

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

NAYARA CAROLINE PEREIRA

**O EFEITO DA ARTEMISININA NO CONTROLE DA DOR NOCICEPTIVA,
INFLAMATÓRIA AGUDA E NEUROPÁTICA EM RATOS**

ALFENAS/MG

2018

NAYARA CAROLINE PEREIRA

**O EFEITO DA ARTEMISININA NO CONTROLE DA DOR NOCICEPTIVA,
INFLAMATÓRIA AGUDA E NEUROPÁTICA EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal Alfenas como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre.

Área de concentração: Neurociências e comportamento.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Lourenço da Silva

Coorientador: Profa. Dra. Josie Resende Torres da Silva

ALFENAS/MG

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Pereira, Nayara Caroline.

O efeito da artemisinina no controle da dor nociceptiva, inflamatória aguda e neuropática em ratos / Nayara Caroline Pereira. -- Alfenas, MG, 2018.

45 f.

Orientador: Marcelo Lourenço da Silva.

Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, 2018.

Bibliografia.

1. Dor. 2. Nocicepção. 3. Artemisinina. 4. Analgesia. I. Silva, Marcelo Lourenço da. II. Título.

CDD-571.1

NAYARA CAROLINE PEREIRA

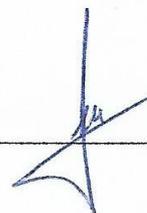
"O EFEITO DA ARTEMISININA NO CONTROLE DA DOR NOCICEPTIVA,
INFLAMATÓRIA AGUDA E NEUROPÁTICA EM RATOS"

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para a obtenção do título de Mestre
em Biociências Aplicadas à Saúde pela
Universidade Federal de Alfenas . Área de
concentração: Neurociências e Comportamento

Aprovado em: 20/02/2018

Prof. Dr. Marcelo Lourenço da Silva
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
- UNIFAL-MG

Assinatura: _____



Prof. Dr. Renato Leonardo de Freitas
Instituição: Universidade de São Paulo
-USP

Assinatura: _____



Prof. Dr. Adriano Prado Simão
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
- UNIFAL-MG

Assinatura: _____



Dedico a Deus, por ser essencial em minha vida, autor de meu destino e meu guia. À minha mãe Vanilza Aparecida Cantarino e meu padrasto Adilson da Silva Vitor por serem os principais incentivadores desta conquista e aos meus irmãos pelo amor imensurável.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por me abençoar e iluminar em todos os caminhos. À minha mãe Vanilza Aparecida Cantarino, pelo incentivo e amor constante que me fizeram chegar até aqui e por ser modelo de determinação à qual me inspiro todos os dias.

Ao meu padraastro Adilson da Silva Vitor por ser um pai presente em todos momentos, me apoiando e amando como tal.

Aos meus irmãos Gabryela Alicia Vitor e Miguel Augusto Silva Vitor por alegrar meus dias.

Ao meu namorado Lucas Salgueiro, pelo amor e apoio em prol desta conquista.

Ao meu pai, amigos, avós e demais familiares por acreditarem em mim.

Ao Professor Doutor Marcelo Lourenço da Silva por ter me orientado e trazido um novo olhar profissional, assim como conhecimentos diversos que me fizeram crescer indescritivelmente.

À Professora Doutora Josie Resende Torres da Silva, pela amizade e por acreditar na minha capacidade e ter sido a porta de entrada para esse novo caminho.

Ao Professor Claudio Viegas Jr. pela disponibilização da Artemisinina utilizada no presente estudo.

As amigas de pós-graduação Izabella Breda, Isabella de Paula, Jadi, Letícia, Rafaella Rocha e Ravena pelos aprendizados repassados e por compartilhar diversos momentos com respeito e carinho.

Em especial, as amigas que Alfnas me presenteou, Angélica Pontes e Gabriela Mendonça pela presença e torcida pelo meu sucesso.

À banca pelo aceite e por todo conhecimento agregado.

A todos profissionais que de alguma forma contribuíram para que o meu trabalho fosse realizado da melhor maneira.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Por fim, a todos aqueles que cruzaram meu caminho durante esses anos e que o tornaram mais especial, meu profundo agradecimento!!!

RESUMO

Introdução: A Artemisinina, extraída das folhas de *Artemisia Annu*, é um tipo de lactona sesquiterpênica e possui uma variedade de efeitos farmacológicos importantes e aplicações potenciais, incluindo seu uso contra a malária, tumores e inflamação, bem como sua capacidade de melhorar a função imunológica. Essas aplicações sugerem que pode ter um papel no controle da dor. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da Artemisinina no controle da dor nociceptiva, inflamatória aguda e neuropática em ratos. **Métodos:** Foram utilizados ratos *Wistar* machos, divididos em três grupos: (1) dor nociceptiva, avaliados no teste de latência de retirada da cauda; (2) dor inflamatória, induzida por Adjuvante Completo de Freund (CFA) e (3) dor neuropática, submetidos ao modelo de constrição crônica do nervo isquiático (CCI). Os animais tiveram seus limiares basais avaliados, e após indução da dor por CFA e CCI houve novamente avaliação de seus limiares e ainda nos tempos 0, 1, 3, 6 e 24 h após a administração oral única de solução Salina (controle) ou Artemisinina em três doses: 0,03mg/kg, 0,3mg/kg e 3mg/kg. Ainda utilizamos o teste de campo aberto para excluir possíveis efeitos motores. Os resultados foram analisados por *two-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de *Bonferroni*. **Resultados:** No teste de latência de retirada da cauda, os animais tratados com Artemisinina demonstraram um aumento no tempo de latência após 3 horas ao tratamento que se manteve por 24 horas, nas três doses administradas, quando comparado ao grupo controle. No modelo de dor inflamatória, no teste de *Von Frey* digital, os animais tratados com Artemisinina apresentaram aumento no limiar de pressão logo após administração (T0) que se manteve por 24 horas, nas três doses administradas, quando comparados ao controle. No modelo de dor neuropática, no teste de *Von Frey* digital, os animais tratados com Artemisinina apresentaram aumento no limiar após 1 hora do tratamento que se manteve por 24 horas, nas três doses administradas, quando comparados ao controle. Não houve diferença no teste do campo aberto. **Conclusão:** Os resultados demonstram que a Artemisinina é capaz de aliviar os comportamentos da dor nos ratos submetidos aos modelos de dor nociceptiva, inflamatória aguda e neuropática.

Palavras-chave: Dor, Nocicepção, Artemisinina, Analgesia

ABSTRACT

Introduction: Artemisinin, extracted from the leaves of *Artemisia Annu*, is a type of sesquiterpene lactone and has a variety of important pharmacological effects and potential applications, including its use against malaria, tumors and inflammation, as well as its ability to improve immune function. These applications suggest that it may play a role in pain control. Thus, the objective of the present study was to evaluate the effect of Artemisinin on the control of nociceptive, acute and neuropathic inflammatory pain in rats. **Methods:** Male Wistar rats were divided into three groups: (1) nociceptive pain, evaluated in the tail withdrawal test; (2) inflammatory pain induced by Freund's Complete Adjuvant (CFA) and (3) neuropathic pain, submitted to the chronic constriction of the sciatic nerve (CCI) model. The animals had their baseline thresholds evaluated, and after induction of pain by CFA and CCI, their thresholds were again evaluated, and at 0, 1, 3, 6 and 24 hours after oral administration of saline (control) or Artemisinin in three doses: 0.03mg / kg, 0.3mg / kg and 3mg / kg. We still use the open field test to exclude possible motor effects. The results were analyzed by two-way ANOVA followed by the Bonferroni post-test. **Results:** In the nociceptive pain model in the tail-removal test, animals treated with Artemisinin demonstrated a reduction in latency time at 3 hours, which was maintained for 24 hours at three doses, when compared to the control group. In the model of inflammatory pain, in the digital Von Frey test, animals treated with Artemisinin showed an increase in the pressure threshold after administration (T₀), which was maintained for 24 hours in the three doses when compared to the control. In the model of neuropathic pain, in the digital Von Frey test, the animals treated with Artemisinin presented increase in the threshold in the after 1 hour that was maintained for 24 hours in the three doses, when compared to the control. There was no difference in the open field test. **Conclusion:** The results demonstrate that Artemisinin is capable of alleviating pain behaviors in rats submitted to nociceptive, acute inflammatory and neuropathic pain models.

Key words: Pain, Nociception, Artemisinin, Analgesia

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Imagem representativa do sistema nociceptivo | 12 |
| Figura 2 - Analgesímetro Tail Flick | 20 |
| Figura 3 - Filamento de níquel-cromo..... | 21 |
| Figura 4 - Nervo isquiático exposto | 22 |
| Figura 5 - Amarração do nervo isquiático | 23 |
| Figura 6 - Sutura da pele | 23 |
| Figura 7 - Delineamento experimental - Dor nociceptiva..... | 27 |
| Figura 8 - Delineamento experimental - Dor neuropática e Inflamatória | 27 |
| Figura 9 - Delineamento experimental - Campo Aberto..... | 28 |

