

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

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO
DA FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA E DA SUBSTÂNCIA ISOLADA,
PELTATOSÍDEO, PROVENIENTES DAS FOLHAS DE *ANNONA*
***CRASSIFLORA* MART. EM CAMUNDONGOS**

Cristina da Costa Oliveira

BELO HORIZONTE

2015

Cristina da Costa Oliveira

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO
DA FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA E DA SUBSTÂNCIA ISOLADA,
PELTATOSÍDEO, PROVENIENTES DAS FOLHAS DE *ANNONA
CRASSIFLORA* MART. EM CAMUNDONGOS**

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 Mestre em Ciências Biológicas, com área de concentração em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Andrea de Castro Perez.

Co-orientador: Prof. Dr. André Klein.

BELO HORIZONTE

2015

043

Oliveira, Cristina da Costa.

Avaliação dos efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório da fração hidroalcoólica e da substância isolada, peltatosídeo, provenientes das folhas de *Annona crassiflora* Mart. em camundongos [manuscrito] / Cristina da Costa Oliveira. - 2015.

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

Orientadora: Andrea de Castro Perez. Co-orientador: André Klein.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

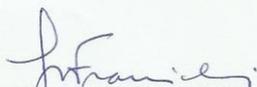
1. Araticum - Teses. 2. Quercetina - Teses. 3. Peltatosídeo. 4. Antinocicepção, - Teses. 5. Canabinoides - Teses. 6. Inflamação - Teses. 7. CXXL8. 8. Fisiologia - Teses. I. Perez, Andrea de Castro. II. Klein, André. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612

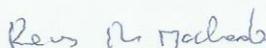
**"AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTINOCICEPTIVO E ANTI-
INFLAMATÓRIO DA FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA E DA
SUBSTÂNCIA ISOLADA, PELTATOSÍDEO, PROVENIENTES DAS
FOLHAS DE ANNONA CRASSIFLORA MART. EM
CAMUNDONGOS"**

CRISTINA DA COSTA OLIVEIRA

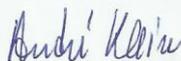
Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 13 de março de 2015, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



PROFA. DRª. JANETTI NOGUEIRA DE FRANCISCHI
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROF. DR. RENES DE RESENDE MACHADO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROF. DR. ANDRÉ KLEIN
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
CO-ORIENTADOR



PROFª. DRª. ANDREA DE CASTRO PEREZ
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADORA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG
Belo Horizonte, 13 de março de 2015

“Sem sonhos, as perdas se tornam insuportáveis, pedras no caminho se tornam montanhas, fracassos se transformam em golpes fatais.

Mas, se você tiver grandes sonhos... Seus erros produzirão crescimento, seus desafios produzirão oportunidades, seus medos produzirão coragem!”

Augusto Cury

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus por me proporcionar esta grande e incrível oportunidade.

À Profa. Andrea de Castro Perez, por acreditar em mim e me abrir estas portas que mudaram para sempre, e para melhor, o rumo de minha vida.

Ao Prof. Igor Dimitri Gama Duarte, por ser um exemplo de pessoa, sempre acolhendo e incentivando todos os alunos que têm a sorte de cruzar seu caminho.

Ao Prof. Thiago Roberto Lima Romero, por seu brilhantismo e entusiasmo facilmente notáveis, exemplo a ser seguido por todos nós.

Ao Prof. André Klein, por me receber tão bem em seu laboratório e pela disposição em ajudar sempre, fundamental para a realização deste trabalho.

À Profa. Janetti Nogueira de Francischi, por todas as sugestões e críticas construtivas, essenciais para o aprimoramento deste trabalho.

À Profa. Lúcia Pinheiro Santos Pimenta por confiar a mim o fruto de um lindo trabalho, permitindo que eu desse continuidade a uma pesquisa tão relevante dentro do atual quadro social brasileiro.

A todos os professores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas e do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas, pela seriedade e competência.

Ao meu amado pai, José Arimatéia de Oliveira, por me servir de exemplo e de inspiração, e que apesar de não estar presente fisicamente, sei que de alguma forma sempre esteve e estará presente em minha vida.

A minha querida mãe, mãezinha/mãezona, Jucélia Venâncio da Costa Oliveira, pelo seu apoio e seu carinho incondicionais.

Ao meu grande irmão, Lucas da Costa Oliveira, por sempre me reanimar com o exemplo da sua dedicação e perseverança.

A minha linda irmã, Luciana da Costa Oliveira, por sempre me contagiar com o seu entusiasmo e a sua alegria.

As minhas companheiras de república, Taíse Mosso Ramos, Bethânia Leite Mansur e Melina Rezende Dias, pela agradável convivência durante tantos anos.

A todos os colegas do Laboratório de Dor e Analgesia, em especial, às doutorandas Renata Cristina Mendes Ferreira e Clarice de Carvalho Veloso, por todos os ensinamentos e pelo grande companheirismo, e às alunas de iniciação científica Carolina Lara Fonseca e Camila Gomes Miranda e Castor, pelas várias vezes que me fizeram companhia durante os experimentos, incluindo finais de semana, feriados e férias, tornando meus dias mais leves com tanta jovialidade e disposição.

A todos os colegas do Laboratório de Inflamação e Dor, em especial à doutoranda Natália Alves de Matos, pelo seu exemplo tanto pessoal quanto profissional e pela nossa estimada amizade.

A todos os colegas do Laboratório de Química Orgânica, em especial à doutoranda Gisele Avelar Lage, por confiar a mim o resultado de seu trabalho de mestrado, permitindo que eu desse continuidade a essa tão importante pesquisa.

Ao pessoal da secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Fisiologia e Farmacologia, Cintya Menezes Fonseca, Nilda Lucas Laurindo e Rodner Rodrigues Madureira de Almeida, pela paciência e atenção.

Aos bioteristas, Jorge Costa Ferreira, Rinaldo do Nascimento e Wellington Palhares, por iniciarem o nosso trabalho antes de nós mesmos ao zelar pelo bem-estar dos nossos animais de experimentação.

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

E, por fim, mas não menos importante, aos animais de experimentação por literalmente doarem suas vidas pelo nosso trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AEA** - araquidonil etanolamina (anandamida)
- AIE** - anti-inflamatório esteroidal
- AINE** - anti-inflamatório não esteroidal
- ANOVA** - análise de variância (do inglês *analysis of variance*)
- BSA** - albumina de soro bovino (do inglês *bovine serum albumin*)
- Ca²⁺** - cálcio
- CB₁** - receptor canabinóide do tipo 1
- CB₂** - receptor canabinóide do tipo 2
- CAPES** - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- CEBIO** - Centro de Bioterismo
- CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais
- CCD** - cromatografia em camada delgada
- CCDC** - cromatografia em camada delgada de celulose
- CCDP** - cromatografia em camada delgada de poliamida
- Cg** - carragenina
- cm** - centímetro (10⁻² m)
- CMC** - carboximetilcelulose
- CNPq** - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- COX** - ciclo-oxigenase
- CXCL8** - ligante de CXC8 (do inglês *chemokine C-X-C motif ligand 8*)
- DAG** - diacilglicerol
- DI₅₀** - dose inibitória de 50%
- DMSO** - dimetilsulfóxido
- DR** - dose relativa
- DRG** - gânglio da raiz dorsal (do inglês *dorsal root ganglion*)
- EPM** - erro padrão da média
- et al** - e outros (do latim *et alii*)
- FAPEMIG** - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
- FAAH** - amido hidrolase de ácidos graxos (do inglês *fatty acid amide hydrolase*)
- g** - gramas
- GABA** - ácido gama-aminobutírico (do inglês *gamma-aminobutyric acid*)

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

ICAM - molécula de adesão intercelular

ICB - Instituto de Ciências Biológicas

ICEx - Instituto de Ciências Exatas

IL - interleucina

i.pl. - intraplantar

i.t. - intratorácica

LFA - antígeno associado à função leucocitária

MAGL - monoacilglicerol lipase

mm - milímetro (10^{-3} m)

n - número de animais experimentais

NADA - N-araquidonoil dopamina

NAPE - N-araquidonoil fosfatidiletanolamina

NF-κB - fator nuclear-Kappa B

NMDA - N-metil-D-aspartato

NP/PEG - difenilboriloxietilamina/polietilenoglicol

OEA - oleiletanolamida

PAG - substância cinzenta periaquedutal (do inglês *periaqueductal gray*)

PBS - tampão fosfato salino (do inglês *phosphate buffered saline*)

PD - pata posterior direita

PE - pata posterior esquerda

PG - prostaglandina

p.o. - via oral (do latim *per os*)

RMN - ressonância magnética nuclear

RVM - medula rostroventromedial (do inglês *rostral ventromedial medulla*)

s.c. - subcutânea

SCP - substância cinzenta periaquedutal

SNC - sistema nervoso central

THC - tetrahydrocannabinol

TNF - fator de necrose tumoral

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

VCAM - molécula de adesão celular vascular

VLA - antígeno de ativação muito tardia (do inglês *very late antigen*)

2-AG - 2-araquidonoil glicerol

°C - graus Celsius ou centígrados

% (p/v) - percentual peso por volume

% (v/v) - percentual volume por volume

µg - micrograma (10^{-6} g)

µl - microlitro (10^{-6} l)

µm - micrometro (10^{-6} m)

Δ- delta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação dos tipos de dor (figura adaptada de Clifford & Woolf, 2004)	23
Figura 2 - Tipos de fibras sensitivas (extraído de Julius & Basbaum, 2001) ...	24
Figura 3 - Representação esquemática da ação dos endocanabinoides (extraído de Saito <i>et al.</i> , 2010)	29
Figura 4 - Sinais e sintomas da inflamação (figura adaptada de Lawrence, 2002)	31
Figura 5 - Cerrado brasileiro (fonte: http://www.espacodocerrado.com/foto02.asp , acessado em 26/03/2013)	37
Figura 6 - Árvore (A), folhas e fruto (B), fruto e polpa (C) e flor (D) de <i>Annona crassiflora</i> Mart. (fonte: http://www.espacodocerrado.com/foto04.asp , acessado em 26/03/2013)	37
Figura 7 - Esquema geral da partição realizada com o extrato etanólico bruto das folhas de <i>Annona crassiflora</i> Mart. (figura adaptada de Lage, 2011)	45
Figura 8 - Estrutura química da quercetina-3-O- β -D-glucopiranosil (1 \rightarrow 6) -O- α -L-arabinosido, conhecida como peltatosideo (extraído de Lage, 2011)	46
Figura 9 - Esquema representativo das ações postuladas de fármacos que atuam no sistema canabinoidérgico	51
Figura 10 - Administração de drogas pelas vias oral (A), subcutânea (B), intratorácica (C) e intraplantar (D)	52
Figura 11 - Suporte contendo câmaras de observação utilizado no teste da formalina.....	54

Figura 12 - Aparelho para estímulo térmico nociceptivo da cauda de camundongos utilizado para o estudo de antinocicepção central	57
Figura 13 - Camundongos sendo submetidos ao teste de coordenação motora	58
Figura 14 - Coleta do lavado pleural em camundongos	60
Figura 15 - Camundongo sendo submetido ao teste de retirada de pata	61
Figura 16 - Parte compressora do aparelho (Ugo Basile, Itália) utilizado para medir o limiar de resposta ao estímulo mecânico aplicado na pata de camundongos	62

RESUMO

Introdução: *Annona crassiflora* Mart. é uma árvore nativa do Cerrado brasileiro, popularmente conhecida como araticum ou marolo, e tem sido utilizada na medicina popular para o tratamento de doenças inflamatórias e dolorosas. A quercetina-3-O- β -D-glycopyranosil(1 \rightarrow 6)-O- α -L-arabinosídeo, conhecida como peltatosídeo, é uma substância natural isolada da fração hidroalcoólica das folhas de *Annona crassiflora* Mart. com possível envolvimento nas ações terapêuticas desta planta. **Objetivo:** Investigar as propriedades analgésicas e anti-inflamatórias *in vivo*, tanto das folhas da *Annona crassiflora* Mart., quanto do peltatosídeo proveniente da mesma. **Métodos:** A fim de avaliar as propriedades analgésicas foram utilizados o teste de formalina com base no método de Dubuisson & Dennis (1977) e adaptado para camundongos por Hunskaar *et al.* (1985), o teste de retirada da cauda (D' Amour & Smith, 1941) e o teste de retirada de pata (Randall & Selitto, 1957). Para analisar o desempenho motor foi utilizado o teste de *rota-rod* (Dunham & Miya, 1957). Além disso, para avaliar as propriedades anti-inflamatórias, o filtrado proveniente da fração hidroalcoólica das folhas de *Annona crassiflora* Mart. foi administrado por via oral 1 hora antes da injeção intratorácica de carragenina (200 μ g), zimosano (200 μ g), LPS (250 ng) ou CXCL8 (60 ng) e o recrutamento de neutrófilos foi avaliado 4 horas após a injeção. A fim de verificar o papel dos endocanabinoides no efeito antinociceptivo periférico do peltatosídeo, utilizamos: (i) VDM11, um inibidor da recaptação de endocanabinoides; (ii) MAFP, um potente inibidor irreversível da anandamida amidase; (iii) e JZL184, um inibidor irreversível da monoacilglicerol lipase (MAGL), a principal enzima responsável por degradar o endocanabinoide 2-araquidonoilglicerol (2-AG). Análise estatística: *One-Way* ou *Two-Way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. **Resultados:** O pré-tratamento oral com o filtrado proveniente da fração hidroalcoólica das folhas de *Annona crassiflora* Mart. (53 mg/kg) reduziu o tempo de lambida, na segunda fase do teste de formalina, a qual representa a dor inflamatória ($P < 0,05$). O tempo de latência (s) do grupo tratado, no teste de retirada da cauda, não foi alterado quando comparado com o grupo controle, sugerindo que não houve efeitos antinociceptivos centrais, provavelmente apenas mecanismos periféricos envolvidos. Uma vez que o teste da formalina e o teste de retirada de cauda

envolvem respostas motoras, o teste do *rota-rod* também foi realizado e verificou-se que o desempenho motor não foi alterado pelo tratamento (53 mg/kg). Além disso, o filtrado da fração hidroalcoólica das folhas de *Annona crassiflora* Mart. inibiu significativamente o recrutamento de neutrófilos para a cavidade pleural induzido por carragenina (200 µg), LPS (250 ng) e CXCL8 (60 ng), mas não por zimosano (200 µg). E, por fim, o peltatosídeo (100 µg/pata) produziu uma inibição local da hiperalgesia induzida por carragenina (200 µg/pata) no teste de retirada de pata. O antagonista para o receptor canabinoide CB₁ (AM251; 80 µg/pata) antagonizou o efeito antinociceptivo induzido pelo peltatosídeo, mas não o antagonista para o receptor canabinoide CB₂ (AM630; 100 µg/pata). VDM11 (2,5 µg/pata), MAFP (0,5 µg/pata) e JZL184 (3,75 µg/pata) não induziram antinocicepção, quando utilizados isoladamente, porém, ao serem administrados juntamente com uma dose intermediária de peltatosídeo (50 µg/pata) foi observada uma potencialização. **Discussão:** Os dados experimentais demonstraram que o filtrado da fração hidroalcoólica das folhas de *Annona crassiflora* Mart. possui atividades anti-inflamatória e antinociceptiva notáveis. Além disso, os resultados sugerem que o peltatosídeo é capaz de induzir analgesia periférica através da ativação de receptores CB₁, com envolvimento de endocanabinoides. **Apoio Financeiro:** CNPq, CAPES e FAPEMIG.

Palavras Chaves: *Annona crassiflora* Mart., Quercetina, Peltatosídeo, Antinocicepção, Sistema Canabinoide, Inflamação, CXCL8.

ABSTRACT

Introduction: *Annona crassiflora* Mart. is a tree native of the Brazilian Cerrado, popularly known as araticum or marolo, and it has been used in folk medicine for the treatment of inflammatory and painful diseases. Quercetin-3-O- β -D-glycopyranosil (1 \rightarrow 6)-O- α -L-arabinoside, known as peltatoside, is a natural substance isolated from the hydroalcoholic fraction of *Annona crassiflora* Mart. leaves with possible involvement in the therapeutic actions of this plant.

