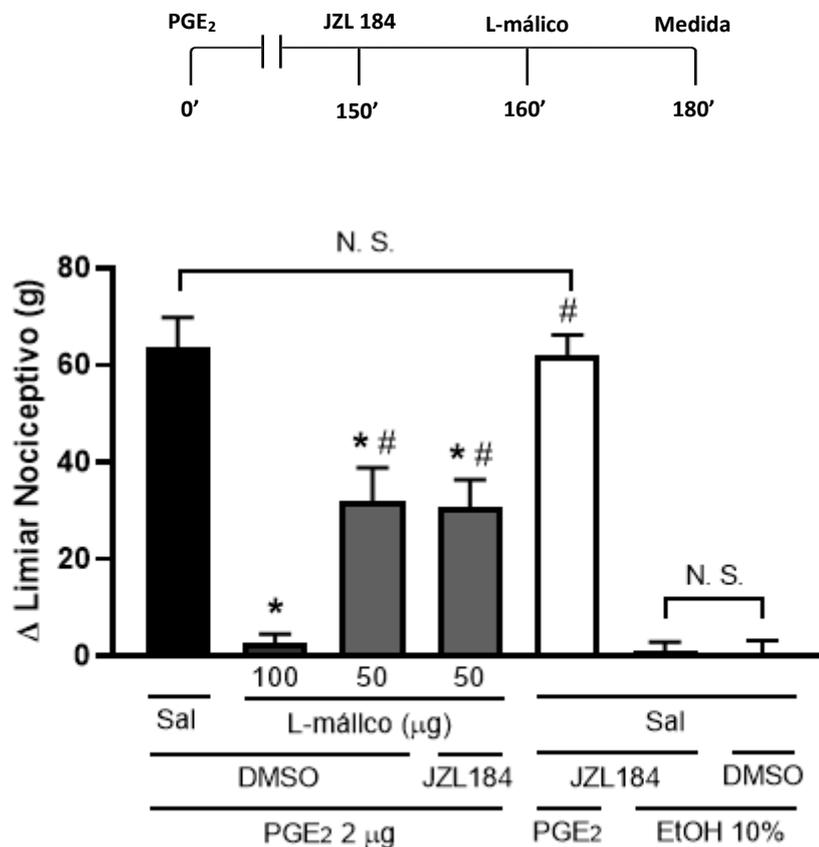


Figura 33: Ação do JZL184, inibidor seletivo de MAGL, sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo ácido L-málico. JZL184 (4 μg) e L-málico (100 μg e 50 μg) foram administrados nos tempos de 150 min e 160 min., respectivamente (ver diagrama acima do gráfico). Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ da medida do limiar nociceptivo expresso em gramas (g) referente a 5 animais. * indica significância estatística $P < 0,05$ em relação ao grupo PGE₂ + DMSO + sal; # indica significância estatística $P < 0,05$ em relação ao grupo PGE₂ + DMSO 1% + L-málico 100 μg. N.S = diferença estatística não significativa. Sal = solução salina estéril 0,9%.

5.7. Análise do envolvimento da via L-arginina/NO/GMPc na antinocicepção mediada pelo ácido L-málico:

A administração de L-NOArg (24 µg/pata), um inibidor não seletivo das enzimas óxido nítrico sintase (NOS), foi capaz de reverter totalmente o efeito antinociceptivo de L-málico 100 µg/pata, como mostra a figura 34. L-NOArg, quando administrado sozinho, não provocou hiperalgesia, ou mesmo antinocicepção quando administrado somente com PGE₂.

Para saber qual enzima estaria envolvida nesse processo, foram utilizados três inibidores da NOS: L-NIL (24 µg/pata), inibidor seletivo da NO-sintase induzível (Fig. 35); L-NPA (24 µg/pata), inibidor seletivo da NO-sintase neuronal (Fig. 36); e L-NIO (24 µg/pata), inibidor não seletivo da NO-sintase endotelial (Fig. 37). L-NIL não promoveu reversão do efeito antinociceptivo de L-málico 100 µg/pata; entretanto observa-se que L-NPA reverteu totalmente e L-NIO reverteu parcialmente o efeito antinociceptivo induzido pelo ácido L-málico.

Assim como o inibidor não-seletivo supracitado, nem L-NIL, L-NPA ou L-NIO provocaram hiperalgesia ou antinocicepção quando administrados sozinhos.

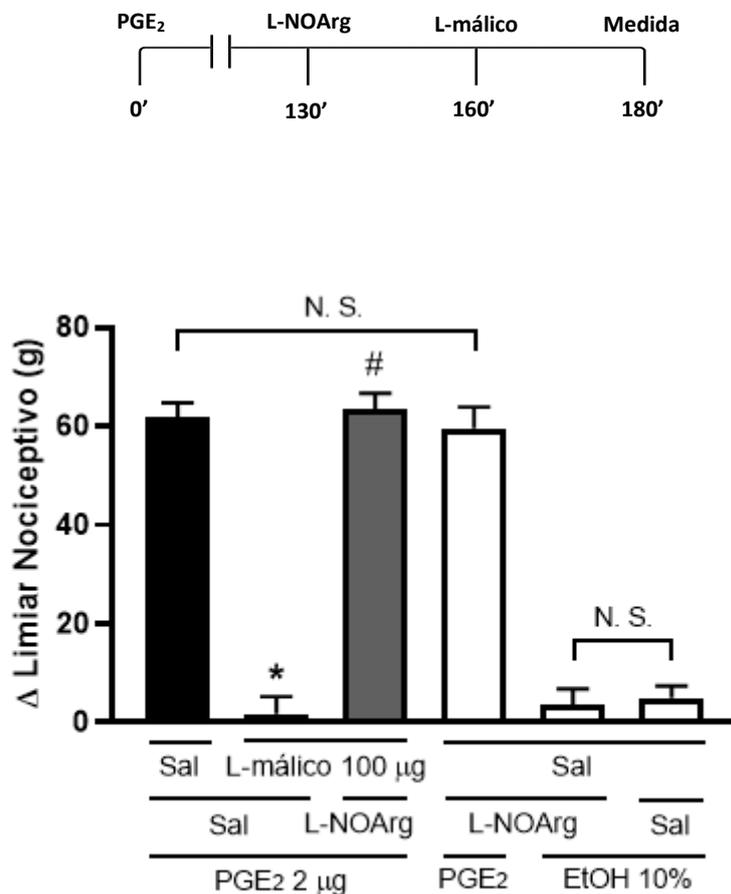


Figura 34: Ação do L-NOArg, inibidor não seletivo das enzimas NOS, sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo ácido L-málico. L-NOArg (24 µg) e L-málico (100 µg) foram administrados nos tempos de 130 min e 160 min., respectivamente (ver diagrama acima do gráfico). Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ da medida do limiar nociceptivo expresso em gramas (g) referente a 5 animais. * indica significância estatística $P < 0,05$ em relação ao grupo PGE₂ + sal + sal; # indica significância estatística $P < 0,05$ em relação ao grupo PGE₂ + sal + L-málico 100 µg. N.S = diferença estatística não significativa. Sal = solução salina estéril 0,9%.

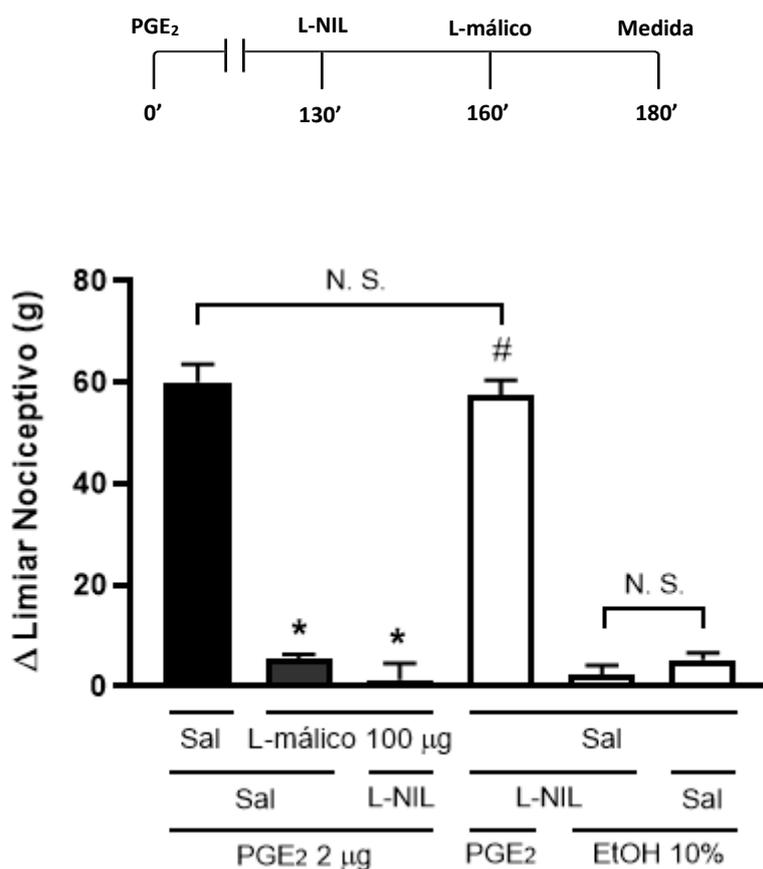


Figura 35: Ação do L-NIL, inibidor seletivo da enzima iNOS, sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo ácido L-málico. L-NIL (24 μg) e L-málico (100 μg) foram administrados nos tempos de 130 min e 160 min., respectivamente (ver diagrama acima do gráfico). Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ da medida do limiar nociceptivo expresso em gramas (g) referente a 5 animais. * indica significância estatística $P < 0,05$ em relação ao grupo PGE₂ + sal + sal; # indica significância estatística $P < 0,05$ em relação ao grupo PGE₂ + sal + L-málico 100 μg. N.S = diferença estatística não significativa. Sal = solução salina estéril 0,9%.