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1:** Limiar de latência (s) avaliado pelo teste de retirada da cauda, no efeito da Artemisinina nas doses 0,03 mg/kg; 0,3 mg/kg e 3,0 mg/kg, sobre a dor nociceptiva30
- Gráfico 2:** Limiar nociceptivo (g) avaliado pelo teste de *Von Frey* digital no efeito da Artemisinina nas doses 0,03 mg/kg; 0,3 mg/kg e 3,0 mg/kg, sobre a dor inflamatória aguda32
- Gráfico 3:** Limiar nociceptivo (g) avaliado pelo teste de *Von Frey* digital no efeito da Artemisinina nas doses 0,03 mg/kg; 0,3 mg/kg e 3,0 mg/kg, sobre a dor neuropática34
- Gráfico 4:** Efeito da Artemisinina nas doses 0,03 mg/kg; 0,3 mg/kg e 3,0 mg/kg na distância percorrida e tempo de imobilidade, avaliado pelo teste de campo aberto35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------------|---|
| IASP | Associação Internacional para o Estudo da Dor |
| SNC | Sistema Nervoso Central |
| SNP | Sistema Nervoso Periférico |
| TNF- α | Fator de Necrose Tumoral Alfa |
| CFA | Adjuvante Completo de Freund |
| CCI | Constricção Crônica do nervo Isquiático |
| NO | Óxido nítrico |
| i.pl | Administração Intraplantar |
| EPM | Erro Padrão da Média |
| TF | <i>Tail Flick Test</i> |
| SAL | Salina |
| COX | Ciclo - Oxigenase |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 11 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 12 |
| 3 JUSTIFICATIVA | 17 |
| 4 OBJETIVOS | 18 |
| 4.1 Objetivo Geral | 18 |
| 4.2 Objetivos Específicos | 18 |
| 5 METODOLOGIA | 19 |
| 5.1 Animais | 19 |
| 5.2 Modelos Experimentais | 19 |
| 5.2.1 Modelo de Dor Nociceptiva | 19 |
| 5.2.2 Modelo de Dor Inflamatória Aguda..... | 21 |
| 5.2.3 Modelo de Dor Neuropática..... | 21 |
| 5.2.4 Testes de nocicepção mecânica por Von Frey digital | 24 |
| 5.2.5 Teste do campo aberto..... | 24 |
| 5.2.6 Drogas e Administração | 25 |
| 5.2.7 Grupos experimentais | 25 |
| 5.2.8 Delineamento do estudo..... | 26 |
| 5.2.9 Análise Estatística | 28 |
| 6 RESULTADOS | 29 |
| 7 DISCUSSÃO | 36 |
| 8 CONCLUSÃO | 39 |
| REFERÊNCIAS | 40 |
| ANEXO I - Comitê de ética em experimentação animal | 48 |

1. INTRODUÇÃO

Atualmente a dor é responsável por parte significativa da demanda aos serviços de saúde e se torna um fenômeno multidimensional, que envolve processos psicossociais, comportamentais e fisiopatológicos. Desta forma, a dor é causadora de morbidade, absenteísmo ao trabalho e incapacidade temporária ou permanente, gerando elevados custos aos sistemas de saúde. (FERREIRA, 2009)

A dor integra a homeostase, ou seja, o equilíbrio do corpo, podendo ser um importante alerta sobre um risco ao organismo, sendo assim, importante para detecção de diversas patologias. (BASBAUM, 2009)

Durante algum tempo, a dor foi considerada uma resposta sensorial inseparável à lesão tecidual, na qual as demais dimensões como afetiva, cognitiva e psicológica, eram subestimadas. Porém, ao longo do tempo, avanços a respeito dos mecanismos subjacentes à dor foram observados, trazendo assim sua natureza complexa, inespecífica e multifatorial, entretanto a identificação e o correto tratamento dos processos dolorosos seguem sendo desafiadores. (COSTIGAN e WOOLF, 2000)

Desta forma, a busca por tratamentos eficientes no controle da dor e que possam apresentar menores efeitos colaterais para os pacientes e ainda menores custos, são bastante procurados. Nessa perspectiva, tratamentos à base de compostos advindos de plantas encaixam-se como uma fonte promissora na pesquisa com potencial atividade analgésica. Assim, alguns estudos sugerem a utilização da Artemisinina neste contexto. (OLIVEIRA *et al.*, 2009; RICHARD *et al.* 2013)

Extraída das folhas de *Artemisia Annu*, a Artemisinina é um tipo de lactona sesquiterpênica que possui uma variedade de efeitos farmacológicos importantes incluindo seu uso contra a malária, tumores e inflamação, bem como sua capacidade de melhorar a função imunológica. (RICHARD *et al.* 2013)

Levando em consideração todo contexto complexo que envolve o processo doloroso e seu tratamento, e os possíveis efeitos farmacológicos da Artemisinina na dor, o objetivo do presente estudo foi avaliar o papel da Artemisinina no controle do processo da dor nociceptiva, inflamatória aguda e neuropática em ratos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (*IASP*), a dor se traduz por uma “experiência sensorial e emocional desagradável associada ou relacionada à lesão real ou potencial dos tecidos, ou descrita em tais termos”.

Sabe-se que a experiência da dor física é conhecida por todos, porém, a intensidade, o caráter e a tolerância dela são subjetivos, ou seja, varia de indivíduo para indivíduo. Assim, a percepção e os efeitos físicos causados pela dor podem ser influenciados por fatores sociais, culturais e psicológicos. (WOLKERSTORFER *et al.*, 2016)

Desta forma sensação dolorosa em humanos é determinada pela palavra dor, devido às influências citadas anteriormente, enquanto que o componente fisiológico da dor é chamado nocicepção, o qual se utiliza em animais, pela ausência de comportamento externo. (FERREIRA *et al.*, 2009).

Fisiologicamente falando o processamento doloroso ocorre por meio do sistema nociceptivo, a via na qual os estímulos nocivos são enviados ao cérebro, evidenciando mecanismos periféricos e centrais, como a transdução, transmissão, modulação e percepção, de sinais neurais gerados em resposta a um estímulo nocivo externo. (FERREIRA *et al.*, 2009) (Figura 1)

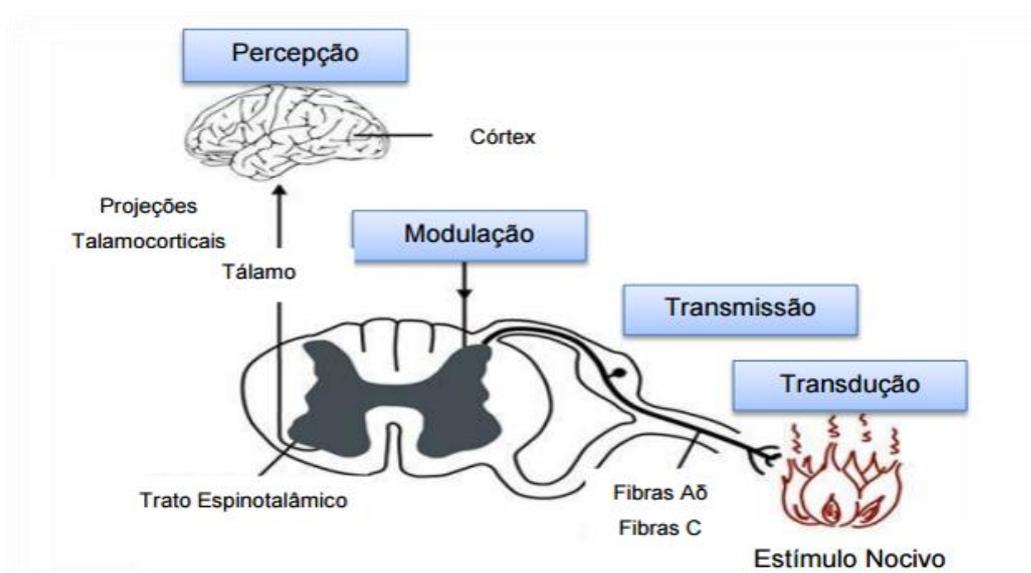


Figura 1: Imagem representativa do sistema nociceptivo. (SILVA, 2013)

Este processamento doloroso ocorre por complexas atividades neuronais dos sistemas nervosos, periférico e central, que são detectados, inicialmente, no sistema somatossensorial. Desta forma, um determinado número de receptores de sinalização recebe a informação externa e compartilham esta informação dolorosa através dos neurônios aferentes primários sendo este processo denominado de transdução nociceptiva. (LEE *et al.*, 2016)

Assim sendo, ocorrem alterações no limiar de transdução no neurônio aferente primário, caracterizado pela sensibilização periférica, que são responsáveis pela zona de hiperalgisia primária na região da injúria tecidual (GARRY *et al.*, 2004). Após ser detectada pelo processo de transdução, a informação dolorosa passa por um processo de transmissão, que ocorre por fibras aferentes primárias do tipo C e A- δ que formam conexões diretas ou indiretas com uma das três populações de neurônios do corno dorsal da medula: interneurônios, subdivididos em excitatórios e inibitórios; neurônios proprioespinais que interconectam vários segmentos da medula espinal; neurônios de projeção que participam da transmissão através da medula espinal até centros supraespinhais superiores onde ocorre a percepção da dor. (KLAUMANN *et al.*, 2008). Esta percepção pode caracterizar a dor, como nociceptiva, inflamatória e neuropática.

A dor nociceptiva pode ser considerada um alarme mediado por neurônios sensoriais não mielinizados (fibras C) ou finamente mielinizados (fibras A δ), que são sensibilizados e alimentam vias nociceptivas do sistema nervoso central (SNC). Esta sensibilização ocorre por um sistema sensorial de detecção de estímulos nocivos mecânicos, térmicos ou químicos. Os estímulos se codificam em impulsos elétricos por terminais nervosos periféricos, ou seja, pelos nociceptores, ocorrendo então a transmissão dolorosa, através das fibras nociceptivas, seguido por modulação e percepção pelo SNC (COSTIGAN *et al.*, 2009; WOLKERSTORFER *et al.*, 2016)

Após a percepção da dor, ocorre a ativação de uma via descendente inibitória, com liberação de noradrenalina e serotonina, caracterizando uma via eficaz e endógena para solucionar a condição dolorosa. (COSTIGAN *et al.*, 2009; WOLKERSTORFER *et al.*, 2016). Assim a dor nociceptiva tem como função a proteção do organismo contra uma lesão tecidual, mediante um estímulo externo potencialmente prejudicial e ainda estímulos internos, caracterizando-a como uma dor aguda e momentânea (TORRES *et al.*, 2006) a qual gera uma resposta previsível ao trauma associada a uma causa identificável que ao ser removida essa dor

consequentemente desaparece. Além disso, responde bem a um possível tratamento por ser caracterizado como uma dor de curta duração. (WOLKERSTORFER *et al.*, 2016)