Objective: Assess the analgesic and anti-inflammatory actions *in vivo*, both of *Annona crassiflora* Mart. leaves, and the peltatoside from this plant. **Methods:**

To assess the analgesic properties, formalin test was used according to the method of Dubuisson & Dennis (1977) and adapted to mice by Hunskaar *et al.* (1985), the tail-flick test (D'Amour & Smith, 1941) and the paw withdrawal test (Randall & Selitto, 1957) were also utilized. To analyze motor performance, we used the rota-rod test (Dunham & Miya, 1957). Furthermore, to assess the anti-inflammatory properties, the filtrate from the hydroalcoholic fraction of *Annona crassiflora* Mart. leaves was administered orally 1 hour prior to intrathoracic injection of carrageenan (200 μ g), zymosan (200 μ g), LPS (250 ng) or CXCL8 (60 ng) and neutrophil recruitment was assessed 4 hours after injection. In order to determine the role of endocannabinoids in the peripheral antinociceptive effect of peltatoside, we used: (i) VDM11, an endocannabinoid reuptake inhibitor; (ii) MAFP, a potent irreversible inhibitor of anandamide amidase; (iii) and JZL184, an irreversible inhibitor of monoacylglycerol lipase (MAGL), the main enzyme responsible for degrading the endocannabinoid 2-araquidonoilglycerol (2-AG). Statistical analysis: One-Way or Two-Way ANOVA followed by Bonferroni post-test. **Results:** Oral pretreatment with the filtrate from the hydroalcoholic fraction of *Annona crassiflora* Mart. leaves (53 mg/kg) decreased the licking time in the second phase of formalin test, which corresponds to inflammatory pain ($P < 0.05$). The latency time (s) in the treated group in the tail-flick test has not changed, compared to the control group, suggesting that there was not central antinociceptive effects, probably only peripheral mechanisms involved. Once the formalin test and tail flick test involve motor responses, the rota-rod test was also conducted and it was found that the motor performance has not been altered by treatment (53 mg/kg). Moreover, the filtrated from the fraction of hydroalcoholic

Annona crassiflora Mart. leaves significantly inhibited the recruitment of neutrophils into the pleural cavity induced by carrageenan (200 µg), LPS (250 ng) and CXCL8 (60 ng), but not zymosan (200 µg). Finally, the peltatoside (100 µg/paw) produced a local inhibition of hyperalgesia induced by carrageenan (200 µg/paw) in the paw withdrawal test. The antagonist for cannabinoid CB₁ receptor (AM251, 80 µg/paw) antagonized the antinociceptive effect induced by peltatoside, but not the antagonist for cannabinoid CB₂ receptor (AM630, 100 µg/paw). VDM11 (2,5 µg/pata), MAFP (0,5 µg/pata) and JZL184 (3,75 µg/pata) did not induce antinociception, when used alone, however, when administered with an intermediate dose of peltatoside (50 µg/paw) potentiation was observed.

Discussion: The experimental data show that the filtrated from the fraction of hydroalcoholic *Annona crassiflora* Mart. leaves possesses remarkable anti-inflammatory and antinociceptive activities. Furthermore, the results suggest that peltatoside is capable to inducing analgesia through activation of peripheral CB₁ receptors, involving endocannabinoids. **Financial support:** CNPq, CAPES and FAPEMIG.

Word Keys: *Annona crassiflora* Mart., Quercetin, Peltatoside, Antinociception, Cannabinoid System, Inflammation, CXCL8.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Considerações sobre o estudo da dor	21
1.2 Transmissão ascendente da dor	24
1.3 Modulação descendente da dor	26
1.4 Canabinoides e seu papel na analgesia	27
1.5 O processo inflamatório e o recrutamento celular	31
1.6 Plantas medicinais	35
1.7 A família <i>Annonaceae</i> e a espécie <i>Annona crassiflora</i> Mart.	36
2 OBJETIVOS	40
2.2 Objetivo geral	41
2.3 Objetivos específicos	41
3 MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1 Coleta e identificação do material vegetal	44
3.2 Preparo dos extratos das folhas de <i>Annona crassiflora</i> Mart. e obtenção do peltatosídeo.....	44
3.3 Prospecção fitoquímica da fração hidroalcoólica e do filtrado, proveniente desta fração, das folhas de <i>Annona crassiflora</i> Mart.	46
3.4 Animais de experimentação	47
3.5 Drogas e solventes	47
3.5.1 Agentes hiperalgésicos e/ou inflamatórios.....	47
3.5.2 Agentes analgésicos e/ou anti-inflamatórios sob estudo	48
3.5.3 Agentes analgésicos e/ou anti-inflamatórios utilizados como controle	49
3.5.4 Fármacos envolvidos na via canabinoidérgica.....	49
3.5.5 Vias de administração das drogas	51
3.6 Teste da formalina	53
3.6.1 Cálculo da dose capaz de inibir em 50% o tempo de lambida em relação ao controle (DI ₅₀) de F1 e da dose de referência (DR) de F2	55
3.7 Teste de retirada de cauda	56
3.8 Teste de coordenação motora	58
3.9 Recrutamento de neutrófilos na cavidade pleural em modelo de pleurisia	59

3.9.1 Método para coloração de lâminas para contagem diferencial de leucócitos	60
3.10 Teste de retirada da pata	61
3.10.1 Resposta do animal	63
3.10.2 Medida do limiar nociceptivo, hiperalgesia e antinocicepção ...	63
3.10.3 Procedimento experimental	64
3.11 Análise estatística dos resultados	65
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações sobre o estudo da dor

A dor é parte integrante da vida, presente em todo o ciclo desenvolvimental, desde o nascimento até a morte (revisto por Freitas *et al.*, 2009). Com o importante papel de, a princípio, indicar que alguma anormalidade está ocorrendo em nosso organismo, a dor assume prioridade sobre outras demandas cognitivas competitivas e impulsiona o indivíduo a procurar e tentar interromper sua aparente causa. Trata-se de uma função adaptativa de extrema importância, de tal maneira que sua ausência, ocorrente em algumas condições hereditárias (Cox *et al.*, 2006; Indo, 2001), pode levar à repetidas lesões e à uma automutilação inconsciente (Woolf, 2010). Entretanto, sua intensidade e frequência podem exceder suas funções indicadoras e comprometer seriamente a qualidade de vida do indivíduo (Kempen *et al.*, 1997; Gureje *et al.*, 1998).

O conceito de dor já sofreu alterações consideráveis ao longo da história da humanidade. Por muito tempo a dor foi considerada uma forma de punição por faltas cometidas dentro do quadro religioso. O conceito científico de dor foi inicialmente fundamentado por Descartes, em 1664, ao descrever que a dor seria produzida por um sistema de transmissão direto, proveniente dos tecidos lesados na periferia até um centro relacionado à dor no cérebro, e que deveria haver uma associação causal entre o grau de dano tecidual e a intensidade da dor (revisto por Schneider & Karoly, 1983).

Embora a intensidade da agressão tecidual e a magnitude da percepção da dor estejam, de fato, frequentemente relacionadas, é possível ocorrer uma dissociação entre essas duas variáveis (Lima & Almeida, 2002). Em determinadas situações a dor pode ocorrer de forma independente da presença de dano tecidual, por exemplo, em áreas amputadas do corpo (Melzack, 1973).

Introdução

Por outro lado, a presença de lesão tecidual sem a percepção da dor pode ocorrer durante atividades físicas intensas ou em exposições a fatores de estresse e medo (Wall, 1979; Rhudy & Megler, 2000).

Diante de tantas variantes, a dor pode ser classificada em 4 diferentes tipos, conforme mostrado na **Figura 1**: (i) dor nociceptiva ou neurogênica, a qual ocorre mediante um estímulo nocivo e mantém-se enquanto ele estiver presente, funciona como um alerta a estímulos externos, como picadas ou queimaduras, e internos, como infarto do miocárdio (revisto por Costigan *et al.*, 2009); (ii) dor inflamatória, na qual os mediadores inflamatórios podem atuar de diversas formas nos nociceptores promovendo sensibilização e/ou ativação (revisto por Millan, 1999); (iii) dor neuropática, resultante de uma lesão neuronal (revisto por Costigan *et al.*, 2009); (iv) e dor disfuncional ou idiopática, condição dolorosa na qual não há estímulo aparente (revisto por Woolf, 2004).

Tendo em vista a complexidade do estudo da dor, dado que esta pode ser muito mais do que apenas uma reação a um estímulo nocivo, em 1973, John J. Bonica fundou a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), a qual por sua vez, em 1979, definiu a dor como uma “experiência sensorial e emocional desagradável, associada a dano tissular real ou potencial” (Kopf & Patel, 2010).

Na experimentação animal, é difícil analisar o componente emocional da dor. Dessa forma, como os termos dor e analgesia envolvem tanto o componente sensorial, quanto o componente emocional da dor, eles são melhor utilizados ao nos referirmos aos seres humanos (revisto por Woolf, 2004; Klaumann *et al.*, 2008). Já em modelos de experimentação animal, utilizamos preferencialmente os termos nocicepção e antinocicepção, os quais estão relacionados apenas com o reconhecimento de sinais dolorosos pelo sistema nervoso, ou seja, tais

Introdução

termos envolvem apenas o componente sensorial da dor. Entretanto, a presença do componente emocional da dor nos animais não é questionada (Jones, 1992), nós apenas não incluímos tal componente em nossas avaliações.

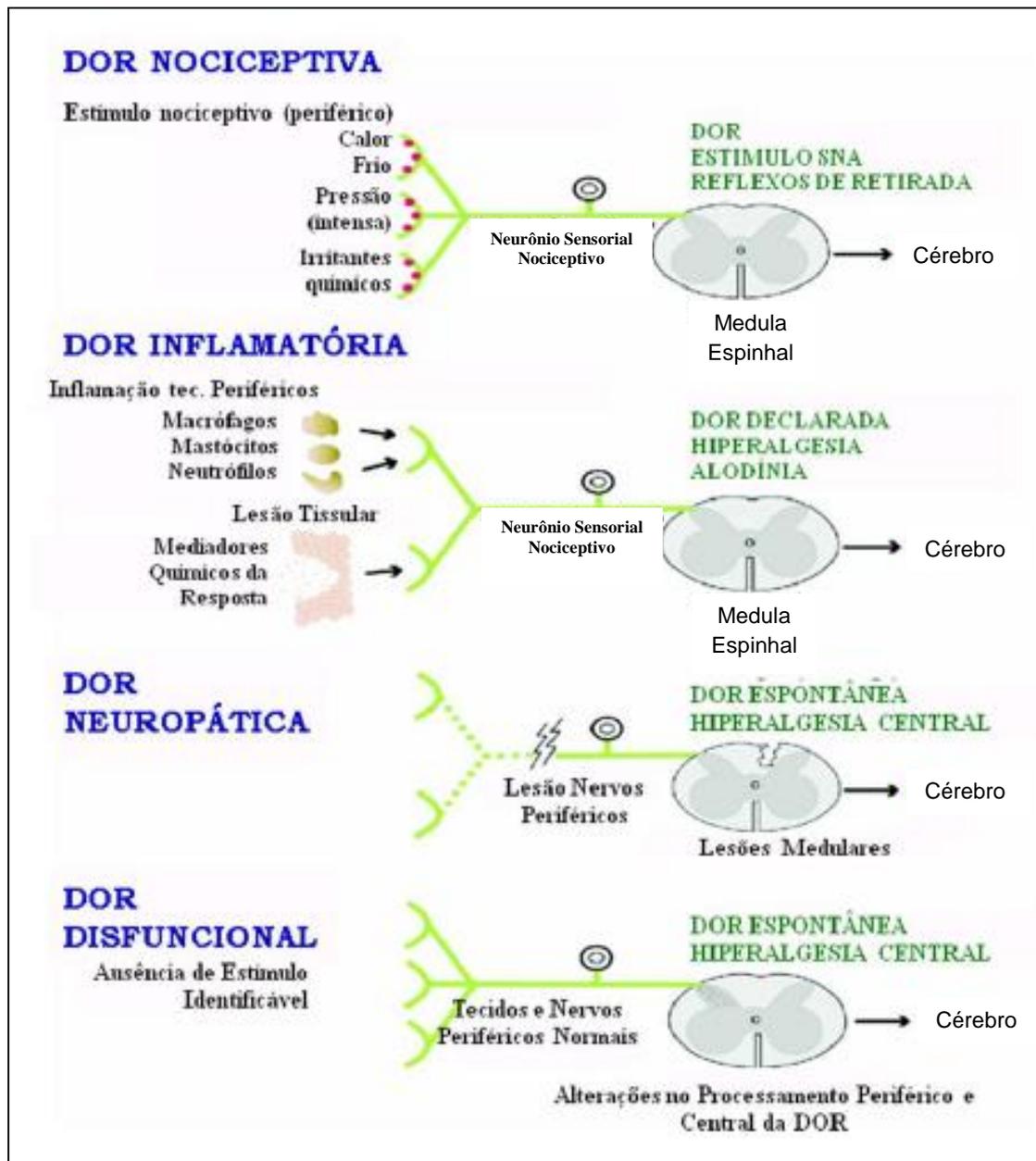


Figura 1 - Classificação dos tipos de dor (figura adaptada de Clifford & Woolf, 2004).

1.2 Transmissão ascendente da dor

Em 1903, Charles Sherrington propôs a existência de um conjunto de terminações nervosas, cuja função seria receber estímulos nocivos.

Introdução

Posteriormente, foi postulada a definição de nociceptores: receptores responsáveis por detectar estímulos potencialmente lesivos (McMahon & Koltzenburg, 1990). O que diferencia os nociceptores de outros receptores sensoriais é o alto limiar dos primeiros, desta forma os nociceptores só são responsivos a estímulos sensoriais mais intensos (revisado por Woolf & Ma, 2007).

Os receptores sensoriais podem ser classificados em três tipos principais com base no diâmetro, estrutura e velocidade de condução (revisado por Millan, 1999): (i) fibras A β e A α , condutoras rápidas mielinizadas; (ii) fibras A δ , condutoras de velocidade intermediária, finamente mielinizadas; (iii) fibras C, condutoras mais lentas amielinizadas (revisado por Fein, 2012) (**Figura 2**).

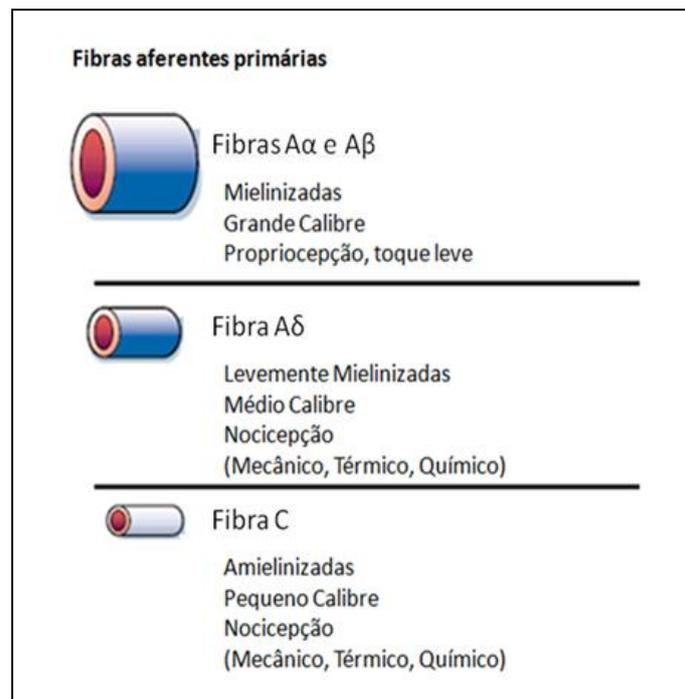


Figura 2 - Tipos de fibras sensitivas (extraída de Julius & Basbaum, 2001).

As fibras A α e A β , a princípio, não são fibras nociceptivas por serem mais sensíveis e dessa forma possuírem um baixo limiar, detectando estímulos não nocivos (Holdcroft & Jaggard, 2005). Porém, estudos já demonstraram que as fibras A β podem apresentar propriedades nociceptivas (Lawson, 2002).

Introdução

As fibras A δ são capazes de responder a estímulos nocivos térmicos e/ou mecânicos, e ao serem ativadas, geram uma sensação dolorosa bem localizada e específica (Meyer *et al.*, 2006). Já as fibras do tipo C são responsivas a estímulos de origem mecânica, térmica e/ou química, e devido a este comportamento multi responsivo são denominadas receptores polimodais. Ao serem ativadas induzem uma sensação dolorosa mais difusa e inespecífica (revisto por Vanderah, 2007). Além disso, algumas fibras do tipo C, denominadas nociceptores silenciosos, não respondem ao estímulo nocivo em condições normais, sendo responsivas apenas após a ocorrência de uma sensibilização, a qual se dá através de uma lesão persistente ou na presença de mediadores inflamatórios específicos (Schmidt *et al.*, 1995).

No processo de transmissão ascendente da dor, neurônios aferentes de primeira ordem projetam-se da periferia até o corno dorsal da medula espinhal, onde realizam sinapses com os neurônios de segunda ordem, os quais ascendem pela medula espinhal até o tálamo, onde realizam sinapses com os neurônios aferentes de terceira ordem, os quais, por sua vez, projetam-se para o córtex cerebral (revisto por Vanderah, 2007), onde os estímulos nociceptivos são processados e interpretados ao nível da consciência (revisto por Fürst, 1999).

1.3 Modulação descendente da dor

Em 1965, Melzack & Wall propuseram a existência de um sistema específico para modulação da dor através da “teoria do portão da dor”, segundo

Introdução

a qual as informações nociceptivas periféricas que chegam ao corno dorsal da medula espinhal não são automaticamente transferidas aos centros superiores, de tal forma que o impulso aferente sofre uma atuação de sistemas moduladores antes que a percepção dolorosa termine de ser evocada.

