UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS

ALINE KELY FELÍCIO DE SOUSA SANTOS

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE *Sargassum polyceratium* Montagne

JOÃO PESSOA - PB
2016

ALINE KELY FELÍCIO DE SOUSA SANTOS

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE *Sargassum polyceratium* Montagne

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. Reinaldo Nóbrega de Almeida

JOÃO PESSOA - PB

2016

ALINE KELY FELÍCIO DE SOUSA SANTOS

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE *Sargassum polyceratium* Montagne

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

Aprovado em 21/11/2016

BANCA EXAMINADORA

_____

Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida
Orientador - UFPB

_____

Profa. Dra. Liana Clébia de Morais Pordeus
Examinador Externo - UFPB

_____

Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima
Examinador Interno - UFPB

PgPNSB

Pós Graduação em Produtos Naturais
e Sintéticos Bioativos

Ata da 360ª (trecentésima sexagésima primeira) Dissertação de Mestrado da aluna do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos **Aline Kely Felício de Sousa Santos** candidata ao Título de "Mestre" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de Farmacologia.

Às quatorze horas (14h00) do dia vinte e um de novembro do ano de dois mil e dezesseis (21.11.2016), nas dependências do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, reuniram-se em caráter de Solenidade Pública os membros da Comissão designada para examinar a aluna **Aline Kely Felício de Sousa Santos**, candidata ao Título de "MESTRE" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de Farmacologia. Foram componentes da Banca Examinadora os professores doutores Edeltrudes de Oliveira Lima, Ph.D em Farmácia, Liana Clébia de Morais Pordeus, Ph.D em Farmacologia e Reinaldo Nóbrega de Almeida, Ph.D em Farmacologia. Sendo todos, integrantes do corpo docente da Universidade Federal da Paraíba. Dando início aos trabalhos, o Presidente da Banca, professor Reinaldo Nóbrega de Almeida, após declarar os objetivos da reunião, apresentou a candidata **Aline Kely Felício de Sousa Santos**, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado "Estudo do mecanismo de ação e avaliação da atividade anti-inflamatória de produtos naturais de origem marinha". Após discorrer sobre o referido tema durante cerca de quarenta minutos, a candidata foi arguida pelos examinadores na forma Regimental. Em seguida, passou a comissão, em caráter secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito **APROVADO**. Em face da aprovação, declarou o Presidente achar-se a examinada **Aline Kely Felício de Sousa Santos** legalmente habilitada a receber o Título de "MESTRE" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na Área de Farmacologia, cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito, a expedição do Diploma que a mesma faz jus. Nada Mais havendo a tratar, eu, Caroline Helena Meireles de Medeiros Mangueira, na qualidade de Secretária, lavrei a presente Ata que submeto a aprovação da Comissão Examinadora.

Caroline Helena Meireles de Medeiros Mangueira (Secretária)

Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida (Orientador)

Morais

Prof.ª Dr.ª Liana Clébia de Morais Pordeus (Examinadora)

Prof.ª Dr.ª Edeltrudes de Oliveira Lima (Examinadora)

PgPNSB

Pós Graduação em Produtos Naturais
e Sintéticos Bioativos

RELATÓRIO FINAL DO ORIENTADOR
MESTRADO

Eu, Prof(a) Dr(a) Reinaldo Nóbrega de Almeida, orientador(a) do trabalho final do(a) aluno(a) **Aline Kely Felício de Sousa Santos**, matrícula nº 2015107553, do Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, área de concentração em **Farmacologia**, da Universidade Federal da Paraíba, após exame da vida acadêmica do(a) mencionado(a) aluno(a), tenho a relatar:

A integralização do curso foi feita em **21** meses, portanto no prazo estabelecido pela Legislação vigente na UFPB.

Quanto ao desempenho acadêmico, constata-se que o(a) Mestrando(a) cursou 22 créditos da estrutura curricular a que está submetido(a) e foi aprovado(a) no exame de verificação da capacidade de leitura em Inglês no período de 2015.1. Já na apresentação do trabalho, intitulada "Estudo do mecanismo de ação e avaliação da atividade anti-inflamatória de produtos naturais de origem marinha", realizada no dia 21 de novembro de 2016, nas dependências do PPgPNSB, o(a) Mestrando(a) obteve conceito ***APROVADO***, tendo a banca examinadora sido formada pelos especialistas:

Liana Clébia de Morais Pordeus	TIT: **Doutora** - IES: **UFPB**
Edeltrudes de Oliveira Lima	TIT: **Doutora** - IES: **UFPB**

Diante do exposto, considerando que **Aline Kely Felício de Sousa Santos,** dentro do prazo regimental, satisfez todas as exigências do Regimento Geral da UFPB, do Regulamento Geral dos Cursos e Programas de Pós-Graduação *Stricto Sensu* da UFPB e do regulamento do Curso/Programa, está apto(a) a obter o grau de **MESTRE** em PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS, área de concentração: **Farmacologia**, a ser conferido pela Universidade Federal da Paraíba.

João Pessoa, 21 de novembro de 2016.

Orientador de Trabalho Final

Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S237e Santos, Aline Kely Felicio de Sousa.
Estudo da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato etanólico bruto de Sargassum polyceratium Montagne / Aline Kely Felicio de Sousa Santos. - João Pessoa, 2016.
77 f. : il.

Orientação: Reinaldo Nóbrega de Almeida.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Produtos naturais. 2. Sargassum polyceratium. 3. Nocicepção. 4. Dor. 5. Inflamação. 6. Alga. I. Almeida, Reinaldo Nóbrega de. II. Título.

UFPB/BC CDU 547.9(043)

Elaborado por Gracilene Barbosa Figueiredo - CRB-15/794

A Deus, que sempre tem me protegido
dos perigos do mundo.
Aos meus pais, Hailton e Lindalva,
por serem os pilares da minha vida e
por sempre acreditarem em mim.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por permitir que eu levante todos os dias com saúde e pronta para vencer as batalhas de cada dia.

Ao meu orientador, professor e amigo, Prof. Dr. **Reinaldo Nóbrega de Almeida**, por sempre ter depositado sua confiança em mim e por agir como um pai na vida acadêmica, sempre me guiando pelos melhores caminhos a serem seguidos.

Aos meus pais, **Hailton** e **Lindalva**, por compreenderem a minha ausência, e por estarem comigo, me apoiando mesmo que de longe, nos momentos de tristeza e vibrando comigo nos momentos de alegria. Vocês são a minha inspiração. A vocês eu devo tudo que sou. Eu amo vocês!

Aos meus irmãos, **Aldair** e **Adailton**, minha cunhada, **Mirian**, meu sobrinho amado, **Kaio César**, e a meus tios e tias, primos e primas, em especial a minha tia **Elizabeth**; obrigada pelo apoio de vocês.

Aos meus amigos que sempre estiveram torcendo pelo meu sucesso**: Karine, Ovídio, Clebinho, Sara, Nayr, Anaís, Millena, Priscilla, Bruna, Vanessa, Aline Candeia, Sulene, Helizene, Anderson** e **Adervando**.

Aos colegas da minha turma de Mestrado: **Ryldene, Gabi, Katherine, Elba, Aratã, André** e **Jephesson** pelo incentivo e companheirismo.

Aos colegas da psicofarmacologia, em especial a **Renan, Mirian, Humberto** e **Teresinha** pela colaboração na parte experimental e pela amizade construída.

A todos os **professores** e **funcionários** do Programa de Pós-graduação, pelos ensinamentos e serviços prestados.

A **José Crispim Duarte**, auxílio técnico, competência e amizade, fornecidos no decorrer desta pesquisa.

Ao **Biotério Prof. Dr. Thomas George** do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos pelo fornecimento dos animais.

A Profa. Dra. **Celidarque Dias**, pelo fornecimento da substância utilizada.

A Profa. Dra. **Edeltrudes Lima**, Profa. Dra. **Liana Pordeus**, Profa. Dra. **Marianna Sobral** e Prof. Dr**. Hemerson Yuri**, por aceitarem participar desta importante etapa na minha formação e pelas contribuições dadas a este trabalho.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (**CAPES**) e ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** (**CNPq**) pelo apoio financeiro.

A **todos** que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

Muito obrigada,

Aline Kely Felício de Sousa Santos

"Decidi não esperar as
oportunidades e sim, buscá-las."

Walt Disney

RESUMO

SANTOS, A.K.F.S. **Estudo da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato etanólico bruto de *Sargassum polyceratium* Montagne**. 2016. 78p. **Dissertação** (Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Farmacologia) - UFPB/CCS/João Pessoa - PB.

Os produtos naturais marinhos têm sido alvos de pesquisas importantes nas últimas décadas, nesse período a quantidade de produtos isolados que apresentam atividades terapêuticas cresceu de forma exponencial. Apesar do enorme arsenal biológico que o ambiente marinho representa, ele ainda é pouco explorado. As algas representam um dos recursos mais biologicamente ativos da natureza e têm despertado o interesse da comunidade científica, por serem produtoras de substâncias químicas com grandes chances de possuírem atividade terapêutica. *Sargassum polyceratium* é uma macroalga bentônica ecologicamente importante para o ambiente marinho. Estudos anteriores isolaram e identificaram quatro substâncias do extrato etanólico bruto de *Sargassum polyceratium* (SpEE) e mostram comprovada atividade antinociceptiva do extrato, porém nada se conhece sobre o mecanismo de ação. No presente trabalho, foi investigado o possível mecanismo de ação do SpEE utilizando antagonistas farmacológicos e tendo como protocolo experimental o teste da formalina. A antinocicepção produzida pelo SpEE foi significativamente bloqueada em animais pré-tratados com cafeína (10 mg/kg, s.c.), indicando o envolvimento do sistema adenosinérgico. Contudo, o efeito antinociceptivo do SpEE não foi revertido pela naloxona (antagonista não-seletivo dos receptores opioides, 5 mg/kg, s.c.), glibenclamida (bloqueador dos canais de K^+_{ATP}, 10 mg/kg, i.p.), sulpirida (antagonista de receptores dopaminérgicos do tipo D_2, 20 mg/kg, s.c.) e nem pela ioimbina (antagonista seletivo de receptores α_2-adrenérgicos, 015 mg/kg, i.p.), sugerindo que o SpEE não atua diretamente por esses mecanismos. No modelo de peritonite induzida por carragenina, o tratamento com SpEE diminuiu o fluxo de leucócitos para o local inflamado. Portanto, esses resultados mostram que o SpEE promove atividade antinociceptiva com possível participação do sistema adenosinérgico, além de possuir possível atividade anti-inflamatória.

Palavras-chaves: *Sargassum polyceratium*, Nocicepção, Dor, Inflamação, Mecanismo de ação, Alga.

ABSTRACT

SANTOS, A.K.F.S. **Study of the action mechanism and assessment of anti-inflammatory activity of natural products from marine origin.** 2016. 78p. **Dissertation** (Post-graduation in Natural Products and Bioactive Synthetics, Pharmacology) – UFPB/CCS/João Pessoa – PB.

The marine natural products have been the target of important researches in the last decades; in that period, the quantity of isolated products that presented therapeutic activity has increased exponentially. However, due to the vast biological arsenal that the marine environment presents, it is still little explored. The algae represent one of the resources most biologically active in nature and due to that, it has aroused the interest of research community for being producers of chemical substances with high chances of having therapeutic activity. *Sargassum polyceratium* is a benthic macroalgae ecologically important for the marine environment. Previous studies isolated and identified four substances from brute ethanolic extract of *Sargassum polyceratium* (SpEE) and reveal confirmed antinociceptive activity of this extract, although it is known nothing about its action mechanism. In the present study, it was studied the possible action mechanism of SpEE using pharmacological antagonists and having the formalin test as experimental protocol. The antinociception produced by SpEE was significantly blocked in animals pre-treated with caffeine (10 mg/kg, s. c.), indicating the involvement of the adenosinergic system. However, the antinociceptive effect of SpEE was not reversed by nexalone (non-selective opioid antagonist, 5 mg/kg, s. c.), glibenclamide (K^+_{ATP} channel blockers, 10 mg/kg, i.p.), sulpiride (antagonist of dopaminergic receptors type D_2, 20 mg/kg, s.c.), neither by yohimbine (selective antagonist of receptors α_2-adrenergic, 015 mg/kg, i.p.), suggesting that SpEE does not act directly by these mechanisms. In the peritonitis model induced by carrageenan, the treatment with SpEE reduced the flow of leukocytes to the inflamed site. Thus, these results show that SPEE promotes antinociceptive activity with possible participation of adenosinergic system, in addition to having anti-inflammatory activity.

Keywords: *Sargassum polyceratium*, Nociception, Pain, Inflammation, Action mechanism, Algae.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Primeira e segunda dor são realizadas por duas diferentes fibras aferentes primárias.....28

Figura 2 - Conexão entre fibras aferentes primárias e a medula espinhal.....30

Figura 3 - Diagrama esquemático do sistema de controle da comporta.....31

Figura 4 - Substâncias isoladas de *Sargassum polyceratium*.....36

Figura 5 -Camundongo Swiss.....40

Figura 6 - Delineamento metodológico utilizado no estudo para determinação do mecanismo de ação do SpEE.....43

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Efeito do SpEE (200 mg/kg i.p.) na fase neurogênica do teste da formalina, em camundongos, na presença de naloxona (NLX: 5 mg/kg s.c.) e morfina (MORF: 10 mg/kg i.p.).....48

Gráfico 2 - Efeito do SpEE (200 mg/kg i.p.) na fase inflamatória do teste da formalina, em camundongos, na presença de naloxona (NLX: 5 mg/kg s.c.) e morfina (MORF: 10 mg/kg i.p.).....50

Gráfico 3 - Efeito do pré-tratamento com glibenclamida (Glib: 10 mg/kg, s.c.) na antinocicepção causada pelo SpEE (200 mg/kg, i.p.), na fase neurogênica do teste da formalina.....51

Gráfico 4 - Efeito do pré-tratamento com glibenclamida (Glib: 10 mg/kg, s.c.) na antinocicepção causada pelo SpEE (200 mg/kg, i.p.), na fase inflamatória do teste da formalina.....52

Gráfico 5 - Efeito sulpirida (Sulp: 20 mg/kg) na antinocicepção causada pelo SpEE (200 mg/kg, i.p.), na fase neurogênica do teste da formalina.....53

Gráfico 6 - Efeito sulpirida (Sulp: 20 mg/kg) na antinocicepção causada pelo SpEE (200 mg/kg, i.p.), na fase inflamatória do teste da formalina.....54

Gráfico 7 - Efeito do SpEE (200 mg/kg i.p.) na fase neurogênica do teste da formalina, em camundongos, na presença de ioimbina (Ioimb: 0,15 mg/kg i.p.).....55

Gráfico 8 - Efeito do SpEE (200 mg/kg i.p.) na fase inflamatória do teste da formalina, em camundongos, na presença de ioimbina (Ioimb: 0,15 mg/kg i.p.).....56

Gráfico 9 - Efeito cafeína (Caf: 10 mg/kg) na antinocicepção causada pelo SpEE (200 mg/kg, i.p.), na fase neurogênica do teste da formalina.....57

Gráfico 10 - Efeito cafeína (Caf: 10 mg/kg) na antinocicepção causada pelo SpEE (200 mg/kg, i.p.), na fase inflamatória do teste da formalina.....58

Gráfico 11 - Efeito da administração do SpEE (100 e 200 mg/kg, i.p.) e da dexametasona (Dexa: 2 mg/kg, s.c.) sobre a migração de leucócitos totais.....59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeito da naloxona sobre a atividade antinociceptiva do SpEE e morfina na nocicepção induzida pelo teste de formalina em camundongos.....49

Tabela 2 – Efeito da glibenclamida sobre a atividade antinociceptiva do SpEE na nocicepção induzida pelo teste de formalina em camundongos.....51

Tabela 3 – Efeito da sulpirida sobre a atividade antinociceptiva do SpEE na nocicepção induzida pelo teste de formalina em camundongos.....53

Tabela 4 – Efeito da ioimbina sobre a atividade antinociceptiva do SpEE na nocicepção induzida pelo teste de formalina em camundongos.....55

Tabela 5 – Efeito da cafeína sobre a atividade antinociceptiva do SpEE na nocicepção induzida pelo teste de formalina em camundongos.....57

Tabela 6 – Efeito da atividade anti-inflamatória do SpEE e dexametasona sobre a migração de leucócitos totais.....59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Diferentes tipos de neurônios sensoriais primários, responsáveis pela condução do sinal nociceptivo da periferia ao SNC.....27

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	-	Por cento
±	-	Mais ou menos
>	-	Maior
<	-	Menor
®	-	Marca registrada
°C	-	Graus celcius
$A_1/A_{2A}/A_{2B}/A_3$	-	Receptores de adenosina
AMPc	-	Monofosfato de adenosina cíclico
ANOVA	-	Análise de variância
ASIC	-	Canais iônicos sensíveis a ácido
ATP	-	Trifosfato de adenosina
B_1/B_2	-	Receptores de bradicinina
Ca^{2+}	-	Íons cálcio
Caf	-	Cafeína
CCS	-	Centro de Ciências da Saúde
CEUA	-	Comissão de Ética no Uso de Animais
CGRP	-	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
D_{1-5}	-	Receptor dopaminérgico (1-5)
DEG/ENaC	-	Canal de sódio epitelial degenerina
DEXA	-	Dexametasona
E.P.M.	-	Erro padrão da média
E.U.A.	-	Estados Unidos da América
g	-	Grama
G_i/G_o	-	Proteína G inibitória
Glib	-	Glibenclamida
h	-	Hora
i.p.	-	Intraperitoneal
Ioimb	-	Ioimbina
IASP -	-	International Association for the Study of Pain
INCT AmbTropic	-	Instituto nacional de ciência e tecnologia ambientes marinhos tropicais