A manifestação de dor inflamatória ocorre por danos no tecido devido aos estímulos nocivos que podem ser químicos, físicos ou mecânicos, constituindo um desequilíbrio na homeostase, que perturba a integridade do tecido e dispara uma resposta mediada por células efectoras que liberam mediadores químicos e sensibilizam a via periférica. (HARGREAVES; RUPAREL, 2016; KANDEL *et al.*, 2000). Esta sensibilização ocorre quando nociceptores são expostos aos produtos do dano tecidual e da inflamação (cascata inflamatória), como histamina, bradicinina, citocinas e TNF- α . (BASBAUM, 2009)

Além das características periféricas, o quadro inflamatório pode gerar danos sistêmicos, como dor, edema, calor e rubor que podem ser controlados pelo próprio organismo ou por terapias medicamentosas e complementares. Se estas soluções não forem eficientes o quadro pode ser tornar crônico. (KALSO *et al.*, 2004)

Com relação a dor crônica, a mesma é considerada o tipo mais difícil de ser controlado, uma vez que ocorre uma extrapolação da função de reflexo e defesa do organismo, associado à redução da qualidade de vida, morbidades, ansiedade, depressão, entre outros. (DWORKIN *et al.*, 2010)

Dentre os diversos tipos de dor crônica, pode-se destacar a dor neuropática, que resulta de injúrias que acometem o sistema nervoso periférico (SNP) de maneira direta, assim como o sistema nervoso central (SNC), com consequente modificação espinal e central, respectivamente (BARON; BINDER, 2004;). O dano tecidual neuronal leva a um aumento da sensibilidade dos nociceptores, assim como alteração de receptores táteis e proprioceptivos, que passam a perceber uma estimulação inócua como sensação dolorosa (alodinia). Além disso, ocorrem outras alterações no sistema nervoso que geram uma persistência no envio de sinais de dor, de uma forma prejudicial, até se tornar patológica. Isto ocorre pela formação de neuromas que geram aumento na frequência dos potenciais de ação que conduz o influxo sensorial, levando a características dolorosas intensas. (DEVOR, 2006; LIU *et al.*, 2001)

A intensidade da dor, no entanto, não se relaciona com a quantidade de danos e sintomas, pois ela pode persistir por muito tempo, através de danos teciduais, pela injúria antecedente, mesmo que a lesão inicial tenha sido solucionada. (WOLKERSTORFER *et al.*, 2016) Apesar de suas características serem complexas,

os principais sintomas da dor neuropática são: hiperalgesia, decorrente das alterações centrais ou espinhais e a sensibilização continuada dos nociceptores; dor espontânea e alodinia. (BARON; BINDER, 2004; BASBAUM et al., 2009)

Neste tipo de dor, alguns componentes da resposta inflamatória são ativados, gerando a liberação de mediadores e recrutamento de células inflamatórias, como serotonina, substância P, histamina, bradicinina, citocinas, TNF- α , entre outras, para o sítio da lesão. Esta manifestação inflamatória ocorre mediante um processo chamado Degeneração Walleriana, pela lesão nervosa, caracterizado pela remoção de axônios que sofreram decomposição de mielina. (TRACEY; WALKER, 1995). Conseqüentemente, essa liberação de mediadores inflamatórios sensibiliza fibras aferentes primárias, resultando em hiperalgesia na dor neuropática. (SOMMER; KRESS, 2004)

Desta forma, sabendo dos danos causados e de sua complexidade o controle da dor têm se tornado um desafio, necessitando assim de uma melhor compreensão de seus mecanismos e tratamentos mais eficazes.

Neste contexto, encontra-se a Artemisinina, uma lactona sesquiterpênica que possui um grupamento endoperóxido isolada da planta *Artemisia Annu*, popularmente conhecida como absinto ou losna, é uma espécie aromática, herbácea, perene e rizomatosa originária da Europa ou Ásia e muito utilizada na medicina tradicional chinesa onde é reconhecida por seus efeitos analgésicos, antiinflamatórios, antiespasmódicos e anticonvulsivos, sendo empregada também para dispepsia, astenia, epilepsia, dores reumáticas, febres, anemias e como vermífugo. (RICHARD *et al.*, 2013)

Atualmente, a Artemisinina é utilizada na medicina humana para o tratamento da malária (NOBEL MEDICINA, 2015). Estas moléculas são bem toleradas pelos pacientes e são empregues, quando há ocorrência de resistência à antimaláricos tradicionais. (RICHARD *et al.* 2013)

Nos últimos anos, estudos trazem a hipótese que a Artemisinina também pode ser utilizada como fármaco anticancerígeno. Vários estudos revelaram que a Artemisinina inibe o crescimento de muitas células e possui um efeito citotóxico seletivo, uma vez que a Artemisinina é essencialmente não tóxica para células normais. (NAKASE *et al.*, 2008)

Provavelmente, o efeito citotóxico é devido à elevada concentração de receptores de transferrina nas células cancerosas que determina um aumento do

influxo de ferro em comparação com as células normais, (HUNSKAAR *et al.*, 2009) já que seu mecanismo de ação envolve à sua reação com a fonte de ferro celular gerando radicais livres o que leva à destruição celular. (NAKASE *et al.*, 2008)

Com relação a dor, estudos demonstram que a Artemisinina pode diminuir a secreção de citocinas pró inflamatórias derivadas de macrófagos, particularmente de TNF. Ainda trazem sua atuação na inibição do fator de transcrição da ativação de NF- κ B, uma via envolvida na produção de citocinas pró inflamatórias. Além de causar uma queda de TNF-alfa e outras citocinas a partir de macrófagos, a Artemisinina também pode regular negativamente a produção de óxido nítrico (NO), que é vital para reações inflamatórias e imunitárias. (SHAKIR *et al.*, 2011; HOU e HUANG, 2016)

Ainda ZHAO (2007) e YING (2017) sugerem que a Artemisinina pode apresentar uma atividade antiinflamatória e que a mesma seria capaz de inibir a transmissão nociceptiva e assim, aliviar os comportamentos de dor em modelos animais.

Diante do exposto, parece que a Artemisinina pode assumir um potencial terapêutico imunossupressor em reações imunes e inflamatórias. Sugerindo desta forma, diante das diversas aplicações anteriormente citadas, um papel no controle da dor. Entretanto, estudos utilizando a Artemisinina neste contexto ainda são muito escassos o que nos traz a necessidade de investigar melhor seus efeitos.

3. JUSTIFICATIVA

Sabe-se que a dor nos dias atuais constitui um problema de saúde pública e possui um tratamento complexo. Diante disto destaca-se cada vez mais a importância de estudos relacionados a esta questão, em busca de tratamentos resolutivos e que tragam aos indivíduos menores efeitos colaterais e menores custos quando comparados aos tratamentos farmacológicos convencionais. Neste contexto, a Artemisinina possui uma variedade de efeitos farmacológicos potenciais os quais sugerem um papel no controle da dor, o que a torna um importante objeto de estudo, uma vez que a mesma consiste em um derivado de planta e estudos neste âmbito ainda são escassos.

4. OBJETIVOS

Abaixo seguem os objetivos gerais e específicos do estudo.

4.1 Objetivo Geral

O presente estudo teve como objetivo avaliar o papel da Artemisinina, no controle do processo da dor nociceptiva, inflamatória aguda e neuropática em ratos *Wistar*.

4.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos da Artemisinina sobre o limiar térmico no modelo de dor nociceptiva pelo teste de latência de retirada da cauda
- Avaliar os efeitos da Artemisinina sobre o limiar nociceptivo mecânico no modelo de dor inflamatória aguda induzida por administração intraplantar de Adjuvante Completo de Freund (CFA);
- Avaliar os efeitos da Artemisinina sobre o limiar nociceptivo mecânico nos modelos de dor neuropática induzida por "*Chronic Constriction Injury*" (CCI);
- Avaliar os efeitos da Artemisinina sobre o comportamento motor no teste de campo aberto.

5. METODOLOGIA

Abaixo seguem os materiais e métodos utilizados ao longo do trabalho.

5.1 Animais

Foram utilizados 108 ratos machos *Wistar*, com peso de 200 a 250g, provenientes do Biotério Central do Campus da UNIFAL. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Fisioterapia, sendo alocados em caixas com 5 animais em cada, sob condições de temperatura e ciclo claro/escuro controlados, com livre acesso a ração e água até o dia do experimento. Todos os experimentos seguiram as normas de ética estabelecidas para experimentação com animais, recomendadas pela IASP (*International Association for the Study of Pain*) (ZIMMERMANN, 1983) e as normas que regulamentam aspectos éticos da utilização de animais de laboratório elaborados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da UNIFAL, com número de aprovação 056/2016. (ANEXO I)

5.2 Modelos Experimentais

Neste item serão descritos todos os aspectos éticos de experimentação animal, suas características, métodos de avaliação, drogas, via de administração, grupos e o delineamento do estudo.

5.2.1 Modelo de Dor Nociceptiva

No presente modelo de dor, o grau de antinocicepção foi medido pelo teste de

retirada da cauda (D'AMOUR; SMITH, 1941), modificado por Azami et al., (1982) utilizando o Analgesímetro Tail Flick (Marca Scienlabor) (Figura 2). Para realização do teste, primeiramente os animais foram mantidos em uma sala durante 30 minutos para que os mesmos pudessem se ambientar, a qual possuía temperatura controlada de 23°C.

Ao iniciar o teste o animal foi gentilmente imobilizado e a porção da cauda, 2 cm de sua extremidade, foi posicionada sobre o filamento de níquel-cromo (Figura 3) sendo o mesmo aquecido progressivamente (aproximadamente 9°C/segundo) a partir da temperatura ambiente (23°C \pm 1°C) até atingir temperatura nociva (53°C) em aproximadamente 3 segundos.

O aquecimento foi automaticamente interrompido ao alcançar 6 segundos com intuito de se evitar danos teciduais. Desta forma inicialmente os animais foram testados para determinação do limiar basal (B1) para o reflexo de retirada de cauda em três medidas consecutivas realizadas a intervalos de 5 minutos. Após a medida basal foi realizada administração oral de Artemisinina ou Salina e os limiares foram avaliados após 0, 1, 3, 6 e 24h (T0, T1, T3, T6 e T24).

