



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA – UFPB

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – CCS

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS
BIOATIVOS - PPgPNSB**

**EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO MONOTERPENO TETRAHIDROLINALOL EM
CAMUNDONGOS**

Natalia Diniz Nunes Pazos

João Pessoa

2022

Natalia Diniz Nunes Pazos

**EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO MONOTERPENO TETRAHIDROLINALOL EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, para obtenção do grau de MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS - Área de concentração: FARMACOLOGIA.

Orientador: Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe

Co-Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida

João Pessoa

2022

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

P348e Pazos, Natalia Diniz Nunes.

Efeito antinociceptivo do monoterpeno
tetraidrolinalol em camundongos / Natalia Diniz Nunes
Pazos. - João Pessoa, 2022.

66 f. : il.

Orientação: Cícero Francisco Bezerra Felipe.

Coorientação: Reinaldo Nóbrega de Almeida.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Farmacologia. 2. Nocicepção. 3.
Tetrahidrolinalol. 4. Receptor opioide. 5. TRPV1. I.
Felipe, Cícero Francisco Bezerra. II. Almeida, Reinaldo
Nóbrega de. III. Título.

UFPB/BC

CDU 615(043)

Natalia Diniz Nunes Pazos

**EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO MONOTERPENO TETRAHIDROLINALOL EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, para obtenção do grau de MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS - Área de concentração: FARMACOLOGIA.

Aprovada em: 21/02/2022

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe
Orientador – Universidade Federal da Paraíba



Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida
Co-orientador – Universidade Federal da Paraíba



Profa. Dra. Liana Clébia de Moraes Pordeus
Membro Externo Titular – Universidade Federal da Paraíba



Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro
Membro Interno Titular – Universidade Federal da Paraíba

DEDICATÓRIA

À minha mãe e amiga, Teresa, que esteve, está e sempre estará ao meu lado. Obrigada por seu meu exemplo de força, coragem e de honestidade e por me proporcionar a oportunidade de seguir os meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por sua imensa misericórdia em minha vida, seu amor e sua bondade. Não há outra vida que eu deseje a não ser a que o Senhor escolheu para mim. Obrigada pelo seu sustento e por ter me mantido forte até aqui.

Ao meu noivo, **Manoel Otacilio**, o qual quero passar o resto da minha vida. Seu incentivo, companheirismo, paciência e amor foram essências durante esse processo. Agradeço a Deus por ter te colocado em minha vida.

Ao meu pai, **Constantino Pazos**, minha avó **Elizete Nunes**, minhas tias **Martha Pacote e Nancy Pacote** e aos meus sogros **Jacileide Ferreira e Eudázio Clementino** pelo apoio imensurável durante todas as etapas da minha vida.

Ao **Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe**, meu orientador, e ao **Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida**, meu co-orientador pela orientação, atenção, disponibilidade e pelos valiosos ensinamentos os quais sempre estaram registrados em minha memória.

Aos meus amigos que sempre me apoiaram, em especial, **Elisangela Farias, Alan Frazão, Maria Carolina, Junior Oliveira, Maria Luiza, Danielle Nóbrega, Prof. Lúcio Castellano e Prof. Felipe Guerra** que foram fundamentais para que esse sonho da pós-graduação se tornasse possível.

Aos meus amigos da psicofarmacologia e do PPgPNSB, em especial, **Pablo Rayff, Thallita Karla, Jaislânia Lucena, Humberto Hugo, Alinne Vilar, Nikole Durand** que me apoiaram e me auxiliaram em tudo que precisei durante esses dois anos. Vocês conseguiram deixar todos os dias mais leves.

Ao grupo de pesquisa LAFABE pelo apoio técnico prestado para a realização deste trabalho, em especial, **Hugo Fernandes e Anne Portela** pela colaboração na execução dos experimentos e pela disponibilidade nos momentos em que mais precisei.

Ao **Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa**, pelo fornecimento da substância estudada.

A **Prof.^a Dr^a Luciana Scotti** pela colaboração na execução da modelagem molecular *in silico*.

A **CNPq** pelo auxílio financeiro.

A **todos** que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho.

EPÍGRAFE

“Porque sou eu que conheço os planos que tenho para vocês, diz o Senhor, planos de fazê-los prosperar e não de causar dano, planos de dar a vocês esperança e um futuro”.

Jeremias 29:11

RESUMO

A dor é uma experiência complexa e representa um mecanismo de proteção e sobrevivência, podendo impactar significativamente na qualidade de vida do indivíduo. O tratamento dessa condição utiliza fármacos analgésicos, compostos dotados de efeitos colaterais que podem prejudicar o bem-estar e a adesão do paciente ao tratamento. Nesse sentido, as plantas aromáticas são fontes de moléculas que podem servir de moldes estruturais para a elaboração de substâncias com potencial farmacológico diverso, a exemplo do tetraidrolinalol (2,6-dimentil-6-octanol), um monoterpene derivado do linalol com atividade antinociceptiva. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito antinociceptivo do tetraidrolinalol (THL) por meio de metodologias *in silico* e *in vivo*. Dentre as metodologias *in silico*, a técnica de *docking* molecular foi utilizada com intuito de prospectar possíveis alvos relacionados ao efeito antinociceptivo do THL. Em adição, metodologias *in vivo* foram realizadas utilizando camundongos *Swiss* machos (*Mus musculus*), que foram tratados com THL (50, 100 e 200 mg.kg⁻¹, v.o.) e submetidos ao teste do *rota-rod* e aos modelos de contorções abdominais por ácido acético, placa quente e formalina. Os resultados do *docking* revelaram que o THL apresentou afinidade para o receptor opioide μ (-55,6 Kcal/mol no Moldscore e -47,3 Kcal/mol no Plantscore) e para o receptor de potencial transitório vanilóide tipo 1 (TRPV1) (-40,9 Kcal/mol no Moldscore e -34,1 Kcal/mol no Plantscore). Em relação aos testes/modelos *in vivo*, o THL não apresentou efeito sobre a coordenação motora dos animais no teste do *rota-rod*. Por outro lado, o tratamento com THL reduziu significativamente o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético nas doses de 50 mg.kg⁻¹ (16,8 \pm 4,5), 100 mg.kg⁻¹ (22,5 \pm 6,0) e 200 mg.kg⁻¹ (28,5 \pm 5,3) em relação ao grupo tratado com veículo (41,6 \pm 1,1). No modelo da placa quente, nos tempos de 30, 60 e 120 minutos, os animais tratados com THL 50 mg.kg⁻¹ (14,0 \pm 0,6 s; 14,0 \pm 0,1 s; 5,6 \pm 1,4 s), 100 mg.kg⁻¹ (10,8 \pm 1,5 s; 8,6 \pm 1,5 s; 6,6 \pm 0,9 s) e 200 mg.kg⁻¹ (10,5 \pm 1,1 s; 9,4 \pm 1,4 s; 11,8 \pm 1,0 s) apresentaram um aumento significativo latência para a resposta nociceptiva, de forma dose-dependente, quando comparado ao grupo tratado com veículo (4.333 \pm 0.2108 s; 1,0 \pm 0 s; 1,0 \pm 0,0 s, respectivamente). Por fim, no modelo da formalina, o monoterpene reduziu significativamente o tempo de lambertura na pata, nas duas fases, nas doses de 50 mg.kg⁻¹ (11,8 \pm 2,9 s; 115,6 \pm 18,0 s), 100 mg.kg⁻¹ (15,6 \pm 1,5 s; 127,0 \pm 34,1 s) e 200 mg.kg⁻¹ (29,6 \pm 2,4 s; 172,7 \pm 13,8 s) em relação ao grupo tratado com veículo (51,6 \pm 10,2 s; 281,5 \pm 31,2 s). Esse último efeito foi parcialmente revertido pela naloxona, um antagonista competitivo de receptores opioides. Diante dos resultados obtidos, o THL mostrou-se uma molécula segura, sendo destituída de efeito sobre a coordenação motora dos animais e apresentou atividade antinociceptiva em nível periférico e central, sendo essa última dependente, pelo menos em parte, da neurotransmissão opioide.

Palavra-chaves: Nociceção, Tetraidrolinalol, Receptor opioide, TRPV1.

ABSTRACT

Pain is a complex experience and represents a protection and survival mechanism, which can significantly impact the individual's quality of life. The treatment of this condition uses analgesic drugs, compounds with side effects that can impair the patient's well-being and adherence to treatment. In this sense, aromatic plants are sources of molecules that can serve as structural templates for the elaboration of substances with diverse pharmacological potential, such as tetrahydrolinalool (2,6-dimethyl-6-octanol), a monoterpene derived from linalool with antinociceptive activity. In this context, the aim of this study was to investigate the antinociceptive effect of tetrahydrolinalool (THL) through *in silico* and *in vivo* methodologies. Among the *in silico* methodologies, the molecular docking technique was used in order to prospect possible targets related to the antinociceptive effect of THL. In addition, *in vivo* methodologies were performed using male Swiss mice (*Mus musculus*), which were treated with THL (50, 100 and 200 mg.kg⁻¹, v.o.) and submitted to rota-rod test and abdominal writhing models. by acetic acid, hot plate and formalin. The docking results revealed that THL showed affinity for the μ -opioid receptor (-55.6 Kcal/mol on Moldscore and -47.3 Kcal/mol on Plantscore) and for the transient vanilloid potential receptor type 1 (TRPV1) (- 40.9 Kcal/mol on Moldscore and - 34.1 Kcal/mol on Plantscore). Regarding the *in vivo* tests/models, THL had no effect on the motor coordination of the animals in the rota-rod test. On the other hand, THL treatment significantly reduced the number of abdominal writhing induced by acetic acid at doses of 50 mg.kg⁻¹ (16.8 \pm 4.5), 100 mg.kg⁻¹ (22.5 \pm 6 .0) and 200 mg.kg⁻¹ (28.5 \pm 5.3) relative to the vehicle-treated group (41.6 \pm 1.1). In the hot plate model, at times of 30, 60 and 120 minutes, the animals treated with THL 50 mg.kg⁻¹ (14.0 \pm 0.6 s; 14.0 \pm 0.1 s; 5.6 \pm 1.4 s), 100 mg.kg⁻¹ (10.8 \pm 1.5 s; 8.6 \pm 1.5 s; 6.6 \pm 0.9 s) and 200 mg.kg⁻¹ (10, 5 \pm 1.1 s; 9.4 \pm 1.4 s; 11.8 \pm 1.0 s) showed a significant increase in latency for the nociceptive response, in a dose-dependent manner, when compared to the vehicle-treated group (4,333 \pm 0.2108 s; 1.0 \pm 0 s; 1.0 \pm 0.0 s, respectively). Finally, in the formalin model, the monoterpene significantly reduced paw licking time, in both phases, at doses of 50 mg.kg⁻¹ (11.8 \pm 2.9 s; 115.6 \pm 18.0 s), 100 mg.kg⁻¹ (15.6 \pm 1.5 s; 127.0 \pm 34.1 s) and 200 mg.kg⁻¹ (29.6 \pm 2.4 s; 172.7 \pm 13, 8 s) compared to the vehicle-treated group (51.6 \pm 10.2 s; 281.5 \pm 31.2 s). This latter effect was partially reversed by naloxone, a competitive opioid receptor antagonist. In view of the results obtained, THL proved to be a safe molecule, being devoid of effect on the motor coordination of the animals and showed antinociceptive activity at peripheral and central levels, the latter being dependent, at least in part, on opioid neurotransmission.

Keywords: Nociception, Tetrahydrolinalool, Opioid receptor, TRPV1.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1 Dor e nocicepção	19
2.2 Classificação da dor	19
2.2.1 <i>Dor aguda</i>	19
2.2.2 <i>Dor crônica</i>	20
2.3 Neurobiologia	21
2.3.1 <i>Nociceptores</i>	21
2.3.2 <i>Vias neurais responsáveis pela dor</i>	24
2.4 Mediadores inflamatórios	26
2.5 Tratamento	27
2.5.1 <i>AINES</i>	27
2.5.2 <i>Opioides</i>	29
2.6 Plantas aromáticas	33
2.6.1 <i>Linalol</i>	34
2.6.2 <i>Tetrahidrolinalol</i>	35
3 OBJETIVOS	37
3.1 Geral	37
3.2 Específicos	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1. Material	38
4.1.1 <i>Local da pesquisa</i>	38
4.1.2 <i>Drogas, fármacos e reagentes</i>	38
4.1.3 <i>Animais e aspectos éticos</i>	39
4.2 Métodos	40
4.2.1 <i>Metodologias in silico</i>	40
4.2.2 <i>Metodologias in vivo</i>	41
4.3 Análise estatística	43
5. RESULTADOS	44
5.1 Metodologias <i>in silico</i>	44
5.2 Metodologias <i>in vivo</i>	48
5.2.1 <i>Teste do rota-rod</i>	48

5.2.2 Modelo das contorções abdominais induzidas por ácido acético	48
5.2.3 Modelo da placa quente	49
5.2.4 Modelo da formalina	50
5.2.5 Envolvimento do receptor opioide	52
6. DISCUSSÃO.....	54
7. CONCLUSÃO.....	59
8. PERSPECTIVAS	60
9. REFERÊNCIAS	61
10. ANEXO	67

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
ug	Micrograma
AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
AMPc	3'5'-adenosina-monofosfato cíclico
Aα	Fibra nervosa A alfa
Aβ	Fibra nervosa A beta
Aγ	Fibra nervosa A gama
Aδ	Fibra nervosa A delta
Ca²⁺	Íon cálcio
CFA	Complexo adjuvante de Freund
COX	Ciclooxigenase
cPLA2	Fosfolipase A2 citosólica
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GRD	Gânglios das raízes dorsais
HPA	Eixo hipófise-hipotálamo-adrenal
i.p.	Intraperitoneal
IASP	Associação Internacional de Estudos para Dor
IL	Interleucina
IP3	Trifosfato de inositol
JECFA	<i>International Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives</i>

K⁺	Íon potássio
Min	Minutos
mL	Mililitros
NMDA	N-metil-D-aspartato
OEs	Óleos essenciais
PGE2	Prostaglandina E2
PG	Prostaglandinas
PSNs	Neurônios Sensoriais Primários
RPM	Rotações por minuto
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
SP	Susbtância P
THL	Tetrahidrolinalol
TRPV1	Receptores de potencial transitório vanilóide tipo 1
V.O	Via oral
WDR	Ampla faixa dinâmica

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fibras responsáveis pela condução de estímulos para o Sistema Nervoso Central.	23
Figura 2 - Vias ascendente e descendente.	24
Figura 3- Via de sinalização do ácido araquidônico.	28
Figura 4 - Via de sinalização do tratamento de dor aguda e crônica com opioides. .	32
Figura 5 - Estrutura química do tetrahidrolinalol (A) obtido de SILVA et al., 2022; e (B) Síntese do tetrahidrolinalol através da reação de hidrogenação do linalol, extraída de OLIVEIRA, 2010.	35
Figura 6 - Interações 2D e 3D entre o THL, a morfina e o receptor opioide. As interações hidrofóbicas são destacadas em rosa, as interações de Van der Waals são destacadas em verde claro, as interações estéricas são destacadas em vermelho e as ligações e as ligações de hidrogênio são destacadas em verde escuro.	46
Figura 7 - Interações 2D e 3D entre o THL, a capsaicina e o receptor TRPV1. As interações hidrofóbicas são destacadas em rosa, as interações de van der Waals são destacadas em verde claro e as ligações de hidrogênio são destacadas em verde escuro.....	47
Figura 8 - Efeitos do THL em camundongos submetidos ao teste de rota-rod.	48
Figura 9 - Efeito do THL em camundongos submetidos ao teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético.	49
Figura 10 - Efeito do THL em camundongos submetidos ao teste da placa quente.	50
Figura 11 - Efeito do THL em camundongos submetidos ao modelo de formalina (Fase 1).	51
Figura 12 - Efeito do THL em camundongos submetidos ao modelo de formalina (Fase 2).	52
Figura 13 - Análise do possível envolvimento do THL com o receptor opioide em camundongos submetidos ao modelo de formalina na fase 1.	53
Figura 14 - Análise do possível envolvimento do THL com o receptor opioide em camundongos submetidos ao modelo de formalina na fase 2.	53

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Substâncias utilizadas durante os ensaios experimentais	38
Quadro 2 - Informações sobre as proteínas selecionadas no estudo de modelagem molecular in silico.....	40
Quadro 3 – Valores de energia de ligação obtidos do docking molecular com o THL e os respectivos alvos selecionados.	44
Quadro 4 - Valores de RMSD para as proteínas selecionadas no estudo.	45

1. INTRODUÇÃO

A dor é uma experiência complexa, caracterizada por informações sensoriais transmitidas por intermédio de um estímulo desagradável, mediante modificações de natureza efetiva, cultural e cognitiva (AGUIAR, 2020; KALIYAPERUMAL et al., 2019), e representa um mecanismo de proteção e sobrevivência de aspecto multidimensional, que impacta diretamente a qualidade de vida do paciente (BOLL et al., 2018). A sua classificação pode ser realizada a partir do seu mecanismo fisiológico ou do tempo de duração. Nesse sentido, a dor é aguda quando ocorre um dano tecidual, seguido da ativação de nociceptores locais, responsáveis por identificar os estímulos nocivos, podendo persistir ao longo de dias a semanas. A dor crônica, por sua vez, não apresenta um único agente causador, apresentando um tempo de duração maior do que a dor aguda e aumentando a capacidade de resposta e de sensibilidade dos sistemas relacionados com a percepção da dor (KALIYAPERUMAL et al., 2019). Dessa forma, a ampliação do conhecimento a respeito da classificação temporal da dor proporcionou o avanço da compreensão da base fisiológica da nocicepção, que ao contrário da dor, não é um sentimento subjetivo e sim a codificação fisiológica do processamento de estímulos nociceptivos, uma vez que dor e nocicepção podem existir de modo independente (UTA et al., 2019; GREGORY et al., 2013).

De acordo com a Sociedade Brasileira para Estudo da Dor, a prevalência de dor crônica no Brasil varia entre 30 a 50%. Esse resultado, é semelhante os dados encontrados em países desenvolvidos (SBED, 2022). Além disso, a taxa de distribuição de pacientes com dores crônicas é maior do que quando comparado com pacientes acometidos pela asma e diabetes, tendo em vista que apresenta uma prevalência em indivíduos adultos de 20%, que cresce conforme o avanço da idade (32% adultos com idade entre 25 a 34 anos e 62% adultos com mais de 75 anos) (GENEEN et al., 2020). À vista disso, a falta de estudos e dados concisos em relação à problemática da dor prejudicam o seu manejo e o rastreamento dos pacientes portadores de dores agudas e crônicas e o seu encaminhamento para centros ou unidades capazes de trata-los antes que o problema seja agravado (SBED, 2022).

