



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA



**EFICÁCIA ANTI-HIPERALGÉSICA DA *Tabebuia aurea* EM  
CAMUNDONGOS INOCULADOS COM A PEÇONHA DE *Bothrops  
mattogrossensis***

CAMPO GRANDE-MS

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

EFICÁCIA ANTI-HIPERALGÉSICA DA *Tabebuia aurea* EM  
CAMUNDONGOS INOCULADOS COM A PEÇONHA DE *Bothrops*  
*mattogrossensis*

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-graduação em Farmácia da  
Universidade Federal de Mato Grosso do  
Sul como requisito necessário para a  
obtenção do título de Mestre em Farmácia.

Aluno: Kauê Franco Malange

Orientador: Prof. Dr. Eric Schmidt Rondon

CAMPO GRANDE-MS

2017

## **Dedicatória**

A Deus, pela vida, fé e perseverança em minha jornada.

Aos meus pais, Fernando e Denizi, e minha irmã, Tayná, pelo amor incondicional. Amo vocês!

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Eric. Professor, pela amizade, orientação e disposição para execução deste trabalho. Foi uma satisfação poder ter sido teu aluno, e é com gratidão que chego ao final desta etapa, grande abraço!

Ao professor Carlos Parada. Professor, obrigado pela sua amizade, por ter me aberto as portas de seu laboratório e disponibilizado toda infraestrutura necessária para execução deste trabalho. Forte abraço!

A professora Mônica. Pela nossa amizade e por ter sido minha mentora para a vida acadêmica e científica. Grande abraço querida!

Aos professores Cesar e Cláudia do Laboratório de Estudos da Dor. Obrigado por contribuírem para minha formação acadêmico-científica durante as reuniões de laboratório. Grande abraço!

Aos professores dos programas de pós-graduação em Farmácia da UFMS e Biologia Funcional/Molecular da UNICAMP, que contribuíram para aprimoramento da minha formação acadêmico-científica.

Ao Gilson, Jaras, obrigado pelo auxílio em todos os experimentos realizados durante este trabalho, aprendi muito contigo! Abraço!

À Juliana. Ju, pela sua disposição em me ajudar durante meu estabelecimento parcial na UNICAMP. Você tornou esta caminhada mais fácil, obrigado!

Aos colegas do Laboratório de Estudos da Dor. Obrigado pela companhia diária e troca de experiências. Vocês tornaram esta caminhada mais leve! Grande abraço em todos!

A técnica Catarine. Cat, pela amizade e seu auxílio prestado em minha estadia no Laboratório de Estudos da Dor, obrigado!

Ao técnico Cesinha, pela amizade e auxílios prestados para manutenção dos animais de experimentação. Grande abraço!

Aos meus avós, Nair, Elenice e Sebastião. Obrigado por serem minha segunda casa e porto seguro durante esta longa caminhada. Amo vocês!

A toda minha família. Obrigado por serem umas das bases de minha existência, de meu caráter pessoal e profissional. Beijo Grande, amo vocês!

A Emiliane. Emi, por ter me recepcionado e aberto as portas de sua casa quando cheguei em Campinas, sem nem me conhecer direito. Você tornou este caminho mais fácil, obrigado querida!

Aos meus amigos do pensionato: Virgilhão, Allan e Rolando. Valeu molecada, pelas nossas conversas e pelo apoio de vocês em todos os momentos. Abração!

Ao meu camarada Antonio Marcos. Tonão, agradeço sua imensa disposição em me auxiliar na execução de todos os trâmites que precisei realizar durante este mestrado inteiro quando estava fora de Campo Grande, e ainda, por ter me acolhido durante minhas idas e vindas a cidade morena. Forte abraço parceiro!

Aos amigos Kauêzão, Uriel, Hinin, João, Rayan, Murilão, Oscar, Cacá, Pati, Mari e Vanessa. Moçada, pela nossa amizade que já não é de hoje, pelas cervejas, prosas e apoio durante todos os nossos encontros neste período. Abração!

As amigas Josy e Kátia. Meninas, pela nossa amizade e conversas durante este período todo do mestrado, renderam boas risadas e essência! Beijão!

A todos que de alguma forma contribuíram para a empreitada deste trabalho, o meu muito obrigado!

“Largue-se e você será muito mais do que jamais sonhou ser...”

Janis Joplin.

## RESUMO

Estudos etnobotânicos mostraram que comunidades rurais do pantanal sul-matogrossense tradicionalmente usam a *Tabebuia aurea* ("ipê-amarelo" ou "paratudo") através de sua decocção ou mastigação de cascas de seu caule para o alívio da dor e demais sintomas presente no acidente ofídico. A serpente *Bothrops mattogrossensis* ("boca-de-sapo") é endêmica no estado de Mato Grosso do Sul, sendo umas das responsáveis pelos acidentes ofídicos que ocorrem no estado. Baseando-se nestas premissas, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade anti-hiperalgésica do Extrato hidroetanólico de *Tabebuia aurea* (EHETa) utilizando a peçonha de *Bothrops mattogrossensis* (PBm) como estímulo nóxico. Foram utilizados camundongos *Swiss* machos, adultos, pesando aproximadamente 25-30g. O teste empregado para avaliação da nocicepção foi o analgesímetro digital (*von frey* eletrônico). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM, ANOVA, pós-teste Bonferroni ( $p < 0,05$ ). Em cada grupo de animais testado ( $n = 6$ ) havia um grupo controle tratado com solução de NaCl 0,9% estéril. Assim, para a curva dose-resposta-tempo da PBm, no grupo controle, foi inoculado 30  $\mu$ L/animal da solução de NaCl 0,9% estéril por via intraplantar (i.pl). Ao se avaliar o tratamento com EHETa, o grupo controle recebeu, via oral ou local, conforme o teste, solução de NaCl 0,9% em substituição ao EHETa, com o mesmo volume final. Inicialmente, foi elaborada uma curva dose-resposta-tempo para PBm. Testou-se as doses 1 pg; 1 ng; 0,3  $\mu$ g; 1  $\mu$ g e 3  $\mu$ g/animal; 30  $\mu$ L/animal; via i.pl. Os resultados foram obtidos para os tempos 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 24 e 72 h. A PBm induziu hiperalgésia dose e tempo-dependentes com pico de ação em 2 h após sua inoculação. A dose de 3  $\mu$ g/animal apresentou hiperalgésia máxima ( $7,84 \pm 0,22$  g). Posteriormente, a dose de 3  $\mu$ g/animal (30 $\mu$ L) da PBm foi inoculada, via i.pl. e o EHETa foi administrado (10 mL/kg) por via oral (v.o.) nas doses de 180, 540, 720, 810 ou 1080 mg/kg 30 min antes da PBm. O EHETa reduziu a hiperalgésia da PBm em 2 h pós sua inoculação, nas doses de 720 mg/kg ( $26,29\% ; 5,75 \pm 0,29$  g), 810 mg/kg ( $32,31\% ; 5,28 \pm 0,15$  g) e 1080mg/kg ( $32,57\% ; 5,26 \pm 0,29$  g). Doses superiores a 720 mg/kg não mostraram efeitos estatisticamente diferentes a esta. Subsequentemente, a dose de 720 mg/kg (v.o; 10 mL/kg) do EHETa foi testada nos tempos 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 24 e 72 h após administração da PBm (3  $\mu$ g/animal; 30  $\mu$ L; i.pl). O EHETa reduziu a hiperalgésia da PBm em 1,5 e 2 horas pós sua inoculação. Em seguida, o efeito anti-hiperalgésico do EHETa (720 mg/kg; v.o; 10 mL/kg) foi avaliado no modelo de hiperalgésia da PGE<sub>2</sub> (100 ng/pata; 30  $\mu$ L; i.pl). O EHETa reduziu a hiperalgésia da PGE<sub>2</sub> em 49,72% ( $3,48 \pm 0,53$  g) em relação ao grupo controle ( $6,92 \pm 0,41$  g). A análise histopatológica revelou que o EHETa amenizou o infiltrado inflamatório induzido pela peçonha, tendo infiltrado leucocitário de caráter leve e significativamente diferente do grupo controle (NaCl 0,9%; v.o), que apresentou infiltrado moderado e intenso. Por fim, A dose de 720 mg/kg (v.o; 10 mL/kg) do EHETa foi avaliada no teste do *Rota rod*. Não houve comprometimento motor no tratamento com EHETa ( $178,4 \pm 1,07$  s) ou grupo controle ( $177,2 \pm 0,86$  s). Assim, concluiu-se que o EHETa possui atividade anti-nociceptiva e anti-hiperalgésica, podendo ser uma alternativa no tratamento da dor provocada pelos acidentes ofídicos.

**Palavras-chave:** Dor; *Tabebuia aurea*; *Bothrops mattogrossensis*

## ABSTRACT

Ethnobotanical studies have shown that rural communities of the pantanal in Mato Grosso do Sul traditionally use *Tabebuia aurea* ("ipê-amarelo" or "paratudo") through their decoction or chewing the bark from her stem for the relief of pain and other symptoms present in snakebites. *Bothrops mattogrossensis* ("boca-de-sapo") is a snake endemic in Mato Grosso do Sul, being one of the responsible for the snakebites that occur in the state. Based on these premises, the objective of this work was evaluate the antihyperalgesic activity of the Hydroethanolic extract of *Tabebuia aurea* (HEETa) using *Bothrops mattogrossensis* venom (VBm) as noxious stimulus. Male Swiss adult mice weighing approximately 25-30g were used. The test used to evaluate nociception was the digital (electronic von frey) analgesimeter. The results were expressed as mean  $\pm$  SEM, ANOVA, Bonferroni post-test ( $p < 0.05$ ). In each group of animals tested ( $n=6$ ) there was a control group treated with NaCl 0.9% sterile solution (saline). Thus, for the dose-response-time curve of VBm, in the control group, 30  $\mu$ L/animal of the sterile saline solution was inoculated subcutaneously (s.c). When the treatment with HEETa was evaluated, the control group received, by oral or subcutaneous route, according to the test, saline solution in replace of EHETa, with the same final volume. Initially, a dose-response time curve for VBm was developed. The doses of 1 pg; 1 ng; 0.3  $\mu$ g; 1  $\mu$ g and 3  $\mu$ g/animal; 30  $\mu$ L/animal; s.c; were tested. The results were obtained for the times 0.5; 1; 1.5; 2; 3; 4; 24 and 72 hours. VBm induced dose and time-dependent hyperalgesia with maximum action within 2 hours after inoculation. The dose of 3  $\mu$ g/animal presented the maximal hyperalgesia ( $7.84 \pm 0.22$  g). Subsequently, the dose of 3  $\mu$ g/animal (30  $\mu$ L) of VBm was inoculated subcutaneously and EHETa was administered (10 mL/kg) orally at doses of 180, 540, 720, 810 or 1080 mg/kg, 30 minutes prior to VBm. EHETa reduced VBm hyperalgesia within 2 hours after inoculation at doses of 720 mg/kg (26.29%,  $5.75 \pm 0.29$  g), 810 mg/kg (32.31%,  $5.28 \pm 0.15$  g) and 1080 mg/kg (32.57%,  $5.26 \pm 0.29$  g). Doses greater than 720 mg/kg showed no statistically difference. Subsequently, the dose of 720 mg/kg (orally, 10 mL/kg) of EHETa was tested at times 0.5; 1; 1.5; 2; 3; 4; 24 and 72 hours after administration of VBm (3  $\mu$ g/animal; 30  $\mu$ L; s.c). EHETa reduced VBm hyperalgesia in 1.5 and 2 hours after inoculation of the venom. Then, the antihyperalgesic effect of EHETa (720 mg/kg, orally, 10 mL/kg) was evaluated in the hyperalgesia induced by PGE<sub>2</sub> (100 ng/pata; 30  $\mu$ L; s.c) assay. EHETa reduced PGE<sub>2</sub> hyperalgesia by 49.72% ( $3.48 \pm 0.53$  g) compared to the control group ( $6.92 \pm 0.41$  g). Histopathological analysis revealed that EHETa attenuated inflammatory infiltrate induced by venom and had a mild and significantly different leukocyte infiltrate from the control group (saline, orally), which presented moderate and intense infiltrate. Finally, the dose of 720 mg / kg (orally, 10 mL/kg) of EHETa was evaluated in the Rota rod test. There was no motor impairment in treatment with EHETa ( $178.4 \pm 1.07$  s) or control group ( $177.2 \pm 0.86$  s). Thus, it was concluded that EHETa has antinociceptive and antihyperalgesic activity, and may be an alternative in the treatment of pain caused by snakebites.

**Keywords:** Pain, *Tabebuia aurea*, *Bothrops mattogrossensis*.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b>	Fibras aferentes sensoriais de condução da informação nociceptiva <b>Fonte:</b> Julius; Basbaum, 2001.....	21
<b>Figura 2:</b>	Os 4 processos que compõem a nocicepção: transdução, transmissão, percepção e modulação. <b>Fonte:</b> Ferrante e VadeBoncouer, 1993. Adaptado .....	22
<b>Figura 3:</b>	Conexões sinápticas entre as fibras sensoriais nociceptivas e neurônios de segunda ordem na medula espinhal. <b>Fonte:</b> Todd, 2010 .....	23
<b>Figura 4:</b>	Tabebuia aurea. <b>Fonte:</b> <a href="http://www.panoramio.com/photo/14331077">http://www.panoramio.com/photo/14331077</a> , adaptado.....	32
<b>Figura 5:</b>	Estrutura química do iridoide especiosídeo. <b>Fonte:</b> Silva, D.B (2017).....	33
<b>Figura 6:</b>	Exemplar da serpente <i>Bothrops matogrossensis</i> . <b>Fonte:</b> <a href="http://www.luar.dcc.ufmg.br/bravesdb/index">http://www.luar.dcc.ufmg.br/bravesdb/index</a> .....	36
<b>Figura 7:</b>	Analgesímetro digital (von frey eletrônico) (A). Imagem representativa do movimento progressivo ascendente que promove o reflexo de retirada do membro posterior do animal (B). <b>Fonte:</b> MALANGE, K. F. 2016.....	41
<b>Figura 8:</b>	Aparelho Rota rod (A). Imagem representativa do teste utilizado para avaliação da motricidade e sinais de ataxia nos animais (B). <b>Fonte:</b> MALANGE, K. F. 2016. ....	42
<b>Figura 9:</b>	Cromatogramas do extrato de Tabebuia aurea .....	49
<b>Figura 10:</b>	Efeito da PBm após inoculação. Resultados expressos como média $\pm$ EPM (n=6). Two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni .....	51
<b>Figura 11:</b>	Efeito dose-dependente do EHETa (180, 540, 720, 810 ou 1080mg/kg; 10mL/kg; via oral) na redução da hiperalgesia induzida pela PBm .....	53
<b>Figura 12:</b>	Efeito do EHETa sob a motricidade dos animais. Resultados expressos como média $\pm$ EPM (n= 4). Teste t – student.....	54
<b>Figura 13:</b>	Análise temporal após pré-tratamento com EHETa por via oral. Resultados expressos como média $\pm$ EPM (n=6). Two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni .....	55
<b>Figura 14:</b>	Análise temporal após tratamento com a mistura previamente incubada de PBm:EHETa. Resultados expressos como média $\pm$ EPM (n=6). Two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni .....	56
<b>Figura 15:</b>	Cortes histológicos de 5 $\mu$ m de espessura do tecido subcutâneo plantar do membro pélvico esquerdo de camundongos <i>Swiss</i> . Amostras foram coletadas duas horas após a inoculação de PBm ou tratamentos.....	58

- Figura 16:** Cortes histológicos de 5  $\mu\text{m}$  de espessura do tecido subcutâneo plantar do membro pélvico esquerdo de camundongos *Swiss*. Amostras foram coletadas 72 horas após a inoculação de PBM ou tratamentos..... 59
- Figura 17:** Efeito do EHETa na redução da hiperalgesia mecânica induzida pela  $\text{PGE}_2$ . Resultados expressos como média  $\pm$  EPM (n=6). One-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.....60

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Constituintes identificados no extrato de *Tabebuia aurea* por CLAE-DAD-EM. .... 48
- Tabela 2:** Valores de escore da análise histopatológica para grupos que foram tratados com EHETa via oral ou a mistura incubada de PBm:EHETa. A lesão hemorrágica e o infiltrado inflamatório foram avaliados duas horas após a inoculação da PBm ou dos tratamentos. .... 58
- Tabela 3:** Valores de escore da análise histopatológica para grupos que foram tratados com EHETa via oral ou a mistura incubada de PBm:EHETa. A lesão hemorrágica e o infiltrado inflamatório foram avaliados 72 horas após a inoculação da PBm ou dos tratamentos..... 59

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1:** Escores e grau de lesão relacionado para qualificação e quantificação de lesões apresentadas pelos animais durante a análise histopatológica..... 46
- Quadro 2:** Valores da intensidade de hiperalgesia induzida pela PBm, em diferentes doses após inoculação..... 50

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina di-fosfato
ANOVA	Análise de variância
AMPc	3', 5' - Monofosfato cíclico de adenosina
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CGRP1	Receptor de CGRP tipo 1
CGRP2	Receptor de CGRP tipo 2
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COX-II	Enzima Ciclooxygenase Tipo II
DAD	Detector de arranjo de diódos
EHETa	Extrato hidroetanólico de <i>Tabebuia aurea</i>
EM	Espectrometria de Massas
EPM	Erro padrão da média
FLA2	Fosfolipase A2
IB	Intensidade Basal
IH	Intensidade de Hiperalgisia
IHt	Intensidade de Hiperalgisia pós-tratamento
IL-1	Interleucina 1
IL-1RI	Receptor de interteleucina do tipo 1
i.p	Intraperitoneal
i.pl	Intraplantar
min	Minuto
MPE	Membro pélvico esquerdo
MPD	Membro pélvico direito
MP	Metaloproteinase da peçonha botrópica
NF-κB	Fator Nuclear kappa B
ng	Nanograma
NK1	Receptor de neurocinina tipo 1
NVPL	Núcleo Talâmico ventral posterior lateral
NVPM	Núcleo Talâmico medial
p38 MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno p38

PAG	Substância cinzenta perireaquedutal
PBm	Peçonha de <i>Bothrops mattogrossensis</i>
pg	Picograma
PGE2	Prostaglandina E2
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
SP	Serinoproteinase da peçonha botrópica
sFLA2	Fosfolipase A2 secretada
sFLA2-Asp 49	Fosfolipase A2 secretada variante Asparto 49
sFLA2-Lys 49	Fosfolipase A2 secretada variante Lisina 49
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral- $\alpha$
TNFR-I	Receptor do fator de necrose tumoral tipo 1
TRPV1	Receptor vaniloide de potencial transitório tipo 1
TTXr	Canal de sódio resistente a Tetrodotoxina
UV	Ultravioleta
V.o	Via oral
VR	Receptor vanilóide
VR-1	Receptor vanilóite tipo 1
m/z	Relação massa/carga

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	20
<b>2.1 Dor</b> .....	20
<b>2.1.1. Considerações gerais</b> .....	20
<b>2.2. Fisiopatologia do Acidente Botrópico</b> .....	25
<b>2.2.1. Hemorragia</b> .....	25
<b>2.2.2. Miotoxicidade</b> .....	27
<b>2.2.3. Dor</b> .....	28
<b>2.3. Terapêutica dos Acidentes Botrópicos</b> .....	31
<b>2.4. <i>Tabebuia aurea</i></b> .....	32
<b>2.5. Acidentes Ofídicos</b> .....	33
<b>2.6. <i>Bothrops mattogrossensis</i></b> .....	34
<b>2.7. Variabilidade das Peçonhas Botrópicas</b> .....	35
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	39
<b>3.1. Objetivo Geral</b> .....	37
<b>3.2. Objetivos Específicos</b> .....	37
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	38
<b>4.1. Coleta do Material Vegetal</b> .....	38
<b>4.2. Obtenção do Extrato</b> .....	38
<b>4.3. Identificação dos Constituintes do Extrato de <i>Tabebuia aurea</i> por     CLAE-DAD-EM</b> .....	38
<b>4.4. Obtenção da Peçonha</b> .....	39
<b>4.5. Animais</b> .....	39
<b>4.6. Avaliação da Nocicepção</b> .....	40
<b>4.6.1. Teste Comportamental</b> .....	40
<b>4.7. Avaliação da Motricidade e Sinais de Ataxia</b> .....	41
<b>4.7.1. Teste Comportamental</b> .....	41
<b>4.8. Determinação do Tempo de Resposta e Reposta Máxima da     Peçonha</b> .....	42

<b>4.9. Determinação da Dose Máxima Efetiva para Tratamento por Via Oral:</b>	
<b>curva dose-resposta</b> .....	43
<b>4.10. Avaliação da Motricidade e Sinais de Ataxia após Tratamento por Via Oral</b> .....	43
<b>4.11. Análise Temporal da Resposta ao Tratamento por Via Oral</b> .....	43
<b>4.12. Análise Temporal da Resposta ao Tratamento por Via Subcutânea</b> .....	44
<b>4.13. Avaliação da Resposta ao Tratamento por Via Oral em Modelo de Hiperalgesia Induzida pela Prostaglandina E<sub>2</sub></b> .....	45
<b>4.14. Eutanásia e Preservação dos Tecidos para Coleta de Estruturas</b> .....	45
<b>4.15. Análise Histopatológica</b> .....	46
<b>4.16. Análise Estatística</b> .....	46
<b>5. RESULTADOS</b> .....	47
<b>5.1. Identificação dos Constituintes do Extrato de <i>Tabebuia aurea</i> por CLAE-DAD-EM</b> .....	47
<b>5.2. Determinação do Tempo de Resposta e Resposta Máxima da Peçonha</b> .....	50
<b>5.3. Determinação da Dose Máxima Efetiva para Tratamento por Via Oral: curva dose-resposta</b> .....	52
<b>5.4. Avaliação da Motricidade e Sinais de Ataxia após Tratamento por Via Oral</b> .....	54
<b>5.5. Análise Temporal da Resposta ao Tratamento por Via Oral</b> .....	54
<b>5.6. Análise Temporal da Resposta ao Tratamento por Via Subcutânea</b> .....	56
<b>5.7. Análise Histopatológica</b> .....	57
<b>5.8. Avaliação da Resposta ao Tratamento por Via Oral em Modelo de Hiperalgesia induzida pela Prostaglandina E<sub>2</sub></b> .....	60
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	61
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	66
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	67
<b>9. ANEXOS</b> .....	85



## 1. INTRODUÇÃO

Os acidentes causados por serpentes peçonhentas representam um problema de saúde pública em países tropicais (GUTIERREZ *et al.*, 2010). A maior frequência destes acidentes ocorre em zonas rurais e atingem, sobretudo, homens em idade economicamente ativa (BOCHNER; STRUCHINER, 2003; GUTIERREZ *et al.*, 2010; MOTA-DA-SILVA *et al.*, 2015).

No Brasil, registram-se anualmente em média 28.800 casos de acidentes ofídicos causados por serpentes peçonhentas, desses, 119 (0,41%) provocam óbito (MOTA-DA-SILVA *et al.*, 2015). No entanto, a incapacitação traduzida por dor e mutilação nos pacientes acometidos é considerada relevante (RIBEIRO; JORGE, 1997; FUNASA, 1998).

As serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis pela maior parte dos acidentes que ocorrem em território nacional (ARAGON *et al.*, 2016; FEITOSA *et al.*, 2015; BOCHNER; STRUCHINER, 2003). Em Mato Grosso do Sul, a espécie *Bothrops matogrossensis*, anteriormente denominada *Bothrops neuwiedi* (MACHADO *et al.*, 2014), é uma das principais espécies responsáveis pelos acidentes ofídicos que ocorrem no estado (CARDOSO *et al.*, 2003) e pode ser encontrada habitando regiões de municípios que compõem parte da planície do pantanal sul-matogrossense, como a de Aquidauana (MACHADO *et al.*, 2014) e Miranda (SILVA; RODRIGUES, 2008).

Durante o envenenamento botrópico notam-se manifestações clínicas sistêmicas e locais decorrentes da inoculação da peçonha botrópica. Dentre as locais, a dor é o principal sintoma, estando presente em 95,6% dos casos, seguida do edema, equimose e sangramento na região da mordida. Em alguns casos, a lesão tecidual induzida pela peçonha evolui para a síndrome compartimental, caracterizada por dor intensa, déficit motor e necrose, ocasionando a perda funcional e anatômica do membro afetado (RIBEIRO; JORGE, 1997; FUNASA, 1998).

Ainda hoje a terapêutica dos acidentes ofídicos de origem botrópica se faz pelo uso do soro antibotrópico ou poliespecífico. Ambos possuem boa neutralização de efeitos sistêmicos, porém, ação limitada sobre os efeitos locais, tendo pouca eficácia na amenização da dor, edema e hemorragia (GUTIERREZ *et al.* 2006; PICOLO *et al.*, 2002). Outro aspecto é que embora a soroterapia seja o tratamento primordial, nem sempre se encontra prontamente disponível, sobretudo para populações rurais. Assim, visto que a terapia apresenta estas peculiaridades, novas estratégias tem sido pesquisadas.