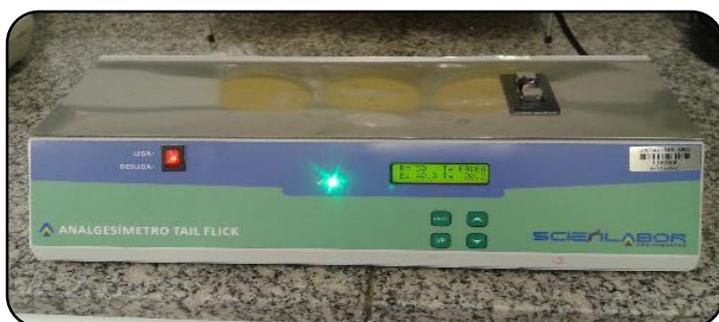


Figura 2 - Analgesímetro *Tail Flick*

Fonte: Autor



Figura 3 – Filamento de níquel-cromo

Fonte: Autor

5.2.2 Modelo de Dor Inflamatória Aguda

Inicialmente os animais foram testados para determinação do limiar basal (B1) de retirada da pata pelo teste de Von Frey Digital. Para realização do modelo de dor inflamatória os animais receberam através de administração intraplantar 100 μ L de Adjuvante Completo de Freund (CFA) (CUNHA *et al.*, 2007). No grupo controle, os animais receberam 100 μ L de Salina via intraplantar.

Quatro horas após a injeção de CFA/Salina (CUNHA *et al.*, 2007), os animais foram testados novamente (B2) e considerados hiperalgésicos quando o limiar de resposta à aplicação de estímulos mecânicos correspondeu à pelo menos, 50% do limiar de resposta basal. Após, os animais receberam administração oral de Artemisinina ou Salina e o limiar nociceptivo mecânico foi avaliado após 0, 1, 3, 6 e 24h (T0, T1, T3, T6 e T24).

5.2.3 Modelo de Dor Neuropática

Antes da indução do modelo de dor neuropática, os animais foram testados para determinação do limiar basal (B1) de retirada da pata pelo teste de *Von Frey* Digital. Foi utilizado o modelo experimental de neuropatia por lesão de Constricção Crônica do nervo Isquiático (CCI), a qual consiste na amarração do nervo isquiático em quatro pontos e constrição crônica deste nervo (BENNET; XIE, 1988). Antes da cirurgia os animais foram anestesiados com isoflurano a 2% por via inalatória. O nervo

isquiático foi exposto na região abaixo do glúteo (Figura 4) e ligado com quatro amarrações com fio de seda separados por 2 mm (Figura 5). A musculatura e a pele sobre os nervos foram suturadas com padrão de 3 amarrações (Figura 6). Nas cirurgias do grupo falso operados (*Sham*), o nervo isquiático foi exposto, mas não amarrado. A musculatura e a pele sobre o nervo foram suturadas, com padrão de 3 amarrações. Por fim, os animais foram mantidos sob aquecimento para prevenir a hipotermia e, em seguida, recolocados no biotério de manutenção.

Três dias após o procedimento, os animais foram testados (B2) e considerados sensibilizados quando o limiar de resposta à aplicação de estímulos mecânicos no teste de *Von Frey* digital correspondeu a, pelo menos, 50% do limiar de resposta basal. Após, os animais receberam administração oral de Artemisinina ou Salina e o limiar nociceptivo mecânico foi avaliado após 0, 1, 3, 6 e 24h (T0, T1, T3, T6 e T24).



Figura 4 - Nervo isquiático exposto.

Fonte: autor



Figura 5 - Ligadura do Nervo Isquiático

Fonte: autor



Figura 6 - Sutura da Pele

Fonte: autor

5.2.4 Testes de nocicepção mecânica por Von Frey digital

Para realizar os testes de nocicepção, inicialmente, os animais foram alocados em caixas de acrílico sobre uma tela de arame que proporcionava acesso à pata desses animais, em uma sala silenciosa o qual o ambiente foi controlado, sendo a temperatura de 23°C, 30 minutos antes da estimulação, para ambientação dos animais ao local. O teste foi realizado pelo aparelho *Von Frey* digital (Marca Insigth), por meio de uma ponteira descartável de polipropileno com 0.5 mm de diâmetro adaptada a este, o aplicador então realizou uma pressão linearmente crescente no centro da planta direita do animal, até que o mesmo demonstrasse comportamento nociceptivo, caracterizado pela retirada da pata, lambida da mesma e/ou “*flinch*”. Nesse método, foram realizadas 6 avaliações, com intervalos de 10 segundos e assim realizou-se a média, por animal. (FARGHALY *et al.*, 2016)

5.2.5 Teste do campo aberto

Para retirarmos possíveis viés quanto a influência da Artemisinina no comportamento motor dos animais, o qual poderia gerar alterações nas respostas dos demais testes utilizados, aplicamos o teste de campo aberto, o mesmo, foi realizado utilizando uma caixa de plástico retangular aberta (80 × 80 × 40 cm), em uma sala escura, com exceção das luzes dentro da caixa que usavam para captura de vídeo, e com a temperatura controlada em 23°C. Trinta minutos antes da aplicação do teste foi realizada administração oral de Artemisinina ou Salina. Desta forma os animais foram colocados individualmente no centro do campo e foi permitido explorar a área livremente por 5 min. A atividade dos ratos foi registrada por uma câmera pendente, a qual gravou todas as faixas do movimento dos mesmos. Entre cada experimento, a arena foi limpa com álcool 30%. (YANG, 2017) Ao final, a distância total percorrida e o tempo de imobilidade de cada animal foram contabilizados utilizando o *software Ethovision 6.0* e os dados foram analisados.

5.2.6 Drogas e Administração

Artemisinina 98% (Sigma – Aldrich) diluída em Cloreto de Sódio, estéril, 0,9%. A dose foi definida através da indicação da Organização Mundial da Saúde (OMS) para tratamento da malária, sendo ela de 3,0 mg/kg, entretanto foi realizado uma curva dose efeito para observarmos sua atuação em menores doses, sendo 0,03 mg/kg; 0,3 mg/kg e 3,0 mg/kg, em dose única, via oral.

Para realizar a administração da droga, todos os animais foram mantidos em jejum alimentar overnight (aproximadamente 12hs), sem restrição de água. Foi utilizada uma seringa com agulha de gavagem apropriada para ratos.

5.2.7 Grupos experimentais

- ✓ Tail Flick
 - Tail Flick + Salina (n=6)
 - Tail Flick + Artemisinina (0,03 mg/kg) (n=6)
 - Tail Flick + Artemisinina (0,3 mg/kg) (n=6)
 - Tail Flick + Artemisinina (3,0 mg/kg) (n=6)

- ✓ CFA
 - Salina + Salina (n=6)
 - CFA + Salina (n=6)
 - CFA + Artemisinina (0,03 mg/kg) (n=6)
 - CFA + Artemisinina (0,3 mg/kg) (n=6)
 - CFA + Artemisinina (3,0 mg/kg) (n=6)

- ✓ CCI
 - Sham + Salina (n=6)
 - CCI + Salina (n=6)
 - CCI + Artemisinina (0,03 mg/kg) (n=6)

- CCI + Artemisinina (0,3 mg/kg) (n=6)
 - CCI + Artemisinina (3,0 mg/kg) (n=6)
- ✓ Campo Aberto
- CA + Salina (n=6)
 - CA + Artemisinina (0,03 mg/kg) (n=6)
 - CA + Artemisinina (0,3 mg/kg) (n=6)
 - CA + Artemisinina (3,0 mg/kg) (n=6)

5.2.8 Delineamento do estudo

Para o grau nociceptivo de latência de retirada da cauda, através do analgésímetro *Tail-Flick*, no modelo de dor nociceptiva, foi realizada inicialmente uma medida basal (B1) e em seguida 0, 1, 3, 6 e 24 horas após a administração da droga/salina via oral (T0, T1, T3, T6, T24) (Figura 7).

No modelo de dor inflamatória, os animais tiveram seus limiares nociceptivos de retirada da pata avaliados pelo Von Frey digital, antes da indução de dor, por meio da administração de CFA/Salina (B1), após 4 horas (B2) e 0, 1, 3, 6 e 24 horas após a administração da droga/salina via oral (T0, T1, T3, T6 e T24).

Para o modelo de dor neuropática foi utilizado o mesmo método de avaliação, entretanto a medida para avaliar a indução de dor foi realizada 72 horas após a CCI/Sham (B2) (Figura 8). Em todos modelos de indução de dor, a avaliação no tempo 0h (T0) se refere a 15 minutos após a administração da droga, devido ao tempo gasto para a manipulação dos animais.