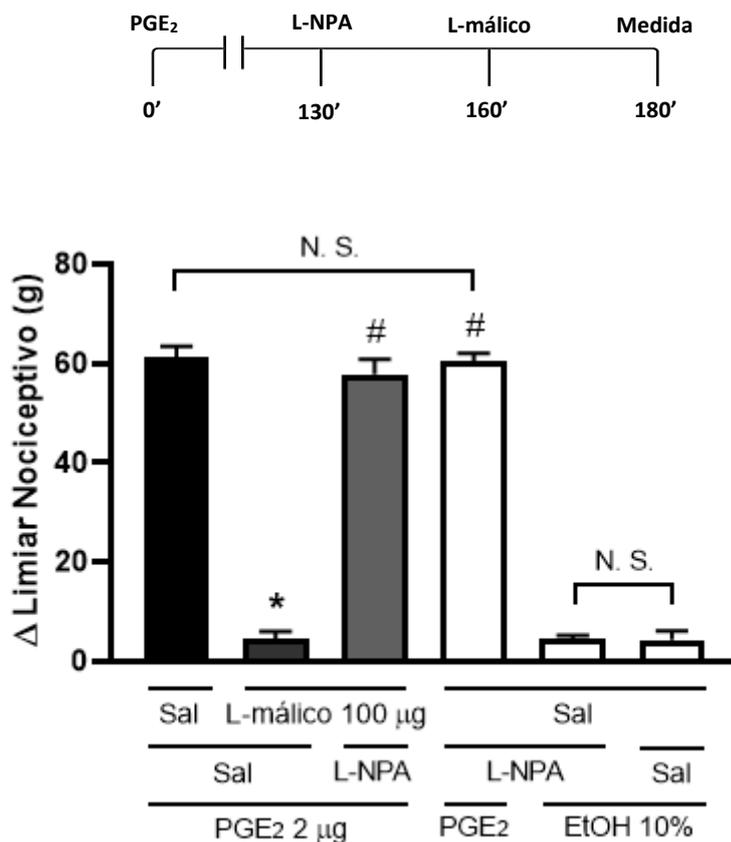


Figura 36: Ação do L-NPA, inibidor seletivo da enzima nNOS, sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo ácido L-málico. L-NPA (24 μg) e L-málico (100 μg) foram administrados nos tempos de 130 min e 160 min., respectivamente (ver diagrama acima do gráfico). Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ da medida do limiar nociceptivo expresso em gramas (g) referente a 5 animais. * indica significância estatística $P < 0,05$ em relação ao grupo PGE₂ + sal + sal; # indica significância estatística $P < 0,05$ em relação ao grupo PGE₂ + sal + L-málico 100 μg. N.S = diferença estatística não significativa. Sal = solução salina estéril 0,9%.

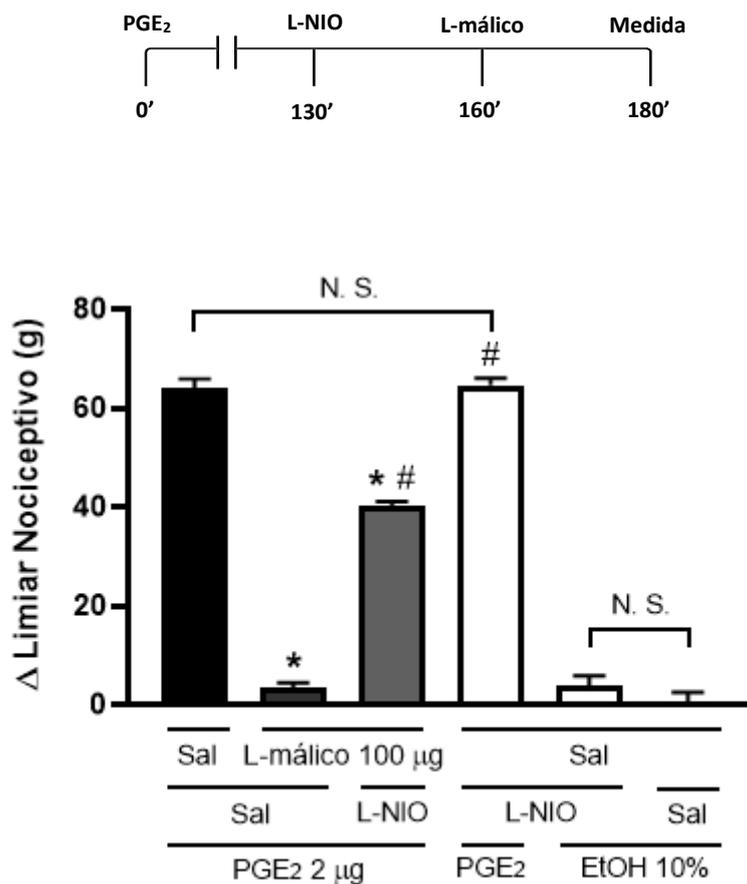


Figura 37: Ação do L-NIO, inibidor não seletivo da enzima eNOS, sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo ácido L-málico. L-NIO (24 μg) e L-málico (100 μg) foram administrados nos tempos de 130 min e 160 min., respectivamente (ver diagrama acima do gráfico). Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ da medida do limiar nociceptivo expresso em gramas (g) referente a 5 animais. * indica significância estatística $P < 0,05$ em relação ao grupo PGE₂ + sal + sal; # indica significância estatística $P < 0,05$ em relação ao grupo PGE₂ + sal + L-málico 100 μg. N.S = diferença estatística não significativa. Sal = solução salina estéril 0,9%.

O passo seguinte foi verificar se o ODQ, inibidor seletivo da enzima guanilato ciclase (GC), que catalisa a transformação de GTP em GMPc, poderia reverter o efeito antinociceptivo de L-málico 100 µg/pata. Na figura 38 é possível observar que ODQ (100 µg/pata) reverteu parcialmente a ação de L-málico 100 µg/pata.

A seguir, zaprinast, um inibidor seletivo da fosfodiesterase específica de GMPc, foi testado e este foi capaz de potencializar ao máximo o efeito da dose intermediária de L-málico (50 µg/pata), em um perfil semelhante ao do efeito observado no grupo controle L-málico 100 µg/pata (Fig. 39).

Ambos os inibidores não promoveram hiperalgesia ou antinocicepção quando verificados em seus respectivos grupos controles (etOH 10% e PGE₂).

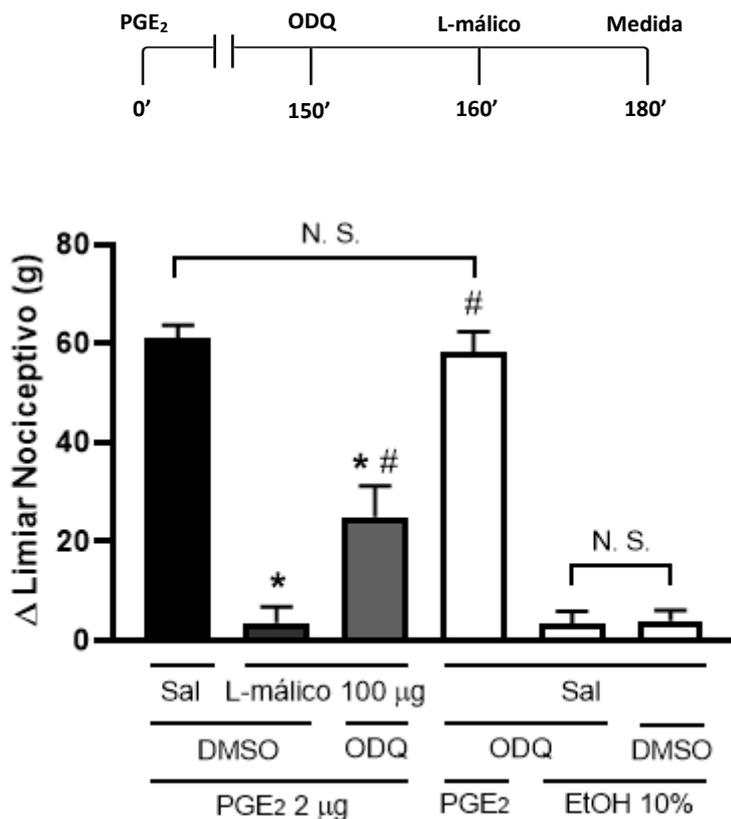


Figura 38: Ação do ODQ, inibidor seletivo da guanilato ciclase solúvel, sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo ácido L-málico. ODQ (100 µg) e L-málico (100 µg) foram administrados nos tempos de 150 min e 160 min., respectivamente (ver diagrama acima do gráfico). Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ da medida do limiar nociceptivo expresso em gramas (g) referente a 5 animais. * indica significância estatística P<0,05 em relação ao grupo PGE₂ + DMSO + sal; # indica significância estatística P<0,05 em relação ao grupo PGE₂ + DMSO 1% + L-málico 100 µg. N.S = diferença estatística não significativa. Sal = solução salina estéril 0,9%.

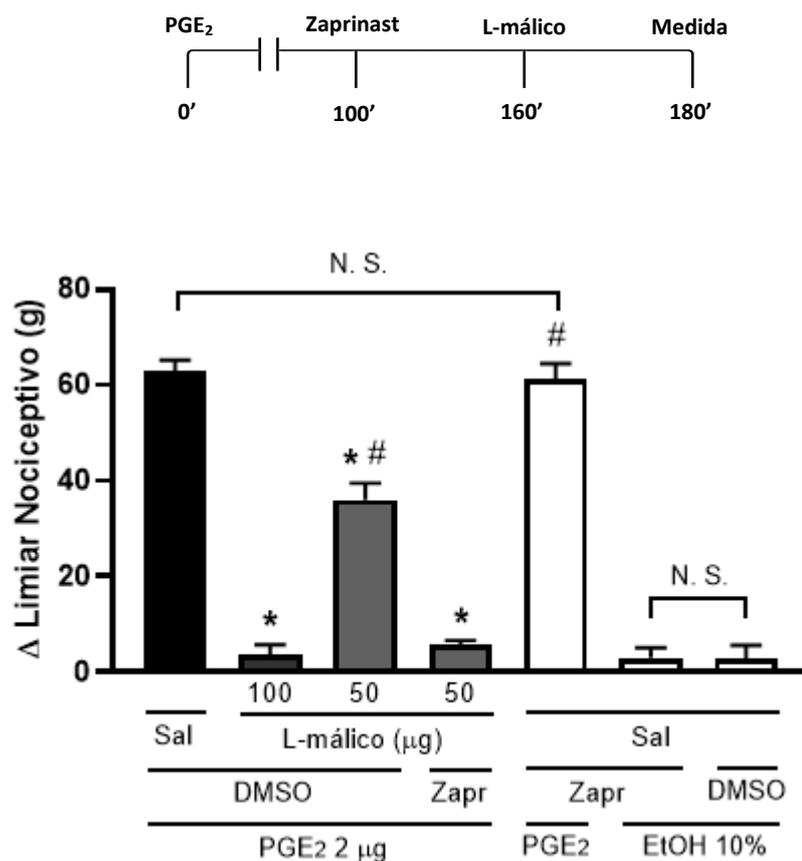


Figura 39: Ação do zaprinast, inibidor seletivo da fosfodiesterase específica do GMPc, sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo ácido L-málico. Zaprinast (50 μg) e L-málico (100 μg e 50 μg) foram administrados nos tempos de 100 min e 160 min., respectivamente (ver diagrama acima do gráfico). Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ da medida do limiar nociceptivo expresso em gramas (g) referente a 5 animais. * indica significância estatística $P < 0,05$ em relação ao grupo PGE₂ + DMSO + sal; # indica significância estatística $P < 0,05$ em relação ao grupo PGE₂ + DMSO 1% + L-málico 100 μg. N.S = diferença estatística não significativa. Sal = solução salina estéril 0,9%.