Quando se considera a busca por novas terapias acessíveis capazes de promoverem o tratamento de diversas enfermidades, as plantas medicinais têm papel significativo. A exemplo disso temos a inclusão de diversos fitoterápicos na lista de medicamentos disponibilizados pelo Sistema Único de Saúde (SANTOS *et al.*, 2011) e a utilização de plantas medicinais como fonte primária de cuidados em saúde pela população mundial (Calixto, 2005).

O gênero *Tabebuia* compreende várias espécies vegetais pertencentes a biomas como Amazônia, Caatinga, Cerrado e Pantanal, tendo sua utilização destinada tanto a fins ornamentais quanto medicinais (SANTOS *et al.*, 2015; LORENZI, 1992). Estudos etnobotânicos realizados por Nunes *et al.* (2003) visando identificar o perfil regional do consumo de plantas no município de Campo Grande-MS, identificaram que este gênero era utilizado pelas populações locais devido a suas propriedades anti-inflamatória e cicatrizante.

Diversos trabalhos na literatura identificaram várias substâncias farmacologicamente ativas presentes no gênero *Tabebuia*, como saponinas, flavonoides, cumarinas, lapachol e iridóides. A estas são atribuídas as propriedades antineoplásicas, antimicrobianas, antivirais, anti-inflamatórias, analgésicas e anti-parasitárias (HUSSAIN *et al.*, 2007; TUNDIS *et al.*, 2008; VILJOEN *et al.*, 2012).

Em Mato Grosso do Sul, a espécie *Tabebuia aurea* é utilizada por populações residentes no pantanal através da decocção, mastigação, bem como em preparações conhecidas como “garrafadas”, constituídas a partir de lascas de seu caule, para o tratamento da dor e de outros efeitos locais provocados durante o envenenamento ofídico, alegando amenização dos sintomas e até mesmo, cura.

Nesse sentido, estudos pré-clínicos realizados pelo Laboratório de Farmacologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul identificaram que o Extrato hidroetanólico da *Tabebuia aurea* foi capaz de neutralizar as atividades inflamatória, miotóxica e hemorrágica da peçonha de *Bothrops neuwiedi*, atual *Bothrops mottogrossensis* (REIS *et al.*, 2014).

De fato, o atual cenário da terapêutica antiofídica frente ao acidente botrópico reflete a necessidade do desenvolvimento de uma terapia complementar, com maior cobertura terapêutica e enfoque na neutralização das toxinas responsáveis pelos eventos locais presentes na fisiopatologia do envenenamento. Desta maneira, considerando-se os resultados obtidos até o momento, é evidente que a *Tabebuia aurea* exibe um potencial farmacológico promissor.

Porém, há escassez de dados no que diz respeito a atividade anti-hiperalgésica, antinociceptiva e analgésica desta planta. Além disso, há que se considerar que o acidente botrópico induz uma incapacitação breve ou permanente nos pacientes acometidos, sendo que a dor é um dos fatores limitantes que predispõe a esta condição. Logo, tomando-se uma perspectiva clínica e de eficácia terapêutica, a investigação da atividade anti-hiperalgésica da *Tabebuia aurea* é plenamente justificável.

Baseando-se em todas estas premissas, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade anti-hiperalgésica do extrato hidroetanólico da *Tabebuia aurea* em modelo murino de hiperalgesia induzida pela inoculação da peçonha de *Bothrops matogrossensis*.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Dor

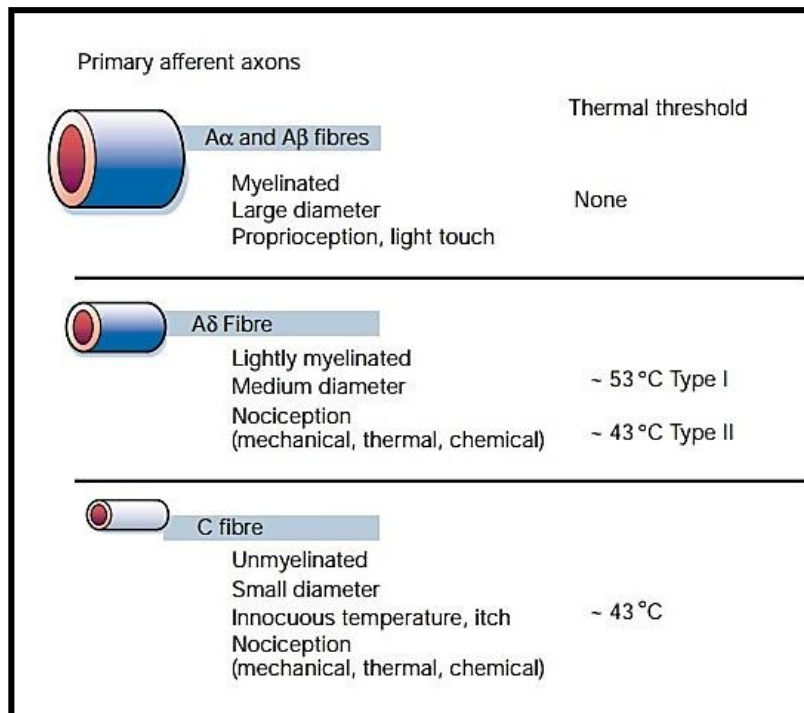
#### 2.1.1. Considerações Gerais

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) define dor como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão tecidual real ou potencial. Assim, o fenômeno da dor pode ser caracterizado como sendo a percepção e interpretação subjetiva de um sinal nociceptivo (PADDLEFORD, 1998).

A nocicepção compreende o processo pelo qual um estímulo de caráter térmico, mecânico ou químico, lesivo ou potencialmente lesivo à integridade tecidual, é detectado por uma subpopulação de fibras nervosas periféricas, os nociceptores. Compreende a resposta neuronal mediante aplicação de um estímulo nódio sem conotação emocional (BASBAUM *et al.*, 2009).

Está bem estabelecido que três grupos principais de fibras nervosas sensoriais aferentes (Figura 1) participam da detecção e condução do estímulo nociceptivo. O primeiro grupo inclui as fibras nervosas aferentes mielinizadas A $\alpha$  e A $\beta$ , as quais apresentam grande diâmetro e rápida velocidade de condução. Estas fibras são responsáveis pela transmissão de estímulos de baixa intensidade, proprioceptivos e inócuos, conduzindo estímulos de caráter nociceptivo apenas em condições específicas como alodínia (MILLAN, 1999; JULIUS; BASBAUM, 2001; BASBAUM *et al.*, 2009).

O segundo grupo inclui as fibras nervosas aferentes mielinizadas A $\delta$ . Estas fibras apresentam diâmetro médio e conduzem estímulos nociceptivos mecânicos, térmicos e químicos, estando relacionadas com a dor rápida, primária e discriminativa. Estas fibras se subdividem em duas classes principais. A primeira, fibras A $\delta$  tipo I, são nociceptores mecânicos de alto limiar, podem responder tanto a estímulos de natureza mecânica quanto química, detectando estímulos nociceptivos mecânicos de alta intensidade e possuindo limiares altos para estímulos de temperatura (> 50 °C). Na segunda classe, fibras A $\delta$  tipo II, os limiares nociceptivos mecânicos são altos, porém, para estímulos de temperatura, estas fibras possuem limiares menores (MILLAN, 1999; JULIUS; BASBAUM, 2001; BASBAUM *et al.*, 2009).



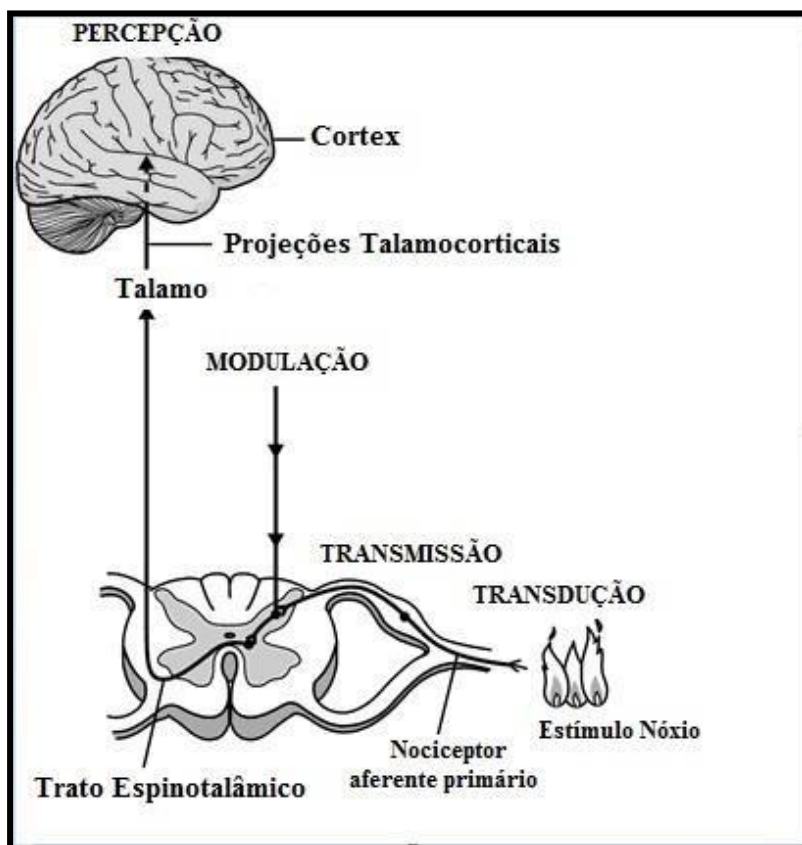
**Figura 1.** Fibras aferentes sensoriais de condução da informação nociceptiva. **Fonte:** Julius; Basbaum, 2001.

O terceiro grupo constitui-se pelas fibras C. Estas fibras possuem receptores de caráter polimodal, apresentam pequeno diâmetro e estão relacionadas com propriocepção a estímulos inócuos de temperatura e coceira. Estas fibras estão envolvidas com a dor de má localização, lenta, secundária ou tardia, conduzindo estímulos nociceptivos de caráter mecânico, térmico e químico (MILLAN, 1999; JULIUS; BASBAUM, 2001; BASBAUM *et al.*, 2009).

Há ainda outra classe particular de nociceptores, denominada ‘‘nociceptores silenciosos’’. Estas estruturas não respondem a estímulos mecânicos ou térmicos imediatos, são ativados apenas em algumas condições patológicas como processos inflamatórios. Respondem preferencialmente a estímulos químicos como capsaicina e histamina, e suas aferências distribuem-se pelo tecido cutâneo, visceral e articulações (BASBAUM *et al.*, 2009; SCHAIBLE; SCHMIDT, 1988; SCHMIDT *et al.*, 1995; SCHMELZ *et al.*, 1994; 2000; WILLIS; WESTLUND, 1997).

O fenômeno da nocicepção (Figura 2) compreende 4 estágios: transdução, transmissão, percepção e modulação (BASBAUM *et al.*, 2009; KITCHELL, 1987; STEFFEY, 2003). Na transdução o estímulo nociceptivo é detectado por nociceptores dispostos em terminações nervosas presentes na pele, vísceras e outros órgãos internos. Propriedades biofísicas e moleculares permitem que os nociceptores possam responder a

diversos estímulos potencialmente prejudiciais a integridade tecidual. Atingindo o limiar de ativação, o estímulo nociceptivo é transduzido em sinais eletroquímicos, denominados potenciais de ação (MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2008; ROCHA *et al*, 2007).

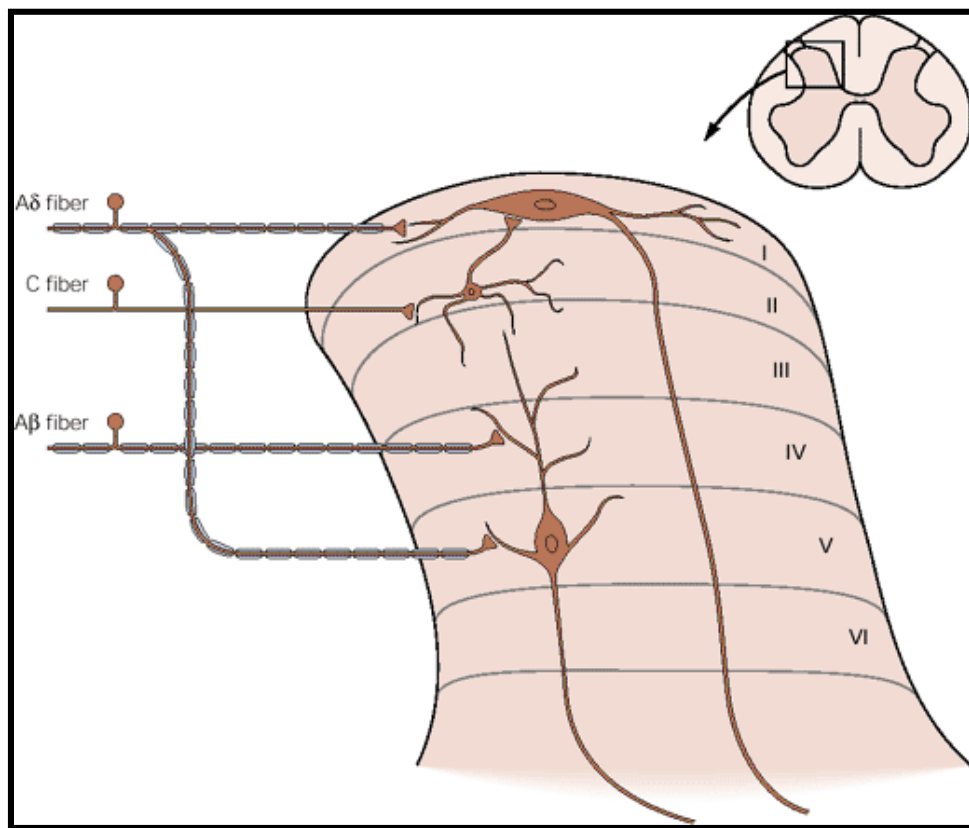


**Figura 2.** Os 4 processos que compõem a nociceção: transdução, transmissão, percepção e modulação. **Fonte:** Ferrante e VadeBoncouer, 1993. Adaptado.

Subsequente a transdução inicia-se à etapa de transmissão. O impulso nociceptivo é agora transmitido da periferia ao sistema nervoso central pelas fibras nervosas aferentes primárias mielinizadas e não mielinizadas. Os nociceptores que inervam a região do crânio e da face possuem corpos celulares localizados no gânglio trigeminal, e conduzem a informação ao núcleo espinal do nervo trigêmeo, fazendo sinapse no núcleo sensitivo principal e núcleo do trato espinal do trigêmeo. Em contrapartida, os nociceptores que inervam membros e troncos possuem corpos celulares localizados no gânglio da raiz dorsal (GRD), conduzindo a informação até o corno dorsal da medula espinhal, fazendo sinapse com interneurônios e neurônios de segunda ordem localizados no corno dorsal da medula espinhal (BASBAUM *et al.*, 2009; BYERS; BONICA, 2001; BROOKS; TRACEY, 2005; JULIUS; BASBAUM, 2001).

Dentro da medula espinhal os neurônios encontram-se dispostos longitudinalmente em camadas celulares organizadas de acordo com suas propriedades citológicas, denominadas lâminas de Rexed e enumeradas de I a X. Os neurônios responsáveis pela propagação do estímulo nociceptivo encontram-se nas lâminas I, II, III e V (BASBAUM; JESSEL, 2000; BASBAUM *et al.*, 2009; BROWN, 1982).

As fibras A $\beta$  realizam sinapse com neurônios de segunda ordem nas lâminas III, IV e V, fibras A $\delta$  nas lâminas I e V, enquanto que as fibras C realizam na lâmina II (Figura 3). Os neurônios que compõem a lâmina I e II estão relacionados diretamente com a propagação da informação nociceptiva, realizando conexões diretas com fibras A $\delta$  e C (BASBAUM; JESSEL, 2000; BROWN, 1982; PURVES *et al.*, 2004).



**Figura 3.** Conexões sinápticas entre as fibras sensoriais nociceptivas e neurônios de segunda ordem na medula espinhal. **Fonte:** Todd, 2010.

A lâmina I é composta por neurônios que se projetam para estruturas supraespinhais e respondem exclusivamente a estimulação nociva. A lâmina II é composta por interneurônios excitatórios e inibitórios que respondem a estímulos nociceptivos e próprioceptivos. A lâmina V contém os neurônios de ampla faixa dinâmica que se projetam para o tronco encefálico e regiões do tálamo, e que recebem conexões de

fibras nociceptivas provenientes de estruturas viscerais. Os neurônios das lâminas I, II e V constituem a principal via de transmissão da informação nociceptiva que se direciona da medula espinhal até o tálamo e córtex cerebral (BASBAUM; JESSEL, 2000; BROWN, 1982; PURVES *et al.*, 2004).

Duas vias e tratos ascendentes conduzem a informação até o tálamo e córtex cerebral: trato neoespinotalâmico ou espinotalâmico lateral e trato paleoespinotalâmico ou espinotalâmico medial (BASBAUM; JESSEL, 2000; BROWN, 1982; PURVES *et al.*, 2004).

O trato neoespinotalâmico ascende através da substância branca do funículo ântero-lateral da medula espinhal, chegando ao núcleo talâmico ventral póstero-lateral (NVPL) e núcleo talâmico ventral póstero-medial (NVPM). Este trato projeta-se para o córtex somatossensorial e conduz informações nociceptivas de alta velocidade, estando envolvido na propagação e transmissão da dor aguda, rápida, primária e discriminativa (MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2008; WOLKERS, 2014).

O trato paleoespinotalâmico transmite informações nociceptivas para várias regiões do córtex cerebral, que incluem o trato espinoreticular, espinomesencefálico e trato espino-hipotalâmico (localizado no hipotálamo). Este trato ascende pelo funículo ântero-lateral e emite as projeções de seus axônios para os núcleos mediais do tálamo: núcleo central lateral, núcleo parafascicular, porção ventrocaudal médio-dorsal e complexo posterior medial. As informações nociceptivas conduzidas pelo trato paleoespinotalâmico são de baixa velocidade, relacionadas com a dor lenta ou crônica (MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2008; RUSSO *et al.*, 1998; WOLKERS, 2014).

No tálamo, os axônios provenientes dos tratos neoespinotalâmico e paleoespinotalâmico realizaram sinapse com neurônios de terceira ordem. Em sequência, os neurônios de terceira ordem projetam-se para o córtex somatossensorial primário e secundário, ínsula, córtex cingulado anterior e córtex pré-frontal. Essas regiões desempenham diversas funções na percepção da dor e interagem com outras áreas do encéfalo, como cerebelo e núcleos basais. A percepção do estímulo nociceptivo e o fenômeno da dor resultará da ativação de várias estruturas encefálicas, com propriedades sensoriais e discriminativas (córtex somatossensorial) e outras relacionadas ao componente afetivo-motivacional da dor (córtex insular) (BASBAUM *et al.*, 2009; STEEDS, 2013; WOLKERS, 2014).



Ocorrendo a percepção, os tratos supraespinhais enviam a resposta ao sinal nóxio, que sofre modulação pela substância cinzenta periaquedutal (PAG), núcleo magno da rafe e células adjacentes ao bulbo rostroventromedial (BUTLER; FINN, 2009; HOFFMAN 2008; WOLKERS, 2014).

Estes sistemas modulatórios emitem projeções para o corno dorsal da medula espinhal, onde ocorre a convergência de informações inibitórias de vias descendentes sobre neurônios envolvidos na transmissão nociceptiva. Estas células podem sofrer ação de neurotransmissores capazes de modular o estímulo nociceptivo como serotonina, noradrenalina, dopamina, acetilcolina e peptídeos opióides (BASBAUM *et al.*, 2009; BEAR *et al.*, 2014; WOLKERS, 2014).

## **2.2. Fisiopatologia do Acidente Botrópico**

O quadro clínico provocado pela peçonha botrópica é caracterizado por manifestações clínicas sistêmicas onde se observam alterações de coagulação sanguínea e cardiovasculares, insuficiência renal aguda e choque, e locais, nas quais se observa dor, edema, equimoses e sangramento na região da mordida acompanhada ou não de necrose, podendo levar a perda funcional ou mesmo anatômica dos membros afetados (PINHO; PEREIRA, 2001; SAÚDE, 1998).

A fisiopatologia do acidente botrópico é conduzida pela perturbação em três diferentes componentes: muscular, vascular e hemostático. Estes, são sítios-alvo para as toxinas presentes na peçonha, que atuam promovendo a degradação de componentes estruturais de membranas celulares e interferindo na hemostasia, por meio da degradação, indução ou inibição de componentes da cascata de coagulação sanguínea.

Dentre os componentes da peçonha botrópica, as enzimas fosfolipases A<sub>2</sub>, metaloproteinases e serinoproteinases são as principais responsáveis pelas manifestações locais e patogênese do envenenamento.

### **2.2.1. Hemorragia**

Os eventos hemorrágicos do acidente botrópico são propagados preponderantemente pelas enzimas metaloproteinases (MP). Estas enzimas pertencem a subfamília M<sub>12</sub> de enzimas metaloproteicas e estruturalmente todas as classes de metaloproteinases são similares, apresentando em seu sítio ativo um domínio de ligação

a um metal bi-valente, que na grande maioria das encontradas em peçonhas de serpentes caracteriza-se pelo metal Zinco ( $Zn^{2+}$ ) (ESCALANTE *et al.*, 2011; MARKLAND, 1998).

Quatro classes de metaloproteínas estão descritas, distinguidas de acordo com a composição da estrutura do domínio catalítico e combinação deste com outros domínios de propriedades específicas, sendo elas:

- a) P-I: domínio metaloproteinase
- b) P-II: domínio metaloproteinase + domínio desintegrina
- c) P-III: domínio metaloproteinase + domínio desintegrina + domínio rico em cisteína
- d) P-IV: domínio metaloproteinase + domínio desintegrina + domínio rico em cisteína + dois domínios lectina.

Quanto a mecanismo de ação hemorrágica, as enzimas da classe P-I atuam degradando componentes estruturais como colágeno tipo IV e lâminina que estão dispostos na membrana basal de células epiteliais da pele, células musculares esqueléticas, e células endoteliais, interferindo na manutenção da hemostasia (BALDO *et al.*, 2010; GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000). Já classe P-II, por possuir domínio desintegrina, também exibe atividade de inibição da agregação plaquetária inibindo a ligação do fibrinogênio ao receptor de integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$  das plaquetas, prejudicando a formação de trombina e coagulação sanguínea (MATSUI *et al.*, 2009; TAKEDA *et al.*, 2012).

As metaloproteínas da classe P-III atuam de modo semelhante a classe P-II: inibem a agregação plaquetária degradando o receptor de colágeno  $\alpha_2\beta_1$  presente nas plaquetas e também os seus receptores de adenosina, inibindo a ligação do ADP e consequentemente ativação da cascata de coagulação. Por fim, a classe P-IV exerce sua atividade hemorrágica pelo mecanismo de ligação direta aos fatores IX e X da cascata de coagulação sanguínea, inibindo a produção de trombina e consequentemente formação de fibrinogênio (MARKLAND, 1998; ADAMS; BIRD, 2009).

Contribuindo com a ação das metaloproteínas, as enzimas serinoproteínas também atuam diretamente na cascata de coagulação sanguínea, prejudicando a regulação do sistema hemostático.

As serinoproteínas da peçonha botrópica (SP) são enzimas que pertencem a família  $S_1$  e subordem S de enzimas proteolíticas (MACKESSY, 2010; SERRANO, 2013). São também denominadas ‘‘trombina-semelhante’’ por mimetizarem funções da

enzima trombina quando secretadas (SERRANO & MAROUN, 2005; MARKLAND, 1998).

De maneira geral, as SP afetam as vias da cascata de coagulação sanguínea realizando hidrólise da molécula de fibrinogênio, ativação de fatores da cascata de coagulação como fator V, VIII e XIII, ativação da proteína C, fibrinólise, ativação de plasminogênio e indução de agregação plaquetária (MARKLAND, 1998; NISHIDA *et al.*, 1994; SERRANO & MAROUN, 2005). Além disso, estas enzimas também podem gerar bradicinina por meio da clivagem de cininogênio, induzindo aumento da permeabilidade vascular, hipotensão e propagação do processo inflamatório (GOLIAS *et al.*, 2007; SERRANO & MAROUN, 2005).

### **2.2.2. Miotoxicidade**

A miotoxicidade desencadeada durante o envenenamento botrópico é atribuída a ação de enzimas Fosfolipases A<sub>2</sub> (FLA<sub>2</sub>) presentes na peçonha. Estas enzimas são denominadas fosfatidil-ácil-hidrolases, pois catalizam a hidrólise da ligação acil-éster de fosfolípídeos, obtendo como produto ácidos graxos livres e lisofosfolípídeos (SIX; DENNIS, 2000).

Quatro grupos e quatorze subgrupos (I a XIV) compreendem a classificação das FLA<sub>2</sub>. O subgrupo II constitui-se por enzimas FLA<sub>2</sub> denominadas fosfolipases A<sub>2</sub> secretadas (sFLA<sub>2</sub>), encontradas nas serpentes da família Viperidae e gênero *Bothrops* (CHACUR, 2004; MOREIRA, 2007; MURAKAMI *et al.*, 1995).