Dentre as modalidades de tratamento disponíveis, a utilização de analgésicos, anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e opioides são alternativas utilizadas por pacientes portadores de dores agudas e crônicas. Os AINES constituem uma classe

de medicamentos muito usada na clínica para o alívio e tratamento da dor, febre e doenças inflamatórias, abrangendo várias classificações de acordo com a sua constituição química e com seu mecanismo de ação (MIRANDA et al., 2019; HARIRFOROOSH et al., 2013). Os opioides apresentam o potencial de regular a sensação da dor no sistema nervoso central e periférico em decorrência do seu efeito analgésico (QIER et al., 2022) e, além disso, segundo a Organização Mundial de Saúde, essa classe de fármacos é a mais utilizada no tratamento da dor (KUMAR et al., 2019). Todavia, o uso dessas terapias medicamentosas ocasiona diversos efeitos colaterais que prejudicam o bem-estar do paciente, principalmente, quando utilizados a longo prazo (MELO et al., 2020; UTA et al., 2019).

Dessa forma, os produtos naturais têm ganhado espaço ao exibirem propriedades biologicamente ativas capazes de servirem para o *design* de novos medicamentos (OLIVEIRA et al., 2021). Os óleos essenciais (OEs) são uma mistura complexa de metabólitos secundários capazes de atuar biologicamente em várias patologias. Os monoterpenos e os sesquiterpenos são considerados os constituintes majoritários presentes nos OEs e dispõem de propriedades físico-químicas que podem ser exploradas pela indústria farmacêutica, de alimentos, de cosméticos, entre outras. Nesse sentido, os monoterpenos, quando comparados com os demais constituintes, são as moléculas mais importantes, visto que representam aproximadamente cerca de 90% dos componentes encontrados em plantas aromáticas (EDDIN et al., 2021; CALDO et al., 2020; SANTOS et al., 2018).

Os monoterpenos são compostos formados por hidrocarbonetos, duas unidades de isopreno, podendo ser dividido em cíclicos e ramificados, e fazem parte da classe dos metabólitos secundários cujo o objetivo principal é atuar na defesa da planta. Apesar de exibirem uma estrutura quimicamente simples, estes compostos são dotados de propriedades biológicas diversas, com ênfase nos efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório, já observados em modelos animais capazes de modular as vias neurais associadas à dor e à transmissão de estímulos nociceptivos, bem como, a inibição da liberação de mediadores inflamatórios (MOHTASHAMI; SHAKERI; JAVADI, 2019; SANTOS et al., 2019; SOUZA et al., 2014).

O linalol (3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol) consiste em um álcool monoterpreno acíclico identificado em mais de 100 óleos essenciais e dispõe de efeitos anti-inflamatório e neuroprotetor em regiões do hipocampo e córtex motor, antinociceptivo, ansiolítico, analgésico, antioxidante, entre outras propriedades terapêuticas (MIGHELI

et al.,2021;PINAL et al., 2020; SABOGAL-GUAQUETA et al., 2018; SANTOS et al., 2018; SOUTO-MAIOR, et al 2017; TASHIRO et al, 2016). O Tetrahidrolinalol (2,6-dimethyl-6-octanol) é um monoterpene derivado do metabolismo do linalol através de uma reação de hidrogenação. Trabalhos realizados por nosso grupo de pesquisa evidenciaram que o monoterpene em questão é dotado dos seguintes efeitos farmacológicos: ansiolítico, antidepressivo-símile, anticonvulsivante e antinociceptivo (SILVA et al., 2022; SALVADORI, 2019; OLIVEIRA, 2010). Deste modo, o presente trabalho buscou investigar o efeito antinociceptivo do monoterpene tetrahidrolinalol e sugerir o seu possível mecanismo de ação.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 DOR E NOCICEPÇÃO

A dor é uma experiência desagradável, individual e subjetiva que necessita da percepção de neurônios capazes de identificar o dano sofrido. Apesar de ter um papel importante na proteção e preservação da integridade do corpo, a dor pode afetar diretamente o bem-estar do indivíduo impedindo-o de realizar suas atividades (BELL, 2018). A nocicepção, por outro lado, consiste em um mecanismo de codificação de estímulos nocivos capazes de ocasionar um prejuízo em potencial (SMITH, E.S., 2018). Nesse sentido, a nocicepção é uma experiência que pode se distanciar da dor. Assim, o contato com temperaturas extremas, pressões e substâncias químicas ativam receptores sensoriais periféricos especializados em reconhecer esses estímulos nocivos e realizar sua transferência até regiões cerebrais responsáveis por proporcionar um mecanismo de defesa contra um determinado dano tecidual iminente. Conseqüentemente, a dor é um processo que pode ou não ocorrer concomitantemente a nocicepção dependendo da modalidade e localidade do estímulo. Além disso, a dor pode ser definida com conceitos e características diferentes em decorrência do seu mecanismo fisiológico e do seu tempo de duração podendo ser intitulada como: dor aguda e crônica (KALIYAPERUMAL et al., 2019).

2.2 CLASSIFICAÇÃO DA DOR

2.2.1 Dor aguda

A dor aguda pode ser desencadeada por diversas condições tais como estímulos nocivos, processos cirúrgicos, lesões teciduais ou a presença de patógenos que danificam ou ameaçam tecidos saudáveis (MICHAELIDES, A.; ZIS, P. 2019; MASIC et al., 2018). Na maioria das circunstâncias, a dor aguda é localizada e seus efeitos podem ser amenizados durante o processo de cicatrização (CARACI et al., 2020). O reconhecimento dos estímulos nocivos são moldados em todos os níveis do sistema nervoso e seguem para neurônios de projeção ascendente que transferem para o córtex por intermédio do tálamo (GLARE, P.; AUBREY, K.; MYLES, P., 2019).

Assim, muitos estímulos são identificados através de receptores acoplados a proteína G, que aumentam o influxo ou causam o fechamento de canais iônicos de Na⁺ ou Ca²⁺. Esses nociceptores são sensibilizados através de limiares mais baixos e por isso apresentam a capacidade de reconhecer irritantes endógenos produzidos pela própria lesão e inflamação (BELL et al., 2018).

Além disso, a dor aguda pode evoluir para cronicidade, como é o caso da dor pós-operatória. Segundo informações da SBED, cerca de 10 a 50% dos pacientes que submetidos a processos cirurgicos desenvolvem dor persistente, ao passo que, destes 2 a 20% evoluem para a cronicidade. Conseqüentemente, a dor aguda ainda é um problema desafiador devido a pratica de subtratamento medicamentoso que favorece o tempo de duração da dor, podendo chegar ao estágio crônico, e também dispõe de uma etiologia multifatorial, sendo capaz de seguir uma progressão estática ou ascendente da dor, contribuindo para o uso intensificado de analgésicos (SBED, 2022; SMALL, C.; LAYCOCK, H., 2020).

2.2.2 Dor crônica

A dor crônica, diferentemente da dor aguda, tem uma duração maior podendo permanecer por vários meses, e acomete cerca de 11-19% de indivíduos adultos, podendo ser dividida em dor inflamatória e dor neuropática (SMITH, E.S., 2018). De acordo com a Associação para o Estudo da Dor (IASP), a duração e complexidade da dor são elementos responsáveis pela definição da dor crônica. O aumento nos custos associados à dor crônica é significativo, pois consiste em umas das principais razões pelas quais os pacientes buscam atendimento médico nos Estados Unidos. Além disso, há um sofrimento individual que pode comprometer a capacidade cognitiva e ocasionar quadros de depressão (MCCARBERG; PEPPIN, 2019; MICHAELIDES, A.; ZIS, P. 2019), o que tem tornado um grave problema de saúde em nossa sociedade (ROECKEL et al., 2016). Nos EUA foi observado que pacientes tendem a continuar o tratamento com opióides além do tempo de internação pós-operatória (SMALL, C.; LAYCOCK, H., 2020).

A dor crônica atinge mais de 100 milhões de adultos americanos, quando comparada com desordens cardíacas, câncer e diabetes, segundo o relatório do Instituto de Medicina dos Estados Unidos. Por isso, o conhecimento acerca dos mecanismos fisiológicos que regem a dor e a nocicepção são relevantes para o auxílio no tratamento (MCCARBERG; PEPPIN, 2019). Há evidências de uma possível interação entre os fatores emocionais e a dor crônica. O fator afetivo pode estar associado com a mudança para cronicidade, já que mesmo com a redução das lesões periféricas, o sofrimento do paciente, em muitos casos, se mantém. (RAVER et al., 2020; MANSOUR et al., 2014). É sabido que os eventos de transdução, transmissão e integração central são essenciais para a percepção da dor (BELL, 2018). Contudo, a dor (aguda ou crônica) pode ocasionar a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), gerando a liberação de uma grande quantidade de cortisol. Com a ativação persistente do eixo HPA pode-se observar uma maior incidência de doenças crônicas associadas à dor (TIMMERS ET AL., 2019).

2.3 NEUROBIOLOGIA

2.3.1 Nociceptores

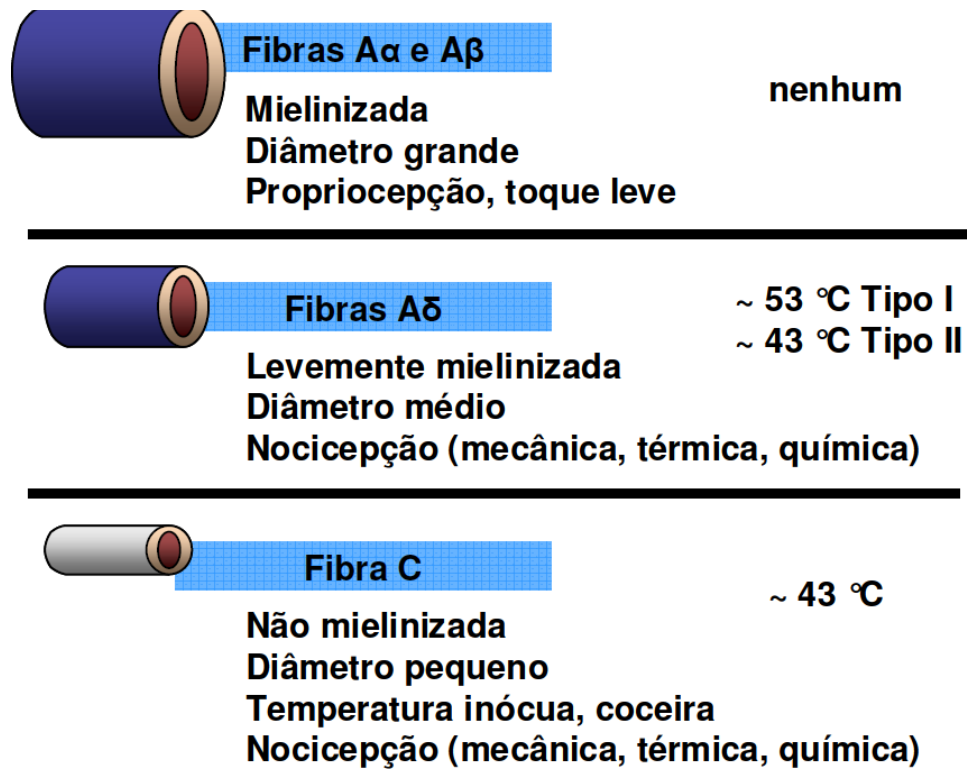
Os nociceptores podem ser definidos como terminações nervosas que têm a capacidade de identificar estímulos nocivos e reconhecer sensações associadas à dor. A distribuição em mamíferos é ampla e abrange em média 67% das fibras totais (12% A δ , 30% C-polimodal, 20% C-mecanotérmico ou apenas sensível ao calor e 5% C-silencioso), restando 33% responsáveis por identificar sinais de toque e pressão. Sua classificação é direcionada a quatro categorias: nociceptores mecânicos, os quais são sensíveis a pressão; nociceptores térmicos, que respondem a situações extremas de temperatura quente ou fria; nociceptores polimodais, que reconhecem estímulos de natureza mecânica, térmica e química; e silenciosos, que são ativados mediante estímulos químicos e através de mediadores inflamatórios. Além dos nociceptores, a transmissão do impulso nociceptivo necessita de fibras aferentes e eferentes que serão capazes de transmitir o estímulo nocivo (MARTINS et al., 2018). Os neurônios sensoriais primários (PSNs), denominados de nociceptores, identificam os estímulos nocivos através das terminações nervosas provenientes dos PSNs que permitem a percepção da dor. Essa categoria de nociceptores reconhece determinados estímulos

sob certas circunstâncias, mas nada impede a identificação de formas inócuas do mesmo estímulo como é o caso dos nociceptores de calor e frio (FRIAS, B.; MERIGHI, A., 2016). Ademais, essa classe de neurônios é responsável por identificar extremos de temperatura (10°C e 40°C em mamíferos), e níveis elevados de pressão mecânica e lesão ocasionada por produtos químicos.

Os nociceptores apresentam-se bem distribuídos na periferia, vísceras e nos tecidos profundos. Quando ativados, os nociceptores localizados em diversas regiões do corpo transferem um potencial de ação até o córtex somatossensorial, córtex parieto-insular e ao córtex cingulado anterior onde a sensação da dor é decodificada (SNEDDON, L. U., 2018). Contudo, as vias de transmissão para os órgãos somáticos e vísceras até os centros corticais apresentam rotas distintas (FRIAS, B.; MERIGHI, A., 2016) e, apesar da nocicepção e a dor apresentarem conceitos diferentes, um processo não pode ocorrer sem o outro (SMITH, E.S., 2018).

As fibras A subdividem-se em alfa (13-20 µm), beta (6-13µm), gama (3-8 µm) e delta (1-5 µm) (Figura 1). Deste modo, as fibras que apresentam um calibre maior são responsáveis por conduzir impulsos nervosas mais rápidos do que quando comparado com fibras de calibre menor. Assim, as fibras alfa, beta e gama são consideradas mais rápidas em decorrência do seu calibre e conduzem estímulos associados a: propriocepção (pele, músculos e articulações) e tato (SYDNEY, P.; CONTI, P., 2011; LANZANSTER, 2011; GUGINSKI, G.,2008). Da mesma forma existe uma subdivisão para as fibras A delta e C em I e II (Aδ1, Aδ2, C1 e C2).

Figura 1 - Fibras responsáveis pela condução de estímulos para o Sistema Nervoso Central.



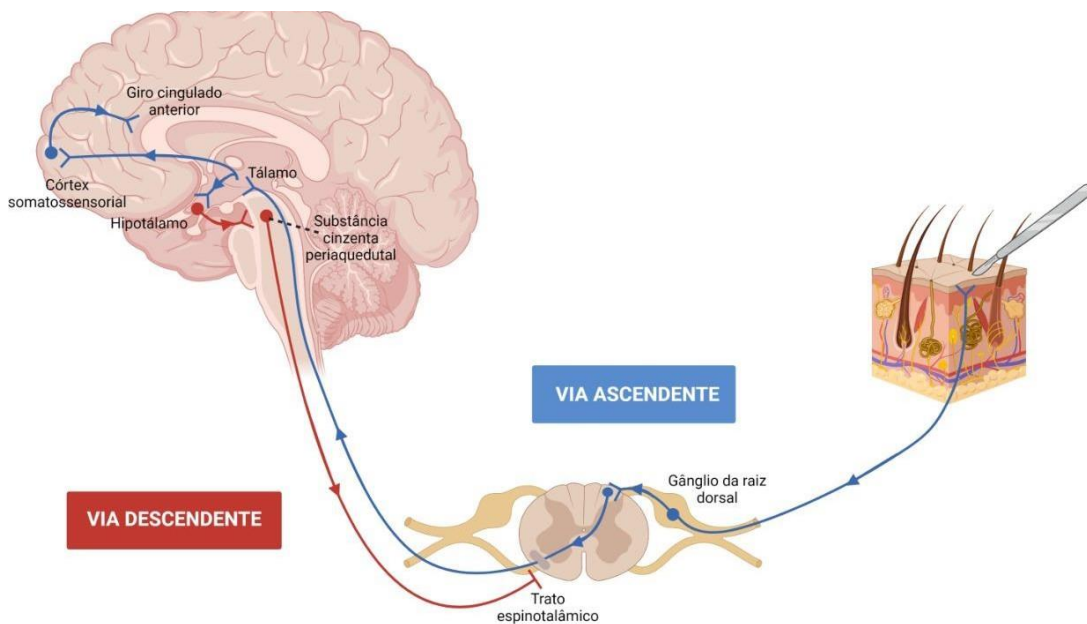
Fonte: LANZANSTER, 2011.

As fibras A δ , que são levemente mielinizadas, transmitem os estímulos em espaço menor de tempo e são responsáveis por produzir percepções associadas a dor rápida e aguda. Em contrapartida, as fibras do tipo C por apresentarem um diâmetro menor e ausência de mielina, transmitem os estímulos mais lentamente, sendo relacionadas às fibras polimodais, que conduzem a sensação de dor leve, moderada e lenta. A ativação de uma fibra nociceptiva favorece uma série de modificações membranares que culminam na formação de um estímulo, o qual será transmitido até o SNC e entendido pelo córtex cerebral como desagradável. As consequências de um estímulo doloroso estão relacionadas com uma cascata de eventos ligada a: lesões teciduais, liberação de substâncias pró-inflamatórias, mediadores inflamatórios e aumento da permeabilidade vascular, que produzem a inflamação e ocasiona danos significativos a longo prazo (MARTINS et al., 2018; SNEDDON, L. U., 2018).

2.3.2 Vias neurais responsáveis pela dor

A via da dor compreendes diversos componentes cognitivos, como o sistema sensorial, emocional e o comportamental, visando proporcionar um efeito protetor diante de estímulos considerados nocivos. Os reflexos espinhais, tanto os primitivos quanto complexos, conscientes e subconscientes, possibilitam respostas supra espinhais que estão relacionadas com esse sistema. Nesse sentido, as fibras nervosas atuam no transporte de estímulos nocivos para o Sistema Nervoso Central (SNC) que são inicialmente transduzidos e sinalizados por intermédio de nociceptores. Em seguida, são encontrados um grupo de corpos celulares das fibras aferentes primárias chamados de gânglio da raiz dorsal (DRG), que realizam diversas sinapses com várias células do corno dorsal espinhal, possibilitando a liberação de neurotransmissores excitatórios ou inibitórios (MCCARBERG; PEPPIN, 2019). Assim, para que esse processo seja executado existem duas vias importantes para detecção e percepção da dor: via ascendente e a via descendente (figura 2).