5.8. Análise do envolvimento de canais para potássio na antinocicepção mediada pelo ácido L-málico:

A fim de verificar a atividade de canais para potássio na ação antinociceptiva de L-málico 100 µg/pata, foi utilizado o tetraetilamônio (TEA), um bloqueador não seletivo destes canais, na dose de 30 µg/pata. TEA reverteu totalmente a ação de L-málico, como demonstrado na Fig. 40.

Em seguida, foi utilizada a glibenclamida (80 µg/pata), de modo a elucidar a participação dos canais para potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}), visto que esta droga promove o bloqueio seletivo destes canais. Como foi demonstrado na Fig. 41, a Glibenclamida também foi capaz de reverter totalmente a ação de L-málico 100 µg/pata.

TEA e Glibenclamida não provocaram hiperalgesia ou antinocicepção quando administradas em seus respectivos grupos controle (etOH 10% e PGE₂).

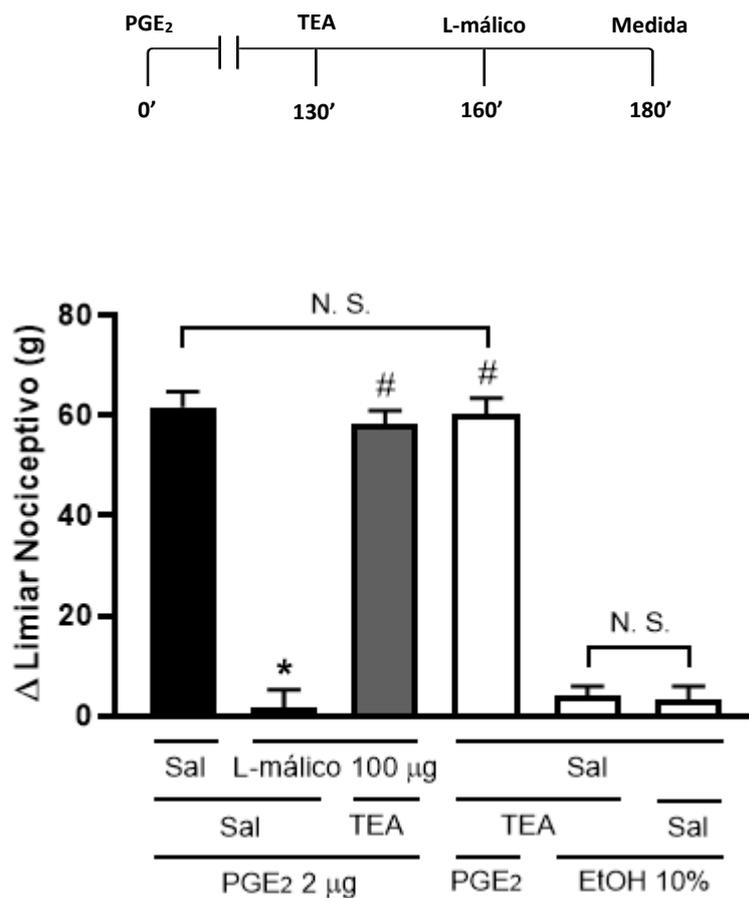


Figura 40: Ação do TEA, bloqueador não seletivo dos canais para K⁺, sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo ácido L-málico. TEA (30 μg) e L-málico (100 μg) foram administrados nos tempos de 130 min e 160 min., respectivamente (ver diagrama acima do gráfico). Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ da medida do limiar nociceptivo expresso em gramas (g) referente a 5 animais. * indica significância estatística P<0,05 em relação ao grupo PGE₂ + sal + sal; # indica significância estatística P<0,05 em relação ao grupo PGE₂ + sal + L-málico 100 μg. N.S = diferença estatística não significativa. Sal = solução salina estéril 0,9%.

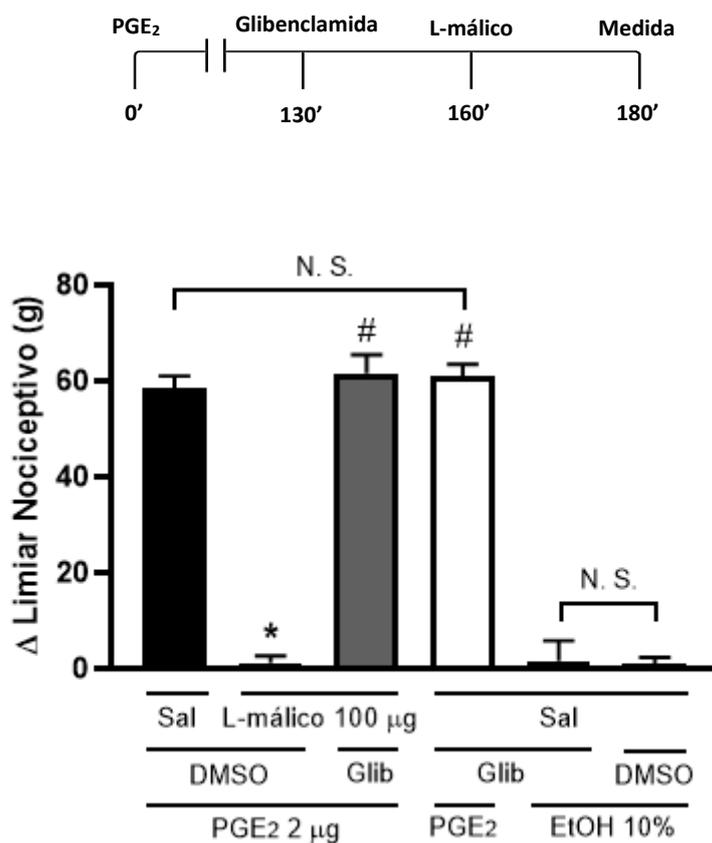


Figura 41: Ação da Glibenclamida, bloqueador seletivo dos canais para K_{ATP}, sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo ácido L-málico. Glibenclamida (80 μg) e L-málico (100 μg) foram administrados nos tempos de 155 min e 160 min., respectivamente (ver diagrama acima do gráfico). Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ da medida do limiar nociceptivo expresso em gramas (g) referente a 5 animais. * indica significância estatística P<0,05 em relação ao grupo PGE₂ + DMSO + sal; # indica significância estatística P<0,05 em relação ao grupo PGE₂ + DMSO 1% + L-málico 100 μg. N.S = diferença estatística não significativa. Sal = solução salina estéril 0,9%.

6. Discussão



Segundo estimativas, até 70.000 espécies de plantas são usadas por seus poderes curativos em todo o mundo (Haq *et al.*, 2012). O uso terapêutico de plantas como drogas analgésicas na medicina popular é uma tradição antiga (Ullah *et al.*, 2015). Neste contexto, surgiu o interesse em investigar o possível potencial terapêutico da planta alvo deste trabalho. Para tanto, iniciamos um trabalho colaborativo com a área de Produtos Naturais do Departamento de Química da UFMG, de onde obtivemos o extrato dos galhos de *C. gongyloides* para as análises no Departamento de Farmacologia da UFMG.

Efeitos analgésicos de plantas têm sido estudados através de diferentes modelos experimentais de dor, incluindo o teste de contorção, teste do movimento leve da cauda, teste da imersão da cauda, teste da placa quente e teste de formalina (Haq *et al.*, 2012).

O teste de formalina tem amplo uso como modelo para estudo da dor, uma vez que provoca uma resposta bifásica distinta, dor nociceptiva e dor inflamatória. A primeira fase (nociceptiva) é caracterizada por uma dor aguda compreendida nos primeiros 5 minutos, causada pela sensibilização direta da formalina em neurônios aferentes primários (fibras C). Essa dor se abrandava e então surge a segunda fase, compreendida entre 15 e 30 minutos após injeção do hiperalgésico. A segunda fase de dor é devida à subsequente inflamação, pois há liberação de vários mediadores hiperalgésicos e inflamatórios. Opioides de ação central, como morfina e codeína, são capazes de inibir a dor em ambas as fases do teste; por outro lado, drogas de ação periférica como anti-inflamatórios esteroidais (AIES) e não esteroidais (AINES) são eficientes em inibir somente a segunda fase, a da dor inflamatória (Shibata *et al.*, 1989).

Ao avaliarmos a ação de diferentes doses de EE ante a hiperalgisia por formalina, vimos que as maiores doses (300 mg/kg e 1000 mg/kg) foram capazes de reduzir consideravelmente o tempo de lambida da pata, ao longo de todo o experimento. Na 1ª fase, quando comparamos com a morfina (fármaco controle), a dose de 300 mg/kg apresentou diferença estatística ($p > 0,05$), diferente da dose de 1000 mg/kg, sugerindo que 1000 mg/kg tenha um perfil mais semelhante ao do opioide controle. Entretanto, não houve diferença estatística entre estas duas doses de EE na primeira fase e, por isso, nessa observação ainda não foi possível propor que o tratamento seja dose-dependente.

Verificamos, também, redução do tempo de lambida de pata entre 15 e 30 minutos após a formalina de maneira dose-dependente, período que corresponde à dor inflamatória. Decerto, estudos recentes demonstraram o potencial anti-inflamatório do decocto de *C. gongylodes*, que foi eficaz em inibir tanto a via das cicloxigenases (COX) quanto a das lipoxigenases (LOX) em modelo murino (Salem *et al.*, 2020). Visto que a maior dose de EE (1000 mg/kg) apresentou resultados positivos em ambas as fases da dor, optamos por usar esta para os cálculos das concentrações a serem utilizadas nos experimentos seguintes.

Um cuidado que se deve tomar em estudos de analgesia é garantir que antinocicepção vista em teste não seja, na verdade, um possível efeito sedativo da substância testada (revisado por Millan, 1999). Isso pode acontecer em modelos de dor que utilizam administração sistêmica da droga testada, a citar o próprio teste de formalina. No teste de coordenação motora (Rota-rod), os animais são adestrados a caminharem sob uma haste giratória e logram êxito quando em condições normais. Contudo, quando recebem administração de drogas depressoras, não conseguem se manter na haste e caem (Kuribara, 1977). Desse modo, para exclusão de um possível efeito sedativo de EE, realizamos o teste de coordenação motora, Rota-rod. Os animais foram tratados previamente com EE 1000 mg/kg, veículo de EE e xilazina 16 mg/kg. A xilazina tem ação analgésica, miorelaxante e sedativa (Massone, 2003), sendo utilizada como controle de coordenação motora reduzida. Os resultados de todos os tempos medidos mostraram que EE, mesmo em sua maior dose, não apresentou miorelaxamento ou sedação, o que sugere um caráter antinociceptivo do extrato.