A existência de um controle endógeno da dor foi fortemente suportada por Reynolds (1969), ao demonstrar que a estimulação elétrica da substância cinzenta periaquedutal (SCP) era capaz de induzir processos analgésicos em ratos e ao mesmo tempo manter suas outras respostas comportamentais inalteradas. Desde então, numerosos sítios antinociceptivos supraespinhais que originam vias descendentes modulatórias para o corno dorsal da medula espinhal têm sido identificados (revisto por Sandkühler, 1996), dentre eles podemos citar o hipotálamo, o núcleo rostral ventromedial, o qual inclui o núcleo magno da rafe e o núcleo reticular paragigantocelular, o núcleo parabraquial, o locus coeruleus, o núcleo do trato solitário e o núcleo reticular dorsal (revisto por Millan, 2002).

A partir destas evidências experimentais, os mediadores químicos que atuam na via descendente passaram a ser extensivamente pesquisados (Hosobuchi *et al.*, 1977; Peyron *et al.*, 1995). Dessa forma, descobriu-se a existência dos peptídeos opióides endógenos (Miller, 1981), tais como, β -endorfinas, dinorfinas e encefalinas, as quais exercem funções modulatórias substanciais sobre a transmissão nociceptiva, primordialmente através da ativação de receptores opióides (revisto por Millan, 2002).

A contribuição dos peptídeos opióides endógenos na modulação inibitória da dor foi confirmada ao ser observado que o antagonista de receptores opióides naloxona era capaz de inibir processos analgésicos induzidos por estresse ou

estimulação elétrica de determinadas áreas do sistema nervoso central (revisto por Watkins & Mayer, 1982). Desde então, houve muita evolução na compreensão dos múltiplos sistemas endógenos envolvidos no controle da dor e diversos outros mediadores químicos atuantes na via descendente já foram descritos, dentre os quais podemos citar a noradrenalina, a dopamina, a serotonina, a acetilcolina e os endocanabinoides (revisto por Sandkühler, 1996).

1.4 Canabinoides e seu papel na analgesia

As propriedades terapêuticas da *Cannabis sativa* são conhecidas desde a antiguidade em várias partes do mundo. Dentre os vários efeitos farmacológicos induzidos por esta planta medicinal, inclui-se sua ação analgésica (Bloomquist, 1968; Guy *et al.*, 2004). Seu principal componente ativo, o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), foi descoberto, em 1964, por Gaoni & Mechoulam, sendo denominado canabinoide qualquer composto que tenha atividade biológica semelhante ao Δ^9 -THC.

A existência de um sistema analgésico endocanabinoide pôde ser concluída a partir da descoberta dos receptores canabinoides (Munro *et al.*, 1993), juntamente com a identificação de substâncias canabinoides endógenas, mediadores químicos produzidos pelo próprio organismo capazes de interagir com um ou mais subtipos de receptores canabinoides (Devane *et al.*, 1992; Mechoulam *et al.*, 1995).

Existem pelo menos dois subtipos de receptores canabinoides, o receptor CB₁ e o receptor CB₂. O receptor CB₁ é expresso principalmente no sistema nervoso central (SNC) (Matsuda *et al.*, 1990), mas também pode ser encontrado em uma menor proporção em terminais periféricos de neurônios sensoriais

Introdução

primários (Fan *et al.*, 2011). Já o receptor CB₂ tem sua localização mais restrita às células imunes (revisito por Howlett *et al.*, 2002), porém pesquisas recentes têm demonstrado a presença desse subtipo no SNC (Onaivi *et al.*, 2012) e em neurônios localizados periféricamente (Anand *et al.*, 2008).

O primeiro endocanabinoide isolado foi o *N*-araquidonoil etanolamina (AEA), conhecido como anandamida, seguido alguns anos mais tarde pela identificação do 2-araquidonoil glicerol (2-AG) (Devane *et al.*, 1992; revisito por Di Marzo *et al.*, 2004). Desde então, vários outros ligantes endógenos de receptores canabinoides foram isolados e identificados, tais como 2-araquidonoil glicerol éter (noladina) (Hanus *et al.*, 2001), *O*-araquidonoil etanolamina (virodamina) (Porter *et al.*, 2002) e *N*-araquidonoil dopamina (NADA) (Sugiura *et al.*, 1995). Os dois endocanabinoides isolados mais bem estudados até o momento são a AEA e o 2-AG, sendo que o primeiro liga-se preferencialmente aos receptores do subtipo CB₁, e o segundo parece ser capaz de ativar tanto o subtipo CB₁ quanto o CB₂ (revisito por Di Marzo, 2001).

A produção dos endocanabinoides pode ocorrer a partir de diversos precursores fosfolipídicos. A biossíntese da anandamida, por exemplo, ocorre a partir da hidrólise do *N*-araquidonoil fosfatidiletanolamina (NAPE) (Jin *et al.*, 2009). Já o 2-AG é sintetizado principalmente através do diacilglicerol (DAG) (revisito por Basavarajappa, 2007). Tais sínteses só ocorrem sob demanda, a partir do aumento das concentrações intracelulares de Ca²⁺, não ocorrendo estocagem em vesículas secretórias (Van Sickle *et al.*, 2005).

Logo após sua produção, os endocanabinoides são liberados por neurônios pós-sinápticos despolarizados e se dirigem aos terminais pré-sinápticos, onde ativam receptores canabinoides através de um mecanismo de

Introdução

sinalização retrógrada (Alger, 2002). Tal sinalização é finalizada primeiramente por meio da ação de transportadores presentes na membrana neuronal, os quais auxiliam no deslocamento do endocanabinoide do meio extra para o intracelular (Beltramo *et al.*, 1997; revisto por Pacher, 2006), e posteriormente pela ação de enzimas específicas presentes no interior dos neurônios, as quais, por sua vez, terminam por degradar os endocanabinoides (revisto por Di Marzo, 2008).

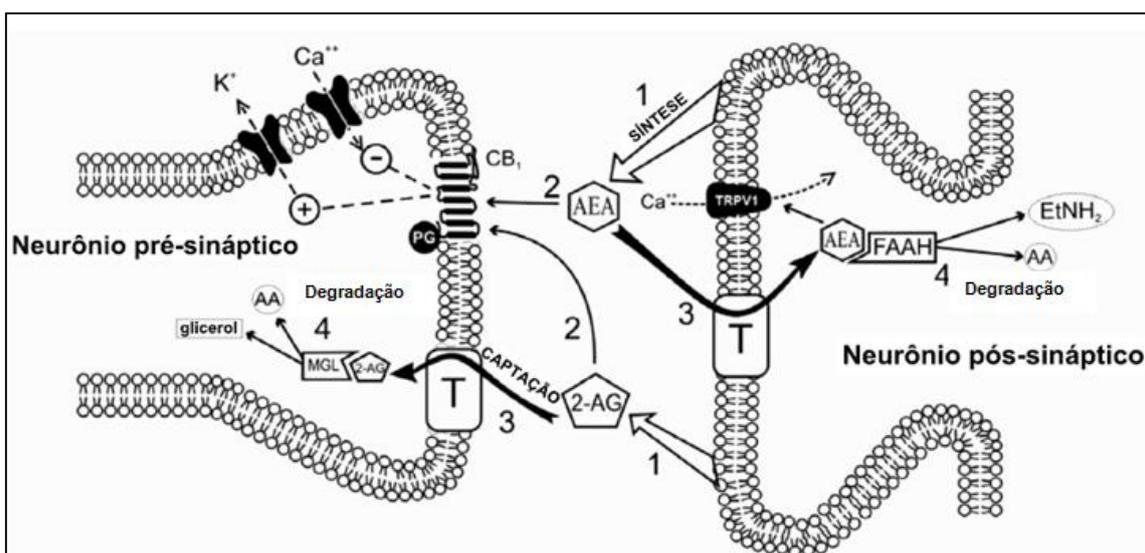


Figura 3 - Representação esquemática da ação dos endocanabinoides. Os endocanabinoides são sintetizados e liberados pelos neurônios pós-sinápticos conforme demanda, após o influxo de cálcio (1). Eles ativam os receptores pré-sinápticos CB_1 (2). A anandamida e o 2-AG são removidos da fenda sináptica pela captação através dos transportadores pré- e pós-sinápticos, respectivamente (3). Uma vez dentro dos neurônios, a anandamida é degradada pela FAAH, e o 2-AG é degradado pela MGL se transformando em ácido araquidônico e etanolamina, e ácido graxo e glicerol respectivamente (4) (extraído de Saito *et al.*, 2010).

A AEA é hidrolisada pela ácido graxo amida hidrolase (*FAAH*, do inglês *fatty acid amide hydrolase*), enzima localizada em neurônios pós-sinápticos (revisto por Seierstad & Breitenbucher, 2008), sendo produtos desta hidrólise o ácido araquidônico e a etanolamina (Di Marzo, 1994). Por sua vez, o 2-AG é hidrolisado pela monoacilglicerol lipase (MAGL), presente em neurônios pré-

sinápticos (Dinh *et al.*, 2002), tendo como produtos desta reação ácido graxo e glicerol (revisto por Guindon & Hohmann, 2009) (**Figura 3**).

Os efeitos analgésicos dos canabinoides têm sido amplamente relatados e seus efeitos antinociceptivos periféricos já foram demonstrados em diversos modelos experimentais (revisto por Hohmann, 2002). Por exemplo, Calignano *et al.* (1998) observaram que a anandamida foi capaz de inibir a hiperalgesia induzida pela formalina por ativar os receptores periféricos do subtipo CB₁. Em outro trabalho, Agarwal *et al.* (2007) demonstraram que a deleção do receptor CB₁ em neurônios nociceptivos periféricos de camundongos, reduziu a antinocicepção produzida pela administração sistêmica e local de agonistas canabinoides. A antinocicepção a nível periférico, induzida pela via canabinoide, também conta com a participação do receptor do subtipo CB₂. Já foi demonstrado experimentalmente, por exemplo, que sua ativação atenuou significativamente um quadro de hiperalgesia inflamatória (Quartilho *et al.*, 2003; revisto por Ibrahim *et al.*, 2006).

Dessa forma, apesar da ativação do sistema canabinoide estar associada a efeitos adversos psicotrópicos, dependência e enfraquecimento temporário da memória, resultante de ações centrais (revisto por Freund *et al.*, 2003), tais relatos de efeitos antinociceptivos obtidos pela ação periférica de agonistas canabinoides torna viável a tentativa de desenvolvimento de analgésicos com propriedades canabimiméticas com efeitos predominantemente periféricos, minimizando assim efeitos adversos centrais (Munro *et al.*, 1993).

1.5 O processo inflamatório e o recrutamento celular

Introdução

A inflamação é uma resposta biológica complexa de tecidos vascularizados a diferentes formas de agressão ao organismo, com o objetivo de restaurar a homeostasia perdida em decorrência do estímulo agressivo (revisto por Muller, 2002).

O processo inflamatório possui sinais e sintomas específicos, os quais foram descritos pela primeira vez por Celsus, no séc. I d.C.: *rubor*, *tumor*, *calor* e *dolor* (eritema, edema, calor e dor). Posteriormente, uma quinta alteração foi descrita, a *functio laesa* (perda de função) (Rather, 1971) (**Figura 4**).

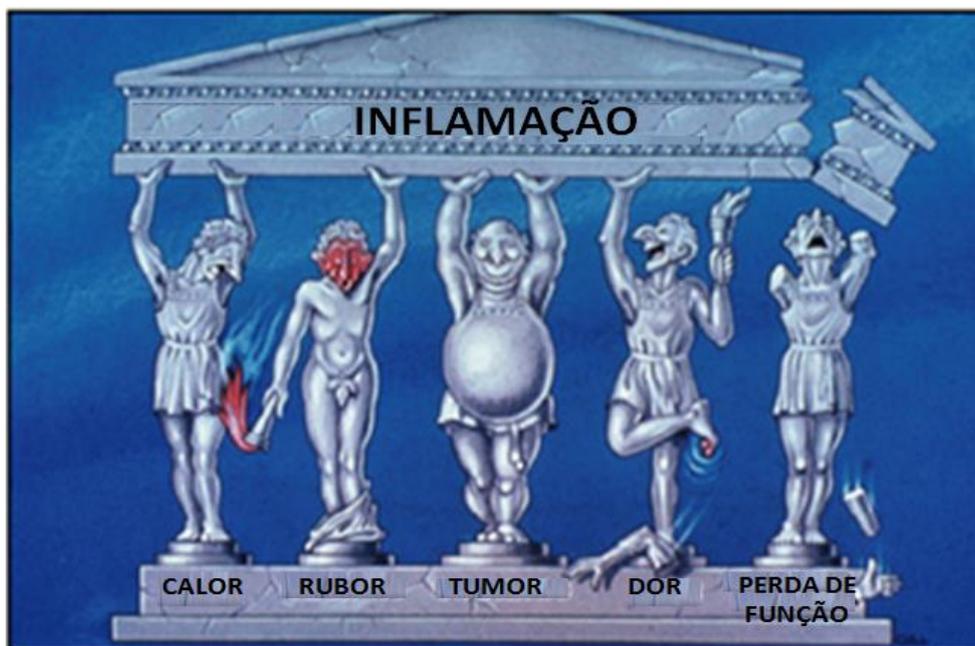


Figura 4 - Sinais e sintomas da inflamação (figura adaptada de Lawrence, 2002).

Desde então, muitas descobertas foram feitas sobre a inflamação, e foi visto que a resposta inflamatória é um processo elaborado que conta com um número elevado de componentes envolvidos (Issekutz *et al.*, 1988). O estímulo agressor, podendo também ser denominado de estímulo flogogênico ou pró-inflamatório, induz a liberação, por mastócitos presentes no tecido lesionado, de

Introdução

mediadores hidrossolúveis, como histamina e serotonina, e lipossolúveis, como a prostaglandina (PG) E₂, por exemplo. Muitos destes mediadores inflamatórios liberados são capazes de induzir alterações vasculares, as quais por sua vez podem levar a um extravasamento de plasma e proteínas dos vasos sanguíneos para a região intersticial (Issekutz *et al.*, 1988).

Dentre estas proteínas que migram do interior dos vasos sanguíneos para a região intersticial, devido a tal aumento da permeabilidade vascular, estão as proteínas do sistema do complemento, o qual se caracteriza por uma ativação sequencial de proteínas presentes no plasma. A ativação deste sistema inicia uma cascata de eventos bioquímicos com ativação em cadeia de diversas enzimas envolvidas no desenvolvimento da resposta inflamatória, como, por exemplo, ativação do quinto componente do sistema complemento (C5a), o qual pode atuar como fator quimiotático para leucócitos, promovendo sua saída da microcirculação adjacente para o tecido inflamado (Peng *et al.*, 2009).

Além do sistema do complemento, durante o processo inflamatório, outras vias específicas de sinalização também podem ser ativadas em diferentes células como macrófagos e células dendríticas, estimulando a produção de citocinas inflamatórias, as quais por sua vez têm um papel relevante na inflamação (revisto por Borish *et al.*, 2003).

A quimiocina CXCL8, por exemplo, estimula a desgranulação de neutrófilos, além de induzir a adesão desse tipo celular ao endotélio vascular, estimulando o processo de migração destas células até o local da lesão. Uma produção elevada de CXCL8 induz uma migração excessiva de neutrófilos para o foco inflamatório (revisto por Yang *et al.*, 1999).

Introdução

O recrutamento de leucócitos para o tecido inflamado pode ser didaticamente dividido em quatro etapas subsequentes e dependentes entre si. A primeira etapa é caracterizada pelo rolamento dos leucócitos sobre a superfície endotelial vascular, o qual ocorre mediado por selectinas, glicoproteínas que proporcionam interações de pouca intensidade entre os leucócitos e as células endoteliais (Rosen, 1993). As selectinas podem ser divididas em três diferentes tipos: (i) selectina-E, presente em grânulos localizados no citoplasma celular das células endoteliais e expressa apenas em condições inflamatórias; (ii) selectina-L, localizada na membrana celular dos leucócitos; (iii) e selectina-P, encontrada em grânulos plaquetários e em células endoteliais (revisto por Muller, 2002).

A segunda etapa consiste na ativação leucocitária, a qual ocorre, principalmente, por meio do simples contato entre o leucócito e a célula endotelial vascular (revisto por Cook-Mills *et al.*, 2005). Já a terceira etapa é caracterizada pela adesão dos leucócitos a pontos específicos do endotélio vascular. Tal adesão é mediada pelas integrinas, proteínas presentes na membrana dos leucócitos, as quais possuem ligantes específicos localizados na membrana endotelial. Como exemplo, podemos citar a Molécula de Adesão Intercelular do tipo 1 (ICAM-1), a qual reconhece a integrina associada à função leucocitária do tipo 1 (LFA-1) e a Molécula de Adesão Celular Vascular (VCAM-1), a qual por sua vez reconhece a integrina de ativação muito tardia do tipo 4 (VLA-4), favorecendo a adesão dos leucócitos às células endoteliais (Marlin *et al.*, 1987). Os ligantes ICAM-1 e VCAM-1 são expressos em baixos níveis, na maioria dos leitos vasculares, na ausência de inflamação, entretanto a presença de citocinas inflamatórias estimula a expressão de ambos (revisto por Muller, 2002).