As sFLA<sub>2</sub> da peçonha botrópica são enzimas cálcio-dependentes, pois dependem do íon cálcio para execução de sua atividade enzimática. Devido a sua ação lítica ser direta e específica sobre as células musculares, estas sFLA<sub>2</sub> foram denominadas de sFLA<sub>2</sub> miotóxicas. Dois tipos são descritos: Asp-49 e Lys-49 (GUTIERREZ; OWNBY, 2003).

A isoforma Asp-49 possuem um resíduo de aspartato na posição 49, e na Lys-49, o resíduo de aspartato é substituído por um resíduo de lisina na mesma posição. A Asp-49 representa a forma ativa da enzima, uma vez que este resíduo coordena a interação do íon cálcio ao sitio ativo enzimático durante a reação de hidrólise de fosfolípídeos, sendo crucial para a expressão da atividade catalítica destas enzimas e demais FLA<sub>2</sub> secretadas (GUTIERREZ; OWNBY, 2003; LOMONTE *et al.*, 2009).

Na sFLA<sub>2</sub> Lys-49 a substituição do resíduo de aspartato pelo de lisina causa impedimento estérico e com isso afeta a interação do íon cálcio com a estrutura enzimática durante o processo de catálise, gerando perda de atividade catalítica (ARNI; WARD, 1996; LEE *et al.*, 2001). Entretanto, esta isoforma também é capaz de promover miotoxicidade e lise celular (DELATORRE *et al.*, 2011; GUTIÉRREZ; OWNBY, 2003; LOMONTE *et al.*, 1994).

A ação miotóxica destas enzimas é causada tanto pela hidrólise direta dos fosfolipídeos de membrana, quanto pela interferência na integridade da bicamada lipídica através de interações eletrostáticas entre grupamentos dispostos na estrutura enzimática e nos fosfolipídeos da membrana celular (GUTIÉRREZ; OWNBY, 2003).

Inicialmente, durante o evento miotóxico, a membrana plasmática das células musculares esqueléticas é o primeiro sítio de ação. Após a lise, ocorre o efluxo de enzimas citoplasmáticas como a creatina quinase (CK), responsável pela disponibilização do ATP durante o processo de contração muscular. Posteriormente, inicia-se a degeneração celular, associada à perda de proteínas estruturais da membrana plasmática, como distrofina e  $\beta$ -dístroglicano (GUTIERREZ; OWNBY, 2003; VATER *et al.*, 1995).

### **2.2.3. Dor**

Esta bem estabelecido que a dor desencadeada durante o envenenamento botrópico está relacionada tanto a ação direta das enzimas presentes na peçonha, que exercem lesão química do epitélio, endotélio e tecido muscular, quanto também, ao processo inflamatório instalado mediante a lesão tecidual induzida pelas toxinas, predispondo ao quadro de hiperalgesia e dor inflamatória (FRANÇA; MALAQUE, 2009; TEIXEIRA *et al.*, 2009; BONAVITA *et al.*, 2006).

Desta maneira, é sabido que a lesão tecidual propagada pelas metaloproteinases e fosfolipases A<sub>2</sub>, induz uma resposta inflamatória inerente à apoptose das células endoteliais e musculares, caracterizada pela presença de macrófagos, neutrófilos e síntese de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (DE TONI *et al.*, 2015; MAMEDE *et al.*, 2016; MOREIRA *et al.*, 2012).

A IL-1 $\beta$  liberada pelas células inflamatórias é capaz de estimular a produção de PGE<sub>2</sub>, liberação de CGRP e aumento de expressão das enzimas COX-II no gânglio da raiz dorsal e com isso contribuir para o processo de sensibilização periférica durante a

hiperalgesia inflamatória (ARALDI *et al.*, 2013; NEEB *et al.*, 2011). Já o TNF- $\alpha$ , ao atuar sobre os receptores TNFR-I, ativa a proteína quinase dependente de mitógeno p38 (p38 MAPK). Em seguida, esta enzima induz a sensibilização dos canais de sódio Nav 1.8, levando ao aumento de correntes iônicas neste canal (JIN; GEREAU, 2006; HUDMON *et al.*, 2008).

Além da participação das citocinas pró-inflamatórias, está bem elucidado que durante o evento inflamatório que procede o envenenamento botrópico têm-se a participação da bradicinina e de prostanóides, sobretudo, da isoforma E<sub>2</sub> pertencente a classe das prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>) (MOREIRA *et al.*, 2009; CHACUR *et al.*, 2002; WANDERLEY *et al.*, 2014). De modo complementar, é sabido que estes mediadores bioquímicos contribuem para a manutenção do quadro de hiperalgesia induzido pela peçonha botrópica (CHACUR *et al.*, 2002; 2004a).

Ao atuar sobre os nociceptores a bradicinina ativa a isoforma épsilon da proteína quinase C (PKC $\epsilon$ ), que promove fosforilação de receptores vanilóides do tipo 1 (VR-1), facilitando a abertura deste canal iônico e influxo de íons Ca<sup>2+</sup> para o interior do neurônio, e conseqüentemente, o processo de despolarização (BASBAUM *et al.*, 2009; RANG *et al.*, 2004a). A PGE<sub>2</sub> é capaz de sensibilizar diretamente os nociceptores periféricos, via receptores EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub> ou EP<sub>4</sub> acoplados a proteína G, induzindo ao aumento de níveis de AMPc e ativação da enzima PKA, culminando na fosforilação dos canais de sódio resistentes a tetrodotoxina (TTXr), Nav 1.8 e Nav 1.9 expressos nos terminais periféricos, facilitando sua abertura e reduzindo o limiar de ativação (DIB-HAJJ *et al.*, 2009; JULIUS; BASBAUM, 2001; LEVINE; REICHLING, 1999).

Paralelamente ao evento periférico do envenenamento botrópico, ocorrem mecanismos moleculares centrais na medula espinhal que também contribuem para manutenção do quadro de hiperalgesia, onde a substância P e o CGRP atuam diretamente no processo de sensibilização (CHACUR, 2004; CHACUR *et al.*, 2004a).

Na medula espinhal, a substância P tem ação neuromoduladora, sendo liberada durante as sinapses entre neurônios aferentes primários provenientes de gânglios sensitivos e neurônios de segunda ordem, induzindo ao aumento de excitabilidade de neurônios do corno dorsal e contribuindo para o processo de sensibilização central (LAWSON *et al.*, 1993; TRAUB *et al.*, 1996). Em neurônios aferentes primários, atuando sobre seus receptores CGRP<sub>1</sub> e CGRP<sub>2</sub>, o CGRP induz a liberação de substância P e de aminoácidos excitatórios como o glutamato. Em neurônios pós-sinápticos da medula

espinhal, sua ação restringe-se a abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem, promovendo ativação da fibra pós-sináptica (NEUGEBAUER, 2009; SEYBOLD *et al.*, 2003; WILLIS; COGGESHALL, 2004).

Estudos também demonstraram que as células gliais da medula espinhal e no gânglio da raiz dorsal, o ATP, participam diretamente no estabelecimento da hiperalgesia induzida pela peçonha botrópica.

Chacur et al (2004a) verificaram por meio da técnica de imuno-histoquímica que durante o evento hiperalgésico propagado pelas sFLA<sub>2</sub> Asp-49 e Lys-49 derivadas da peçonha de *Bothrops asper*, na medula espinhal ocorria ativação de células gliais: astrócitos e micróglia. Em sequência, foi observado que tratamento intratecal com um inibidor metabólico de células gliais, fluorocitrato, foi capaz de reverter a hiperalgesia induzida pelas fosfolipases.

Observa-se em Zhang et al (2017) que o ATP está diretamente envolvido na hiperalgesia desencadeada pela Bomotx, uma toxina com estrutura enzimática de sFLA Lys-49 derivada da peçonha de *Bothrops moojeni*. Em síntese, neste trabalho foi verificado que o evento nóxio induzido por esta fosfolipase tem ação neuronal direta, sendo dependente da liberação intracelular de íons Ca<sup>2+</sup>, via retículo endoplasmático e ação da enzima fosfolipase C, que culminava na ativação de canais iônicos associados as junções celulares de panexinas. Estes realizavam a liberação do ATP que posteriormente atuava via receptores P2X3 expressos nas fibras C nociceptivas não peptidérgicas, facilitando a resposta neuronal.

### 2.3. Terapêutica dos Acidentes Botrópicos

Ainda hoje, a terapêutica dos acidentes botrópicos se baseia no tratamento com soro antiofídico poliespecífico ou antibotrópico. Ambos não possuem total eficácia na neutralização dos efeitos locais promovidos pela peçonha, mesmo quando inoculado no local da mordida (GUTIÉRREZ et al 1981;1986; 2006; PICOLO et al., 2002).

A dose utilizada durante a terapia é variável, sendo determinada de acordo com a sintomatologia do acidente ofídico, a qual é classificada em leve, grave e moderada (FRANÇA; MALÁQUE, 2009). Na maioria dos casos são necessárias administrações sucessivas, ocasionando reações alérgicas nos pacientes como febre, urticária, hipotensão, e em casos mais graves, choque anafilático (CARDOSO *et al.*, 1993; OTERO *et al.*, 2002).

Quanto à ineficácia da terapia com o soro antiofídico, algumas hipóteses foram sugeridas. A primeira baseia-se na rápida instalação dos efeitos locais e o tempo decorrido até a administração do soro na unidade de saúde, o que contribui em uma dificuldade de reversão do processo já instalado (CHACUR, 2000; DOMINGOS, 1990). A segunda, seria o fato de que as toxinas responsáveis pelos efeitos locais presentes na peçonha apresentam baixa imunogenicidade em cavalos, tendo como consequência, a ausência de anticorpos capazes de neutralizar essas toxinas nos soros antiofídicos (GUTIÉRREZ *et al.*, 1985; TU, 1982).

Uma vez que a soroterapia apresenta tais peculiaridades, novas estratégias têm sido buscadas com o intuito de fornecerem complementação a terapêutica convencional, com enfoque na neutralização dos eventos locais induzidos pela peçonha. Outro ponto que dá suporte a este cenário é o fato de que a maior incidência de acidentes ofídicos é em zonas rurais e a acessibilidade a soroterapia pelas populações que residem nessas localidades é escassa, o que muitas vezes conduz os indivíduos a utilização de tratamentos baseados na sabedoria popular, que em sua grande maioria, se faz pelo uso de plantas medicinais.

#### 2.4. *Tabebuia aurea*

A *Tabebuia aurea* (Figura 4) é uma espécie vegetal pertencente ao gênero *Tabebuia* e à família Bignoniaceae. As espécies deste gênero são encontradas em biomas como Caatinga, Cerrado, Amazônia e Pantanal (SANTOS *et al.*, 2015; LORENZI, 1992), sendo popularmente conhecidas como ipê-amarelo, ipê-roxo, ipê-branco e pau-d'arco, com seu uso destinado a fins ornamentais e medicinais (PANIZZA, 1997; SOARES, 2006).



**Figura 4.** *Tabebuia aurea*. Fonte: <http://www.panoramio.com/photo/14331077>, adaptado.

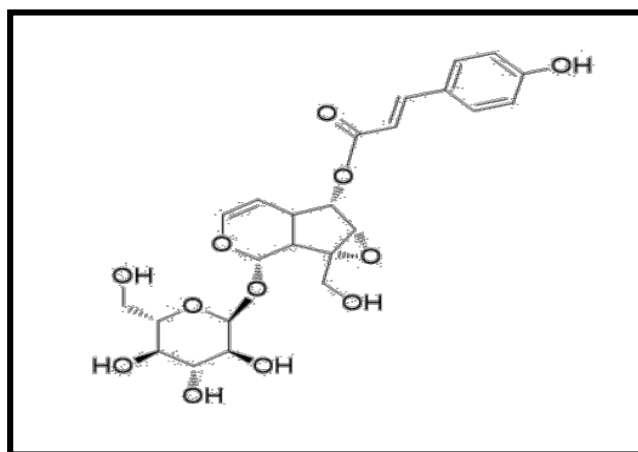
Com relação aos fins medicinais, o gênero *Tabebuia* é fonte de diversos compostos bioativos com atividade anti-inflamatória e antinociceptiva como esteroides, flavonoides e iridoides, tendo seu uso etnofarmacológico convalidado em alguns trabalhos da literatura. Exemplificando, o icarisídeo E<sub>4</sub> (composto isolado da *Tabebuia róseo-alba*) demonstrou atividade antinociceptiva inibindo o número de contorções no teste do ácido acético e o tempo de lambida de pata na segunda fase do teste da formalina, respectivamente (FERREIRA – JUNIOR *et al.*, 2014). Lee *et al* (2015) evidenciaram que o  $\beta$ -lapachone, composto presente no gênero *Tabebuia sp*, foi capaz de inibir a inflamação de células da microgliais, através da inibição de síntese de óxido nítrico, citocinas IL - 1 $\beta$ , TNF - $\alpha$  e IL -6, bem como inibindo a fosforilação da quinase AKT e posteriormente, realizando modulação negativa da ativação do NF- $\kappa$ B.

É importante ressaltar que o espectro de atividade terapêutica tanto anti-inflamatória quanto antinociceptiva deste gênero é fator que condiciona o uso de suas espécies para fins antiofídicos.



Nesse sentido, Otero e colaboradores (2000) demonstraram que a espécie *Tabebuia rosea* foi eficaz na neutralização dos efeitos letais e hemorrágicos promovidos pela peçonha de *Bothrops atrox*. Como relatado anteriormente, estudos feitos por Reis *et al.* (2014) demonstraram que a *Tabebuia aurea* foi capaz de neutralizar os efeitos inflamatório, hemorrágico e miotóxico da peçonha de *Bothrops matogrossensis*.

Posteriormente aos estudos realizados por Reis *et al.* (2014) e considerando os estudos feitos por Verçosa (2011) que identificaram como composto majoritário do Extrato hidroetanólico da *Tabebuia aurea* o iridoíde especiosídeo (ASTHANA *et al.*, 2015) (Figura 5), Moslaves (2016) demonstrou que este composto foi capaz de inibir a atividade inflamatória, miotóxica e coagulante induzida pelas peçonhas de *Bothrops moojeni*, *Bothrops matogrossensis* e *Bothrops jararaca*, corroborando o potencial antifídico desta espécie vegetal.



**Figura 5.** Estrutura química do iridoide especiosídeo. **Fonte:** Silva, D.B (2017).

## 2.5. Acidentes Ofídicos

Os acidentes causados por serpentes peçonhentas representam um problema de saúde pública em países tropicais da África, América Latina, Ásia e Oceania, afetando principalmente trabalhadores agrícolas de comunidades rurais (GUTIERREZ *et al.*, 2010). Estima-se que 421.000 envenenamentos e 20.000 mortes por acidentes ofídicos ocorram a cada ano, mundialmente (KASTURIRATNE *et al.*, 2008).

Na América Latina, o número estimado de acidentes por serpentes peçonhentas varia de 130.000 a 150.000 casos a cada ano, com uma estimativa anual de mortalidade entre 540 a 2.298 mortes (CHIPPAUX, 1998; KASTURIRATNE *et al.*, 2008). No Brasil,

os envenenamentos por serpentes registram 28.800 casos por ano e uma média de 119 óbitos (0,41%) (MOTA-DA-SILVA *et al.*, 2015).

Dentre as espécies de serpentes peçonhentas que habitam o território brasileiro, as do gênero *Bothrops* são as responsáveis pela maior parte dos acidentes (ARAGON *et al.*, 2016; FEITOSA *et al.*, 2015; BOCHNER; STRUCHINER, 2003). A maioria dos casos ocorre em zonas rurais com homens na faixa etária entre 15 e 49 anos, sendo que os membros inferiores são os mais frequentemente afetados (BOCHNER; STRUCHINER, 2003; MOTA-DA-SILVA *et al.*, 2015; RIBEIRO; JORGE, 1990, 1997).

## **2.6. *Bothrops matogrossensis***

A serpente *Bothrops matogrossensis* pertence ao gênero *Bothrops*, inserido na família Viperidae (BERNARDE; GOMES, 2012). Esta família de serpentes é composta por 28 espécies, distribuídas em cinco gêneros: *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis* (MELGAREJO, 2009).

Historicamente, a *Bothrops matogrossensis* era classificada como uma subespécie pertencente ao complexo *Bothrops neuwiedi*: um conjunto composto por oito subespécies do gênero *Bothrops* com ampla distribuição pelo território nacional (MACHADO *et al.*, 2014). Silva & Rodrigues (2008) em uma revisão taxonômica, reclassificaram seis subespécies deste complexo como espécies, dentre estas, a *Bothrops matogrossensis*.

A boca-de-sapo (Figura 6), denominação pela qual é popularmente conhecida esta serpente, possui sua alimentação constituída por pequenos mamíferos, pássaros, lagartos ou lagartixas, anuros (sapos, pererecas e rãs) e centopeias, tendo hábitos noturnos, e podendo ser encontrada em habitats terrestres e arboreais (CICCHI *et al.*, 2007; HARTMANN *et al.*, 2003; MARTINS *et al.*, 2002; VALLE; BRITES, 2008). Sua distribuição geográfica compreende os estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rondônia, São Paulo e Tocantins (MACHADO *et al.*, 2014; SILVA; RODRIGUES, 2008).

Em Mato Grosso do Sul, esta serpente representa uma das principais espécies responsáveis pelos acidentes ofídicos que ocorrem no estado (CARDOSO *et al.*, 2003; FUNASA, 1998), sendo encontrada em localidades como a região de Aquidauana (MACHADO *et al.*, 2014) e Miranda (SILVA; RODRIGUES, 2008) que constituem parte da planície do Pantanal sul-matogrossense (SILVA; CARLINI, 2014).



**Figura 6.** Exemplar da serpente *Bothrops mattogrossensis*. Pigmentação do corpo variando de castanho escuro a marron claro, manchas dorsais com coloração castanho escura ou preta, de bordas bem marcadas na coloração branca, e presença de manchas intercalares entre as manchas principais. **Fonte:** <http://www.luar.dcc.ufmg.br/bravesdb/index>.

## 2.7. Variabilidade das Peçonhas Botrópicas

É sabido que a composição da peçonha está relacionada à dieta da espécie (KOCHVA *et al.*, 1987; AIRD; JORGE DA SILVA, 1991). A exemplo disso temos as serpentes *Bothrops insularis*, endêmicas da Ilha da Queimada Grande, litoral sul de São Paulo, que possuem hábitos arborícolas e apresentam peçonha mais ativa em pássaros do que em mamíferos (COGO *et al.*, 1993). Outro exemplo são as serpentes marinhas, que apresentam na composição de sua peçonha toxinas pós-sinápticas, importantes para a captura de presas rápidas em ambiente aquático (LI *et al.*, 2005).

Está bem estabelecido que diferentes fatores contribuem para a variabilidade de peçonhas botrópicas e as diferentes atividades biológicas observadas, sendo que estes fatores se encontram distribuídos em cinco esferas: interespecie, ontogenética, geográfica, sazonal e

sexual (ANTUNES *et al.*, 2010; DURBAN *et al.*, 2011; JORGE *et al.*, 2015; MENEZES *et al.*, 2006; SUNTRAVAT *et al.*, 2010; ZAMUNER *et al.*, 2004).

Variações geográficas foram observadas por Rodrigues *et al.* (1998), que demonstraram diferença quanto presença de miotoxinas na peçonha de serpentes *Bothrops neuwiedi* oriundas do estado de São Paulo em relação a serpentes da mesma espécie oriundas do estado de Minas Gerais. Posteriormente, um estudo de Jorge *et al.* (2015) evidenciou diferenças na composição da peçonha de serpentes *Bothrops erythromelas* originadas dos estados da Bahia, Ceará, Paraíba e Pernambuco.

Com relação às variações sexuais, Menezes *et al.* (2006) observaram maior atividade proteolítica em peçonhas de serpentes machos de *Bothrops jararaca*. Outra comprovação em relação à mesma espécie foi feita por Zelanis *et al.* (2011), que evidenciou maior predominância de enzimas fosfolipases A<sub>2</sub> e de peptídeo potenciador da bradicinina (BPP) em serpentes machos.

Variações ontogenéticas foram diagnosticadas por Guércio *et al.* (2006) em serpentes jovens e adultas de *Bothrops atrox*. Em serpentes jovens houve maior predominância de enzimas melatoproteinases da classe P-III, enquanto que para as serpentes adultas observou-se maior predominância de metaloproteinases da classe P-I.

Com relação a variações interespecie, Furtado *et al.* (1991) mostraram diferença nas atividades necrosante, edematogênica, hemorrágica, coagulante e proteolítica das peçonhas de *Bothrops alternatus*, *Bothrops atrox*, *Bothrops cotiara*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops moojeni* e *Bothrops neuwiedi*. Posteriormente, Zamuner *et al.* (2004) evidenciaram maior atividade miotóxica de peçonhas de *Bothrops jararacussu*, *Bothrops moojeni* e *Bothrops neuwiedi* em relação as peçonhas de *Bothrops jararaca* e *Bothrops erythromelas*.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

- Avaliar a eficácia anti-hiperalgésica do extrato hidroetanólico da *Tabebuia aurea*

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Caracterizar a atividade nociceptiva da peçonha de *Bothrops mattogrossensis*
- Determinar a dose nóxica não necrozante da peçonha
- Determinar o tempo de ação nociceptiva da peçonha
- Avaliar a atividade anti-hiperalgésica do extrato hidroetanólico da *Tabebuia aurea* administrado por via oral
- Determinar a dose efetiva para o extrato hidroetanólico da *Tabebuia aurea* administrado por via oral
- Avaliar o efeito anti-hiperalgésico do extrato hidroetanólico da *Tabebuia aurea* administrado por via subcutânea
- Avaliar os efeitos do extrato hidroetanólico da *Tabebuia aurea* sobre as lesões teciduais locais induzidas pela peçonha

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. Coleta do Material Vegetal**

As cascas do caule de *Tabebuia aurea* foram coletadas na sub-região de Miranda do Pantanal sul-matogrossense (19°34'12.54"S, 57°00'44.15"W). Um exemplar foi depositado no herbário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, campus de Campo Grande-MS. O projeto possui autorização do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA) sob número CGEN nº 010273/2013-1, para o acesso e coleta das amostras.

### **4.2. Obtenção do Extrato**

As cascas do caule de *T. aurea* foram trituradas em moinho de facas e estas foram submetidas à extração por percolação através de álcool etílico 70%. (70°GL). A extração foi exaustiva e realizada por 12 h e 30 min com um fluxo de solvente de 1 mL/min. Em seguida, esta solução foi concentrada em evaporador rotativo e a água foi removida por liofilização. Os extratos secos foram armazenados sob refrigeração a temperatura de -10°C.

### **4.3. Identificação dos Constituintes do Extrato de *Tabebuia aurea* por CLAE-DAD-EM**

As análises foram realizadas em um UFLC Proeminence da Shimadzu acoplado a um detector de arranjo de díodos (DAD) e a um espectrômetro de massas MicroTOF-Q III (Bruker Daltonics, Billerica, USA), constituído por uma fonte de ionização por eletrospray (IES) e analisador do tipo quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF).

A coluna cromatográfica usada foi uma Kinetex C18(2,6 µ, 150 x 2.2 mm, Phenomenex), a qual foi protegida com uma pré-coluna com o mesmo material. A fase móvel utilizada foi água deionizada (A) e acetonitrila (B), ambas contendo 0,1% de ácido fórmico (v/v). O gradiente de eluição foi o seguinte: 0-2 min- 3% de B, 2-25 min de 3-25% de B, 25-40 min de 25-80% de B, seguido da lavagem e acondicionamento da coluna (8 min). A vazão foi de 0.3 mL/min, volume de injeção foi de 1 µL e durante as análises a coluna cromatográfica foi mantida a 50 °C.

O extrato foi preparado na concentração de 1 mg/mL e filtrado em filtro Millex<sup>®</sup> (0,22 µm x 3.0 mm, Millipore) com membrana PTFE. As análises foram monitoradas no comprimento de onda de 220-800 nm e no espectrômetro de massas em ambos os modos de ionização, positivo e negativo ( $m/z$  120-1200). Nitrogênio foi utilizado como gás de colisão, de nebulização (pressão de 4 Bar) e de secagem (fluxo de 9 L/min). A voltagem do capilar foi de 2,5 kV. A identificação dos constituintes foi baseada nos dados espectrais de UV, EM e EM/EM comparados a dados publicados na literatura, e alguns constituintes puderam ser confirmados através da co-injeção de padrões autênticos.

#### **4.4. Obtenção da Peçonha**

Foi utilizado um *pool* de peçonhas extraídas de vários exemplares adultos de *Bothrops matogrossensis* (PBm) fornecidos pela Profa. Me. Paula Helena Santa Rita da Universidade Católica Dom Bosco (Campo Grande-MS). As peçonhas foram submetidas à liofilização e mantidas a -20 °C até o momento da utilização, quando foram solubilizadas em solução NaCl 0,9% estéril.