Na realização do teste de campo aberto, os animais foram inicialmente tratados com droga/salina e após 30 minutos realizado o teste. (Figura 9)

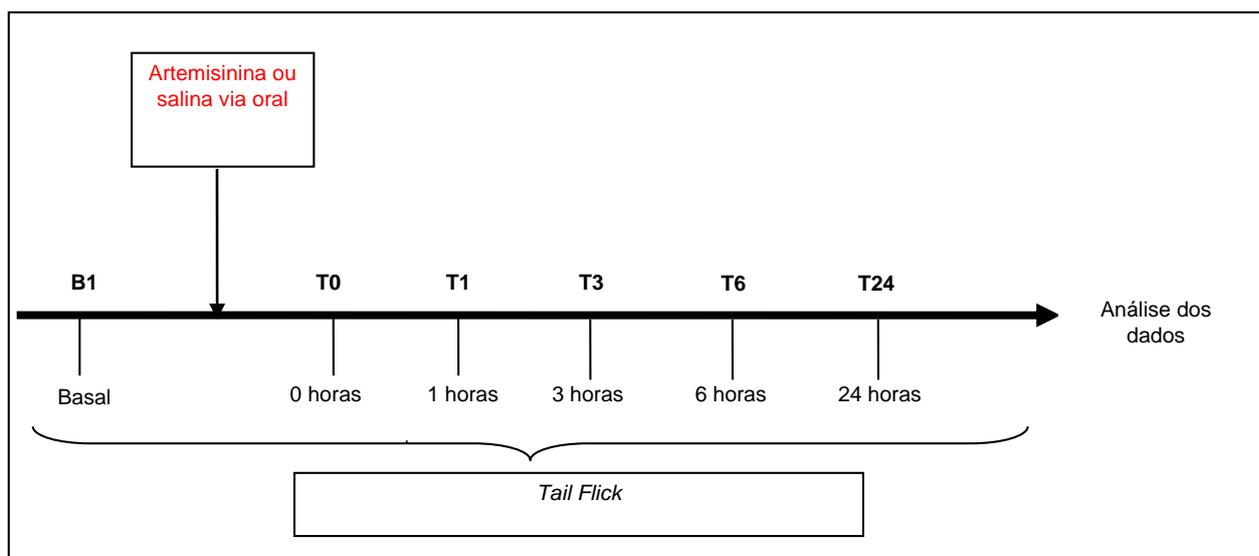


Figura 7 - Delineamento experimental - Dor Nociceptiva

Fonte: autor

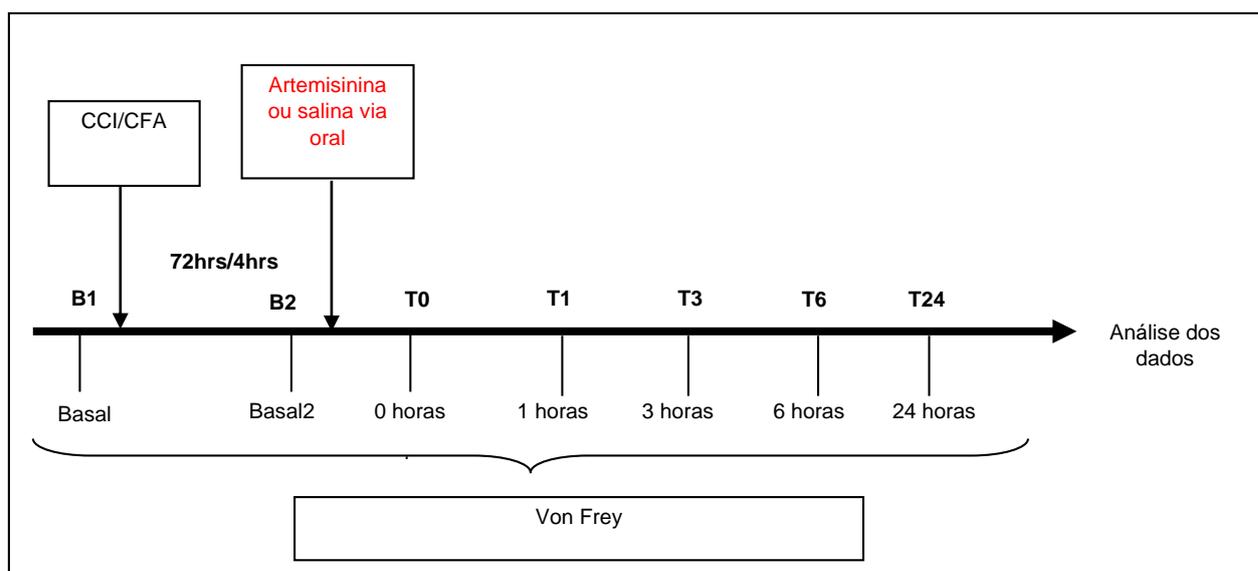


Figura 8 - Delineamento experimental - Dor neuropática e inflamatória.

Fonte: autor

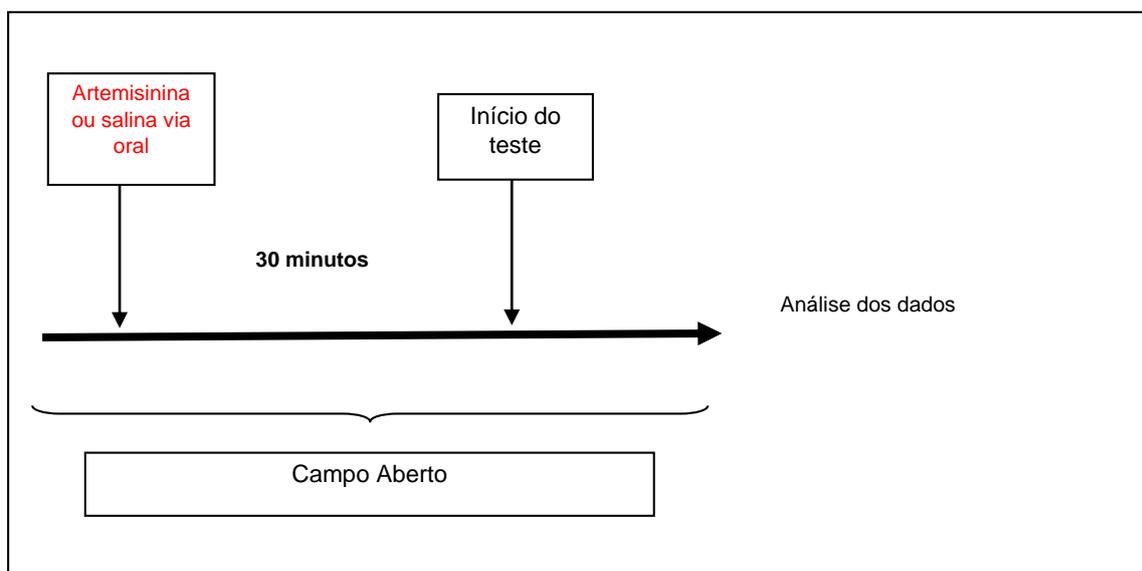


Figura 9 - Delineamento experimental - Campo aberto.

Fonte: autor

5.2.9 Análise Estatística

OS resultados comportamentais foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de 6 animais por grupo, sendo grupos independentes. A análise dos resultados foi feita pelo teste de análise de variância de dois *TWO-WAY ANOVA*. As comparações post-hoc foram realizadas com o teste de Bonferroni usando o *Software Prisma*. O nível de significância foi de $P < 0,05$.

6. RESULTADOS

Os efeitos da administração de Artemisinina no modelo de dor nociceptiva encontram-se demonstrados no gráfico 1, através do limiar de latência (s) avaliado pelo teste de retirada da cauda, nos grupos tratados com salina ou Artemisinina, sendo esta em três diferentes doses, 0,03 mg/kg ou 0,3 mg/kg ou 3,0 mg/kg. A avaliação de retirada da cauda foi realizada antes da administração de salina ou Artemisinina (B1), e após 0, 1, 3, 6 e 24 horas da administração (T0, T1, T3, T6 e T24).

Os resultados demonstram que o grupo tratado com salina, ou seja, o grupo controle, não apresentou alterações quanto ao limiar de latência (s) ao longo das avaliações. Enquanto o grupo tratado com Artemisinina na dose de 0,03mg/kg apresentou aumento no limiar nos tempos 3, 6 e 24 horas pós tratamento quando comparado ao grupo controle.

O grupo tratado com Artemisinina na dose de 0,3mg/kg apresentou aumento significativo no limiar de latência quando comparado ao controle nos tempos 3 e 6 horas pós tratamento. Por fim, o grupo tratado com Artemisinina na dose de 3mg/kg apresentou aumento no limiar de latência em todos os tempos de avaliação (0,1,3,6 e 24horas), quando comparado ao controle, sendo ainda, mais eficaz que as demais doses nos tempos 6 e 24hs.

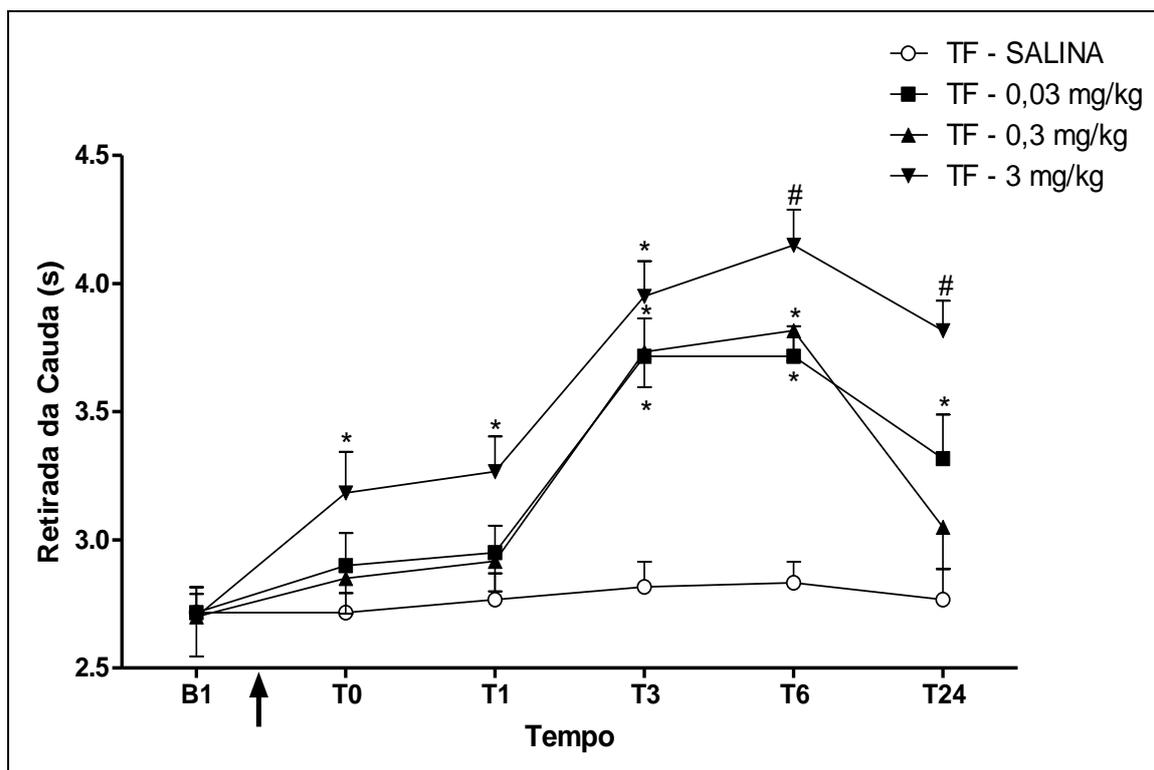


Gráfico 1: Limiar de latência (s) avaliado pelo teste de retirada da cauda, no efeito da Artemisinina nas doses 0,03 mg/kg; 0,3 mg/kg e 3,0 mg/kg, sobre a dor nociceptiva.