E, por fim, a quarta e última etapa do recrutamento leucocitário consiste na transmigração dos leucócitos pelo endotélio vascular, a qual pode ocorrer por duas diferentes vias: (i) paracelular, na qual a passagem dos leucócitos se dá por entre as células endoteliais (Shaw *et al.*, 2001); (ii) ou transcelular, em que a passagem dos leucócitos ocorre por dentro da célula endotelial (Feng *et al.*, 1998). Sendo a segunda via citada menos frequente do que a primeira (Carman *et al.*, 2004).

Após a passagem pelas células endoteliais, os leucócitos são estimulados por fatores quimiotáticos e diferenças no gradiente de concentração de citocinas, quimiocinas e mediadores inflamatórios diversos, presentes em maior quantidade no local da lesão, permitindo com que estas células alcancem o tecido inflamado (revisto por Henkels *et al.*, 2011).

A migração dos leucócitos para o local lesionado é um fator importante para o controle do processo inflamatório. A presença moderada de leucócitos no foco inflamatório é benéfica por contribuir para a reobtenção da homeostasia perdida, porém, o excesso de infiltrado leucocitário pode exacerbar a liberação de mediadores inflamatórios e provocar lesões, agravando o quadro. Dessa forma, pesquisas são realizadas na tentativa de desenvolver novos fármacos que possam modular a migração de leucócitos para os tecidos, evitando assim um processo inflamatório exacerbado e prejudicial ao organismo (Tavintharan *et al.*, 2007; Tavintharan *et al.*, 2009; Kempf *et al.*, 2011).

1.6 Plantas Medicinais

Desde os tempos antigos, as plantas têm sido úteis para o homem como fonte de vestuário, abrigo, comida, e não menos importante, medicamentos. As

Introdução

substâncias naturais derivadas de plantas têm formado a base da medicina moderna (revisto por Capasso, 1998).

Diversos fármacos de suma importância para a medicina atual foram, a princípio, isolados de plantas medicinais. Por exemplo, em 1806, Friedrich Serturmer isolou, a partir dos frutos imaturos da papoula (*Papaver somniferum*), a morfina, um analgésico protótipo do grupo dos opióides. Posteriormente, em 1824, Pierre-Jean Robiquet conseguiu isolar, também da papoula, a codeína, um opióide com atividades analgésicas e antitussígenas. Desde então, diversos outros compostos naturais com propriedades terapêuticas foram obtidos a partir de plantas medicinais, como por exemplo: (i) a atropina, um antagonista muscarínico isolado da *Atropa beladonna*; (ii) a cafeína, analgésico e antitérmico proveniente da *Coffea arabica*; (iii) e a salicilina, outro analgésico e antitérmico, muito utilizado nos dias de hoje, obtido da planta *Salix alba* (revisto por Calixto & Siqueira Jr, 2008).

A análise dos dados sobre as prescrições dispensadas em farmácias comunitárias nos Estados Unidos, nos anos de 1959 a 1980, indicou que 25% das prescrições avaliadas continham frações de plantas e/ou princípios ativos derivados de plantas e, pelo menos, 119 produtos químicos derivados de 90 espécies vegetais. Destas 119 substâncias, 88 (74%) foram descobertas como resultado de estudos dirigidos para o isolamento de substâncias ativas de plantas utilizadas na medicina tradicional (Farnsworth *et al.*, 1985).

A flora brasileira foi estimada ser a maior do mundo e é muitas vezes considerada o habitat mais promissor para a pesquisa de plantas medicinais devido a sua alta biodiversidade (revisto por Gurib-Fakim, 2006). O potencial terapêutico desta flora é enorme, uma vez que apenas cerca de 1% das espécies

vegetais tropicais têm sido estudadas para avaliação das propriedades farmacológicas de seus compostos (Abelson, 1990).

1.7 A família *Annonaceae* e a espécie *Annona crassiflora* Mart.

A família *Annonaceae* possui 130 gêneros e 2300 espécies (Araya, 2004), as quais se encontram distribuídas entre as áreas tropicais da América, África, Ásia e Oceania. A África é o continente que contém o menor número de espécies pertencentes a esta família, aproximadamente 450. Seguida pela América do Sul, América Central, parte do México e Caribe com cerca de 900 espécies e por fim pela Ásia e Austrália contendo em torno de 1200 espécies (Chatrou *et al.*, 1999).

No Brasil, é possível encontrar 26 gêneros e aproximadamente 260 espécies da família *Annonaceae* (Maas *et al.*, 2007), espécies dentre as quais cerca de 45 são nativas do segundo maior bioma brasileiro, o cerrado (Lorenzi & Mattos, 2002). O cerrado brasileiro cobre uma área de aproximadamente 200 milhões de km², abrangendo quase 1/4 do território brasileiro (Gentry, 1993). Este bioma ocupa áreas contínuas dos estados de Goiás, Tocantins e Distrito Federal, além de ocupar porções territoriais nos estados da Bahia, Ceará, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Piauí, Rondônia, São Paulo e Minas Gerais (Eiten, 1994). Em Minas Gerais, encontram-se áreas de cerrado nas regiões do Alto e Médio Jequitinhonha, Alto e Médio São Francisco, Campo das Vertentes, Zona Metalúrgica, Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba (Brandão, 2000). Segundo Myers *et al.* (2000), trata-se de um dos principais ecossistemas tropicais da Terra, sendo um dos centros prioritários (*hot spots*) para a preservação da biodiversidade do planeta (**Figura 5**).



Figura 5 - Cerrado brasileiro (fonte: <http://www.espacodocerrado.com/foto02.asp>, acessado em 26/03/2013).

A *Annona crassiflora* Mart. (**Figura 6**) é uma espécie nativa do cerrado e apresenta ampla distribuição nesse bioma, podendo ser encontrada nos seguintes estados: Bahia, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás, Tocantins e Minas Gerais. Conhecida popularmente como araticunzeiro, araticum-do-cerrado, araticum do campo, pinha-do-cerrado, maroleiro ou marolo. Os frutos dessa espécie são muito apreciados por populações locais, sendo encontrados em pomares domésticos e consumidos *in natura* e/ou utilizados na fabricação de geléias, sorvetes, sucos e licores (Almeida *et al.*, 1998; Lorenzi, 1998; Lorenzi & Matos, 2002).



Figura 6 - Árvore (A), folhas e fruto (B), fruto e polpa (C) e flor (D) de *Annona crassiflora* Mart. (fonte: <http://www.espacodocerrado.com/foto04.asp>, acessado em 26/03/2013).

É uma espécie arbórea com uma altura que varia de 4 a 8 m após completo desenvolvimento e um diâmetro de copa que pode chegar até 4 m. Os troncos são geralmente tortuosos, variando entre 20 a 30 cm de diâmetro, revestidos por uma casca áspera e bastante resistente ao calor. As folhas são alternas e simples (Ribeiro *et al.*, 2000). As flores são solitárias, axilares e têm pétalas grossas e carnosas. O fruto possui superfície tomentosa e tuberculada de cor verde, quando em desenvolvimento, e marrom, quando já maduro. A polpa é amarelada e adocicada. As sementes são elípticas e achatadas, de cor marrom. Floresce durante os meses de outubro e novembro, sendo que a frutificação tem início em novembro e a maturação ocorre entre janeiro e abril (Lorenzi, 1998; Carvalho, 2002; Lorenzi *et al.*, 2006).

Na medicina popular, a administração oral de infusões das folhas do marolo e de suas sementes trituradas auxilia no tratamento de enfermidades inflamatórias e dolorosas, como cólicas induzidas por diarreia e picadas de

Introdução

cobras (Ferreira, 1980; Siqueira, 1981; Almeida *et al.*, 1987; Santos *et al.*, 1996). Além disso, em algumas localidades do estado de Goiás, as sementes da *Annona crassiflora* Mart. são utilizadas no tratamento de afecções do couro cabeludo. Depois de devidamente trituradas, elas são misturadas a qualquer tipo de óleo e executam-se massagens no couro cabeludo (Almeida *et al.*, 1998).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar os efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório de derivados do extrato bruto e da substância isolada, peltatosídeo, provenientes das folhas de *Annona crassiflora* Mart.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar se a fração hidroalcoólica das folhas de *Annona crassiflora* Mart., e o filtrado proveniente desta fração, administrados por via oral, induzem antinocicepção em modelo de nocicepção provocada pela administração intraplantar de formalina e no modelo de retirada de cauda submetida a aquecimento em camundongos;
- Investigar se o filtrado proveniente da fração hidroalcoólica das folhas de *Annona crassiflora* Mart., administrado por via oral, reduz o recrutamento de leucócitos na cavidade pleural induzido por carragenina, zimosano, LPS ou CXCL8 em camundongos;
- Investigar se a substância isolada das folhas de *Annona crassiflora* Mart., o peltatosídeo, administrada perifericamente, induz antinocicepção em modelo de hiperalgesia induzida pela administração intraplantar de carragenina, no modelo de retirada de pata submetida à compressão, em camundongos;
- Investigar a participação da via canabinoidérgica no mecanismo de ação antinociceptiva periférica do peltatosídeo, através de: (i) uso de

Objetivos

antagonistas seletivos dos receptores CB₁ (AM251) e CB₂ (AM630) canabinoides; (ii) uso de um inibidor do transportador de endocanabinóides (VDM11); (iii) e uso de inibidores das enzimas que degradam endocanabinoides, enzimas ácido graxo amida hidrolase (*FAAH, fatty acid amide hydrolase*) (MAFP) e monoacilglicerol lipase (MAGL) (JZL184).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta e identificação do material vegetal

Annona crassiflora Mart. foi coletada na cidade de Itatiaiuçu, localizada no estado de Minas Gerais, pela Professora Lúcia Santos Pinheiro Pimenta, do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A identificação foi feita pelo botânico João Renato Stehmann do Departamento de Botânica da UFMG. A coleta foi realizada no dia 17 de julho de 2007. Uma excicata (nº 22.988) está depositada no herbário do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

3.2 Preparo dos extratos das folhas de *Annona crassiflora* Mart. e obtenção do peltatosídeo

A partição dos extratos foi realizada pela aluna de doutorado Gisele Avelar Lage do Departamento de Química da UFMG, sob a orientação da professora Lúcia Santos Pinheiro Pimenta. A extração das folhas secas e trituradas (610,2 g) foi realizada por percolação com hexano seguido de etanol aquoso a 80% (v/v), resultando em 13,5 g e 268,6 g de extratos hexânico e etanólico, respectivamente. Subsequentemente, uma porção (157,5 g) do extrato de etanólico foi dissolvida em 1 L de uma mistura de metanol/água (8:2) e foi feita uma extração, à temperatura ambiente, com clorofórmio (2x1000 ml), proporcionando 121,3 g de fração hidroalcoólica e 13,05 g de fração clorofórmica, após remoção do solvente. Antes da remoção do solvente e após um processo de refrigeração (5°C), ocorreu uma precipitação espontânea na fração hidroalcoólica, o precipitado obtido foi filtrado a vácuo (10,92 g). A fração hidroalcoólica e o filtrado advindo da mesma foram denominados F1 e F2, respectivamente (**Figura 7**).

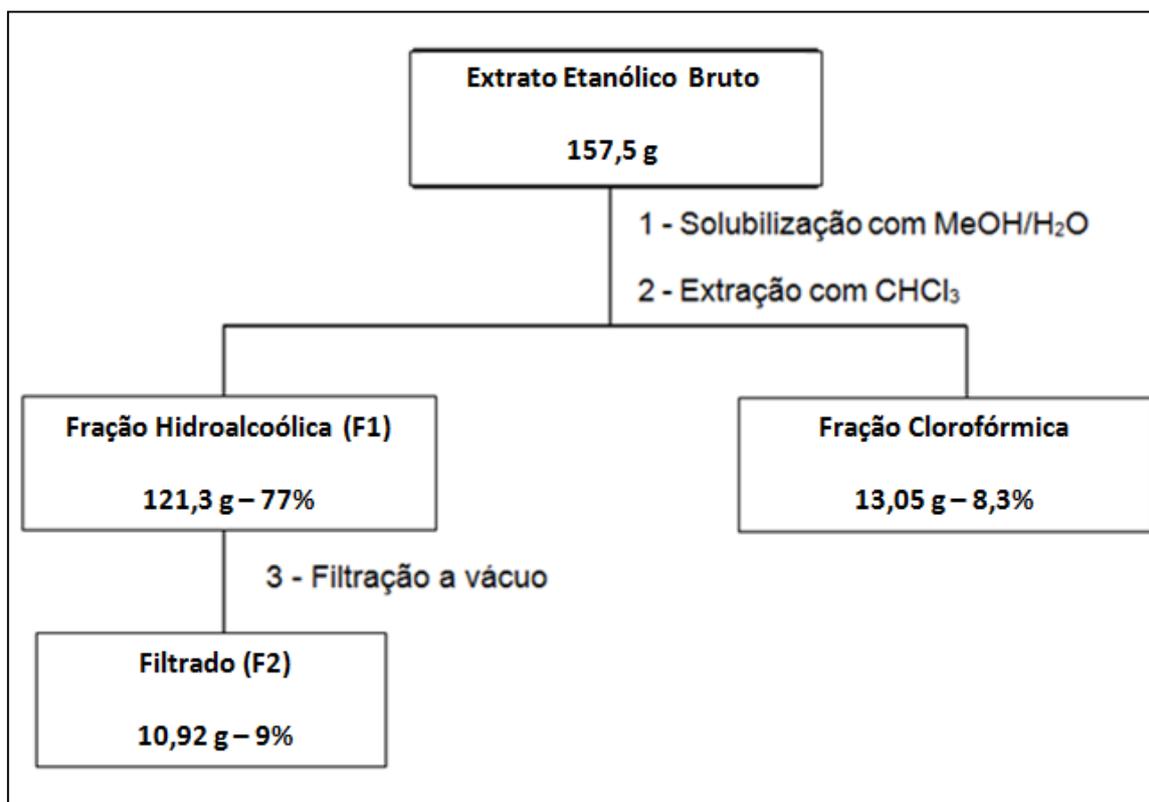


Figura 7 - Esquema geral da partição realizada com o extrato etanólico bruto das folhas de *Annona crassiflora* Mart. (figura adaptada de Lage, 2011).

Uma porção (41,1 g) da fração hidroalcoólica foi cromatografada em uma coluna de fase inversa de poliamida (<0,07 mm, 4x90 cm, CC6 poliamida; Macherey-Nagel), utilizando um gradiente em degrau de H₂O/MeOH/EtOAc isolados ou em misturas de polaridade decrescentes. Cinquenta e duas frações foram colhidas e divididas de acordo com os padrões da cromatografia em camada delgada (CCD), obtendo-se 24 grupos de frações. A partir do grupo 9 (frações 18-20) foi obtido um sólido amarelado (8,1 mg) que se apresentou puro, apresentando uma única mancha em CCD e ponto de fusão entre 265 e 268°C. Ele foi submetido à análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), espectrometria de massa e espectroscopia de infravermelho. Feita a interpretação dos dados, um flavonoide glicosilado foi identificado: a quercetina-

3-O- β -D-glucopiranosil (1 \rightarrow 6) -O- α -L-arabinosídeo, conhecida como peltatosídeo (Lage *et al.*, 2014) (**Figura 8**).

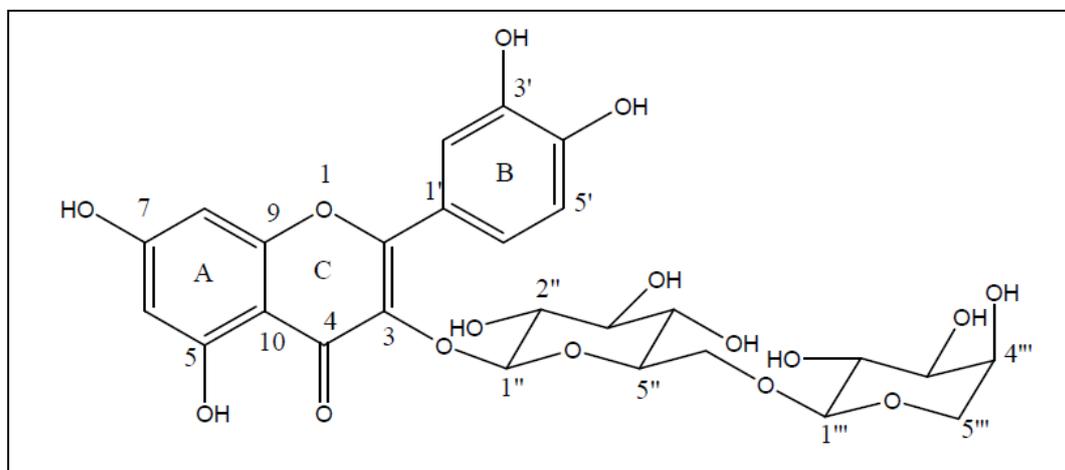


Figura 8 - Estrutura química da quercetina-3-O- β -D-glucopiranosil (1 \rightarrow 6) -O- α -L-arabinosídeo, conhecida como peltatosídeo (extraído de Lage, 2011).