IPeFarM	-	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
K^+	-	Íon potássio
K^+_{ATP}	-	Canal de potássio ativado por ATP
mg/kg	-	Miligrama por quilograma
mmol/kg	-	Milimol por quilograma
min.	-	Minuto
MORF	-	Morfina
mRNA	-	Ácido ribonucleico mensageiro
m/s	-	Metro por segundo
Na_v	-	Canais de sódio regulados por voltagem
NK	-	Natural killer
NLX	-	Naloxona
p	-	Grau de significância
pH	-	Potencial hidrogeniônico
P2X/P2Y	-	Receptor purinérgico
rpm	-	Rotações por minuto
s	-	Segundo
s.c.	-	Subcutâneo
SNC	-	Sistema nervoso central
SpEE	-	Extrato etanólico bruto de *Sragassim polyceratium*
Sulp	-	Sulpirida
TRP	-	Família de receptores de potencial transitório
UFPB	-	Universidade Federal da Paraíba
α	-	Alfa
β	-	Beta
δ	-	Delta
ε	-	Epsilon
σ	-	Sigma
κ	-	Kappa
μ	-	Mu
μm	-	Micrômetros

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 20

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA 24

2.1. Dor - Considerações gerais 24

2.2. Classificação da dor 25

2.3. Percepção da dor 26

2.4. Sistema opioide e antinocicepção 31

2.5. Canais para K^+ e antinocicepção 32

2.6. Sistema dopaminérgico e antinocicepção 32

2.7. Sistema α_2-adrenérgico e antinocicepção 33

2.8. Sistema adenosinérgico e antinocicepção 33

2.9. Inflamação 34

2.10. Considerações gerais sobre *Sargassum polyceratium* 35

3. OBJETIVOS 38

3.1. Objetivo geral 38

3.2. Objetivos específicos 38

4. MATERIAL 40

4.1. Animais 40

4.2. Local de pesquisa e condições experimentais 41

4.3. Substâncias utilizadas 41

4.4. Preparação da amostra do Extrato Etanólico Bruto de *Sargassum polyceratium* 42

5. MÉTODOS 42

5.1. Ensaios farmacológicos utilizados 42

5.1.1. Teste da formalina 42

5.2. Investigação do mecanismo de ação da propriedade antinociceptiva do SpEE 43
5.2.1. Estudo do envolvimento do sistema opioide 44
5.2.2. Participação dos canais de K^+_{ATP} 44
5.2.3. Participação do sistema dopaminérgico 44
5.2.4. Participação do sistema α_2-adrenérgico 44
5.2.5. Participação do sistema adenosinérgico 45
5.3. Estudo da atividade anti-inflamatória do SpEE 45
5.3.1. Peritonite induzida por carragenina 45
5.4. Análise estatística 46
6. RESULTADOS 48
6.1. Investigação do mecanismo de ação do SpEE 48
6.1.1. Estudo do envolvimento do sistema opioide 48
6.1.2. Participação dos canais de K^+_{ATP} 50
6.1.3. Participação do sistema dopaminérgico 52
6.1.4. Participação do sistema α_2-adrenérgico 54
6.1.5. Participação do sistema adenosinérgico 56
6.2. Estudo da atividade anti-inflamatória do SpEE 58
6.2.1. Peritonite induzida por carragenina 58
7. DISCUSSÃO 61
8. CONCLUSÃO 68
9. REFERÊNCIAS 70

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A dor é um sintoma que sempre esteve presente na humanidade. A sensação da dor tem um papel protetor para os seres vivos, pois funcionam como alerta para detecção de algo que ameace a manutenção da homeostase no corpo; consequentemente, o organismo induzirá respostas que permitirão a ativação de mecanismos de defesa para combater a lesão ou o agente causador da perda da homeostase. Quando o dano tecidual é inevitável, alterações de excitabilidade provocam uma hipersensibilidade no tecido lesionado e ao seu redor, fazendo com que o indivíduo evite o contato local até que a cura seja alcançada e, provocando reações emocionais negativas, tornando causadora de sofrimentos e sendo o motivo mais comum para que seja procurado atendimento médico (LUIZ, 2007; BENEDITO, 2013).

A dor pode ser desagradável para o paciente permitindo que sua qualidade de vida seja reduzida, o que também irá gerar um desconforto para a família. Para o paciente, a palavra dor significa doença e sofrimento; já para os fisiologistas dor tem o sentido mais abrangente e se segue da ativação de nociceptores, envolvimentos de vias de sinalização, terminando no córtex cerebral (SWIEBODA *et* al., 2013). Já está bem estabelecido que dor é uma definição complexa e que envolve tanto processos cognitivos e emocionais pelo encéfalo, como também a transdução de estímulos nocivos ao organismo. Portanto dois componentes participam do processo doloroso: o componente sensorial e o componente motivacional (CHAPMAN *et al*., 1999; JULIUS; BASBAUM, 2001; ALMEIDA *et al*., 2004).

O termo nocicepção vem do latim “*nocere*”, que significa “*doer*”, e refere-se ao processo sensorial desencadeado por estímulos nocivos que serão convertidos em impulsos nervosos, através dos nociceptores, e levados ao cérebro para produzir a sensação de dor (*International Association for the Study of Pain*, 2010). Nociceptores são transdutores altamente especializados que se apresentam como terminações nervosas livres de alto limiar de excitabilidade e ativados quando um estímulo mecânico, térmico, químico ou elétrico potencialmente lesivo seja aplicado ao organismo. Para que os nociceptores sejam ativados a partir de um dano tecidual, deve ocorrer a liberação de vários mediadores químicos que irão atuar em receptores específicos, ativando cascatas de sinalização (BENEDITO, 2013). Portanto,

substâncias que são capazes de bloquear tais vias vêm sendo tratadas como importantes ferramentas no tratamento da dor (MEOTTI *et al*., 2007)

Grande parte da população que faz uso de terapias medicamentosas não obtêm respostas positivas ao tratamento existente no mercado, e, aliado a isso, os efeitos indesejados causados por medicamentos ajudaria a favorecer a descontinuação do tratamento. Dessa forma se faz necessário a pesquisa constante por novos medicamentos ou procedimentos que diminuam ou cessem os estímulos dolorosos e que sejam mais eficazes e seguros.

Em meio a essa necessidade, diversos fatores impulsionam para a investigação de propriedades farmacológicas que possam vir dos produtos naturais, a exemplo: vias alternativas mais baratas que sejam oferecidas a população, juntamente com a descoberta de drogas eficazes, contribuindo, também, para o estudo da biodiversidade das espécies (CARVALHO, 2001). A biodiversidade brasileira tem contribuído bastante para pesquisa de novos fármacos; cabe ressaltar que o Brasil detém a maior e mais rica biodiversidade do planeta, porém, ainda é precariamente explorada no que tange a rápida necessidade de novas drogas.

Apesar do alto potencial terapêutico que os produtos naturais possuem, há uma grande complexidade estrutural em suas substâncias, que pode levar a um baixo rendimento químico, o que inviabiliza a síntese orgânica das mesmas (SOUZA *et al*., 2012). Além disso, deve-se considerar que os efeitos normalmente resultam do sinergismo entre vários compostos bioativos.

Uma busca nessa área influenciaria diretamente a sociedade em vários níveis, possibilitando a descoberta de novas drogas, a identificação de fontes de substâncias químicas locais capazes de substituir as importadas, assim como o desenvolvimento da indústria de fitoterápicos nacionais (SANTOS, 2015). A fundamentação científica é indispensável e é o que possibilita a transformação segura e eficaz de uma planta em um medicamento de qualidade, diferente do uso baseado na prática popular (ELISABETSKY, 2002).

No ambiente marinho pode-se encontrar cerca de 80% das espécies de plantas e animais do mundo, sendo considerado uma fonte primárias de produtos naturais (ALMEIDA, 2011).

As pesquisas com produtos naturais de origem marinha são recentes, se comparados aos produtos naturais de origem terrestre, porém, os de origem marinha

apresentam uma promissora fonte de substâncias com finalidades terapêuticas para o uso humano (analgésico e antitumoral) (INCT AmbTropic, 2012). No entanto, devido a complexa e pouco explorada diversidade molecular, ainda são poucas as informações a respeito das substâncias isoladas e atividade biológica documentadas nos artigos científicos sobre os produtos naturais de organismos marinhos coletados ao longo do vasto litoral brasileiro.

Sendo um dos recursos mais biologicamente ativos da natureza, as algas, possuem uma infinidade de compostos primários e secundários (O'SULLIVAN *et al*., 2010).

As algas marinhas são ricas em fibra, minerais, lipídios, proteínas, ácidos graxos, (incluindo o ômega-3), aminoácidos essenciais, polissacarídeos e vitaminas A, B, C e E. Estudos sobre a atividade de composto extraídos de algas marinhas revelaram numerosos efeitos terapêuticos, incluindo efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, antinociceptivo, antimicrobianos e antitumoral (LEE *et al*., 2013).

Sargassum polyceratium Montagne, pertencente à família Sargassaceae, ordem Fucales, é uma macroalga bentônica, que está distribuída desde a Flórida até o Nordeste brasileiro. É uma alga parda que atua diminuindo a poluição do ambiente marinho, agindo como biofiltros que acumulam metais tóxicos (ENGELEN *et al*., 2001). Dados na literatura descrevem atividade biológicas como atividade antioxidante em células endoteliais e imunorreguladores de células NK, macrófagos e células T (CHEN et al., 2007).

Estudos anteriores mostraram que o extrato etanólico bruto de *Sargassum polyceratium* possui atividade antinociceptiva comprovada nos modelos de nocicepção química (teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético, nocicepção induzida por glutamato e no teste da formalina) utilizando roedores (SANTOS *et al*., 2015), contudo, o mecanismo de ação pelo qual ele promove este efeito permanece desconhecido.

O presente trabalho buscou investigar o possível mecanismo de ação do extrato etanólico bruto de *Sargassum polyceratium*, para entender quais vias estão envolvidas na antinocicepção promovida pelo mesmo. Além disso, buscamos avaliar a influência do SpEE na migração de leucócitos no modelo da peritonite induzida por carragenina, para observar se há alguma atividade anti-inflamatória existente.

Fundamentação teórica

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Dor - Considerações gerais

A dor é uma das principais causas de sofrimento humano, comprometendo a qualidade de vida das pessoas e interferindo no seu estado físico e psicossocial. Sendo uma das sensações mais íntimas e exclusivas que o ser humano já experimentou, a dor não só envolve componentes sensoriais; mas também envolve componentes afetivos, cognitivos, sociais e comportamentais (ARAÚJO, 2014).

A definição de dor, que é mais bem aceita pela comunidade científica é ditada pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (*International Association for the Study of Pain – IASP*, *2012*), que diz que a dor é “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão tecidual potencial ou real, ou descrita em termos de tal lesão”. Independente da aceitação e da amplitude dessa definição, a dor é considerada como uma experiência, uma sensação, genuinamente subjetiva e pessoal (SILVA *et al*., 2011).

Desta maneira, é importante que haja a distinção entre dor e nocicepção. A primeira se caracteriza como experiência multidimensional e amplamente substrata, que causa sofrimento ao indivíduo e à sociedade ao redor dele. Já o termo nocicepção refere-se à detecção da lesão tecidual por transdutores especializados ligados às fibras nervosas que tem a função de transmitir sinais ao sistema nervoso central, influenciados por estímulos ambientais físicos, químicos ou térmicos e por processos inflamatórios que venham a surgir no organismo (LOESER; MELZACK, 1999). Portanto, a nocicepção, refere-se à percepção do estímulo doloroso.

O termo “dor” é de exclusividade dos seres humanos, pois, além de envolver o componente nociceptivo, há o envolvimento do componente emocional (COUTAUX *et al.*, 2005). Deste modo, em estudos com animais, o termo dor, se torna errôneo, já que os mesmos não são capazes de demonstrar, através de palavras, quais os componentes emocionais envolvidos; sendo assim, o termo nocicepção é mais adotado e mais apropriado em estudos com animais (JONES, 1996).

2.2. Classificação da dor

Existem várias classificações que dividem os processos dolorosos de acordo com a duração, a intensidade e natureza do estímulo. Sendo a mais utilizada a que divide a dor em seu tempo de duração.

Sob o ponto de vista temporal, a dor é classificada como aguda e crônica. A primeira é caracterizada por ser pontual, delimitada e desaparecer com a resolução do processo patológico envolvido, tendo o papel de alertar o organismo e permitindo que mecanismos de defesa sejam adotados (ALMEIDA *et al*., 2004).

A dor crônica persiste por um longo período de tempo e está associada a processos patológicos crônicos e mudanças no padrão de transmissão neuronal, ocorrendo uma estimulação persistente dos nervos periféricos no sistema nervoso central, podendo persistir após a recuperação da doença ou lesão. Na maioria das vezes ela não está bem localizada, e tende a ser contínua ou recorrente. A dor crônica pode ser dividida em nociceptiva, neuropática e psicogênica (MERSKEY *et al*., 1994; WHO, 2012; HELMS; BARONE, 2008)

A dor nociceptiva resulta de situações em que ocorre a estimulação persistente dos nociceptores. Nesta dor, ocorre uma excitação direta dos nociceptores periféricos somáticos ou viscerais, sem que exista uma lesão das estruturas nervosas (MILLAN, 1999; RODRIGUES, 2013). A dor somática é bem localizada e é interpretada como sensação de picada ou pontada, podendo ser difusa ou se tratar de dor profunda. A dor visceral tem localização indefinida, irradia de forma difusa e profunda e é percebida como constritiva ou em cólica, podendo ter sua origem em diversos processos patológicos que ocorrem em órgãos internos (RAMOS, 2014; RODRIGUES, 2013).

A dor neuropática está relacionada com a existência de lesão total ou parcial do sistema nervoso central, periférico ou de ambos, podendo suceder com o crescimento rápido de algum tumor ou por compressão dos nervos periféricos e/ou centrais. É descrita pelo doente como sensações de queimadura e formigueiros e tem duração contínua e raramente intermitentes. Dor do membro fantasma é um exemplo de dor neuropática (RAMOS, 2014).

Há, também, a dor psicogênica, que surge em resposta a ansiedade, stress ou outros distúrbios psíquicos, sendo um termo utilizado para definir dores que são determinadas por fatores psicológicos (WHO, 2012).

2.3. Percepção da dor

O sistema nervoso é capaz de detectar uma vasta gama de estímulos que acontecem ao nosso redor, porém a habilidade de detectar estímulos nocivos tem sido essencial para a sobrevivência e bem-estar do organismo. A nocicepção pode ser provocada por estímulos químicos, térmicos ou mecânicos. Tais estímulos são detectados por um feixe de fibras nervosas periféricas chamadas nociceptores (BASBAUM *et al*., 2009; FEIN, 2011).

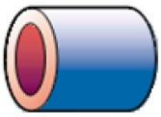
Nociceptores são neurônios aferentes que possuem terminações nervosas livres com um alto limiar de ativação. Eles têm a função de conduzir informações sobre lesões periféricas para o sistema nervoso central (SNC) (RUSSO; BROSE, 1998; FEIN, 2011). As fibras aferentes primárias têm uma morfologia única, denominada pseudounipolar, ou seja, possuem seus corpos celulares localizados nos gânglios da raiz dorsal e nos gânglios trigeminal, possuindo ramificações axonais periféricas e centrais, que inervam órgãos e medula espinhal respectivamente. Isto significa que os nociceptores tanto podem enviar como receber mensagens de ambos os terminais (BASBAUM *et al*., 2009).

De acordo com a velocidade de condução e calibre os nociceptores podem ser divididos em 3 grupos principais (Quadro 1) que apresentam padrões distintos de terminações centrais. O primeiro grupo, fibras Aα e Aβ, inclui fibras mielinizadas de maior diâmetro, que conduzem com velocidade rápida, respondendo a estímulos mecânicos inócuos com baixo limiar de ativação, como tato, vibração e pressão (GOLAN *et al*., 2009; KLAUMANN *et al*., 2008).

A segunda população, fibras Aδ, consiste em fibras pouco mielinizadas de diâmetro e velocidade intermediários, que respondem a estímulos de calor, frio e mecânicos de alto limiar, estas fibras medeiam a dor aguda ou “rápida” (Figura 1). Tais fibras são subdivididas em fibras Tipo I e Tipo II. As do tipo I são mecanoceptores de alto limiar que respondem a estímulos térmicos (> 50ºC) e químicos, porém no tecido lesionado o limiar dessas fibras tende a ser um pouco mais baixo. As fibras do

tipo II possuem limiar menor que as do tipo I e são sensíveis a temperaturas em torno de 43ºC (GOLAN *et al*., 2009; ALMEIDA *et al*., 2004; ROCHA *et al*., 2007).

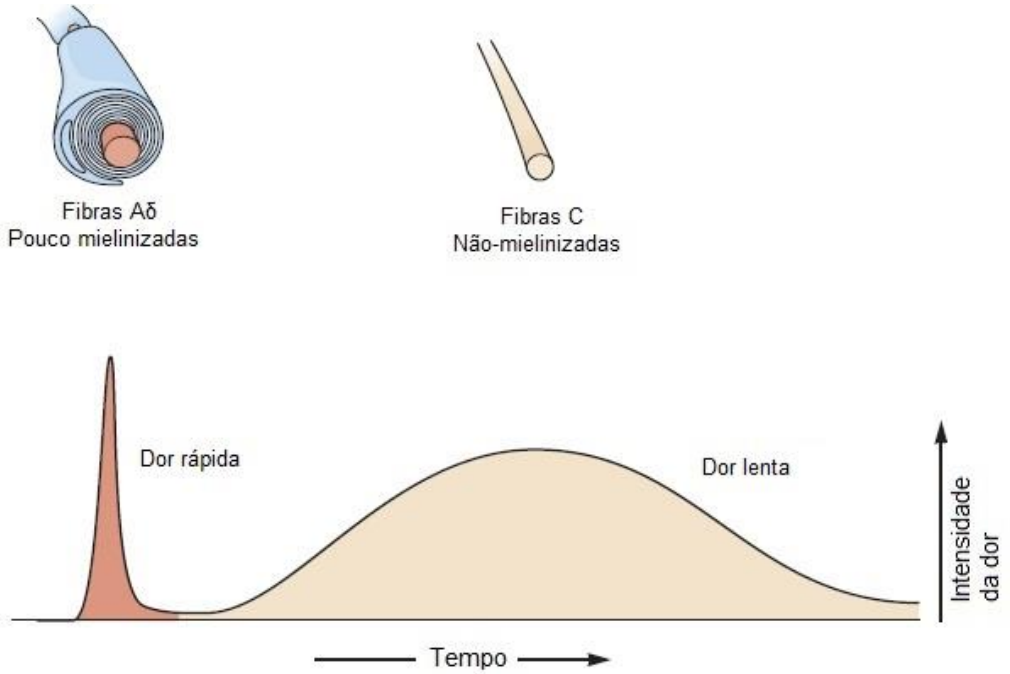
Quadro 1 - Diferentes tipos de neurônios sensoriais primários, responsáveis pela condução do sinal nociceptivo da periferia ao SNC.