Nota: A análise estatística foi realizada utilizando-se *one-way* ANOVA seguido de *Bonferroni post hoc test* com interação em relação ao tempo ($F_{5,90} = 326.61$, $p < 0,001$) tratamento ($F_{3,120} = 189.32$, $p < 0,001$) e tratamento x tempo ($F_{15,90} = 19.83$, $p < 0,001$).

Seta se refere à administração oral; * Denota uma diferença significativa em relação ao grupo controle (TF/SALINA); # Denota uma diferença em relação aos demais tratamentos utilizados, e ao grupo TF/SALINA. Cada ponto representa a média (\pm S.E.M.) de 6 animais.

Fonte: autor.

Os efeitos da administração da Artemisinina no modelo de dor inflamatória aguda encontram-se demonstrados no gráfico 2, através do limiar mecânico (g), avaliado pelo teste de *Von Frey* digital, nos grupos tratados com salina ou Artemisinina, em três diferentes doses, 0,03 mg/kg ou 0,3 mg/kg ou 3,0 mg/kg.

A avaliação do limiar mecânico foi realizada antes da indução de dor por CFA (B1), 4 horas após a indução (B2) e 0, 1, 3, 6 e 24 horas (T0, T1, T3, T6 e T24) após administração de salina ou Artemisinina.

Os resultados demonstram que o grupo SAL/SAL, ou seja, o grupo controle geral, não apresentou alteração no limiar mecânico em nenhum tempo de avaliação. Enquanto o grupo CFA/SAL, ou seja, o grupo controle da droga, apresentou seu limiar diminuído após a indução de dor (B2) que se prolongou até as 24 horas.

Os demais grupos, aqueles tratados com Artemisinina nas doses 0,03 mg/kg; 0,3 mg/kg; 3,0 mg/kg apresentaram diminuição do limiar mecânico após a indução de dor (B2), o que foi revertido em partes pela administração da droga, observado pelo aumento do limiar mecânico de todos os grupos em todos tempos de avaliação 0, 1, 3, 6 e 24 horas, pós tratamento.

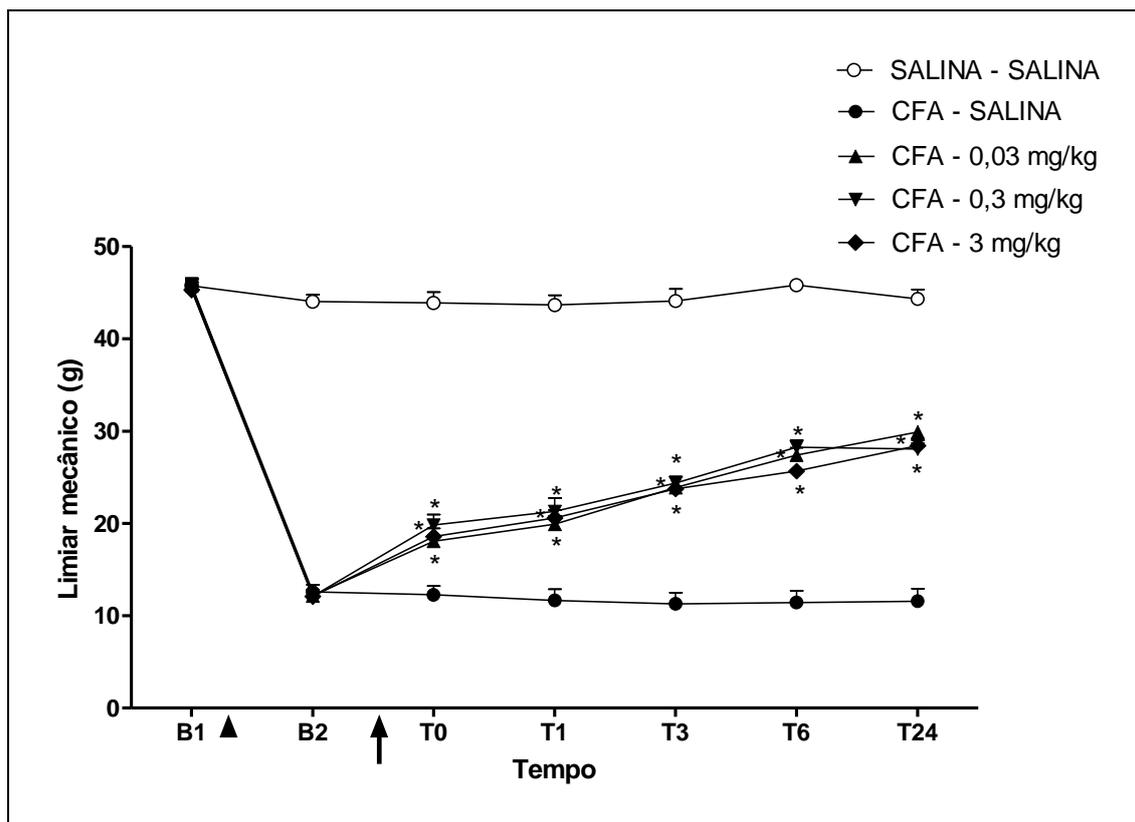


Gráfico 2: Limiar nociceptivo (g) avaliado pelo teste de *Von Frey* digital no efeito da Artemisinina nas doses 0,03 mg/kg; 0,3 mg/kg e 3,0 mg/kg, sobre a dor inflamatória aguda

Nota: A análise estatística foi realizada utilizando-se one-way ANOVA seguido de *Bonferroni post hoc tests*, com interação em relação ao tempo ($F_{6,175} = 2877.76$, $p < 0,001$), tratamento ($F_{4,175} = 5623.27$, $p < 0,001$) e tratamento x tempo ($F_{24,175} = 230.47$, $p < 0,001$).

Cabeça de Seta se refere à indução pelo CFA; Seta se refere à administração oral;

* Denota uma diferença significativa em relação ao grupo controle (CFA/SALINA). Cada ponto representa a média (\pm S.E.M.) de 6 animais.

Fonte: autor.

Os efeitos da administração da Artemisinina no modelo de dor neuropática encontram-se demonstrados no gráfico 3, através do limiar mecânico (g), avaliado pelo teste de *Von Frey* digital, nos grupos tratados com salina ou Artemisinina, em três diferentes doses, 0,03 mg/kg ou 0,3 mg/kg ou 3,0 mg/kg.

A avaliação do limiar mecânico foi realizada antes da indução de dor pela cirurgia de CCI (B1), e 72 horas após a indução (B2) e 0, 1, 3, 6 e 24 horas (T0, T1, T3, T6 e T24) após administração de salina ou Artemisinina.

Os resultados demonstram que o grupo Sham/SAL, ou seja, o grupo controle geral, não apresentou alteração no limiar mecânico em nenhum tempo de avaliação. Enquanto o grupo CCI/SAL, ou seja, o grupo controle da droga, apresentou seu limiar diminuído após a indução de dor (B2) que se prolongou até as 24 horas.

Quanto aos grupos tratados com Artemisinina nas doses 0,03 mg/kg; 0,3 mg/kg; 3,0 mg/kg todos apresentaram diminuição do limiar mecânico após a indução de dor (B2), o que foi revertido em partes pela administração da droga, observado pelo aumento do limiar mecânico de todos os grupos em todos tempos de avaliação 0, 1, 3, 6 e 24 horas, pós tratamento, exceto para o grupo 0,03mg/kg no tempo 0 horas, o qual não apresentou diferença significativa.