3.3 Prospecção fitoquímica da fração hidroalcoólica e do filtrado, proveniente desta fração, das folhas de *Annona crassiflora* Mart.

Os ensaios fitoquímicos também foram realizados pela aluna de doutorado Gisele Avelar Lage do Departamento de Química da UFMG, sob a orientação da professora Lúcia Santos Pinheiro Pimenta. Os constituintes químicos pesquisados nos extratos foram: alcaloides, flavonoides e terpenóides.

F1 e F2 foram avaliados por cromatografia em camada delgada (CCD). F2 também foi analisado por CCD de poliamida (CCDP) e celulose (CCDC), para obter uma melhor separação das manchas, utilizando três reveladores específicos: (i) reagente Dragendorff para detecção de alcaloides; (ii) reagente difenilboriloxietilamina/polietilenoglicol (NP/PEG) para detectar a presença de flavonoides; (iii) e vanilina/H₂SO₄ para detectar outras substâncias, como por

exemplo, terpenóides (Wagner *et al.*, 1984; Matos, 1988; Cannell, 1998 e Zweig e Sherma, 1987).

3.4 Animais de experimentação

Nos experimentos de caracterização farmacológica dos efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório de F1 e F2, foram utilizados camundongos da linhagem Swiss machos (20-30g), exceto nos experimentos de pleurisia em que foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas (20-30 g). No teste de retirada de pata, para análise do efeito antinociceptivo do peltatosídeo, foram utilizados camundongos Swiss machos (30-40 g).

Os animais foram provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (CEBIO-ICB/UFMG) e mantidos em caixas plásticas com cama de maravalha, à temperatura controlada ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) e com ciclo claro-escuro (06:00-18:00 h). Tiveram livre acesso à ração e água, exceto nos experimentos em que foram tratados por via oral, quando foram submetidos a jejum durante a noite anterior ao experimento.

Todos os procedimentos realizados foram executados de acordo com os princípios éticos, aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG (protocolo 51/2014) (**Anexo I**).

3.5 Drogas e Solventes

3.5.1 Agentes hiperalgésicos e/ou inflamatórios

- Formalina (formaldeído [Labsynth, Brasil] diluído em solução aquosa de cloreto de sódio [NaCl] estéril a 0,9% [solução salina estéril], na proporção de 1:50) preparada imediatamente antes das injeções.

- Carragenina (Cg) λ tipo IV (Sigma, EUA) diluída em solução aquosa de cloreto de sódio (NaCl) estéril a 0,9% (solução salina estéril) nos testes de retirada de pata e em solução tampão de PBS pH 7,4 (Na₂HPO₄ 8,1 mM, KH₂PO₄ 1,84 mM, NaCl 0,14 M e KCl 2,68 mM) nos testes de pleurisia.
- Zimosano A (Sigma, EUA) diluído em solução tampão de PBS.
- Lipopolissacarídeo (LPS) obtido por extração fenólica a partir de *Escherichia coli*, sorotipo 0127:B8 (Sigma, EUA) diluído em solução tampão PBS.
- Interleucina (IL)-8/CXCL8 (PeproTech, EUA) diluída em albumina de soro bovino (BSA) tipo V, livre de ácidos graxos, nucleases e proteases (Calbiochem, EUA) (0,1%) em solução tampão PBS.

3.5.2 Agentes analgésicos e/ou anti-inflamatórios sob estudo

- Fração hidroalcoólica das folhas de *Annona crassiflora* Mart., denominada F1, solubilizada em solução salina estéril com 4% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO).
- Filtrado proveniente da fração hidroalcoólica das folhas de *Annona crassiflora* Mart., denominado F2, solubilizado em solução salina estéril com 4% (v/v) de DMSO.
- Peltatosídeo isolado a partir da fração hidroalcoólica das folhas de *Annona crassiflora* Mart., previamente caracterizado por Lage *et al.* (2011). Solubilizada em solução salina estéril com 0,5% (p/v) de carboximetilcelulose (CMC).

3.5.3 Agentes analgésicos e/ou anti-inflamatórios utilizados como controle

- Morfina ([hidrocloridrato de 7,8-dihidro-4,5-epoxi-17-metilmorfina-3,6-diol] Merck, Alemanha), agonista opióide, diluído em solução salina estéril.
- Dexametasona (Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A., Brasil), anti-inflamatório esteroidal (AIE), diluído em solução salina estéril.
- Indometacina ([ácido 2-{1-[(4-clorofenil) carbonil]-5-metoxi-2-metil-1*H*-indol-3-il}acético] Sigma, EUA), Anti-Inflamatório-Não-Esteroidal (AINE), diluído em tween, etanol e solução salina estéril (1:4:45).
- Xilazina ([hidrocloridrato de 2-(2,6-dimetilfenilamina)-5,6-dihidro-4*H*-tiazina] Sigma, EUA), analgésico, anestésico, sedativo e relaxante muscular, diluído em solução salina estéril.

3.5.4 Fármacos envolvidos na via canabinoidérgica (Figura 9)

- AM251 (1-[2,4-diclorofenil]-5-[4-iodofenil]-4-metil-N-[1-piperidil]pirazol-3 carboxamida, Tocris, EUA). Antagonista seletivo dos receptores canabinoides CB₁. Mantido no *freezer* (-20°C) em solução-estoque, dissolvido em DMSO. Antes das injeções, a solução foi diluída em salina, obtendo-se a concentração de DMSO 10% em salina.
- AM630 (6-Iodo-2-metil-1-[2-{4-morfolinil}etil]-1*H*-indol-3-il)(4metoxifenil)metanona, Tocris, EUA). Antagonista seletivo dos receptores canabinoides CB₂. Mantido no *freezer* (-20°C) em solução-estoque, dissolvido em DMSO. Antes das injeções, a solução foi

Materiais e Métodos

diluída em salina, obtendo-se a concentração de DMSO 10% em salina.

- VDM11 ([5Z,8Z,11Z,14Z]-N-[4-Hidroxi-2-metilfenil]-5,8,11,14-eicosatetraenamida, Tocris, EUA). Inibidor do transportador de anandamida. Mantido no *freezer* (-20°C) em solução-estoque, dissolvido em Tocrisolve. Antes das injeções, a solução foi diluída em salina, obtendo-se a concentração de Tocrisolve 10% em salina.
- MAFP (metil araquidonil fluorofosfonato) (ácido (5Z,8Z,11Z,14Z)-eicosatetraenil- fosfonofluorídrico metil Ester, Tocris, EUA). Inibidor da enzima ácido graxo amida hidrolase (*FAAH, fatty acid amide hydrolase*). Mantido no *freezer* (-20°C) em solução-estoque, dissolvido em etanol. Antes das injeções, a solução foi diluída em salina, obtendo-se a concentração de etanol 3% em salina.
- JZL184 (ácido 4-[Bis(1,3-benzodioxo-5-il)hidroximetil]-1-piperidinocarboxílico 4-nitrofenil éster, Tocris, EUA). Inibidor da enzima monoacilglicerol lipase (MAGL). Mantido no *freezer* (-20°C) em solução-estoque, dissolvido em DMSO. Antes das injeções, a solução foi diluída em salina, obtendo-se a concentração de DMSO 20% em salina.

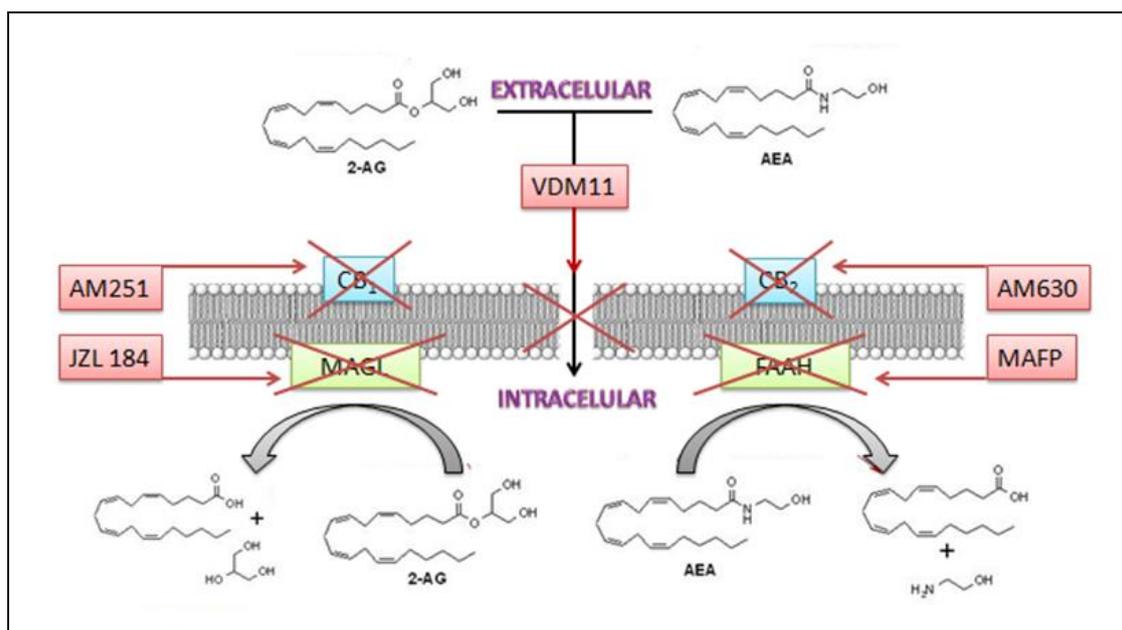


Figura 9 - Esquema representativo das ações postuladas de fármacos que atuam no sistema canabinoide. CB₁ - receptor canabinoide do tipo 1. CB₂ - receptor canabinoide do tipo 2. AEA, araquidonil etanolamina (anandamida). 2-AG, 2-araquidonoilglicerol. MAGL, monoacilglicerol lipase. FAAH, fatty acid amide hydrolase.

3.5.5 Vias de administração das drogas

- Oral (p.o.): A fração hidroalcoólica e o filtrado, proveniente desta fração, das folhas de *Annona crassiflora* Mart., e indometacina foram administrados através de uma sonda gástrica adaptada inserida no interior do trato gastrointestinal do animal através da boca do mesmo, de tal forma que o volume administrado foi diretamente inserido no estômago do animal. Este processo é comumente denominado gavagem (**Figura 10A**).
- Subcutânea (s. c.): Morfina e xilazina foram administradas através da introdução de uma agulha 13,0 x 0,3 mm, em um movimento único e firme, no tecido subcutâneo da região dorsal do animal (**Figura 10B**).
- Intratorácica (i.t.): Carragenina, zimosano, LPS, CXCL8 e dexametasona foram administrados por meio da introdução de uma

Materiais e Métodos

agulha 13,0 x 0,3 mm, em um movimento único e firme, entre a terceira e a quinta costela do lado direito do mediastino. Para uma total imobilização do camundongo, segurou-se a pele da região cervical posterior com o polegar e o indicador, virando-se a mão de maneira que ele ficasse com o abdômen voltado para cima (**Figura 10C**).

- Intraplantar (i.pl.): Peltatosídeo, formalina, carragenina, AM251, AM630, VDM11, MAFP e JZL184 foram injetados subcutaneamente na superfície plantar da pata posterior do camundongo, utilizando-se uma agulha com dimensões de 8,0 x 0,3 mm. Em todos os experimentos foi utilizada a pata posterior direita dos animais, com exceção do protocolo utilizado para excluir a possibilidade de um efeito não local, em que foram utilizadas ambas as patas posteriores (**Figura 10D**).

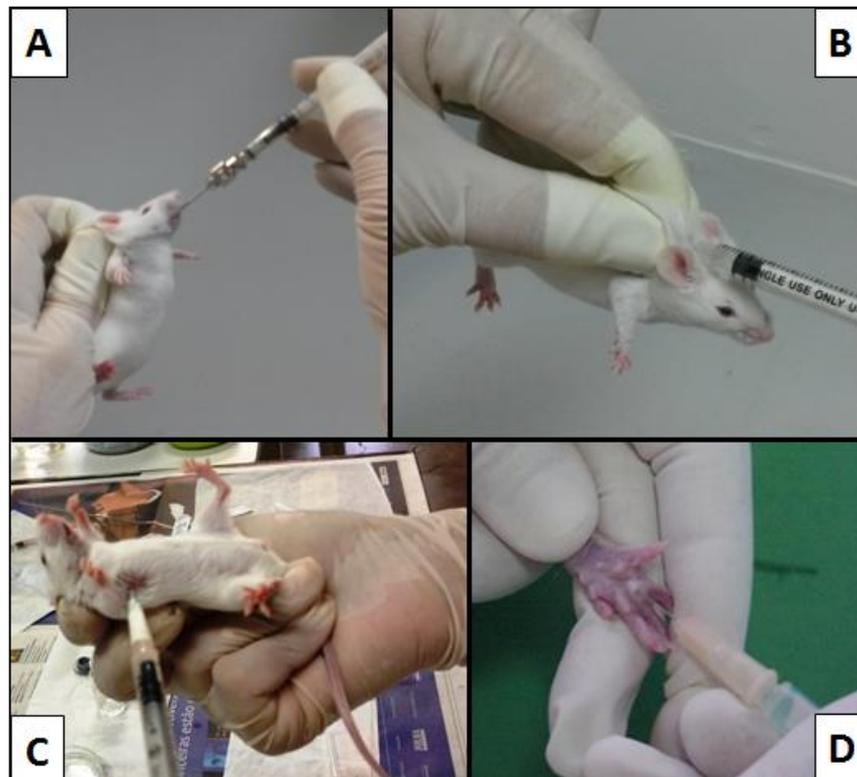


Figura 10 - Administração de drogas pelas vias oral (A), subcutânea (B), intratorácica (C) e intraplantar (D).

3.6 Teste da Formalina

Dubuisson & Dennis (1977) descreveram um método para avaliação da nocicepção induzida por formalina (estímulo agressor químico) em ratos e posteriormente este mesmo método foi adaptado para camundongos por Hunskaar *et al.* (1985).

Duas horas antes da realização do experimento, camundongos Swiss machos (n = 4-6 por grupo) são colocados individualmente em gaiolas padronizadas de acrílico transparente (20 x 13 x 12 cm) situadas sobre um suporte de madeira, as quais são utilizadas como câmaras de observação. As câmaras contêm um espelho localizado paralelamente a parte posterior e outro na parte inferior em um ângulo de 45° (**Figura 11**). Os animais não têm acesso a água e ração após terem sido colocados nas câmaras. Passado esse período de adaptação (ambientalização), o animal é retirado da câmara e formalina (formaldeído 2% em solução salina estéril) é injetada subcutaneamente na superfície dorsal da pata posterior direita (via intralantar [i.pl.]), em um volume constante de 30 µl/pata. Imediatamente após a injeção, o animal é recolocado na câmara e inicia-se o período de observação. O tempo em que o animal permanece lambendo a pata que recebeu a injeção é cronometrado em segundos durante os primeiros 5 minutos (1ª fase, dor neurogênica ou nociceptiva) e de 15 a 30 minutos (2ª fase, dor inflamatória) após a injeção de formalina.

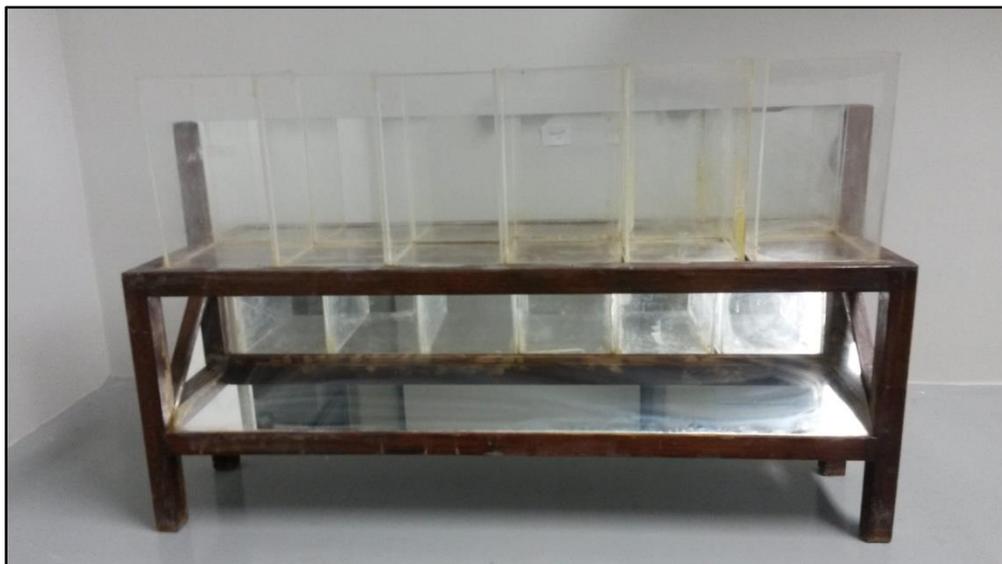


Figura 11 - Suporte contendo câmaras de observação utilizado no teste da formalina.