Em seguida, analisamos em uma lupa os estômagos dos animais tratados com EE 1000 mg/kg e verificamos que não houve nenhuma alteração macroscópica aparente quando comparados aos animais tratados somente com veículo. A princípio, podemos inferir que o tratamento oral com EE não causa lesão gástrica. De fato, a administração crônica de infuso e decocto de caule de *C. gongylodes* não leva a alterações de peso de órgãos, ou de funções renais e hepáticas, sugerindo certa segurança em relação à toxicidade (Navarro, 2009). De todo modo, uma análise mais profunda dos cortes histológicos faz-se necessária para corroborar essa sugestão.

A partir destes resultados preliminares de EE, demos seguimento à investigação das porções fracionadas do extrato. Essas frações foram obtidas a partir da purificação do extrato na coluna em Sephadex LH-20 e foram nomeadas de acordo com seu peso molecular, em ordem decrescente: F1 sendo a de maior peso molecular, F5 a de menor. A massa de cada fração obtida foi suficiente para os testes de dor periférica, onde uma pequena dose é injetada na pata do animal e esta é medida ao longo do tempo. A dose de partida para todas as frações foi ajustada pelo proporcional de dose sistêmica de EE (1000 mg/kg), resultando em 400 µg/pata.

Para os testes de dor periférica, utilizamos o modelo de hiperalgia por prostaglandina E₂ (PGE₂) avaliada no analgesímetro. A prostaglandina provoca dor quando administrada por injeção subdérmica em concentrações encontradas numa inflamação (Ferreira, 1972). Utilizamos a dose de 2 µg/pata por esta apresentar hiperalgia máxima no modelo murino testado (Petrocchi *et al.*, 2019). Por ativação de AMPc e via da proteína quinase A (PKA), as prostaglandinas intensificam as correntes de sódio e inibem canais para potássio. Isso diminui o limiar de disparo dos neurônios aferentes primários, aumentando a excitabilidade neuronal e, conseqüentemente, a liberação de substâncias próprias da transmissão do estímulo doloroso, como aminoácidos excitatórios, substância P e óxido nítrico, por exemplo (Millan, 1999; Vanegas e Schaible, 2001).

A fração F1 foi a que apresentou, entre todas, o melhor resultado antinociceptivo ante PGE₂. Além dela, F4 também obteve efeito considerável. F2 e F3, embora tenham apresentado certo efeito antinociceptivo periférico, foram descartadas de análises posteriores por não apresentarem resultados considerados suficientes, por nós, para uma investigação mais minuciosa. F2 não reverteu totalmente a hiperalgia de PGE₂ com a dose de 400 µg/pata, além de ter o pico de ação relativamente tardio. F3 400 µg/pata apresentou pico de ação mais rápido que as duas anteriores. Mesmo quando aumentada a dose, 600 µg/pata, também não foi capaz de reverter totalmente a hiperalgia. F4 também não teve reversão total da hiperalgia com a dose de 400 µg/pata; entretanto nos despertou interesse por ter apresentado um pico de ação mais rápido que o de F1. F5 apresentou efeito antinociceptivo baixo, sendo também desconsiderada.

Subprodutos de plantas podem exercer seus efeitos benéficos por ações aditivas, sinérgicas ou indutivas de outros compostos endógenos, atuando em um ou vários alvos e modulando processos fisiológicos (Briskin, 2000). Isto posto, nossa sugestão é de que o efeito terapêutico observado em EE e suas frações se encaixaria nestas condições descritas.

F1 foi capaz de reverter a hiperalgesia causada por PGE₂ na dose de 400 µg após o tratamento, enquanto F4 reverteu na dose de 600 µg/pata. Após a análise dos dados coletados, optamos pelo uso da fração F1, por apresentar antinocicepção com menor dose. A análise química de F1 nos mostrou que a substância presente em maior quantidade era o ácido málico (Fig. 12).

O ácido málico é amplamente utilizado nas indústrias alimentícia e cosmética há décadas (revisado por Ortiz, 2018; Fiume, 2001). Além disso, também é utilizado como nutracêutico quando em associação com o magnésio para tratamento da dor da fibromialgia. A dose média encontrada nas farmácias de manipulação é de 400 mg para uma pessoa de 70kg. Ao calcularmos a proporção para um camundongo de 35 g (em média), obtivemos a dose de partida de 200 µg para os testes desta substância isolada.

As duas substâncias foram testadas no analgesímetro, ante a hiperalgesia por PGE₂. A dose de partida para ambos nos testes preliminares foi de 200 µg/pata. DL-málico não demonstrou potencial antinociceptivo total nesta dose, ao passo que o L-málico sim. Além de reverter totalmente a hiperalgesia, L-málico 200 µg chegou ao pico de ação aos 20 minutos e perdurou até 55 minutos após a injeção. Diante destes resultados, optamos por reduzir a dose, de ambas as substâncias, para 100 µg/pata e, subsequentemente, 50 µg/pata. Vale lembrar que o DL-málico utilizado é uma mistura racêmica, composta por 50% de ácido D-málico e 50% de ácido L-málico. Logo, a dose de 200 µg de DL-málico, por exemplo, contém 100 µg de L-málico.

DL-málico em nenhuma das doses testadas foi capaz de promover a antinocicepção total. Este resultado sugere que a mistura racêmica de ácido málico, além de não ser satisfatória para controle da hiperalgesia, apresenta alguma interferência do isômero D-málico na ação do isômero L-málico, atrapalhando o efeito benéfico visto deste último. Por certo, a literatura revela trabalhos envolvendo isômeros que, não necessariamente, apresentam o mesmo resultado quando administrados sozinhos ou em mistura racêmica. Na

verdade, é comum que misturas racêmicas apresentem resultados menos adequados do que formulações com um dos isômeros puro (Lima, 1997; Orlando, 2007). O exemplo mais famoso é a talidomida, medicamento que continha ambos os enantiômeros ativos em sua composição e que causou anormalidade congênita em milhares de bebês nascidos no meio do século XX (McBride, 1961; Fabro *et al.*, 1967).

O enantiômero L-málico sozinho apresentou resultados satisfatórios na dose de 100 µg/pata, com pico de ação aos 20 minutos de tratamento, perdurando por 25 minutos. Assim sendo, cogitamos que talvez reduzindo pela metade novamente obtivéssemos uma dose menor ainda eficaz. Para nossa surpresa, 50 µg/pata reverteu em torno de 42% da hiperalgesia de PGE₂. Aparentemente a dose de 50 µg/pata não é suficiente para ativar o mínimo de receptores que desencadeariam o efeito biológico máximo.

Diante desses resultados, elegemos a dose de 100 µg para testes subsequentes nos quais precisaríamos de eficácia máxima e a dose de 50 µg como intermediária para testes de potencialização do efeito de L-málico.

Para assegurar que a dose local de 100 µg de L-málico não teria efeito sistêmico, conduzimos o teste de exclusão de pata. Neste, os animais do grupo controle e do grupo teste tiveram PGE₂ injetada em ambas as patas. Nos animais tratados o L-málico foi injetado somente na pata direita, no tempo de acordo com o protocolo. Vimos que esta dose não causou alteração no limiar nociceptivo sensibilizado da pata contralateral, sugerindo que não há efeito sistêmico de L-málico 100 µg injetado na periferia (pata).

O primeiro sistema analgésico endógeno que avaliamos foi o sistema opioidérgico. Este sistema regula respostas a estímulos nocivos dolorosos, de estresse, ou estímulos de recompensa e motivação, também controla funções autonômicas como a respiração, termorregulação, motilidade gastrointestinal, entre outras (revisado por Kieffer, 1999). Existem 3 tipos de receptores: µ (mi); κ (kappa) e δ (delta), que são ativados por diferentes peptídeos endógenos, sejam das classes das endorfinas, encefalinas ou dinorfinas (Van Ree *et al.*, 2000). Isto posto, para o início da busca de uma possível participação do sistema opioide no efeito antinociceptivo de L-málico, utilizamos a naloxona (50 µg), um antagonista não-seletivo dos receptores opioidérgicos µ, κ, δ. Os resultados mostraram que o sistema opioidérgico não participa da modulação

antinociceptiva de L-málico, visto que o antagonismo dos receptores opioides não alterou a eficácia da droga testada. A literatura apresenta outros trabalhos utilizando produtos naturais que também demonstraram a não participação deste sistema em seus efeitos analgésicos (Tarselli *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2015; Safavi-Hemami *et al.*, 2019).

A seguir, nos propusemos a avaliar a participação do sistema canabinoidérgico neste evento. Este sistema é modulado por endocanabinoides, sendo os mais estudados a anandamida (AEA) e o 2-araquidonoilglicerol (2-AG). Essas moléculas ativam dois conhecidos receptores canabinoidérgicos: CB₁, amplamente encontrado nos sistemas nervosos central e periférico, e CB₂, expresso principalmente em células não neuronais. Os efeitos antinociceptivos dos canabinoides (exógenos ou endógenos) devem-se, em sua maioria, pela ativação de receptores CB₁ (Matsuda *et al.*, 1990; Munro *et al.*, 1993; Di Marzo e Fontana, 1995). Considerando essas informações, utilizamos AM251 (80 µg), droga capaz de antagonizar os receptores CB₁ canabinoides (Gatley *et al.*, 1996) e, assim, impedir que a antinocicepção aconteça mesmo com tratamento. Observamos que houve uma diminuição do efeito de L-málico 100 µg, mas não totalmente.

Apurada a possível participação dos receptores CB₁ canabinoides, mesmo que de forma parcial, resolvemos avaliar a participação dos canabinoides endógenos neste evento. Para tanto, utilizamos duas drogas potencializadoras de efeitos de endocanabinoides: MAFP, inibidor da enzima FAAH, que degrada anandamida; e JZL 184, inibidor de MAGL que degrada 2-AG (Deutsch *et al.*, 1997; De Petrocellis *et al.*, 2000). Utilizamos a dose intermediária de L-málico (50 µg), visto que para identificar se há modulação de endocanabinoides, estes teriam seus efeitos potencializados, uma vez que diminuimos a degradação destas moléculas endógenas com as drogas inibidoras supradescritas. Com MAFP vimos que a dose intermediária de L-málico foi potencializada ao efeito máximo, sugerindo participação de AEA. Várias substâncias exógenas derivadas de plantas já demonstraram a participação de endocanabinoides após a administração de MAFP (Muccioli *et al.*, 2009; Chicca *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2016). Entretanto, o JZL 184 não foi capaz de potencializar L-málico 50 µg, sugerindo que 2-AG pode não estar envolvido na antinocicepção induzida pela droga teste. Embora existam

trabalhos demonstrando que a inibição da enzima MAGL pode potencializar o efeito antinociceptivo de fito-substâncias (Oliveira *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2019), nem sempre isso acontece, mesmo quando é observado o envolvimento de receptores canabinoiérgicos (Velooso *et al.*, 2018).

CB₁ e CB₂ são receptores metabotrópicos acoplados à proteína G dos tipos G_i/G_o (revisado por Morisset *et al.*, 2001) que, quando ativados, inibem a produção de adenilato ciclase e, conseqüentemente, reduzem os níveis de AMPc e proteína quinase A (PKA) intracelulares (Howlett *et al.*, 1988). Dessa forma, o menor acúmulo de AMPc pode induzir a diminuição de enzimas conversoras de óxido nítrico (as óxido nítrico sintases, NOS) e, como consequência, reduzir a formação de óxido nítrico (NO). Em um efeito de retroalimentação desta cascata, menores níveis de NO prejudicam diretamente a atividade de adenilato ciclase (Stefano *et al.*, 1998). A partir disto surgiu o interesse em verificar se haveria participação da via L-arginina/NO/GMPc, já que esta via pode ser desencadeada pela ativação de receptores canabinoiérgicos tanto do sistema nervoso central (Azad *et al.*, 2001), quanto do sistema nervoso periférico (Reis *et al.*, 2011). Logo, para avaliar a participação do sistema nitrérgico na antinocicepção de L-málico, utilizamos a princípio um inibidor não seletivo de NOS, o L-NOArg (Irikura *et al.*, 1994). Os resultados mostraram que NO participa da modulação induzida por L-málico, uma vez que a inibição das NOS reverteu a resposta antinociceptiva da droga teste. As enzimas NOS são categorizadas em três subtipos: óxido nítrico sintase neuronal, (nNOS), encontrada majoritariamente no corno dorsal da medula espinhal; óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), encontrada no endotélio vascular, em algumas populações de neurônios (revisado por Cury *et al.*, 2011) ou em astrócitos do núcleo do trato solitário (Lin *et al.*, 2007); e a óxido nítrico sintase induzível (iNOS), expressa na periferia durante a inflamação ou em processos de dor neuropática, sendo produzida por macrófagos, neutrófilos, astrócitos ou micróglia (Knowles e Moncada, 1994).

Então, para identificar qual subtipo de NOS estaria envolvida (ou quais), utilizamos três drogas: L-NIL, inibidor seletivo da iNOS; L-NPA, inibidor seletivo da nNOS; e L-NIO, inibidor não seletivo da eNOS. Vimos que L-NIL não alterou o limiar nociceptivo dos animais tratados, mostrando que iNOS parece não estar envolvida na antinocicepção mediada por L-málico. Entretanto, L-NPA foi capaz

de reverter totalmente o efeito de L-málico, ao passo que L-NIO reverteu parcialmente. Substâncias naturais podem agir na antinocicepção pela via L-arginina e, mais especificamente, pela ativação de nNOS (Veloso *et al.*, 2015). Com estes resultados podemos dizer que a enzima nNOS é ativada nessa cascata antinociceptiva, mas tal sugestão não pode ser feita para a enzima eNOS, já que a droga disponível hoje (L-NIO) para essa análise não tem seletividade para a isoforma endotelial. O resultado visto com L-NIO aparentemente foi evocado também pela inibição da isoforma neuronal da óxido nítrico sintase.

A enzima guanilato ciclase solúvel (GC) é sensível a NO e está diretamente relacionada ao aumento dos níveis intracelulares de um nucleotídeo mediador chamado guanosina monofostato cíclica (GMPc). Quando ativada, GC catalisa a formação de GMPc a partir de uma molécula de guanosina trifosfato (GTP) (Moncada *et. al.*, 1988) e níveis aumentados de GMPc evocam antinocicepção periférica (Duarte *et al.*, 1990). Para avaliarmos, então, se a guanilato ciclase estaria envolvida nessa sinalização intracelular, utilizamos ODQ, um inibidor seletivo desta enzima. Esta droga foi capaz de reverter parcialmente o efeito antinociceptivo. De qualquer modo, foi necessário apurar a participação de GMPc na antinocicepção, dado que sua formação intracelular não depende somente de guanilato ciclase (Romling *et al.*, 2013). GMPc é degradado por uma fosfodiesterase específica, a PDE5, então o tratamento com substâncias inibidoras desta fosfodiesterase tornam os efeitos deste nucleotídeo mediador mais duradouro (Duarte e Ferreira, 1992; Rybalkin *et al.*, 2002). Para tanto, utilizamos zaprinast, inibidor da PDE5 (entre outras) (Taniguchi *et al.*, 2006), junto com o tratamento na dose intermediária de L-málico (50 µg/pata), para efeito de potencialização. Observamos que o zaprinast foi capaz de potencializar o efeito da dose intermediária do L-málico ao máximo, mostrando que GMPc está envolvido na cascata antinociceptiva de L-málico. O mesmo efeito foi observado em trabalhos de Veloso e colaboradores, em 2015, e Romero e colaboradores, em 2012, o que ratifica os nossos achados.

O acúmulo de GMPc intracelular pode modular diferentes tipos de canais iônicos, seja por ação direta nestes ou indireta, por meio da fosforilação da proteína quinase G (PKG). PKG fosforilada e o próprio GMPc interagem e abrem os canais para potássio (K⁺), por exemplo. A saída deste íon provoca

hiperpolarização celular, reduzindo a excitabilidade neuronal e, conseqüentemente, diminui a transmissão do estímulo doloroso (Sachs, *et al.*, 2004). São 4 os tipos de canais para potássio: voltagem-dependente (K_v); ativados por cálcio (K_{Ca}); retificador de influxo (K_{ir}) e de dois poros (K_{2P}). Dentro do grupo de canais K_{ir} encontram-se os canais para potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) (revisado por Ocaña *et al.*, 2004). Vários estudos envolvendo os K_{ATP} foram desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa e mostraram relação direta entre a abertura destes canais e a antinocicepção periférica (Rodrigues e Duarte, 2000; Soares e Duarte, 2001; Reis *et al.*, 2011). Neste contexto, nos propusemos a investigar se esses níveis aumentados de GMPc intracelular, induzidos por L-málico, modulariam o efluxo de potássio da célula nervosa. Para tanto, utilizamos tetraetilamônio (TEA) um bloqueador não-seletivo de canais para K^+ (Cook e Quast, 1990) e pudemos observar que há envolvimento destes canais, uma vez que o TEA foi capaz de reverter totalmente a antinocicepção periférica induzida por L-málico. Confirmado o envolvimento de canais para K^+ , buscamos saber se os canais sensíveis ao ATP estariam implicados nesta via de sinalização. Para tal, utilizamos a glibenclamida, um potente bloqueador de canais para K^+ sensíveis ao ATP (Schimid-Antomarchi *et al.*, 1990). Glibenclamida, assim como TEA, foi capaz de reverter totalmente o efeito antinociceptivo da droga em estudo, sugerindo que os canais K_{ATP} estariam envolvidos nessa cascata intracelular disparada por L-málico, gerando antinocicepção. Respostas semelhantes foram encontradas em outros trabalhos envolvendo substâncias exógenas naturais (Veloso *et al.*, 2015, Romero *et al.*, 2012b).

Para concluir, conforme sintetizado na figura 42, propomos que o extrato da planta estudada, a *Cissus gongylodes* (Baker) Planch., quando administrado via oral, tem potencial analgésico para tratamento da dor nociceptiva, bem como da dor inflamatória periféricas. Dentre suas substâncias, a majoritária é o ácido málico, que também se mostrou eficiente no tratamento da dor periférica. O enantiômero natural L-málico apresentou os melhores resultados, tendo sido capaz de induzir a ativação de receptores canabinoidérgicos CB₁, com possível liberação do endocanabinoide anandamida e consequente ativação da via L-arginina/NO/GMPc. A produção de NO é desencadeada por eNOS e, principalmente, por nNOS, com posterior ativação da enzima guanilato ciclase, consequente aumento dos níveis de GMPc e abertura de canais para K⁺ sensíveis ao ATP. Esse efluxo de íons K⁺ provoca hiperpolarização da célula, dificultando a transmissão do estímulo hiperalgésico, culminando no efeito antinociceptivo visto em L-málico.

Esse estudo corrobora, com emprego de metodologia científica, o conhecimento popular acerca do cupá, planta com tradição terapêutica na qual o uso se aplica à dor. Além disso inova, ao apresentar pela primeira vez, o mecanismo molecular de antinocicepção periférica do ácido L-málico: uma substância há muito conhecida e que agora demonstra ser um potencial agente terapêutico para o controle da dor.

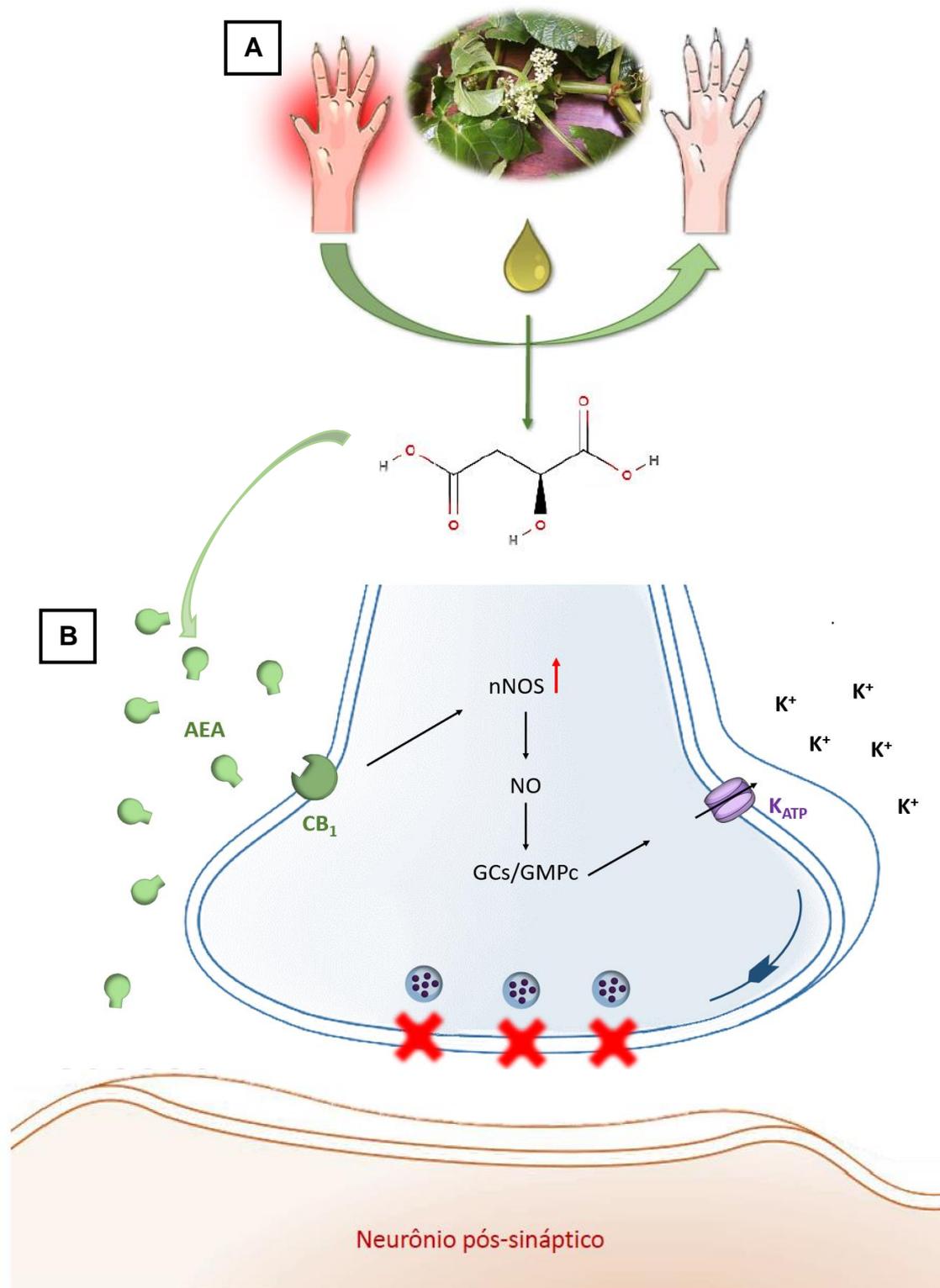


Figura 42: Esquema gráfico que representa o potencial analgésico do extrato de *C. gongylodes* e dos supostos mecanismos de antinociceção do ácido málico. [A] EE administrado sistemicamente evoca antinociceção periférica. Sua substância majoritária é o ácido málico. [B] Ácido málico induz liberação de AEA, que ativa receptores canabinoides CB₁, ativando nNOS, o que dispara a sinalização intracelular da via L-arginina/NO/GMPc/K_{ATP}. O efluxo de potássio da célula diminui a excitabilidade neuronal, a liberação de neurotransmissores e, conseqüentemente, a transmissão do estímulo doloroso.

Referências Bibliográficas



Abraham, G. E., & Flechas, J. D. (1992). Management of fibromyalgia: rationale for the use of magnesium and malic acid. *Journal of Nutritional Medicine*, 3(1), 49-59.

Abrams, D. I., and Guzman, M. (2015). Cannabis in cancer care. *Clin. Pharmacol. Ther.* 97, 575–586.

Alger, B. E. (2002). Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: Focus on endocannabinoids, *Progress in Neurobiology*.

Alvarez, G. O. (2005). O ritual da tocandira entre os Sateré-Mawé: aspectos simbólicos do waumat (No. 369). Departamento de Antropologia, Universidade de Brasília.

Alves, D. P., & Duarte, I. D. (2002). Involvement of ATP-sensitive K⁺ channels in the peripheral antinociceptive effect induced by dipyrone. *European journal of pharmacology*, 444(1-2), 47-52.

Andlauer, W., & Fürst, P. (2002). Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. *Food Research International*, 35(2-3), 171-176.

Azad, S. C. et al. (2001) 'Differential role of the nitric oxide pathway on Δ^9 -THC-induced central nervous system effects in the mouse', *European Journal of Neuroscience*, 13(3), pp. 561–568.

Bardellini, E., Amadori, F., Conti, G., Veneri, F., & Majorana, A. (2019). Effectiveness of a spray containing 1% malic acid in patients with xerostomia induced by graft-versus-host disease. *Medicina oral, patologia oral y cirugía bucal*, 24(2), e190.

Baune, B. T. et al. (2008) 'Combined effects of major depression, pain and somatic disorders on general functioning in the general adult population', *Pain*, 138(2), pp. 310–317.

Bredt, D.S., Ferris, C.D., and Snyder, S.H. (1992). Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites. *J. Biol. Chem.* 267, 10976–10981.

Briskin, D. P. (2000) 'Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health', *Plant Physiology*, 124(2), pp. 507–514.

Cerqueira, N. F., & Yoshida, W. B. (2002). Óxido nítrico: revisão. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 17(6), 417-423.

Chen, Y., Boettger, M. K., Reif, A., Schmitt, A., Üçeyler, N., & Sommer, C. (2010). Nitric oxide synthase modulates CFA-induced thermal hyperalgesia through cytokine regulation in mice. *Molecular pain*, 6(1), 1-11.

Chicca, A., Marazzi, J., & Gertsch, J. (2012). The antinociceptive triterpene β -amyrin inhibits 2-arachidonoylglycerol (2-AG) hydrolysis without directly targeting cannabinoid receptors. *British journal of pharmacology*, 167(8), 1596-1608.

Cook, N.S., Quast, U., 1990. Potassium channel pharmacology. In: Cook, N.S. (Ed.), *Potassium Channels: Structure, Classification, Function, and Therapeutic Potential*. Ellis Horwood, Chichester, pp. 181– 255.

Cox, J. J. et al. (2006) 'An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain', *Nature*, 444(7121), pp. 894–898.

Cox, J. J. et al. (2010) 'Congenital insensitivity to pain: Novel SCN9A missense and in-frame deletion mutations', *Human Mutation*, 31(9), pp. 1670–1686.

Cury, Y. et al. (2011) 'Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system', *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*. Elsevier Inc., 25(3), pp. 243–254.

De Petrocellis, L. et al. (2000) 'Overlap between the ligand recognition properties of the anandamide transporter and the VR1 vanilloid receptor: Inhibitors of anandamide uptake with negligible capsaicin-like activity', *FEBS Letters*, 483(1), pp. 52–56.

Deutsch, D. G., Lin, S., Hill, W. A. G., Morse, K. L., Salehani, D., Arreaza, G., ... & Makriyannis, A. (1997). Fatty acid sulfonyl fluorides inhibit anandamide metabolism and bind to the cannabinoid receptor. *Biochemical and biophysical research communications*, 231(1), 217-221.

Devane, W. A.; Hanus, L; Breuer, A.; Pertwee, R. G.; Stevenson, L. A.; Griffin, G.; Gibson, D.; Mandelbaum, A.; Etinger, A.; Mechoulam, R. (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. 258: 1946-1949.

Di Marzo, V. (2008). Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nature Reviews Drug Discovery*. 7:438-55.

Di Marzo, V. and Fontana, A. (1995) 'Anandamide, an endogenous cannabinomimetic eicosanoid: "Killing two birds with one stone"', *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 53(1), pp. 1–11.

Diakou, Paraskevi et al. Phosphoenolpyruvate carboxylase during grape berry development: protein level, enzyme activity and regulation. *Functional Plant Biology*, v. 27, n. 3, p. 221-229, 2000.

Dickenson, A. H. (1991) 'Mechanisms of the analgesic actions of opiates and opioids', *British Medical Bulletin*, 47(3), pp. 690–702.

Duarte, I. D. G., Lorenzetti, B. B., & Ferreira, S. H. (1990). Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. *European journal of pharmacology*, 186(2-3), 289-293.

Duarte, I. D., & Ferreira, S. H. (1992). The molecular mechanism of central analgesia induced by morphine or carbachol and the L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *European journal of pharmacology*, 221(1), 171-174.

Dubuisson, D.; Dennis, S. G. (1977) The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*. 4 (2): 161-174.

Dunham, N. W.; Miya, T. S. (1957) A note on a simple apparatus for detection of neurological deficit in rats and mice. *Journal of the American Pharmaceutical Association*. 46 (3): 208–209.

Edwards, R. R. et al. (2016) 'The Role of Psychosocial Processes in the Development and Maintenance of Chronic Pain', *Journal of Pain*. Elsevier Inc, 17(9), pp. T70–T92.

Esplugues, J. V. (2002). NO as a signalling molecule in the nervous system. *British journal of pharmacology*, 135(5), 1079-1095.

Fabro, S., Smith, R. L. and Williams, R. T. (1967) 'Toxicity and teratogenicity of optical isomers of thalidomide.', *Nature*, 215(1966), p. 296.

Ferreira, R. C. M. et al. (2018) 'The Involvement of the Endocannabinoid System in the Peripheral Antinociceptive Action of Ketamine', *Journal of Pain*. Elsevier Inc., 19(5), pp. 487–495.

Ferreira, S. H. (1972). Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. *Nature New Biol.*, 240, 200-203.

Fioravanti, C. (2016) 'A maior diversidade de plantas do mundo', *Pesquisa Fapesp*, 241, pp. 42–47.

Fiume, Z. Final report on the safety assessment of Malic Acid and Sodium Malate. *International journal of toxicology*, v. 20, p. 47-55, 2001.

Freire, M. A. M., Guimarães, J. S., Gomes-Leal, W., & Pereira, A. (2009). Pain modulation by nitric oxide in the spinal cord. *Frontiers in neuroscience*, 3, 24.

Fürst, S. (1999) 'Transmitters involved in antinociception in the spinal cord', *Brain Research Bulletin*, 48(2), pp. 129–141.

Galstyan, A., Markman, J. L., Shatalova, E. S., Chiechi, A., Korman, A. J., Patil, R., ... & Ljubimova, J. Y. (2019). Blood–brain barrier permeable nano immunoconjugates induce local immune responses for glioma therapy. *Nature communications*, 10(1), 1-13.

Gatley, S. J. et al. (1996) '123I-labeled AM251: A radioiodinated ligand which binds in vivo to mouse brain cannabinoid CB1 receptors', *European Journal of Pharmacology*, 307(3), pp. 331–338.

Golan, D. E. et al. (2014) *Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia*. 3a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Gureje, O.; Korff, M. V.; Simon, G. E.; Gater, R. (no date) 'Persistent pain and well-being: a World Health Organization study in primary care.'

Guy, G. W.; Whittle, B. A.; Robson, P. J. (2004) *The medicinal uses of cannabis and cannabinoids*. London: Pharmaceutical Press, 448 p.

Hamza, M. et al. (2010) 'Nitric oxide is negatively correlated to pain during acute inflammation', *Molecular Pain*, 6, pp. 1–10.

Haq F., Ahmad H., Ullah R., Iqbal Z. (2012) Species diversity and ethno botanical classes of the flora of Allai valley District Battagram, Pakistan. 2(4):111–123.

Herkenham, M. (1995). Localization of cannabinoid receptors in brain and periphery. *Cannabinoid receptors*.

Hill, K. P., Palastro, M. D., Johnson, B., and Ditre, J. W. (2017). Cannabis and pain: a clinical review. *Cannabis Cannabinoid Res.* 2, 96–104.

Hillard, C. J. and Jarrahan, A. (2003) 'Cellular accumulation of anandamide: Consensus and controversy', *British Journal of Pharmacology*, 140(5), pp. 802–808.

Holden, J. E., Jeong, Y., Forrest, J. M., 2005. The endogenous opioid system and clinical pain management. *AACN Clin Issues* 16, 291-301.

Hosobuchi, Y.; Adams, J. E.; Linchitz, R. Pain relief by electrical stimulation of the central gray matter in humans and its reversal by naloxone. *Science*. 197: 183-185, 1977.