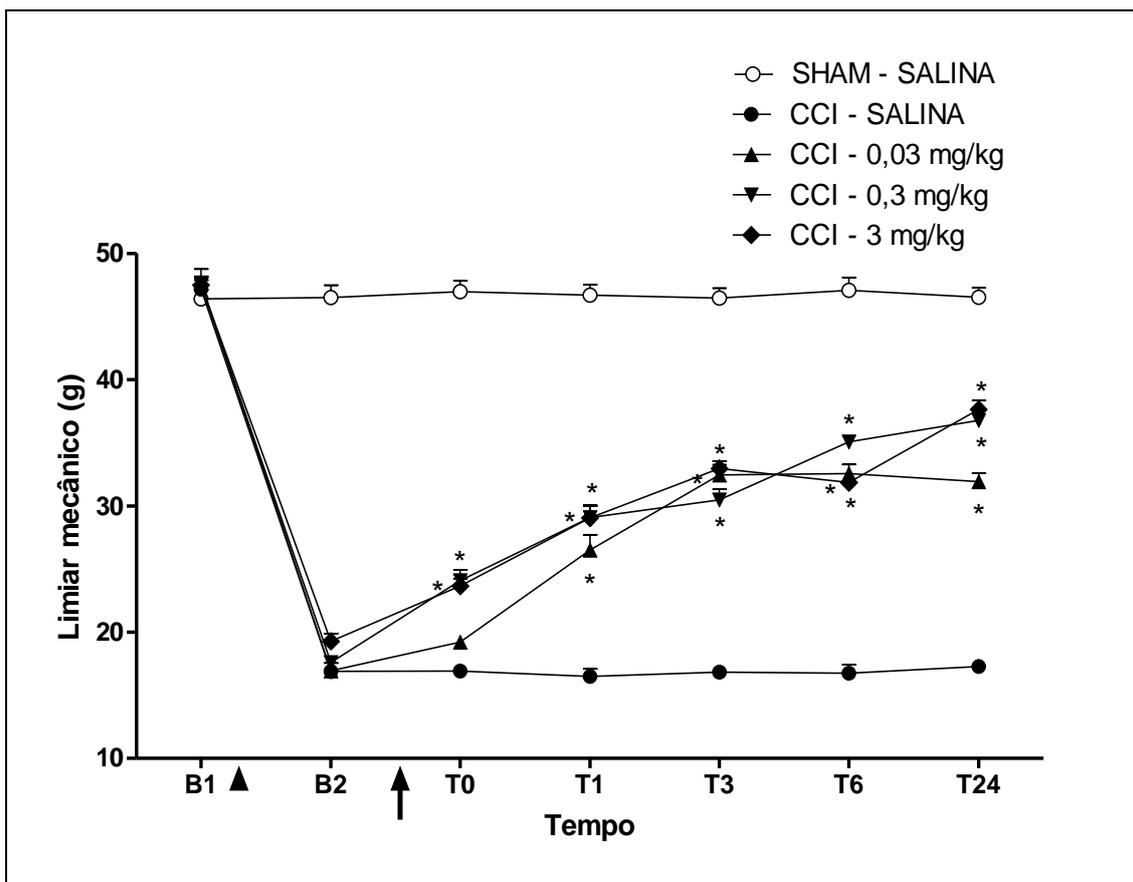


Gráfico 3: Limiar nociceptivo (g) avaliado pelo teste de *Von Frey* digital no efeito da Artemisinina nas doses 0,03 mg/kg; 0,3 mg/kg e 3,0 mg/kg, sobre a dor neuropática

Nota: A análise estatística foi realizada utilizando-se *one-way* ANOVA seguido de *Bonferroni post hoc tests*, com interação em relação ao tempo ($F_{6,140} = 2655.24$, $p < 0,001$) tratamento ($F_{4,140} = 7198.24$, $p < 0,001$), e tratamento x tempo ($F_{24,120} = 369.87$, $p < 0,001$).

Cabeça de Seta se refere à da CCI; Seta se refere à administração oral; * Denota uma diferença significativa em relação ao grupo controle (CCI/SALINA). Cada ponto representa a média (\pm S.E.M.) de 6 animais.

Fonte: autor.

No gráfico 4 podemos observar a distância percorrida e o tempo de imobilidade avaliado pelo teste de campo aberto nos grupos que receberam via oral em dose única Artemisinina em três diferentes doses (0,03 mg/kg ou 0,3 mg/kg ou 3,0 mg/kg) ou salina (SAL). O qual demonstra que não houve diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle, tanto para a distância percorrida como para o tempo de imobilidade.

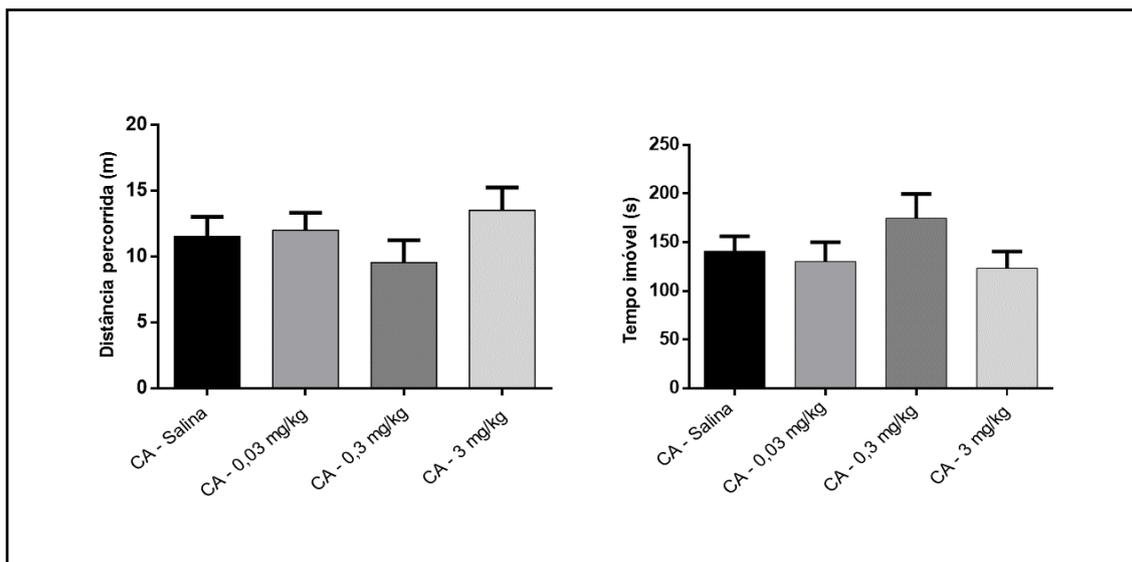


Gráfico 4 - Efeito da Artemisinina nas doses 0,03 mg/kg; 0,3 mg/kg e 3,0 mg/kg na distância percorrida e tempo de imobilidade, avaliado pelo teste de campo aberto.

Fonte: autor.

7. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que a administração de Artemisinina nas doses 0,03 mg/kg; 0,3 mg/kg e 3,0 mg/kg proporciona efeitos anti-nociceptivos em ratos no teste de latência de retirada da cauda, observado pelo aumento do limiar de latência dos animais tratados com a droga, quando comparados ao grupo salina. Entretanto este efeito apresentou diferença entre as doses, o qual a maior dose, ou seja de 3,0 mg/kg foi mais eficaz quando comparada ao grupo salina e as demais doses, perdurando deste a administração até as próximas 24hs, enquanto as menores doses não foram capazes de alterar o teste até as 3hs pós tratamento.

O teste de latência de retirada da cauda é amplamente utilizado para identificar a atividade de diversos medicamentos, inclusive de compostos presentes em extratos vegetais ou isolados a partir desses, além dos medicamentos sintéticos. (Oliveira et al., 2008) Este ensaio experimental consiste na aplicação de calor na cauda do animal como estímulo nociceptivo térmico, provocando o movimento de retirada da mesma. (Oliveira et al., 2009)

Quando há um aumento no tempo de retirada da cauda geralmente é considerado como um parâmetro importante para avaliar a atividade antinociceptiva central. Sendo assim, substâncias que atuam em nível central, como a morfina, são capazes de suprimir respostas de neurônios espinhais ao estímulo térmico nocivo na cauda, aumentando o tempo de latência (Fischer et al., 2008).

Resultados como estes utilizando a Artemisinina na dor nociceptiva até o momento não foram demonstrados na literatura. Entretanto, o estudo de Ying *et al.*, em 2017 talvez possa explicar o possível mecanismo de ação da droga neste modelo de dor, o qual traz a atuação da Artemisinina nos receptores P2X₄ em modelos de dor neuropática. Sabe-se que esses são receptores purinérgicos e expressos em neurônios e glia, participando do processo de sinalização entre essas células e envolvidos na transmissão nociceptiva. Desta forma, pode-se sugerir um possível mecanismo de ação, com atuação a nível central, para o controle da dor nociceptiva. Entretanto, demais estudos acerca desta premissa são importantes para a real definição da atuação da Artemisinina neste modelo de dor.

Outro resultado que se pode se observar, foi o efeito antinociceptivo da Artemisinina no modelo de dor inflamatória aguda, demonstrado através do aumento do limiar mecânico após o tratamento, em todas as doses aplicadas.

Para indução da dor inflamatória aguda, foi utilizado um modelo amplamente usual, que consiste na administração intraplantar de CFA, causando uma cascata inflamatória. Sabemos que o processo dessa dor é estabelecido pela liberação de diversos mediadores inflamatórios locais após a lesão tecidual entre eles bradicinina, prostaglandinas, e TNF-alfa, que estimulam diretamente e causam a sensibilização dos nociceptores. (JI *et al.*, 2014)

A atuação da Artemisinina sobre a diminuição da secreção de citocinas pró inflamatórias, particularmente de TNF-alfa já havia sido descrito na literatura por SHAKIR *et al.*, 2011; HOU e HUANG, 2016, os quais observaram que além de diminuir essas citocinas, a Artemisinina também poderia regular negativamente a produção de óxido nítrico (NO) e ainda inibir o fator de transcrição da ativação de NF-kB, o qual é essencial em processos inflamatórios. Ainda neste contexto ZHAO (2007) observou o poder anti-inflamatório da Artemisinina em ratos que sofriam de pancreatite aguda.

Desta forma, os dados encontrados na literatura vão de encontro com os resultados do presente trabalho, onde a Artemisinina demonstrou seu efeito antinociceptivo, ainda, sugere-se assim que a mesma possa ter um efeito sobre as alterações locais causadas neste modelo de dor, ou seja, que a mesma é capaz de atuar diminuindo liberação de citocinas pró inflamatórias importantes para o processo desta dor.

Outro resultado demonstrado no presente estudo foi quanto ao modelo de dor neuropática, induzido pelo modelo de “*Chronic Constriction Injury*” (CCI), que consiste em uma amarração do nervo ciático, em quatro pontos, para simular uma hérnia discal, com conseqüente efeito hiperalgésico, modelo que foi descrito por BENNET e XIE em 1988, o qual os animais tratados com a Artemisinina apresentaram um aumento no limiar mecânico, avaliado pelo *Von Frey* digital, não havendo relação dose-resposta.

Na literatura os resultados Ying *et al.*, em 2017, corrobora com os do presente estudo, onde traz o efeito antinociceptivo da Artemisinina na dor neuropática em ratos e delineou seu possível mecanismo neste modelo de dor, induzido pela CCI e sugeriu que a Artemisinina poderia inibir a transmissão nociceptiva mediada por receptores

P2X₄ que estão envolvidos especialmente na dor crônica e desta forma aliviar os comportamentos de dor nos ratos.

Por fim, os resultados apresentados demonstraram que a Artemisinina nas doses utilizadas, não foi capaz de gerar alteração na resposta motora dos animais tratados, observado pelo teste do campo aberto, que, se houvesse, poderia influenciar nas demais respostas obtidas no presente estudo.

Diante do exposto, pode-se sugerir um duplo papel da Artemisinina, ou seja, que a mesma possa ter um efeito tanto central quanto periférico de acordo com cada tipo de dor, o que a torna uma fonte promissora na pesquisa com potencial atividade analgésica. Ainda, devido ao fato de ser um composto natural, a mesma pode trazer diversos benefícios para a população.

8. CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados podemos concluir que a Artemisinina alivia os comportamentos de dor nos ratos submetidos aos modelos de dor nociceptiva, inflamatória aguda e neuropática e que a mesma não gera alterações motores capazes de interferir nos testes utilizados. Sugerindo desta forma que a Artemisinina possa ser um potencial terapêutico em condições dolorosas, uma vez que se trata de um composto advindo de planta o que pode apresentar menores efeitos colaterais e custos para a população geral. Entretanto sugere-se maiores investigações acerca do seu mecanismo de ação e vias envolvidas neste processo.

REFERÊNCIAS

AZAMI, J.; LLEWELYN, M.B.; ROBERTS, M.H. The contribution of nucleus reticularis paragigantocellularis and nucleus raphe magnus to the analgesia produced by systemically administered morphine, investigated with the microinjection technique. **Pain**, v. 12, p. :229–246, 1982.

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

BARON, R.; BINDER, A. How neuropathic is sciatica? The mixed pain concept. **Orthopade**, v. 33, p. 568-575, 2004.

BENNETT, G.J.; XIE, Y.K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, v. 33, p. 87-107, 1988.

BUOMMINO, E.; BARONI, A.; CANOZO, N.; PETRAZZUOLO, M.; NICOLETTI, R.; VOZZA, A.; TUFANO, M.A. Artemisinin reduces human melanoma cell migration by down-regulating $\alpha V\beta 3$ integrin and reducing metalloproteinase 2 production. **Invest New Drugs**, v. 27, p. 412–418, 2009.

CATERINA, M.J.; JULIUS, D. The Vanilloid Receptor: A Molecular Gateway to the Pain Pathway Annu. **Rev. Neurosci**, v. 24, p. 487–517, 2001.

COSTIGAN M.; SCHOLZ J.; WOOLF J.C. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. **Rev Neurosci**, n.32, p. 1–32, 2009.

CUNHA, T.M.; VERRI, J.R.; POOLE, S.; PARADA, C.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H.; Pain facilitation by proinflammatory cytokine actions at peripheral nerve terminals. **Immune and Glial Regulation of Pain**, p. 67–83, 2007.

D'AMOUR, F.E.; SMITH, D.L. A method for determining loss of pain sensation. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 72, p. 74-79, 1941.

DWORKIN, R. H. *et al.* Recommendations for the pharmacological management of neuropathic pain: an overview and literature update. **Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic**, v. 85, p. S3–S14, 2010.

FARGHALY, H.S.M., MAHMOUD, A.M., ABDEL-SATER, K.A. Effect of dexmedetomidine and cold stress in a rat model of neuropathic pain: Role of interleukin-6 and tumor necrosis factor- α . **European Journal of Pharmacology**, 2016.

FERREIRA, S.H. *et al.* **Dor Inflamatória**. In *Dor - Princípio e prática*. São Paulo: Artmed, 2009.

FISCHER, L.G., SANTOS D., SERAFIN C., MALHEIROS A., DELLEMONACHE F., DELLE-MONACHE G., CECHINEL-FILHO V., SOUSA M.M. Further antinociceptive properties of extracts and phenolic compounds from *Plinia glomerata* (Myrtaceae) leaves. **Biol Pharm Bull**, v. 31, n.2, p. 235 – 239, 2008.

FOROUD, M.; VESAL, N. Evaluation of the anti-nociceptive effects of morphine, tramadol, meloxicam and their combinations using the tail-flick test in rats **Veterinary Research Forum**, v. 6 n. 4, p. 313 – 318, 2015.

GARRY, E.M.; JONES, E.; FLEETWOOD-WALKER, S.M. Nociception in vertebrates: key receptor participating in spinal mechanisms of chronic pain in animals. **Brain Research Reviews**, v. 46, n. 2, p. 216-224, 2004.

HARGREAVES, K. M.; RUPAREL, S. Role of Oxidized Lipids and TRP Channels in Orofacial Pain and Inflammation. **Journal of Dental Research**, 2016.

HOU L.; HUANG H. Immune suppressive properties of artemisinin family drugs. **Pharmacology & Therapeutics**, v.166, p. 123-127, 2016.

HUNSKAAR S. & HOLE K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 30(1): 103 – 14, 1987.

JI R.R.; XU Z.Z.; GAO Y.J. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. **Nat Rev Drug Discov**, v. 13, n. 7, p 533–548, 2014.

KALSO, E. *et al.*, Opioids in chronic non-cancer pain: systematic review of efficacy and safety. **Pain**, v. 112, n. 3, p. 372–380, 2004.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M. Principles of Neural Science, **McGraw-Hill Medical**, 4th edition, 2000.

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

LEE J.S.; HAN J.S.; LEE K.; BANG J.; LEE, H. The peripheral and central mechanisms underlying itch. **BMB Rep**, 2016.

LIU H.; MANTYH P.W.; BASBAUM A.I. NMDA-receptor regulation of substance P release from primary afferent nociceptors. **Nature**, v.386, p, 721-724, 1997.

LIU C.N.; RABER P.; ZIV-SEFER S.; DEVOR M. Hyperexcitability in sensory neurons of rats selected for high versus low neuropathic pain phenotype.

Neuroscience, v. 105, p. 265-75, 2001.

NAKASE I. A.C.; HENRY L.B.; NARENDRA P.; SINGH B.; TOMIKAZU S. Anticancer properties of artemisinin derivatives and their targeted delivery by transferrin conjugation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 354 p. 28–33, 2008.

OLIVEIRA F.S., SOUSA D.P., ALMEIDA R.N. Antinociceptive effect of hydroxydihydrocarvone. **Biol Pharm Bull**, v. 31, n. 4, p. 588 – 591, 2008.

OLIVEIRA M.I.; CASTRO E.M.; COSTA L.C.B.; OLIVEIRA C. Características biométricas, anatômicas e fisiológicas de *Artemisia vulgaris* L. cultivada sob telas coloridas. **Rev. Bras. Pl. Med**, v.11, n.1, p. 56-62, 2009.

RICHARD K.; HAYNE S.; KWAN-WING C.; DAVID N.; PAOLO C.; DIEGO M. Considerations on the Mechanism of Action of Artemisinin Antimalarials: Part 1 - The 'Carbon Radical' and 'Heme' Hypotheses. **Infectious Disorders – Drug Targets**, v.13, p. 217-277. 2013.

SILVA J.C.; SARAIVA S.R.G.L; JÚNIOR R.G.O.; ALMEIDA J.R.G.S. Experimental models for evaluation of antinociceptive activity of natural products: a review. **Rev. Bras. Farm.** v. 94, n.1, p. 18-23, 2013.

SHAKIR L.; HUSSAIN M.; JAVEED A.; ASHRAF M.; RIAZ A. Artemisinins and immune system. **European Journal of Pharmacology**, v. 668, p. 6-14, 2011.

SOMMER C.; KRESS M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: Peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia.

Neurosci Lett, v.6, p.184-7, 2004.

TRACEY D.J.; WALKER J.S.; Pain due to nerve damage: are inflammatory mediators involved? **Inflamm Res**, v. 44, p. 407-411, 1995.

TORRES L.; DUNLOP D.D.; PETERFY C.; GUERMAZI A.; PRASAD P. The relationship between specific tissue lesions and pain severity in persons with knee osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 14, p. 1033–40, 2006.

WOLKERSTORFER A.; HANDLER N.; BUSCHMANN H. New approaches to treating pain. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, p. 1103–1119, 2016.

YANG Y.; HU Z.; DU X.; DAVIES H.; HUO X.; Fang M. miR-16 and Fluoxetine Both Reverse Autophagic and Apoptotic Change in Chronic Unpredictable Mild Stress Model Rats. **Front. Neuroscience**, 2017.

YING M. *et. al.* Effect of artemisinin on neuropathic pain mediated by the P2X4 receptor in the dorsal root ganglia. **Neurochem Int**, v. 108, p. 27-33, 2017.

ZIMMERMANN M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v.16, p 109-110,1983.

ZHAO M.; XUE D.B.; ZHENG B.; ZHANG W.H.; PAN S.H.; SUN B. Induction of apoptosis by artemisinin relieving the severity of inflammation in caerulein-induced acute pancreatitis. **World J. Gastroenterol**, v.13, p. 5612-5617, 2007.

ANEXO I - Comitê de ética em experimentação animal



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG
 Rua General Monteiro da Silva, 150. Alfenas/MG CEP 37130-000
 Fone: (35) 3299-1000 Fax: (35) 3299-1903

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "O efeito da Artemisinina no controle da dor fásica, inflamatória aguda e neuropática em ratos", registrada com o nº 58/2016, sob a responsabilidade de Marcelo Lourenço da Silva, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS, em reunião de 28/11/2016.

| Finalidade | () Ensino | (X) Pesquisa científica |
|-------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Vigência da autorização | De 28/11/2016 a 01/02/2018 | |
| Espécie/inhagem/raça | Rato Wistar / heterogénico | |
| Nº de animais | 150 | |
| Sexo | Macho | |
| Origem | Biotério Central da UNIFAL | |

Alfenas, 30 de novembro de 2016.

Estela Regina de Oliveira
 Prof.ª Dr.ª Estela Regina de Oliveira
 Coordenadora CEUA-UNIFAL