Utiliza-se como controles positivos a indometacina (10 mg/kg; p.o., 60 minutos antes da injeção da formalina) e a morfina (5 mg/kg; s.c., 30 minutos antes da injeção da formalina), sendo o primeiro fármaco utilizado como controle positivo apenas da 1ª fase e o segundo fármaco de ambas as fases.

A fração hidroalcoólica de folhas de *A. crassiflora* Mart. solubilizada em DMSO/solução salina estéril (4%) foi administrada, nas doses de 10, 30, 100, 300 e 1000 mg/Kg (p.o.), 60 minutos antes da injeção da formalina e a partir dos resultados obtidos foi possível elaborar uma curva dose-resposta. Como controle negativo utilizou-se DMSO/solução salina estéril (4%) em um volume de 10 ml/kg (p.o.), também administrada 60 minutos antes da injeção de formalina.

O filtrado proveniente da fração hidroalcoólica de folhas de *A. crassiflora* Mart. foi administrado também oralmente, 1 h antes da administração intraplantar da formalina, e as doses utilizadas foram a dose relativa (DR), calculada a partir da DI_{50} da fração hidroalcoólica de folhas de *A. crassiflora* Mart., 3 x DR e 10 x DR.

3.6.1 Cálculo da dose capaz de inibir em 50% o tempo de lambida em relação ao controle (DI₅₀) de F1 e da dose de referência (DR) de F2

Os cálculos foram feitos de acordo com Azevedo (2004). Foi construída uma curva dose-resposta para a fração hidroalcoólica das folhas de *A. crassiflora* Mart. (F1) utilizando as doses de 10, 30, 100, 300 e 1000 mg/kg. Foi calculada a porcentagem de inibição para cada uma das doses na segunda fase do teste da formalina, fase em que F1 apresentou atividade biológica, tomando-se o valor do grupo não tratado (grupo controle negativo) como 100% de resposta. Os dados obtidos foram analisados no programa GraphPad Prism 3, para a construção de uma curva porcentagem de inibição *versus* log das doses de F1. A dose capaz de inibir em 50% o tempo de lambida em relação ao controle (DI₅₀) foi calculada por regressão não-linear utilizando o modelo sigmoidal E_{max}. A DI₅₀ calculada foi empregada para o cálculo da dose de referência (DR) do filtrado proveniente da fração (F2), como descrito a seguir.

Com a finalidade de se manter uma proporcionalidade entre as doses utilizadas de F1 e F2, uma vez que F2 foi originado a partir de F1, realizamos o cálculo da Dose de Referência (DR). Este cuidado permite que se tenha a idéia de “quanto” da atividade inicial de F1 está presente em F2, permitindo a administração de quantidades teoricamente equivalentes de princípios ativos presentes em ambas. Assim, a dose de referência de F2 (53 mg/kg) foi calculada através da multiplicação do valor da DI₅₀ de F2 (587 mg/kg), obtida conforme os resultados da segunda fase do teste da formalina, pelo rendimento de obtenção em porcentagem de F2 (9%). No teste da formalina, as doses de F2 utilizadas foram equivalentes a uma, três ou dez vezes o valor da DR calculada (53, 159 e 530 mg/kg, respectivamente).

3.7 Teste de retirada de cauda

O teste de retirada de cauda modificado de D'amour & Smith (1941) consiste na determinação do tempo de latência para que o animal retire a cauda após aplicação de estímulo térmico nociceptivo.

A cauda do animal (camundongo Swiss macho, n = 4-6 por grupo) é posicionada junto a uma resistência helicoidal de níquel-cromo, de modo que um ponto da superfície dorsal da cauda, marcado previamente e distante 2,0 cm da extremidade da mesma, entre em contato com o fio. O aparelho (**Figura 12**) ao ser ligado faz passar uma corrente pela resistência, de forma a aquecê-la. Simultaneamente, um cronômetro acoplado ao sistema é acionado. Quando o calor se torna suficiente para produzir nocicepção, o animal apresenta movimento reflexo brusco de retirada de cauda. Nesse momento, o aparelho é desligado manualmente interrompendo seu aquecimento e o funcionamento do cronômetro. Esse procedimento tem o objetivo de determinar o tempo decorrido desde o início da estimulação até o aparecimento da resposta de retirada de cauda ao contato com a resistência (latência de resposta, medida em segundos). Se em nove segundos (tempo de corte), o animal não retirar a cauda, o aparelho é desligado, automaticamente, para minimizar lesões teciduais que possam afetar as leituras subsequentes.

Antes da administração de qualquer fármaco, é medido o tempo de latência para retirada da cauda após o estímulo (latência basal de resposta). Tais medidas são realizadas três vezes em cada animal e a determinação da média desses valores é considerada como a medida final.



Figura 12 - Aparelho para estímulo térmico nociceptivo da cauda de camundongos utilizado para o estudo de antinocicepção central.

A intensidade de estímulo nº 5 do aparelho foi utilizada baseando-se em um estudo prévio, realizado por Pacheco (2008), que demonstrou as latências de retirada de cauda frente a diferentes intensidades de estímulos (0 a 9). Foi observado que a intensidade nº 5 promoveu uma latência basal de resposta de aproximadamente 3,0 a 4,0 segundos.

É importante ressaltar que o animal é ambientalizado ao aparelho no dia que antecede o teste. Essa ambientalização consiste em submeter o animal à mesma situação que será vivenciada no dia do experimento.

O tempo de latência de retirada de cauda foi avaliado imediatamente antes (basal), 30, 60 e 120 minutos após o tratamento dos camundongos Swiss machos com veículo (DMSO 4%, 10 ml/kg, p.o.), F1 (DI₅₀, p.o.), F2 (DR, p.o.), ou morfina (5 mg/kg, s.c.). Foram realizadas três medidas por animal e a determinação da média desses valores foi considerada como a medida final.

3.8 Teste de coordenação motora

A coordenação motora foi avaliada pelo tempo em que o animal passou caminhando sobre uma haste giratória (Dunham & Miya, 1957) durante 2 minutos (tempo de corte). O aparelho utilizado (Ugo Basile mod. 7600 [Figura 13]) consta de uma haste giratória horizontal, revestida de plástico antideslizante, suspensa a uma altura de 25-30 cm e com rotação constante (16 rpm). Camundongos Swiss machos (n = 4-6 por grupo) foram submetidos a três sessões de treinamento nos dias que antecederam os experimentos. A coordenação motora foi avaliada imediatamente antes (basal), 30, 60 e 120 minutos após o tratamento com veículo (DMSO 4%, 10 ml/kg, p.o.), F1 (DI₅₀, p.o.), F2 (DR, p.o.) ou xilazina (2 mg/kg, s.c.).



Figura 13 - Camundongos sendo submetidos ao teste de coordenação motora.

3.9 Recrutamento de neutrófilos na cavidade pleural em modelo de pleurisia

Camundongos BALB/c fêmeas foram divididos em grupos experimentais (n = 5-6 por grupo). Veículo (DMSO 4% em salina, 10 ml/kg), F1 (DI₅₀) ou F2 (DR e suas variáveis múltiplas de 0,001, 0,01, 0,1, 3 e 10 vezes) foram administrados oralmente 1 h antes da injeção intratorácica de veículo (PBS ou BSA 0,1% em PBS, 100µl), carragenina (200 µg, 100 µl), zimosano (200 µg, 100 µl), LPS (250 ng, 100 µl) ou CXCL8 (60 ng, 100 µl). A escolha das doses e dos volumes injetados dos agentes flogogênicos utilizados foi baseada nos dados de Ferreira (2011) e Henriques *et al.* (1996). O grupo controle positivo recebeu dexametasona na dose de 0,5 mg/kg, intraperitoneal, 30 minutos antes do estímulo inflamatório.

Os animais foram sacrificados na câmara de CO₂ 4 h após a injeção do agente flogogênico e tiveram a cavidade torácica aberta para a coleta do lavado pleural com 2 ml de BSA 1% em PBS (**Figura 14**). O lavado foi centrifugado (4°C a 100xg) por 4 minutos, o sobrenadante foi desprezado e as células resuspensas com BSA 3%.

Em seguida, 20 µL da solução ressuspensa com BSA (3%) foram colocados em um tubo contendo 180 µL da solução de Turk e, posteriormente, uma alíquota de 20 µL foi retirada e colocada em uma câmara de Neubauer (Brand) para contagem total de leucócitos em microscópio óptico. Para realizar a contagem diferencial, 40-50 µL da solução ressuspensa com BSA (3%), foram adicionados em um Cytospin (Fanem), 100 rpm por 40 s, abastecido com lâminas de vidro. Após um intervalo para secagem, as lâminas foram coradas com soluções de Giemsa & May Grunwald e utilizadas para realização da contagem

diferencial de leucócitos. O número de leucócitos encontrados foi expresso na forma de células $\times 10^5$ por cavidade.



3.9.1 Método para coloração de lâminas para contagem diferencial de leucócitos **Figura 14 - Coleta do lavado pleural em camundongos.**

A coloração das lâminas foi realizada com os corantes May-Grunwald & Giemsa, sendo que a técnica combina os processos de fixação e coloração em um único procedimento. Antes do início do procedimento, o corante Giemsa foi diluído na proporção de uma gota de corante para 1 ml de água destilada.

As lâminas foram colocadas sobre um suporte específico e com auxílio de uma pipeta plástica foram adicionadas aproximadamente 50 gotas do corante May-Grunwald. Após 3 min. foram acrescentados aproximadamente 50 gotas de água destilada sobre as lâminas, seguido de mais 1 min. de intervalo. Imediatamente após, as lâminas foram escorridas e, sem lavar, foram colocadas aproximadamente, 50 gotas do corante Giemsa já diluído em água destilada. Após um intervalo de 15 min., as lâminas foram lavadas com água destilada e colocadas em posição vertical à temperatura ambiente para secagem. As lâminas foram analisadas com auxílio de microscópio óptico e o número de leucócitos encontrados foi expresso na forma de células $\times 10^5$ por cavidade.

3.10 Teste de retirada da pata

Para realizar a medida da hiperalgesia, foi utilizado o método de retirada de pata submetida à compressão, descrito originalmente por Randall & Selitto (1957) para ratos, com a finalidade de medir o limiar nociceptivo ao estímulo mecânico. Posteriormente, Kawabata *et al.* (1992) adaptaram este teste para camundongos.

No teste, o animal (camundongo Swiss macho, $n = 4$ por grupo) é cuidadosamente mantido em posição horizontal sobre a bancada, por uma das mãos do experimentador, enquanto a superfície plantar da pata a ser testada é colocada sob a parte compressora do aparelho algésimétrico (Ugo Basile, Itália), como representado na **Figura 15**.



Figura 15 - Camundongo sendo submetido ao teste de retirada de pata.

A parte compressora do aparelho consiste em duas superfícies, sendo uma plana, sobre a qual se coloca a pata do animal, e outra cônica, com uma área de $1,75 \text{ mm}^2$ na extremidade, por meio da qual é aplicada uma pressão na superfície plantar da pata do camundongo (**Figura 16**). A intensidade da pressão

aplicada aumenta a uma taxa constante de 16 g/s, mediante o acionamento de um pedal pelo experimentador. Ao observar a resposta nociceptiva do animal, padronizada como retirada da pata, o experimentador desaciona o pedal, interrompendo assim o aumento da pressão imposta à pata, sendo que o último valor, correspondente ao limiar nociceptivo, fica indicado na escala do aparelho e expresso em gramas (g). O valor de 160 g foi usado como valor de corte para reduzir a possibilidade de causar uma lesão na pata dos camundongos.



Figura 16 - Parte compressora do aparelho (Ugo Basile, Itália) utilizado para medir o limiar de resposta ao estímulo mecânico aplicado na pata de camundongos.

3.10.1 Resposta do animal

O aprendizado para a medida do limiar nociceptivo na pata do camundongo, consiste no treinamento do experimentador para detectar o momento em que o animal percebe o estímulo como sendo doloroso e

desenvolve uma reação. É considerado como resposta o instante inicial dessa reação. Nesse momento, observa-se um reflexo de retirada da pata.

É importante ressaltar que o animal é ambientalizado ao aparelho no dia que antecede o teste, sendo submetido à mesma situação que será vivenciada no dia do experimento. A pata do animal é pressionada pelo aparelho três vezes, até que o mesmo não manifeste mais uma reação de fuga. Esse procedimento é muito importante, pois permite uma melhor observação da resposta nociceptiva do animal, que durante o teste deve permanecer quieto, evitando que desenvolva uma reação aversiva simplesmente devido à situação estranha imposta ao mesmo.

3.10.2 Medida do limiar nociceptivo, hiperalgesia e antinocicepção

O limiar nociceptivo é definido como a pressão, aplicada à pata do animal, em que o mesmo apresenta o reflexo de retirada da pata submetida à compressão. O limiar basal de cada animal foi determinado antes da administração do agente hiperalgésico. 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.

Para avaliação de um possível efeito antinociceptivo periférico do peltatosídeo foi realizado o acompanhamento temporal do limiar nociceptivo dos animais, em função da ação desta quercetina glicosilada, sobre o efeito hiperalgésico induzido pela carragenina. Considerando a hiperalgesia como diminuição do limiar nociceptivo, nos demais experimentos sua intensidade foi avaliada pela diferença (Δ) do limiar nociceptivo obtido no início do experimento (valor basal), antes de qualquer injeção (tempo zero), em relação ao limiar

medido após 3 h da injeção de carragenina (tempo em que se observa efeito máximo deste agente hiperalgésico).

Se antes ou durante o desenvolvimento da hiperalgesia induzida pela carragenina for administrado um fármaco com ação antinociceptiva, será verificada uma redução da intensidade de hiperalgesia, ou seja, uma diminuição do Δ do limiar nociceptivo. 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 próximos àqueles obtidos quando se administra somente o agente hiperalgésico.

3.10.3 Procedimento experimental

O peltatosídeo foi sempre injetado 20 minutos antes da terceira hora após a injeção de carragenina (200 μg). AM251, AM630, VDM11, MAFP ou JZL, respectivamente nas doses de 160, 100, 2,5, 0,5 e 3,75 μg , foram administrados 10 minutos antes da administração do peltatosídeo.

As doses e o tempo de administração dos fármacos foram definidos através de dados da literatura e em estudos prévios realizados em nosso laboratório. A determinação do tempo de latência para retirada da pata, antes (basal) ou após o estímulo nociceptivo (carragenina), foi medida três vezes, sendo que a determinação da média desses valores foi considerada como a medida final.

3.11 Análise estatística dos resultados

Os resultados obtidos foram apresentados como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Os dados foram submetidos à análise de variância *one-way*

Materiais e Métodos

ou *two-way* ANOVA, seguida pelo teste de Bonferroni para comparações múltiplas. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $P < 0.05$.

As análises estatísticas foram feitas usando o programa GraphPad Prism 3 e 5.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas

Abelson, P. H. Medicine from plants. **Science**. 247: 513-513, 1990.

Ackerman, N.; Tomolonis, A.; Miram, L.; Kheifets, J.; Martinez, S.; Carter, A. Three day pleural inflammation: a new model to detect drug effects on macrophage accumulation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 215(3): 588-95,1980.

Agarwal, N.; Pacher, P.; Tegeder, I.; Amaya, F.; Constantin, C. E.; Brenner, G. J.; Rubino, T.; Michalski, C. W.; Marsicano, G.; Monory, K.; Mackie, K.; Marian, C.; Batkai, S.; Parolaro, D.; Fischer, M. J.; Reeh, P.; Kunos, G.; Kress, M.; Lutz, B.; Woolf, C. J.; Kuner, R. Cannabinoids mediate analgesia largely via peripheral type 1 cannabinoid receptors in nociceptors. **Nature Neuroscience**. 10: 870-879, 2007.

Alger, B. E. Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. **Progress in Neurobiology**. 68: 247-86, 2002.

Almeida, S. P. de; Silva, J. A. da; Ribeiro, J. F. **Aproveitamento alimentar de espécies nativas dos cerrados: araticum, baru, cagaita e jatobá**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, In: Documento 26, 83 p., 1987.

Almeida, S. P. **Frutas nativas do Cerrado: caracterização físico-química e fonte potencial de nutrientes**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, In: Cerrado: ambiente e flora, 247-285, 1998.

Almeida, S. P.; Proença, C. E. B.; Sano, S. M.; Ribeiro, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 464 p., 1998.

Anand, U.; Otto, W. R.; Sanchez-Herrera, D.; Facer, P.; Yiangou, Y.; Korchev, Y.; Birch, R.; Benham, C.; Bountra, C.; Chessell, I. P.; Anand, P. Cannabinoid receptor CB₂ localisation an agonist mediated inhibition of capsaicin responses in human sensory neurons. **Pain**. 138 (3): 667-680, 2008.