Figura 2 - Vias ascendente e descendente.



Created with BioRender.com

Fonte: PORTELA, 2022

Em casos de dano tecidual, irá ocorrer uma série de eventos relacionados à ativação de canais iônicos presentes no terminal periférico, iniciando a despolarização dos pequenos neurônios aferentes de primeira ordem. Posteriormente, o potencial de ação será conduzido através das fibras nociceptivas A δ e C, por intermédio do gânglio da raiz dorsal, para os terminais do axônio no corno dorsal da medula espinhal. Em sequência, esses neurônios irão realizar sinapses com neurônios de segunda ordem: as fibras C nas lâminas I e II e fibras A δ na substância gelatinosa (SG), também chamada de lâmina II. Ao cruzar com a medula espinhal os neurônios de segunda ordem têm suas fibras terminais projetadas até o tálamo, onde interagem com os neurônios de terceira ordem, que são capazes de estabelecer uma comunicação com o córtex somatossensorial. Quando ocorre o recebimento do potencial de ação por essa classe de neurônios, a dor será assimilada ou esses neurônios poderão seguir com esse estímulo até o giro cingulado anterior, que interpreta a parte emocional da dor (WOLLER et al.,2017; AGUIAR, 2018). A principal via descendente inibitória da dor é localizada em nível supra espinhal e estabelece uma comunicação com uma região presente no mesencéfalo, chamada de substância cinzenta periaquedutal (PAG), através da via funículo dorsolateral. Nesse sentido, essa região recebe aferências provenientes do hipotálamo e do trato espinotalâmico ascendente e posteriormente descende na via do núcleo magno da rafe, liberando substâncias capazes de exercer papéis inibitórios associados a analgesia. Todavia, há inúmeros sítios que dão origem a via descendente para o corno dorsal como: núcleo magno da rafe, hipotálamo, núcleo reticular paragigantocelular, núcleo parabraquial, locus coeruleus, núcleo do trato solitário e núcleo reticular dorsal (AGUIAR, 2018).

As lâminas Rexed consistem em nove lâminas (I-IX), que apresentam particularidades citológicas e estão presentes na substância cinzenta relatada pelo anatomista sueco B. Rexed, sendo as lâminas I e II nomeadas como a parte superficial do corno dorsal. Em contrapartida, as outras lâminas dispõem uma extensão que abrange o longo do cordão, as colunas dorsais de forma paralela e a parte ventral da substância cinzenta (GEBHART G.F., SCHMIDT, 2013). Na região superficial do corno dorsal são projetados neurônios aferentes de alto limiar específicos da lâmina I. Outra população pertencente ao corno dorsal são os neurônios de segunda ordem- lâminas V-, situados em regiões mais profundas e sensíveis a entrada de fibras A de baixo limiar e de alto limiar (fibras A δ / C). Em

consequência, da alta quantidade de entradas de estímulos mediadas por fibras A e C há uma resposta gradativa dos neurônios convergentes ou de ampla faixa dinâmica (WDR), que começam a reconhecer estímulos nociceptivos e não nociceptivos. (R.F. Ashmawi HA; Freire GM, 2016; WOLLER et al.,2017). Contudo, não há uma região dentro do cérebro capaz de processar todas as entradas sensoriais (WOLLER et al.,2017).

A modulação da transmissão nociceptiva é realizada após a liberação de aminoácidos e neuropeptídeos nas terminações aferentes primárias presentes no corno dorsal como: taquicininas (substância P), neurocinina A (NKA) e neurocinina B (NKB); endorfinas, glutamato e aspartato, peptídeo associado ao gene da calcitonina (CGRP), colecistocinina (CCK), somatostatina, óxido nítrico, prostaglandinas, galanina e encefalinas. Em contrapartida, existem neurotransmissores como a serotonina, noradrenalina, ácido gama aminobutírico (GABA), glicina e neuropeptídeos capazes de ocasionar um processo inibitório nociceptivo no corno dorsal (AGUIAR, 2018). Os aspectos somatossensoriais e cognitivos da dor, em especial da dor aguda, são feitos a partir de sinais da periferia na área do corno dorsal da medula, sendo transmitido com auxílio do tálamo para regiões centrais específicas para processamento. Deste modo, esses sinais tendem a cessar com o término do estímulo da incitação periférica (WOLLER et al.,2017).

2.4 MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

Dentre os sinais clássicos da inflamação – dor, rubor, calor, edema e perda de função - a dor está associada quimicamente a eventos de aumento de fluxo e permeabilidade vascular, bem como de liberação de substâncias algogênicas com potencial pró-inflamatório (JÚNIOR et al., 2016). Deste modo, durante o processo inflamatório, os macrófagos M1 atuam na indução de citocinas pró-inflamatórias: TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18 e IL-23; produção de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS), além de agirem na imunidade adaptativa citotóxica, na expressão de receptores de quimiocinas e na resposta contra patógenos mediada pela célula T auxiliar tipo 1 (Th1) e Th17. Por outro lado, os macrófagos M2 apresentam associação com quimiocinas CCL17, CCL18, CCL22 e CCL24; favorecem a mudança gênica para interleucinas com potencial anti-inflamatório como TGF β , IL-1R tipo II, IL-1Ra e IL-10, induzem a expressão de receptores em níveis

endolíticos e convocam o recrutamento de células Th2, eosinófilos e basófilos por meio de estímulos provenientes de quimiocinas CCL17, CCL18, CCL22, CCL24 e células Tregs (MOGHADDAM et al., 2018).

As citocinas compreendem uma família de mensageiros moleculares, constituídos por polipeptídios ou glicoproteínas, com meia-vida limitada, peso entre 15-20 kDa e que estão associadas a processos de crescimento, diferenciação, sinais inflamatórios ou anti-inflamatórios a partir de um estímulo inicial. (CONLON et al., 2019; BERRAONDO et al., 2018; ROSE-JOHN, 2018). Além disso, essas moléculas apresentam um papel relevante no que tange a modulação da dor (CRISPINO, N; CICCIA, F, 2021). Após a ligação da citocina em seu alvo farmacológico expresso na membrana celular, é iniciado o processo de sinalização intracelular que modifica a transcrição genica, levando à proliferação e diferenciação de determinadas funções celulares (BERRAONDO et al., 2018), como a produção e a liberação de citocinas. Algumas citocinas estão associadas com o mecanismo da nocicepção, a saber: a IL-6, IL-1 β e IL-23. A intercelucina-6 está relacionada com a modulação da nocicepção e com a coordenação de outras citocinas e seus receptores como a IL-23, IL-17A e IL-18. Em contrapartida, a IL-1 β é responsável por ocasionar dano tecidual e pela modulação também da nocicepção em decorrência do aumento do seu receptor (IL-1R), expresso por neurônios DRG em roedores portadores de artrite induzida através do adjuvante completo de Freund (CFA) (CRISPINO, N; CICCIA, F, 2021).

2.5 TRATAMENTO

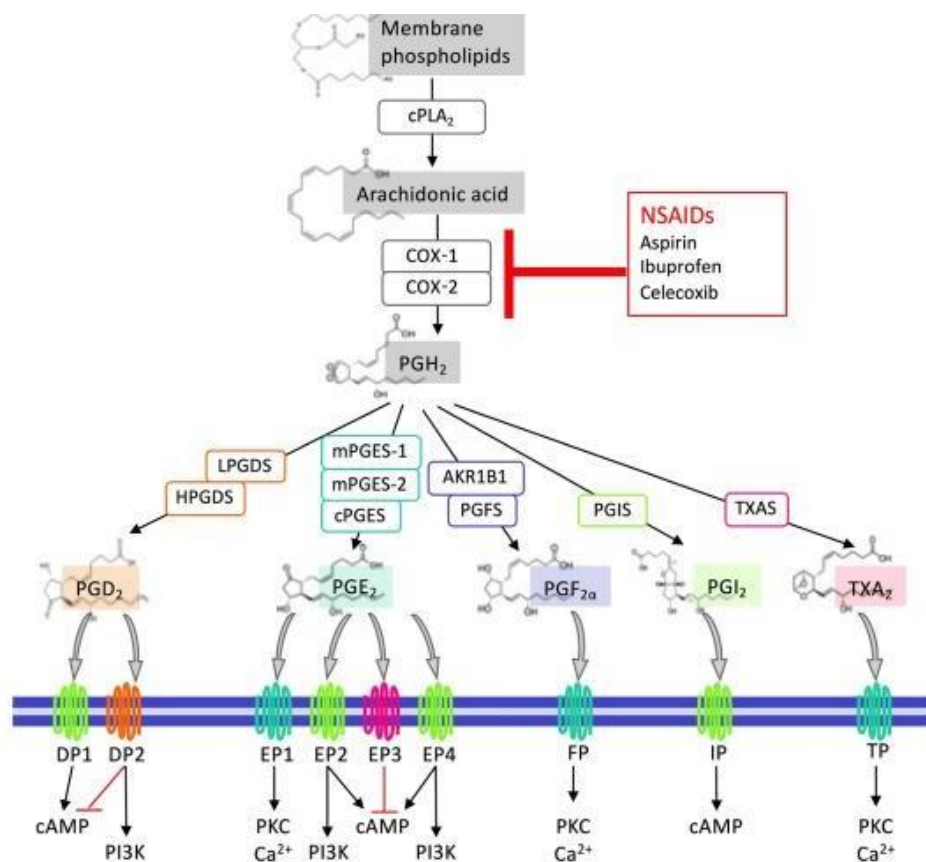
2.5.1 AINES

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) pertencem a uma classe de medicamentos utilizados comumente na clínica para o tratamento da dor, febre e doenças inflamatórias, pois promove o alívio dos sintomas de pacientes portadores de doenças crônicas como: artrite reumatoide, osteoartrite, lúpus eritematoso sistêmico, febre reumática, entre outras (HARIRFOROOSH et al., 2013). Além disso, é o tipo de terapia farmacológica mais usada para casos de dor leve e inflamatória moderada (GROSSER, T.; RICCIOTII, E.; FITZGERAL, G.A., 2017; BACCI et al., 2012). Seu

mecanismo de ação consiste na inibição da ciclooxygenase (COX), enzima responsável pela biossíntese de prostaglandinas (PGs - importantes mediadores do processo inflamatório e nociceptivo (MARTINEZ et al., 2019). Apesar de promover o alívio dos sintomas associados à dor e à inflamação, esses fármacos ocasionam efeitos adversos significativos (BACCI et al., 2012) como: hemorragia gastrointestinal, úlcera péptica, diarreia, dispepsia, inibição da agregação plaquetária, entre outros (SANDOVAL et al., 2017).

A princípio, uma grande parte dos efeitos adversos ocasionados por essa classe de medicamentos decorre da inibição da biossíntese de prostanóides provenientes da via do ácido araquidônico (AA), que é transformado em prostaglandina G2 (PGG2) e, posteriormente, em prostaglandina H2 (PGH2) pela atividade da ciclooxygenase (COX). A PGH2 é finalmente metabolizada pelas prostaglandinas sintases específicas, formando os prostanóides (figura 3).

Figura 3- Via de sinalização do ácido araquidônico.



Fonte: ROBB et al., 2020.

O mecanismo de ação dos AINES foi evidenciado por Vane, mas só foi completamente elucidado por elucidado por Simmons que constatou em sua pesquisa a existência da COX-2. É importante salientar que toda a classe que compõe os AINES é capaz de inibir as ciclooxigenases (COX), enzimas responsáveis por gerar os produtos finais do ácido araquidônico, as prostaglandinas (PGs). O AA é o precursor das PGs e está presente nas membranas celulares como um éster fosfolipídico liberado pela via da fosfolipase A2 citosólica (cPLA2), apesar de diversos estímulos serem capazes de libera-lo. Dessa forma, após ser liberado, o AA é convertido em eicosanoides através da via da COX e do processo de catalítico da enzima lipoxigenase (LOX) (SANDOVAL et al., 2017; HARIRFOROOSH et al., 2013).

Na via da COX é possível identificar duas isoformas da enzima: COX-1 e COX-2. A isoforma que está associada com o encargo de realizar a citoproteção gástrica, regulação do fluxo sanguíneo renal e agregação plaquetária é a COX-1, além de estar presente na maior parte dos tecidos. Em contrapartida, a COX-2 está expressa em regiões como o cérebro, medula espinhal e rins, e exerce funções que agem no aumentam o processo inflamatório, exceto quando desempenha funções estritamente basais. Além das duas isoformas, existe a COX-3 que não tem atividade relacionada com a produção de prostaglandina em humanos e que pode ser considerada uma variação da COX-1 (JAPIASSU, V.; NETO, S., 2022). Nesse sentido, a primeira etapa da via da COX é a biossíntese de PGs e tromboxanos (TxA).

2.5.2 Opioides

O ópio é proveniente do processo de extração do látex da papoula (*Papaver somniferum*), substância natural que foi classificada posteriormente como um narcótico por Hipócrates em 460 a.C. Os derivados do ópio podem ser classificados em três categorias: naturais, extraídos do cálice da papoula como a morfina; semissintéticos como a diacetilmorfina – conhecida como heroína; e os sintéticos, fabricados em laboratório. A nomenclatura adotada leva em consideração aspectos associados a origem da molécula e sua respectiva estrutura química. Logo, as substâncias de origem natural e algumas semissintéticas são chamadas de

opiáceos, ao passo que as derivadas de processos sintéticos são conhecidas como opioides. Seus efeitos são destinados a proporcionar ao paciente analgesia e ações hipnóticas (LEAL, R; ALENCAR, G., 2020; PEREIRA et al., 2016). Dessa forma, os opioides constituem uma das linhas de tratamento para a dor aguda e crônica moderada a intensa (ROECKEL et al., 2016). Em decorrência de seus benefícios, principalmente durante a terapêutica oncológica, o uso de opiáceos foi altamente recomendado para o manejo de pacientes com câncer para alívio da dor e para melhor a qualidade de vida, visto que esses fármacos conseguem proporcionar analgesia, ao ativar receptores pré- e pós-sinápticos localizados no SNC e SNP, culminando na diminuição de impulsos nociceptivos para as regiões do cérebro e da medula espinhal (SILVA, 2020; LEAL, R; ALENCAR, G., 2020).

Atualmente o Brasil é tido como o maior consumidor de analgésicos opioides *per capita* dentre os países da América do Sul. Todavia, dos cerca de 50% de pacientes portadores de dores agudas que estão sob tratamento medicamentoso, boa parte não está satisfeita com os resultados (CALÔNEGO, 2020). Ao se tratar de fármacos opioides, pode-se ressaltar dois efeitos colaterais que geram heterogeneidade entre si, como a hiperalgesia induzida por opioides (OIH) e a tolerância analgésica. A OIH pode ser caracterizada como a hipersensibilidade diante de estímulos dolorosos em fases crônicas da utilização de opiáceos, proporcionando a percepção de dor mais acentuada (ROECKEL et al., 2016).

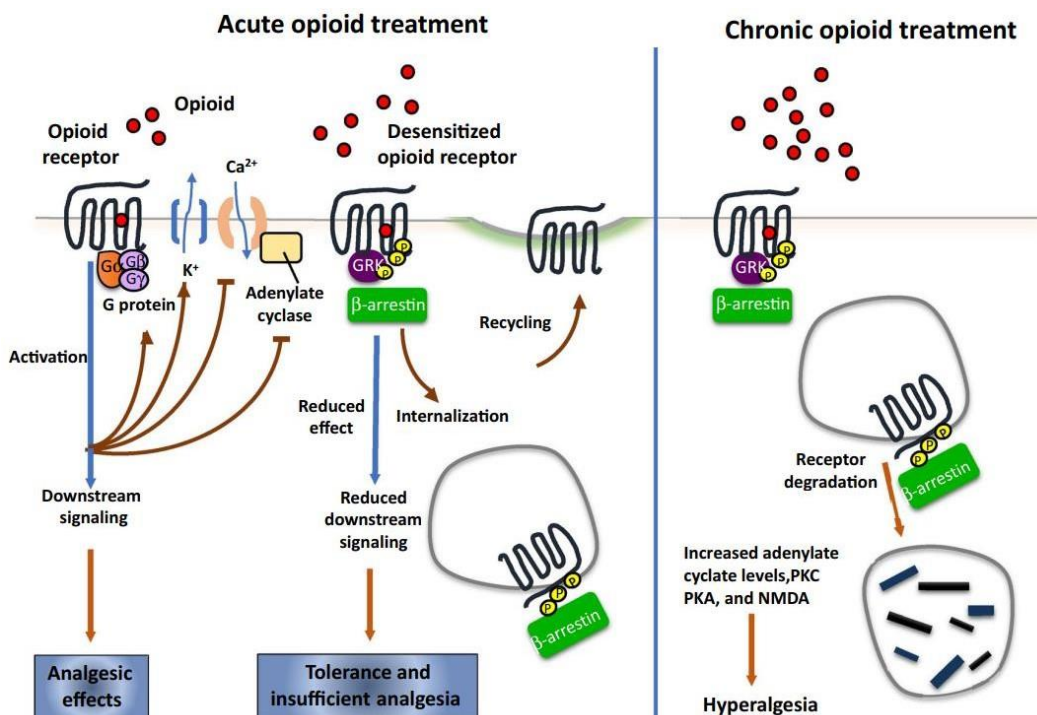
Quando existe a necessidade de aumentar de forma progressiva as doses de opiáceos com o objetivo de manter os seus efeitos, entende-se que o paciente está em um quadro de tolerância analgésica que pode ser definida pela redução gradual da analgesia estabelecida por uma determinada dose de opiáceo devido a administração em caráter crônico. Além disso, esse quadro é decorrente da presença de um desvio para direita na curva dose-resposta, que pode contribuir para o aumento de dose contínuo ou no transcorrer do uso dessa classe a longo prazo. Mediante a isso, é importante que as pesquisas avancem significativamente para que novos alvos terapêuticos sejam implementados como um recurso médico (MERCADANTE, S.; ARCURI, E.; SANTONI, A., 2019; ROECKEL et al., 2016).

2.5.2.1 Receptores opioides

Os receptores opioides estão associados a processos de reconhecimento da dor e nocicepção. Além disso, estão presentes no sistema nervoso central e periférico; na periferia são expressos por células neuroendócrinas (hipófise, adrenal), ectodérmicas e por células provenientes do sistema imunológico (CARROLL, P., 2019; STEIN, 2016). Essa classe de receptores apresenta agregação heteromérica, acoplamento com a proteína G e podem ser divididos em três famílias: mu, kappa e delta (CARROLL, P., 2019), apesar de existirem outros tipos de receptores que não são reconhecidos como receptores clássicos como o sigma, epsilon e o orfanina, por exemplo (STEIN, 2016).