#### **4.5. Animais**

Foram utilizados 134 (cento e trinta e quatro) camundongos *Swiss*, machos, adultos pesando 25-30g, oriundos do Biotério Central da UNICAMP. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (32 cm x 20 cm x 21 cm), no Biotério de manutenção do Laboratório de Estudos da Dor-UNICAMP à temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , com ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo ração apropriada para espécie (Nuvital<sup>®</sup>) e água à vontade.

Os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas estabelecidas pelo CONCEA e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biologia da UNICAMP- CEUA/IB-UNICAMP, protocolo nº 3903-1A.

Os cuidados com os animais e os procedimentos realizados durante as análises experimentais estiveram de acordo com o estabelecido pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) (ZIMMERMAN, 1983).

Os testes comportamentais foram conduzidos entre as 9 h e 17 h, sempre no mesmo local, uma sala silenciosa (sala de testes) com temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  nas dependências do Laboratório de Estudos da Dor-UNICAMP.

## 4.6. Avaliação da Nociceção

### 4.6.1. Teste Comportamental

A avaliação comportamental da nociceção foi realizada conforme a metodologia descrita por Cunha *et al.* (2004). Sessenta minutos antes da realização de todos os experimentos, os animais foram colocados em caixas de acrílico (23 cm x 20 cm x 18 cm) para ambientação e posteriormente, realização dos testes comportamentais.

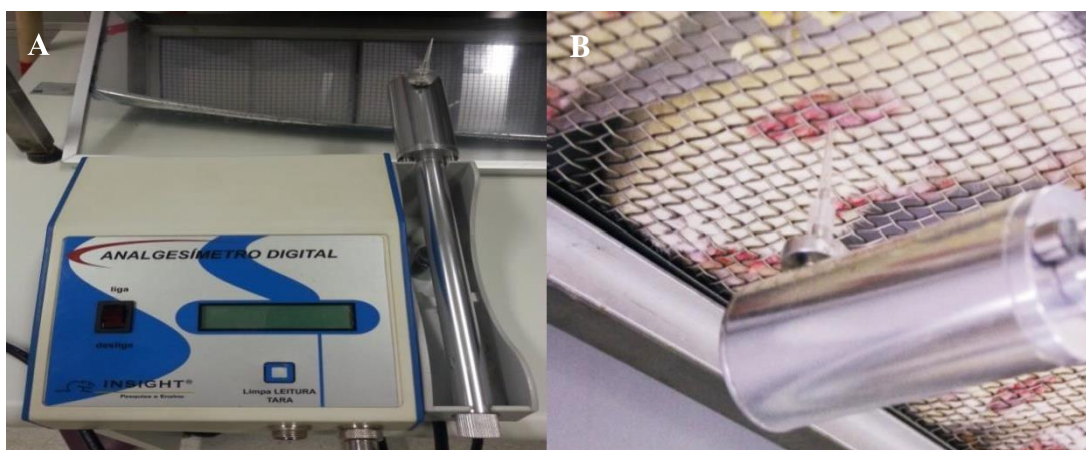
O equipamento utilizado (Figura 7A) – von Frey eletrônico ou analgesímetro digital (Insight®, Brasil) - constitui-se por um transdutor de força, em cuja extremidade foi fixada uma ponteira de polipropileno de 0,5 mm<sup>2</sup>, ligado a um aparelho que fez a leitura da força aplicada convertendo-a em gramas.

Com o animal em estado de alerta e posicionado em decúbito externo-abdominal, aplicou-se a ponteira nos coxins metatársicos dos membros pélvicos esquerdo (MPE) e direito (MPD) de forma perpendicular e em movimento progressivo ascendente (Figura 7B) até que o reflexo de retirada dos membros fosse obtido.

Para todos os experimentos, foram realizadas medidas basais e pós-tratamento e, embora somente o MPE tenha recebido Pbm ou tratamento local, o membro contralateral (MPD) também foi avaliado.

O valor basal representa a média aritmética de três medições obtidas antes que qualquer estímulo ou tratamento tivesse sido realizado. O resultado desta média gerou um valor chamado intensidade basal (IB). De forma similar, foram obtidas três medidas após o estímulo nódio (peçonha) cuja média aritmética é o valor da intensidade de hiperalgesia pós-tratamento (IHt). A diferença entre IB e IHt, isto é, delta ( $\Delta$ ) da reação de retirada foi o valor utilizado nas análises estatísticas e está representado nos gráficos.





**Figura 7.** Analgesímetro digital (*von frey* eletrônico) (A). Imagem representativa do movimento progressivo ascendente que promove o reflexo de retirada do membro posterior do animal (B). **Fonte:** MALANGE, K. F. 2016.

## 4.7. Avaliação da Motricidade e Sinais de Ataxia

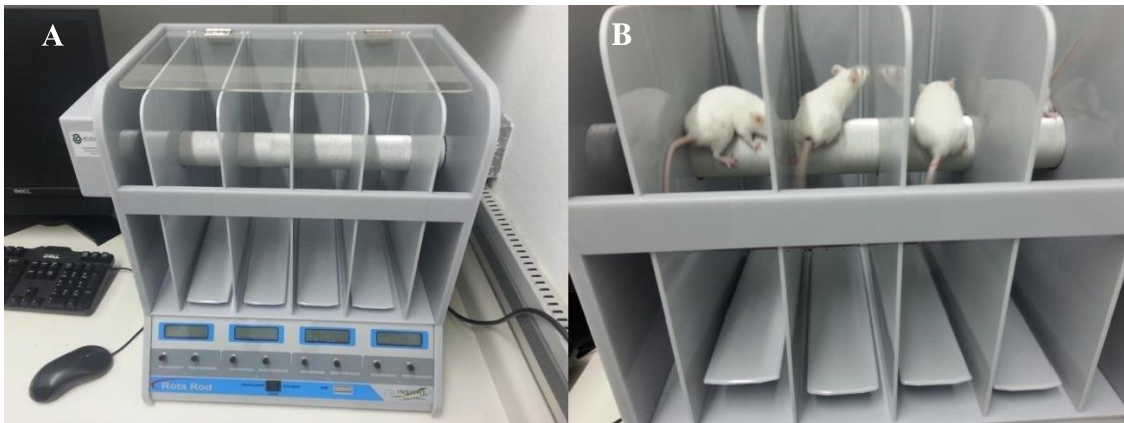
### 4.7.1. Teste Comportamental

Realizou-se a avaliação da motricidade e verificação de sinais de ataxia por meio do teste *Rota rod* (Figura 8B) nos animais submetidos ao tratamento oral com o EHETA. O aparelho utilizado - *rota rod* - (Figura 8A; Insight®, Brasil) contém uma barra de ferro giratória com velocidade regulável em rotações por minuto (rpm), separada em 4 compartimentos permitindo a avaliação simultânea de 4 animais.

Um dia e meio (36 horas) anterior ao teste, foi realizado a seleção dos camundongos, excluindo os animais que não foram capazes de permanecer equilibrados na barra giratória na velocidade constante de 14 rpm em um período de 60 segundos em pelo menos 3 tentativas consecutivas.

Os camundongos selecionados foram submetidos a seções de treinamento na barra giratória durante 3 períodos diferentes (manhã e tarde no dia anterior ao experimento e no período da manhã no dia do experimento), deixando os animais na barra giratória por um período que não excedesse 180 segundos (“cut-off”).

Na última seção de treinamento, todos os camundongos selecionados foram capazes de permanecer em equilíbrio na barra giratória durante 180 segundos consecutivos. Deste modo, a seleção e treinamento prévio dos animais foram procedimentos que garantiram o nivelamento da *performance* locomotora dos animais a serem observados, garantindo assim, efetiva avaliação da substância teste.



**Figura 8.** Aparelho *Rota rod* (A). Imagem representativa do teste utilizado para avaliação da motricidade e sinais de ataxia nos animais(B). **Fonte:** MALANGE, K. F. 2016.

#### 4.8. Determinação do Tempo de Resposta e Reposta Máxima da Peçonha

Foi realizada a curva dose-resposta-tempo para o estímulo com a peçonha. Grupos constituídos por 6 camundongos foram formados de forma aleatória. Em cada grupo, 5 animais receberam, por via intraplantar (i.pl), no coxim metatársico do membro pélvico esquerdo (MPE) a peçonha de *B. matogrossensis* (PBm) e 1, solução estéril de NaCl a 0,9% (Salina; animal controle). O volume final da injeção foi ajustado, quando necessário, para 30  $\mu$ L pela diluição da PBm com NaCl 0,9% estéril. Foram testadas as doses de 1 pg, 1 ng, 0,3  $\mu$ g, 1  $\mu$ g e 3  $\mu$ g/animal.

Após a fase de ambientação, descrita no item 4.6.1, foram obtidos os valores basais (IB) tanto para o MPE quanto para o membro pélvico direito (MPD). Em sequência a PBm foi injetada no MPE e ambos os membros pélvicos tiveram o reflexo de retirada testado (IHt) nos tempos 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 24 e 72 horas após a aplicação da PBm. A dose máxima não necrosante da PBm obtida pela curva dose-resposta-tempo foi utilizada nos ensaios posteriores com o extrato.

#### **4.9. Determinação da Dose Máxima Efetiva para Tratamento por Via Oral: curva dose-resposta**

Inicialmente, previamente aos experimentos, os animais foram deixados sob jejum de 8 horas antes, de serem realizados os tratamentos com o extrato ou controle administrados por via oral. Posteriormente, as doses de 180; 540; 720; 810 ou 1080 mg/kg do EHETa foram administradas por via oral 30 minutos antes da inoculação da PBm (30 µL; via intraplantar; MPE). Utilizou-se 30 animais dos quais 5 foram tratados com solução salina estéril (controle; 10 mL/kg; via oral) e 25 com extrato (5 animais por dose do extrato; 5 doses; 10 mL/kg; via oral). A hiperalgesia foi avaliada no momento da máxima resposta obtida com a PBm no item **4.8**.

#### **4.10. Avaliação da Motricidade e Sinais de Ataxia após Tratamento por Via Oral**

Inicialmente, previamente aos experimentos, os animais foram deixados sob jejum de 8 horas, antes de ser realizado os tratamentos com o extrato ou controle administrados por via oral. Em sequência, conforme metodologia descrita no item **4.7.1.**, os animais foram tratados 90 minutos antes do experimento com solução salina estéril (controle; via oral, 10 mL/kg; n= 4 animais) ou com a dose efetiva do EHETa (via oral; 10 mL/kg; n= 4 animais), obtida pela curva dose resposta do item **4.9**. Os resultados foram expressos pela média do tempo de permanência de cada grupo de animais na barra giratória, na velocidade de 14 rpm, em um período total de 180 segundos.

#### **4.11. Análise Temporal da Resposta ao Tratamento por Via Oral**

Inicialmente, previamente aos experimentos, os animais foram deixados sob jejum de 8 horas, antes de ser realizado os tratamentos com o extrato ou controle administrados por via oral. Em seguida, a dose máxima efetiva do extrato, obtida pela curva dose-resposta, foi administrada por via oral 30 minutos antes da administração da PBm (30 µL; via intraplantar; MPE). Os animais do grupo controle receberam solução salina estéril (10 mL/kg; via oral). Os animais foram divididos em dois subgrupos para avaliação da hiperalgesia:

- Subgrupo G<sub>1</sub>: constou de 12 animais dos quais 6 receberam a dose máxima efetiva do extrato (10 mL/kg; via oral) e 6, solução NaCl 0,9% estéril (10 mL/kg; via oral). O limiar de retirada foi medido nos tempos 0,5, 1, 1,5 horas e os animais foram submetidos a eutanásia no tempo de 2 horas após a aplicação da PBm. Em seguida, foi coletado o tecido subcutâneo plantar do membro pélvico ipsolateral (MPE) à administração da peçonha para análise histopatológica.
- Subgrupo G<sub>2</sub>: constou de 12 animais dos quais 6 receberam a dose máxima efetiva do extrato (10 mL/kg; via oral) e 6, solução NaCl 0,9% estéril (10 mL/kg; via oral). O limiar de retirada foi medido nos tempos 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 24 horas e os animais foram submetidos a eutanásia no tempo de 72 horas após a aplicação da PBm. Em seguida, foi coletado o tecido subcutâneo plantar do membro pélvico ipsolateral (MPE) à administração da peçonha para análise histopatológica.

#### **4.12. Análise Temporal da Resposta ao Tratamento por Via Subcutânea**

Nesta etapa, a PBm foi incubada por 30 minutos com o EHETa na proporção de 1:100 (PBm:EHETa, respectivamente) à temperatura de 37°C, em banho-maria. Imediatamente após a incubação, a mistura previamente incubada foi injetada por via intraplantar (30 µL/animal; MPE). Os animais controle receberam a mistura incubada de PBm com solução salina estéril no mesmo volume final e condições utilizadas para a mistura PBm: EHETa. Os animais foram divididos em dois subgrupos para avaliação da hiperalgesia:

- Subgrupo G<sub>3</sub>: constou de 12 animais dos quais em 6 foi injetado a mistura PBm:EHETa e em 6, a mistura de PBm:NaCl 0,9% estéril (30 µL; i.pl.; MPE). O limiar de retirada foi medido nos tempos 0,5, 1, 1,5 horas e os animais foram submetidos a eutanásia no tempo de 2 horas após a aplicação da PBm. Em seguida, foi coletado o tecido subcutâneo plantar do membro pélvico ipsolateral (MPE) aos tratamentos para análise histopatológica.
- Subgrupo G<sub>4</sub>: constou de 12 animais dos quais em 6 foi injetado a mistura PBm:EHETa e em 6, a mistura de PBm:NaCl 0,9% estéril (30 µL; i.pl.; MPE). O limiar de retirada foi medido nos tempos 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 24 horas e os

animais foram submetidos a eutanásia no tempo de 72 horas após a aplicação da PBm. Em seguida, foi coletado o tecido subcutâneo plantar do membro pélvico ipsolateral (MPE) aos tratamentos para análise histopatológica.

#### **4.13. Avaliação da Resposta ao Tratamento por Via Oral em Modelo de Hiperálgia Induzida pela Prostaglandina E<sub>2</sub>**

Inicialmente, previamente aos experimentos, os animais foram deixados sob jejum de 8 horas, antes de ser realizado os tratamentos com o extrato ou controle administrados por via oral. Após o período de jejum, foi realizada a administração de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (100 ng/pata; 30 µL; via intraplantar; MPE). Em seguida, 90 minutos após a administração de PGE<sub>2</sub> realizou-se a administração por via oral da dose efetiva do EHETA (10 mL/kg; n=6). Os animais controle receberam solução salina estéril por via oral (Controle EHETA; 10 mL/kg; n= 6) ou intraplantar (Controle PGE<sub>2</sub>; 30 µL; MPE; n= 6), sendo a hiperálgia avaliada no tempo de 3 horas após a administração de PGE<sub>2</sub>, tempo que este mediador bioquímico atinge seu efeito máximo (Cunha *et al.*, 2004).

#### **4.14. Eutanásia e Preservação dos Tecidos para Coleta de Estruturas**

Foi realizada a perfusão transcardíaca e exsanguinação dos animais para fixação e preservação de tecidos destinados a análise histopatológica. Os animais foram anestesiados com a mistura de Cetamina (120mg/kg) e Xilazina (16mg/kg), em volume final de 0,4 mL aplicada por via intraperitoneal (i.p).

Após parada respiratória, realizou-se a toracotomia e exposição do coração. O átrio direito foi seccionado e uma agulha, acoplada a uma bomba de circulação extracorpórea, foi inserida no ventrículo esquerdo.

Inicialmente, foram infundidos 30 a 50 mL de solução NaCl 0,9% estéril (Solução Salina) e em ato contínuo, o mesmo volume de solução de Paraformaldeído (PFA) a 4% resfriada a  $\pm 4^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, foi coletado o tecido subcutâneo plantar do coxim metatársico do membro pélvico ipsolateral à administração da peçonha.

#### 4.15. Análise Histopatológica

Os tecidos dos animais submetidos e não submetidos aos tratamentos nos itens **4.11** e **4.12**, foram emblocados em parafina, seccionados a 5 µm e corados com hematoxilina-eosina para observação em microscópio.

Para qualificação e quantificação das lesões apresentadas pelos animais, o grau de alteração tecidual após os tratamentos foi delineado por meio de escores e o tipo de lesão classificado como ausente, leve, moderado ou intenso. Os graus de lesão e respectivos escores correspondentes encontram-se dispostos no quadro abaixo:

**Quadro 1.** Escores e grau de lesão relacionado para qualificação e quantificação de lesões apresentadas pelos animais durante a análise histopatológica

<b><u>LESÃO</u></b>	<b><u>ESCORE</u></b>
<b>Ausente</b>	<b>2 pontos</b>
<b>Leve</b>	<b>4 pontos</b>
<b>Moderada</b>	<b>6 pontos</b>
<b>Intensa</b>	<b>8 pontos</b>

#### 4.16. Análise Estatística

Foram realizados cálculos estatísticos por meio do software *Graphpad Prism 6* (Graphpad Software Inc., USA) para determinação da média, desvio e erro-padrão. A comparação entre os grupos para determinação dos níveis de significância estatística foi realizada por meio da análise de variância de uma via ou duas vias (*One way* ou *Two-way* ANOVA) seguida do teste de Bonferroni para comparações múltiplas.

Na análise histopatológica (item **4.15**) foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para verificar se havia diferença entre os grupos e teste de Mann-Whitney para localizar onde estavam as diferenças estatísticas.

Na análise do item **4.9**, realizou-se a confecção da curva dose-resposta por meio da regressão não linear dos valores obtidos para as doses utilizadas [ Log (dose) ]. No ensaio de avaliação da motricidade após tratamento por via oral (item **4.10**) foi utilizado o teste de t-student para determinação de diferença estatística entre os grupos analisados.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Identificação dos Constituintes do Extrato de *Tabebuia aurea* por CLAE-DAD-EM

Os constituintes de *T. aurea* foram identificados através seus dados espectrais (UV, EM e EM/EM) em comparação com dados publicados para tais constituintes. Os cromatogramas encontram-se ilustrados na **Figura 9** e todos os dados espectrais foram sumariados na **Tabela 1**.

Foram detectados onze metabólitos a partir do extrato de *T. aurea*, sendo estes pertencentes à classe dos iridoides e derivados fenólicos. O principal componente do extrato, o especiosídeo (Figura 5), foi confirmado a partir de injeção de padrão autêntico.

Os picos cromatográficos **2** e **6-11** foram identificados como iridoides glicosilados. Os compostos **6** e **10** produziram íons intensos de  $m/z$  523.1469 e 537.1620  $[M-H]^-$  compatíveis com as fórmulas moleculares  $C_{24}H_{28}O_{13}$  e  $C_{25}H_{30}O_{13}$ , além disso ambos revelaram espectros de UV compatíveis com a presença de ácido cafeico ( $\lambda_{max} = 299$  e  $327$  nm).

O composto **6** apresentou fragmentos de  $m/z$  179 e 161 correspondentes o ácido cafeico seguido de uma perda de água, bem como o íon de  $m/z$  361 que confirma a presença da hexose. Já o composto **10** exibiu os fragmentos 261, 193 e 161, os quais são relativos a clivagem do anel ciclopentano, ácido ferúlico e a hexose. Desta maneira, as substâncias **6** e **10** foram identificadas como rerminosídeo e minecosídeo, ambos iridoides glicosilados ligados a ácidos fenilpropenóicos. Esse perfil de fragmentação é condizente com o descrito na literatura para tais substâncias (AMESSIS-OUCHEMOUKH *et al.*, 2014)

O composto **8** exibiu em seu espectro de UV bandas com absorções máximas em 299 e 313, compatíveis com a presença de um ácido cumárico. Além disso, este composto produziu íons intensos de  $m/z$  509.1595  $[M+H]^+$  e 507.1449.1469  $[M-H]^-$ , compatíveis com a fórmula molecular  $C_{24}H_{28}O_{12}$ . Este íon gerou os seguintes íons fragmento  $m/z$  345 (perda de  $162$  u) que confirma a presença da hexose. Os íons fragmento de  $m/z$  163 e 145 são relativos ao ácido cúmarico com uma subsequente eliminação de água, corroborando com a estrutura proposta. Enquanto que, o íon fragmento de  $m/z$  231 é relativo à clivagem do anel pentano, sendo esta característica de iridoides (HONG *et al.*, 2010; AMESSIS-OUCHEMOUKH *et al.*, 2014).

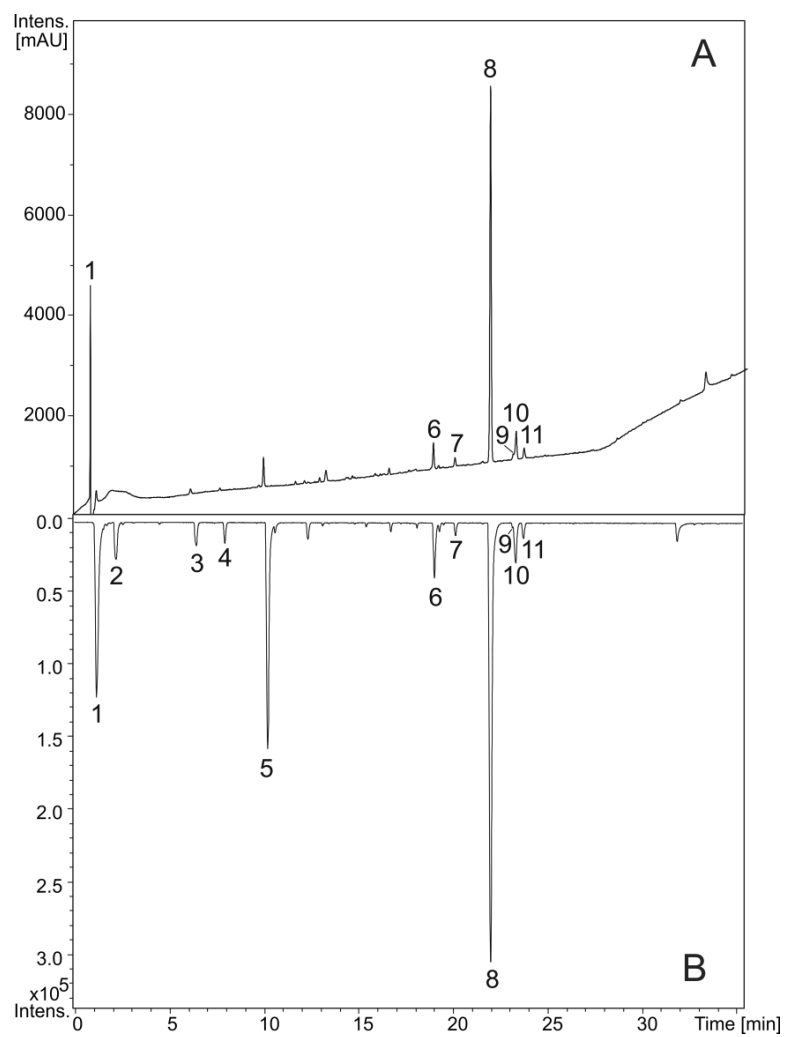
Desta maneira, a identificação do pico **8** foi confirmada através da injeção de padrão, sendo este o iridoide especiosídeo, uma substância já descrita no gênero *Tabebuia* (Nakano et al., 1993). Para os demais iridoídeos, a identificação foi baseada de acordo com as características espectrais descritas aqui, sendo assim os compostos **2**, **7**, **9** e **11** foram identificados catalpol, *O*-cumaroil-harpagideo, *O*-cumaroil-asistasiosideo e *O*-veratroilcatalpol (HONG *et al.*, 2010; AMESSIS- OUCHEMOUKH *et al.*, 2014), respectivamente.

**Tabela 1.** Constituintes identificados no extrato de *Tabebuia aurea* por CLAE-DAD-EM.

Pico	TR (min)	Substância	UV (nm)	FM	<i>m/z</i> [M+H] <sup>+</sup>	<i>m/z</i> [M-H] <sup>-</sup>	<i>m/z</i> -EM/EM (modo negativo)
1	1,1	Di-O-hexoside	-	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	343,1255	341,1089	-
		Tetra-O-hexoside	-	C <sub>24</sub> H <sub>42</sub> O <sub>21</sub>	667,2356	665,2183	383, 179
2	2,2	Catalpol	-	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	385,1129 <sup>Na</sup>	361,1167	169
3	6,5	<i>O</i> -pentosil-hexosil 3,4-dimetoxifenol	280	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>12</sub>	471,1480 <sup>Na</sup>	447,1547	315, 153
4	7,9	NI	280	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>12</sub>	471,1496 <sup>Na</sup>	447,1522	191
5	10,2	NI	280	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>11</sub>	455,1526 <sup>Na</sup>	431,1556	191
6	19,0	Verminosideo	299, 327	C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> O <sub>13</sub>	525.1603	523.1469	361, 179, 161
7	20,1	<i>O</i> -Cumaroil-harpagideo	295, 315	C <sub>24</sub> H <sub>30</sub> O <sub>12</sub>	511.1806	509.1660	329, 163
8	21,5	Especiosideo	299, 313	C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> O <sub>12</sub>	509.1595	507.1449	345, 327, 231, 187, 163, 145
9	23,1	<i>O</i> -Cumaroil-asistasiosideo	299, 313	C <sub>24</sub> H <sub>29</sub> ClO <sub>12</sub>	-	543.1251	507, 345
10	23,3	Minecosideo	299, 327	C <sub>25</sub> H <sub>30</sub> O <sub>13</sub>	539.1759	537.1620	375, 261, 193, 175, 161
11	23,7	<i>O</i> -Veratroilcatalpol	260, 290	C <sub>24</sub> H <sub>30</sub> O <sub>13</sub>	527.1781	525.1604	249, 221, 181, 163

TR: tempo de retenção; FM: fórmula molecular; NI: não identificado; <sup>Na</sup>: [M+Na]<sup>+</sup>. Todas as fórmulas moleculares apresentaram erros menores do que 8 ppm.





**Figura 9.** Cromatogramas do extrato de *Tabebuia aurea* a 220-350 nm (A) e de íons totais em modo negativo (B).

## 5.2. Determinação do Tempo de Resposta e Reposta Máxima da Peçonha

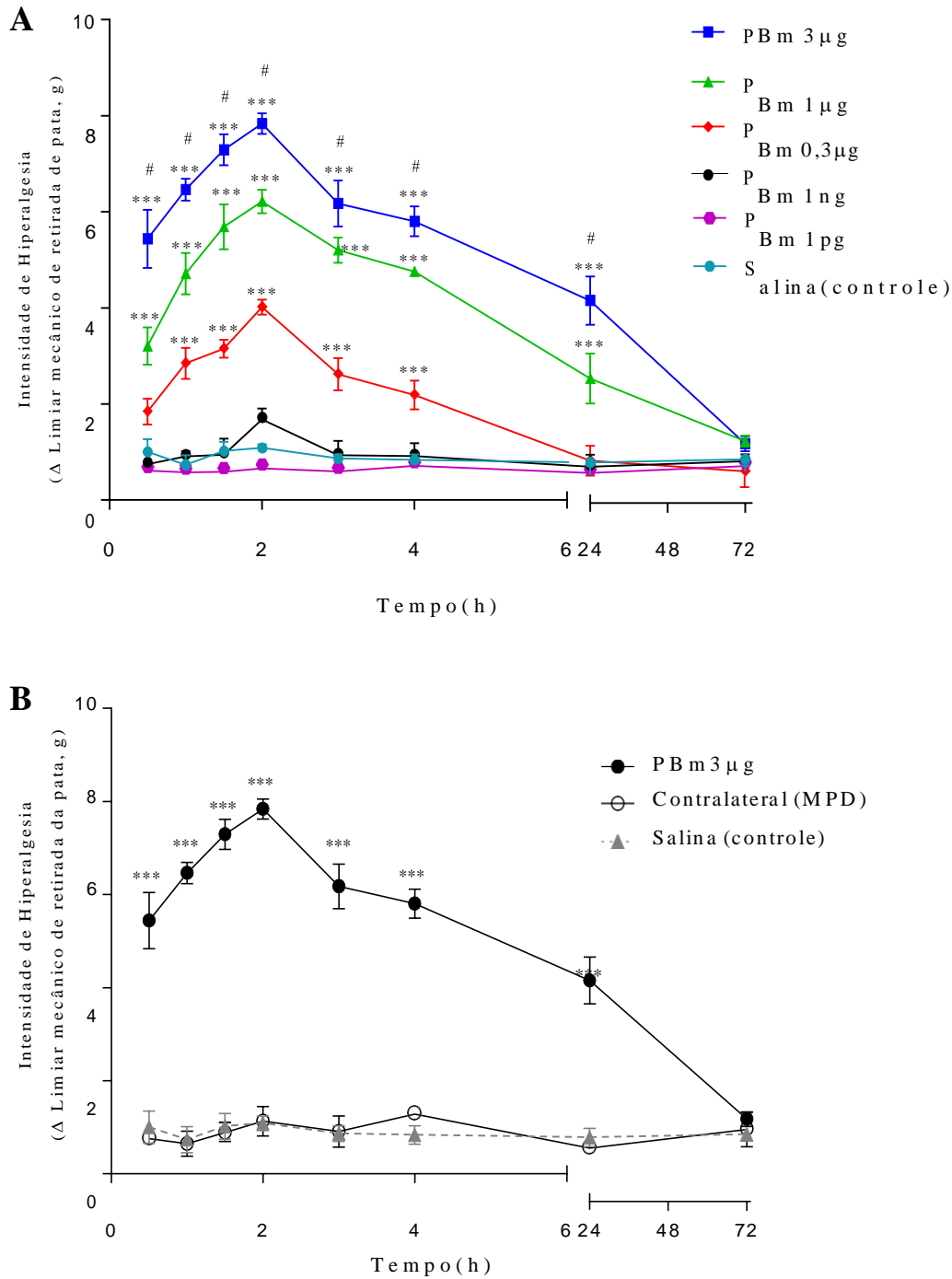
A PBm induziu hiperalgesia de maneira dose-dependente quando comparada com o grupo controle. O efeito hiperalgésico máximo promovido pela PBm ocorreu no tempo de 2 horas após a inoculação, decaindo a seguir e voltando ao limiar basal no tempo de 72 horas após (Figura 10A). Os valores obtidos para os diferentes tempos nos animais tratados com as diferentes doses da PBm encontram-se inseridos no **Quadro 2**.

Não foi evidenciado indução de hiperalgesia no membro pélvico contralateral (MPD) para a dose de 3 µg/animal da PBm (Figura 10B), sendo o mesmo observado para todas as doses restantes (dados não mostrados). Visto que a dose de 3 µg/animal foi a que apresentou máxima hiperalgesia, esta dose foi a utilizada nos ensaios posteriores com o extrato.

**Quadro 2.** Valores da intensidade de hiperalgesia induzida pela PBm, em diferentes doses, após inoculação

Tempo \ Dose	0,5 h	1 h	1,5 h	2 h	3 h	4 h	24 h	72 h
<b>PBm 3 µg</b>	****# 5,44 ± 0,60g	****# 6,46 ± 0,23g	****# 7,29 ± 0,32g	****# 7,84 ± 0,22g	****# 6,17 ± 0,48g	****# 5,80 ± 0,31g	****# 4,15 ± 0,50g	1,17 ± 0,15g
<b>PBm 1µg</b>	*** 3,21 ± 0,38g	*** 4,71 ± 0,43g	*** 5,69 ± 0,47g	*** 6,22 ± 0,25g	*** 5,20 ± 0,27g	*** 4,76 ± 0,10g	*** 2,53 ± 0,52g	1,23 ± 0,11g
<b>PBm 0,3 µg</b>	1,85 ± 0,27g	*** 2,85 ± 0,32g	*** 3,16 ± 0,18g	*** 4,03 ± 0,16g	*** 2,63 ± 0,34g	*** 2,20 ± 0,30g	0,83 ± 0,31g	0,61 ± 0,23g
<b>PBm 1ng</b>	0,78 ± 0,26g	0,94 ± 0,11g	0,98 ± 0,33g	1,74 ± 0,22g	0,97± 0,30g	0,95 ± 0,27g	0,73± 0,25g	0,85 ± 0,15g
<b>PBm 1pg</b>	0,69 ± 0,08g	0,65 ± 0,15g	0,66 ± 0,07g	0,74± 0,11g	0,67± 0,08g	0,79± 0,10g	0,64 ±0,06g	0,79 ± 0,10g
<b>Salina (controle)</b>	1,00 ± 0,35g	0,73 ± 0,28g	1,02 ± 0,28g	1,08 ± 0,16g	0,87 ± 0,17g	0,83 ± 0,20g	0,78 ± 0,20g	0,85± 0,13g

Resultados expressos como média ± EPM (n=6). Símbolos \*\*\* e # indicam  $p < 0,001$  para PBm vs Salina e  $p < 0,05$  para PBm 3 µg vs PBm 1 µg, respectivamente. *Two-way* ANOVA, pós-teste de Bonferroni



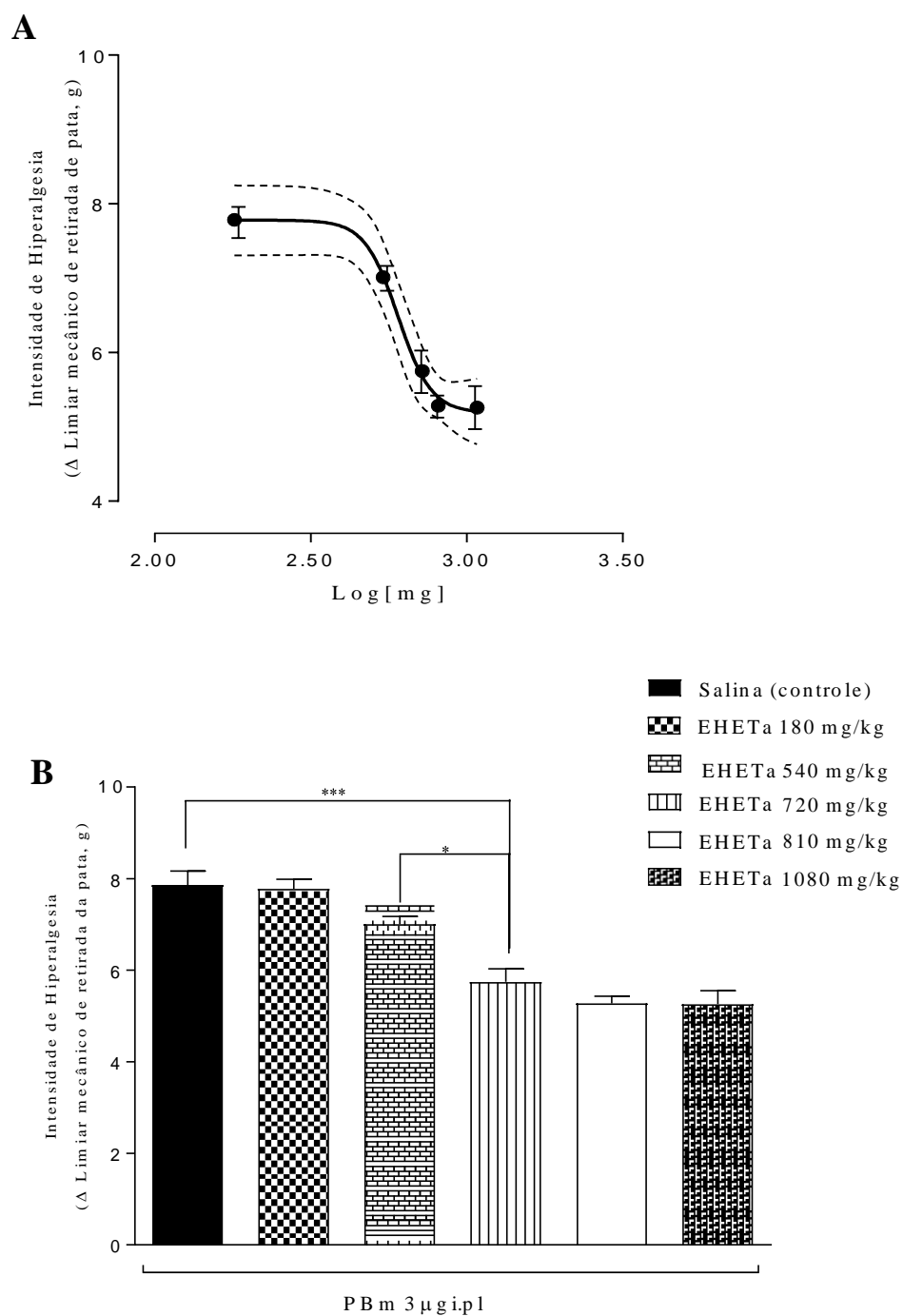
**Figura 10.** Efeito da PBm após inoculação. Animais receberam PBm (1 pg; 1 ng; 0,3  $\mu$ g; 1  $\mu$ g ou 3  $\mu$ g/animal; 30  $\mu$ L; via intraplantar; MPE) ou solução salina estéril (30  $\mu$ L; via intraplantar; MPE). PBm (0,3  $\mu$ g; 1  $\mu$ g ou 3  $\mu$ g/animal) induziu hiperalgesia mecânica nos tempos 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4 e 24 horas após inoculação (A). PBm (3  $\mu$ g/animal) não induziu hiperalgesia mecânica no membro pélvico contralateral (B). Resultados expressos como média  $\pm$  EPM (n=6). Símbolos \*\*\* e # indicam  $p < 0,001$  para PBm vs Salina e  $p < 0,05$  para PBm 3  $\mu$ g vs PBm 1  $\mu$ g, respectivamente. *Two-way* ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

### **5.3.Determinação da Dose Máxima Efetiva para Tratamento por Via Oral: curva dose-resposta**

O EHETa reduziu de maneira dose-dependente a hiperalgesia induzida pela PBm (Figura 11A). A redução significativa na hiperalgesia induzida pela PBm ocorreu a partir da dose de 720 mg/kg, não havendo diferença significativa esta e as doses superiores analisadas, 810 mg/kg e 1080mg/kg (Figura 11B).

A intensidade de hiperlagesia ou delta limiar mecânico de retirada da pata foi em média de  $7,80 \pm 0,39$  g para os animais do grupo controle, isto é, aqueles que receberam solução salina por via oral como tratamento. Um valor muito próximo a este,  $7,78 \pm 0,21$  g foi encontrado para os animais tratados com 180 mg/kg do EHETa, resultado que representou apenas 0,26% de inibição da hiperalgesia.

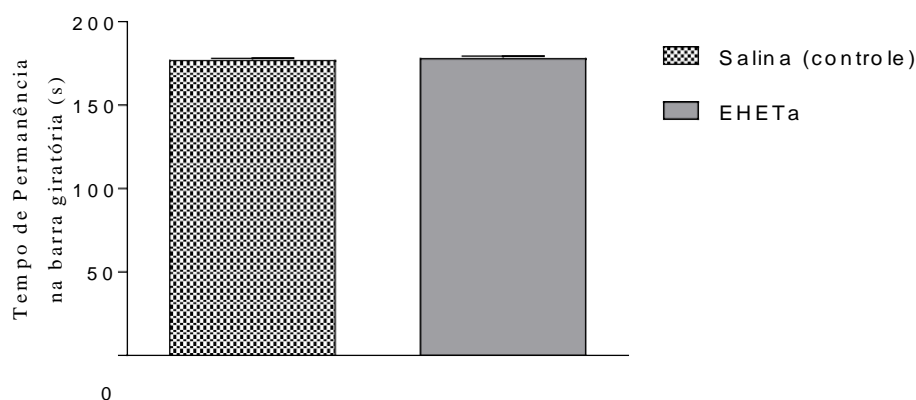
Os percentuais de redução de intensidade de hiperalgesia para as demais doses do EHETa superiores a 180 mg/kg analisadas (Figura 11B) foram de 10,13% ( $7,01 \pm 0,17$ g), 26,29% ( $5,75 \pm 0,29$ g), 32,31% ( $5,28 \pm 0,15$ g) e 32,57% ( $5,26 \pm 0,29$ g), respectivamente, para as doses de 540, 720, 810 e 1080 mg/kg do extrato.



**Figura 11.** Efeito dose-dependente do EHETa (180, 540, 720, 810 ou 1080mg/kg; 10mL/kg; via oral) na redução da hiperálgia induzida pela PBm (3 $\mu$ g/animal; 30  $\mu$ L; via intraplantar). Doses (mg) expressas pela média  $\pm$  E.P.M (n=6) ( $R^2= 0,8257$ ; GL = 21 ; SQ = 5,355). SQ = soma absoluta dos quadrados; GL = graus de liberdade (A). Símbolos \* e \*\*\* indicam  $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ , respectivamente; *One-way* ANOVA, pós-teste de Bonferroni (B).

#### 5.4. Avaliação da Motricidade e Sinais de Ataxia após Tratamento por Via Oral

Não foi observado diferença estatística entre os animais submetidos ao tratamento com o EHETa e os animais controle (Figura 12). Para os animais tratados com EHETa (720 mg/kg; 10 mL/kg; via oral) o tempo de permanência na barra giratória foi de  $178,4 \pm 1,07$  s, e para os animais controle (salina; 10 mL/kg; via oral) o tempo de permanência foi de  $177,2 \pm 0,86$  s.

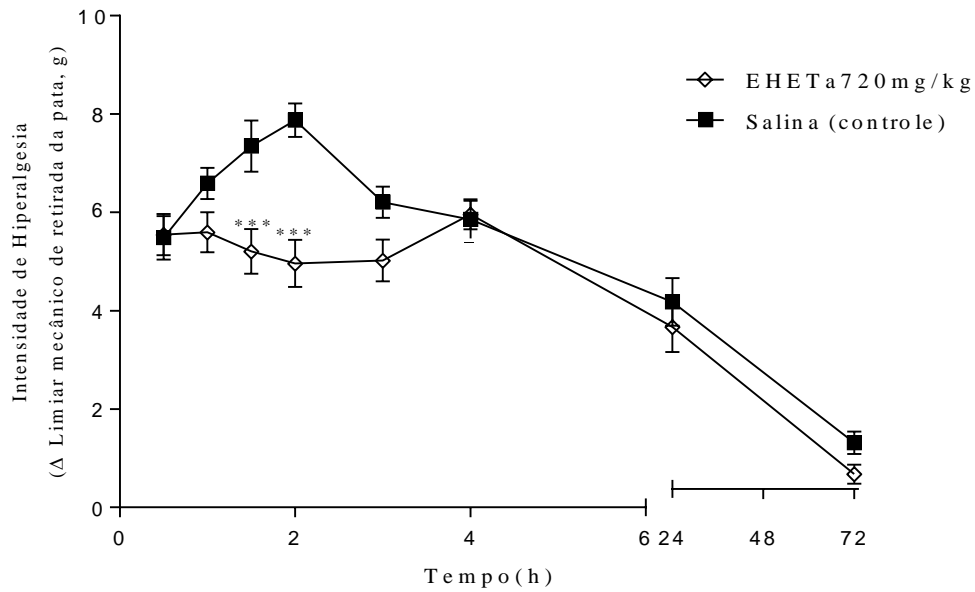


**Figura 12.** Gráfico do efeito do EHETa sob a motricidade dos animais. Animais receberam EHETa (720mg/kg; 10mL/kg; via oral) ou solução salina estéril (controle; 10mL/kg; via oral) 90 minutos antes do experimento. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM (n= 4). Teste t – student.

#### 5.5. Análise Temporal da Resposta ao Tratamento por Via Oral

A análise temporal da resposta ao tratamento com EHETa por via oral revelou que o início de resposta significativa do extrato na hiperalgesia induzida pela PBm ocorreu no tempo de 1,5 horas após a administração desta, com efeito máximo no tempo de 2 horas, e decaimento após este período (Figura 13).

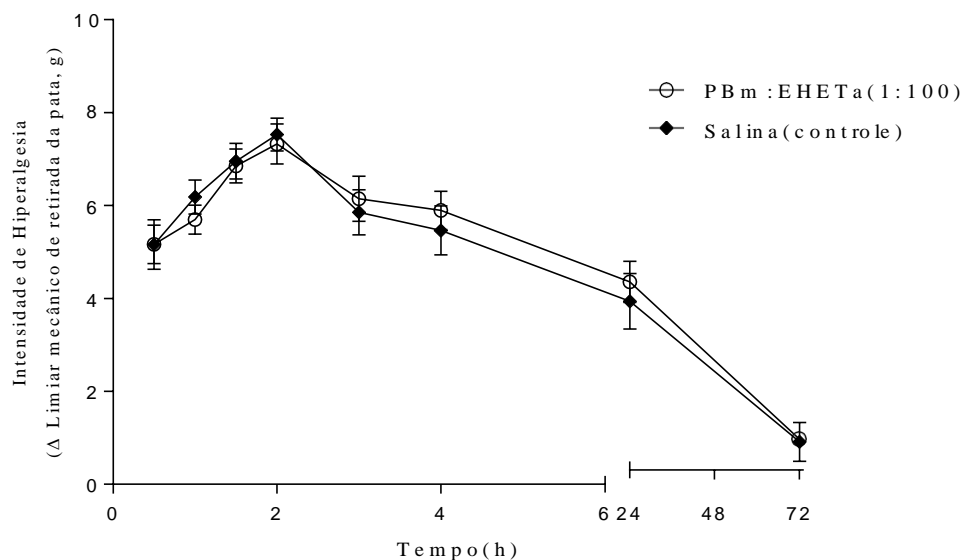
A intensidade de hiperalgesia promovida pela PBm no tempo 1,5 horas e 2 horas para o grupo controle foi de  $7,35 \pm 0,52$ g e  $7,89 \pm 0,34$ g, respectivamente. Nestes mesmos tempos, para os animais tratados com o EHETa a intensidade de hiperalgesia foi de  $5,20 \pm 0,47$ g e  $4,96 \pm 0,48$ g, respectivamente, obtendo percentual de redução de intensidade de 29,26% e 37,14% em relação ao grupo controle.



**Figura 13.** Gráfico resposta vs tempo após pré-tratamento com EHETa. Animais receberam EHETa (720 mg/kg; 10 mL/kg; via oral) ou solução salina estéril (controle; 10mL/kg; via oral) 30 minutos antes da aplicação da Pbm (3 µg/animal; 30µL; via intraplantar; MPE). EHETa reduz hiperalgesia nos tempos 1,5 e 2 h após inoculação da Pbm. Resultados expressos como média ± EPM (n=6). *Two-way* ANOVA, pós-teste de Bonferroni. Símbolo \*\*\* indica  $p < 0,001$  quando comparado com grupo controle.

## 5.6. Análise Temporal da Resposta ao Tratamento por Via Subcutânea

A mistura de PBm:EHETa (1:100) não foi capaz de reduzir a hiperalgesia induzida pela PBm quando injetada após incubação (Figura 14), não obtendo diferença estatística em relação ao grupo controle.



**Figura 14.** Gráfico resposta vs tempo após tratamento com a mistura previamente incubada de PBm:EHETa (1:100; 30  $\mu$ L; via intraplantar; MPE). Animais receberam a mistura previamente incubada de PBm:EHETa ou a mistura previamente incubada de PBm:Salina (controle; 30  $\mu$ L; via intraplantar; MPE). PBm:EHETa (1:100) não reduziu a hiperalgesia induzida pela PBm. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM (n=6). *Two-way* ANOVA, pós-teste de Bonferroni.



## 5.7. Análise Histopatológica

Os resultados da análise histopatológica para os animais tratados com a dose efetiva do EHETa administrada por via oral ou com a mistura PBm:EHETa, nos diferentes tempos, 2 horas ou 72 horas após inoculação da PBm ou tratamentos, encontram-se dispostos na **Tabela 2** e **Tabela 3**, respectivamente.

Nas análises feitas com os animais que reberam salina ou EHETa, duas horas após a inoculação da PBm, preponderantemente notou-se a presença de intensa lesão hemorrágica, de caráter difuso, estendendo-se por todo o campo analisado (Tabela 2; Figura 15A; B). Um padrão similar foi visto para os animais que receberam a mistura incubada de PBm: EHETa ou PBm:NaCl 0,9%, que apresentaram lesão hemorrágica moderada (Tabela 2; Figura 15C; D).

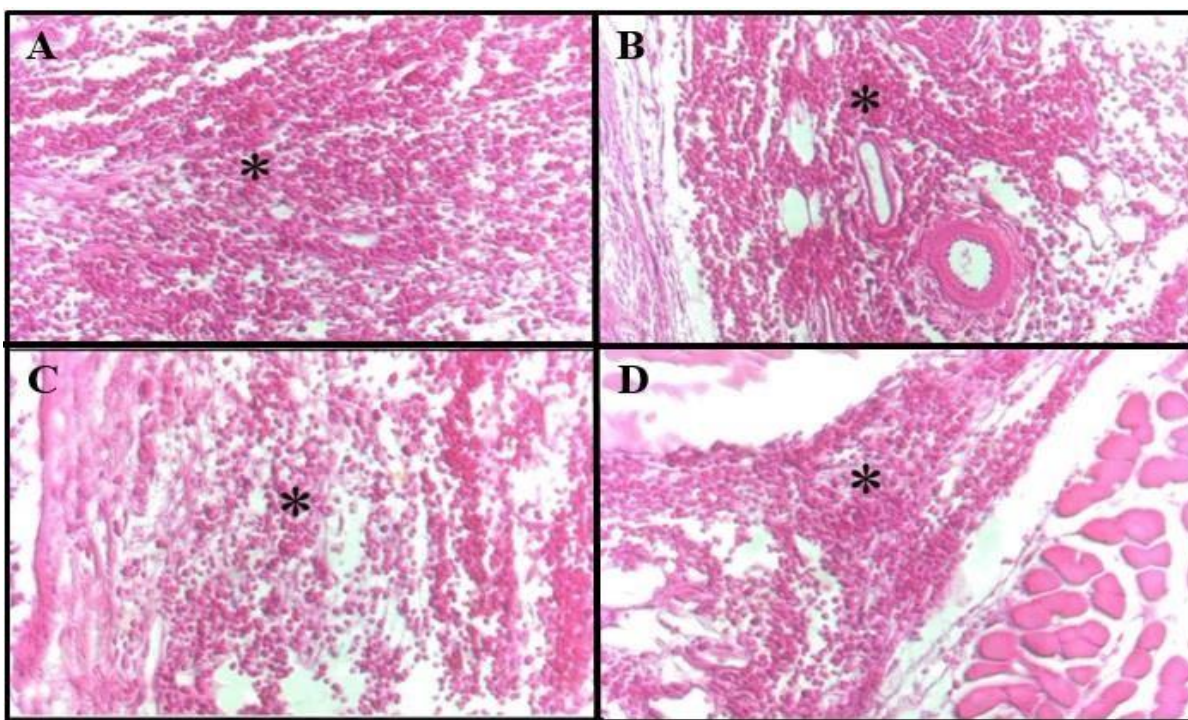
Com relação ao infiltrado inflamatório, os animais tratados com salina por via oral apresentaram infiltrado moderado (Tabela 2), com predomínio de neutrófilos. No período de 72 horas após a peçonha, este infiltrado evoluiu de moderado para intenso apresentando também predominância de neutrófilos (Tabela 3; Figura 15E). No entanto, nestes mesmos tempos, para os animais que receberam EHETa via oral, este mesmo tipo de infiltrado inflamatório apresentou-se menor e de caráter leve (Tabela 2, 3; Figura 15F).

Nas análises feitas com a mistura PBm:EHETa, observou-se infiltrado inflamatório de caráter leve, com menor predomínio de neutrófilos no sítio da lesão em relação ao grupo controle, que recebeu PBm:NaCl 0,9%. Neste grupo, o infiltrado inflamatório foi de caráter moderado. Estes mesmos resultados foram observados para estes mesmos grupos também no tempo de 72 horas (Tabela 2, 3; Figura 15G, H).

**Tabela 2.** Valores de escore da análise histopatológica para grupos que foram tratados com EHETa via oral ou a mistura incubada de PBm:EHETa. A lesão hemorrágica e o infiltrado inflamatório foram avaliados duas horas após a inoculação da PBm ou dos tratamentos.

Lesão \ Tratamento	EHETa 720 mg/kg	NaCl 0,9%	PBm:EHETa	PBm:NaCl 0,9%
Hemorragia	8 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>	6 <sup>d</sup>	6 <sup>d</sup>
Infiltrado inflamatório	4 <sup>b</sup>	6 <sup>c</sup>	4 <sup>b</sup>	6 <sup>c</sup>

Extrato Hidroetanólico de *Tabebuia aurea* (EHETa); Mistura pré-incubada da peçonha de *Bothrops mattogrossensis* com EHETa (PBm:EHETa) ou salina estéril (PBm:NaCl 0,9%). Hemorragia e infiltrado inflamatório avaliados duas horas após PBm para animais que foram tratados com EHETa e solução NaCl 0,9% estéril (controle) ou duas horas após a inoculação da mistura pré-incubada, para animais tratados com PBm:EHETa e PBm: NaCl 0,9%. Escores: 2, ausência de lesão; 4, lesão leve; 6, lesão moderada; 8, lesão intensa. Valores representados em medianas. Letras distintas comparadas entre colunas indicam diferença estatística significativa ( $p < 0.05$ ). Teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

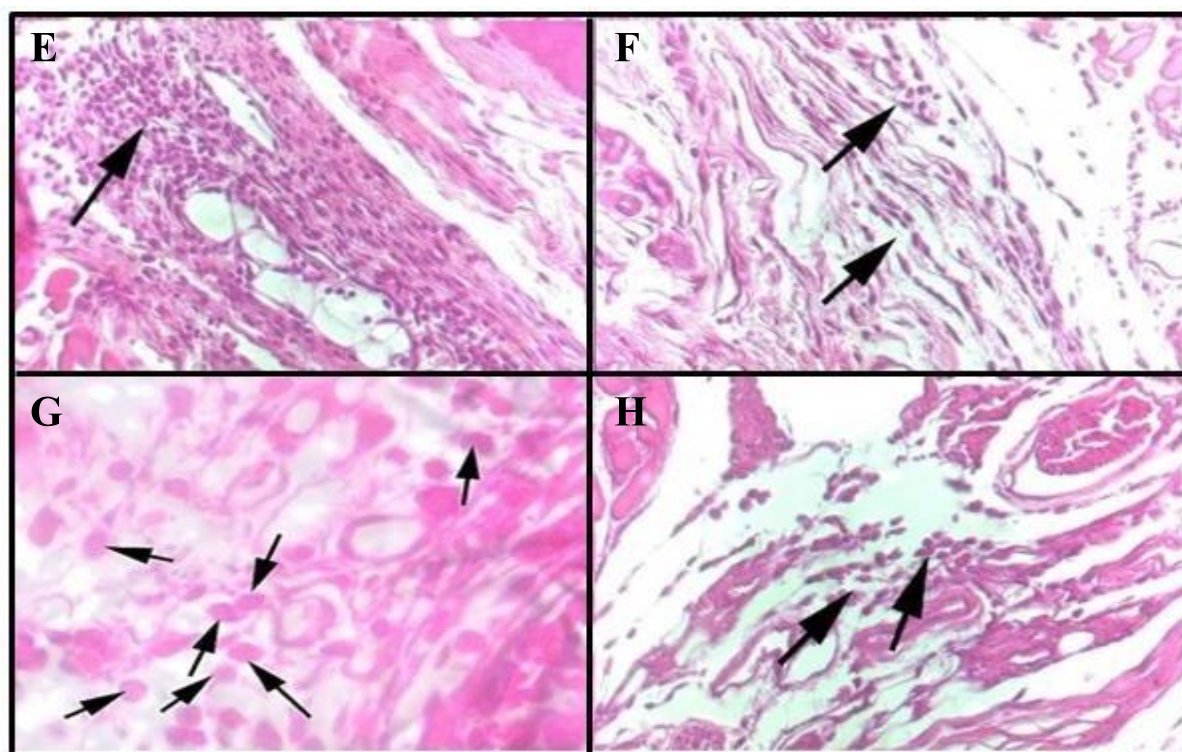


**Figura 15.** Cortes histológicos de 5 µm de espessura do tecido subcutâneo plantar do membro pélvico esquerdo de camundongos *Swiss*. Amostras foram coletadas duas horas após a inoculação de PBm para animais tratados com salina (A) ou EHETa (B), ou duas horas após tratamentos para animais tratados com PBm:NaCl 0,9% (C) ou PBm:EHETa (D). Asterisco - área hemorrágica; Setas - células inflamatórias. Coloração Hematoxilina - Eosina.

**Tabela 3.** Valores de escore da análise histopatológica para grupos que foram tratados com EHETa via oral ou a mistura incubada de PBm:EHETa. A lesão hemorrágica e o infiltrado inflamatório foram avaliados 72 horas após a inoculação da PBm ou dos tratamentos.

Lesão \ Tratamento	EHETa 720 mg/kg	NaCl 0,9%	PBm: EHETa	PBm:NaCl 0,9%
Hemorragia	2 <sup>e</sup>	2 <sup>e</sup>	2 <sup>e</sup>	2 <sup>e</sup>
Infiltrado inflamatório	4 <sup>f</sup>	8 <sup>g</sup>	4 <sup>f</sup>	6 <sup>h</sup>

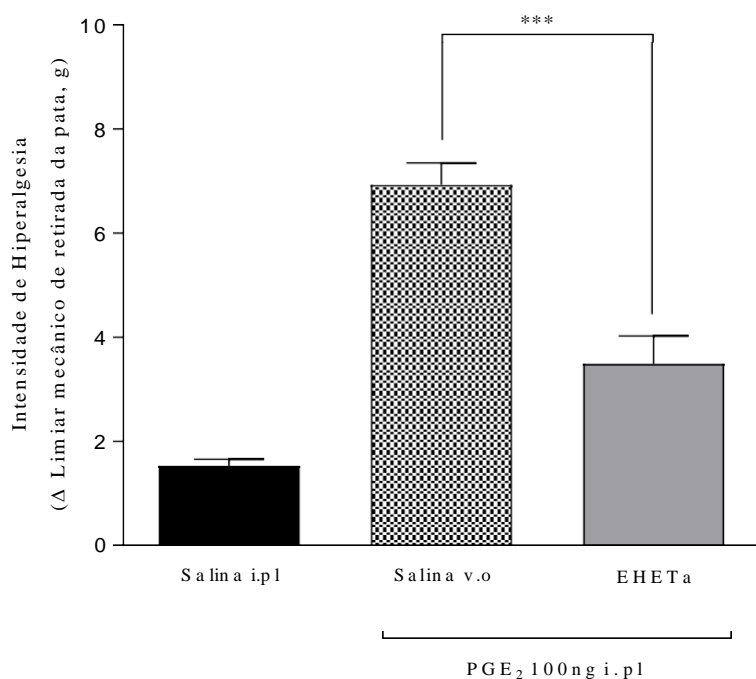
Extrato Hidroetanólico de *Tabebuia aurea* (EHETa); Mistura pré- incubada da peçonha de *Bothrops matogrossensis* com EHETa (PBm:EHETa) ou salina estéril (PBm: NaCl 0,9%). Hemorragia e infiltrado inflamatório avaliados 72 horas após PBm para animais que foram tratados com EHETa e solução NaCl 0,9% estéril (controle) ou 72 horas após a inoculação da mistura pré-incubada, para animais tratados com mistura PBm:EHETa e PBm: NaCl 0,9%. Escores: 2, ausência de lesão; 4, lesão leve; 6, lesão moderada; 8, lesão intensa. Valores representados em medianas. Letras distintas comparadas entre colunas indicam diferença estatística significativa ( $p < 0.05$ ). Teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.



**Figura 16.** Cortes histológicos de 5  $\mu$ m de espessura do tecido subcutâneo plantar do membro pélvico esquerdo de camundongos *Swiss*. Amostras foram coletadas 72 horas após a inoculação de PBm para animais tratados com salina (E) ou EHETa (F), ou 72 horas após tratamentos para animais tratados com PBm:NaCl 0,9% (G) ou PBm:EHETa (H). Asterisco - área hemorrágica; Setas - células inflamatórias. Coloração Hematoxilina – Eosina.

## 5.8. Avaliação da Resposta ao Tratamento por Via Oral em Modelo de Hiperálgia induzida pela Prostaglandina E<sub>2</sub>

O EHETA reduziu a hiperálgia induzida pela PGE<sub>2</sub> (Figura 17). Para o grupo controle tratado com salina via oral, a intensidade de hiperálgia foi de  $6,92 \pm 0,41$  g. No grupo tratado com EHETA, a intensidade de hiperálgia foi de  $3,48 \pm 0,53$  g, obtendo percentual de redução de intensidade de 49,72% em relação ao grupo controle.



**Figura 17.** Gráfico do efeito do EHETA na redução da hiperálgia mecânica induzida pela PGE<sub>2</sub>. Animais receberam EHETA (720 mg/kg; 10 mL/kg; via oral) ou solução salina estéril (controle; 10 mL/kg; via oral) 90 minutos após inoculação de PGE<sub>2</sub> (30 µL; 100 ng/pata; via intraplantar; MPE). Resultados expressos como média  $\pm$  EPM (n=6). *One-way* ANOVA, pós-teste de Bonferroni. Símbolo \*\*\* indica  $p < 0,001$  para EHETA vs Controle.

## 6. DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou o efeito anti-hiperalgésico do extrato hidroetanólico da *Tabebuia aurea* em modelo de hiperalgesia induzida pela inoculação da peçonha de *Bothrops matogrossensis*.

Inicialmente, foi realizada a confecção de uma curva dose-resposta-tempo utilizando diferentes doses nóxias e não necrosantes da peçonha, determinando seu pico de ação e a cinética do efeito hiperalgésico em um período de 72 horas.

Os resultados obtidos com a curva dose-resposta-tempo mostram que a PBm induz uma hiperalgesia dose e tempo dependente, de caráter local e efeito máximo duas horas após sua inoculação, decaindo após este período. Para as doses de 1 e 3 µg/animal, este efeito hiperalgésico perdurou até o tempo de 24 horas, voltando aos limiares basais em 72 horas.

Esta bem estabelecido que as células inflamatórias contribuem diretamente para lesão tecidual induzida pela peçonha botrópica, sendo que o curso temporal do evento inflamatório induzido por sua inoculação dura em média, de 24 horas a 72 horas e a magnitude da resposta é proporcional a quantidade de peçonha inoculada (DOURADO *et al.*, 2011; QUEIROZ *et al.*, 2011; TEIXEIRA *et al.*, 2009)

Desta forma, é possível que o maior efeito hiperalgésico evidenciado para as doses de 1 e 3 µg/animal seja em decorrência de uma maior resposta inflamatória induzida por essas doses. Uma vez que isto implicaria em uma maior duração e intensidade do evento inflamatório e as citocinas e mediadores hiperalgésicos produzidos no local da lesão como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e PGE2 (CHAVES *et al.*, 2005; MOREIRA *et al.*, 2007; WANDERLEY *et al.*, 2014) poderiam estar contribuindo para a manutenção da hiperalgesia, justificando o efeito ainda presente no período de 24 horas.

Em uma segunda etapa, estabelecido a dose e pico de ação máximo para o efeito hiperalgésico da peçonha, foi investigado o efeito anti-hiperalgésico de diferentes doses do extrato hidroetanólico da *Tabebuia aurea* frente a hiperalgesia máxima induzida pela PBm. Para tanto, uma curva dose-resposta foi realizada com o extrato.

O EHETa administrado por via oral reduziu a hiperalgesia promovida pela PBm em duas horas após sua inoculação, momento em que esta atingia seu efeito hiperalgésico máximo. O efeito significativo na redução da hiperalgesia foi observado partir da dose de 720 mg/kg, não tendo diferença significativa entre esta e as doses subsequentes utilizadas (810 e 1080 mg/kg). Desta forma, a dose de 720 mg/kg foi considerada a dose máxima efetiva e utilizada nos ensaios posteriores.

Em sequência, estabelecida a dose efetiva, avaliamos o efeito do tratamento oral com o extrato na coordenação motora dos animais utilizando o teste do *Rota rod*. Não foi evidenciado comprometimento da coordenação motora nos animais tratados com o EHETa. Isto mostra que os dados obtidos com a curva dose-resposta do extrato indicam que resposta comportamental decorre de um aumento do limiar nociceptivo dos animais e não de um comprometimento motor no reflexo de retirada do membro pélvico, corroborando o efeito anti-hiperalgésico do extrato.

A análise temporal realizada com o EHETa administrado por via oral evidenciou que sua ação significativa na redução da hiperalgesia induzida pela PBm tinha início no tempo de 1,5 horas após a administração da peçonha, com efeito máximo no tempo de 2 horas após. Curiosamente, a análise temporal para o tratamento por via subcutânea com a mistura pré-incubada PBm:EHETa demonstrou resultados contrários aos obtidos durante as análises realizadas para o tratamento oral: observou-se a perda da atividade anti-hiperalgésica do extrato.

No entanto, os resultados obtidos com a análise histopatológica mostraram que tanto os grupos tratados com o EHETa administrado por via oral quanto os grupos que receberam a mistura PBm:EHETa apresentaram significativamente menor infiltrado inflamatório em relação aos animais do grupo controle.

Posteriormente, uma análise experimental extra foi realizada com o extrato. Dado que o EHETa poderia estar interferindo na ação hiperalgésica da prostaglandina E<sub>2</sub>, um dos principais mediadores hiperalgésicos presentes no sítio da lesão após a inoculação da peçonha botrópica (MOREIRA *et al.*, 2007, 2009, 2012) e que contribui diretamente para a manutenção do quadro clínico de dor no acidente botrópico, analisamos o efeito do tratamento oral com o extrato no modelo de hiperalgesia induzida pela inoculação de prostaglandina E<sub>2</sub>.

Os resultados mostraram que o EHETa foi capaz de reverter a hiperalgesia previamente estabelecida pela PGE<sub>2</sub> quando administrado por via oral 90 minutos após este mediador, indicando efeito anti-nociceptivo do extrato.

A análise fitoquímica para identificação dos constituintes do extrato hidroetanólico da *Tabebuia aurea* revelou a presença de 11 metabólitos pertencentes a classe dos iridóides glicosilados e derivados fenólicos, dentre estes, os iridóides Catalpol, Minecosídeo, Verminosídeo e o Especiosídeo, este último apontado como composto majoritário do extrato.

Considerando os iridóides glicosilados Catalpol, Minecosídeo e Verminosídeo, estudos na literatura já mostraram atividade anti-inflamatória *in-vitro* para estes compostos. Dentre os mecanismos anti-inflamatórios principais relatados estão: inibição da síntese de óxido nítrico (NO), inibição da síntese de citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , inibição da síntese de PGE<sub>2</sub>, e inibição de expressão de enzimas COX-II (AN *et al.*, 2002; BAS *et al.*, 2007a; 2007b; PAE *et al.*, 2003; PARK *et al.*, 2007; QIU *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2011).

Em relação ao Especiosídeo, algumas atividades na literatura são relatadas: Asthana e colaboradores (2015) demonstraram que este composto modula o estresse oxidativo, diminuindo a formação de espécies reativas de oxigênio, apresentando atividade antioxidante. Além desta atividade antioxidante, Moslaves (2016), concluiu que o tratamento com o especiosídeo via oral e incubado previamente com as peçonhas de *Bothrops jararaca*, *Bothrops moojeni*, e *Bothrops mattogrossensis*, foi capaz de reduzir o influxo de células polimorfonucleares, corroborando os achados de Reis *et al.* (2014) que identificaram atividade anti-inflamatória do EHETa frente a PBm.

Como relatado anteriormente, sabe-se que além da participação de células mono e polimorfonucleares no evento inflamatório induzido pela peçonha botrópica, têm-se a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ), prostanóides (PGE<sub>2</sub>), espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e também participação de enzimas COX-II (MOREIRA *et al.*, 2012; 2007; WANDERLEY *et al.*, 2014). Adicionalmente, este conjunto de fatores também é o responsável por promover a manutenção do quadro de hiperalgesia relacionado ao envenenamento botrópico (CHACUR *et al.*, 2003; 2004b; TEIXEIRA *et al.*, 1993; 2009)

Sendo assim, dado que em todas as análises realizadas com o extrato via oral os tratamentos foram feitos previamente a inoculação da peçonha, é possível que os mecanismos anti-inflamatórios relatados aos iridóides glicosilados estejam envolvidos no efeito anti-hiperalgésico do extrato. Desta forma, o EHETa quando administrado via oral poderia estar prevenindo a hiperalgesia induzida pela ação destes compostos, visto que as

atividades farmacológicas produzidas pela ação da peçonha são antagonizadas por componentes presentes no extrato.

Com relação aos mecanismos anti-nociceptivos, alguns iridóides glicosilados como o Shanzhisídeo, Asperulosídeo e Scandosídeo, apresentam atividade dependente do sistema opióide e também promovem ativação da via L-arginina/NO/GMPc/PKG (FAN *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2012), esta última está envolvida na analgesia *in-vivo* induzida por medicamentos já consagrados como a dipirona (DOS SANTOS *et al.*, 2014; SACHS *et al.*, 2002). Logo, uma vez que o especiosídeo é também um iridoide glicosilado e está presente em grandes concentrações no EHETa, é possível que estes mecanismos também possam estar envolvidos na antinocicepção promovida pelo extrato.

Outro ponto a se considerar, é que determinados compostos presentes na classe dos iridóides glicosilados necessitam de hidrólise enzimática via enzima  $\beta$ -glicosidase para exercerem suas atividades farmacológicas. Em estudos feitos por Park *et al.* (2007) e Zhang *et al.* (2011) a hidrólise prévia com esta enzima foi necessária para que os iridóides glicosilados Aucubin, Harpagídeo, Loganina, entre outros analisados, apresentassem diferentes atividades anti-inflamatórias como inibição da síntese de TNF- $\alpha$ , inibição da síntese de NO e inibição da enzima COX-II.

Deste modo, em decorrência da presença majoritária do especiosídeo e tomados juntos os resultados das análises que investigaram a resposta ao tratamento oral e local com o extrato, é possível que o EHETa esteja atuando por dois diferentes mecanismos:

1. Via oral, atuando como pró-fármaco, considerando que o especiosídeo necessite de hidrólise enzimática prévia via  $\beta$ -glicosidase para manutenção de sua atividade farmacológica, e o que também justificaria os efeitos anti-hiperalgésicos e anti-nociceptivo obtidos com a análises realizadas.
2. Localmente, realizando antagonismo químico a peçonha, o que justificaria o menor influxo leucocitário evidenciado para a mistura PBm: EHETa durante a análise histopatológica.

Considerando a segunda premissa, ressalta-se que a fisiopatologia da peçonha botrópica promove alterações em 3 componentes principais: hemostático, vascular e muscular. Particularmente as metaloproteinases e fosfolipases A<sub>2</sub>, promovem a lise direta de células endoteliais e musculares, e conjuntamente, induzem um evento nociceptivo



direto no tecido afetado (GUTIERREZ; OWNBY, 2003; GUTIERREZ; RUCAVADO, 2000; FRANÇA; MALAQUE, 2009).

Conseqüentemente, estas toxinas também induzem a hiperalgesia por promoverem a apoptose celular, e com isso, síntese de citocinas pró-inflamatórias e recrutamento celular diretamente para o sítio da lesão. As células inflamatórias por sua vez contribuem para lesão tecidual e manutenção da resposta nociceptiva através da produção de moléculas citotóxicas e mediadores inflamatórios capazes de induzirem sensibilização nos nociceptores (HUCHO;LEVINE, 2007).

Assim, visto que a peçonha botrópica possui diferentes componentes que atuam de modo conjunto promovendo lesão tecidual e resposta inflamatória, o antagonismo químico realizado pelo EHETa talvez não seja suficiente para prevenir a hiperalgesia desencadeada pela PBm.

## 7. CONCLUSÕES

A peçonha de *Bothrops matogrossensis* induz hiperalgesia de caráter local, dose e tempo dependente, com efeito máximo em duas horas após sua inoculação e duração de 24 horas.

O Extrato Hidroetanólico de *Tabebuia aurea*, quando administrado sistemicamente, foi capaz de reduzir a hiperalgesia da peçonha de maneira dose e tempo dependente, com efeito máximo no tempo de 2 horas após a PBm. Quando incubado juntamente com a peçonha e administrado localmente, por via subcutânea, este composto também foi capaz de realizar antagonismo químico e diminuir a lesão inflamatória tecidual.

Em síntese, tomando-se uma perspectiva terapêutica, os dados obtidos com este trabalho mostram que o extrato hidroetanólico da *Tabebuia aurea* pode representar uma alternativa terapêutica complementar a soroterapia antiofídica do envenenamento botrópico, amenizando a dor e o evento inflamatório local induzidos pela peçonha, e com isso, contribuir para um melhor prognóstico dos pacientes em terapia.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. L. C.; BIRD, R. J. Review article: Coagulation cascade and therapeutics update: Relevance to nephrology. Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants. **Nephrology**, v. 14, p. 462-470, 2009.

AIRD, S. D.; JORGE DA SILVA, N. Comparative studies enzymatic of Brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms. **Comparative Biochemistry & Physiology**, v. 99B, n. 2, p. 287-294, 1991.

AMESSIS- OUCHEMOUKH, N., et al. Tentative Characterisation of Iridoids, Phenylethanoid Glycosides and Flavonoid Derivatives from *Globularia alypum* L. (*Globulariaceae*) Leaves by LC-ESI-QTOF-MS. **Phytochemical Analysis** v. 25, p. 389-398, 2014.

AN, S.J.; PAE, H.O.; OH, G.S.; CHOI, B.M.; JEONG, S.; JANG, S.I.; OH, H.; KWON, T.O.; SONG, C.E.; CHUNG, H.T. Inhibition of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 productions and NF- $\kappa$ B activation in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 macrophages by catalposide, and iridoid glycoside isolated from *Catalpa ovata* G. Don (*Bignoniaceae*). **International Immunopharmacology**, v. 2, p. 1173-1181, 2002.

ANTUNES, T. C.; YAMASHITA, K. M.; BARBARO, K. C.; SAIKI, M.; SANTORO, M. L. Comparative analysis of newborn and adult *Bothrops jararacas* snake venoms. **Toxicon**, v. 56, p. 1453-1458, 2010.

ARAGON, D. C.; QUEIROZ, J. A. M.; MARTINEZ, E. Z. Incidence of snakebites from 2007 to 2014 in the State of São Paulo, Southeast Brazil, using a Bayesian time series model. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 4, p.515-519, 2016.

ARALDI, D.; FERRARI, L.F.; LOTUFO, C.M.; VIEIRA, A.S.; ATHIÉ, M.C.P.; FIGUEIREDO, J.G.; DUARTE, D.B.; TAMBELI, C. H.; FERREIRA, S. H.; PARADA, C.A. Peripheral inflammatory hyperalgesia depends on the cox increase in the dorsal root ganglion. **PNAS**, v. 110. n. 9. p. 3603 – 3608, 2013.

ARNI, R.K.; WARD, R.J. Phospholipase A2: a structural review. **Toxicon**, v. 34, p. 827–841, 1996.

BALDO, C.; JAMORA, C.; YAMANOUYE, N.; ZORN, T. M.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Mechanism of vascular damage by hemorrhagic snake venom metalloproteinases: tissue distribution and in situ hydrolysis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 6, p. 1-10, 2010.

BAS, E. Inhibition of the pro-inflammatory mediators' production and anti-inflammatory effect of the iridoid scrovalentinoside. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 419-427, 2007a.

- BAS, E.; RECIO, M. C.; MANEZ, S.; GINER, R. M.; ESCANDELL, J. M.; LOPEZGINES, C.; RIOS, J. L. New insight into the inhibition of the inflammatory response to experimental delayed type hypersensitivity reactions in mice by scropolioside A. **European Journal of Pharmacology**, v.555, p. 199-210, 2007b.
- BASBAUM, A.I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, p. 267-284, 2009.
- BASBAUM, A.; JESSEL, T. The Perception of Pain. Disponível em: KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H. **Principles of Neuroscience**, p. 199-212. Elsevier: Nova York, 2000.
- BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. Pain. Disponível em: BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neuroscience: exploring the brain**. 4ª ed. Wolters Kluwer, Nova York, p. 437-453, 2014.
- BERNARDE, P. S.; GOMES, J. O. Serpentes peçonhentas e ofidismo em Cruzeiro do Sul, Alto Juruá, Estado do Acre, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 42, n. 1, p. 65-72, 2012.
- BESSON, J. M. The neurobiology of pain. **Lancet**, v. 353, p. 1610-1615, 1999. BYERS; M. R.; BONICA, J. J. Peripheral Pain Mechanisms and Nociceptor Plasticity. Disponível em: BONICA, J.J. **The management of pain**. 3ª ed. Philadelphia, 2001a. p. 68-99.
- BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 1, p. 7 - 16, 2003.
- BONAVITA, A. G. C.; COSTA, A. S.; PIRES, A. L. A.; NEVES-FERREIRA, A. G. C.; PERALES, J.; CORDEIRO, R. S. B.; MARTINS, M. A.; SILVA, P. M. R. Contribution of mast cells and snake venom metalloproteinases to the hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom in rats. **Toxicon**, v. 47, p. 885 - 893, 2006.
- BROOKS, J.; TRACEY, I. From nociception to pain perception: imaging the spinal and supraspinal pathways. **Journal of Anatomy**, v. 207, p. 19-33, 2005.
- BROWN, A. G. The Dorsal Horn of the Spinal Cord. **Quarterly Journal of Experimental Physiology**, v. 67, p. 193-212, 1982.
- BROWN, W. J., CHAMBERS, K., DOODY, A. Phospholipase A2 (PLA2) enzymes in membrane trafficking: mediators of membrane shape and function. **Traffic**, v. 4 (4), p. 214-221, 2003.
- BUTLER, R. K.; FINN, D. P.; Stress- induced analgesia. **Progress in neurobiology**, v. 88, p. 184-202, 2009.
- CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131– 134, 2005.

CARDOSO, J. L. C.; FAN, H. W.; FRANÇA, F. O.; JORGE, M. T.; LEITE, R. P.; NISHIOKA, S. A.; AVILA, A.; SANO – MARTINS, I.S.; TOMY, S. C.; SANTORO, M. L. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. **Quarterly Journal of Medicine**, v. 86, p. 315 - 325, 1993.

CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MALAQUES, S. A.; HADDAD, V. J. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia clínica e terapêutica**. São Paulo: Sarvier, p. 468, 2003

CHACUR, M. **Mediação química da hiperalgesia induzida pelos venenos de serpentes *Bothrops jararaca* e *Bothrops asper* e por uma miotoxina com atividade de fosfolipase A2 isolada do veneno de *Bothrops asper***. Dissertação de mestrado, USP, São Paulo, 2000.

CHACUR, M.; PICCOLO, G.; GUTIÉRREZ, J. M.; TEIXEIRA, C. F. P.; CURY, Y. Pharmacological modulation of hyperalgesia induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Toxicon**, v. 39, p. 1173-1181, 2001.

CHACUR, M.; PICCOLO, G.; TEIXEIRA, C. F. P.; CURY, Y. Bradykinin is involved in hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon**, v. 40, p. 1047 - 1051, 2002.

CHACUR, M.; LONGO, I.; PICCOLO, G.; GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B.; GUERRA, J.L.; TEIXEIRA, C.F.P.; CURY, Y. Hyperalgesia induced by Asp49 and Lys49 phospholipases A2 from *Bothrops asper* snake venom: pharmacological mediation and molecular determinants. **Toxicon**, v. 41, p. 667 – 678. 2003.

CHACUR, M. **Efeito nociceptivo induzido por fosfolipases A2 (variantes Lys49 e Asp49) isoladas do veneno de serpentes *Bothrops asper*: caracterização dos mecanismos centrais e determinantes moleculares**. Tese de Doutorado, USP, São Paulo, 2004.

CHACUR, M.; GUTIERREZ, J. M.; MILLIGAN, E. D.; WIESELER-FRANK, J.; BRITTO, L. R. G.; MAIER, S. F.; WATKINS, L. R.; CURY, Y. Snake venom components enhance pain upon subcutaneous injection: an initial examination of spinal cord mediators. **Pain**, v. 111, p.65-76, 2004a.

CHACUR, M.; MILLIGAN, E. D.; SLOAN, E. M.; WIESELER-FRANK, J.; BARRIENTOS, R. M.; MARTIN, D.; POOLE, S.; LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J. M.; MAIER, S. F.; CURY, Y.; WATKINS, L. R. Snake venom phospholipase A2s (Asp49 and Lys49) induce mechanical allodynia upon peri-sciatic administration: involvement of spinal cord glia, proinflammatory cytokines and nitric oxide. **Pain**, v. 108, p. 180-191, 2004b.

CHAVES, F.; LEON, G.; ALVARADO, V.H.; GUTIERREZ, J.M. Pharmacological modulation of edema induced by Lys-49 and Asp-49 myotoxic phospholipases A2 isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**, v. 36, p. 1861–1869, 1998.

CHAVES, F.; TEIXEIRA, C.F.P; GUTIÉRREZ, J. M. Role of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 in the local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom: an experimental assessment in mice. **Toxicon**, v. 45, p. 171 - 178, 2005.

CHICCA, A.; MARAZZI, J.; GERTSCH, J. The antinociceptive triterpene b-amyrin inhibits 2-arachidonoylglycerol (2-AG) hydrolysis without directly targeting cannabinoid receptors. **British Journal of Pharmacology**, v.167, p. 1596-1608, 2012.

CHIPPAUX, J. P. Snake-bites: appraisal of the global situation. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 76, n. 5, p. 515 - 524, 1998.

CHU, H. M.; TAN, Y.; KOBIERSKI, L. A.; BALSAM, L. B.; COMB, M. J. Activating transcription factor-3 stimulates 3',5'- cyclic adenosine monophosphate-dependent gene expression. **Mol. Endocrinol.**, v.8, p. 59-68, 1994.

CICCHI, P. J. P.; SENA, M. A.; SEALE-PECCININI, D. M.; DUARTE, M. R. Snakes from coastal islands of State of São Paulo, Southeastern Brazil. **Biota Neotropica**, v. 9, n. 2, p. 201 -212, 2007.

COGO, J. C.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CRUZ-HOFLING, M. A.; CORRADO, A. P.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Effects of *Bothrops insularis* venom on the mouse and chick nerve-muscle preparation. **Toxicon**, v. 31, p. 1237-1247, 1993.

CUNHA, F. Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. The pivotal role of tumour necrosis factor  $\alpha$  in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v. 107, p. 660-664, 1992.

CUNHA, T. M.; VERRI JR, W.A.; VIVANCOS, G. G.; I.F. MOREIRA.; REIS, S.; PARADA, C.A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 401- 407, 2004.

DELATORRE, P.; ROCHA, B. A.; SANTI-GADELHA, T.; GADELHA, C. A.; TOYAMA, M. H.; CAVADA, B. S. Crystal structure of Bn IV in complex with myristic acid: a Lys49 myotoxic phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops neuwiedi* venom. **Biochimie**, v. 93, n. 3, p. 513-518, 2011.

DE TONI, L. G. B.; MENALDO, D. L.; CINTRA, A. C. O.; FIGUEIREDO, M. J.; De SOUZA, A. R.; MAXIMIANO, W. M. A.; JAMUR, M. C.; SOUZA, G. E. P.; SAMPAIO, S. V. Inflammatory mediators involved in the paw edema and hyperalgesia induced by Batroxase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops atrox* snake venom. **International Immunopharmacology**, v. 28, p. 199-207, 2015.

DIB-HAJJ, S. D.; BINSHTOK A. M.; CUMMINS T. R.; JARVIS M. F.; SAMAD, T.; ZIMMERMANN, K. Voltage-gated sodium channels in pain states: role in pathophysiology and targets for treatment. **Brain Res Rev.**, v. 60, p. 65-83, 2009.

DIGHE, S. B.; KUCHEKAR, B. S.; WANKHEDE, S.B. Analgesic and anti-inflammatory activity of  $\beta$ -sitosterol isolated from leaves of *Oxalis*

*corniculata*. **International Journal of Pharmacological Research**, v. 6, n. 3, p. 109 - 113, 2016.

DOMINGOS, M.O.; CARDOSO, J. L. C.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; MOTA, I. The humoral immune responses of patients bitten by snake *Bothrops jararaca* (jararaca). **Toxicon**, v. 28, p. 723-726, 1990.

DOS SANTOS, G.G.; DIAS, E. V.; MAIA, J. T.; PEDRO ATHIE, M. C.; MAGAYEWSKI BONET, I.J.; TAMBELI, C.H.; PARADA, C.A. The analgesic effect of dipyrone in peripheral tissue involves two different mechanisms: Neuronal KATP channel opening and CB1 receptor activation. **European Journal of Pharmacology**, v. 741, p. 124-131, 2014.

DOURADO, D. M.; FÁVERO, S.; MATIAS, S.; CARVALHO, P. T.; CRUZ – HOFLING, M. A. Low-level Laser Therapy Promotes Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Expression in Endothelial and Nonendothelial Cells of Mice Gastrocnemius Exposed to Snake Venom. **Photochemistry and Photobiology**, v. 87, p. 418 - 426, 2011.

DURBAN, J.; JUAREZ, P.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; FLOREZ-DIAZ, M.; ALAPE-GIRON, A.; SASA, M.; SANZ, L.; GUTIERREZ, J. M.; DOPAZO, J.; CONESA, A.; CALVETE, J. J. Profiling the venom gland transcriptomes of Costa Rican snakes by 454 pyrosequencing. **BMC Genomics**, v. 12, p. 259-275, 2011.

ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A.; FOX, J. W.; GUTIERREZ, J. M. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. **Journal of Proteomics**, v. 74, p. 1781-1794, 2011.

FAN, H.; LI, T. F.; GONG, N.; WANG, Y. X. Shanzhiside methylester, the principle effective iridoid glycoside from the analgesic herb *Lamiophlomis rotata*, reduces neuropathic pain by stimulating spinal microglia b-endorphin expression. **Neuropharmacology**, v. 101, p. 98 - 109, 2016.

FEITOSA, E.S.; SAMPAIO, V.; SACHETT, J.; CASTRO, D. B.; NORONHA, M. D. N.; LOZANO, J. L. L.; MUNIZ, E.; FERREIRA, L. C. L.; LACERDA, M. V. G.; MONTEIRO, W. M. Snakebites as a largely neglected problem in the Brazilian Amazon: highlights of the epidemiological trends in the State of Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 1, p. 34-41, 2015.

FERRANTE, F. M.; VADEBONCOUER, T. R. **Postoperative pain management**, 3<sup>a</sup> Edição, Springerlink, 1993.

FERREIRA-JUNIOR, J. C.; CONSERVA, L. M.; LEMOS, R. P. L.; OMENA-NETA, G. C.; CAVALCANTE-NETO, A.; BARRETO, E. Isolation of a dihydrobenzofuran lignan, icariside E4, with an antinociceptive effect from *Tabebuia roseo-alba* (Ridley) Sandwith (Bignoniaceae) bark. **Arch. Pharm. Res.**, Disponível em: DOI 10.1007/s12272-014-0468-4.

FERNANDEZ, G. P.; SEGURA, A.; HERRERA, M.; VELASCO, W.; SOLANO, G.; GUTIERREZ, J. M.; LEON, G. Neutralization of *Bothrops mattogrossensis* snake venom

from Bolivia: Experimental evaluation of llama and donkey antivenoms produced by caprylic acid precipitation. **Toxicon**, v. 55, p.642-645, 2009.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Exploring snake venom proteomes: multifaceted analyses for complex toxin mixtures. **Proteomics**, v. 8, p. 909-920, 2008.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research. **Journal of Proteomics**, v. 72, p. 200-209, 2009.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **The FEBS Journal**, v. 275, n. 12, p. 3016-3030, 2008.

FRANÇA, F. O. S.; MÁLAQUE, C. M. S. Acidente botrópico. Disponível em: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S., *et al* (Ed.). **Animais Peçonhentos no Brasil – Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2009.

FURTADO, M. F. D.; MARUYAMA, M.; KAMIGUTI, A. S.; ANTONIO, L. C. Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. **Toxicon**, v. 29, p. 219-226, 1991.

GOLIAS, CH.; CHARALABOPOULOS, A.; STAGIKAS, D.; CHARALABOPOULOS, K.; BATISTATOU, A. The kinin system - bradykinin: biological effects and clinical implications. Multiple role of the kinin system – bradykinin. **Hippokratia**, v. 11, n. 3, p. 124-128, 2007.

GUERCIO, R. A. P.; SHEVCHENKO, A.; SHEVCHENKO, A.; LOPEZ – LOZANO, J. L.; PABA, J.; SOUSA, M. V.; RICART, C. A. O. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. **Proteome Science**, v. 4, n. 11., p. 1-14, 2006.

GUTIERREZ, J. M.; CHAVES, F.; BOLAÑOS, R.; CERDAS, L.; ROJANS, E.; ARROYO, O.; PORTILLA, E. Neutralization of local effects of *Bothrops asper* venom by polyvalent antivenom. **Toxicon**, v. 19, p. 493-500, 1981.

GUTIERREZ, J. M.; GENE, J. A.; ROJAS, G.; CERDAS, L. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. **Toxicon**, v. 23, n. 6, p. 887-893, 1985.

GUTIERREZ, J. M.; ROJAS, G.; LOMONTE, B.; GENE, J. A.; CERDAS, L. Comparative study of the edema-forming activity of Costa Rica snake venoms and its neutralization by a polyvalent antivenom. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 85C, p. 171-175, 1986.

GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 51, p. 211-223, 1989.

GUTIERREZ, J. M.; NUNEZ, J.; DIAZ, C.; CINTRA, A. C. O.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R. Skeletal muscle degeneration and regeneration



after injection of Bothropstoxin-II, a phospholipase A 2 isolated from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 55, p. 217-229, 1991.

GUTIERREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v. 82, p. 841-850, 2000.

GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A2: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon**, v. 42, p. 915-931, 2003.

GUTIERREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; DIAZ, C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon**, v. 45, p. 997-1011, 2005.

GUTIERREZ, J. M.; THEAKSTON, R. D. G.; WARRELL, D. A. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: The need for a global partnership. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 6, p. 727-731, 2006.

GUTIERREZ, J. M.; WILLIAMS, D; FAN, H.W; WARREL, D.A. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. **Toxicon**, v. 56, p. 1223 - 1235, 2010.

HARTMANN, P A.; HARTMANN, M. T.; GIASSON, L. O. M. Uso do habitat e alimentação em juvenis de *Bothrops jararaca* (serpentes, *Viperidae*) na mata atlântica do sudeste do Brasil. **Phyllomedusa**, v. 2, n.1, p. 35-41, 2003.

HOFFMAN, A. A dor na perspectiva da evolução filogenética. **Reflexões em torno da dor**. 1ª ed, p. 169 – 196. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP: Ribeirão preto, 2008.

HONG, J. L.; QIN, P.; SHU, G.; WU, Q.; WANG, M. J. Analysis of catalpol derivatives by characteristic neutral losses using liquid chromatography combined with electrospray ionization multistage and time- of- flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 24, p.2680-26863, 2010.

HUCHO, T.; LEVINE, J. D. Signaling Pathways in Sensitization: Toward a Nociceptor Cell Biology. **Neuron**, v. 55, n. 2, p. 365 - 376, 2007.

HUDMON, A.; CHOI, J. S.; TYRRELL, L.; BLACK, J. A.; RUSH, A. M.; WAXMAN, S. G.; DIB-HAJJ, S. D. Phosphorylation of Sodium Channel Nav1.8 by p38 Mitogen Activated Protein Kinase Increases Current Density in Dorsal Root Ganglion Neurons. **The Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 12, p. 3190-3201, 2008.

HUSSAIN, H.; KROHN, K.; AHMAD, V. U.. Lapachol: an overview. **Arkivoc**, p. 145-171, 2007.

HSU, J. C.; LAZ, T.; MOHN, K. L.; TAUB, R. Identification of LRF-1, a leucine-zipper protein that is rapidly and highly induced in regenerating liver. **PNAS**, v. 88, p. 3511–3515, 1991.

IASP. Classification of chronic pain. In: MERSKEY, H.; BODKUK, N. **Pain terms: a current list with definitions and notes on usage**. 2<sup>a</sup>ed. Seattle: IASP Press, 1994. p.209-214.

IASP Guidelines for the Use of Animals in Research. Disponível em: <http://www.iasp-pain.org/Education/Content.aspx?ItemNumber=1217>. Acesso em: 29/11/2015.

ITO, S.; OKUDA-ASHITAKA, E.; MINAMI, T. Central and peripheral roles of prostaglandins in pain and their interactions with novel neuropeptides nociceptin and nocistatin. **Neuroscience Research**, v.41, p. 299-332, 2001.

JORGE, R. J. B.; MONTEIRO, H. S. A.; MACHADO, L. G.; GUARNIERI, M. C.; XIMENES, R. M.; NOJOSA, D. M. B.; LUNA, K. P. O.; ZINGALI, R. B.; NETTO, C. C.; GUTIERREZ, J. M.; SANZ, L.; CALVETE, J. J.; PLA, D. Venomics and antivenomics of *Bothrops erythromelas* from five geographic populations within the Caatinga ecoregion of northeastern Brazil. **Journal of Proteomics**, v. 114, p. 93 - 114, 2015.

JIN, X.; GEREAU R. W. Acute p38-mediated modulation of tetrodotoxin resistant sodium channels in mouse sensory neurons by tumor necrosis factor- $\alpha$ . **Journal of Neuroscience**, v. 26, p. 246 -255, 2006.

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

KASTURIRATNE, A.; WICKREMASINGHE, A. R.; SILVA, N.; GUNAWARDENA, N. K.; PATHMESWARAN, A.; PREMARATNA, R.; SAVIOLI, L.; LALLO, D. G.; SILVA, H. J. The Global Burden of Snakebite: A Literature Analysis and Modelling Based on Regional Estimates of Envenoming and Deaths. **Plos Medicine**, v. 5, n. 11, p. 1591 - 1604, 2008.

KITCHELL, R. L. Problems in defining pain and peripheral mechanisms of pain. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.191, n.10, p.1195-1199, 1987.

KOCHVA, E. The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. **Toxicon**, v. 25, p. 65-106, 1987.

LAWSON, S. N.; PERRY, M. J.; PRABHAKAR, E.; MCCARTHY, P. W. Primary sensory neurones: neurofilament, neuropeptides, and conduction velocity. **Brain.Res. Bull.**, v. 30, p. 239-243, 1993.

LEE, W. H.; DA SILVA GIOTTO, M. T.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M. H.; POLIKARPOV, I.; GARRAT, R. C. Structural basis for low catalytic activity in Lys49, phospholipases A2-a hypoythesis: the crystal structure of piratoxin II complexed to fatty acid. **Biochemistry**, v. 40, p.28-36, 2001.

LEE, E. J.; KO, H. M.; JEONG, Y. H.; PARK, E. M.; KIM, H. S.  $\beta$ -Lapachone suppresses neuroinflammation by modulating the expression of cytokines and matrix metalloproteinases in activated microglia. **Journal of Neuroinflammation**, v. 133, n. 12, p. 1-15, 2015.

LEVINE, J. D.; FIELD, H. L.; BASBAU, A. I. Peptides and the primary nociceptor. **Journal of Neuroscience**, v. 13, p. 2273-2286, 1993.

LEVINE, J. D.; REICHLING, D. B. Peripheral mechanisms of inflammatory pain. Disponível em: **Textbook of Pain**. WALL, P. D.; MELZACK, R. ChurchillLivingstone, New York .p. 59–84, 1999.

LIN, C. R.; AMAYA, F.; BARRETT, L.; WANG, H.; TAKADA, J.; SAMAD, T. A.; WOOLF, C. J. Prostaglandin E2 receptor EP4 contributes to inflammatory pain hypersensitivity. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 319, n. 3, p. 1096-1103, 2006.

LIN, E.; CALVANO, S. E.; LOWRY, S. F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**, v.127, p. 117-126, 2000.

LIU, M.; ZHOU, L.; CHEN, Z.; HU, C. Analgesic effect of iridoid glycosides from *Paederia scandens* (LOUR.) MERRILL (Rubiaceae) on spared nerve injury rat model of neuropathic pain. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 102, p. 465-470, 2012.

LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L. A. Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. **Inflammation**, v. 17, p. 93-105, 1993.

LOMONTE, B.; MORENO, E.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L. A.; MACCARANA, M. Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a Lys-49 phospholipase A2 from *Bothrops asper* snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modeling. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 47, p. 29867-29873, 1994.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: 1992.

MAIORANO, V.; MARCUSSI, S.; DAHER, M. A. F.; OLIVEIRA, C. Z.; COUTO, L. B.; GOMES, O. A.; FRANÇA, S. C.; SOARES, A. M.; PEREIRA, P. S. Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 364-370, 2005.

MACHADO, T.; SILVA, V. X.; SILVA, M. J. Phylogenetic relationships within *Bothrops neuwiedi* group (Serpentes, Squamata): Geographically highly-structured lineages, evidence of introgressive hybridization and Neogene/Quaternary diversification. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 71, p. 1 – 14, 2014.

MACKESSY, S. P. Thrombin-Like Enzymes in Snake Venoms. Disponível em: KINI, R.M.; CLEMETSON, K.J.; MARKLAND, F.S.; MCLANE, M.A.; MORITA, T. **Toxins and Hemostasis**, 1ª edição, Springer Editora, Holanda, 2010.

MAGALHÃES, A.; SANTOS, G. B.; VERDAM, M. C. S.; FRAPORTI, L.; MALHEIRO, A.; LIMA, E. S.; DOS-SANTOS, M. C. Inhibition of the inflammatory and coagulant action of *Bothrops atrox* venom by the plant species *Marsypianthes chamaedrys*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, p. 82-88, 2011.

MARKLAND, F. S. Snake Venoms And The Hemostatic System. **Toxicon**, v. 36, n. 12, p. 1749 - 1800, 1998.

MARTINS, M.; MARQUES, O. A. V.; SAZIMA, I. Ecological and phylogenetic correlates of feeding habits in Neotropical pitvipers of the genus *Bothrops*. **Biology of The Vipers**, p. 307 - 328, 2002.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1477, p. 146-156, 2000.

MELGAREJO, A. R. Serpentes peçonhentas do Brasil. Disponível em: Cardoso, JLC; França, FOS; Wen, FH; Malaque, CMS; Haddad Jr, V. (Org). **Animais peçonhentos no Brasil – biologia, clínica e terapêutica dos acidentes** (2ª edição). São Paulo. Ed. Sarvier, p. 42-70, 2009.

MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. Neurobiologia da dor e da analgesia. 1ª ed. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP: Ribeirão Preto, 2008.

MENEZES, M. C.; FURTADO, M. F.; TRAVAGLIA – CARDOSO, S. R.; CAMARGO, A. C. M.; SERRANO, S. M. T. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. **Toxicon**, v. 47, p. 304 – 312, 2006.

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

MINAMI, T.; NAKANO, H.; KOBAYASHI, T.; SUGIMOTO, Y.; USHIKUBI, F.; ICHIKAWA, A.; NARUMIYA, S.; ITO, S. Characterization of EP receptor subtypes responsible for prostaglandin E2-induced pain responses by use of EP1 and EP3 receptor knockout mice. **Br. J. Pharmacol.**, v. 133, p. 438–444, 2001.

MOREIRA, V.; ZAMUNER, S. R.; WALLACE, J. L.; TEIXEIRA, C. F. P. *Bothrops jararaca* and *Crotalus durissus terrificus* venoms elicit distinct responses regarding to production of prostaglandins E2 and D2, and expression of cyclooxygenases. **Toxicon**, v. 49, p. 615 - 624, 2007.

MOREIRA, V. **Efeitos de toxinas com estrutura de fosfolipase A2, isoladas dos venenos de *Bothrops asper* *Crotalus durissus terrificus* e dos respectivos venenos, sobre a expressão de cicloxigenases e produção de prostaglandinas.** Tese de Doutorado, USP, São Paulo, 2007.

MOREIRA, V.; DOS-SANTOS, M. C; NASCIMENTO, N. G.; BORGES- DA- SILVA, H.; FERNANDES, C. M.; D'IMPÉRIO LIMA, M. R.; TEIXEIRA C. F. P. Local inflammatory events induced by *Bothrops atrox* snake venom and the release of distinct classes of inflammatory mediators. **Toxicon**, v. 60, n. 1, p. 12 - 20, 2012.

MOREIRA, V.; GUTIERREZ, J. M.; AMARAL, R. B.; ZAMUNER, S. R.; TEIXEIRA, C. F. P. Effects of *Bothrops asper* snake venom on the expression of cyclooxygenases and production of prostaglandins by peritoneal leukocytes in vivo, and by isolated neutrophils and macrophages in vitro. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 8, p. 107-114, 2009.

MOREIRA, F. L.; SOUZA, G. H. B; RODRIGUES, I. V.; LOPES, N. P.; OLIVEIRA, A. R. M. A non-michaelian behavior of the in vitro metabolism of the pentacyclic triterpene alfa and beta amyryns by employing rat liver microsomes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 84, p.14-19, 2013.

MOSLAVES, I. S. B. **Avaliação das ações anti-inflamatória e antiofídica do especiosídeo isolado da *Tabebuia aurea* em camundongos injetados com venenos botrópicos**. Dissertação de mestrado, UFMS, Campo Grande, 2016.

MOTA- DA-SILVA, A.; BERNARDE, P. S.; ABREU, L. C. Accidents with poisonous animals in Brazil by age and sex. **Journal of Human Growth and Development**, v. 25, n. 1, p. 54 - 62, 2015.

MOURA, A. A.; KAYANO, A. M.; OLIVEIRA, G. A.; SETUBAL, S. S.; RIBEIRO, J. G.; BARROS, N. B.; NICOLETE, R.; MOURA, L. A.; FULY, A. L; NOMIZO, A.; SILVA, S. L.; FERNANDES, C. F. C; ZULIANI, J. P.; STABELI, S. G; SOARES, A. M.; CALDERON, L. A. Purification and Biochemical Characterization of Three Myotoxins from *Bothrops mato grossoensis* Snake Venom with Toxicity against Leishmania and Tumor Cells. **Biomed Research International**. v. 2014, p. 1- 13, 2014.

MAMEDE, C. N.; SOUSA, B.B.; PEREIRA, D.F.C.; MATIAS, M.S.; QUEIROZ, M.R.; MORAIS, N.C.G.; VIEIRA, S. A. P. B.; STANZIOLA, L.; OLIVEIRA, F. Comparative analysis of local effects caused by *Bothrops alternatus* and *Bothrops moojeni* snake venoms: Enzymatic contributions and inflammatory modulations. **Toxicon**, 2016. Disponível em: 10.1016/j.toxicon.2016.03.006.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; FURLAN, M. S.; CAPORRINO, M.C.; GREGO, K. F.; PORTES-JUNIOR, J. A.; CLISSA, P. B.; VALENTE, R. H.; MAGALHÃES, G. S. Diversity of metalloproteinases in *Bothrops neuwiedi* snake venom transcripts: evidences for recombination between different classes of SVMPs. **BMC Genetics**, v 94, n. 12, p. 1-14, 2011.

MURAKAMI, M.; NAKATANI, Y.; HARA, N.; KUDO, I.; INOUE, K. Phospholipase A2 in Clinical Inflammation: Molecular Approaches to Pathophysiology. CRC Press, v. 5.; p. 93-124, 1995.

MURAKAMI, M., NAKATANI, Y. ATSUMI, G. INOUE, K., KUDO, I. Regulatory functions of phospholipase A2. **Crit. Rev. Immunol.**, v. 17, p. 225-283, 1997.

NAKANO, K.; MARUYAMA, K.; MURAKAMI, Y.; TAKAISHI, T. Iridoids from *Tabebuia avellaneda*. **Phytochemistry**, v. 32, p.371-373, 1993.

NEEB, L.; HELLEN, P.; BOEHNKE, C.; HOFFMANN, J.; SCHUH-HOFER, S.; DIRNAGL, U.; REUTER U. IL-1 $\beta$  stimulates COX-2 dependent PGE<sub>2</sub> synthesis and CGRP release in rat trigeminal ganglia cells. **Plos One**, v. 6, n. 3, p. 1-10, 2011.

NEUGEBAUER, V. CGRP in spinal cord pain mechanisms. Disponível em: MALCANGIO, M. **Synaptic plasticity in pain**. New York: Springer. p. 175–197, 2009.

NIRMAL, S. A.; PAL, S. C.; MANDAL, S. C.; PATIL, A. N. Analgesic and anti-inflammatory activity of  $\beta$ -sitosterol isolated from *Nyctanthes arbortristis* leaves. **Inflammopharmacology**, v. 20, p. 219 - 224, 2012.

NISHIDA, S.; FUJIMURA, Y.; MIURA, S.; OZAKI, Y.; USAMI, Y.; SUZUKI, M.; TITANI, K.; YOSHIDA, E.; SUGIMOTO, M.; YOSHIOKA, A.; FUKUI, H. Purification and characterization of bothrombin, a fibrinogen-clotting serine protease from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**, v. 33, p. 1843–1849. 1994.

NUNES, G.P., SILVA, M.F., RESENDE, U.M. DE SIQUEIRA, J.M. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no centro de Campo Grande, MS. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, n.2, p.83-92, 2003.

OLIVEIRA, F.; RODRIGUES, VM; BORGES, MH; SOARES, AM; HAMAGUCHI, A; GIGLIO, JR; HOMSI-BRANDEBURGO, MI. Purification and partial characterization of a new proteolytic enzyme from the venom of *Bothrops moojeni* (Caissaca). **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 47, n. 6, p. 1069- 1077, 1999.

OLIVEIRA, C. I. F. B. **Estudo da atividade antinociceptiva de  $\beta$ -amirina, um triterpeno pentacíclico isolado de *Protium heptaphyllum* March. em modelos experimentais de dor.** Tese de Doutorado, UFC, Fortaleza, 2010.

OLIVEIRA, C. M. B.; SAKATA, R. K.; ISSY A. M.; GEROLA L. R.; SALOMÃO R. Citocinas e Dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, n. 2, p.255-265, 2011. OLIVEIRA, A. M; ARAUJO, A. F.; LEMOS, R. P. L.; CONSERVA, L. M.; FERRO, J. N. S.; BARRETO, E. Antinociceptive and anti-inflammatory activity of the siaresinolic acid, a triterpene isolated from the leaves of *Sabicea grisea* Cham. & Schltdl. var. *grisea*. **Journal of Natural Methods**, v. 68, p. 232-240, 2015.

OTERO, R.; GUTIERREZ, J.; MESA, M. B.; DUQUE, E.; RODRIGUEZ, O.; ARANGO, J. L.; GOMEZ, F.; TORO, A.; CANO, F.; RODRIGUEZ, L. M.; CARO, E.; MARTINEZ, J.; CORNEJO, W.; GOMEZ, L. M.; URIBE, F. L.; CARDENAS, S.; NUNEZ, V.; DIAZ, A. Complications of *Bothrops*, *Porthidium*, and *Bothriechis* snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. **Toxicon**, v. 40, p. 1107-1114, 2002.

OTERO, R.; NÚÑEZ, V.; JIMÉNEZ, S.L.; FONNEGRA, R.; OSORIO, R.G.; GARCÍA, M.E.; DÍAZ, A. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia: Part II: neutralization of lethal and enzymatic effects of *Bothrops atrox* venom. **J. Ethnopharmacol.**, 71: 505-511, 2000.

PADDLEFORD, R. R. Analgesia and pain management. Disponível em: **Manual of small animal anesthesia**. 2<sup>a</sup>d. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1998. p.227-246.

PAE, H. O.; OH, G. S.; CHOI, B. M.; SHIN, S.; CHAI, K. Y.; OH, H.; KIM, J. M.; KIM, H. J.; JANG, S. I.; CHUNG, H. T. Inhibitory effects of the stem bark of *Catalpa ovata* G. Don. (Bignoniaceae) on the productions of tumor necrosis factor- $\alpha$  and nitric oxide by the lipopolisaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, p. 287 – 291, 2003.

- PANIZZA, S. Plantas que curam: cheiro de mato (17ª Edição). São Paulo: IBRASA, p. 152-153, 1997.
- PARK, K. S.; KIM, B. H.; CHANG, II. M. Inhibitory Potencies of Several Iridoids on Cyclooxygenase- 1, Cyclooxygenase-2 Enzymes Activities, Tumor Necrosis factor –  $\alpha$  and Nitric Oxide Production *in vitro*. **eCam**, p. 41-45, 2007.
- PICOLO, G; CHACUR, M; GUTIERREZ, J. M; TEIXEIRA, C. F. P; CURY, Y. Evaluation of antivenoms in the neutralization of hyperalgesia and edema induced by *Bothrops jararaca* and *Bothrops asper* snake venoms. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 1221 - 1228, 2002.
- PINHO, F. M. O.; OLIVEIRA, E. S.; FALEIROS, F. Acidente ofídico no Estado de Goiás. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 50, p. 93-96, 2004.
- PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47, n. 1, p. 24-29, 2001.
- PURVES, D.; AUGUSTINE, G.; FITZPATRICK, D.; LAWRENCE, K.; ANTHONY, S. L.; MACNAMARA, S.; MARK, W. Pain. Disponível em: PURVES, D.; AUGUSTINE, G.; FITZPATRICK, D.; LAWRENCE, K.; ANTHONY, S. L.; MACNAMARA, S.; MARK, W. **Neuroscience**, 3ª ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 2004.
- QIU, J.; CHI, G.; WU, Q.; REN, Y.; CHEN, C.; FENG, H. Pretreatment with the compound asperuloside decreases acute lung injury via inhibiting MAPK and NF- $\kappa$ B signaling in a murine model. **International Immunopharmacology**, v. 31, p.109-115, 2016.
- QUEIROZ, M. R.; MAMEDE, C. C.; FONSECA, K. C.; CANABRAVA, L. C. M. N.; FRANÇA, L. V.; SILVA, M. C.; STANZIOLA, L.; BELETTI, M. E.; CANABRAVA, H. A. N.; OLIVEIRA, F. Biological characterization of a myotoxin phospholipase A2 homologue purified from the venom of the snake *Bothrops moojeni*. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 17, p. 49-58, 2011.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. Aminoácidos transmissores. Disponível em: RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5ªed. Rio de Janeiro: Elsevier, p.520-540, 2004.
- REIS, F.P.; MOSLAVES, I.S.B.; CAVALCANTE, R.B., OKOBA, D., VASCONCELOS, S. B. S., CANDELORO, L., FILIU, W. F. O., MONREAL, A. C. D., DA SILVA, V. J., RITA, P. H. S., CAROLLO, C. A., TOFFOLI-KADRI, M.C. *Tabebuia auerea* decreases inflammatory, myotoxic, and hemorrhagic activities induced by the venom of *Bothrops neuwiedi*, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 158, p. 352-357, 2014.
- RIBEIRO, L. A.; GADIA, R.; JORGE, M. T. Comparação entre a epidemiologia do acidente e a clínica do envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops*, em adultos idosos e não idosos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 1, p. 46 - 49, 2008.

RIBEIRO, L. A.; JORGE, M. T. Epidemiologia e quadros clínicos dos acidentados por serpentes *Bothrops jararaca* adultas e filhotes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 32, p. 436-442, 1990.

RIBEIRO, L. A.; JORGE, M. T. Acidente por serpentes do gênero *Bothrops*: série de 3.139 casos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, p. 475-480, 1997.

ROCHA, A. P. C; KRAYCHETE, D. C; LEMONICA, L.; CARVALHO L. R.; BARROS, G. A. M.; GARCIA, J. B. S.; SAKATA, R. K. Dor: Aspectos Atuais da Sensibilização Periférica e Central. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 57, n. 1, p. 94-105, 2007.

RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; MANCIN, A. C.; FONTES, M. R. M.; HOMSI – BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R. Geographic variations in the composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: biochemical characterization and biological activity. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 121, p. 215 – 222, 1998.

ROJAS, C. A.; GONÇALVES, M. R.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Epidemiology of snakebite in the northwestern region of the state of São Paulo, Brazil. v. 8, n. 3, p. 193-204, 2007.

RUSSO, C. M.; BROSE, W. G. Chronic Pain. **Annual Review of Medicine**, v. 49, p. 123-133, 1998.

SACHS, D.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Peripheral analgesic blockade of hypernociception: Activation of arginine/NO/cGMP/protein kinase G/ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel pathway. **PNAS**, v. 101, n. 10, p. 3680-3685, 2002.

SANTOS, R.L.; GUIMARAES, G.P.; NOBRE, M.S.C.; PORTELA, A.S. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 4, p. 486-491, 2011.

SANTOS, R.F.E.P.; CONSERVA, L. M.; BASTOS, M. L .A; CAMPESSATO, E. A. Avaliação do potencial biológico da *Tabebuia aurea* (Silva Manso) como fonte de moléculas bioativas para atividade antimicrobiana, antiedematogênica e antirradicalar. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.17, n.4, supl. III, p.1159-1168, 2015.

FUNASA. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**. 2. Brasília: Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), 1998.

SCHAIBLE, H.; SCHMIDT, R. F. Excitation and sensitization of fine articular afferents from cat's knee joint by prostaglandin E2. **Journal of Physiology**, v. 403, p. 91-104, 1988.

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



SCHMELZ, M.; SCHMIDT, R.; RINGKAMP, M.; HANDWERKER, H. O.; TOREBJORK, H. E. Sensitization of insensitive branches of nociceptors in human skin. **Journal of Physiology**, v. 480, p. 389-394, 1994.

SCHMELZ, M.; SCHMIDT, R.; HANDWERKER, H. O.; TOREBJORK, H. E. Encoding of burning pain from capsaicin-treated human skin in two categories of unmyelinated nerve fibres. **Brain**, v. 123, p. 560-571, 2000.

SERRANO, SM; MENTELE, R; SAMPAIO, CA; FINK, E. Purification, characterization, and amino acid sequence of a serine proteinase, PA-BJ, with platelet-aggregating activity from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**, v. 34, n. 31, p.7186-7193, 1995.

SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, v. 35, p. 1115 – 1132, 2005.

SERRANO, S. M. T. The long road of research on snake venom serine proteinases. **Toxicon**, v. 62, p. 19-26, 2013.

SEYBOLD, V. S.; MCCARSON, K. E.; MERMELSTEIN, P. G.; GROTH, R. D.; ABRAHAMS, L. G. Calcitonin gene-related peptide regulates expression of neurokinin 1 receptors by rat spinal neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 23, p. 1816-1824, 2003.

SILVA, J. S. V.; CARLINI, F. J. **Distribuição espacial da vegetação e uso da terra na bacia do Alto Paraguai em Mato Grosso do Sul**. Anais 5º Simpósio de Geotecnologias no Pantanal. AGROPECUÁRIA, E. I. Campo Grande – MS, p. 800 – 811, 2014.

SILVA, V. X.; RODRIGUES, M. T. Taxonomic revision of the *Bothrops neuwiedi* complex (Serpentes, Viperidae) with description of a new species. **Phyllomedusa**, v. 7, p. 45-90, 2008.

SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: Classification and characterization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1488, p. 1-19, 2000.

SOARES, A.O. **Estudo fitoquímico das flores e casca do caule de um espécime de *Tabebuia caraíba* (bignoniaceae) coletado na região do cerrado em mato grosso do sul**. 2006. 113p. Dissertação (mestrado em Química, Área de Concentração em Química Orgânica). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul- UFMS, Campo Grande- MS.

SUNTRAVAT, M.; NUCHPRAYOON, I.; PEREZ, J. C. Comparative study of anticoagulant and procoagulant properties of 28 snake venoms from families Elapidae, Viperidae, and purified Russell's viper venom-factor X activator (RVV-X). **Toxicon**, v. 56, n. 4, p. 544-553, 2010.

SUO, M. R.; YAN, S. Y. Iridoid glycosides from *Tabebuia avellanedae*. **Chemistry and Biodiversity**, 2016. Disponível em: doi: 10.1002/cbdv.201600018.

STEEDS, C. E. The anatomy and physiology of the pain. **Surgery**, v. 31, p. 49-53, 2013.

STEFFEY, E. P. Introdução às drogas que agem no sistema nervoso central e princípios de anestesiologia. Disponível em: ADAMS, H. R. **Farmacologia e terapêutica em veterinária**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 127-143.

STOCKER, K; FISHER, H; MEIER, J. Thrombin-like snake venom proteinases. **Toxicon**, v. 20, n. 1, p. 265-73, 1982.

TAKEDA, S.; TAKEYA, H.; IWANAGA, S. Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1824, p.164-176, 2012.

TANJONI, I.; WEINLICH, R.; DELLA-CASA, M. S.; CLISSA, P. B.; SALDANHA-GAMA, R. F.; FREITAS, M. S.; BARJA-FIDALGO, C.; AMARANTE-MENDES, G. P.; MOURA-DA -SILVA, A. M. Jararhagin, a snake venom metalloproteinase, induces a specialized form of apoptosis (anoikis) selective to endothelial cells. **Apoptosis**, v. 10, n. 4, p. 851-861, 2005.

TEIXEIRA, C. F. P.; CURY, Y.; MOREIRA, V.; PICOLO, G.; CHAVES, F. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. **Toxicon**, v. 54, n. 7, p. 988-997, 2009.

TEIXEIRA, C. F. P.; CURY, Y.; OGA, S.; JANCAR, S. Hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom in rats: role of eicosanoids and platelet activating factor (PAF). **Toxicon**, v. 32, p. 419-426, 1993.

TERMAN; G. W.; BONICA, J. J. Spinal Mechanisms and Their Modulation. Disponível em: BONICA, J.J. **The management of pain**. 3ª ed. Philadelphia, 2001. p. 99-151.

TODD, A. J. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, p. 823-836, 2010.

TRAUB, R. J. The spinal contribution of substance P to the generation and maintenance of inflammatory hyperalgesia in the rat. **Pain**, v. 67, p. 151-161, 1996.

TU, A. T. Chemistry of rattlesnake venoms. Disponível em: **Venoms: Their actions and Treatment**. DEKKER, M. New York, p. 247-312, 1982.

TUNDIS, R.; LOIZZO, M.R.; MENICHINI, F.; STATTI, G.A.; MENICHINI, F.. Biological and pharmacological activities of iridoids: recent developments. **Mini-reviews in Medicinal Chemistry**, 8: 399-420, 2008.

URBAN, M. O.; GEBHART, G. F. Supraspinal contributions to hyperalgesia. **PNAS**, v. 96, p. 7687-7692, 1999.

VALLE, A. L.; BRITES, V. L. C. Nomes populares e aspectos ecológicos de *Bothrops pauloensis* (Amaral, 1925) em áreas antropizadas do Triângulo e Alto Paranaíba, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Zootecias**, v. 10, n. 2, p. 155-161, 2008.

VATER, R.; HARRIS, J.B.; ANDERSON, L.V.B.; ROBERTS, S.L.; CAMPBELL, K.P.; CULLEN, M.J. The expression of dystrophin-associated glycoproteins during skeletal

muscle degeneration and regeneration. An immunofluorescence study. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v. 54, p. 557–569, 1995.

VERÇOSA, D. **Variação sazonal e espacial de metabólitos secundários em formação monodominante de *Tabebuia aurea***. Dissertação de mestrado, UFMS, Campo Grande, 2011.

VILJOEN, A.; MNCWANGI, N.; VERMAAK, I. Anti-Inflammatory Iridoids of Botanical Origin. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 2104 - 2127, 2012.

XI, J.; CHANG, Q.; CHAN, C. K.; MENG, Z. Y.; WANG, G. N.; SUN, J. B.; WANG, Y. T.; TONG, H. H. Y.; ZHENG, Y. Formulation Development and Bioavailability Evaluation of a Self-Nanoemulsified Drug Delivery System of Oleanolic Acid. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 1, p. 172-182, 2009.

XU, J.D.; MAO, Q.; SHEN, H.; ZHU, L.Y.; LI, S.L.; YAN, R. Ultra-high performance liquid chromatography coupled with photo-diode array and quadrupole/time-of-flight mass spectrometry based chemical profiling approach to evaluate the influence of preparation methods on the holistic quality of Qiong-Yu-Gao, a traditional complex herbal medicine. **Journal of Chromatography A**, v. 1304, p. 154-168, 2013.

WATKINS, L. R.; WIERTELAK, E. P.; GOEHLER, L. E.; SMITH, K. P.; MARTIN, D.; MAIER, S. F. Characterization of cytokine-induced hyperalgesia. **Brain Res.**, v. 654, p. 15–26, 1994.

WANDERLEY, C. W. S.; SILVA, C. M. S.; WONG, D. V. T.; XIMENES, R. M.; MORELO, D. F. C.; COSKER, F.; ARAGÃO, K. S.; FERNANDES, C.; PALHETA – JÚNIOR.; HAVT, A.; BRITO, G. A. C.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A.; LIMA – JÚNIOR, R. C. P. *Bothrops jararacussu* snake venom-induces a local inflammatory response in a prostanoid and neutrophil-dependent manner. **Toxicon**, v. 90, p. 134 - 147, 2014.

WILLIS, W. D.; WESTLUND, K. N. Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. **J. Clin. Neurophysiol.**, v. 14, n. 1, p. 2-31, 1997.

WOOLF, C. J. Somatic pain: pathogenesis and prevention. **British Journal of Anaesthesia**, v. 75, p. 169-176, 1995.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v. 288, p. 1765-1768, 2000.

WOLKERS, C. P. B. **Antinociceção induzida pelo estresse de restrição no peixe *Leporinus macrocephalus***. Tese de Doutorado, USP, Ribeirão Preto, 2014.

ZAMUNER, S.; CRUZ-HOFLING, M. A.; CORRADO, A. P.; HYSLOP, S.; SIMIONI, L. R. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian *Bothrops* venoms and their neutralization by commercial antivenom. **Toxicon**, v. 44, p. 259 - 271, 2004.

ZELANIS, A.; SILVA, D. A.; ROCHA, M. M.; FURTADO, M. F.; SERRANO, S. M. T.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; HO, P. L. A Transcriptomic View of the

Proteome Variability of Newborn and Adult *Bothrops jararaca* Snake Venoms. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 3, p. e1554, 2011.

ZHANG, J. M.; AN, J. Cytokines, Inflammation and Pain. **Int. Anesthesiol. Clin**, v. 45, n. 2, p. 27 - 37, 2007.

ZHANG, L.; FENG, L.; JIA, Q.; XU, J.; WANG, R.; WANG, Z.; WU, Y.; LI, Y. Effects of b-glucosidase hydrolyzed products of harpagide and harpagoside on cyclooxygenase-2 (COX-2) *in vitro*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 4882 - 4886, 2011.

ZHANG, C.; MEDZIHRADSZKY, K. F.; SÁNCHEZ, E. E.; BASBAUM, A. I.; JULIUS, D. Lys49 myotoxin from the Brazilian lancehead pit viper elicits pain through regulated ATP release. **PNAS**, v. 114, n. 12, p.2524-2532, 2017.

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

ZYCHAR, B. C. et al. Contribution of metalloproteases, serine proteases and phospholipases A<sub>2</sub> to the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* crude venom in mice. **Toxicon**, v. 55, n. 2/3, p. 227-234, 2010.

## 9. ANEXOS

### 9.1. Comprovante de Submissão de Artigo em Revista Científica

30/01/2017

Gmail - manuscript JEP\_2017\_316 received by Journal of Ethnopharmacology



Kaue Franco Malange <malangefc@gmail.com>

---

#### manuscript JEP\_2017\_316 received by Journal of Ethnopharmacology

---

Journal of Ethnopharmacology <EvisSupport@elsevier.com>  
Responder a: ethnopharmacology@elsevier.com  
Para: malangefc@gmail.com

28 de janeiro de 2017 17:45

Dear Mr. Franco Malange,

We have received the manuscript 'Tabebuia aurea decreases pain and hyperalgesia induced by Bothrops mattogrosensis venom' for consideration for publication in Journal of Ethnopharmacology. You have designated Eric Rondon as the Corresponding Author of this manuscript.

The manuscript can now only be accessed by Eric Rondon - it no longer appears on your homepage under 'My Submissions'. All further communications related to this submission will be sent to Eric Rondon.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,  
Journal of Ethnopharmacology

**This message was sent automatically. Please do not reply**

---

Copyright © 2017 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

## 9.2. Certificado CEUA



### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Teste da Eficácia Analgésica da *Tabebula aurea* em Camundongos Inoculados com Peçonhas de *Bothrops newviedi* (boca de sapo) oriundas de Mato Grosso do Sul", protocolo nº 3903-1(A), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Carlos Amílcar Parada / Kauê Franco Malange, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica ou ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais e do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal - CONCEA, e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em reunião de 07 de março de 2016.

Vigência do adendo ao projeto: 04/2016-08/2017

Início do experimento envolvendo manipulação animal: ABRIL/2016

Espécie/Linhagem: Camundongo heterogênico / Swiss

No. de animais: 64

Peso/Idade: 06 semanas / 25g

Sexo: machos

Origem: CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBIO.

Campinas, 07 de março de 2016.

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud  
Presidente

Fátima Alonso  
Secretária Executiva