Howlett, A. C. (2002) 'The cannabinoid receptors', *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 68–69, pp. 619–631.

Howlett, A. C., Johnson, M. R., Melvin, L. S., & Milne, G. M. (1988). Nonclassical cannabinoid analgetics inhibit adenylate cyclase: development of a cannabinoid receptor model. *Molecular pharmacology*, 33(3), 297-302.

Hunskar, S.; Fasmer, O. B.; Hole, K. (1985) Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *Journal of Neuroscience Methods*. 14 (1): 69-76, 1985.

Indo, Y. et al. (2001) 'Congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA): Novel mutations of the TRKA (NTRK1) gene, a putative uniparental disomy, and a linkage of the mutant TRKA and PKLR genes in a family with CIPA and pyruvate kinase deficiency', *Human Mutation*, 18(4), pp. 308–318.

Irikura, K. et al. (1994) 'L-NNA decreases cortical hyperemia and brain cGMP levels following CO₂ inhalation in Sprague-Dawley rats', *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 267(2 36-2).

Jones, J. D. et al. (2008) 'Cannabinoid receptor-mediated translocation of NO-sensitive guanylyl cyclase and production of cyclic GMP in neuronal cells', *Neuropharmacology*, 54(1), pp. 23–30.

Julius, D., & Basbaum, A. I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413(6852), 203-210.

Kano, M. (2014). Control of synaptic function by endocannabinoid-mediated retrograde signaling. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 90, 235–250.

Kawabata, A., Nishimura, Y. and Takagi, H. (1992) 'l-Leucyl-l-arginine, naltrindole and d-arginine block antinociception elicited by l-arginine in mice with carrageenin-induced hyperalgesia', *British Journal of Pharmacology*, 107(4), pp. 1096–1101.

Kempen, G. I. J. M. et al. (1997) 'Adaptive responses among Dutch elderly: The impact of eight chronic medical conditions on health-related quality of life', *American Journal of Public Health*, 87(1), pp. 38–44.

Kerr, W. E., Posey, D. A. and Wolter Filho, W. (1978) 'Cupá, ou cipó-babão, alimento de alguns índios amazônicos', *Acta Amazonica*, 8(4), pp. 702–705.

Kieffer, B. L. (1999) 'Opioids: First lessons from knockout mice', *Trends in Pharmacological Sciences*, 20(1), pp. 19–26.

Klaumann, P. R., Wouk, A. F. P. F. and Sillas, T. (2008) 'Patofisiologia da dor', *Archives of Veterinary Science*, 13(1), pp. 1–12.

Knowles, R. G. and Moncada, S. (1994) 'Nitric oxide synthases in mammals', *Biochemical Journal*, 298(2), pp. 249–258.

Knowles, R. G., Palacios, M., Palmer, R. M., & Moncada, S. (1989). Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction

mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(13), 5159-5162.

Koehn, F. E. and Carter, G. T. (2005) 'The evolving role of natural products in drug discovery', *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(3), pp. 206–220.

Kolodny, A., Courtwright, D. T., Hwang, C. S., Kreiner, P., Eadie, J. L., Clark, T. W., Alexander, G. C., 2015. The prescription opioid and heroin crisis: a public health approach to an epidemic of addiction. *Annual review of public health* 36, 559-574.

Kuribara, H., Higuchi, Y., & Tadokoro, S. (1977). Effects of central depressants on rota-rod and traction performances in mice. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 27(1), 117-126.

LaRiccia, P. J., Farrar, J. T., Sammel, M. D., & Gallo, J. J. (2008). The effect of OPC Factor™ on energy levels in healthy adults ages 45–65: a phase IIb randomized controlled trial. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 14(6), 723-732.

Lawson, S. N. (2002) Phenotype and function of somatic primary afferent nociceptive neurones with C, A δ or A α/β fibres. *Experimental Physiology*. 87(2): 239-244.

Lima, V. L. E. (1997) 'Os fármacos e a quiralidade: uma breve abordagem', *Química Nova*, 20(6), pp. 657–663.

Lin, L. H., Taktakishvili, O., & Talman, W. T. (2007). Identification and localization of cell types that express endothelial and neuronal nitric oxide synthase in the rat nucleus tractus solitarii. *Brain research*, 1171, 42–51.

Lipina, C. and Hundal, H. S. (2017) 'The endocannabinoid system: "NO" longer anonymous in the control of nitrenergic signalling?', *Journal of Molecular Cell Biology*, 9(2), pp. 91–103.

Llorens, J. A. M. (2012). Quiralidad y actividad óptica en las moléculas orgánicas. RiuNet repositório UPV. Universitat Politècnica de València.

Long, J. Z. et al. (2009) 'Dual blockade of FAAH and MAGL identifies behavioral processes regulated by endocannabinoid crosstalk in vivo', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(48), pp. 20270–20275.

Lopes, B. P. C. S. (2017). Estudo etnobotânico de plantas medicinais na Terra Indígena Kaxinawá de Nova Olinda, município de Feijó, Acre.

Mackinnon, R., 2003. Potassium channels. *FEBS Lett.* 555, 62– 65.

Mark, M. D., & Herlitze, S. (2000). G-protein mediated gating of inward-rectifier K⁺ channels. *European Journal of Biochemistry*, 267(19), 5830-5836.

Marzo, V. Di and Bisogno, T. (2001) 'Anandamide : some like it hot', 22(7), pp. 346–349.

Massone, F. (2003). *Anestesiologia veterinária: farmacologia e técnicas*. Guanabara-Koogan.

Matsuda, L. A. et al. (1990) 'Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA', *Nature*, 346(6284), pp. 561–564.

McBride, W. G. (1961) "Thalidomide and Congenital Abnormalities." Letter to the Editor. *The Lancet* 2: 1358.

McDonald, L. J., & Murad, F. (1996). Nitric oxide and cyclic GMP signaling. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 211(1), 1-6.

McMahon, S. and Koltzenburg, M. (1990) 'The changing role of primary afferent neurones in pain', *Pain*, 43(3), pp. 269–272.

Mechoulam, R. et al. (1995) 'Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors', *Biochemical Pharmacology*, 50(1), pp. 83–90.

Meira, M. B. V. (2009). Sobre estruturas etárias e ritos de passagem. *Ponto-e-Vírgula: Revista de Ciências Sociais*, (5).

Melzack, R., & Wall, P. D. (1965). Pain mechanisms: a new theory. *Science*, 150(3699), 971-979.

Millan, M. J. (1999) 'The induction of pain: An integrative review', *Progress in Neurobiology*, 57(1), pp. 1–164.

Millan, M. J. (2002) 'Descending control of pain', *Progress in Neurobiology*, 66(6), pp. 355–474.

Miyamoto, T., Dubin, A. E., Petrus, M. J., & Patapoutian, A. (2009). TRPV1 and TRPA1 mediate peripheral nitric oxide-induced nociception in mice. *PLoS one*, 4(10), e7596.

Moncada, S., Radomski, M. and Palmer, R. (1988) 'Endothelium-derived relaxing factor. Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function', *Biochemical Pharmacology*, 37(13), pp. 2495–2501.

Morisset, V. et al. (2001) 'Possible mechanisms of cannabinoid-induced antinociception in the spinal cord', *European Journal of Pharmacology*, 429(1–3), pp. 93–100.

Muccioli, G. G., Sia, A., Muchowski, P. J., & Stella, N. (2009). Genetic manipulation of palmitoylethanolamide production and inactivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*, 4(6), e5942.

Munro, S., Thomas, K. L. and Abu-Shaar, M. (1993) 'Molecular characterization

- of a peripheral receptor for cannabinoids', *Nature*, 365(6441), pp. 61–65.
- Navarro, F. F. (2009). *Cissus gongylodes: caracterização farmacognóstica e investigação de aspectos preliminares da segurança da utilização de extratos aquosos das folhas e caules*. (Tese)
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2018). *Princípios de Bioquímica de Lehninger-7*. Artmed Editora.
- Niu, J., Huang, D., Zhou, R., Yue, M., Xu, T., Yang, J., ... & Zeng, J. (2017). Activation of dorsal horn cannabinoid CB2 receptor suppresses the expression of P2Y 12 and P2Y 13 receptors in neuropathic pain rats. *Journal of neuroinflammation*, 14(1), 1-12.
- Ocaña, M. et al. (2004) 'Potassium channels and pain: Present realities and future opportunities', *European Journal of Pharmacology*, 500(1-3 SPEC. ISS.), pp. 203–219.
- Okada, M. (2009). *Dor: evolução histórica dos conhecimentos. Dor: Princípios e prática*, 27.
- Oliveira, C. C., Veloso, C. C., Ferreira, R. C. M., Lage, G. A., Pimenta, L. P. S., Duarte, I. D. G., ... & de Castro Perez, A. (2017). Peltatoside isolated from *Annona crassiflora* induces peripheral antinociception by activation of the cannabinoid system. *Planta medica*, 83(03/04), 261-267.
- Oliveira, C. da C. et al. (2019) 'Evidence for the involvement of opioid and cannabinoid systems in the peripheral antinociception mediated by resveratrol', *Toxicology and Applied Pharmacology*. Elsevier Inc, 369, pp. 30–38.
- Orlando, R. M. (2007) 'Importância Farmacêutica De Fármacos Quirais', *Revista Eletrônica de Farmácia*, 4(1), pp. 8–14.
- Ortiz, R. W. P. (2018). *Estudo da síntese química do ácido DL-málico por hidratação do ácido fumárico*. Tese (UFPR).

Patty. (1981). *Patty's industrial hygiene and toxicology*, 3rd ed., 4937, 4941–4942. New York: Wiley and Sons.

Petrocchi, J. A., de Almeida, D. L., Paiva-Lima, P., Queiroz-Junior, C., Caliari, M. V., Duarte, I. D. G., & Romero, T. R. L. (2019). Peripheral antinociception induced by ketamine is mediated by the endogenous opioid system. *European journal of pharmacology*, 865, 172808.

Petrovska, B. B. (2012) 'Historical review of medicinal plants' usage', *Pharmacognosy Reviews*, 6(11), pp. 1–5.

Piomelli, D. (2003) 'The molecular logic of endocannabinoid signalling', *Nature Reviews Neuroscience*, 4(11), pp. 873–884.

Pirker, H. et al. (2012) 'Transformation of traditional knowledge of medicinal plants: The case of Tyroleans (Austria) who migrated to Australia, Brazil and Peru', *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 8.

Poblete, I. M. et al. (2005) 'Anandamide elicits an acute release of nitric oxide through endothelial TRPV1 receptor activation in the rat arterial mesenteric bed', *Journal of Physiology*, 568(2), pp. 539–551.

Randall, L. O. and Selitto, J. J. (1957) 'A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue.', *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie*, 111(4), pp. 409–419.

Rates, S. M. K. (2001) 'Plants as source of drugs', *Toxicon*, 39(5), pp. 603–613.

Reis, G. M. L. et al. (2011) 'Endogenous cannabinoid receptor agonist anandamide induces peripheral antinociception by activation of ATP-sensitive K⁺ channels', *Life Sciences. Elsevier B.V.*, 88(15–16), pp. 653–657.

Rey, R., Wallace, L. E., Cadden, J. A., Cadden, S. W., & Brieger, G. H. (1995). *The history of pain*. Cambridge, MA: Harvard University Press.

Reynolds, D. (1969) 'Surgery in the Rat during Electrical Analgesia Induced by Focal Brain Stimulation', *Science*, 164(3878), pp. 444–445.

Rodrigues, A. R. A. and Duarte, I. D. G. (2000) 'The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K⁺ channels', *British Journal of Pharmacology*, 129(1), pp. 110–114.

Rodrigues, W. (2016). Competitividade e mudança institucional na cadeia produtiva de plantas medicinais no Brasil. *Interações (Campo Grande)*, 17(2), 267-277.

Romero, T. R. L., & Duarte, I. D. G. (2012a). N-palmitoyl-ethanolamine (PEA) induces peripheral antinociceptive effect by ATP-sensitive K⁺-channel activation. *Journal of pharmacological sciences*, 118(2), 156-160.

Romero, T. R., Galdino, G. S., Silva, G. C., Resende, L. C., Perez, A. C., Cortes, S. F., & Duarte, I. D. (2012b). Involvement of the L-arginine/nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway in peripheral antinociception induced by N-palmitoyl-ethanolamine in rats. *Journal of neuroscience research*, 90(7), 1474-1479.

Romling, U., Galperin, M. Y. and Gomelsky, M. (2013) 'Cyclic di-GMP: the First 25 Years of a Universal Bacterial Second Messenger', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(1), pp. 1–52.

Russell, I. J. et al. Treatment of fibromyalgia syndrome with Super Malic: a randomized, double blind, placebo controlled, crossover pilot study. *The Journal of rheumatology*, v. 22, n. 5, p. 953-958, 1995.

Rybalkin, S. D. et al. (2002) 'Regulation of cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) phosphorylation in smooth muscle cells', *Journal of Biological Chemistry*,

277(5), pp. 3310–3317.

Sachs, D., Cunha, F. Q. and Ferreira, S. H. (2004) 'Peripheral analgesic blockade of hypernociception: Activation of arginine/NO/cGMP/protein kinase G/ATP-sensitive K⁺ channel pathway', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(10), pp. 3680–3685.

Safavi-Hemami, H., Brogan, S. E., & Olivera, B. M. (2019). Pain therapeutics from cone snail venoms: From Ziconotide to novel non-opioid pathways. *Journal of proteomics*, 190, 12-20.

Sage, Rowan F. A portrait of the C4 photosynthetic family on the 50th anniversary of its discovery: species number, evolutionary lineages, and Hall of Fame. *Journal of experimental botany*, v. 68, n. 2, p. e11-e28, 2017.

Salem, P. P. O. et al. (2020) 'Anti-urolithiatic and anti-inflammatory activities through a different mechanism of actions of *Cissus gongylodes* corroborated its ethnopharmacological historic', *Journal of Ethnopharmacology*. Elsevier B.V., 253, p. 112655.

Salerno, J. C., Harris, D. E., Irizarry, K., Patel, B., Morales, A. J., Smith, S. M. & Gross, S. S. (1997). An autoinhibitory control element defines calcium-regulated isoforms of nitric oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 272(47), 29769-29777.

Sandkühler, J. The organization and function of endogenous antinociceptive systems. *Progress in Neurobiology*. 50: 49-81, 1996.

Scherer, Rodrigo; RYBKA, Ana Cecília Poloni; GODOY, Helena Teixeira. Determinação simultânea dos ácidos orgânicos tartárico, málico, ascórbico e cítrico em polpas de acerola, açaí e caju e avaliação da estabilidade em sucos de caju. *Química Nova*, v. 31, n. 5, p. 1137-1140, 2008.

Schmid-Antomarchi, H., Amoroso, S., Fosset, M., & Lazdunski, M. (1990). K⁺ channel openers activate brain sulfonylurea-sensitive K⁺ channels and block neurosecretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(9), 3489-3492.

Shepherd, G. J. and Giuliatti, A. M. (2002) *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo Online*.

Shibata, M. et al. (1989) 'Modified formalin test: characteristic biphasic pain response', *Pain*, 38(3), pp. 347–352.

Shieh, C.C., Coghlan, M., Sullivan, J.P., Gopalakrishnan, M., 2000. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol. Rev.* 52, 557– 594.

Silverthorn, D. U. (2017) *Fisiologia Humana - Uma Abordagem Integrada*. 7a Edição. Porto Alegre: Artmed Editora Ltda.

Soares, A. C. and Duarte, I. D. G. (2001) 'Dibutyryl-cyclic GMP induces peripheral antinociception via activation of ATP-sensitive K⁺ channels in the rat PGE₂-induced hyperalgesic paw', *British Journal of Pharmacology*, 134(1), pp. 127–131.

Stefano, G. B., Salzet, M., Magazine, H. I., & Bilfinger, T. V. (1998). Antagonism of LPS and IFN- γ induction of iNOS in human saphenous vein endothelium by morphine and anandamide by nitric oxide inhibition of adenylate cyclase. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 31(6), 813-820.

Tang, S. C. and Yang, J. H. (2018) 'Dual effects of alpha-hydroxy acids on the skin', *Molecules*, 23(4), pp. 1–12.

Taniguchi, Y., Tonai-Kachi, H., & Shinjo, K. (2006). Zaprinast, a well-known cyclic guanosine monophosphate-specific phosphodiesterase inhibitor, is an agonist for GPR35. *FEBS letters*, 580(21), 5003-5008.

Tarselli, M. A., Raehal, K. M., Brasher, A. K., Streicher, J. M., Groer, C. E., Cameron, M. D., ... & Micalizio, G. C. (2011). Synthesis of conolidine, a potent non-opioid analgesic for tonic and persistent pain. *Nature chemistry*, 3(6), 449-453.

Tucker, G.A. (1993) Introduction. In 'Biochemistry of fruit ripening' (Eds GB Seymour, JE Taylor and GA Tucker) pp. 3–43. (Chapman and Hall: London).

Ullah R., Ahmad S., Atiq A., et al. Quantification and antibacterial activity of flavonoids in coffee samples. 2015;12(4): p. 84.

Van Ree, J. M. et al. (2000) 'Endogenous opioids and reward', *European Journal of Pharmacology*, 405(1–3), pp. 89–101.

Vanderah, T. W. (2007) 'Pathophysiology of Pain', *Medical Clinics of North America*, 91(1), pp. 1–12.

Vanegas, H. and Schaible, H. G. (2001) 'Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord', *Progress in Neurobiology*, 64(4), pp. 327–363.

Veloso, C. C., Ferreira, R. C. M., Rodrigues, V. G., Duarte, L. P., Klein, A., Duarte, I. D., ... & Perez, A. C. (2018). Tingenone, a pentacyclic triterpene, induces peripheral antinociception due to cannabinoid receptors activation in mice. *Inflammopharmacology*, 26(1), 227-233.

Veloso, C., Rodrigues, V. G., Ferreira, R. C. M., Duarte, L. P., Klein, A., Duarte, I. D., ... & de Castro Perez, A. (2015). Tingenone, a pentacyclic triterpene, induces peripheral antinociception due to NO/cGMP and ATP-sensitive K⁺ channels pathway activation in mice. *European journal of pharmacology*, 755.

Vergara, C., Latorre, R., Marrion, N. V., & Adelman, J. P. (1998). Calcium-activated potassium channels. *Current opinion in neurobiology*, 8(3), 321-329.

Watkins, L. R. and Mayer, D. J. (1982) 'Organization of endogenous opiate and nonopiate pain control systems', *Science*, 216(4551), pp. 1185–1192.

Woodhams, S. G. et al. (2017) 'The cannabinoid system and pain', *Neuropharmacology*. Elsevier Ltd, 124, pp. 105–120.

Woolf, C. J. (2004) 'Review Pain: Moving from Symptom Control toward Mechanism-Specific', pp. 441–451.

Woolf, C. J. (2010) 'What is this thing called pain?', *Journal of Clinical Investigation*, 120(11), pp. 3742–3744.

Xu, J., Zhao, Q., Wei, L., Yang, Y., Xu, R., Yu, N., & Zhao, Y. (2015). Phytochemical composition and antinociceptive activity of *Bauhinia glauca* subsp. *hupehana* in rats. *PLoS One*, 10(2), e0117801.

Zeni, A. L. B. et al. (2017) 'Utilização de plantas medicinais como remédio caseiro na Atenção Primária em Blumenau, Santa Catarina, Brasil', *Ciencia e Saude Coletiva*, 22(8), pp. 2703–2712.

Anexos



ANEXO I



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
Cadastro nº A683AE3

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A683AE3**
 Usuário: **Universidade Federal de Minas Gerais**
 CPF/CNPJ: **17.217.985/0001-04**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie**Cissus gongylodes**

Título da Atividade: **Investigação fitoquímica de Cissus gongylodes (Baker) Planch**

Equipe

Lúcia Pinheiro Santos Pimenta	Universidade Federal de Minas Gerais
Natália Andrade Mattiello	Universidade Federal de Minas Gerais
Marla O. Calazans	Universidade Federal de Minas Gerais

Resultados Obtidos**Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação**

Identificação do meio onde foi divulgado: **XXVIII SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2019**
 Identificação do meio onde foi divulgado: **1st Congress SisBioSus, 2019: ANTINOCICEPT**

Data do Cadastro: **27/08/2020 20:33:44**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **18:00** de **28/08/2020**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**

ANEXO II



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 357/2019**Título do projeto:** Avaliação da atividade antinociceptiva de *Cissus gongylodes* (Baker) Planch, em camundongos**Finalidade:** Pesquisa**Pesquisador responsável:** Andrea de Castro Perez**Unidade:** Instituto de Ciências Biológicas**Departamento:** Departamento de Farmacologia**Situação atual:** **Decisão Final - Aprovado**

Aprovado na reunião do dia 02/03/2020. Validade: 02/03/2020 à 01/03/2025.
Belo Horizonte, 03/03/2020.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO III



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 98/2020**Título do projeto:** Avaliação da atividade antinociceptiva do Ácido Málico em camundongos**Finalidade:** Pesquisa**Pesquisador responsável:** Andrea de Castro Perez**Unidade:** Instituto de Ciências Biológicas**Departamento:** Departamento de Farmacologia**Situação atual:** [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião "on line" do dia 08/06/2020. Validade: 08/06/2020 à 07/06/2025.
Belo Horizonte, 08/06/2020.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br