A partir da interação com agonista ou antagonista de natureza sintética ou endógena com os receptores opioides, uma série de eventos são observados que culminam em alterações conformacionais e no acoplamento na porção C-terminal da proteína Gi/o heterotrimérica do receptor opioide. Em sequência, ocorre a troca de GTP para GDP e dissociação da subunidade $G\alpha$ e do dímero $\beta\gamma$. A presença de GDP favorece a inibição da adenilil ciclase e a consequente produção de cAMP, quanto os dímeros $\beta\gamma$ agem diretamente em diversos canais presentes na membrana ocasionando a diminuição da condutância de canais de Ca^{2+} ou de canais retificadores de entrada de K^+ abertos. Quando os níveis de cAMP são reduzidos ocasiona o processo de hiperpolarização da célula e diminuição da liberação de neurotransmissores pela substância cinzenta periaquedutal, constituindo a antinocicepção. A dessensibilização e a internalização do receptor é realizada através da fosforilação efetuada pelo receptor acoplado à proteína G cinase (GRK), que recruta a β -arrestina que é capaz de internalizar, degradar e diminuir a quantidade de receptores de membrana através da via dependente de clatrina ou serem degradados por lisossomos. Em contrapartida, a regulação negativa dos receptores de glutamato, ativação dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) e o aumento da ação da adenilato ciclase e da PKA estão associados a amenização dos efeitos analgésicos aumento do índice de tolerância e a quadros de hiperalgesia (figura 4) (MERCADANTE, S.; ARCURI, E.; SANTONI, A., 2019; STEIN, 2016).

Figura 4 - Via de sinalização do tratamento de dor aguda e crônica com opioides.



Fonte: MERCADANTE, S.; ARCURI, E.; SANTONI, A., 2019.

Existe uma ampla variedade de receptores μ localizados no organismo humano, em especial o MOR, que é o principal alvo dos opiáceos utilizados na clínica. Esse receptor está localizado no SNC e no sistema nervoso periférico (SNP) e sua ativação proporciona o estado de analgesia. Sua estrutura consiste em um domínio transmembranar acoplado à proteína G (GPCR), codificada por intermédio do gene OPRM1 em seres humanos (PATRICK CARROLL, 2019; ROECKEL et al., 2016). Os receptores opioides também apresentam potencial de inibir outros canais (receptores de potencial transitório vanilóide tipo 1 (TRPV1) e os canais iônicos sensíveis a ácido (ASICs), por exemplo, proporcionando a diminuição da transmissão de estímulos nociceptivos e alívio da dor (STEIN, 2016). Em relação ao sistema opioide endógeno, podemos destacar que o mesmo está relacionado à modulação da dor em situação de estresse, especialmente em casos em que a sobrevivência do indivíduo está sendo posta em risco (RIBEIRO, 2019). Dessa forma, os receptores e as substâncias endógenas que fazem parte desse grupo também estão associadas em promover efeitos analgésicos nos sistemas nociceptivos centrais e periféricos (SNEDDON, L., 2018). No intuito de exercer esse objetivo, as vias endógenas dispõem

de uma série de neuropeptídeos opioides, denominados de endorfinas, divididas em três classes: encefalinas, dinorfinas e β -endorfinas. Por sua vez, as encefalinas estabelece uma interação com os receptores δ , enquanto as dinorfinas com κ e as β -endorfinas com receptores μ e δ . (RIBEIRO, 2019).

2.6 PLANTAS AROMÁTICAS

Os produtos naturais consistem em uma fonte rica de compostos dotados de propriedades bioativas, capazes de tratar de diversas enfermidades (WANG et al., 2019). A *Food and Drug Administration* (FDA), até o final do ano de 2013, autorizou cerca de 547 produtos naturais e seus derivados para uso (RAO et al., 2019). Contudo, apenas 6% das plantas superiores foram estudadas a fim de avaliar o seu potencial farmacológico (WANG et al., 2019). Com isso, torna-se evidente a necessidade de mais pesquisas dada a diversidade de moléculas que podem ser isoladas dessas plantas, bem como seus potenciais farmacológicos (RAO et al., 2019). Embora seja uma prática medicinal antiga, o uso de plantas medicinais tem sido usado na atualidade para prevenção de doenças, tratamento e para induzir ações psicoativas relacionadas com a consciência, emoção e cognição (DONATELLO et al., 2020; RENAN et al., 2018).

As plantas aromáticas compõem cerca de 10% do reino vegetal com aproximadamente 17.000 espécies em todo o mundo. Suas propriedades, aroma e a mistura de compostos voláteis evidenciados chamam a atenção para pesquisas com enfoque no design de novas moléculas bioativas com menos efeitos colaterais (FITSIOU, E.; PAPPA, A., 2019). Em virtude da sua alta disponibilidade em plantas aromáticas, os óleos essenciais podem encontrados em todos os órgãos vegetais como: sementes, frutos, madeira, brotos, folhas, raízes, madeira ou até mesmo na casca (VALDIVIESO-UGARTE et al., 2019). Os óleos essenciais, devido a sua lipofilicidade, são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica e ocasionar ações no sistema nervoso central conforme já observado em modelos animais (RENAN et al., 2018). Os terpenos, compostos encontrados abundantemente na composição dos óleos essenciais, consistem em moléculas com duas unidades de isopreno, compreendendo estruturas cíclicas ou acíclicas e nomenclatura definida a partir da quantidade de átomos de carbono presentes na cadeia principal. Os monoterpenos, por sua vez são hidrocarbonetos com fórmula, $C_{10}H_{16}$, como é o

caso do linalol.

2.6.1 Linalol

O Linalol (Lin-3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol) é um monoterpene acíclico que possui dois enantiômeros, o (R)-(-)-linalol e o (S)-(+)-linalol, sendo comumente encontrado em várias espécies de plantas aromáticas como: *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (*Poaceae*), *Ocimum sanctum* L. (*Lamiaceae*), *Jasminum subtriplinerve* Blume (*Oleaceae*), *Lavandula angustifolia* Mill. (*Lamiaceae*), *Melissa officinalis* L. (*Lamiaceae*) e *Rosmarinus officinalis* L. (*Lamiaceae*). Além disso, tem um papel importante em iniciar a biossíntese de outros álcoois e aldeídos (WESTON-GREEN, CLUNAS; NARANJO, 2021; MIGHELI et al., 2021; SOUTO-MAIOR, et al 2017).

Na indústria, o linalol é empregado como uma essência na confecção de perfumes, shampoos, sabões e detergentes (SOUTO-MAIOR, et al 2017), podendo ser usado como condimento e na indução de polinizadores em ambientes naturais (SABOGAL- GUAQUETA et al., 2018). Os óleos provenientes dos linalol quando empregados como fragrância não apresentam potencial em ocasionar efeitos irritantes, genotóxicos ou mutagênicos quando em contato com a pele humana, conforme descrito em vários estudos (WESTON-GREEN, CLUNAS; NARANJO, 2021).

O linalol apresenta uma série de efeitos farmacológicos descritos na literatura, a saber: efeitos anticonvulsivante, ansiolítico, sedativo, hipnótico, antidepressivo, antinociceptivo, antioxidante, antineoplásico, antileishmanicida e antimicrobiano (MIGHELI et al.,2021; SABOGAL-GUAQUETA et al., 2018; SOUTO-MAIOR, et al 2017; TASHIRO et al, 2016). Do ponto de vista farmacodinâmico, o composto parece atuar nos sistemas opióide, colinérgico e dopaminérgico, além de ativar canais de K⁺ e reduzir as respostas perante estímulos nociceptivos (MIGHELI et al.,2021; DONATELLO et al., 2020). Foi observado também que o monoterpene parece modular a neurotransmissão glutamatérgica, via receptor NMDA (SABOGAL-GUAQUETA et al., 2018). Foi observado também que o linalol reduziu a produção de citocinas e de mediadores inflamatórios como óxido nítrico, NF-kB, TNF- α , IL-6 e IL-1 β em 616 macrófagos

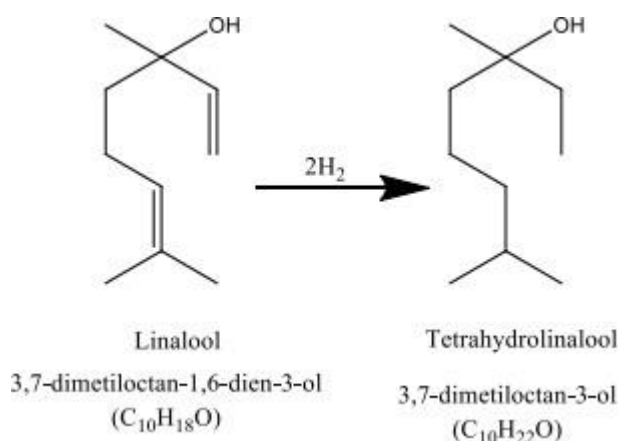
de camundongos (RAW 264.7) e em linhagens de células glias (BV2) (WESTON-GREEN, CLUNAS; NARANJO, 2021), na presença de lipopolissacarídeo. Ademais, o enantiômero (R)-(-)-linalol apresentou efeito antioxidante em lesões induzidas por privação/reoxigenação de oxigênio-glicose. Por fim, foi observado que o linalol parece interagir com os receptores da adenosina A1 e A2A, promovendo uma diminuição da atividade da NOS com conseqüente redução da produção/liberação de NO (MIGHELI et al.,2021).

2.6.2 Tetraidrolinalol

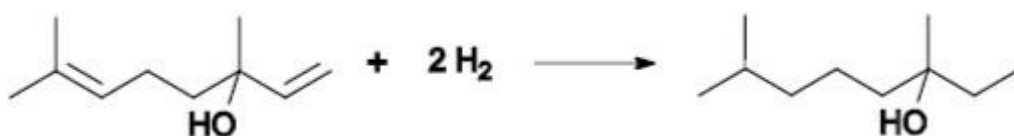
O Tetraidrolinalol (2,6-dimentil-6-octanol) é um líquido incolor, com peso molecular de 158,29 g/mol e fórmula química C₁₀H₂₂O. Do ponto de vista químico, esse composto é classificado como um monoterpene álcool acíclico derivado do metabolismo do linalol, através de uma reação de hidrogenação da ligação dupla endocíclica (Figura 5) (OLIVEIRA, 2010).

Figura 5 - Estrutura química do tetraidrolinalol (A) obtido de SILVA et al., 2022; e (B) Síntese do tetraidrolinalol através da reação de hidrogenação do linalol, extraída de OLIVEIRA, 2010.

(A)



(B)



O tetraidrolinalol teve seu uso aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) e *Flavor and Extract Manufacturers' Association* (FEMA) como aromatizante na indústria de cosméticos e produtos de limpeza. O uso como aditivo alimentar, entretanto, não foi aprovado pela International Joint *FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA) com a alegação de baixa disponibilidade de estudos com o THL (LAPCZYNSKI et al., 2008). Apesar de ser derivado do linalol, um monoterpeno amplamente estudado, as pesquisas envolvendo o THL ainda são escassas. Estudos desenvolvidos em nosso laboratório têm identificado as seguintes propriedades farmacológicas do tetraidrolinalol associadas a efeitos: ansiolítico, anticonvulsivante, anti-inflamatório, antidepressivo e antinociceptivo (SILVA et al., 2022; SALVADORI, 2019; OLIVEIRA et al., 2010).

Dessa forma, levando-se em consideração que: 1) os efeitos terapêuticos observados com o uso de monoterpenos os tornam excelentes alternativas para a síntese de novos fármacos para o tratamento de diversas sintomatologias (MOHTASHAMI; SHAKERI; JAVADI, 2019; SANTOS et al., 2019); 2) o linalol apresenta atividade antinociceptiva já bem descrita na literatura, sendo capaz de reduzir a dor neuropática, bem como, diminuir contorções abdominais induzidas pelo acético em modelos animais (DONATELLO et al., 2020) e 3) trabalhos realizados em nosso laboratório apontam um potencial antinociceptivo do THL em modelos animais de contorções abdominais induzidas por ácido acético, placa quente e formalina (SALVADORI, 2019; OLIVEIRA et al., 2010), o presente trabalho busca investigar os mecanismos subjacentes ao efeito antinociceptivo do composto, através de metodologias *in silico* e *in vivo*.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

- ❖ Investigar o efeito antinociceptivo do tetrahidrolinalol através de metodologias *in silico* e *in vivo*.

3.2 ESPECÍFICOS

- ❖ Prospectar, através do *docking* molecular, os principais alvos farmacológicos envolvidos no efeito antinociceptivo do tetrahidrolinalol;
- ❖ Avaliar o efeito do tetrahidrolinalol sobre a coordenação motora de camundongos submetidos ao teste do *rota-rod*;
- ❖ Investigar o efeito antinociceptivo do tetrahidrolinalol em camundongos submetidos ao modelo das contorções abdominais induzidas por ácido acético;
- ❖ Investigar o efeito antinociceptivo do tetrahidrolinalol em camundongos submetidos ao modelo da formalina;
- ❖ Investigar o efeito antinociceptivo do tetrahidrolinalol em camundongos submetidos ao modelo da placa quente;
- ❖ Sugerir, a partir das metodologias anteriormente descritas, um possível mecanismo de ação que explique o efeito antinociceptivo do tetrahidrolinalol.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1 Local da pesquisa

As metodologias *in vivo* foram realizadas no Laboratório de Psicofarmacologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), sob orientação do Professor Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe e co-orientação do Professor Dr. Reinaldo Nobrega de Almeida. Ademais, o estudo de modelagem molecular *in silico* foi realizado em parceria com a Professora Dr^a Luciana Scotti farmacêutica do Hospital Lauro Wanderley e pertencente ao departamento de química da UFPB.

4.1.2 Drogas, fármacos e reagentes

O Tetrahidrolinalol (Sigma – Aldrich EUA) foi cedido pelo Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa, coordenador do Laboratório de Química Farmacêutica da UFPB e emulsificado com Tween 80% (0,5%) em solução salina a 0,9%. As demais substâncias utilizadas foram diluídas em soro fisiológico e administradas por via oral em um volume total de 0,1 mL/10 g.

Quadro 1 - Substâncias utilizadas durante os ensaios experimentais

Substâncias	Procedência
Ácido acético glacial P. A	Merck, Brasil
Água destilada	IPeFarM/UFPB, Brasil
Etanol absoluto	IPeFarM/UFPB, Brasil
Formaldeído P. A 37%	Vetec, Brasil
Indometacina	Merck Life Science, Brasil
Morfina	Cristália, Brasil
Naloxona	Cristália, Brasil
Tetrahidronalol	Sigma-Aldrich® Chemical (St. Louis, MO, USA)

Tween 80 (Polissorbato 80)	Vetec, Brasil
-----------------------------------	---------------

4.1.3 Animais e aspectos éticos

Foram utilizados camundongos Swiss (*Mus musculus*), albinos, adultos, machos, pesando entre 30 a 40 gramas, com aproximadamente 3 meses de idade, provenientes da Unidade de Produção Animal – UPA do Instituto de Pesquisa de Fármacos e Medicamentos – IPeFarM da Universidade Federal da Paraíba – UFPB. Os animais foram agrupados em gaiolas de polietileno, contendo no máximo 08 camundongos por gaiola, mantidos sob condições monitoradas de temperatura ($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$), com livre acesso à ração tipo pellets e água filtrada. Os testes foram efetuados entre 12h00 e 17h00 p.m, seguindo precisamente as recomendações presentes no Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório dos Institutos Nacionais de Saúde e do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA. Os protocolos experimentais foram submetidos previamente à Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA - UFPB), certidão nº 1739290620, com período de vigência de 08/2020 a 10/2021 (ANEXO A) e conduzidos de acordo com as diretrizes éticas propostas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA).

Ao final dos experimentos, os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal da associação cloridrato de cetamina (100 mg/kg) e cloridrato de xilazina (20 mg/kg) e posteriormente eutanasiados por deslocamento cervical (CONCEA, 2018; Damy et al., 2010). Todos os resíduos biológicos resultantes foram descartados de acordo com as suas características específicas, segundo o Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde – PGRSS elaborado pelo laboratório. Primordialmente, as carcaças dos animais foram acondicionadas em sacos e/ou recipientes impermeáveis contendo uma etiqueta de identificação, resistentes à punctura, vazamentos e ruptura, sendo capaz de suportar os processos de descarga e transporte da unidade geradora até o destino final (CONCEA, 2016).

Durante todo o processo de experimentação, a avaliação dos animais foi realizada a partir da metodologia de simples-cego (*single-blind*) em que os participantes não detinham conhecimento sob qual grupo estavam analisando (ROSARIO-FILHO, 2018). Além disso, em consonância com o princípio dos 3'Rs (redução, substituição e refinamento), foi realizado o cálculo amostral no intuito de

diminuir o uso desnecessário de modelos animais, melhorando o seu bem-estar e empregando somente os testes biológicos necessários.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Metodologias in silico

O *docking* molecular foi utilizado para prospectar os possíveis alvos farmacológicos envolvidos no efeito antinociceptivo do THL. A estruturas 3 D das proteínas foram obtidas do *Protein Data Bank* (PDB) (QUADRO 2) (CHAUDHARY, K; MISHRA, N., 2016; THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M.H., 2006).

Quadro 2 - Informações sobre as proteínas selecionadas no estudo de modelagem molecular in silico.

Proteína	PDB ID/Homologia	Controle	Resolução
Receptor opioide μ	6DDE	Morfina	3.50 Å
Receptor opioide μ	6DDF	Morfina	3.50 Å
PLA2	1DCY	Inibidor seletivo (LY311727)	2.70 Å
PLA2	1POD	Inibidor seletivo (LY311727)	2.10 Å
COX2	1DDX	Celecoxibe	3.00 Å
COX2	1CVU	Celecoxibe	2.40 Å
TRPV1	-	Capsaicina	3.27 Å

Inicialmente foram removidas todas as moléculas de água e cofatores da estrutura cristalina das proteínas selecionadas. Dessa forma, para verificar o grau de confiabilidade do método, o desvio quadrático médio (RMSD) foi calculado a partir das poses geradas e estrutura original. O RMSD fornece o modo de conexão próximo à estrutura experimental e é considerado bem-sucedido se o valor for inferior a 2,0 Å. Em seguida, foi utilizado o software Molegro Virtual Docker v.6.0.1 (MVD) (THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M.H., 2006) com os parâmetros predefinidos no mesmo software. Um ligante complexado foi usado para definir o sítio ativo e, em seguida, os compostos foram importados para analisar a estabilidade do sistema

através das interações identificadas com o sítio ativo da proteína, tomando como referência o valor energético do MolDock Score e Plantscore (PINZI, L.; RASTELLI, G., 2019; YURIEV, E. et al, 2015). O algoritmo MolDock SE (Simplex Evolution) foi usado com os seguintes parâmetros: um total de 10 execuções com um máximo de 1.500 iterações usando uma população de 50 indivíduos, 2.000 etapas de minimização para cada resíduo flexível e 2.000 etapas de minimização global por corre. A função de pontuação MolDock Score (GRID) foi usada para calcular os valores de energia de encaixe. Um GRID foi fixado em 0,3 Å e a esfera de busca foi fixada em 15 Å de raio. Para a análise da energia do ligante, foram avaliadas as interações eletrostáticas internas, ligações de hidrogênio internas e torções sp²-sp².