Referências Bibliográficas

Antony, V. B. Immunological mechanisms in pleural disease. **European Respiratory Journal**. 21 (3): 539-44, 2003.

Araya, H.; Studies on annonaceous tetrahydrofuranic acetogenins from *Annona squamosa* L. seeds. **Bulletin of National Institute for Agro-Environmental Sciences**. 23, 77-149, 2004.

Azevedo, A. O. **Caracterização farmacológica dos efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato hidroalcoólico bruto e fracionado de *Lychnophora pinaster* (Arnica mineira). Biomonitoramento farmacológico da triagem fitoquímica**. Belo Horizonte, 2004. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.

Basavarajappa, B. S. Critical enzymes involved in endocannabinoid metabolism. **Protein & Peptide Letters**. 14 (3): 237-46, 2007.

Beltramo, M.; Stella, N.; Calignano, A.; Lin, S. Y.; Makriyannis, A.; Piomelli, D. Functional role of high affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. **Science**. 277:1094-97, 1997.

Beltramo, M.; Piomelli, D. Carrier-mediated transport and enzymatic hydrolysis of the endogenous cannabinoid 2-arachidonylglycerol. **Neuro Report**. 11:1231-35, 2000.

Bloomquist, E. R. **Marijuana**. Glencoe Press, Beverly Hills, California. 216 p., 1968.

Borish, L. C.; Steinke, J. W. Cytokines and chemokines. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 111 (2): S460-75, 2003.

Brandão, M. **Cerrado**. In: Mendonça, M. P.; Lins, L. V. Lista Vermelha das espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas Gerais. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas/Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte. 55-63, 2000.

Referências Bibliográficas

Briskin, D. P. Medicinal plants and phytomedicines: linking plant biochemistry and physiology to human health. **Plant Physiology**. 124 (2): 507-514, 2000.

Cailhier, J. F.; Sawatzky, D. A.; Kipari, T.; Houlberg, K.; Walbaum, D.; Watson, S.; Lang, R. A.; Clay, S.; Kluth, D.; Savill, J.; Hughes, J. Resident pleural macrophages are key orchestrators of neutrophil recruitment in pleural inflammation. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. 173 (5): 540-7, 2006.

Calignano, A.; La Rana, G.; Giuffrida, A.; Piomelli, D. Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. **Nature**. 394 (6690): 277-281, 1998.

Calixto, J. B.; Beirith, A.; Ferreira, J.; Santos, A. R. S.; Filho, V. C.; Yunes, R. A. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytotherapy Research**. 14: 401-418, 2000.

Calixto, J. B.; Siqueira Jr, J. M. **Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: desafios**. Gazeta Médica da Bahia. 78 (1): 98-106, 2008.

Callén, L.; Moreno, E.; Barroso-Chinea, P.; Moreno-Delgado, D.; Cortés, A.; Mallol, J.; Casadó, V.; Lanciego, J. L.; Franco, R.; Lluís, C.; Canela, E. I.; McCormick, P. J. Cannabinoid receptors CB₁ and CB₂ form functional heteromers in brain. **The Journal of Biological Chemistry**. 287 (25): 20851-20865, 2012.

Cannell, R. J. P. **Natural Products Isolation**. New Jersey, Totowa: Human Press, 473 p., 1998.

Carman, C. V.; Springer, T. A. A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. **The Journal of Cell Biology**. 167 (2): 377-388, 2004.

Carvalho, J. A. **Araticum: o doce aroma do cerrado**. Minas Gerais: Gráfica Editora Folha Machadense, 20 p., 2002.

Referências Bibliográficas

Chatrou, L. W. **Las Annonaceae y el proyecto Annonaceae: una breve revisión de su estado actual.** In: Pinto, A. C. Q. Acta Horticulturae. Proceedings of the First International Symposium on Cherimoya. Loja, Ecuador, 51-57, 1999.

Chow, J. C.; Young, D. W.; Golenbock, D. T.; Christ; W. J.; Gusovsky, F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. **The Journal of Biological Chemistry.** 274 (16): 10689-10692, 1999.

Clifford, J.; Woolf, M. D. Pain: Moving from Symptom Control toward Mechanism-Specific Pharmacologic Management. **Annals of Internal Medicine.** 140 (6): 441-451, 2004.

Cook-Mills, J. M.; Deem, T. L. Active participation of endothelial cells in inflammation. **Journal of Leukocyte Biology.** 77 (4): 487-95, 2005.

Corrêa, C. R.; Calixto, J. B. Evidence for participation of B1 and B2 kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. **British Journal of Pharmacology.** 110 (1): 193-198, 1993.

Costigan, M.; Scholz, J.; Woolf, C. J. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. **Annual Review of Neuroscience.** 32: 1-32, 2009.

Cox, J. J.; Reimann, F.; Nicholas, A. K.; Thornton, G.; Roberts, E.; Springell, K.; Karbani, G.; Jafri, H.; Mannan, J.; Raashid, Y.; Al-Gazali, L.; Hamamy, H.; Valente, E. M.; Gorman, S.; Williams, R.; McHale, D. P.; Wood, J. N.; Gribble, F. M.; Woods, C. G. An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. **Nature.** 444 (7121): 894-898, 2006.

Crunkhorn, P.; Meacock, S. C. Mediators of the inflammation induced in the rat paw by carrageenin. **British Journal of Pharmacology.** 42, 392-402, 1971.

Referências Bibliográficas

Cunha, T. M.; Verri, W. A.; Silva, J. S.; Poole, S.; Cunha, F. Q.; Ferreira, S. H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 102: 1755-60, 2005.

D'Amour, F. E.; Smith, D. L. A method for determining loss of pain sensation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 72 (1) 74-79, 1941.

de Lago, E.; Ligresti, A.; Ortar, G.; Morera, E.; Cabranes, A.; Pryce, G.; Bifulco, M.; Baker D.; Fernandez-Ruiz, J.; Di Marzo V. In vivo pharmacological actions of two novel inhibitors of anandamide cellular uptake. **The European Journal of Pharmacology**. 484 (2-3): 249-57, 2004.

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

Di Carlo, G.; Mascolo, N.; Izzo, A. A.; Capasso, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**. 65 (4): 337-353, 1999.

Di Marzo, V.; Fontana, A.; Cadas, H.; Schinelli, S.; Cimino, G.; Schwartz, J. C.; Piomelli, D. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. **Nature**. 372 (6507): 686-91, 1994.

Di Marzo, V.; Bisogno, T.; De Petrocellis, L. Anandamide: some like it hot. **Trends in Pharmacological Sciences**. 22: 346-9, 2001.

Di Marzo, V.; Bifulco, M.; De Petrocellis, L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploration. **Nature Reviews Drug Discovery**. 3:771-784, 2004.

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

Dinh, T. P.; Carpenter, D.; Leslie, F. M.; Freund, T. F.; Katona, I.; Sensi, S. L.; Kathuria, S.; Piomelli, D. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 99: 10819-24, 2002.

Dubuisson, D.; Dennis, S. G. 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, 1977.

Dunham, N. W.; Miya, T. S. 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, 1957.

Eiten, G. A. **A vegetação do Cerrado**. In: Pinto, M. N. Cerrado: Caracterização, ocupação e perspectivas. 2ª edição. Brasília: Universidade de Brasília, SEMATEC. 65 pg., 1994.

Erlund, I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. **Nutrition Research**. 24: 851-874, 2004.

Fan, Y.; Hooker, B. A.; Garrison, T. R.; El-Kouhen, O. F.; Idler, K. B.; Holley-Shanks, R. R.; Meyer, M. D.; Yao, B. B. Pharmacological and molecular characterization of a dorsal root ganglion cell line expressing cannabinoid CB(1) and CB(2) receptors. **The European Journal of Pharmacology**. 659:161-168, 2011.

Farnsworth, N. R.; Akerele, A. O.; Bingel, A. S.; Soejarto, D. D.; Guo, Z. Medicinal plants in therapy. **Bulletin World Health Organization**. 63: 965-981, 1985.

Fein, A. **Nociceptors and the perception of pain**. In. University of Connecticut Health Center. 153 p., 2012.

Referências Bibliográficas

Feng, D.; Nagy, J. A.; Pyne, K.; Dvorak, H. F.; Dvorak, A. M. Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP. **The Journal of Experimental Medicine**. 187 (6): 903-15, 1998.

Ferreira, M. B. **Frutos nativos do cerrado em Minas Gerais**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, MG, Brasil. 6 (61): 19-23, 1980.

Ferreira, R. G. **Avaliação dos efeitos induzidos pelo ácido nicotínico e pela nicotinamida sobre a migração de neutrófilos induzida por diferentes estímulos inflamatórios em camundongos**. Belo Horizonte, 2011. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

Freitas, C. C.; Vieira, P. R.; Torres, G. V. B.; Pereira, C. R. A. Avaliação da dor com o uso das escalas unidimensionais. **Revista Dor**. 10 (1): 56-62, 2009.

Freund, T. F.; Katona, I.; Piomelli, D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. **Physiological Reviews**. 83: 1017-1066, 2003.

Frode, T. S.; Souza, G. E.; Calixto, J. B. The modulatory role played by TNF-alpha and IL-1 beta in the inflammatory responses induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Cytokine**. 13 (3): 162-8, 2001.

Fürst, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **The Brain Research Bulletin**. 48: 129-141, 1999.

Galdino, G.; Romero, T. R.; Silva, J. F.; Aguiar, D. C.; de Paula, A. M.; Cruz, J. S.; Parrella, C.; Piscitelli, F.; Duarte, I. D.; Di Marzo, V.; Perez, A. C. The endocannabinoid system mediates aerobic exercise-induced antinociception in rats. **Neuropharmacology**. 77: 313-24, 2014.

Gaoni, Y.; Mechoulam, R. Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. **Journal of the American Chemical Society**. 86 (8): 1646-1647, 1964.

Gantner, B. N., R. M. Simmons, S. J. Canavera, S. Akira, and D. M. Underhill. 2003. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and toll like receptor 2. **The Journal of Experimental Medicine**. 197: 1107–1117.

Guarim Neto, G.; Morais, R. G. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: Um estudo bibliográfico. **Acta Botânica Brasílica**. 17 (4): 561-584, 2003.

Guindon, J.; Hohmann, A. G. The endocannabinoid system and pain. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**. 8: 403-21, 2009.

Gureje, O.; Korff, M. V.; Simon, G. E.; Gater, R. Persistent pain and well-being: a World Health Organization study in primary care. **Journal of the American Medical Association**. 280 (2): 147-51, 1998.

Gurib-Fakim, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**. 27: 1-93, 2006.

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

Hanus, L.; Abu-Lafi, S.; Fride, E.; Breuer, A.; Vogel, Z.; Shalev, D. E.; Kustanovich, I.; Mechoulam, R. 2-Arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 98: 3662-3665, 2001.

Henkels, K. M.; Frondorf, K.; Gonzalez-Mejia, M. E.; Doseff, A. L.; Gomez-Cambroner, J. CXCL8-induced neutrophil chemotaxis is mediated by Janus kinase 3 (JAK3). **FEBS Letters**. 585 (1): 159-66, 2011.

Henriques, M. G.; Silva, P. M.; Martins, M. A.; Flores, C. A.; Cunha, F. Q.; Assreuy-Filho, J.; Cordeiro, R. S. Mouse paw edema: a new model for

inflammation? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** 20: 243-9, 1987.

Henriques, G. M. O.; Jadwiga M. M.; Cordeiro, R. S. B. Cordeiro; Wolitzky, B. S.; Woolley, S. T.; Hellewell, P. G. Selectins mediate eosinophil recruitment *in vivo*: a comparison with their role in neutrophil influx. **Blood.** 87 (12): 5297-5304, 1996.

Hohmann, A. G. Spinal and peripheral mechanisms of cannabinoid antinociception: behavioural, neurophysiological and neuroanatomical perspectives. **Chemistry and Physics of Lipids.** 121: 173-190, 2002.

Holdcroft, A.; Jaggar, S. **Core Topics in Pain.** New York: Cambridge University Press. 345p., 2005.

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. The cannabinoid receptors. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators.** 68-69: 619-631, 2002.

Huang, S.M.; Bisogno, T.; Trevisani, M.; Al-Hayani, A.; De Petrocellis, L.; Fezza, F.; Tognetto, M.; Petros, T. J.; Krey, J. F.; Chu, C. J.; Miller, J. D.; Davies, S. N.; Geppetti, P.; Walker, J. M.; Di Marzo, V. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences.** 99: 8400-8405, 2002.

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

Hunskar, S.; Hole, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain.** 30: 103-114, 1987.

Referências Bibliográficas

Ibrahim, M. M.; Rude, M. L.; Stagg, N. J.; Mata, H. P.; Lai, J.; Vanderah, T. W.; Porreca, F.; Buckley, N. E.; Makriyannis, A.; Malan Jr, T. P. CB₂ cannabinoid receptor mediation of antinociception. **Pain**. 122 (1-2): 36-42, 2006.

Ikeda, Y.; Adachi, Y.; Ishii, T.; Miura, N.; Tamura, H.; Ohno, N. Dissociation of Toll-like receptor 2-mediated innate immune response to zymosan by organic solvent-treatment without loss of dectin-1 reactivity. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. 31: 13-18, 2008.

Imai, Y.; Hayashi, M.; Oh-Ishi, S. Key role of complement activation and platelet-activating factor in exudate formation in zymosan-induced rat pleurisy. **The Japanese Journal of Pharmacology**. 57 (2) 225-32, 1991.

Indo, Y.; Mardy, S.; Miura, Y.; Moosa, A.; Ismail, E. A.; Toscano, E.; Andria, G.; Pavone, V.; Brown, D. L.; Brooks, A.; Endo, F.; Matsuda, I. 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: 308-18, 2001.

Issekutz, A. C.; Issekutz, T. B. Cellular and vascular phenomena in inflammation. **Methods in Enzymology**. 162: 301-20, 1988.

Jachak, S. M.; Saklani, A. Challenges and opportunities in drug discovery from plants. **Current Science**. 92: 1251-1257, 2007.

Jin, X. H.; Uyama, T.; Wang, J.; Okamoto, Y.; Tonai, T.; Ueda, N. cDNA cloning and characterization of human and mouse Ca²⁺-independent phosphatidylethanolamine N-acyltransferases. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1791: 32-8, 2009.

Jones, S. L. **Anatomy of pain**. In: Sinatra, R. S.; Hord, A. H.; Ginsberg, B.; Preble, L. Acute Pain: Mechanisms & Management. St Louis: Mosby-Year Book, 1992.

Referências Bibliográficas

Julius, D.; Basbaum, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**. 413, 2001.

Kempen, G. I.; Ormel, J.; Brillman, E. I.; Relyveld, J. 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): 38-44, 1997.

Kempf, T.; Zarbock, A.; Widera, C.; Butz, S.; Stadtmann, A.; Rossaint, J.; Bolomini-Vittori, M.; Korf-Klingebiel, M.; Napp, L. C.; Hansen, B.; Kanwischer, A.; Bavendiek, U.; Beutel, G.; Hapke, M.; Sauer, M. G.; Laudanna, C.; Hogg, N.; Vestweber, D.; Wollert, K. C. GDF-15 is an inhibitor of leukocyte integrin activation required for survival after myocardial infarction in mice. **Nature Medicine**. 17 (5): 581-8, 2011.

Klaumann, P. R.; Wouk, A. F. P. F.; Sillas, T. Patofisiologia da dor. **Archives of Veterinay Science**. 13 (1): 1-12, 2008.

Kobayashi, Y. The role of chemokines in neutrophil biology. **Frontiers in Bioscience**. 13: 2400-2407, 2008.

Kopf, A.; Patel, N. B. **Guide to pain management in low-resource settings**. International Association of Study of Pain. 371 p., 2010.

Lage, G. A. **Isolamento, identificação química e bioprospecção de metabólitos secundários nas folhas *Annona crassiflora* Mart.** Belo Horizonte, 2011. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

Lage, G. A.; Medeiros, F. D.; Furtado, W. D.; Takahashi, J. A.; de Souza, J.D.; Pimenta, L. P. S. The first report on flavonoid isolation from *Annona crassiflora* Mart. **Natural Product Research**. 28: 808-811, 2014.

Referências Bibliográficas

Landolfi, R.; Mower, R. L.; Steiner, M. Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. **Biochemical Pharmacology**. 32: 1525-1530, 1984.

Lawrence, T.; Willoughby, D. A.; Gilroy, D. W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**. 2: 787-795, 2002.

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

Le Bars, D.; Gozariu, M.; Cadden, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews**. 53 (4): 597-652, 2001.

Lindley, I.; Aschauer, H.; Seifert, J. M.; Lam, C.; Brunowsky, W.; Kownatzki, E.; Thelen, M.; Peveri, P.; Dewald, B.; von Tscharner V. Synthesis and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding monocyte-derived neutrophil-activating factor: biological equivalence between natural and recombinant neutrophil-activating factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 85: 9199-9203, 1988.