Tipos de fibras	**Aα e Aβ** 	**Aδ**	**C**
Mielinização	Muita	Pouca	Ausente
Diâmetro (µm)	10	2 - 6	0,4 - 1,2
Velocidade de condução (m/s)	30 - 100	1,2 - 30	0,5 - 2
Temperatura	Não reconhece	Tipo I > 53ºC Tipo II > 43ºC	> 43ºC
Tipo de sinal	Toque leve Propriocepção	Nocicepção (Térmico, mecânico e químico)	Nocicepção (Térmico, mecânico e químico)

FONTE: Adaptado de Julius & Basbaum, (2001).

As fibras pertencentes ao terceiro grupo, fibras C, não possuem bainha de mielina, tem pequeno diâmetro e conduzem lentamente o sinal, sendo responsáveis pela “dor lenta”, conhecida como sensação de queimação. Essas fibras, também chamadas de polimodais, respondem a estímulos mecânicos intensos, térmicos e químicos (PERL, 2007). Nociceptores silenciosos são fibras C sensíveis ao calor, e que apenas apresentam sensibilidade mecânica na presença de lesão tecidual (SCHIMIDT *et al*., 1995). Estudos de caracterização neuroanatômicas e molecular das fibras C mostram a existência de nociceptores C peptidérgicos e não-peptidérgicos. Os primeiros produzem e liberam neuropeptídios, como a substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e expressam o receptor neurocinina 1. Já as fibras C não-peptidérgicas apresentam ligação para a isolectina B_4 e expressam o receptor purinérgico $P2X_3$ (JULIUS; BASBAUM, 2001; BASBAUM *et al*., 2009; GOLAN *et al*., 2009).

Figura 1 - Primeira e segunda dor são realizadas por duas diferentes fibras aferentes primárias.



FONTE: Modificado de Kandel *et al*., (2013).

O processamento neural de estímulos nocivos que originam o fenômeno doloroso se dá através uma sequência de mecanismos: transdução, transmissão e modulação. A transdução é a transformação de estímulos nocivos agressivos e intensos em potenciais de ação, através da despolarização das terminações nervosas periféricas dos nociceptores, que são transmitidos para o SNC (GOLAN *et al*., 2009; KANDEL *et al*., 2013). Em resposta a tais estímulos, canais iônicos e/ou receptores altamente especializados abrem ou mudam de conformação, respectivamente, gerando uma despolarização celular necessária para geração um potencial de ação.

Estudos mostram que nociceptores termossensíveis expressam canais catiônicos da família do receptor de potencial transitório (TRP). TRPV1, TRPV2, TRPV3 e TRPV4 são canais iônicos sensíveis ao calor; e TRPM8 e TRPA1 são canais sensíveis ao frio. De forma semelhante, uma população de mecanoceptores expressam TRPA1 e canais de sódio epiteliais degenerina (DEG/ENaC), que são ativados por estímulos mecânicos intensos. Algumas fibras nervosas periféricas também são estimuladas diretamente por vários agentes químicos. Por exemplo, um baixo pH extracelular produz influxo de cátions através dos canais iônicos sensíveis a

ácido (ASICs) e por meio do TRPV1; concentrações elevadas de ATP no espaço extracelular permitem a abertura de canais regulados por ligantes P2X e ativação de receptores de ATP P2Y acoplados à proteína G; cininas atuam nos receptores de bradicinina B_1 e B_2 acoplados a proteína G (GOLAN *et al*., 2009; BASBAUM *et al*., 2009; KANDEL *et al*., 2013).

Uma vez que sinais térmicos, mecânicos e químicos são recebidos pelo terminal periférico do nociceptor aferente primário, a despolarização gerada promove a abertura de vários canais iônicos dependentes de voltagem, permitindo que ela seja convertida em potencial de ação. Merecendo destaque os canais de sódio regulados por voltagem (Na_v) que representam um interessante alvo farmacológico para a dor (GOLAN *et* al., 2009).

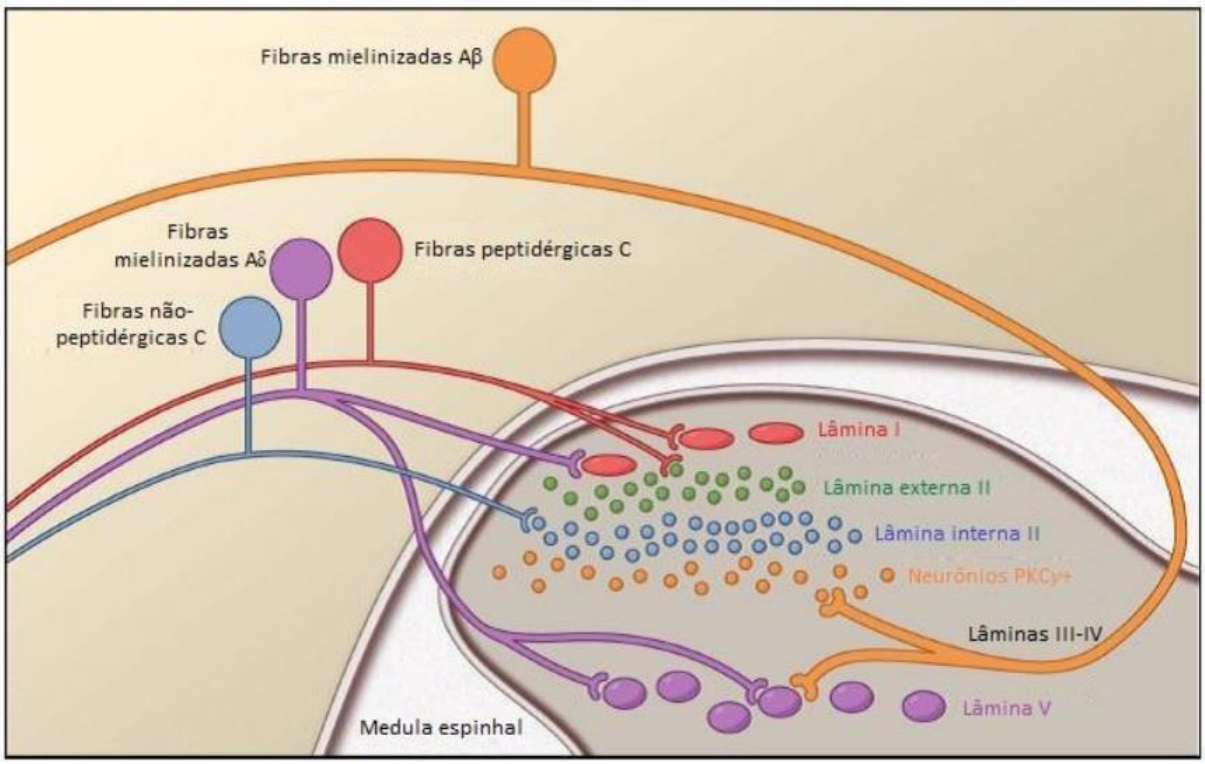
Após a propagação do potencial de ação pelos nociceptores aferentes primários, é necessário entender o papel da medula espinhal na transmissão da dor, que é o segundo estágio no processamento dos sinais nociceptivos.

A medula espinhal é uma extensão caudal do sistema nervoso central e está localizada dentro dos forames vertebrais, possui duas extensões ventrais e duas dorsais, denominadas de corno ventral e dorsal, respectivamente. Redex (CORDERO-ERAUSQUIN *et al*., 2016) identificou, através de características histológicas, dez secções na medula espinal de gato, tal classificação foi generalizada para humanos e roedores. As lâminas de I à VI formam o corno dorsal, como mostra a figura 2. É no corno dorsal que se estabelecem as projeções das fibras nociceptivas, onde fazem sinapse química com neurônios secundários presentes na lâmina (CORDERO-ERAUSQUIN *et al*., 2016, BASBAUM *et al*., 2009, GOZZANI, 2003)

De forma sucinta, os nociceptores Aδ projetam-se para as lâminas I e V, enquanto as fibras Aβ projetam-se para as lâminas III, IV e V. Já a maioria dos neurônios C peptidérgicos terminam na parte mais superficial das lâminas I e II, enquanto as fibras C não-peptidérgicas terminam na região mediana da lâmina II (BASBAUM *et al*., 2009).

Após deixarem as lâminas, os neurônios secundários cruzam a linha média da medula espinhal e ascendem para o tálamo por cinco vias ascendentes: trato espinotalâmicos, espinorreticulares, espinomesencefálico, espinohipotalâmico e espinocervical (GOZZANI, 2003; PINTO, 2000; KLAUMANN *et al*., 2008).

Figura 2 - Conexão entre fibras aferentes primárias e a medula espinhal.



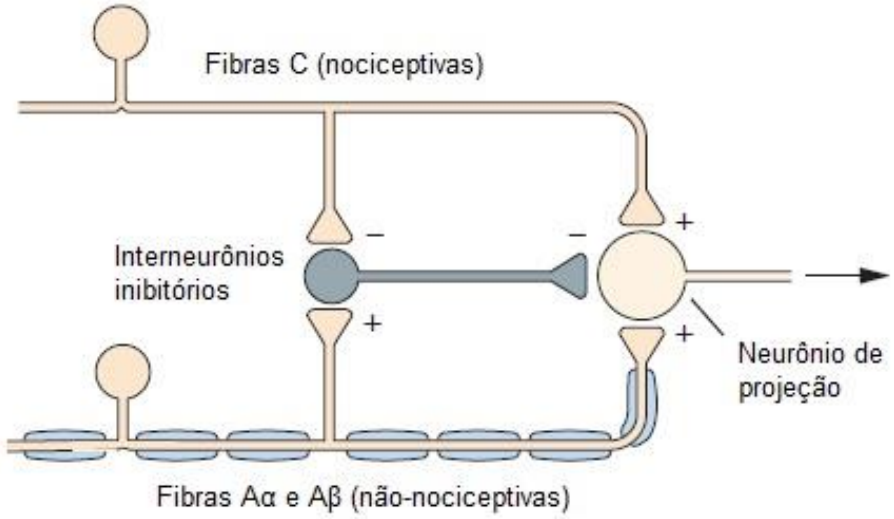
FONTE: Adaptado de Basbaum *et al*., (2009).

A modulação é o terceiro mecanismo do processamento da dor. Este evento permite que sinais nocivos sejam inibidos e a transmissão destes para os centros superiores cessem. A inibição dos sinais nocivos ocorre pela liberação de mediadores químicos que podem induzir ou inibir a propagação do estímulo doloroso, desta forma podem atenuar ou suprimir a sensação de dor. A modulação é um sistema bastante complexo, pois um neurotransmissor irá exercer as funções excitatórias ou inibitórias dependendo do local onde ele será liberado (MILLAN, 2002).

A teoria da comporta proposta por Ronald Melzack e Patrick WALL em 1965 constitui num modelo de equilíbrio relativo da atividade de fibras sensoriais nociceptivos e não-nociceptivos. Segundo esses autores, a supressão da dor decorreria de uma regulação da passagem de impulsos de vias periféricas para o tálamo através da ativação de interneurônios inibitórios presentes no corno dorsal da medula (Figura 3). Quando as fibras Aα e Aβ são ativadas, elas ativam interneurônios inibitórios, localizados na substância gelatinosa da medula espinhal. Tais neurônios inibitórios podem ser GABAérgicos ou glicinérgicos, que quando ativados bloqueiam

a propagação da dor para as vias supraespinhais, ou seja, fecha a comporta. No entanto, a ativação de fibras de pequeno calibre (Aδ e C) abrem a comporta pois inibem os interneurônios inibitórios, o que permite a transmissão do estímulo para centros superiores, e propagação da dor (CORDERO-ERAUSQUIN *et al*., 2016; BASBAUM *et al*., 2009; TEIXEIRA, 2001).

Figura 3 - Diagrama esquemático do sistema de controle da comporta.



FONTE: Modificado de Kandel *et al*., (2013).

2.4. Sistema opioide e antinocicepção

O termo opioide refere-se a substâncias que possuem os efeitos similares aos da morfina, sejam ela endógenas ou sintéticas, e que sejam bloqueados por antagonistas como a naloxona. Receptores opioides estão amplamente distribuídos nos tecidos periféricos, nervos cutâneos e principalmente no SNC no que tange as vias que envolvem a sensação dolorosa (WITTERT *et al*., 1996; STEIN, 1990; STÄNDER *et al*., 2002; LAO *et al*., 2008).

São conhecidas 5 tipos de famílias de receptores opioides descritos: μ, κ, δ, ε e σ. Os efeitos analgésicos dos opioides são devidos a ativação dos receptores μ, κ e δ, acoplados a proteína G_i, que promove uma diminuição dos potenciais de ação gerados pelos estímulos nociceptivos. As endorfinas, dinorfinas, encefalinas e endomorfinas são os ligantes endógenos destes receptores. (ZAMBELLI, 2011).

Apesar dos opioides terem propriedades analgésicas, eles apresentam importantes efeitos colaterais, como dependência física, euforia, sedação e depressão respiratória. Sendo assim, o sistema opioide é considerado um importante alvo farmacológico para drogas antinociceptivas, por fazer parte do sistema endógeno descendente inibitório no controle da dor.

2.5. Canais para K^+ e antinocicepção

Os canais para potássio são amplamente distribuídos nos seres humanos onde estão envolvidos em vários mecanismos fisiológicos e patológicos, sendo necessário a compreensão de seu funcionamento (TSANTOULAS; McMAHON, 2014).

Estudos mostram um amplo envolvimento dos canais para potássio no que diz respeito ao processo de antinocicepção. Sabe-se que a abertura destes canais promove um aumento na condutância de íons K^+ e um influxo extremamente rápido que hiperpolariza a célula fazendo com que não haja a propagação do estímulo nociceptivo (RANG *et al*., 2007; TSANTOULAS; McMAHON, 2014).

Substâncias que agem em determinados canais para K^+, promovendo sua abertura nos neurônios que transmitem a dor, representam uma importante ferramenta farmacológica para a terapêutica da dor.

2.6. Sistema dopaminérgico e antinocicepção

A dopamina cerebral é conhecida pela sua função de no controle motor, na sensação de prazer, memória e atenção. Embora tenha estas funções, estudos evidenciam o envolvimento do sistema dopaminérgico na modulação da dor (WOOD *et al*., 2007). Isto é demonstrado por estudos imunohistoquímicos, onde receptores dopaminérgicos, principalmente do subtipo D_2, e seu mRNA codificador encontram-se localizados em terminais de fibras aferentes primárias no corno dorsal da medula (VAN DIJKEN *et al*., 1996)

Ainda é observado que, após a indução de um estímulo nocivo, há um aumento na liberação de dopamina e histamina (MUROTANI *et al*., 2010). E que, em animais, a hiperalgesia se faz presente quando há uma redução da liberação de dopamina (MAGNUSSON; FISHER, 2000). Isto indica que a atividade dopaminérgica é liberada

em resposta ao estímulo doloroso atenuando o comportamento nociceptivo, se tornando um importante alvo farmacológico para o tratamento da dor.

2.7. Sistema α_2-adrenérgico e antinocicepção

A participação do sistema α_2-adrenérgico na modulação da dor se faz através de receptores do tipo α_2 por vias descendentes noradrenérgicas que exercem um efeito inibitório no corno dorsal da medula. Tal efeito se dá porque esse receptor é acoplado a proteína G_i que atua promovendo a inibição da enzima adenilato ciclase, reduzindo os níveis de AMPc, e aumentando o efluxo de K^+ para a o neurônio, o que promoverá uma diminuição dos níveis cálcio em neurônios presentes na substância cinzenta periquedutal, impendindo, assim, a liberação de neurotransmissores excitatórios como glutamato e substância P a partir dos terminais das fibras nervosas (MILLAN, 2002).

2.8. Sistema adenosinérgico e antinocicepção

A adenosina está presente em todo o corpo por ser um metabólito intermediário encontrado em muitas vias metabólicas. Tem sido demonstrado que a adenosina possui importantes funções, como por exemplo, vasodilatação, inibição da agregação plaquetária, angiogênese, ativação de mastócitos, inibição da lipólise, diminuição do fluxo sanguíneo renal (FREDHOLM, 2010).

Além destas funções, vários estudos pré-clínicos e clínicos demonstram o importante papel que a adenosina possui na transmissão da dor, tanto central como periférica. Quatro subtipos de receptor de adenosina foram identificados: A_1, A_{2A}, A_{2B} e A_3. Os receptores do subtipo A_2, são acoplados a proteína G_s, enquanto os A_1 e A_3 estão acoplados com a G_i (SAWYNOK; BURNSTOCK, 2010).

As propriedades antinociceptivas associadas a adenosina são em grande parte atribuídas sobre sistemas de receptores que se localizam na medula espinhal, onde os receptores A_1 e A_2 foram identificados na substância gelatinosa. Embora existam evidências do envolvimento de receptores A_2 na antinocicepção, o receptor A_1 desempenha um papel principal na inibição da nocicepção na medula espinhal (DICKENSON *et al*., 2000).

Diante disso, composto que afetam o sistema adenosinérgico se mostram como uma importante ferramenta farmacológica no controle da dor.

2.9. Inflamação

A inflamação é uma resposta protetora do organismo, que envolve células, vasos sanguíneos, proteínas e vários mediadores químicos que têm como finalidade eliminar a causa inicial da lesão. Também tem como objetivo eliminar as células e tecidos lesionados iniciando o processo de reparação (FLOWER; PERRETTI, 2005).

Sabe-se que o sistema imunológico tem um papel fundamental no desenvolvimento e manutenção da dor, podendo altera o processamento sensorial e emocional do indivíduo. Desta forma, a interação entre o sistema nervoso e o imunológico fornece caminhos farmacológicos para a intervenção em sensações dolorosas (VERMA, 2015).

O processo inflamatório caracteriza-se por ser uma complexa e dinâmica cascata de eventos bioquímicos e celulares dos quais fazem parte o extravasamento de fluidos, a migração celular, liberação de mediadores químicos, lise tecidual e ativação de receptores, que resulta nos sinais clínicos característicos da inflamação: calor, rubor, edema, dor e perda da função (CRUVINEL *et al*., 2010).

De maneira sucinta, os eventos que participam do processo inflamatório se iniciam com a lesão tecidual, que induz a produção de mediadores químicos, como peptídeos vasoativos, citocinas, quimiocinas, aminas vasoativas, dentre outros, que promove vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular. Em seguida, leucócitos do sangue são atraídos para o local afetado, por um gradiente de quimiocinas (CARVALHO, LEMÔNICA, 1998).

O movimento e a passagem do sangue para o tecido que os leucócitos fazem para chegar ao sítio lesionado se dá por uma interação direta com moléculas presentes nas células endoteliais dos vasos sanguíneos. As selectinas são moléculas que realizam ligações entres os leucócitos (L-selectina) e o endotélio (P- e E-selectina) de forma reversível, para que eles possam rolar sobre o endotélio vascular. As integrinas e imunoglobulinas promovem a adesão da célula-endotélio e célula-matriz extracelular, sendo importantes na diapedese (FERRAZ; FERNANDEZ, 2014; MURPHY *et al*., 2010).

Após a migração, os leucócitos liberam uma série de mediadores inflamatórios (prostaglandinas, bradicinina, ATP e prótons) que atuam em receptores de fibras nervosas adjacentes, de forma a ativar os nociceptores periféricos que levam a informação para a medula espinhal e em seguida para centro superiores, onde a dor será codificada (OLIVEIRA-JUNIOR, *et al*., 2016).

2.10. Considerações geria sobre *Sargassum polyceratium*

Os produtos naturais de origem marinha têm sido alvos de pesquisa importantes nas últimas décadas. Tal interesse da comunidade científica se dá pelo fato de organismos marinhos apresentarem um leque de substâncias com grande potencial industrial, econômico e, principalmente, farmacológico, o que atrai a pesquisa para a descobertas de novos protótipos candidatos à fármacos no tratamento de diversas doenças (FAHEY *et al*., 2001).

O ambiente marinho é responsável por conter mais de 80% da fauna e flora do mundo (ALMEIDA *et al*., 2011). As macroalgas marinhas são consideradas, por alguns autores, os organismos mais importantes na construção de recifes, funcionando como a base da teia trófica dos recifes, abrigo para várias espécies de animais e possuindo componentes estruturais na composição do ambiente físico (MÁXIMO, 2015).

As algas constituem um grupo polifilético onde a relações filogenética ainda não são tão bem entendidas, por isso há uma grande discussão sobre as relações que envolvem as algas vermelhas, verdes e pardas (HAVEN *et al*., 2014).

As macroalgas marinhas se destacam por possuírem uma rica gama de compostos bioativos primários e metabólitos secundários como por exemplo: acetogeninas, terpenoides, carotenoides, vitaminas, ácidos graxos saturados e poli-insaturados, xantofilas, aminoácidos, polifenois, composto halogenados, alcaloides e polissacarídeos (PANIAGUA-MICHEL *et al*., 2009; CEN-PACHECO *et al*., 2010; LA BARRE *et al*., 2010; PALLELA *et al*., 2010; ALMEIDA *et al*., 2011).

A família Sargassaceae é constituída de 12 gêneros: *Acystis*, *Anthophycus*, *Carpacanthus*, *Carpophyllum*, *Cladophyllum*, *Halochloa*, *Hizikia*, *Nizamuddinia*, *Pterocaulon*, *Sargassopsis*, *Sargassum* e *Turbinaria*, e é considerada um conjunto de algas predominantemente pardas (ENGELEN *et al*., 2001).

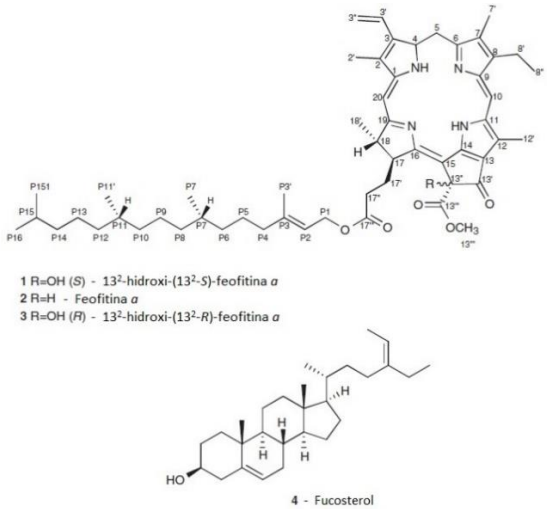
As espécies do gênero *Sargassum* se distribuem predominantemente por áreas costeiras de substrato consolidado, tanto em áreas tropicais, quanto subtropicais, frequentemente formando os chamados bancos de *Sargassum* (SZÉCHY; PAULA, 2000). São fontes ricas em alginatos, pois eles são o principal componente presente na parede celular, sendo amplamente utilizados pela indústria em alimentos, cosméticos e medicamentos, em função de suas características como espessante, estabilizantes de emulsões, agente de encapsulação, entre outras (ZUBIA *et al*., 2008).

Além dos alginatos, outras substâncias foram encontradas nas algas do gênero *Sargassum*: Fucoidanos, florotaninos, ácido araquidônico, cumarinas, cromonas do tipo meroterpenóides, terpenóides, quinonas e, ainda que raramente, flavonoides (LIU *et al*., 2009; AFOLAYAN *et al*., 2008)

Sargassum polyceratium está distribuída desde o sudoeste da Flórida até o nordeste do Brasil, onde possui uma grande importância nesses ecossistemas por atuarem como biofiltros na diminuição da poluição pela acumulação de metais tóxicos. Também é utilizada como alimento em alguns países, como Cuba (MURUGADAS *et al*., 1995; ENGELEN *et al*., 2001).

Santos *et al*. (2015) isolaram três novos derivados porfirínicos e um esteroide fucosterol de *Sargassum polyceratium* (Figura 4), também mostraram que o extrato etanólico bruto de *Sargassum polyceratium* apresenta efeito antinociceptivos em testes com camundongos.

Figura 4 - Substâncias isoladas de *Sargassum polyceratium*



FONTE: Modificado de Santos *et al*., (2015).

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Estudar o mecanismo de ação antinociceptivo e avaliar a atividade anti-inflamatória do Extrato Etanólico Bruto de *Sargassum polyceratium* (SpEE).

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar se a atividade antinociceptiva do SpEE envolve o sistema opioide, os canais para potássio, o sistema dopaminérgico, o sistema α_2-adrenérgico e o sistema adenosinérgicos;

- Avaliar a atividade anti-inflamatória do SpEE na migração de células no modelo de peritonite induzida por carragenina;

- Contribuir com o conhecimento farmacológico de produtos naturais marinhos.

Material e Métodos

4. MATERIAL

4.1. Animais

No presente estudo, foram utilizados camundongos da espécie *Mus musculus* de linhagem *Swiss*, machos, pesando entre 25g e 35g, com aproximadamente 3 meses de idade, provenientes do Biotério Prof. Dr. Thomas George/UFPB (Figura 5).

Os animais foram mantidos no biotério em gaiolas de polietileno, contendo 20 camundongos, sob condições monitoradas de temperatura de 21 ± 1º C, tiveram livre acesso a uma dieta controlada a base de ração e água. Os animais também foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo a fase clara das 6:00 às 18:00 horas.

Após o período experimental, os camundongos foram pré-anestesiados com acepromazina (4 mg/kg), e anestesiados com uma mistura de cloridrato de quetamina (150 mg/kg) por via intramuscular e cloridrato de xilazina (11 mg/kg) por via intraperitoneal, em dose suficiente para eliminar o reflexo corneal (Conceição-Silva e Presgrave, 2008). Após a ausência do reflexo corneal, administrou-se 2 mmol/kg de cloreto de potássio e os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical (Association American Veterinary Medical, 2013; Damy *et al*., 2010). Todos os procedimentos desde o início do estudo até o momento de eutanásia foram realizados para evitar o sofrimento, reduzir o desconforto e dor dos animais.

Todos os procedimentos experimentais foram analisados e previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB), sob a certidão Nº 011/2016.

Figura 5 - Camundongo Swiss.

FONTE: http://jaxmice.jax.org/strain/001803.html.

4.2. Local de pesquisa e condições experimentais

As atividades de pesquisa foram desenvolvidas no Laboratório de Psicofarmacologia Elisaldo Carlini e Biotério Prof. Dr. Thomas George (BTG) do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM), onde funciona o Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba (CCS/UFPB).

Os testes foram realizados no Setor de Experimentação Comportamental do Biotério Prof. Dr. Thomas George/IPeFarM/UFPB, no período compreendido entre as 12:00 e as 17:00 h. Os animais foram pesados e separados em grupos de no máximo 4 animais por gaiola com antecedência de no mínimo 1 hora para o início dos testes experimentais, com a finalidade de promover uma adaptação ao novo ambiente, e assim evitar possíveis alterações fisiológicas e comportamentais que podem decorrer do estresse causado pelo seu manuseio.

As bancadas metálicas e os aparelhos utilizados foram higienizados com álcool 70%, entretanto, durante os testes, foi utilizado etanol com baixa graduação (10%), na tentativa de diminuir possíveis odores que pudessem interferir no comportamento dos animais.

4.3. Substâncias utilizadas

- Água destilada (UFPB - Brasil)
- Cafeína (Merck – E.U.A.)
- Carragenina (Sigma – E.U.A.)
- Cloridrato de morfina (Merck - E.U.A.)
- Dexametasona (Sigma – E.U.A)
- Etanol (UFPB - Brasil)
- Formaldeído 37% (Vetec - Brasil)
- Glibenclamida (Sigma – E.U.A.);
- Hidrocloridrato de naloxona (Research Biochemical - EUA);
- Ioimbina (Sigma – E.U.A)
- SpEE (Laboratório de Fitoquímica/CBiotec/UFPB - Brasil)
- Sulpirida (Sigma - EUA);
- Tween 80 (Vetec - Brasil)

4.4. Preparação da amostra do Extrato Etanólico Bruto de *Sargassum polyceratium*

Foi utilizado o SpEE, preparado e cedido pela Profa. Dra. Celidarque Dias da Silva do Laboratório de Fitoquímica/UFPB, que coletou o material no litoral da cidade de João Pessoa - Paraíba/Brasil.

SpEE foi dissolvido em Tween 80 à 2% e em água destilada, utilizando-se concentrações decimais de forma a possibilitar a injeção de 0,1 mL/10g de peso do animal. A dose utilizada durante os experimentos foi escolhida com base em testes anteriores, sendo a de 200 mg/kg, por via intraperitoneal (i.p.) a dose efetiva nos modelos preliminares da analgesia (SANTOS *et al.,* 2015). Para o controle negativo, foi utilizado água destilada (i.p.). As demais substâncias foram preparadas, em suas respectivas doses, alguns minutos antes de sua utilização, sendo dissolvida em água destilada e administradas por via i.p., com exceções da formalina que foi injetada via intraplantar e da naloxona, sulpirida e cafeína, que foram injetadas via subcutânea.

5. MÉTODOS

5.1. Ensaios farmacológicos utilizados

5.1.1. Teste da formalina

O teste da formalina foi realizado como descrito por HUNSKAAR e HOLE (1985) em camundongos. Este teste é considerado um modelo de dor persistente e em sua metodologia uma solução de formalina é injetada na região intraplantar do camundongo o que causa a estimulação de nociceptores, tendo o tempo de lambida da pata como indicação de resposta nociceptiva (SOUZA *et al*., 2000).

O experimento é considerado um modelo bifásico de comportamentos de dor. A primeira fase (Fase neurogênica) ocorre após cerca de 5 minutos e, é resultante da estimulação direta dos nociceptores; a inibição desta fase é indicativa de drogas analgésicas que atuam a nível central. Em seguida, há um período de “descanso” (interfase) que dura aproximadamente 10 minutos e resulta de uma ativação de mecanismos inibitórios da dor. Na sequência, ocorre uma segunda fase (Fase inflamatória) com duração de 15 minutos, gerada tanto pela estimulação dos

nociceptores como pela liberação de mediadores inflamatórios, encontrando a medula espinhal num estado de hiperexcitabilidade, induzida pela fase neurogênica. Além de analgésicos centrais os anti-inflamatórios podem atuar na fase inflamatória (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

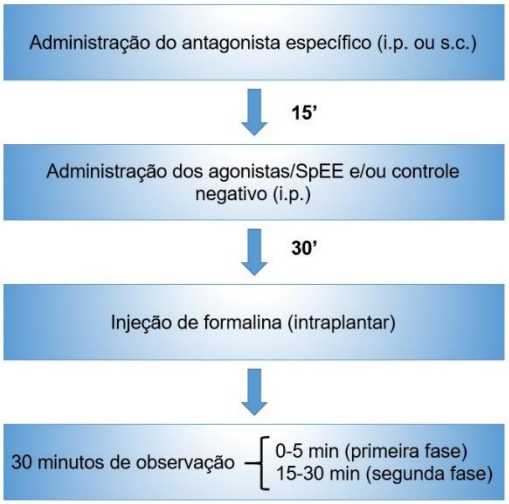
O procedimento foi realizado de acordo com Hunskaar e Hole (1987) com algumas modificações, e escolhido porque estudos anteriores mostraram que o SpEE atua na fase neurogênica em modelos de dor (SANTOS *et al*., 2015).

5.2. Investigação do mecanismo de ação da propriedade antinociceptiva do SpEE

A fim de determinar o(s) mecanismo(s) de ação da atividade antinociceptiva do SpEE foi escolhida a dose de 200mg/kg, bem como o modelo do teste de formalina para a avaliação do efeito do SpEE frente a vários sistemas de neurotransmissores envolvidos na modulação do processo doloroso. A reversão da propriedade antinociceptiva do composto por um antagonista específico de neurotransmissores de várias vias que modulam o processo doloroso foi o critério adotado para a determinação do mecanismo de ação do mesmo.

As vias de neuromodulação estudadas foram: Opioide, adenosinérgica, dopaminérgica, adrenérgica e os canais K^+_{ATP}. O delineamento metodológico do estudo do mecanismo de ação da propriedade antinociceptiva do SpEE em camundongos está esquematizado na Figura 6.

Figura 6 - Delineamento metodológico utilizado no estudo para determinação do mecanismo de ação do SpEE.



5.2.1. Estudo do envolvimento do sistema opioide

Para a investigação de um possível envolvimento de receptores opioides na resposta antinociceptiva do SpEE, foi utilizado a naloxona, um antagonista não seletivo de receptores opioides (BODNAR, 2008).

Grupos distintos de animais foram pré-tratados com antagonista opioide não seletivo, naloxona (5 mg/kg, s.c.) 15 min antes da administração do SpEE (200 mg/kg i.p.) ou de morfina (6 mg/kg i.p.), utilizada como controle positivo. Decorridos 30 minutos das administrações os camundongos foram submetidos ao teste da formalina.

5.2.2. Participação dos canais de K^+_{ATP}

É evidente a participação dos canais de K^+_{ATP} no processo de antinocicepção, desta forma, também foi investigado o envolvimento destes canais.

Para investigar se o SpEE exerce seu efeito antinociceptivo ativando este canal, foi utilizada a glibenclamida, uma sulfoniluréia que bloqueia especificamente estes canais (OCANA, *et al*., 2004).

Grupos de 8 camundongos foram pré-tratados com a glibenclamida (10 mg/kg, i.p.) e, quinze minutos depois, receberam o SpEE (200 mg/kg i.p.). O efeito nociceptivo foi avaliado no teste da formalina.

5.2.3. Participação do sistema dopaminérgico

A possível participação do sistema dopaminérgico no mecanismo de ação do SpEE, foi utilizado a sulpirida (antagonista de receptor dopaminérgico do tipo D_2). Os animais foram divididos em grupos de 8, onde receberam sulpirida (20mg/kg s.c.) 15 minutos antes da administração do SpEE. Após 30 minutos os camundongos foram submetidos ao teste da formalina.

5.2.4. Participação do sistema α_2-adrenérgico

Para avaliar se o SpEE exerce seu efeito antinociceptivo pelo envolvimento do sistema α_2-adrenérgico, foi utilizado a ioimbina, um antagonista seletivo de receptores do sistema α_2-adrenérgico. Dois grupos contendo 8 camundongos foram tratados com veículo (Tween 80 à 0,2%, i.p.) e SpEE (200 mg/kg, i.p.), respectivamente. Outros dois

grupos foram pré-tratados com ioimbina (0,15 mg/kg, i.p.), 15 min antes das respectivas administrações do veículo e do SpEE. Transcorridos 30 minutos, os animais foram desafiados no teste da formalina.

5.2.5. Participação do sistema adenosinérgico

Para investigar a possível participação do sistema adenosinérgico no mecanismo de ação do AP foi utilizado a cafeína (antagonista não seletivo dos receptores de adenosina). Os animais foram divididos em grupos (n=8), onde dois deles receberam cafeína (10mg/kg s.c.) 15 minutos antes da administração do SpEE. Após 30 minutos os camundongos foram submetidos ao teste da formalina.

5.3. Estudo da atividade anti-inflamatória do SpEE

5.3.1. Peritonite induzida por carragenina

A fim de avaliar a capacidade imunomoduladora do SpEE em inibir a migração celular após a administração de um estímulo inflamatório, utilizou-se o modelo da peritonite induzida por carragenina.

Grupos de 8 camundongos foram separados e tratados com veículo, SpEE (100, 200 mg/kg, i.p.) ou dexametasona (2 mg/kg, s.c.). Após 1 hora dos tratamentos, administrou-se uma solução de carragenina (1%) por via intraperitoneal para indução da inflamação, com exceção de um grupo que foi tratado com salina.

Após 4 horas do desafio com carragenina, os animais foram eutanasiados, e 300µL de PBS gelado foram injetados na cavidade peritoneal. Cuidadosamente, o peritônio foi massageado, e o lavado peritoneal foi puncionado e colocado em tubos tipo eppendorf, para que fossem centrifugados a 1500 rpm, por 5 minutos, a 4ºC. O sobrenadante foi removido e armazenado a -20ºC, para uma possível dosagem de citocinas.

As células presentes nos pellets foram suspensas de novo, e cada amostra foi diluída com a solução de Turk na proporção 1:10. Com a ajuda de uma pipeta automática, a amostra diluída preencheu o espaço contido entre a superfície espelhada e a lamínula presentes na Câmara de Neubauer. A contagem ocorreu em um microscópio óptico na objetiva de 40X.

5.4. Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando o método de Análise de Variância (ANOVA), aplicado na análise de dados paramétricos e não-paramétricos. O teste estatístico de Kruskal–Wallis e Post Hoc de Dunn foi utilizado na análise de dados não-paramétricos. Para os dados paramétricos, o teste de Newman-Keuls. O programa GraphPad Prism versão 6.0 para Windows foi utilizado na confecção de todos os gráficos.

Os dados obtidos serão expressos como média ± e.p.m. (erro padrão da média), sendo os valores considerados significativos, quando apresentassem um nível de significância (*p*) menor que 0,05.

A porcentagem de inibição foi determinada pela comparação entre as médias do grupo controle e experimental, calculadas conforme a e equação descrita abaixo (OYEMITAN *et al*., 2008; IJEOMA *et al*., 2011; OLIVEIRA *et al*., 2012; TAHER, 2012).

$$Porcentagem\ de\ inibição\ = 100 - \frac{média\ do\ grupo\ experimental\ \times 100}{média\ do\ grupo\ controle}$$

Resultados

6. RESULTADOS

6.1. Investigação do mecanismo de ação do SpEE

6.1.1. Estudo do envolvimento do sistema opioide

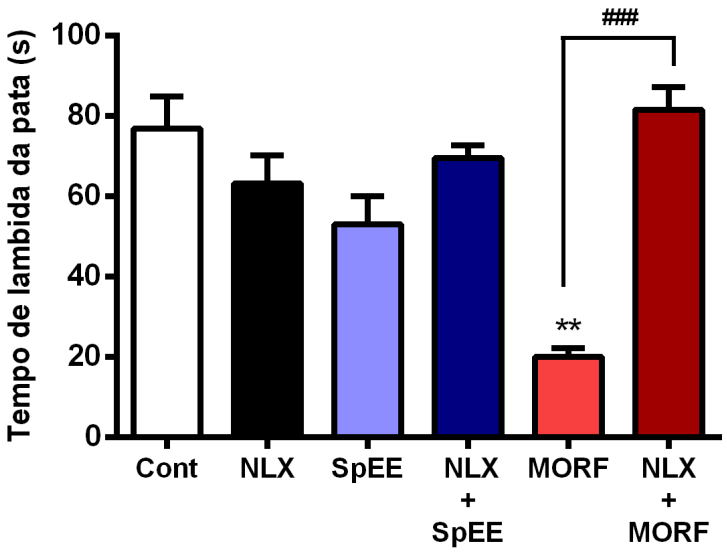
O gráfico 1 e a tabela 1 mostram o efeito do SpEE sobre a via opioide, no teste da nocicepção induzida pela formalina durante a fase neurogênica (0 – 5 min).

Os grupos tratados com naloxona (63,2 ± 7,1 s), SpEE (53,0 ± 7,1 s), naloxona + SpEE (69,6 ± 3,1 s) e naloxona + morfina (81,7 ± 5,6 s) não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle negativo (76,9 ± 8,0 s).

A porcentagem de inibição dos grupos tratados com naloxona foi de 17,8%, SpEE 31,1% e naloxona + SpEE 9,5% e não apresentaram diferença significativa em relação ao controle negativo; assim como o grupo naloxona + morfina não apresentou valor de inibição em relação ao grupo controle negativo.

Como esperado, somente o grupo morfina (controle positivo) (20,0 ± 2,2 s) diferiu significativamente do grupo controle negativo e do grupo naloxona + morfina.

Gráfico 1 - Efeito do SpEE (200 mg/kg i.p.) na fase neurogênica do teste da formalina, em camundongos, na presença de naloxona (NLX: 5 mg/kg s.c.) e morfina (MORF: 10 mg/kg i.p.).



Valores expressos em média ± e.p.m (n= 8) (Kruskal-Wallis seguido pelo Post Hoc de Dunn). **p<0,01 *versus* grupo controle e $^{###}$p<0,001 *versus* grupo morfina.

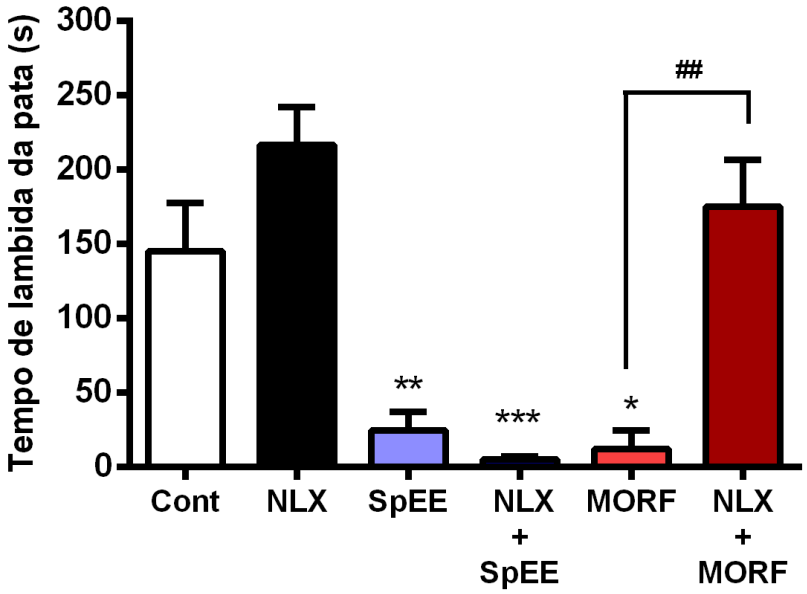
Tabela 1 – Efeito da naloxona sobre a atividade antinociceptiva do SpEE e morfina na nocicepção induzida pelo teste de formalina em camundongos.

Grupo	Dose (mg/kg)	Tempo de lambida (fase neurogênica)	Tempo de lambida (fase inflamatória)
Controle	—	76,9 ± 8,0 s	145,3 ± 32,2 s
Naloxona	5, s.c.	63,2 ± 7,1 s	216,7 ± 25,3 s
SpEE	200, i.p.	53,0 ± 7,1 s	24,7 ± 12,5 s **
Naloxona + SpEE	5, s.c. + 200, i.p.	69,6 ± 3,1 s	5,2 ± 1,8 s ***
Morfina	10, i.p.	20,0 ± 2,2 s **	12,3 ± 12,3 s *
Naloxona + Morfina	5, s.c. + 10, i.p.	81,7 ± 5,6 s ###	175,1 ± 31,4 s ##

Valores expressos em média ± e.p.m (n= 8) (Kruskal-Wallis seguido pelo Post Hoc de Dunn). *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 *versus* grupo controle e ##p<0,01 e ###p<0,001 *versus* grupo morfina.

Na segunda fase do teste da formalina (gráfico 2 e tabela 1) os animais tratados com naloxona (216,7 ± 25,3 s) não apresentaram diferença significativa em relação ao controle negativo (145,3 ± 32,2 s). Por outro lado, tanto o SpEE (24,7 ± 12,5 s), como o grupo naloxona + SpEE (5,2 ± 1,8 s) e morfina (12,3 ± 12,3 s) reduziram significativamente o tempo em segundos da lambida da pata quando comparados ao controle negativo, apresentando uma porcentagem de inibição de 83%, 96,4% e 91,5%, respectivamente. Isso mostra que a administração prévia da naloxona não reverteu o efeito antinociceptivo do SpEE. O grupo morfina teve seu efeito revertido significativamente pela pré-administração da naloxona (grupo naloxona ± morfina: 175,1 ± 31,4 s), quando comparados ao grupo morfina.

Gráfico 2 - Efeito do SpEE (200 mg/kg i.p.) na fase inflamatória do teste da formalina, em camundongos, na presença de naloxona (NLX: 5 mg/kg s.c.) e morfina (MORF: 10 mg/kg i.p.).



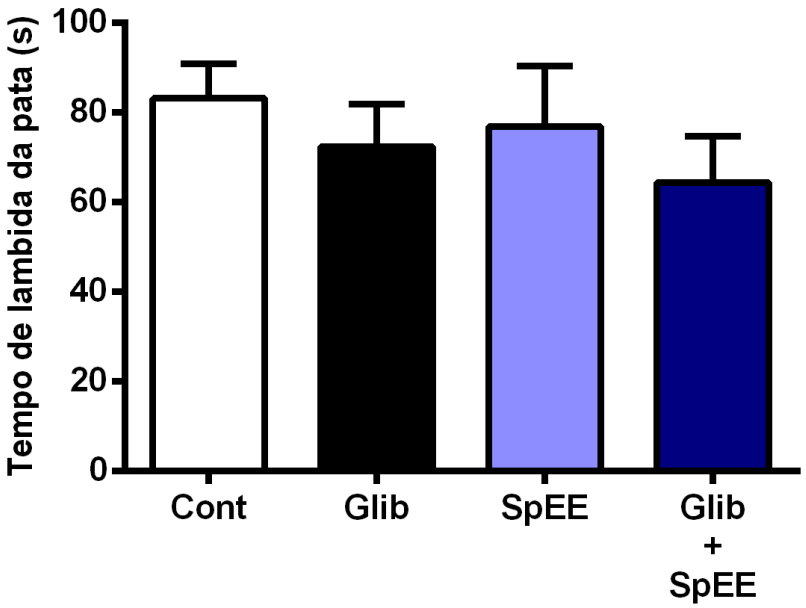
Valores expressos em média ± e.p.m (n= 8) (Kruskal-Wallis seguido pelo Post Hoc de Dunn). *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 *versus* grupo controle e $^{\#\#}$p<0,01 *versus* grupo morfina.

6.1.2. Participação dos canais de K^+_{ATP}

Observamos no gráfico 3 e tabela 2 o efeito do SpEE sobre os canais de K^+_{ATP} com o uso da glibenclamida, bloqueador dos canais de K^+_{ATP}, durante a primeira fase do teste da formalina.

Os resultados mostram que os grupos de animais tratados com glibenclamida (72,4 ± 9,5 s), SpEE (76,8 ± 13,5 s) e o grupo pré-tratado com glibenclamida e a seguir tratado com SpEE (64,4 ± 10,3 s), não apresentaram diferença estatística significativa em relação ao grupo controle negativo (83,1 ± 7,6 s).

Gráfico 3 - Efeito do pré-tratamento com glibenclamida (Glib: 10 mg/kg, s.c.) na antinocicepção causada pelo SpEE (200 mg/kg, i.p.), na fase neurogênica do teste da formalina.



Valores expressos em média ± e.p.m (n= 8) (Kruskal-Wallis seguido pelo Post Hoc de Dunn).

Tabela 2 – Efeito da glibenclamida sobre a atividade antinociceptiva do SpEE na nocicepção induzida pelo teste de formalina em camundongos.

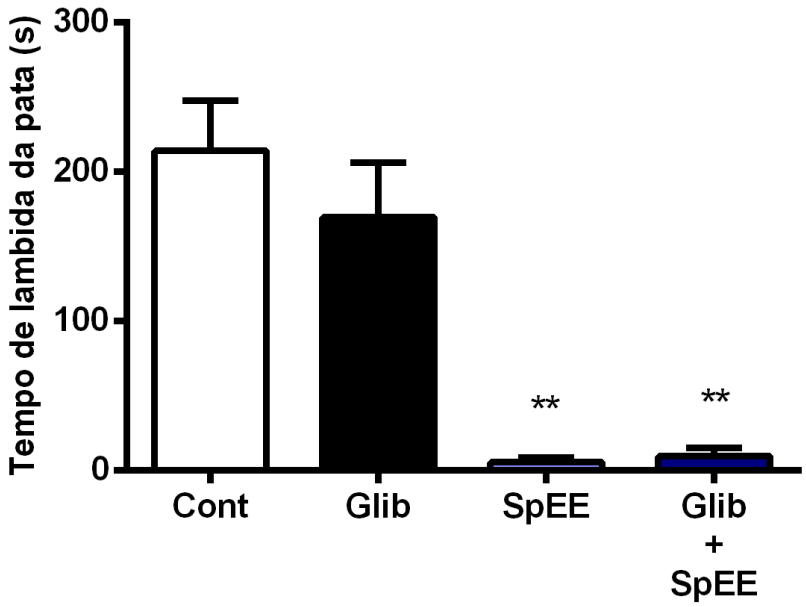
Grupo	Dose (mg/kg)	Tempo de lambida (fase neurogênica)	Tempo de lambida (fase inflamatória)
Controle	—	83,1 ± 7,6 s	213,8 ± 34,0 s
Glibenclamida	10, s.c.	72,4 ± 9,5 s	169,3 ± 36,5 s
SpEE	200, i.p.	76,8 ± 13,5 s	5,4 ± 3,1 s **
Glibenclamida + SpEE	10, s.c. + 200, i.p.	64,4 ± 10,3 s	9,3 ± 5,5 s **

Valores expressos em média ± e.p.m (n= 8) (Kruskal-Wallis seguido pelo Post Hoc de Dunn). **p<0,01 *versus* grupo controle.

Os dados apresentados no gráfico 4 e tabela 2 representam a segunda fase do teste, indicando que os grupos SPEE (5,4 ± 3,1 s) e glibenclamida + SpEE (9,3 ± 5,5 s) causaram uma redução significativa no tempo de lambida de pata, apresentando

uma porcentagem de inibição de 97,5% e 95,6% quando comparado ao grupo controle negativo (213,8 ± 34,0 s). Já o grupo glibenclamida (169,3 ± 36,5 s) não apresentou redução no tempo de lambida da pata, com inibição de 20,8% em relação ao grupo controle negativo.

Gráfico 4 - Efeito do pré-tratamento com glibenclamida (Glib: 10 mg/kg, s.c.) na antinocicepção causada pelo SpEE (200 mg/kg, i.p.), na fase inflamatória do teste da formalina.

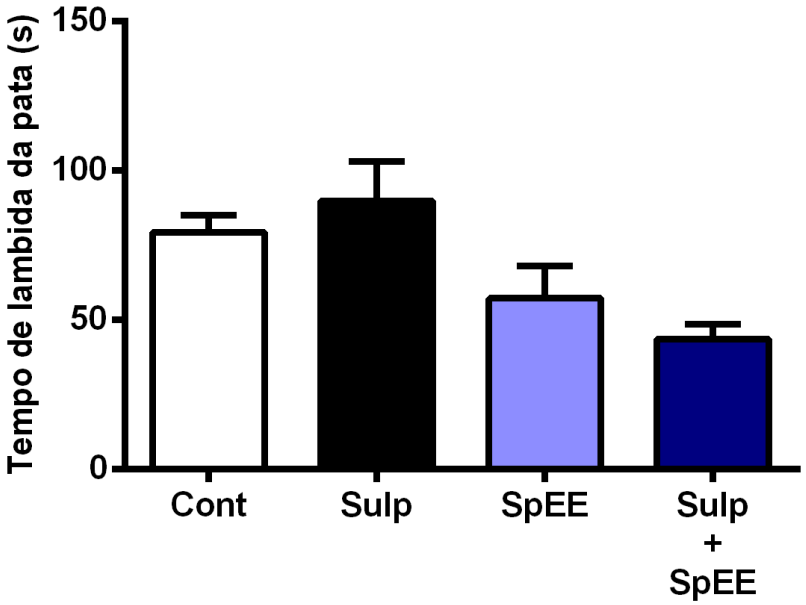


Valores expressos em média ± e.p.m (n= 8) (Kruskal-Wallis seguido pelo Post Hoc de Dunn). **p<0,01 *versus* grupo controle.

6.1.3. Participação do sistema dopaminérgico

O gráfico 5 e a tabela 3 mostram o efeito do SpEE em relação ao sistema dopaminérgico na primeira fase do teste de formalina. Os grupos tratados com sulpirida (89,8 ± 13,2 s) e SpEE (57,2 ± 10,9 s) não apresentaram diferença significativa em relação ao controle (79,3 ± 5,6 s) quanto ao tempo de lambida da pata. O pré-tratamento com sulpirida também não foi capaz de reverter o efeito do SpEE (43,6 ± 4,8 s), quando comparamos ao grupo que foi tratado apenas com SpEE.

Gráfico 5 - Efeito sulpirida (Sulp: 20 mg/kg) na antinocicepção causada pelo SpEE (200 mg/kg, i.p.), na fase neurogênica do teste da formalina.



Valores expressos em média ± e.p.m (n= 8) (Kruskal-Wallis seguido pelo Post Hoc de Dunn).

Tabela 3 – Efeito da sulpirida sobre a atividade antinociceptiva do SpEE na nocicepção induzida pelo teste de formalina em camundongos.

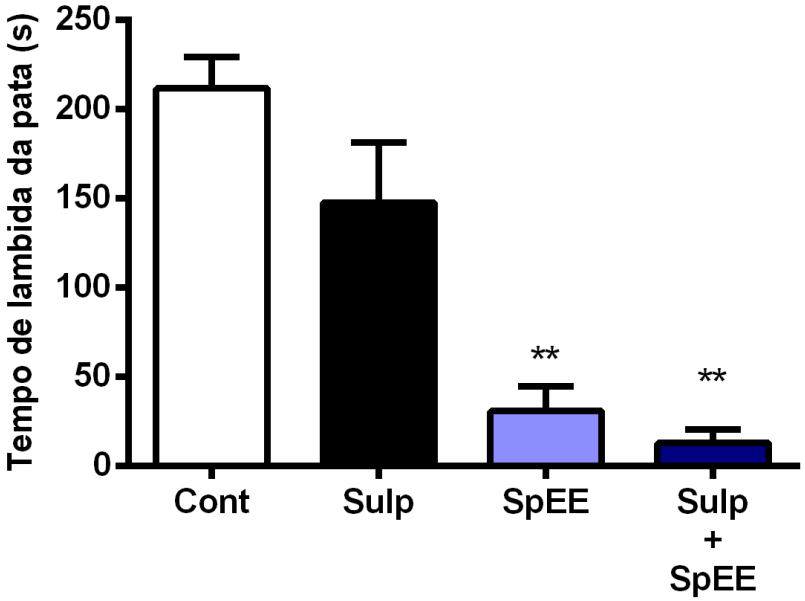
Grupo	Dose (mg/kg)	Tempo de lambida (fase neurogênica)	Tempo de lambida (fase inflamatória)
Controle	—	79,3 ± 5,6 s	211,6 ± 17,7 s
Sulpirida	20, s.c.	89,8 ± 13,2 s	147,5 ± 33,6 s
SpEE	200, i.p.	57,2 ± 10,9 s	30,8 ± 16,7 s **
Sulpirida + SpEE	20, s.c. + 200, i.p.	43,6 ± 4,8 s	12,8 ± 7,7 s **

Valores expressos em média ± e.p.m (n= 8) (Kruskal-Wallis seguido pelo Post Hoc de Dunn).
**p<0,01 *versus* grupo controle.

Na segunda fase do teste da formalina (gráfico 6 e tabela 3) os animais tratados com sulpirida (147,5 ± 33,6 s) não apresentaram diferença significativa em relação ao controle negativo (211,6 ± 17,7 s). Por outro lado, tanto o SpEE (30,8 ± 16,7 s) quanto o grupo sulpirida + SpEE (12,8 ± 7,7 s) reduziram significativamente o tempo em

segundos da lambida da pata quando comparados ao controle, apresentando uma porcentagem de inibição de 85,4% e 93,4%, respectivamente.

Gráfico 6 - Efeito sulpirida (Sulp: 20 mg/kg) na antinocicepção causada pelo SpEE (200 mg/kg, i.p.), na fase inflamatória do teste da formalina.

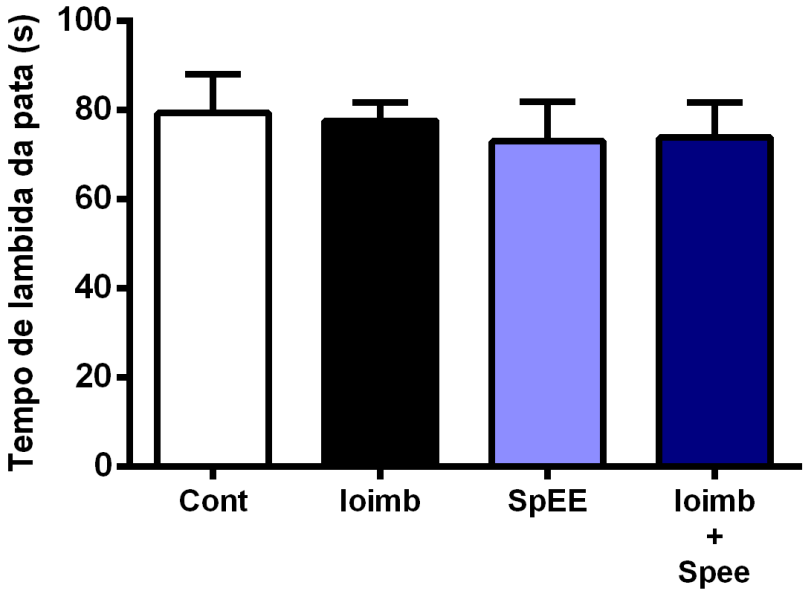


Valores expressos em média ± e.p.m (n= 8) (Kruskal-Wallis seguido pelo Post Hoc de Dunn). **p<0,01 *versus* grupo controle.

6.1.4. Participação do sistema α_2-adrenérgico

Como pode ser observado no gráfico 7 e tabela 4, nenhum dos grupos tratados com SpEE, ioimbina (antagonista do receptor α_2-adrenérgico) e ioimbina + SpEE diferiram estatisticamente. Estes grupos não promoveram redução da resposta nociceptiva dos animais na fase neurogênica do teste da formalina e apresentaram valores de 73,0 ± 8,9; 77,7± 4,1 e 73,8 ± 7,9 s, respectivamente, em relação ao grupo controle negativo (79,3 ± 8,8 s).

Gráfico 7 - Efeito do SpEE (200 mg/kg i.p.) na fase neurogênica do teste da formalina, em camundongos, na presença de ioimbina (Ioimb: 0,15 mg/kg i.p.).



Valores expressos em média ± e.p.m (n= 8) (Kruskal-Wallis seguido pelo Post Hoc de Dunn).

Tabela 4 – Efeito da ioimbina sobre a atividade antinociceptiva do SpEE na nocicepção induzida pelo teste de formalina em camundongos.

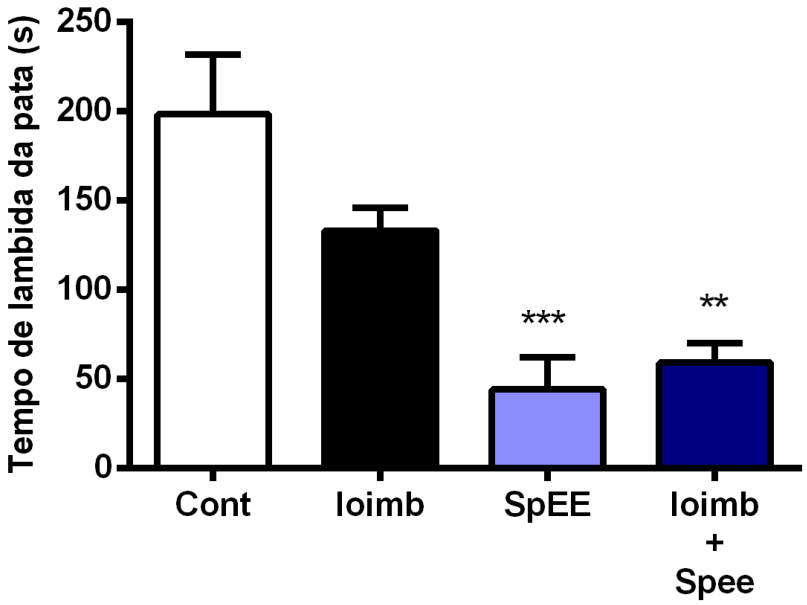
Grupo	Dose (mg/kg)	Tempo de lambida (fase neurogênica)	Tempo de lambida (fase inflamatória)
Controle	—	79,3 ± 8,8 s	198,4 ± 33,4 s
Ioimbina	0,15, i.p.	77,7± 4,1 s	133,2 ± 12,8 s
SpEE	200, i.p.	73,0 ± 8,9 s	44,2 ± 18,2 s ***
Ioimbina + SpEE	0,15, i.p. + 200, i.p.	73,8 ± 7,9 s	59,2 ± 11,1 s **

Valores expressos em média ± e.p.m (n= 8) (Kruskal-Wallis seguido pelo Post Hoc de Dunn). **p<0,01 e ***p<0,001 *versus* grupo controle.

Na fase inflamatória do teste, o grupo ioimbina (133,2 ± 12,8 s) não apresentou alterações significativas quando comparado ao grupo controle negativo (198,4 ± 33,4 s). Já os grupos SpEE e Ioimbina + SpEE apresentaram alterações significativas nos tempos de lambida da pata com valores de 44,2 ± 18,2 s e 59,2 ± 11,1 s, e porcentagem de inibição de 77,7% e 70,2%, respectivamente, em relação aos animais

do grupo controle negativo, tratados com o veículo, como pode ser observado no gráfico 8 e tabela 4.

Gráfico 8 - Efeito do SpEE (200 mg/kg i.p.) na fase inflamatória do teste da formalina, em camundongos, na presença de ioimbina (Ioimb: 0,15 mg/kg i.p.).

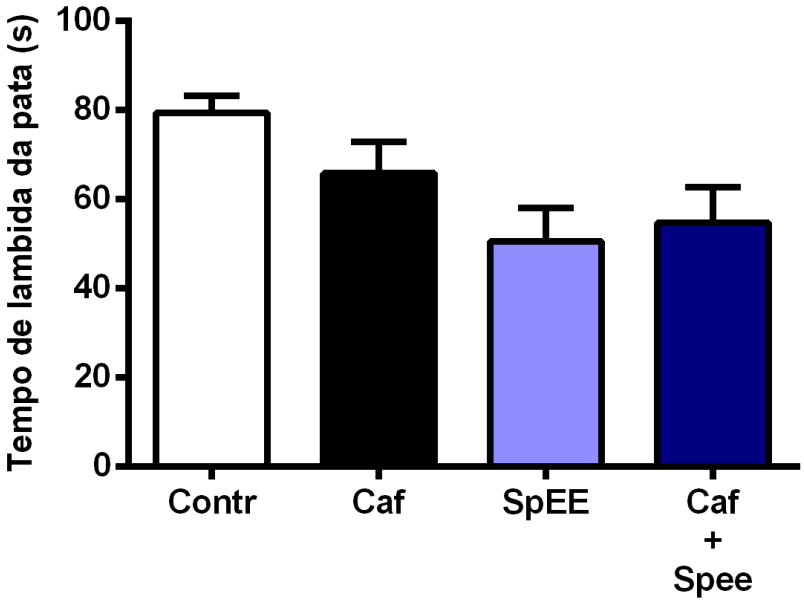


Valores expressos em média ± e.p.m (n= 8) (Kruskal-Wallis seguido pelo Post Hoc de Dunn). **p<0,01 e ***p<0,001 *versus* grupo controle.

6.1.5. Participação do sistema adenosinérgico

O gráfico 9 e a tabela 5 mostram o efeito do SpEE em relação ao sistema adenosinérgico na fase neurogênica do teste de formalina. Como pode-se perceber através do gráfico 9 e tabela 5, nenhum dos grupos tratados com cafeína (65,8 ± 7,0 s), SpEE (50,5 ± 7,5 s) e cafeína + SpEE (54,7 ± 8,0 s) apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle negativo (79,3 ± 3,8) quanto ao tempo de lambida da pata.

Gráfico 9 - Efeito cafeína (Caf: 10 mg/kg) na antinocicepção causada pelo SpEE (200 mg/kg, i.p.), na fase neurogênica do teste da formalina.



Valores expressos em média ± e.p.m (n= 8) (Kruskal-Wallis seguido pelo Post Hoc de Dunn).

Tabela 5 – Efeito da cafeína sobre a atividade antinociceptiva do SpEE na nocicepção induzida pelo teste de formalina em camundongos.

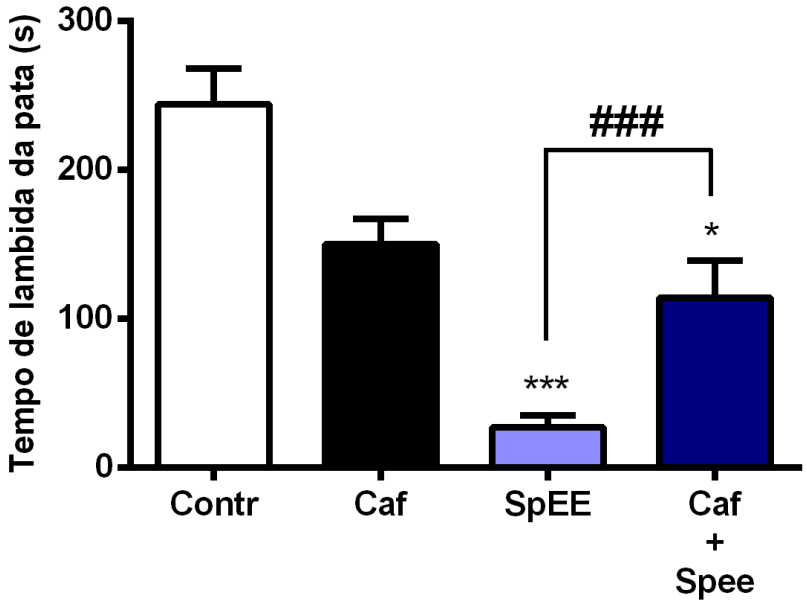
Grupo	Dose (mg/kg)	Tempo de lambida (fase neurogênica)	Tempo de lambida (fase inflamatória)
Controle	—	79,3 ± 3,8 s	244,2 ± 24,0 s
Cafeína	10, s.c.	65,8 ± 7,0 s	150,0 ± 16,8 s
SpEE	200, i.p.	50,5 ± 7,5 s	27,0 ± 7,9 ***
Cafeína + SpEE	10, s.c. + 200, i.p.	54,7 ± 8,0 s	114,2 ± 24,8 s ###

Valores expressos em média ± e.p.m (n= 8) (Kruskal-Wallis seguido pelo Post Hoc de Dunn). ***p<0,001 *versus* grupo controle e ###p<0,001 *versus* grupo SpEE.

Porém, na segunda fase do teste, o grupo SpEE apresentou alterações significativas no tempo de lambida da pata com valores de 27,0 ± 7,9 s e porcentagem de inibição de 88,9%, em relação aos animais do grupo controle negativo (244,2 ± 24,0 s) tratados com o veículo, como pode ser observado no gráfico 10 e tabela 5.

Contudo, o pré-tratamento dos animais com cafeína reverteu com significância estatística o efeito antinociceptivo do SpEE (cafeína + SpEE 114,2 ± 24,8 s) quando comparados ao grupo SpEE.

Gráfico 10 - Efeito cafeína (Caf: 10 mg/kg) na antinocicepção causada pelo SpEE (200 mg/kg, i.p.), na fase inflamatória do teste da formalina.



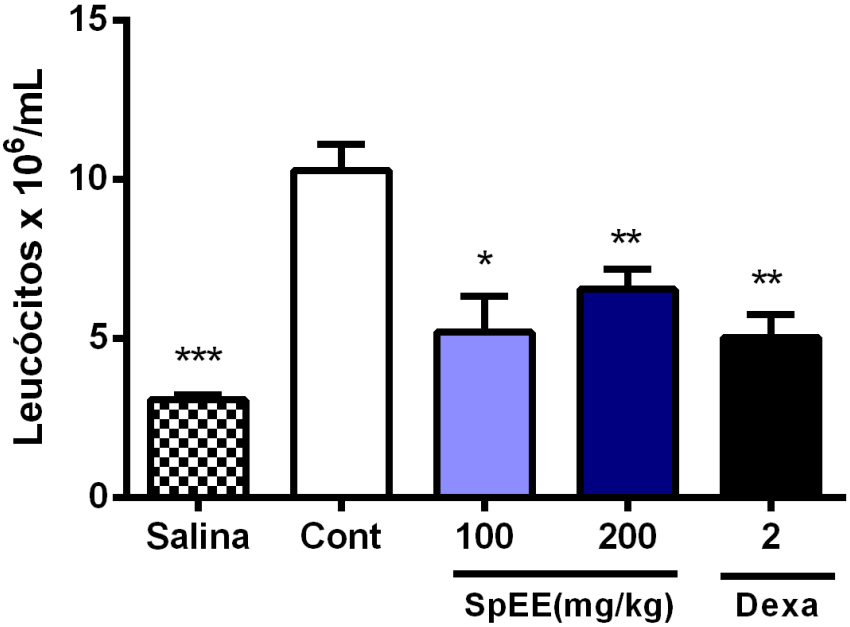
Valores expressos em média ± e.p.m (n= 8) (Kruskal-Wallis seguido pelo Post Hoc de Dunn). *p<0,05 e ***p<0,001 *versus* grupo controle e $^{###}$p<0,001 *versus* grupo SpEE.

6.2. Estudo da atividade anti-inflamatória do SpEE

6.2.1. Peritonite induzida por carragenina

A aplicação intraperitoneal de carragenina induz uma peritonite, causando migração de células. Como mostrado no gráfico 11 e tabela 6, a administração de carragenina aumentou o número de leucócitos totais em 10,3 ± 0,8, mas o pré-tratamento com o SpEE diminuiu a população de leucócitos nas doses de 100 (5,2 ± 1,1) e 200 (6,5 ± 0,6) mg/kg em 49,5% e 36,9%, respectivamente. A dexametasona (2 mg/kg, s.c.), droga padrão, inibiu em 51,4% (5,0 ± 0,7) o infiltrado celular.

Gráfico 11 - Efeito da administração do SpEE (100 e 200 mg/kg, i.p.) e da dexametasona (Dexa: 2 mg/kg, s.c.) sobre a migração de leucócitos totais.



Valores expressos em média ± e.p.m (n= 8) (Kruskal-Wallis seguido pelo Post Hoc de Dunn). *p<0,05, **p<0,01 e ***p>0,001 *versus* grupo controle.

Tabela 6 – Efeito da atividade anti-inflamatória do SpEE e dexametasona sobre a migração de leucócitos totais.

Grupo	Dose (mg/kg)	Migração de leucócitos totais (leucócitos X 10^6/mL)
Salina	—	3,1 ± 0,2 ***
Controle	—	10,3 ± 0,8
SpEE	100, i.p.	5,2 ± 1,1 *
SpEE	200, i.p.	6,5 ± 0,6 **
Dexametasona	2, s.c.	5,0 ± 0,7 **

Valores expressos em média ± e.p.m (n= 8) (Kruskal-Wallis seguido pelo Post Hoc de Dunn). *p<0,05, **p<0,01 e ***p>0,001 *versus* grupo controle.

Discussão

7. DISCUSSÃO

A pesquisa com produtos naturais continua a oferecer uma variedade de novas substâncias que podem vir a ser utilizadas no desenvolvimento de novos fármacos. O uso de plantas e de suas substâncias isoladas tem crescido de forma extensiva em todo o mundo, devido ao alto interesse da indústria farmacêutica na comercialização de fitomedicamentos.

Os produtos naturais de origem marinha passaram a ser mais valorizados nas últimas duas décadas, por terem uma vasta gama de substâncias com estruturas químicas complexas e diferentes daquelas encontradas em plantas terrestres e por representarem uma nova fonte de prospecção para novas drogas. A quantidade de novas substâncias derivadas de produtos naturais marinhos tem crescido constantemente, em 1984 eram conhecidas 332 substâncias que pulou para 1378 até 2014 (BLUNT *et al*., 2015).

As algas marinhas têm despertado um interesse especial na comunidade científica por apresentarem diversas substâncias com várias atividades farmacológicas, como por exemplo: antitumoral, antiangiogênica, anti-inflamatória, hemaglutinante, antibacteriana e antiviral (LIRA, 2012).

Sargassum polyceratium é uma macroalga que está presente em regiões tropicais e subtropicais. Estudos anteriores provaram que o extrato etanólico bruto desta alga, nas doses de 100 e 200 mg/kg, foi capaz de produzir antinocicepção em modelos de nocicepção química. Sendo eles, o teste das contorções abdominais induzidos pelo ácido acético, nocicepção induzida por glutamato e o teste da formalina (SANTOS *et al*., 2015).

A partir desses resultados, onde o SpEE se mostrou efeito antinociceptivo mais claro na fase inflamatória do teste da formalina, foi decidido aprofundar os estudos a seu respeito e partiu-se para a investigação do seu possível mecanismo de ação utilizando o teste da formalina, como protocolo de escolha, por ser este um modelo de dor persistente onde se observa claramente uma fase neurogênica e outra inflamatória. A fase neurogênica tem início imediato e caracteriza-se pela excitação direta de fibras C sensoriais, através da ativação de TRPA1, e pela liberação de

substância P e bradicinina (McNAMARA *et al*., 2007; PARADA *et al*., 2001). A fase inflamatória ocorre por alterações teciduais e funcionais no corno dorsal da medula espinhal e pode ser acompanhada por liberação de cininas, óxido nítrico, fator de necrose tumoral α e interleucinas. (SALVADORI, 2013) Drogas de ação central atuam na primeira fase e drogas de ação periférica atuam na segunda fase.

Por último foi feito o estudo da atividade anti-inflamatória do SpEE na migração de células utilizando o modelo de peritonite induzida por carragenina.

A investigação dos mecanismos de ação de psicofármacos, geralmente, é baseada na interação farmacológica que ocorre entre ligantes e receptores durante a transmissão neuronal (SCHEFFER, 2006). Este estudo é baseado na utilização de antagonistas farmacológicos, que uma vez administrados, bloqueiam os efeitos resultantes da ativação do receptor específico. Desta forma, caso a substância em estudo possa se ligar ao receptor e promover a sua ação, o antagonista farmacológico reverterá o efeito esperado. Se a via de sinalização bloqueada não for o mecanismo usado pela substância-teste, não será observado uma alteração no efeito da substância-teste.

O primeiro sistema investigado foi o opioide. O termo opioide se aplica a qualquer substância, natural ou sintética, que produz os efeitos semelhantes aos da morfina e que pode ser bloqueado por antagonistas do tipo naloxona (RANG *et al*., 2007).

Os receptores opioides estão amplamente distribuídos em regiões como o córtex cerebral, núcleos acumbens, tálamo, amígdalas, corno dorsal da medula espinhal (lâminas I e II), hipotálamo, núcleo da rafe, substância periaquedutal cinzenta, núcleo trigêmio medular, lócus ceruleus, hipocampo, núcleo caudado e globo pálido, no plexo nervoso e glândulas exócrinas do estômago e intestino, na região ventral superior do bulbo e da ponte, sendo a participação do sistema opioide na regulação neuroendócrina, do comportamento motor e dos sistemas afetivo e neurovegetativo (MERRER *et al*., 2009; KRAYCHETE, 2010).

Todos os receptores opioides pertencem a família dos receptores acoplados a proteína G_i/G_o, que quando ativados, promovem a abertura de canais específicos de

potássio e a inibição de canais de cálcio dependentes de voltagem, o que promove a redução da excitabilidade neuronal (SAWYNOK, 2003).

A morfina é um analgésico opioide considerado droga de primeira escolha para o tratamento de diversos tipos de dores. Porém, seus efeitos colaterais, como dependência física e psíquica, tolerância e depressão respiratória, têm contribuído para a pesquisa de novos fármacos que sejam semelhantes a morfina, no que diz respeito à atividade terapêutica, mas com tais efeitos colaterais diminuídos (HESS *et al*., 2010).

A fim de avaliarmos a participação da via opioide no mecanismo de ação do SpEE, foi utilizado a naloxona, um antagonista não seletivo dos receptores opioides, sendo a morfina escolhida como da droga padrão. Os resultados obtidos, sugerem que a antinocicepção produzida pelo SpEE não foi revertida pela naloxona em nenhuma das fases do teste de formalina, sugerindo a não participação do sistema opioide no efeito antinociceptivo em animais pré-tratados com a naloxona. Esta conclusão se deu pelo fato de que o pré-tratamento com a naloxona não alterou o tempo de lambida do SpEE na segunda fase do teste de formalina, onde se observa claramente o efeito antinociceptivo do SpEE, e inibiu completamente o efeito antinociceptivo causado pela morfina.

Os canais K^+_{ATP} dependentes são canais determinantes na atividade neuronal do sistema nervoso. Dependendo do perfil biofísico e da localização celular do neurônio, a ativação desses canais inibe a excitabilidade periférica. A abertura desses canais promove o efluxo de K^+ e consequentemente, a hiperpolarização da célula, levando a uma diminuição dos níveis de Ca^{2+} intracelular, reduzindo a liberação de neurotransmissores, desse modo, diminuindo a transmissão da dor (TSANTOULAS; McMAHON, 2014).

A administração central de agonistas para os canais de K^+, a exemplo do minoxidil, diazoxide e cromacalina potencializa o efeito analgésico de agonistas opioides e α_2-adrenérgicos (GALEOTTI *et al*., 1999, WELCH; DUNLOW, 1993).

Estudo anteriores mostram que a glibenclamida não atenua a dor em nenhuma das fases do teste de formalina. (HAJHASHEMI; AMIN, 2011) Os resultados mostram que pré-tratamento com a glibenclamida não foi capaz de inibir o efeito

antinociceptivos do SpEE na segunda fase do teste de formalina, indicando a não participação dessa via.

O sistema dopaminérgico é constituído por receptores D1, D2, D3, D4 e D5, acoplados à proteína G. Sabe-se relativamente pouco sobre o papel desse sistema na via inibitória descendente, porém estudo recentes mostram que, receptores do tipo D_1 medeiam resposta pronociceptivas e exacerbam a hiperexcitabilidade induzida pelo receptor N-metil-D-aspartato, enquanto que receptores do tipo D_2 estão envolvidos no processo de antinocicepção sendo mais presentes na lâmina I do corno dorsal da medula espinhal (OHTANI; MASAKI, 2016; VAN DIJKEN, *et al*.,1996).

Tal sistema possui diversos antagonista, dentre eles sabe-se que o haloperidol é um antagonista não-seletivo, considerado um neuroléptico típico, e que a sulpirida é um antagonista seletivos de receptores do tipo D_2.

Diante disso o próximo sistema a ser avaliado foi o sistema dopaminérgico, utilizando a sulpirida como antagonista dos receptores D_2. Os resultados mostram que o efeito antinociceptivo do SpEE não depende da ativação de receptores dopaminérgicos do tipo D_2, pois a sulpirida não foi capaz de reverter a antinocicepção causada pelo SpEE.

Também foi investigado a via dos adrenorreceptores α_2 na antinocicepção induzida pelo SpEE.

O sistema noradrenérgico é crucial para várias atividades no corpo, incluindo a modulação da dor. A dor é uma das sensações reguladas pelo sistema noradrenérgico e sua estrutura central, o Locus Ceruleus. Vias ascendente e descendentes que passam através deste núcleo podem ser responsáveis pelas entradas noradrenérgicas nos centros mais altos do processamento da dor, como o sistema límbico e o córtex frontal (LLORCA-TORRALBA *et al*., 2016).

A ativação de receptores α_2 adrenérgicos descendentes exerce um efeito regulador inibitório importante na modulação da dor. Tais receptores são acoplados a proteína G_i que pormove a inibição da enzima adenilato ciclase, desta forma reduzindo os níveis de AMPc e aumentando o efluxo de K^+. Tal processo inibe a liberação de

neurotransmissores como glutamato e substância P (MILLAN, 2002; MANSIKKA *et al*., 2004).

O efeito antinociceptivo do SpEE, sobre a nocicepção induzida pela formalina, não foi revertido pela administração prévia da ioimbina (antagonista não-seletivo de receptores α_2-adrenérgicos), indicando a não participação desta via.

Existem várias evidências científicas sobre o sistema adenosinérgico na modulação da transmissão aferente primária. As propriedades antinociceptivas da adenosina e de alguns de seus análogos foram demonstradas através de vários testes nociceptivos, modelos de inflamação e neuropatia, em estudos com animais. Nos seres humanos, a administração intratecal ou sistêmica de adenosina foi eficaz contra a dor (DICKENSON *et al*., 2000).

A adenosina, no sistema nervoso central, é um neuromodulador que regula a função neuronal for atuar em seus receptores: A_1, A_{2A}, A_{2B} e A_3. Os receptores do subtipo A_1 estão presentes em neurônios sensoriais, são receptores acoplados a proteína G_i, que quando ativados, causam inibição da enzima adenilato ciclase e consequentemente diminuição dos níveis de AMPc e efluxo de K^+, provocando uma hiperpolarização celular e diminuição dos níveis intracelulares de Ca^{2+}, o que leva a diminuição da liberação de neurotransmissores. Os receptores A_{2A} também estão presentes em neurônios sensoriais, porém, estudos mostram que a ativação de tais receptores leva a uma hiperalgesia mediada por níveis aumentados de AMPc, ativação de proteína cinase A, fosforilação de canais de Na^+, gerando aumento das correntes internas e consequentemente nocicepção. Os receptores A_{2B} e A_3 estão localizados em mastócitos, e contribuem indiretamente para a dor inflamatória por meio da liberação de mediadores químicos (SAWYNOK; BURNSTOCK, 2010).

Diante desses fatos, o sistema adenosinérgico também foi investigado e os dados mostram que o pré-tratamento dos animais com a cafeína (antagonista não-seletivo de receptores adenosinérgicos) foi capaz de inibir o efeito antinociceptivo do SpEE na fase inflamatória do teste de formalina, indicando a participação dessa via no mecanismo de antinocicepção do extrato em estudo.

Em síntese, no que diz respeito ao efeito analgésico do SpEE, os resultados experimentais indicam que tal efeito depende da ativação da via adenosinérgica.

O próximo passo do nosso estudo foi investigar se o efeito antinociceptivo apresentado pelo SpEE tem alguma relação com a inflamação, já que mediadores inflamatórios são liberados em virtuse de injúria tecidual e são capazes de modificar a transmissão da dor. (Scholz; woolf, 2002). Além disso o SpEE inibiu a nocicepção na segunda fase do teste de formalina, ou seja, na fase inflamatória onde são liberados vários mediadores químicos da inflamação.

A peritonite por carragenina é um modelo de inflamação aguda que é largamente empregado para novas substâncias com potencial anti-inflamatório, permitindo quantificar a migração celular (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

A administração intraperitoneal de carragenina provoca um infiltrado de leucócitos que migram da vênula mesentérica para a cavidade do peritônio onde o tecido está inflamado. Tal evento ocorre devido a vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e liberação de mediadores inflamatórios (HALL *et al*., 1998).

O tratamento com SpEE reduziu o número de leucócitos no líquido peritoneal, sugerindo que o SpEE desempenha um papel importante no controle da inflamação. Tal fato por ter ocorrido por uma modulação na expressão de moléculas de superfície celular ou na produção de citocinas, que são indispensáveis para que ocorra a migração de leucócitos para o local inflamado. (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004)

Portanto, os resultados obtidos no presente estudo, demonstram que o SpEE exerce seu efeito antinociceptivo mediado pelo sistema adenosinérgico, e possui um papel modulador da resposta inflamatória, interferindo na migração de leucócitos para o sítio inflamado.

Conclusão

8. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, conclui-se que:

- O Extrato Etanólico Bruto de *Sargassum polyceratium* apresenta um efeito antinociceptivo mediado pelo sistema adenosinérgico;

- Os sistemas opioide, dopaminérgico, α_2-adrenérgico não participam diretamente do mecanismo de ação do Extrato Etanólico Bruto de *Sargassum polyceratium*;

- Os canais de K^+_{ATP} também não estão envolvidos diretamente no mecanismo de ação;

- Diminui a migração celular para a cavidade peritoneal no modelo da peritonite induzida por carragenina.

Referências

9. REFERÊNCIAS

AFOLAYAN, A.F.; BOLTON, J.J.; LATEGAN, C.A.; SMITH, P.J.; BEUKES, D.R. Fucoxanthin, tetraprenylated toluquinone and toluhydroquinone metabolites from *Sargassum heterophyllum* inhibit the *in vitro* growth of the malaria parasite *Plasmodium falciparum.* **Zeitschrift für Naturforschung C,** v. 63, p. 848-852, 2008.

ALMEIDA, C.L.F. et al. Bioactivities from marine algae of the Genus *Gracilaria*. **International Journal of Molecular Sciences,** v. 12, n. 7, p. 4550-4573, 2011.

ALMEIDA, T.F.; ROIZENBLATT, S.; TUKIF, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**, v. 1000, p 40-56, 2004.

American Veterinary Medical Association – AVMA. **Guidelines on Euthanasia: 2013**, edition. 2013.

ARAÚJO, C.A.C. **Um Contributo Para O Desenvolvimento De Arquétipos – Revisão Integrativa Da Literatura Sobre A 'Dor'**, 2014. p. 15. Dissertação (Curso de Mestrado em Enfermagem Médico-Cirúrgica), Escola Superior de Enfermagem do Porto, Porto, 2014.

BASBAUM, A.I.; BAUTISTA, D.M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v.139, p.267-284, 2009.

BENEDITO, R.B. **Estudo Do Mecanismo De Ação Antinociceptivo E Avaliação Histopatológica Cerebral Do (s)-(-)-álcool perílico Em Camundongos**, 2013. p. 23-24. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos), Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

BIOPROSPECÇÃO de produtos naturais de origem marinha. INCT AmbTropic (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Ambientes Marinhos Tropicais), 2012. Disponível em: <http://www.inctambtropic.org/grupos-de-trabalho/plataforma-continental--/bioprospeccao-de-produtos.html>. Acesso em: 17 ago. 2016.

BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; KEYZERS, R.A.; MUNRO, M.H.G.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. **Nat. Prod. Rep.** v 32, p. 116-211, 2015.

BODNAR, R.J. Endogenous opiates and behavior. **Peptides**, v.30, p.2432-2479, 2008.

CARVALHO, J.E. Fitoterápicos: Alimento ou Medicamento? In: MERCADANTE, A.Z.; BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A.; PEREIRA, J.L.; PASTORE, G.M. **Ciência de Alimentos: avanços e perspectivas**, v. 2. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp, 2001, p.196-202.

CARVALHO, W.A.; LEMÔNICA, L. Mecanismos celulares e Moleculares da Dor Inflamatória. Modulação Periférica e Avanços Terapêuticos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.48, p.137-158, 1998.

CHAPMAN, C.R.; GAVRIN, J. Suffering: the contributions of persistent pain. **The Lancet,** v.353, n.9171, p. 2233-2237, 1999.

CHEN, H.; KUANG, W.; SHI, F. Protective and repairing effects of *Sargassum fusiforme*
polysaccharides on oxidative injured vascular endothelial cells *in vitro.* **Zhongguo Yaoxue Zazhi**, v.42, p.829-831, 2007.

CEN-PACHECO, F.; NORDSTRÖM, L.; SOUTO, M.L.; MARTÍN, M.N.; FERNÁNDEZ, J.J.; DARANAS, A.H. Studies on polyethers produced by red algae. **Marine Drugs,** v. 8, p. 1178-1188, 2010.

Conceicao-Silva, F.; Presgrave, O.A.F. Fármacos usados em animais de laboratório anestésicos e analgésicos. In: NETO FARIA, H.C.C.; SANTOS, B.F. **Manual de utilização de animais/Fiocruz** . Rio de Janeiro: p. 20-27, 2008.

CORDERO-ERAUSQUIN, M.; INQUIMBERT, P.; CHLICHTER, R.; HUGEL, S. Neuronal networks and nociceptive processing in the dorsal horn of the spinal cord. **Neuroscience**, v. 338, p. 230-247, 2016.

COUTAUX, A.; ADAM, F.; WILLER, J.C.; LEBARS, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, v.72, p.359-371, 2005.

CRUVINEL, W.M.; JÚNIOR, D.M.; ARAÚJO, J.A.P.; CATELAN, T.T.T.; SOUZA, A.W.S.; SILVA, N.P.; ANDRADE, L.E.C. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Ver Bras Reumatol**, v. 4, p. 434-61, 2010.

Damy, S.B.; CAMARGO, R.S.; CHAMMAS, R.; FIGUEIREDO, L.F.P. Aspectos fundamentais da experimentação animal – aplicações em cirurgia experimental. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, p. 103- 111, 2010.

DICKENSON, A.H.; SUZUKI, R.; REEVE, A.J. Adenosine as a potential analgesic target in inflammatory and neuropathic pains. **CNS Drugs**, v. 13, p. 77-85, 2000.

ELISABETSKY, E. Fitoterapia com base científica. **Ciência Hoje**, v. 31, n. 182, p. 78-79, 2002.

ENGELEN, A.H.; OLSEN, J.L.; BREEMAN, A.M.; STAM, W.T. Genetic differentiation in *Sargassum polyceratium* (Fucales: Phaeoceae) around the island of Curação (Netherlands Antilles). **Marine Biology,** v. 139, n. 2, p. 267-277, 2001.

HAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. Biologia Vegetal. 8ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

FAHEY, J.W.; ZALCMANN, A.T.; TALALAY,P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. **Phytochemistry,** 56: 5–51, 2001.

FEIN, A. Nociceptores: As células que sentem dor. PETROV, P. Ribeirão Preto – São Paulo: 2011.

FERRAZ, F.B.; FERNANDEZ, J.H. Integrinas na adesão, migração e sinalização celular: associação com patologias e estudos clínicos. **Revista Científica da FMC**, v. 9, 2014.

FLOWER, R.J.; PERRETTI, M. Controlling inflammation a fat chance? **The Journal of Experimental Medicine (JME)**, v.201, p.671-674, 2005.

FREDHOLM, B.B. Adenosine receptors as drug targets. **Exp Cell Res.** v. 8, p. 1284-1288, 2010.

GALEOTTI, N.; GHELARDINI, C.; VINCI, M.C.; BARTOLINI, A. Role of potassium channels in the antinociception induced by agonists of alpha2-adrenoceptors**. BritshJornal Pharmacology**, v.126, p.1214-1220, 1999.

GOLAN, D.E.; TASHJIAN, J.R.; ARMSTRONG, E. J.; ARMSTRONG, A.W. **Princípios de Farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia.** 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

GOZZANI, J.L. Fisiopatologia da Dor. IN: CAVALCANTE, I. L., MADDALENA, M. L. (Org.). **Dor**. Rio de Janeiro: Sociedade de Anestesiologia do Estado do Rio de Janeiro, p.13-36, 2003.

HAJHASHEMI, V.; AMIN, B. Effect of glibenclamide on antinociceptive effects of antidepressants of different classes. **Clinics,** v.66, p.321-325, 2011.

HALL, J.C.; HEEL, K.A.; PAPADIMITRIOU, J.M.; PLATELL, C. The pathobiology of peritonitis. **Gastroenterology**, v.114, p.185-196, 1998.

HELMS, J.E.; BARONE, C.P. Physiology and treatment of pain. **Critical Care Nurse**, v.28, p.38-49, 2008.

HESS, S.; PADOANI, C.; SCORTEGANHA, L.C.; HOLZMANN, I.; MALHEIROS, A.; YUNES, R.A.; MONACHE, F.D.; SOUZA, M.M. Assessment of mechanisms involved in antinociception caused by myrsinoic acid B. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, p. 209-215, 2010.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: a useful technique for evaluating mild analgesics. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 143, p. 769-775, 1985.

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

IASP (International Association for the Study of Pain). Guide to Pain Management in Low-Resource Settings. IN: White, W.; Stein, C. **History, Definitions, and Contemporary Viewpoints**, 2010.

IJEOMA, U.F.; ADERONKE, S.O.; OGBONNA, O.; AUGUSTINA, M.A.; IFEYINWA, C.N. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of crude extracts of *Ipomoea involucrata leaves* in mice and rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.4, p.121-124, 2011.

JONES, S.L. Dypirone into the nucleous raphe magnus inhibits the rat nociceptive tail-flick reflex. **European Journal of Pharmacology**, v.318, p.37-40, 1996.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v.413, n.6852, p. 203-210, 2001.

OHTANI, N.; MASAKI, E. D2-like receptor in the descending dopaminergic pathway are not involved in the decreased postoperative nociceptive threshold induced by plantar incision in adult rats. **Journal of Pain Research**, v. 9, p. 865-869, 2016.

OLIVEIRA JÚNIOR, W.M.; BENEDITO, R.B.; PEREIRA, W.B.; TORRES, P.A.; RAMOS, C.F.A.; COSTA, J.P.; TOMÉ, A.R.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M.; DINIZ, M.F.F.M.; ALMEIDA, R.N. Farnesol: antinociceptive effect and histopathological analysis of the striatum and hippocampus of mice. **Fundamental & Clinical Pharmacology,** v.27, p.419-426, 2012.

OLIVEIRA-JUNIOR, J.O.; JUNIOR, C.S.A.P.; COHEN, C.P. Inflammatory mediators of neuropathic pain. **Rev Dor São Paulo**, v. 17, p. 35-42, 2016.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M.; SIEGELBAUM, S.A.; HUDSPETH, A.J. **Principles of neural science.** 5ª ed. New York: Mc-Graw-Hill, 2013.

KLAUMANN, P.R.; WOUK, A.F.P.F.; SILLAS, T. Pathophysiology of Pain. **Archives of Veterinary Science**, v.13, p. 1-12, 2008.

KRAYCHETE, D. Opioides. In: SILVA, P. **Farmacologia**. 8ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 46 p. 467-480, 2010.

LA BARRE, S.; POTIN, L.; LEBLANC, C.; DELAGE, L. The halogenated metabolism of brown algae (Phaeophyta), its biological importance and its environmental significance. **Marine Drugs,** v. 8, n. 4, p. 988-1010, 2010.

LAO, L.; SONG, B.; CHEN, W.; MARVIZÓN, J.C. Noxious mechanical stimulation evokes the segmental release of opioid peptides that induce mu-opioid receptor internalization in the presence of peptidase inhibitors. **Brain Research.** v. 1197, p. 85-93. 2008.

LEE, J.C.; HOU, M.F.; HUANG, H.W.; CHANG, F.R.; YEH, C.C.; TANG, J.Y.; CHANG, H.W. Marine algal natural products with anti-oxidative, anti-inflammatory, and anti-cancer properties. **Cancer Cell International**, v. 13:55, 2013.

LIRA, Narlize Silva. **Estudo Químico Dos Organismos Marinhos *Aplysina fistularis* Pallas e *Sargassum polyceratium* Montagne**. 2012. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.

LIU, X.; WANG, C.Y.; SHAO, C.L.; GUAN, H.S. Chemical constituents from *Sargassum pallidum* (Turn.) C. Agardh. **Biochem Syst Ecol,** v. 37, p. 127-129, 2009.

LLORCA-TORRALBA, M.; BORGES, G.; NETO, F.; MICO, J.A.; BERROCOSO, E. Noradrenergic locus coeruleus pathways in pains modulation. **Neuroscience**, p. 93-113, 2016.

LOESER, J.D.; MELZACLK, R. Pain: an overview. **Lancet**, v.353, p.1607-1609, 1999.

LUIZ, A.P. **Análise Do Mecanismo De Ação Antinociceptiva Do Extrato Etanólico Obtido Das Raízes Da *Humirianthera ampla* Miers**, 2007. p. 1. Dissertação (Mestre em neurociências), Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

MCNAMARA, C.R.; MANDEL-BREHM, J.; BAUTISTA, D.M.; SIEMENS, J.; DERANIAN, K.L.; ZHAO, M.; HAYWARD, N.J.; CHONG, J.A.; JULIUS, D.; MORAN, M.M.; FANGER, C.M. TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, p. 13525-13530, 2007.

MAGNUSSON, J.E.; FISHER, K. The involvement of dopamine in nociception: the role of D (1) ad D (2) receptors in the dorsolateral striatum. **Brain Research**, v. 855, p. 260-266, 2000.

MANSIKKA, H.; LAHDESMAKI, J.; SCHEININ, M.; PERTOVAARA, A. Alpha(2A) adrenorreceptors contribute to feedback inhibition of capsaicin-induced hyperalgesia. **Anesthesiology**, v.101, p.185-190, 2004.

MÁXIMO, L.N. **Estrutura E Dinâmica De Populações E Comunidades De Macroalgas Em Ambientes Recifais Da Paraíba**, 2015. p. 21, p. 28. Dissertação (Mestrado em Ecologia), Universidade Federal da Paraíba, Rio Tinto, 2015.

MELZACK, R.; WALL, P. D. Pain mechanisms: a new theory. **Science**, v. 150, n. 699, p. 971-79, 1965.

MEOTTI, F.C.; FACHINETTO, R.; MAFFI, L.C.; MISSAU, F.C.; PIZZOLATTI, M.G.; ROCHA, J.B.T.; SANTOS, A.R.S. Antinociceptive action of myricitrin: Involvement of the K^+ and Ca^{2+} channels. **European journal of pharmacology**, v.567, p.198-205, 2007.

MERRER, J.; BECKER, J.A.J.; BEFORT, K.; KIEFFER, B.L. Reward Processing by the Opioid System in the Brain. **Physiological Reviews**, v. 89, p. 1379-1412, 2009.

MERSKEY, H.; BOGDUK, N. Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. **Seattle, Wash: IASP Press**, 2ª ed. 1994.

MILLAN, M.J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, v.66, p.355-474, 2002.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, v. 57, p.1-164, 1999.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. Imunobiologia de Janeway. 7ª Ed. Porto Alegre: Artmed, p. 39-109, 2010.

MUROTANI, T.; ISHIZUKA, T.; NAKAZAWA, H.; WANG, X.; MORI, K.; SASAKI, K.;

ISHIDA, T.; YAMATODANI, A. Possible involvement of histamine, dopamine, and noradrenalin in the periaqueductal gray in electroacupunture pain relief. **Brain Research**, v. 1306, p. 62-68, 2010.

MURUGADAS, T.L.; PHANG, S.M.; TONG, S.L. Heavy metal accumulation cytotoxic principle of the brown alga *Sargassum tortile*. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v.39, p.2129–2131, 1995.

OCANA, M.; CENDÁN, C.M.; COBOS, E.J.; ENTRENA, J.M.; BAEYENS, J.M. Potassium channels and pain: present realities and future opportunities. **European Journal of Pharmacology**, v. 500, p. 203-219, 2004.

OYEMITAN, I.A.; IWALEWA, E.O.; AKANMU, M.A.; OLUGBADE, T.A. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of essential oil of *Dennettia tripetala G.Baker* (Annonaceae) in rodents. **African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines**, v.5, p.355-362, 2008.

O'SULLIVAN, L.; MURPHY, B.; MCLOUGHLIN, P.; DUGGAN, P.; LAWLOR, P.G.; HUGHES, H., GARDINER, G.E. Prebiotics from marine macroalgae for human and animal health applications. **Marine Drugs**, v.8, p.2038-2064, 2010.

PALLELA, R.; NA-YOUNG, Y.; KIM, S.K. Anti-photoaging and photoprotective compounds derived from marine organisms. **Marine Drugs,** v. 8, p. 1189-1202, 2010.

PANIAGUA-MICHEL, J.; CAPA-ROBLES, W.; OLMOS-SOTO, J.; GUTIERREZ-MILLAN, L.E. The Carotenogenesis Pathway via the Isoprenoid-β-carotene Interference Approach in a New Strain of Dunaliella salina Isolated from Baja California Mexico. **Marine Drugs,** v. 7, p. 45-56, 2009.

PARADA, C.A., TAMBELI, C.H., CUNHA, F.Q., FERREIRA, S.H. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. **Neuroscience,** v.102, p.937–944, 2001.

PERL, E.R. Ideas about pain, a historical view. **Nat Rev Neurosci**, v. 8, p. 71–80, 2007.

PINTO, M.S.C.T. A percepção da dor: receptores envolvidos. **Revista da Faculdade de Medicina de Lisboa**, v.5, p.253-262, 2000.

RAMOS, M.L.M. **Relatório de Prática Clínica em Cuidados Paliativos Avaliação e Alívio da Dor**, 2014. p. 36. Relatório de Prática Clínica (Curso de Mestrado em

Cuidados Paliativos), Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias, Instituto Politecnico de Castelo Branco, Porto, 2014.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J. **Farmacologia** 6ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 605-848, 2007.

ROCHA, A.P.C.; KRAYCHETE, D.C.; LEMONICA, L.; CARVALHO, L.R.; BARROS, G.A.M.; GARCIA, J.B.S.; SAKATA, R.K. Pain: Current Aspects on Peripheral and Central Sensitization. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.57, p.94-105, 2007.

RODRIGUES, A.J.S.S. **Avaliação Da Dor Ao Doente Oncológico Em Cuidados Paliativos Incapaz De Comunicar**, 2013. p. 32-34. Dissertação (Curso de Mestrado em Enfermagem Médico-Cirúrgica), Escola Superior de Enfermagem de Coimbra, Porto, 2013.

RUSSO, C.M.; BROSE, W.G. Chronic pain. **Annu. Rev.Med.** v. 49, p. 123-133, 1998.

SALVADORI, M.G.S.S. **Mecanismo De Ação Da Atividade Antinociceptiva E AntiInflamatória Do (-) - Mirtenol**, 2013. p. 21, p. 28. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos), Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

SANTOS, A.K.F.S. **Ivestigação Da Atividade Psicofarmacológica Do Extrato Etanólico Bruto De *Sargassum polyceratium* Em Modelos Animais Utilizando Roedores**, 2015. p. 14. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia), Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, 2015.

SANTOS, A.K.F.S.S.; FONSECA, D.V.; SALGADO, P.R.R.; MUNIZ, V.M.; TORRES, P.A.; LIRA, N.S. DIAS, C.S.; PORDEUS, L.C.M.; BARBOSA-FILHO, J.M.; ALMEIDA, R.N. Antinociceptive activity of Sargassum polyceratium and the isolation of its chemical componentes. **Brazilian Journal Of Pharmacognosy**. v. 1, p. 683–689, 2015.

SAWYNOK, J. Topical and peripherally acting analgesics. **Pharmacological Reviews**, v.55, p.1-20, 2003.

SAWYNOK, J.; BURNSTOCK, G. Adenosine Triphosphate and Adenosine Receptors and Pain. IN: BEAULIEU, P.; LUSSIER, D.; PORRECA, F.; DICKENSON, A.H. (Eds.) **Pharmacology of pain**, p. 303-326 Seattle: IASP Press, 2010

SCHEFFER, R.E. Psychopharmacology: Clinical implications of brain neurochemistry. **Pediatric Clinics of North America**, v.53, p.767-775, 2006.

SCHMIDT, R.; SCHMELZ, M.; FORSTER, C.; RINGKAMP, M.; TOREBJORK, E.; HANDWERKER, H. Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. **J Neurosci**, v. 15, p. 333–341, 1995.

SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research. Clinical Anaesthesiology**, v.18, n.3, p.385-405, 2004.

SILVA, J.A.; RIBEIRO-FILHO, N.P. A dor como um problema psicofísico. **Rev Dor. São Paulo**, 12(2):138-51, 2011.

SOUZA, G.H.B.; MELO, J.C.P.; LOPES, N.P. **Farmacognosia: Coletânea Científica**. 1ed. Ouro Preto, UFOP, 2012.

SOUZA, M.M.; MADEIRA, A.; BERTI, C.; KROGH, R.; YUNES, R.A.; CECHINELFILHO, V. Antinocicepptive properties of the methanolic extract obtained from *Ipomoeapescaprae* (L.) **Journal of Ethnopharmacology,** v. 69, p. 85-90, 2000.

STÄNDER, S.; GUNZER, M.; METZE, D.; LUGER, T.; STEINHOFF, M. Localization of μ-opioid receptor 1A on sensory nerve fibers in human skin. **Regulatory Peptides.** v.110, p. 75-83. 2002.

STEIN, C., et al. Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation. **Proceedings of the National Academy of Science USA.** v.87, p.5935-5939. 1990.

ŚWIEBODA, P.; FILIP, R.; PRYSTUPA, A.; DROZD, M. Assessment of pain: types, mechanism and treatment. **Ann Agric Environ Med**. Special Issue 1: 2–7, 2013.

SZÉCHY, M.T.M.; PAULA, É.J. Padrões estruturais quantitativos de bancos de *Sargassum* (Phaeophyta, Fucales) do litoral dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica,** v.23, p.121-132, 2000.

TAHER, Y.A. Antinociceptive activity of *Mentha piperita leaf* aqueous extract in mice. **Libyan Journal of Medicine**, v.7, p.1-5, 2012.

TSANTOULAS, C.; McMAHON, S.B. Opening paths to novel analgesics: the role of potassium channels in chronic pain. **Trends in Neurosciences**, v. 37, p. 146-158, 2014.

TEIXEIRA, M.J. Mecanismos de ocorrência de dor. **Rev. Med.** 80ª ed. p. 22-62, 2001.
VAN DIJKEN, H.; DIJK, J.; VOOM, P; HOLSTEGE, J.C. Localization of dopamine D_2 receptor in rat spinal cord identified with immucytochemistry and in situ hybridization. **Eur. J. Neurosc.** v. 8, p. 621-628, 1996.

VERMA, V.; SHEIKH, Z.; AHMED, A.S. Nociception and role of immune system in pain. **Acta Neurol Belg**, v. 115, p. 213-220, 2015.

WELCH, S.P.; DUNLOW, L.D. Antinociceptive activity of intrathecally administered potassium channel openers and opioid agonists: a common mechanism of action? **Journal Pharmacology of Experimental Therapeutic**, v.267, p.390-399, 1993.

WHO. Guidelines on the pharmacological treatment of persisting pain in children with medical illnesses. **World Health Organization**, p. 1-167. 2012.

WITTERT, G.; HOPE, P.; PYLE, D. Tissue distribution of opioid receptor gene expression in the rat. **Biochemical and Biophysics Research Communications.** v. 218, 877-881, 1996.

WOOD, P. B.; SCHWEINHARDT, P.; JAEGER, E.; DAGHER, A.; HAKYEMEZ, H.; RABINER, E. A.; BUSHNELL, M. C., CHIZH, B. A. Fibromyalgia patients show an abnormal dopamine response to pain. **European Journal of Neuroscience**, v. 25, p. 3576-3582, 2007.

ZAMBELLI, V.O. **Avaliação Da Expressão E Ativação De Receptores Opioides Após Injúria Periférica Em Ratos**, 2011. p. 21, p. 28. Tese (Doutorado em Ciências), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

ZUBIA, M.; PAYRI, C.; DESLANDES, E. Alginate, mannitol, phenolic compounds and biological activities of two range-extending brown algae, *Sargassum mangarevense* and *Turbinaria ornata* (Phaeophyta: Fucales), from Tahiti (French Polynesia). **Journal of Applied Phycology,** v. 20, p. 1033-1043, 2008.