4.2.2 Metodologias *in vivo*

4.2.2.1 Teste do *rota-rod*

O teste do rota-rod investiga o efeito de drogas sobre o tônus muscular ou coordenação motora do animal. Para este teste, os camundongos foram selecionados em uma sessão de treino, 24 horas antes do experimento, que consistiu em colocar os animais com as quatro patas sobre uma barra de 2,5 cm de diâmetro, elevada a 25 cm do piso. Os camundongos capazes de permanecer na barra giratória (12 rpm) por mais de 180 segundos foram selecionados para o teste (ANAYA-EUGENIO et al., 2016; OLIVEIRA, 2010). Seguidas 24 horas, os camundongos aptos foram divididos em 5 grupos compostos por 6 animais, tratados com veículo ou diazepam 4 mg.kg⁻¹ (i.p) ou THL 50 mg.kg⁻¹ (v.o) ou THL 100 mg.kg⁻¹ (v.o) ou THL 200 mg.kg⁻¹ (v.o). Decorridos 30 – 60 minutos, cada camundongo foi colocado individualmente sobre a barra giratória para registro do tempo permanência no aparelho.

4.2.2.2 Modelo das contorções abdominais induzidas por ácido acético

Esta metodologia é usada como um modelo geral para avaliação da atividade antinociceptiva de compostos diversos. A administração intraperitoneal de uma solução de ácido acético 0,9% causara irritação local, levando à produção de

mediadores pró-inflamatórias como a substância P, bradicinina, prostaglandinas, bem como as citocinas IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α , levando o animal a apresentar contorções da parede abdominal seguidas de torção do tronco e extensão dos membros posteriores, como resposta reflexa à irritação peritoneal (SILVA et al., 2013).

Os camundongos aptos foram divididos em 6 grupos compostos por 6 animais, tratados com veículo ou indometacina 30 mg.kg⁻¹ (i.p) ou morfina 5 mg.kg⁻¹ (i.p) ou THL 50 mg.kg⁻¹ (v.o) ou THL 100 mg.kg⁻¹ (v.o) ou THL 200 mg.kg⁻¹ (v.o). Decorridos 30 – 60 minutos, cada animal recebeu uma injeção intraperitoneal de ácido acético 0,9%, e o número de contorções abdominais foi registrado durante 15 minutos (HUANG et al., 2010).

4.2.2.3 Modelo da placa quente

Essa metodologia permite avaliar o tempo que os animais permanecem sobre uma placa metálica aquecida até reagirem ao estímulo térmico. Esse método é bastante empregado para a detecção de substâncias analgésicas de efeito central, e foi inicialmente descrito por Woolfe & Macdonald (1944). Nesse sentido, os analgésicos centrais apresentam o potencial de aumentar o tempo de resposta dos animais no teste da placa quente (SILVA, 2022).

Inicialmente, os animais foram divididos em 5 grupos compostos por 6 camundongos tratados com veículo ou morfina 5 mg.kg⁻¹ (i.p) ou THL 50 mg.kg⁻¹ (v.o) ou THL 100 mg.kg⁻¹ (v.o) ou THL 200 mg.kg⁻¹ (v.o). Decorridos 30 – 60 minutos, cada camundongo foi colocado individualmente sobre a placa de metal previamente aquecida a $55 \pm 1^{\circ}\text{C}$ para registro do tempo necessário para que os animais apresentem o reflexo de lamber, morder ou levantar as patas sobre a placa (tempo de latência para a resposta nociceptiva). As aferições foram realizadas a cada 30 minutos, iniciando no momento da administração da substância (Tempo 0) e terminando 120 minutos após a administração.

4.2.2.4 Modelo da formalina

Nesta metodologia, 20 μL de uma solução de formalina 2,5% é administrada na região subplantar da pata posterior direita do animal, proporcionando uma estimulação

dos nociceptores, sendo o tempo de lambida da pata considerado indicativo de uma resposta nociceptiva (SOUZA et al., 2000). O modelo em questão compreende duas fases: a primeira fase ocorre normalmente nos 5 primeiros minutos após a injeção da formalina e, provavelmente, é resultante da estimulação direta dos nociceptores, levando a uma resposta neurogênica. A inibição dessa fase é indicativa de drogas analgésicas que atuam em nível central (AZEVEDO et al., 2007; HEIDARI et al., 2009). Em seguida, há uma interfase de aproximadamente 10 minutos caracterizada por mecanismos inibitórios da dor. A segunda fase (15 – 30 minutos) é caracterizada principalmente por uma resposta inflamatória, gerada tanto pela estimulação de nociceptores como pela liberação de mediadores inflamatórios como prostaglandinas, serotonina, histamina e bradicinina (BATISTA et al., 2016).

Inicialmente, foram selecionados 7 grupos com 6 animais, que foram tratados com veículo ou morfina 5 mg.kg⁻¹ (i.p) ou indometacina 30 mg.kg⁻¹ (i.p) ou THL 50 mg.kg⁻¹ (v.o) ou THL 100 mg.kg⁻¹ (v.o) ou THL 200 mg.kg⁻¹ (v.o). Decorridos 30 – 60 minutos, cada animal foi inserido individualmente em uma caixa de caixa triangular, em ângulo de 45°, com os lados e altura medindo 25 cm cada, contendo duas paredes espelhadas e uma de vidro transparente, dando ao observador um maior campo de visão a fim de registrar o comportamento do roedor (tempo de lambadura da pata). Essa metodologia também foi selecionada para avaliar um possível envolvimento do receptor opioide no mecanismo de antinociceptivo do THL. Para efetuar essa análise foram utilizados 5 grupos compostos por 6 animais, que foram tratados com veículo ou morfina 5 mg.kg⁻¹ (i.p) ou morfina 5 mg.kg⁻¹ (i.p) + naloxona 4 mg.kg⁻¹ (i.p) ou THL 50 mg.kg⁻¹ (v.o) ou THL 50 mg.kg⁻¹ (v.o) + naloxona 4 mg.kg⁻¹ (i.p).

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados de acordo com a normalidade das variáveis. Os dados paramétricos foram representados pela média ± erro padrão da média (E.P.M.) e analisados por ANOVA uni-direcional, seguida do pós-teste de Tukey. Foi considerado o nível crítico para rejeição da hipótese de nulidade os valores de p menores que 0,05 ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 METODOLOGIAS *IN SILICO*

O THL foi submetido ao rastreio por meio de *docking* molecular em quatro tipos de alvos de diferentes PDBs. Os resultados foram gerados usando duas funções de pontuação: o Moldockscore e o Plantscore. Dessa forma, os valores mais negativos ou próximos ao fármaco padrão indicaram melhores previsões para possíveis interações entre o monoterpeno e os alvos selecionados, conforme apresentado no quadro 3.

Quadro 3 – Valores de energia de ligação obtidos do docking molecular com o THL e os respectivos alvos selecionados.

Proteína	PDBID	THL		Controle positivo	
		Moldockscore	Plantscore	Moldockscore	Plantscore
Receptor opioide	6DDE	-55.66	-47.35	-77.84	-36.18
Receptor opioide	6DDF	-59.42	-51.06	-78.92	-61.86
FLA2	1DCY	-66.70	-56.42	-138.81	-106.61
FLA2	1POD	-53.01	-34.59	-82.63	76.94
COX2	1DDX	-76.45	-61.75	-161.86	-126.07
COX2	1CVU	-70.29	-59.66	-144.96	-116.803
TRPV 1	3J9J	-40.94	-34.16	-62.18	-38.30

A partir dessa análise foi possível observar que o THL apresentou possíveis interações com o receptor opioide e com o receptor TRPV1, em decorrência dos valores negativos próximos ao grupo controle. Já os demais alvos moleculares, não demonstraram resultados satisfatórios que indicassem possível envolvimento do monoterpeno com a COX-2 e com a FLA2.

No intuito de validar os resultados obtidos, todos os dados adquiridos foram submetidos ao redocking do ligante cristalográfico sendo calculados através do Desvio da Raiz Quadrada Média (RMSD) com as poses de ajuste analisadas em comparação com a estrutura cristalina. Deste modo, os valores da RMSD que fossem inferiores a 2 Å seriam considerados ideais para seguir com a metodologia *in silico*. Durante a

análise de redocking, foi evidenciado que a maioria dos valores RMSD estavam abaixo de 2,0 Å, ou seja, as poses geradas posicionaram o ligante corretamente no local ativo (Quadro 4).

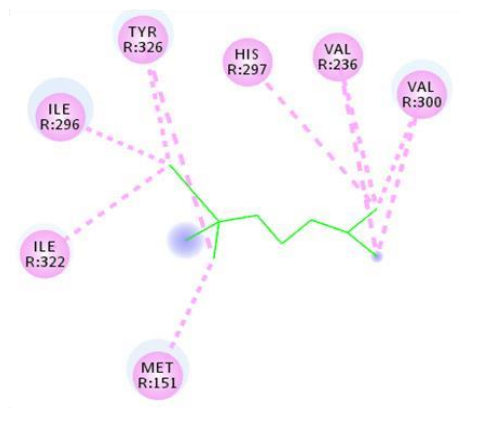
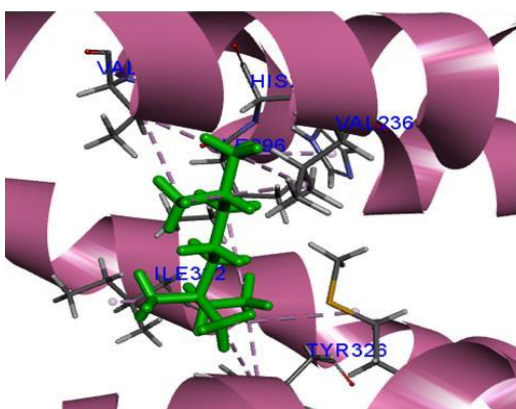
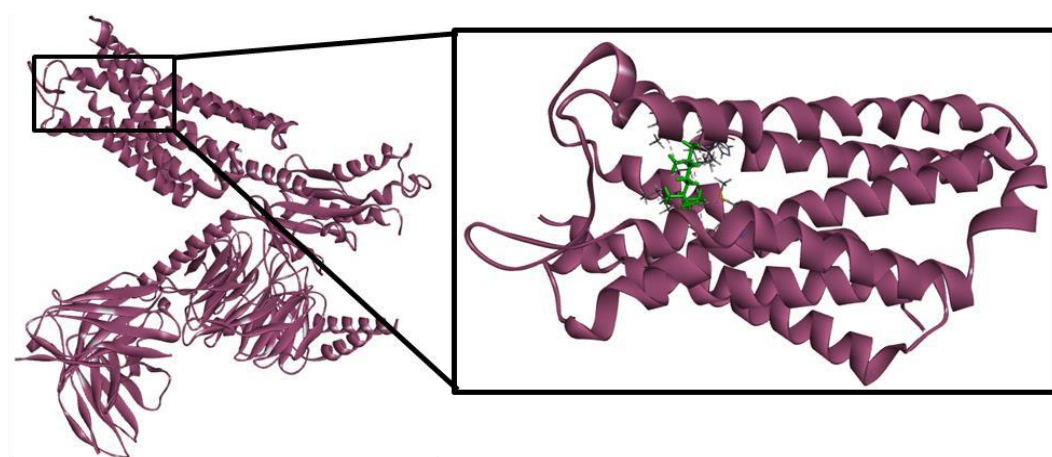
Quadro 4 - Valores de RMSD para as proteínas selecionadas no estudo.

Proteína	PDB	Ligante PDB	RMSD
Receptor opioide	6DDE	Damgo	0.52
Receptor opioide	6DDF	Damgo	1.63
FLA2	1DCY	I3N	0.36
FLA2	1POD	I3N	7.95
COX2	1DDX	PGX	0.45
COX2	1CVU	ACD	0.66
TRPV1	3J9J	-	-

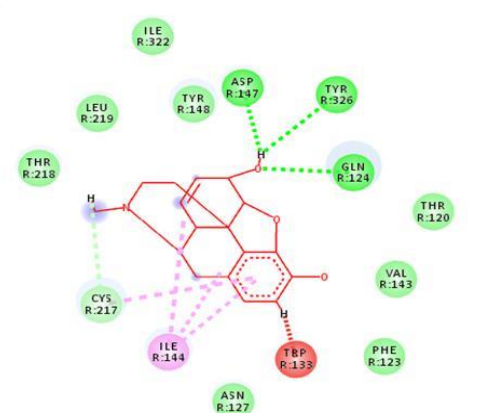
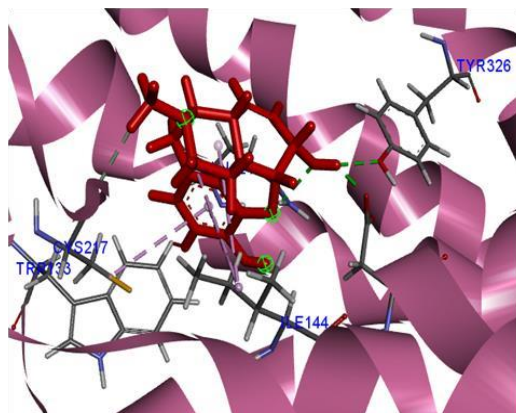
É importante destacar que as interações entre o THL e o receptor opioide, demonstraram resultados mais significativos do que quando comparado com os dados obtidos com o fármaco padrão – a morfina. Além disso, foram observadas as seguintes interações (figura 6): ligações de hidrogênio com os aminoácidos Gln124, Asp147 e Tyr326; uma interação de van der Waals com o aminoácido Cys217; uma ligação hidrofóbica com o aminoácido Ile144 e uma ligação estérica Trp133. Contudo, em comparação com o THL, a morfina formou mais ligações estáveis, no entanto, com uma ligação estérica que evidencia uma baixa afinidade de ligação ao receptor quando contraposto o monoterpeno.

Já as associações entre o THL e o receptor TRPV1 demonstradas na figura 7 foram: interações hidrofóbicas entre o monoterpeno e os aminoácidos Ala15, Leu18, Phe92, Met109 e Met124. Ademais, o controle, capsaicina, apresentou interações eletrostáticas com os aminoácidos Glu14, Phe92, Met109, Phe141 e uma interação hidrofóbica com o aminoácido Leu18.

Figura 6 - Interações 2D e 3D entre o THL, a morfina e o receptor opioide. As interações hidrofóbicas são destacadas em rosa, as interações de Van der Waals são destacadas em verde claro, as interações estéricas são destacadas em vermelho e as ligações e as ligações de hidrogênio são destacadas em verde escuro.

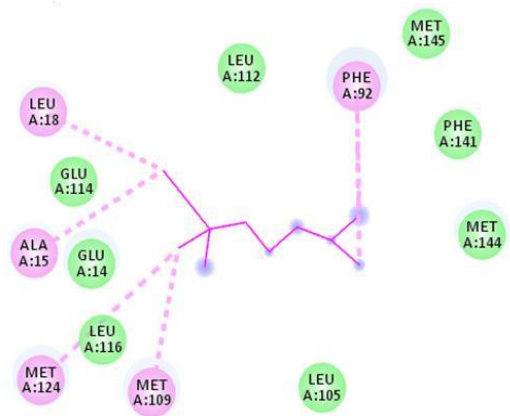
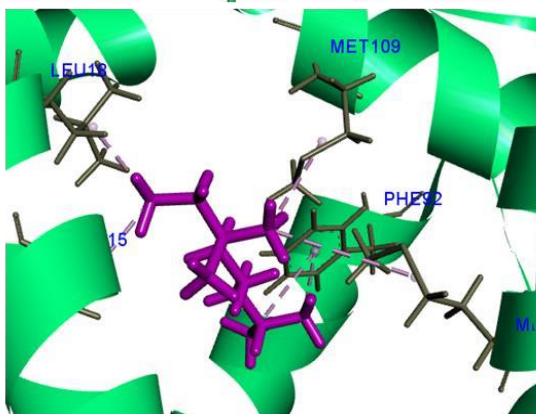
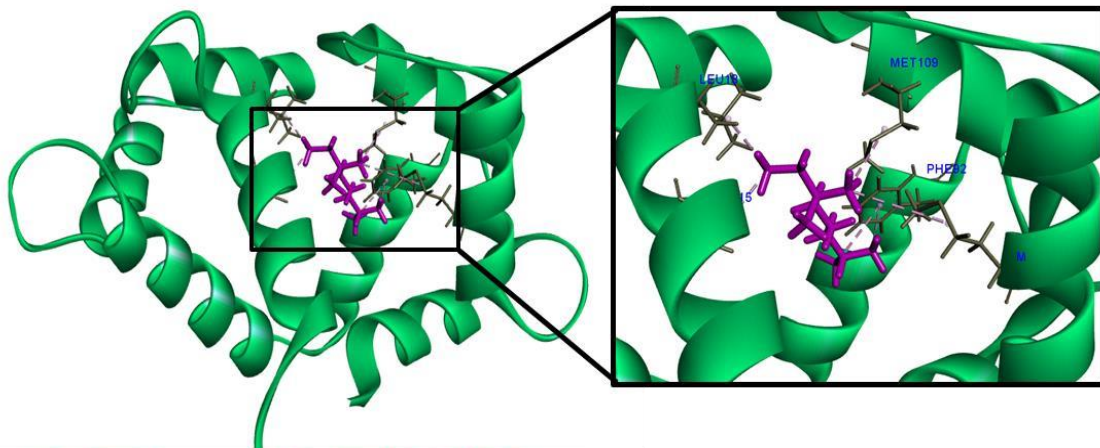


Compound THL

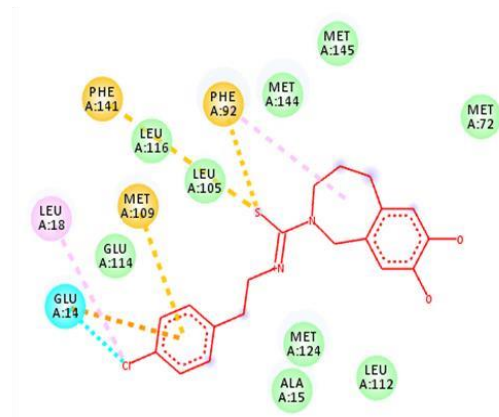
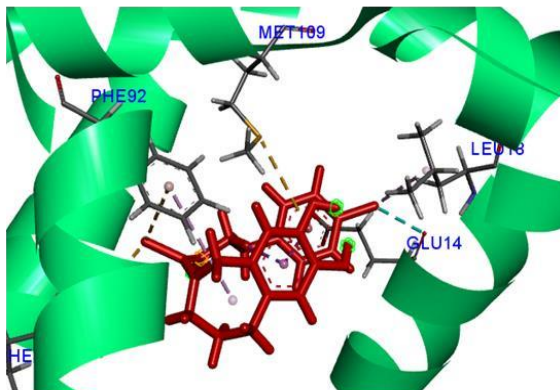


Morfina

Figura 7 - Interações 2D e 3D entre o THL, a capsaicina e o receptor TRPV1. As interações hidrofóbicas são destacadas em rosa, as interações de van der Waals são destacadas em verde claro e as ligações de hidrogênio são destacadas em verde escuro.