Lima, D.; Almeida, A. The medullary dorsal reticular nucleus as a pronociceptive centre of the pain control system. **Progress in Neurobiology**. 66: 81-108, 2002.

Lorenzi, H. **Árvores brasileiras**. Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, São Paulo, 2, 1998.

Lorenzi, H.; Matos, F. de A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, 2002.

Lorenzi, H.; Sartori, S.; Bacher, L. B.; Lacerda, M. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas**. São Paulo: Instituto Plantarum de estudos da flora. 686 p., 2006.

Referências Bibliográficas

Maas, P. J. M.; Kamer, H. M.; Junikka, L.; Silva, R. M.; Rainer, H. **Annonaceae from central-eastern Brazil**. In: Scaloppi Junior, E. J. Propagação de espécies de Annonaceae com estacas caulinares. Jaboticabal: UNESP-FCAV, 92 p., 2007.

Marlin, S. D.; Springer, T. A. Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). **Cell**. 51 (5): 813-819, 1987.

Martins, E. R.; Castro, D. M.; Castellani, D. C.; Dias, J. E. **Plantas Mediciniais**. Editora UFV. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil, 2003.

Matos, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. Ceará, Fortaleza: Coleção Ciência – EUFC. 128 p., 1988.

Matsuda, L. A.; Lolait, S. J.; Brownstein, M. J.; Young, A. C.; Bonner, T. I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature**. 346(6284): 561-564, 1990.

McMahon, S. B.; Koltzenburg, M. Novel classes of nociceptors: beyond Sherrington. **Trends in Neurosciences**. 13(6):199-201, 1990.

McNamara, C. R.; Mandel-Brehm, J.; Bautista, D. M.; Siemens, J.; Deranian, K. L.; Zhao, M.; Hayward, N. J.; Chong, J. A.; Julius, D.; Moran, M. M.; Fanger, C. M. TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 104 (33): 13525-13530, 2007.

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

Referências Bibliográficas

- Melzack, R. **The puzzle of pain**. New York: Basic Books. 1973.
- Meyer, R. A.; Matthias, R.; Campbell, J. N.; Raja, N. S. **Peripheral mechanisms of cutaneous nociception**. In: Wall, P. D, Melzack, R. editors. Textbook of pain. 5th edition. Edinburgh, UK: Elsevier Churchill Livingstone; 3-34 p., 2006.
- Millan, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**. 57:1-164, 1999.
- Millan, M. J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**. 66: 355-474, 2002.
- Miller, R. J. Peptides as neurotransmitters: Focus on the enkephalins and endorphins. **Pharmacology & Therapeutics**. 12: 73-108, 1981.
- Mizuno, M.; Ito, Y.; Hepburn, N.; Mizuno, T.; Noda, Y.; Yuzawa, Y.; Harris, C. L.; Morgan, B. P.; Matsuo, S. Zymosan, but not lipopolysaccharide, triggers severe and progressive peritoneal injury accompanied by complement activation in a rat peritonitis model. **The Journal of Immunology**. 183: 1403-1412, 2009.
- Muller, W. A. Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. **Laboratory Investigation**. 82 (5): 521-33, 2002.
- Munro, S.; Thomas, K. L.; Abu-Shaar, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**. 365(6441): 61-65, 1993.
- Murai, N.; Nagai, K.; Fujisawa, H.; Hatanaka, K.; Kawamura, M.; Harada, Y. Concurrent evolution and resolution in an acute inflammatory model of rat carrageenin-induced pleurisy. **Journal of Leukocyte Biology**. 73 (4): 456-63, 2003.
- Myers, N.; Mittermeier, R. A.; Mittermeier, C. G.; Fonseca, G. A. B.; Kent, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**. 403: 853-858, 2000.

Referências Bibliográficas

Oluyomi, A. O.; Hart, S. L.; Smith, T. W. Differential antinociceptive effects of morphine and methylmorphine in the formalin test. **Pain**. 49 (3): 415-418, 1992.

Onaivi, E. S.; Ishiguro, H.; Gu, S.; Liu, Q. R. CNS effects of CB₂ cannabinoid receptors: beyond neuro-immuno-cannabinoid activity. **Journal of Psychopharmacology**. 26: 92-103, 2012.

Pacheco, D. F. **Estudo sobre a participação de canabinoides endógenos e canais para cloreto ativados por cálcio na antinocicepção central e periférica por ativação de receptores opióides μ , δ e κ** . Belo Horizonte, 2008. Tese (Doutorado em Farmacologia) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

Pacheco, D. da F.; Klein, A.; Perez, A. de C.; Pacheco, C. M. da F.; de Francischi, J. N.; Duarte, I. D. G. The μ -opioid receptor agonist morphine, but not agonists at δ - or κ -opioid receptors, induces peripheral antinociception mediated by cannabinoid receptors. **British Journal of Pharmacology**. 154:1143-1149, 2008.

Pacheco, D. da F.; Klein, A.; Perez, A. C.; Pacheco, C. M. da F.; de Francischi, J. N.; Reis, G. M. L.; Duarte, I. D. G. Central antinociception induced by μ -opioid receptor agonist morphine, but not δ - or κ -, is mediated by cannabinoid CB₁ receptor. **British Journal of Pharmacology**. 158:225-231, 2009.

Pacher, P.; Batkai, S.; Kunos, G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. **Pharmacological Reviews**. 58:389-462, 2006.

Peng, Q.; Li, K.; Sacks, S. H.; Zhou, W. The role of anaphylatoxins C3a and C5a in regulating innate and adaptive immune responses. **Inflammation & Allergy-Drug Targets**. 8 (3): 236-46, 2009.

Electrical stimulation of precentral cortical area in the treatment of central pain: electrophysiological and PET study. **Pain**. 62 (3): 275-286, 1995.

Referências Bibliográficas

Pillemer, L.; Blum, L.; Lepow, I. H.; Ross, O. A.; Todd, E. W.; Wardlaw, A. C. The properdin system and immunity. I. Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena. **Science**. 120 (3112): 279-85, 1954.

Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao JQ, Nomikos GG, Carter P, Bymaster FP, Leese AB, Felder CC. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB₁ receptor. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 301: 1020-1024, 2002.

Proença, C.; Oliveira, R. S.; Silva, A. P. **Flores e frutos do Cerrado: guia de campo ilustrado**. Brasília, DF: Editora Universidade de Brasília: São Paulo: Imprensa Oficial do Estado, 226 p., 2000.

Quartilho, A.; Mata, H. P.; Ibrahim, M. M.; Vanderah, T. W.; Porreca, F.; Makriyannis, A.; Malan, P. Inhibition of inflammatory hyperalgesia by activation of peripheral CB₂ cannabinoid receptors. **Anesthesiology**. 99 (4): 955-960, 2003.

Raetz, C. R.; Whitfield, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annual Review of Biochemistry**. 71: 635-700, 2002.

Randall, L. O.; Selitto, J. J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissues. **Archives Internationales de Pharmacodynamie**. 111: 409-419, 1957.

Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Flower, R. J. **Farmacologia**. 6ª edição. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2007.

Rather, L. J. Disturbance of function (functio laesa): the legendary fifth cardinal sign of inflammation, added by Galen to the four cardinal signs of Celsus. **Bulletin of the New York Academy of Medicine**. 47(3): 303-322, 1971.

Referências Bibliográficas

Raychaudhuri, A.; Chertock, H.; Chovan, J.; Jones, L. S.; Kimble, E. F.; Kowalski, T. J.; Peppard, J.; White, D. H.; Satoh, Y.; Roland, D. Inhibition of LTB₄ biosynthesis in situ by CGS 23885, a potent 5-lipoxygenase inhibitor, correlates with its pleural fluid concentrations in an experimentally induced rat pleurisy model. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**. 355 (4): 470-4, 1997.

Reynolds, D. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. **Science**. 164: 444-445, 1969.

Rhudy, J. L.; Meagher, M. W. Fear and anxiety: divergent effects on human pain thresholds. **Pain**. 84 (1): 65-75, 2000.

Ribeiro, J. P.; Brito, M. P.; Junior, E. S.; Fonseca, C. E. L. **Araticum**. Funep, Jaboticabal, 2000.

Rodrigues, V. E. G.; Carvalho, D. A. **Plantas medicinais no domínio dos cerrados**. Editora UFLA, Lavras, Minas Gerais, Brasil. 180 p., 2001.

Romero, T. R. L. **Participação dos sistemas noradrenérgico, opioidérgico e canabinoidérgico nos mecanismos antinociceptivos central e periférico da xilazina e na modulação endógena periférica da dor inflamatória**. Belo Horizonte, 2011. Tese (Doutorado em Farmacologia) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

Romero, T. R.; Resende, L. C.; Guzzo, L. S.; Duarte, I. D. G. CB₁ and CB₂ cannabinoid receptor agonists induce peripheral antinociception by activation of the endogenous noradrenergic system. **Anesthesia & Analgesia**. 116 (2): 463-72, 2013.

Referências Bibliográficas

Rosen, S. D. Cell surface lectins in the immune system. **Seminars in Immunology**. 5 (4): 237-47, 1993.

Ross, H. R.; Gilmore, A. J.; Connor, M. Inhibition of human recombinant T-type calcium channels by the endocannabinoid N-arachidonoyl dopamine. **British Journal of Pharmacology**. 156: 740-750, 2009.

Saito, V. M.; Wotjak, C. T.; Moreira, F. A. Exploração farmacológica do sistema endocanabinoide: novas perspectivas para o tratamento de transtornos de ansiedade e depressão? **Revista Brasileira de Psiquiatria**. 32:7-14, 2010.

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

Santos, L. P.; Boaventura, M. A. D.; Sun, N. J.; Cassady, J. M.; Oliveira, A. B. De. **Araticulin, a bis-tetrahydrofuran polyketide from *Annona crassiflora* seeds**. Belo Horizonte: Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, UFMG. (CD-Rom CAB Abstracts 1996-7/1998) SO: Phytochemistry, Oxford. 42 (3): 705-707, 1996.

Schmidt, R.; Schmelz, M.; Forster, C.; Ringkamp, M.; Torebjörk, E.; Handwerker, H. Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. **Journal of Neuroscience**. 15: 333-341, 1995.

Schneider, F.; Karoly, P. Conceptions of the pain experience: the emergence of multidimensional models and their implications for contemporary clinical practice. **Clinical Psychology Review**. 3: 61-86, 1983.

Seierstad, M.; Breitenbucher, J. G. Discovery and development of fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**. 51: 7327-43, 2008.

Shaw, S. K.; Bamba, P. S.; Perkins, B. N.; Lusciuskas, F. W. Real-time imaging of vascular endothelial-cadherin during leukocyte transmigration across endothelium. **The Journal of Immunology**. 167 (4): 2323-30, 2001.

Referências Bibliográficas

Shibata, M.; Ohkubo, T.; Takahashi, H.; Inoki, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**. 38: 347-352, 1989.

Shrinivasan, M.; Skariyachan, S.; Aparna, V.; Kolte, V. R. Homology modelling of CB₁ receptor and selection of potential inhibitor against obesity. **Bioinformation**. 8: 523-528, 2012.

Sugiura, T.; Kondo, S.; Sukagawa, A.; Nakane, S.; Shinoda, A.; Itoh, K.; Yamashita, A.; Waku, K. 2-arachidonoylglycerol - a possible endogenous cannabinoid receptor-ligand in brain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 215: 89-97, 1995.

Silva, M. V.; Silva, M. R. R. **Ação de extratos de *A. crassiflora*, *Hyptis virgata*, *Hyptis desertorum* e *Solanum lycocarpum* em isolados de *Cryptococcus neoformans***. In: Seminário de Iniciação Científica, UFG, Goiânia, Brasil. 108-109 p., 1998.

Siqueira, J. C. de. **Utilização popular das plantas do Cerrado**. Loyola, São Paulo, Brasil. 60 p., 1981.

Sobotta, J. **Atlas de Anatomia Humana**. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1988.

Stein, C.; Machelska, H. Modulation of peripheral sensory neurons by the immune system: Implications for pain therapy. **Pharmacological Reviews**. 63 (4): 860-881, 2011.

Tavintharan, S.; Sivakumar, M.; Lim, S. C.; Sum, C. F. Niacin affects cell adhesion molecules and plasminogen activator inhibitor-1 in HepG2 cells. **Clinica Chimica Acta**. 376 (1-2) 41-4, 2007.

Tavintharan, S.; Lim, S. C.; Sum, C. F. Effects of niacin on cell adhesion and early atherogenesis: biochemical and functional findings in endothelial cells. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**. 104 (3): 206-10, 2009.

Tjølsen, A.; Berge, O-G.; Hunskaar, S.; Rosland, J.H.; Hole, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain.** (51): 5-17, 1992.

Tuin, A.; Vlag, A. H. V. D.; Voenen-Weemaes, A. M. M. A. V.; Meijer, D. K. F.; Poelstra, K. On the role and fate of LPS-dephosphorylating activity in the rat liver. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology.** 290: 377-385, 2006.

Underhill, D. M. Toll-like receptors and microbes take aim at each other. **Current Opinion in Immunology.** 16: 483–487, 2004.

Underhill, D. M.; Ozinsky, A.; Hajjar, A. M.; Stevens, A.; Wilson, C. B.; Bassetti, M.; Aderem, A. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. **Nature.** 401:811, 1999.

Vanderah, T. W. Pathophysiology of pain. **Medical Clinics of North America.** 91:1-12, 2007.

Van Sickle, M. D.; Duncan, M.; Kingsley, P. J.; Mouihate, A.; Urbani, P.; Mackie, K.; Stella, N.; Makriyannis, A.; Piomelli, D.; Davison, J. S.; Marnett, L. J.; Di Marzo, V.; Pittman, Q. J.; Patel, K. D.; Sharkey, K. A. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB₂ receptors. **Science.** 310: 329-332, 2005.

Veloso, C. C. **Avaliação farmacológica de extratos de *Maytenus imbricata* Mart. ex. reissek em modelos de inflamação, dor e obesidade.** Belo Horizonte, 2014. Tese (Doutorado em Farmacologia) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

Referências Bibliográficas

Vilar, J. B.; Ferreira, F. L.; Ferri, P. H.; Guillo, L. A.; Chen Chen, L. Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice. **Brazilian Journal of Biology**. 68 (1): 141-147, 2008.

Vilar, J.; Ferri, P.; Chen-Chen, L. Genotoxicity investigation of araticum (*Annona crassiflora* Mart., 1841, Annonaceae) using SOS-Inductest and Ames test. **Brazilian Journal of Biology**. 71: 197-202, 2011.

Wagner, H.; Bladt, S.; Zgainski, E. M. **Plant Drug Analysis**. Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München; 307 p., 1984.

Wall, P. D. On the relation of injury to pain: The John J. Bonica lecture. **Pain**. 6: 253-264, 1979.

Walker, J. M.; Huang, S. M.; Strangman, N. M.; Tsou, K.; Sañudo-Peña, M. C. Pain modulation by release of the endogenous cannabinoid anandamide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 96: 12198-12203, 1999.

Walker J. M; Hohmann, A. G. Cannabinoid mechanisms of pain suppression. **Handbook of Experimental Pharmacology**. 168: 509-554, 2005.

Watkins, L. R.; Mayer, D. J. Organization of endogenous opiate and non-opiate pain control systems. **Science**. 216: 1 1 85-92, 1982.

Woolf, C. J. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. **Annals of Internal Medicine**. 140 (6): 441-451, 2004.

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

Woolf, C. J.; Ma, Q. Nociceptors: Noxious stimulus detectors. **Neuroscience Journal**. 55 (3): 353-64, 2007.

Referências Bibliográficas

Yang, X. D.; Corvalan, J. R.; Wang, P.; Roy, C. M.; Davis, C. G. Fully human anti-interleukin-8 monoclonal antibodies: potential therapeutics for the treatment of inflammatory disease states. **Journal of Leukocyte Biology**. 66 (3): 401-10, 1999.

Yuhki, K.; Ueno, A.; Naraba, H.; Kojima, F.; Ushikubi, F.; Narumiya, S.; Oh-ishi, S. Prostaglandin receptors EP2, EP3, and IP mediate exudate formation in carrageenin-induced mouse pleurisy. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 311 (3): 1218-24, 2004.

Zweig, G.; Sherma, J. C. R. C. **Handbook of chromatography: general data and principles**. Boca Raton, Florida: CRC Press. 172 p., 1987.

ANEXO I



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 51 / 2014, relativo ao projeto intitulado "Avaliação dos efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório da fração hidroetanólica e substâncias isoladas das folhas de *Annona crassiflora*", que tem como responsável Andrea de Castro Perez, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 20/05/2014. Este certificado expira-se em 20/05/2019.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 51 / 2014, related to the Project entitled "Evaluation of antinociceptive and antiinflammatory effects of hydroethanolic fraction and isolated compounds from *Annona crassiflora* leaves", under the supervision of Andrea de Castro Perez, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 20/05/2014. This certificates expires in 20/05/2019.

Jacqueline Isaura Alvarez Leite
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 20/05/2014.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/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) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br