Compound THL



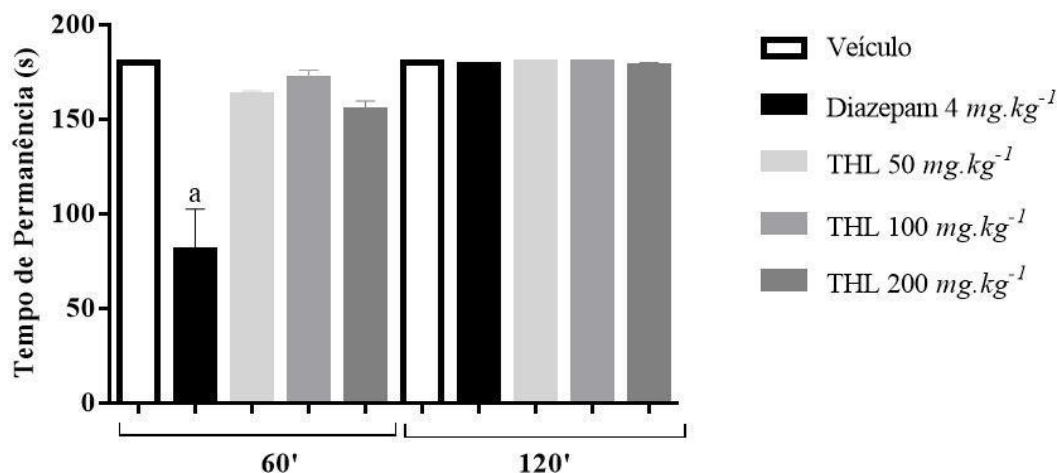
Capsazepine

5.2 METODOLOGIAS *IN VIVO*

5.2.1 Teste do *rota-rod*

Os resultados obtidos demonstram que o tempo de permanência dos roedores no aparelho não apresentou diferença significativa entre os grupos tratados com THL nas doses de 50 mg.kg⁻¹ (162,8 ± 2, 2s; 180,0 ± 0,0 s), 100 mg.kg⁻¹ (171,3 ± 4,7 s; 180,0 ± 0,0 s) e 200 mg.kg⁻¹ (154,5 ± 5,2 s; 178,3 ± 1,6 s) nos tempos de 60 e 120 minutos, respectivamente, em relação ao grupo tratado com veículo (180,0 ± 0,0 s; 180,0 ± 0,0 s). De forma contrária, o tratamento com diazepam 4 mg.kg⁻¹ reduziu significativamente o tempo de permanência dos camundongos na barra giratória, no tempo de 60 minutos (81,0 ± 21.6 s; 178,5 ± 5.2 s), em relação ao veículo (figura 8).

Figura 8 - Efeitos do THL em camundongos submetidos ao teste de *rota-rod*.



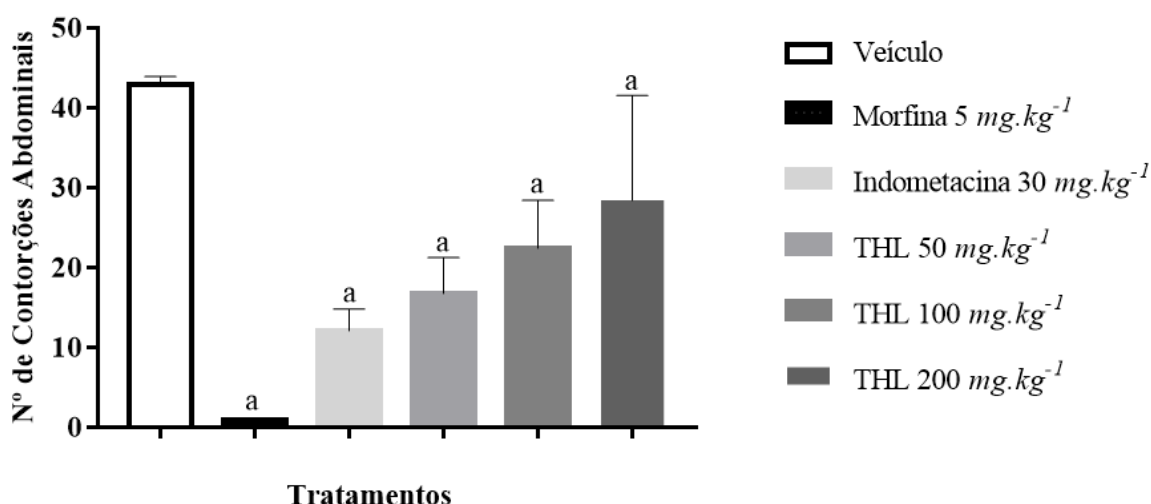
As colunas representam a média ± E.P.M. (n = 6), analisada por ANOVA uni-direcional, seguida do teste de Tukey. "a" vs veículo quando $p < 0,05$.

5.2.2 Modelo das contorções abdominais induzidas por ácido acético

Os resultados obtidos do modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético são observados na figura 9. O tratamento com THL 50 mg.kg⁻¹ (16,8 ± 4,5), 100 mg.kg⁻¹ (22,5 ± 6,0) e 200 mg.kg⁻¹ (28,5 ± 5,3) diminuiu, significativamente, o

número de contorções abdominais em relação ao veículo ($43 \pm 1,0$). Não foram observadas, entretanto, diferenças significativas entre as diferentes doses do monoterpeno. De forma semelhante, os grupos tratados com morfina 5 mg.kg^{-1} ($1,0 \pm 0,0$) e indometacina 30 mg.kg^{-1} ($12,1 \pm 2,7$) apresentaram uma redução significativa no número de contorções abdominais quando comparados ao veículo.

Figura 9 - Efeito do THL em camundongos submetidos ao teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético.



As colunas representam a média \pm E.P.M. ($n = 6$), analisadas por ANOVA uni-direcional, seguida do teste de Tukey. “a” vs controle negativo quando $p < 0,05$.

5.2.3 Modelo da placa quente

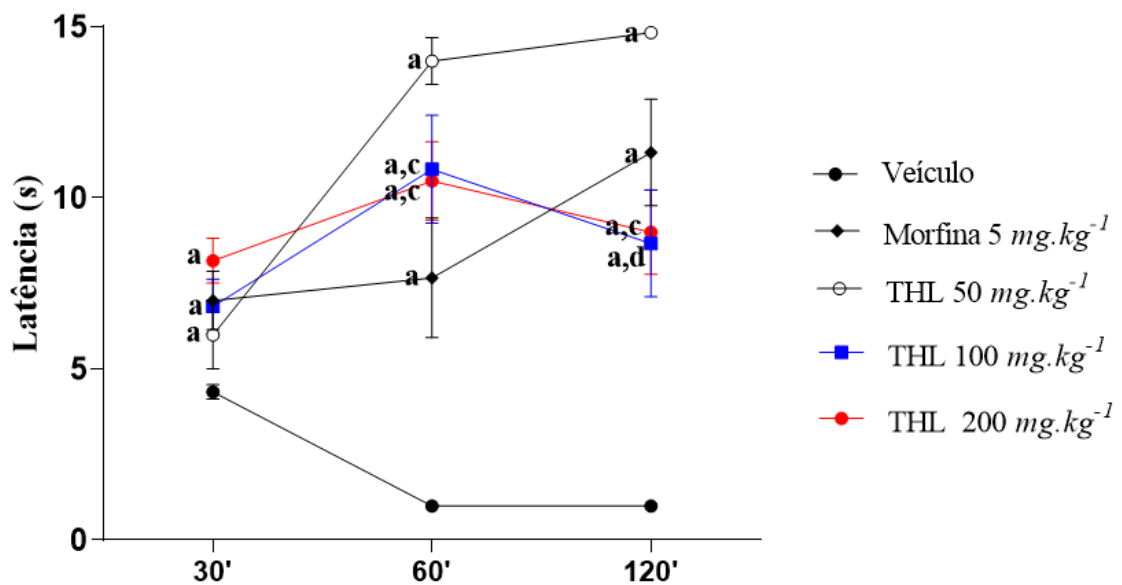
No modelo da placa quente, a observação foi realizada em três tempos diferentes (figura 10). No tempo de 30 minutos, o tratamento com morfina 5 mg.kg^{-1} não exibiu diferença significativa no tempo de latência quando comparado com o veículo ($4,3 \pm 0,2 \text{ s}$). De maneira diferente, o tratamento com THL 50 mg.kg^{-1} ($14 \pm 0,6 \text{ s}$), THL 100 mg.kg^{-1} ($10,8 \pm 1,5 \text{ s}$) e THL 200 mg.kg^{-1} ($10,5 \pm 1,1 \text{ s}$) aumentou, de maneira significativa, o tempo de permanência dos animais na placa aquecida quando contraposto ao veículo.

No tempo de 60 minutos foi observado que o tratamento com morfina 5 mg.kg^{-1} ($11,3 \pm 1,5 \text{ s}$), THL 50 mg.kg^{-1} ($14 \pm 0,1 \text{ s}$), THL 100 mg.kg^{-1} ($8,6 \pm 1,5 \text{ s}$) e THL 200 mg.kg^{-1} ($9,4 \pm 1,4 \text{ s}$) aumentou significativamente a latência para a resposta

nociceptiva em relação ao veículo ($1,0 \pm 0$ s).

Por fim, no tempo de 120 minutos, o tratamento com morfina 5 mg.kg^{-1} ($8,6 \pm 1,43$ s), THL 50 mg.kg^{-1} ($5,6 \pm 1,4$ s), THL 100 mg.kg^{-1} ($6,6 \pm 0,9$ s) e THL 200 mg.kg^{-1} ($11,8 \pm 1,08$ s) também causou um aumento significativo na latência para a resposta nociceptiva em relação ao controle negativo ($1,0 \pm 0,0$ s). Uma relação dose-efeito com o THL foi observada no tempo de 60 minutos entre as dose de 50 mg.kg^{-1} e as de 100 mg.kg^{-1} e 200 mg.kg^{-1} , enquanto que no tempo de 120 minutos, foi entre as doses 50 e 200 mg.kg^{-1} e 100 e 200 mg.kg^{-1} .

Figura 10 - Efeito do THL em camundongos submetidos ao teste da placa quente.



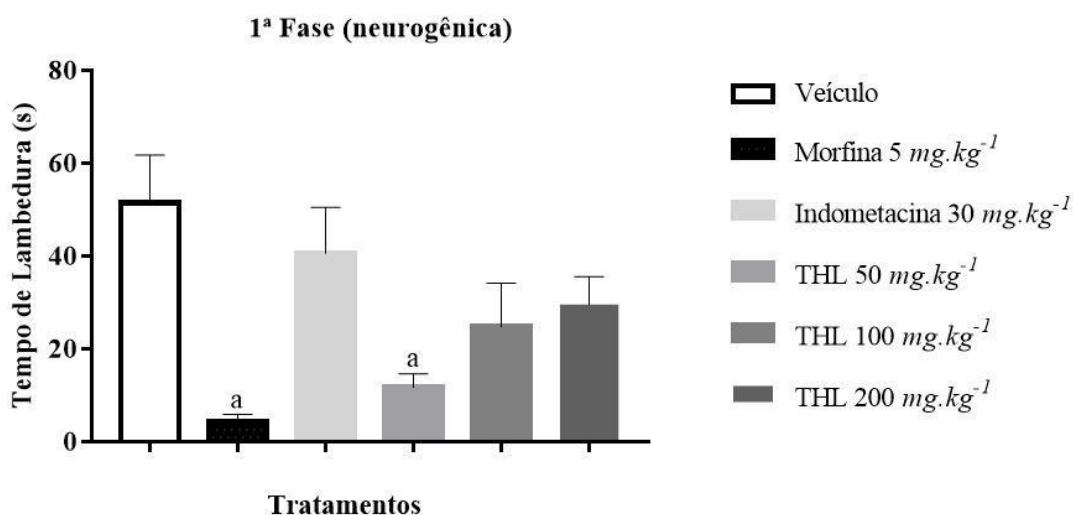
As colunas representam a média \pm E.P.M. ($n = 6$), analisadas por ANOVA uni-direcional, seguida do teste de Tukey. “a” vs Veículo; “c” vs THL 50 mg.kg^{-1} ; “d” vs THL 100 mg.kg^{-1} quando $p < 0,05$.

5.2.4 Modelo da formalina

Na primeira fase do modelo (fase neurogênica – Figura 11), foi possível observar uma diminuição significativa no tempo de lambertura da pata apenas no grupo tratado com THL 50 mg.kg^{-1} ($11,8 \pm 2,9$ s), quando comparado com o veículo ($51,6 \pm 10,2$ s). Contudo, não foi possível observar significância estatística nas doses de 100 mg.kg^{-1} ($15,6 \pm 1,5$ s) e 200 mg.kg^{-1} ($29,6 \pm 2,4$ s). Já os animais tratados

com morfina 5 mg.kg⁻¹ também apresentaram uma redução significativa no tempo de lambedura de pata (4.5 ± 1.5 s), quando comparado ao veículo. Em contrapartida, a indometacina 30 mg.kg⁻¹ (40,7 ± 9,8 s) não demonstrou reduções relevantes quando contraposto ao veículo e aos demais grupos(morfina e com os animais tratados com o monoterpeno).

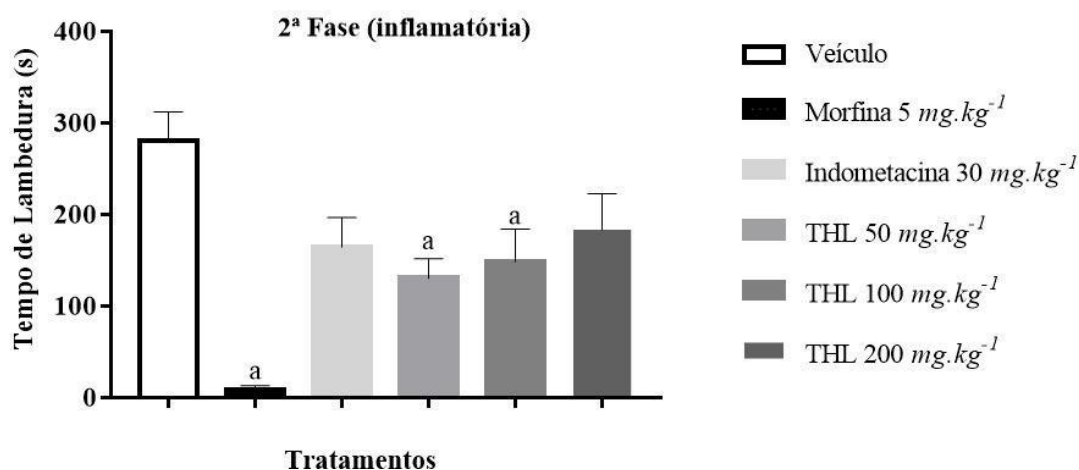
Figura 11 - Efeito do THL em camundongos submetidos ao modelo de formalina (Fase 1).



As colunas representam a média ± E.P.M. (n = 6), analisadas por ANOVA uni-direcional, seguida do teste de Tukey. “a” vs Veículo quando p < 0,05.

Na fase inflamatória (figura 12), que apresenta maior sensibilidade a AINES, foi possível observar uma diminuição significativa no tempo de lambedura da pata entre os grupos tratados com morfina 5 mg.kg⁻¹ (8,5 ± 5,4 s), indometacina 30 mg.kg⁻¹ (165, 2 ± 32,2 s) e com THL 50 mg.kg⁻¹ (131,1 ± 21,3 s), 100 mg.kg⁻¹ (149,1 ± 35,6 s) e 200 mg.kg⁻¹ (184,1 ± 16,0 s) quando comparados com o veículo (281,5 ± 31, 2 s). Além disso, não foi evidenciada relação dose-efeito entre os grupos tratados com o monoterpeno.

Figura 12 - Efeito do THL em camundongos submetidos ao modelo de formalina (Fase 2).

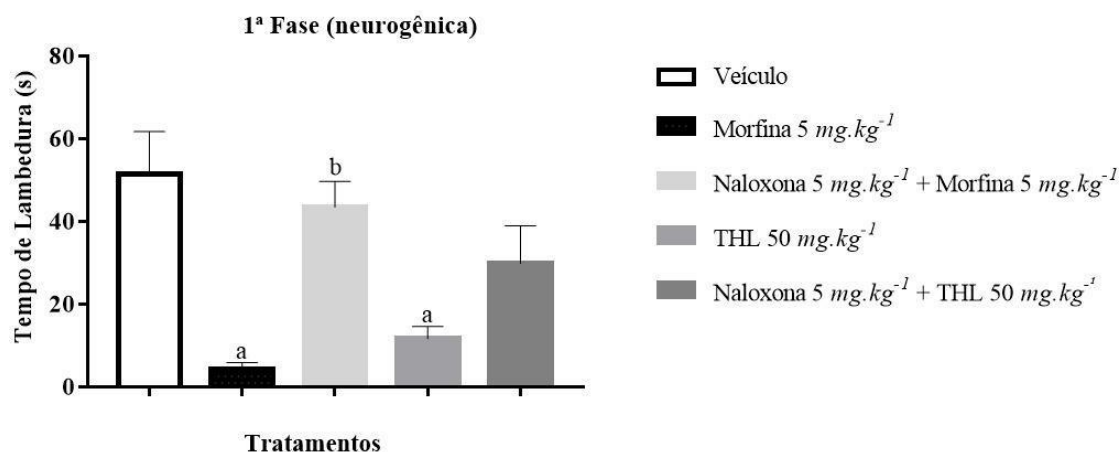


As colunas representam a média \pm E.P.M. (n = 6), analisadas por ANOVA uni-direcional, seguida do teste de Tukey. “a” vs Veículo quando $p < 0,05$.

5.2.5 Envolvimento do receptor opioide

O teste de antagonismo com naloxona foi utilizado para avaliar o envolvimento do sistema opioide na ação antinociceptiva do THL no modelo da formalina. De acordo com a figura 13, a associação naloxona 4 mg.kg⁻¹ + morfina 5 mg.kg⁻¹ aumentou significativamente o tempo de lambedura da pata dos animais (43,6 \pm 6,2 s), em relação ao grupo tratado apenas com morfina 5 mg.kg⁻¹ (4,5 \pm 1,5 s). O grupo tratado apenas com THL 50 mg.kg⁻¹ (11,8 \pm 2,9 s) demonstrou uma redução no tempo de lambedura quando comparado com o controle negativo (51,6 \pm 10,2), no entanto a associação naloxona 4 mg.kg⁻¹ + THL 50 mg.kg⁻¹ (30,0 \pm 9,0 s) não apresentou diferença significativa quando contraposto ao grupo THL 50 mg.kg⁻¹.

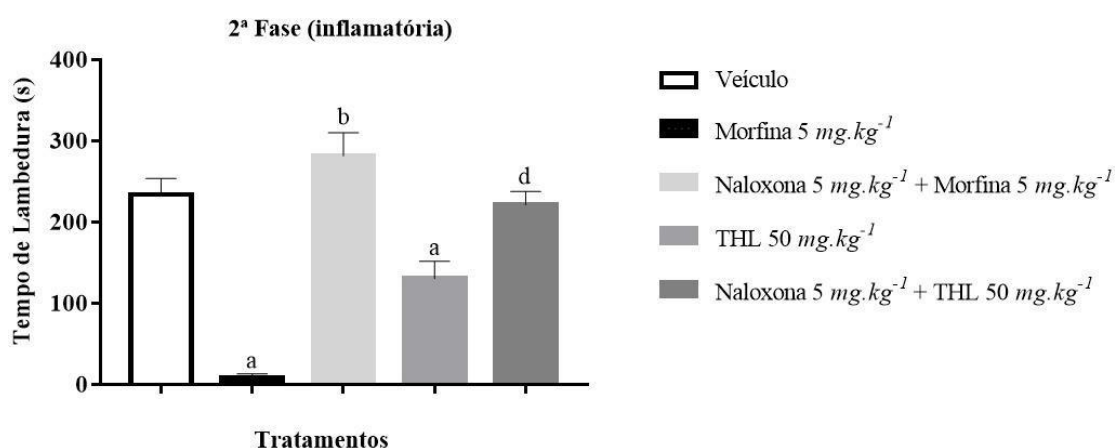
Figura 13 - Análise do possível envolvimento do THL com o receptor opioide em camundongos submetidos ao modelo de formalina na fase 1.



As colunas representam a média ± E.P.M. (n = 6), analisadas por ANOVA uni-direcional, seguida do teste de Tukey. “a” vs Veículo e “b” vs morfina 5 mg.kg⁻¹, quando p < 0,05.

Na fase inflamatória (figura 14), os grupos morfina 5 mg.kg⁻¹ (8,5 ± 5,4 s) e THL 50 mg.kg⁻¹ (131,1 ± 21,3 s) diminuíram o tempo de lambedura da pata dos animais quando comparado com o controle negativo (234,7 ± 19,8). De forma contrária, a associação naloxona 4 mg.kg⁻¹ + morfina 5 mg.kg⁻¹ (282,5 ± 28,3 s) e naloxona 4 mg.kg⁻¹ + THL 50 mg.kg⁻¹ (222,1 ± 16,2) aumentaram o tempo de lambedura da pata dos animais quando comparado com os grupos tratados apenas com morfina e com o monoterpeno na dose de 50 mg.kg⁻¹.

Figura 14 - Análise do possível envolvimento do THL com o receptor opioide em camundongos submetidos ao modelo de formalina na fase 2.



As colunas representam a média ± E.P.M. (n = 6), analisadas por ANOVA uni-direcional, seguida do teste de Tukey. “a” vs Veículo; “b” vs morfina 5 mg.kg⁻¹ e “d” vs THL 50 mg.kg⁻¹ quando p < 0,05.

6. DISCUSSÃO

Estudos prévios desenvolvidos em nosso laboratório, utilizando metodologias *in silico* e *in vivo*, mostraram que o tetrahidrolinalol é dotado de efeito ansiolítico, anticonvulsivante, anti-inflamatório, antidepressivo e antinociceptivo. Esse último efeito, entretanto, ainda não está totalmente elucidado e serviu como ponto de partida para o desenvolvimento do presente trabalho. Nesse sentido, o *docking* molecular foi realizado inicialmente para avaliar a interação entre o THL e os receptores envolvidos nos mecanismos envolvidos na nocicepção. Essa técnica permite prever possíveis interações entre moléculas e determinados alvos biológicos, o que faz dessa técnica uma importante ferramenta para investigação de novas terapias farmacológicas (PINZI, L.; RASTELLI, G., 2019; CHAUDHARY, K; MISHRA, N., 2016; YURIEV, E. et al, 2015).

No presente trabalho, o *docking* molecular revelou que o THL apresentou energia de ligação próxima às moléculas padrão, em relação ao receptor opioide do tipo μ e ao TRPV1. É sabido que o receptor μ -opioide apresenta um papel importante na antinocicepção no SNC e SNP e seus agonistas são comumente usados para o alívio e tratamento da dor crônica moderada e grave, como a morfina. Contudo, a ativação desses receptores proporcionam diversos efeitos colaterais dentre os quais pode-se destacar: constipação, retenção urinária e hipotensão, o que pode impactar na qualidade vida dos pacientes portadores de dores aguda e crônicas (BADAL et al., 2018; YUQING et al., 2017). Em adição, o TRPV1 está relacionado com a hipersensibilidade visceral e com a dor induzida mediante processos inflamatórios, visto que a sua ativação ocorre mediante o reconhecimento de estímulos nocivos como calor excessivo, prótons e lipídios derivados da membrana, por meios de nociceptores polimodais (YANJU et al., 2015). Diante desse contexto, o receptor opioide do tipo μ e o TRPV1 parecem ser importantes alvos farmacológicos para o efeito antinociceptivo do THL. Para confirmar essa hipótese, foram utilizadas diferentes modelos animais de nocicepção.

Os modelos animais têm sido amplamente utilizados na investigação do potencial antinociceptivo de várias substâncias, utilizando estímulos químicos, térmicos ou mecânicos (OLIVEIRA et al., 2021). Esses modelos utilizam camundongos, na maioria das vezes, por apresentam um manuseio fácil e prático,

baixo custo e genética conhecida, o que possibilita a compreensão da fisiopatologia de diversas desordens (GUALDI et al., 2010). No entanto, o uso de animais em modelos comportamentais da dor apresenta limitações devido às divergências entre vias de administração, dosagem dos compostos a possibilidade de avaliar apenas o aspecto fisiológico da nocicepção (MATTA, 2010), tendo em vista que o fator emocional não pode ser analisado nesses modelos (SILVA, 2013).

Em relação aos testes *in vivo*, previamente às metodologias que avaliam o efeito antinociceptivo do THL, foi realizado teste do *rota-rod*. Esse teste permite avaliar se a substância estudada é capaz de promover perda de coordenação motora, seja por sedação e/ou relaxamento da musculatura, em roedores (SANTOS et al., 2018). O fármaco padrão para esse modelo foi o diazepam 4 mg.kg⁻¹ (i.p), o qual apresentou uma redução no tempo de permanência dos animais na barra giratória, dado também relatado no estudo de ANAYA-EUGENIO et al. (2016). No presente trabalho foi observado que o tratamento com THL, em diferentes doses, não promoveu relaxamento muscular ou déficit de coordenação motora dos animais submetidos ao *rota-rod*. Este achado é corroborado pelo trabalho de LEANDRA (2010), no qual a administração intraperitoneal de THL, nas doses de 25, 50 e 100 mg.kg⁻¹, não apresentou efeito na coordenação motora no teste em questão. A ausência do efeito anteriormente citado garante que as doses selecionadas para o estudo são destituídas de efeitos que poderiam prejudicar a performance dos camundongos nos demais testes comportamentais.

Uma vez verificada a ausência de efeito sob a coordenação motora com as doses de THL, foi realizada uma série de modelos que avaliaram o efeito antinociceptivo do composto; o modelo das contorções abdominais induzidas por ácido acético foi o primeiro a ser realizado. O ácido acético, quando administrado intraperitonealmente, é capaz de liberar uma série de mediadores inflamatórios, como histamina, serotonina, bradicinina, eicosanoides. Como consequência ocorre a ativação de canais de cátions não seletivos nas vias aferentes primárias, seguido da diminuição do limiar nociceptivo e posterior estímulo das fibras nociceptivas (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2013). Essa metodologia é utilizada para avaliação de possíveis efeitos analgésicos periféricos (SILVA et al., 2017). Nesse sentido, os grupos tratados oralmente com THL apresentaram diminuição na quantidade de contorções abdominais geradas ácido acético quando comparado com o controle

negativo. Esse resultado é semelhante ao observado por SOUTO-MAIOR e colaboradores (2017), no qual o óxido de linalol foi capaz de reduzir significativamente o número de contorções abdominais nas doses de 100 mg.kg⁻¹ e 150 mg.kg⁻¹. Apesar de ser considerado um modelo inespecífico, é possível presumir que o potencial antinoceptivo do monoterpene pode estar associado, pelo menos em parte, à diminuição da produção de mediadores inflamatórios e/ou ao bloqueio direto de nociceptores.

Na sequência, foi realizado o modelo da placa quente, que avalia a dor espinal e a supraespinal, bem como a atividade analgésica central de compostos (ROCHA et al., 2013). Para tanto, camundongos são submetidos a uma placa aquecida, cujo estímulo térmico ativa as fibras C e A δ tipo II, por meio do receptor TRPV1, o qual está associado a estímulos de calor nocivo, substâncias pungentes, prótons, fatores de crescimento, prostaglandinas, entre outros. Não obstante, essa metodologia é muito estudada em decorrência da sua relação com terapêutica da dor (LANZANSTER, 2011). O tratamento com três diferentes doses de THL, nos tempos de 30, 60 e 120 minutos, aumentou significativamente, e de forma dose-dependente, a latência para a resposta nociceptiva, sugerindo que o monoterpene parece ser dotado de efeito antinociceptivo central. É importante salientar que o aumento do tempo de permanência dos roedores na placa aquecida é decorrente de dois fatores: bloqueio dos receptores térmicos ou da inibição do estímulo nervoso aferente (SANTOS et al., 2018). Dessa forma, é possível conjecturar, mediante os resultados obtidos, que o THL pode utilizar dos mecanismos acima citados. Esse resultado corrobora com os dados observados no estudo de ANAYA-EUGENIO e colaboradores (2016), que avaliaram o efeito antinoceptivo do óleo essencial da *Artemisia ludoviciana*, que apresentou o linalol como componente majoritário, no modelo da placa aquecida. Ademais, é possível sugerir que esse resultado seja decorrente, pelo menos em parte, da capacidade do THL em interagir com o TRPV1, conforme demonstrado no ensaio computacional em *in silico*. No entanto, a realização de testes *in vivo*, utilizando antagonistas do TRVP1 (capsazepina) são necessários para comprovar, ou não, essa hipótese.

O modelo modelo da formalina também foi realizado no presente estudo. Uma característica dessa metodologia é que a mesma apresenta duas fases: a neurogênica e a inflamatória. Na primeira fase é possível observar a ação direta da formalina nos

nociceptores e as sensações agudas e tônicas da dor. Ademais, também é possível constatar a estimulação química direta nos nociceptores. Em contrapartida, a segunda fase decorre após a instauração do processo inflamatório na região dos tecidos periféricos e de modificações no processamento central sendo uma resposta ao mecanismo inflamatório da dor localizada (SILVA et al., 2017; SOUTO-MAIOR et al., 2017; QUINTANS- JÚNIOR et al., 2013). Na fase inicial, os três grupos tratados com o monoterpeno obtiveram uma redução no tempo de lambedura em comparação com o grupo controle e a princípio não demonstraram relação dose-efeito. Isso corrobora com os resultados obtidos no teste da placa quente e no *docking*, reforçando a ideia da participação do sistema opioide no efeito antinociceptivo do composto. De forma semelhante, na fase inflamatória, as três doses de THL apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo veículo. Esse achado pode ser corroborado pelo teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético no qual observa-se a participação de mediadores inflamatórios e ativação direta de nociceptores, como já discutido em parágrafos anteriores. Tomados em conjunto, a presença de efeito do THL nas duas fases do teste de formalina pode indicar uma provável ação central e periférica do monoterpeno (SANTOS et al., 2018). Esse resultado é corroborado por SILVA et al. (2015), os quais avaliaram o efeito antinociceptivo do óleo essencial da *Lavandula augustifolia*, rico em linalol e acetato de linalila, o qual reduziu o tempo de lambedura da pata de animais tratados durante a primeira e segunda fase do modelo da formalina.

No intuito de propor um possível mecanismo de ação que explique o efeito antinociceptivo do THL, anteriormente observado com as metodologias *in silico* e *in vivo*, foi escolhido o modelo da formalina, em decorrência do seu alto grau de confiabilidade na reprodução da dor clínica e da capacidade de identificar substâncias com efeito analgésico de ação periférica, central e anti-inflamatório (SILVA et al., 2018; HASANAT et al., 2017). Para tanto, foi utilizada a naloxona, um antagonista competitivo do receptor opioide μ . Esse fármaco tem sido usado com o intuito de antagonizar os efeitos da depressão respiratória ocasionada pela superdosagem de opioides (DUNE, R.B., 2018; TODERIKA, Y.; WILLIAMS, S., 2018). Diante do exposto, o pré-tratamento com a naloxona resultou no antagonismo do efeito antinociceptivo da morfina nas duas fases do modelo da formalina. Em contrapartida, apesar do THL ter apresentado diminuição do tempo de lambedura em ambas as

fases, o seu efeito só foi de fato antagonizado, significativamente, na segunda fase de observação. De forma semelhante, no estudo de KATSUYAMA e colaboradores (2015), o efeito antinociceptivo do óleo essencial de bergamota, rico em linalol, foi reduzido significativamente após o pré-tratamento com cloridrato de naloxona no modelo de formalina, evidenciando, pelo menos em parte, a participação da via opioide na ação do óleo essencial. Nesse sentido, pode-se conjecturar que o efeito antinociceptivo do THL parece depender do sistema opioide, cujo receptor μ exibe um papel relevante para analgesia a partir da interação do ligante com a estrutura do receptor, o qual é acoplado à proteína Gi/O, e subsequente inibição da produção de cAMP, ocasionando modificações no transporte de cálcio na membrana celular e inibição da liberação de neurotransmissores na fenda pré-sináptica (JIANG et al., 2020; MERCADANTE, S.; ARCURI, E.; SANTONI, A., 2019). Esses achados corroboram com os resultados obtidos nos testes *in silico*, os quais demonstraram a possibilidade de formação do complexo ligante-receptor entre o THL e os receptores μ -opioide e o TRPV1, ambos importantes para percepção dor e modulação da nocicepção. Além disso, existem evidências quanto o *crosstalk* entre esses dois receptores, uma vez que a exposição à morfina pode modular e induzir a antinocicepção a partir da ativação do TRPV1 prosseguindo por duas vias: proteína cinase A dependente de cAMP (PKA) e da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) (MELKES et al., 2020; YANJU et al., 2015). Além disso, a possível interação do monoterpeno com o receptor TRPV1, responsável por modular e integrar a entrada de estímulos nocivos para medula espinhal e para os centros do tronco cerebral (FRIAS, B.; MERIGHI, A., 2016) reforça os efeitos antinociceptivos observados nas metodologias estudadas. Tomados em conjunto, nossos dados sugerem que o THL é dotado de efeito antinociceptivo central, que parece envolver o sistema opioide e o receptor TRVP1, e periférico. No entanto, mais estudos são necessários para uma melhor caracterização dos efeitos anteriormente citados.

7. CONCLUSÃO

- ❖ O THL demonstrou afinidade com o receptor μ e com o receptor TRPV1, segundo a técnica de *docking* molecular, evidenciando um possível envolvimento dessas proteínas no efeito antinociceptivo do composto;
- ❖ A administração oral de THL, nas doses de 50, 100 e 200 *mg.kg⁻¹*, foi destituída de efeito sobre a coordenação motora em camundongos submetidos ao teste do *rota-rod*;
- ❖ A administração oral de THL, nas doses de 50 e 100 *mg.kg⁻¹*, diminuiu o número de contorções abdominais geradas induzidas por ácido acético em camundongos;
- ❖ A administração oral de THL, nas doses de 50, 100 e 200 *mg.kg⁻¹*, aumentou a latência para a resposta nociceptiva, nos tempos de 30 e 60 minutos, em camundongos submetidos ao teste da placa quente, sugerindo o envolvimento do TRVP1 no efeito do monoterpeno;
- ❖ A administração oral de THL, nas doses de 50, 100 e 200 *mg.kg⁻¹*, diminuiu o tempo de lambadura de pata de camundongos submetidos ao teste da formalina, tanto na primeira fase (neurogênica), quanto na segunda fase (inflamatória);
- ❖ O efeito anteriormente descrito foi revertido pela naloxona, um antagonista competitivo de receptores opioides, sugerindo o envolvimento desse sistema de neurotransmissão no efeito do monoterpeno;
- ❖ O efeito antinociceptivo do tetraidrolinalol parece envolver, pelo menos em parte, o sistema opioide, o receptor TRVP1 e mediadores inflamatórios.

8. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos no presente trabalho indicaram que o tetrahidrolinalol, nas condições testadas, mostrou-se uma molécula segura e dotada de importante efeito antinociceptivo central e periférico. Uma vez que a nocicepção é um fenômeno multimediado e envolve mecanismos que vão além da participação do sistema opioide, TRVP1 e mediadores inflamatórios, é importante que o efeito antinociceptivo do THL seja estudado em outros modelos animais, a saber: o teste de retirada da cauda (tail-flick), Von Frey e o teste Randall-Selitto, além de avaliar a participação de outros sistemas de neurotransmissão, tais como o sistema GABAérgico, glutamatérgico e colinérgico. Ademais, a implementação de estudos que utilizem modelos crônicos, que mais se aproximam da condição da dor crônica em humanos, podem ser realizados com intuito de verificar os efeitos da administração a longo prazo do THL.

9. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J. R. G. S.; SOUZA, G. R.; SILVA, J. C.; SARAIVA, S. R. G. L.; J1213 ÚNIOR, R. G. O.; QUINTANS, J. S. S.; BARRETO, R. S. S.; BONJARDIM, L. R.; 1214 CAVALCANTI, S. C. H.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Borneol, a Bicyclic Monoterpene Alcohol, Reduces Nociceptive Behavior and Inflammatory Response in Mice. **The Scientific World Journal**. 2013.

ALMEIDA, R. N. D. Psicofarmacologia: fundamentos práticos. Ed. **Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro, Brasil, 2006.

ALMEIRA, R. N.; FALCÃO, A. C. G. M.; DINIZ, R. S. T.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; POLARI, R. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; DUARTE, J. C.; FERREIRA, C. D.; ANTONIOLLI, A. R.; ARAÚJO, C. C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no sistema nervoso central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 80, p. 72-76, 1999.

ANAYA-EUGENIO, G. D. et al. Cardiovascular effects and safety of (non-aspirin) NSAIDs. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 8, n. 1, p. 12–712, 2020.

ANTÔNIO, M.; CALÔNIGO. Dificuldades sociais, legais e burocráticas para prescrição de opioides. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu. 2020.

ASANO, T.; HATTORI, T.; TANAKA, K.; YAMAKAWA, N.; SUEMASU, S.; SHUJI, AINDA, KATAOKA, M.; MIZUSHIMA, T, MITSUKO TAKENAGA. Antinociception by fluoro-loxoprofen, a novel non-steroidal anti-inflammatory drug with less ulcerogenic effects, in rat models of inflammatory pain. **Elsevier**, v. 844, 2019.

AZEVEDO, A. O.; CAMPO, J. J.; GALDINO, G. S.; BRAGA, F. C.; DUARTE, I. D. J.; PEREZ, A. C. Antinociceptive effect from Davilla elliptica hydroalcoholic extract.

Journal of Ethnopharmacology, v. 113, p. 344-356, 2007.

BARRETT, J. E. The pain of pain: Challenges of animal behavior models. **European Journal of Pharmacology**, v. 753, p. 183–190, 2015.

BARROS, G. A; CALONEGO, M.; MENDESA, R.; CASTRO, R.; FARIA, J.; TRIVELLATO, S.; CAVALCANTE, R.,; FUKUSHIMA, F.; DIAS, A. The use of analgesics and risk of self-medication in an urban population sample: cross-sectional study. **Brazilian Journal of Anesthesiology**, v. 69, n. 6, p. 529–536, 2019.

BATISTA, E. K. F.; TRINDADE, H.I.; LIRA, S.R.S.; MULLER, J.B.; SILVA, L.L.; BATISTA, M.C. Atividades antinociceptiva e antiinflamatória do extrato etanólico de Luehea divaricata. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 2, p. 433–441, 2016.

BAO, Y. et al. The mechanism of μ -opioid receptor (MOR)-TRPV1 crosstalk in TRPV1 activation involves morphine anti-nociception, tolerance and dependence. **Channels**, v. 9, n. 5, p. 235–243, 2015.

BIELSKA, E.; LUCAS, X.; CZERWONIEC, A.; KASPRZAK, J. M.; KAMINSKA, K. H.; BUJNICKI, J. M.; Virtual screening strategies in drug design – methods and

applications, **Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology**, v. 92, n. 3, p. 249-264, 2011.

BOLL, S.; ALMEIDA DE MINAS, A.; RAFTOGIANNI, S.C.; HERPERTZ, V. Oxytocin and Pain Perception: From Animal Models to Human Research. **Neuroscience**, v. 387, p. 149–161, 2018.

CARROLL, C. P. Opioid treatment for acute and chronic pain in patients with sickle cell disease. **Neuroscience Letters**, v. 714, p. 134-534, 2020.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA). Normativas do concea para produção manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica. CONCEA, 2016.

CONLON, K. C.; MILJKOVIC, M. D.; WALDMANN, T. A. Cytokines in the Treatment of Cancer. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 39, n. 1, p. 6–21, 2019.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA). Diretriz da prática de eutanásia do concea. 2018. Disponível em: https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/legislacao/outros_atos/resolucoes/Resolucao_Normativa_CONCEA_n_37_de_15022018.html. Acesso em: 22 de maio de 2020.

COSTA, C. A., CURY, T. C., CASSETTARI, B. O., TAKAHIRA, R. K., FLÓRIO, J. C., & COSTA, M. (2013). Citrus aurantium L. essential oil exhibits anxiolytic-like activity mediated by 5-HT 1A-receptors and reduces cholesterol after repeated oral treatment. **BMC complementary and alternative medicine**, 13(1), 1.

CRISPINO, N.; CICCIA, F. JAK/STAT pathway and nociceptive cytokine signalling in rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v.39, n. 3, p. 668–675, 2021.

DONATELLO, N. N.; EMERA, A.A.; SALMA, D.C.; LUDTKEA, D.D.; BORDIGNONB, SILVANA A. S. R.; FERREIRA, J. K.; SALGADO, A. S. I.; VENZKED D.; BRETANHAD, L. C.; MICKED, G. A.; MARTINSA, D. F. Lavandula angustifolia essential oil inhalation reduces mechanical hyperalgesia in a model of inflammatory and neuropathic pain: The involvement of opioid and cannabinoid receptors. **Journal of Neuroimmunology**, v. 340, 2020.

DOR NO BRASIL. **Sociedade Brasileira Para Estudos Da Dor (SBED), 2022**. Disponível em: <https://sbed.org.br/duvidas-frequentes-2/dor-no-brasil/>. Acesso em: 20 de março de 2022

DUNNE, R. B. Prescribing naloxone for opioid overdose intervention. **Pain management**, v. 8, n. 3, p. 197–208, 2018.

EVERSON, M.; MCLAIN, N.; COLLINS, M.J.; RAYBORN, M. Perioperative Pain Management Strategies in the Age of an Opioid Epidemic. **Journal of Perianesthesia Nursing**, 2020.

FITSIOU, E.; PAPPA, A. Anticancer activity of essential oils and other extracts from aromatic plants grown in Greece. **Antioxidants**, v. 8, n. 8, p. 1–18, 2019. 1311

FRIAS, B.; MERIGHI, A. Capsaicin, nociception and pain. **Molecules**, v. 21, n. 6, 2016.

GAO, T.; SHI, T.; WIESENFELD-HALLIN, Z.; LI, T.; JIANG-DONG, J.; XIAO-JUN, 1315 X. Sinomenine facilitates the efficacy of gabapentin or ligustrazine hydrochloride in animal models of neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 854, n. April, p. 101–108, 2019.

GALANTE, P.; MORTARI, M. R. Avaliação do efeito antinociceptivo em diferentes vias de administração e da interação farmacológica com receptores opioides e canabinoides da prótonectina - F Avaliação do efeito antinociceptivo em diferentes vias de administração e da interação farmacol. 2019.

GOUVEIA, D. N.; GUIMARÃES, A.G; SANTOS, W. B.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Natural products as a perspective for cancer pain management: A systematic review. **Elsevier**, v. 58, 2019.

GORGU, O. et al. Microwave-assisted synthesis and pharmacological screening of some triazolothiadiazole derivatives. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 56, p. 1–10, 2020.

GREGORY, N. S.; HARRIS, A.; ROBINSON, C.; DOUGHERTY, P.; FUCHS, P.; SLUKA, K. An overview of animal models of pain: Disease models and outcome measures. **Journal of Pain**, v. 14, n. 11, p. 1255–1269, 2013.

GRIFFIOEN, M.A; GREENSPAN, J.D; JOHANTGEN,M;RUEDEN, K.V; O'TOOLE, R.V; DORSEY, S.G;REEN, C. L. Acute Pain Characteristics in Patients with and without Chronic Pain Following Lower Extremity Injury Mari. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 12, p. 139–148, 2017.

GUALDI, L. P. et al. Modelos murinos para pesquisas em asma: uma análise crítica atualizada Murine models for asthma research: An updated critical analysis. **Scientia Medica**, v. 20, n. 3, p. 236–242, 2010.

GUIMARÃES, A. G.; OLIVEIRA, M.A; ALVES, R.S.; MENEZES, P.P.;SERAFINI, M.R.; ARAÚJO, A.A.S; BEZERRA, D.P.;QUINTANS-JÚNIOR,L.J. Encapsulation of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano, with β -cyclodextrin, improves the pharmacological response on cancer pain experimental protocols. **Chemico- Biological Interactions**, v. 227, p. 69–76, 2015.

GUGINSKI. DOR: O QUE SABEMOS SOBRE ELA? **Perspectivas online**, v. 2, n. 7, p. 113–121, 2008.

HEIDARI, M. R.; FOROUMADI, A.; NOROOZI, H.; SAMZADEH-KERMANI, A.; AZIMZADEH, B. S. Study of the anti-inflammatory and analgesic effects of novel rigid benzofuran-3, 4-dihydroxy chalcone by formalin, hot-plate and carrageenan tests in mice. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 22, p. 395-401, 2009.

HU, J.; LIU, S.; DENG, W. Dual responsive linalool capsules with high loading ratio for excellent antioxidant and antibacterial efficiency. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 190, n. January, p. 110-978, 2020.

HUANG, G. J.; HUANG, S. S.; LIN, S. S.; SHAO, Y. Y.; CHEN, C. C.; HOU, W. C.; KUO, Y. H. Analgesic effects and the mechanisms of anti-inflammatory of ergostatrien-3 β -ol from *Antrodia camphorata* submerged whole broth in mice. **Journal of cultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 7445-7452, 2010.

JAPIASSU, V. B. Nefrotoxicidade de antiinflamatórios não esteroidais e sua relação com a gota: uma breve revisão de literatura Nephrotoxicity of nonsteroidal anti-inflammatories and its relation with gout : a brief literature review. p. 2549–2562, 2022.

JIANG, X. et al. Discovery of potentially biased agonists of mu-opioid receptor (MOR) through molecular docking, pharmacophore modeling, and MD simulation. **Computational Biology and Chemistry**, v. 90, p. 107-405, 2021.

KATSUYAMA, S. et al. Effect of plantar subcutaneous administration of bergamot essential oil and linalool on formalin-induced nociceptive behavior in mice. **Biomedical Research (Japan)**, v. 36, n. 1, p. 47–54, 2015.

KUDSI, S. Q. et al. Characterisation of nociception and inflammation observed in a traumatic muscle injury model in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 883, n. November 2019, p. 173-284, 2020.

LANZANSTER, D. Participação dos Receptores Trpv1 na atividade antinociceptiva do ácido 3,4,5- trimetoxidihidrocínâmico em camundongos. f. 71. (Programa de Pós-graduação em Neurociências) - Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências Biológicas, Santa Catarina, 2011.

LEAL, R. S. et al. Uso indevido e dependência de opioides: da prevenção ao tratamento. **Revista de medicina de família e saúde menta**. n. 1, p. 29–44, 2020.

LEDOWSKI, T. Objective monitoring of nociception: a review of current commercial solutions. **British Journal of Anaesthesia**, v. 123, n. 2, p. e312–e321, 2019.

LI, Y.; KONG, D.; FU, Y.; SUSSMAN, M. R.; WU, H. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 148, p. 80–89, 2020.

MAIA, A. K. H. L. Estudos Psicofarmacológicos Pré – Clínicos do 3- Fenil- 5-(4-Metilfenil)-Imidazolidin-2,4-Diona (Hpa-05) em Camundongos. (Pós- graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Farmacologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013

MAGRO, D. A. C. et al. An interleukin-33/ST2 signaling deficiency reduces overt pain-like behaviors in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 46, n.7, p. 601–606, 2013.

MAGALHÃES, A.C.M. Estudo das propriedades bioquímicas e farmacológicas da peçonha de *Rhopalurus agamemnon* Estudo das propriedades bioquímicas e farmacológicas da peçonha de *Rhopalurus agamemnon*. (Programa de Pós Graduação em Biologia Animal) - Universidade de Brasília, Brasília, 2021.

MAO, Y. et al. Antinociceptive Effect of Ghrelin in a Rat Model of Irritable Bowel Syndrome Involves TRPV1/Opioid Systems. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 43, n. 2, p. 518–530, 2017.

ARTINEZ, L.; EKMAN, E.; NAKHLA, N. Perioperative Opioid-sparing Strategies: Utility of Conventional NSAIDs in Adults. **Clinical Therapeutics**, v. 41, n. 12, p. 2612–1420, 2019.

MASIC, D. et al. Intravenous Lidocaine for Acute Pain: A Systematic Review. **Pharmacotherapy**, v. 38, n. 12, p. 1250–1259, 2018.

MATTAM, U. et al. Kisspeptin preserves mitochondrial function by inducing mitophagy and autophagy in aging rat brain hippocampus and human neuronal cell line. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1868, n. 1, p. 52–64, 2021.

MELKES, B. et al. Naloxone is a potential binding ligand and activator of the capsaicin receptor TRPV1. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 43, n. 5, p. 908–912, 2020.

MELO, A.J.O.; HEIMARTH, L.; CARVALHO, A.M.S.; QUINTANS, J.S.S.; SERAFINI, 1433 M.R.; ARAÚJO, A.A.S.; ALVES, P.B; RIBEIRO, A.M., SHANMUGAM, S.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. DUARTE, M. C. Eplingiella fruticosa (Lamiaceae) essential oil complexed with β -cyclodextrin improves its anti-hyperalgesic effect in a chronic widespread non-inflammatory muscle pain animal model. **Food and Chemical Toxicology**, v. 135, p. 110-940, 2020.

MOFFAT, R.; RAE, C. P. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, v. 12, n. 1, p. 12–15, 2011.

MOHTASHAMI, L.; SHAKERI, A.; JAVADI, B. Neuroprotective natural products against experimental autoimmune encephalomyelitis: A review. **Neurochemistry International**, v. 129, n. July, p. 104-516, 2019.

OLIVEIRA, L.E.G. Avaliação da atividade psicodpressora, anti-inflamatória e possível mecanismo de ação do tetrahidrolinalol em roedores. (Pós- graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Farmacologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

OLIVEIRA JÚNIOR, J. O. DE; PORTELLA JUNIOR, C. S. A.; COHEN, C. P. Inflammatory mediators of neuropathic pain. **Revista Dor**, v. 17, n. Suppl 1, p. 35–42, 2016.

OZ, M.; LOZON, Y.; SULTAN, A.; YANG, K.S.; GALADARI, S. Effects of monoterpenes on ion channels of excitable cells. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 152, p. 83–97, 2015.

PASSOS, C. S.; ARBO, M. D.; RATES, S. M. K.; VON POSER, G. L. Terpenóides com atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.19(1A), p.140–149.

PEREIRA MM, ANDRADE LP, TAKITANE J. Evolução do uso abusivo de derivados de ópio. **Saúde, Ética & Justiça**. v.21, n.1, p.12-7, 2016.

REA, I. M. et al. Age and age-related diseases: Role of inflammation triggers and cytokines. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. APR, p. 1–28, 2018.

ROSE-JOHN, S. Interleukin-6 family cytokines. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 10, n. 2, p. 1–17, 2018.

SALVADORI, M. G.S.S. Mecanismo de ação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do (-) – mirtenol. Tese (Pós- graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Farmacologia) - **Universidade Federal da Paraíba**, João Pessoa, 2013.

SANCHEZ, A. D.; ANDRADE, A. L. M. DE; PARIZOTTO, N. A. Eficácia da terapia a laser de baixa intensidade no controle da dor neuropática em camundongos. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 25, n. 1, p. 20–27, 2018.

SANTOS, C. C. M. . Atividade antinociceptiva e antioxidante do fitol em modelos in vivo e in vitro. Tese (Pós- graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, 1491 Farmacologia) - **Universidade Federal da Paraíba**, João Pessoa, 2011.

SANTOS, P. L.; MATOS. J. P.; PICOT, L.; ALMEIDA, J.; QUINTANS, J.; QUINTANS-JÚNIOR, L. Citronellol, a monoterpene alcohol with promising pharmacological activities - A systematic review. **Food and chemical toxicology**. v.123,p. 459-469, 2019.

SANTOS, P. L.; BRITO, R.; OLIVEIRA, M.A; QUINTANS, J.; GUIMARÃES, A.; SANTOS, M.; MENEZES, I.; COUTINHO, H.; ARAÚJO, A.; QUINTANS-JÚNIOR, L. Docking, characterization and investigation of β -cyclodextrin complexed with citronellal, a monoterpene present in the essential oil of *Cymbopogon* species, as an anti-hyperalgesic agent in chronic muscle pain model. **Phytomedicine**, v. 23, n. 9, p. 948–957, 2016.

SILVA, J. C.; SARAIVA, S. R. G. L.; JÚNIOR, R. G. O.; ALMEIDA, J. R. G. S. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 94, n.1, p. 18-23, 2013.

SILVA et al. Anxiolytic and antidepressant-like Effects of the monoterpene tetrahydrolinalool and in silico approach of new potential targets. **Current Topics In Medicinal Chemistry**, 2022.

10. ANEXO



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "INVESTIGAÇÃO DO EFEITO ANTINOCEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO DO MONOTERPENO TETRAHIDROLINALOL EM CAMUNDONGOS", protocolada sob o CEUA nº 1739290620 (ID 001173), sob a responsabilidade de **Reinaldo Nóbrega de Almeida e equipe; Natalia Diniz Nunes Pazos** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 21/08/2020.

We certify that the proposal "INVESTIGATION OF THE EFFECT ANTINOCEPTIVE AND ANTI INFLAMMATORY MONOTERPENO TETRAHYDROLINALOL IN MICE", utilizing 208 Heterogenics mice (208 males), protocol number CEUA 1739290620 (ID 001173), under the responsibility of **Reinaldo Nóbrega de Almeida and team; Natalia Diniz Nunes Pazos** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 08/21/2020.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 08/2020 a 10/2021 Área: Fisiologia E Patologia

Origem:	Unidade de Produção Animal IpeFarM	sexo:	Machos	idade:	3 a 4 meses	N:	208
Espécie:	Camundongos heterogênicos			Peso:	20 a 40 g		
Linhagem:	Mus musculus - Swiss						

Local do experimento: Laboratório de Psicofarmacologia/IpeFarM/UFPB.

João Pessoa, 09 de setembro de 2020

Profa. Dra. Jailane de Souza Aquino
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Carlos Augusto Alanis Clemente
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba