



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS**

**Avaliação Farmacológica e Toxicológica do Extrato  
Etanólico das Folhas de *Salvia lachnostachys* Benth e de  
Fruticulina A em Modelo Experimental com Roedores**

**JOYCE ALENCAR SANTOS**

DOURADOS  
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL  
2017

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS**

**JOYCE ALENCAR SANTOS**

**Avaliação Farmacológica e Toxicológica do Extrato Etanólico  
das Folhas de *Salvia lachnostachys* Benth e de Fruticulina A  
em Modelo Experimental com Roedores**

Tese apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Profa. Dra. Cândida Aparecida Leite Kassuya

**DOURADOS  
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL**

**2017**

### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

S237a Santos, Joyce Alencar

Avaliação Farmacológica e Toxicológica do Extrato Etanólico das Folhas de *Salvia lachnostachys* Benth e de Fruticulina A em Modelo Experimental com Roedores: Avaliação Farmacológica e Toxicológica do Extrato Etanólico das Folhas de *Salvia lachnostachys* e de Fruticulina A / Joyce Alencar Santos -- Dourados: UFGD, 2017.

105f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Candida Aparecida Leite Kassuya

Co-orientador: Mario Mateus Sugizaki

Tese (Doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade) - Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados.

Inclui bibliografia

1. Terpeno. 2. Dor. 3. Clonidina. 4. Depressão. 5. Toxicidade. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

## Dedicatória

Dedico a minha mãe *Lurdes Alencar de Almeida Santos* e meu pai *Cicero Santos*, pelo bom exemplo e por me conduzir pela trajetória sempre me dando apoio e suporte.

Dedico ao meu amado esposo *Luiz Radai*, pelo apoio, cuidado e compreensão, pela forma especial e carinhosa que me deu força e coragem, me apoiando nos momentos de dificuldades... Imagino que não deve ter sido fácil para você, mas sem seu apoio eu não teria chegado aonde cheguei. Te amo!

## Agradecimentos

A *Deus*, autor da vida, pela capacidade de adquirir conhecimento, pela sabedoria para lidar com os desafios e adversidades próprios desse caminho que me propus a seguir, a Ele toda honra e glória;

Aos meus pais *Cícero Santos* e *Lurdes Alencar de Almeida Santos*, pelos ensinamentos e apoio incondicional durante toda a minha vida;

Ao meu esposo *Luiz Radai*, por apoiar meus sonhos;

A Profa. Dra. *Cândida Aparecida Leite Kassuya* pela confiança, incentivo, amizade e valiosos ensinamentos que contribuíram para minha formação pessoal e profissional, fazendo-se presente em cada uma das etapas desta pesquisa, deste modo, minha admiração e respeito, minha sincera gratidão tornam-se crescentes.

A Profa. Dra. *Maria Elida Alves Stefanello* (UFPR) e a Profa. Dra. *Elide Pereira dos Santos* (UFPR) pela coleta e preparo do material vegetal.

Ao Prof. Dr. *Rodrigo Juliano Oliveira* (UFMS) que abriu as portas do seu laboratório para eu fazer os testes de toxicidade.

A Profa. *Silvia Costa* (UFBA) que me acolheu em seu laboratório e me ensinou muito sobre de cultura de célula.

A minha amiga de doutorado que nunca mediu esforços em me auxiliar nos testes desta tese *Ana Claudia Piccinelli*.

Pela amizade agradeço a todos do grupo de pesquisa e aos agregados (risos).

Pela amizade, ensinamento e troca de experiências agradeço a Profa. Dra. *Fernanda Silva Graciani*.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. *Ubirajara Lanza Junior* pelo ensinamento.

A *Fundect* e *Capes* pelo auxílio financeiro concedida.

Enfim, a todos que de uma maneira ou outra foram importantes para a realização deste projeto, meus sinceros agradecimentos.

*“Não temas, porque eu sou contigo; não te assombres por que eu sou teu Deus;  
eu te fortaleço, e te ajudo, e te sustento com a destra da minha justiça.”*

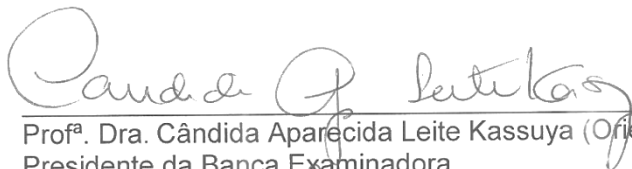
*Isaias 41:10*



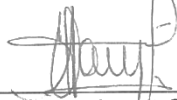
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE

### Termo de Aprovação

Após a apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a tese intitulada: "Avaliação farmacológica e toxicológica do extrato etanólico das folhas de *Salvia lachnostachys* Benth e de fruticulina A em modelo experimental com roedores" de autoria de **Joyce Alencar Santos**, apresentada ao Programa de Doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade da Universidade Federal da Grande Dourados.



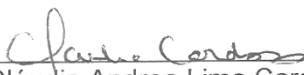
Profª. Dra. Cândia Aparecida Leite Kassuya (Orientadora-UFGD)  
Presidente da Banca Examinadora



Profª. Dra. Eliana Janet Sanjinez Argandona  
Membro Examinador (UFGD)



Profª. Dra. Fernanda Silva Graciani  
Membro Examinador (UFGD)



Profª. Dra. Cláudia Andrea Lima Cardoso  
Membro Examinador (UEMS)



Profª. Dra. Priscila Neder Morato  
Membro Examinador (UEMS)

Dourados/MS, 28 de março de 2017

## Resumo

SANTOS, Joyce Alencar. Universidade Federal da Grande Dourados, março de 2017. Avaliação farmacológica e toxicológica do extrato etanólico das folhas de *Salvia lachnostachys* Benth e de Fruticulina A em modelo experimental com roedores. Orientadora: Dra. Cândida Aparecida Leite Kassuya. Co-Orientadores: Dr. Mario Mateus Sugizaki e Dr. Ubirajara Lanza Junior.

*Salvia lachnostachys* Benth é endêmica do sul do Brasil, a avaliação fitoquímica revelou a presença dos ácidos ursólico e oleanólico, além da fruticulina A, que podem ser responsáveis pela atividade anti-inflamatória e antinociceptiva relatada na literatura pelo nosso grupo. Neste estudo, investigamos as atividades farmacológicas: anti-hiperalgésica, antiartrítica, antidepressiva e antinociceptiva, assim como potencial genotóxico e mutagênico do extrato etanólico das folhas de *S. lachnostachys* (SLEE) e de fruticulina A, em roedores. Para tanto SLEE (100 mg/kg, v.o.) foi avaliado no modelo de lesão do nervo ciático (SNI) em ratos sendo os animais submetidos ao teste de sensibilidade mecânica, sensibilidade ao frio e natação forçada 10 e 15 dias após a cirurgia. No modelo de dor crônica (semelhante a artrite), induzido pelo adjuvante completo de Freund (CFA), os animais receberam o SLEE (50 e 100 mg/kg/dia) por 21 dias de tratamento sendo avaliados a sensibilidade mecânica e térmica (ao frio e calor) nos dias 5, 7, 10, 15 e 21. O SLEE (100 mg/kg, v.o.) e a fruticulina A (3 mg/kg, v.o.). Foram avaliados com relação a resposta nociceptiva induzido por formalina sendo que os animais foram tratados 1 hora antes da injeção de formalina na pata. No modelo de depressão induzido pela clonidina, os animais receberam uma injeção de clonidina (0,8 mg/kg) por 7 dias, enquanto que o tratamento foi iniciado do quinto ao sétimo dia com SLEE (100 mg/kg/dia) e fruticulina A (3 mg/kg/dia). Para a avaliação toxicogenética (genotoxicidade e mutagenicidade), apoptose e fagocitose esplênica, os animais foram tratados por via oral com SLEE (10, 100 e 1000 mg/kg). No modelo de neuropatia (SNI), a administração oral do



SLEE durante 15 dias e uma dose subcutânea de 10 mg/kg de cetamina (controle positivo) inibiram significativamente a hiperalgesia mecânica induzida pelo SNI e diminuíram o tempo de imobilidade no teste de nado forçado. No 15º dia de tratamento oral, SLEE impediu o aumento da sensibilidade ao estímulo frio induzido pela neuropatia. No modelo de dor crônica, SLEE reduziu significativamente a hiperalgesia mecânica, térmica e o edema causado pela injeção de CFA, sugerindo atividade antiartrítica. No teste de formalina, SLEE e fruticulina A reduziram significativamente a resposta nociceptiva (frequência de lamber a pata) na primeira e segunda fase e diminuíram a formação de edema. SLEE e fruticulina A atenuaram significativamente os efeitos induzidos pela clonidina – aumentando a atividade locomotora espontânea (quadrados invadidos e levantamento) e diminuindo a emocionalidade (lamber e congelamento) em comparação com os controles, os resultados foram semelhantes ao grupo naive (não depressivos). Os resultados dos testes de cometa e micronúcleo revelaram que SLEE não causa dano ao DNA, mas houve um aumento na quantidade de células apoptóticas do baço após 72 h do tratamento com SLEE (1000 mg/kg). Com base nos resultados, SLEE exibe atividade anti-hiperalgésica, antiartrítica, antidepressiva, e antinociceptiva e a fruticulina A parece ser um dos compostos responsáveis pelos efeitos do SLEE. Esses resultados reforçam as ações antidepressivas de SLEE e fruticulina A. Os resultados ainda revelam baixa toxicidade nos modelos testados, porém outros testes devem ser realizados.

Palavras- chave: Terpeno, dor; clonidina, toxicidade, neuropatia; depressão.

## ABSTRACT

SANTOS, Joyce Alencar. Universidade Federal da Grande Dourados, March, 2017. Pharmacological and toxicological evaluation of the ethanolic extract of leaves of *Salvia lachnostachys* Benth and of Fruticuline A in experimental model with rodents. Adviser: PhD Cândida Aparecida Leite Kassuya. Co-Advisers: PhD. Mario Mateus Sugizaki and PhD. Ubirajara Lanza Junior.

*Salvia lachnostachys* Benth is endemic in southern Brazil, the phytochemical evaluation revealed the presence of ursolic and oleanolic acids, as well as fruticuline A, which may be responsible for the anti-inflammatory and antinociceptive activity reported in the literature by our group. In this study, we investigated the pharmacological activities: antihyperalgesic, antiarthritic, antidepressive and antinociceptive, as well as the genotoxic and mutagenic potential of the *S. lachnostachys* (SLEE) leaves and the fruticuline A, in rodents. SLEE (100 mg / kg, p.o.) was evaluated in the sciatic nerve injury (SNI) model in rats and the animals were submitted to mechanical sensitivity, cold sensitivity and forced swimming 10 and 15 days after surgery. In the chronic, arthritis-like, induced pain model induced by the complete Freund's adjuvant (CFA), The animals received the SLEE (50 and 100 mg/kg/day) all 21 days of treatment, being evaluated the mechanical and thermal sensitivity (cold and heat) on days 5, 7, 10, 15 and 21. SLEE (100 mg/kg, p.o.) and fruticuline A (3 mg/kg, v.o.) were also evaluated in the formalin-induced nociceptive response with the animals being treated one hour prior to formalin injection into the paw. In the clonidine-induced depression model, the animals received an injection of clonidine (0.8 mg / kg) for 7 days, while treatment was started from day 5 to day 7 with SLEE (100mg/kg/day) and fruticuline A (3 mg/kg/day). For toxicogenic evaluation (genotoxicity and micronucleus test), apoptosis and splenic phagocytosis, the animals were orally treated with SLEE (10, 100 and 1000 mg / kg). In the neuropathy model (SNI), oral administration of SLEE for 15 days and a subcutaneous dose of 10 mg / kg ketamine (positive control)

significantly inhibited SNI-induced mechanical hyperalgesia and decreased the time of immobility in the forced swim test. On the 15th day of oral treatment, SLEE prevented increased sensitivity to cold stimuli induced by neuropathy. In the pain chronic model, SLEE significantly reduced mechanical and thermal hyperalgesia and edema caused by CFA injection, suggesting antiarthritic activity. In the formalin test, SLEE and fruticuline A significantly reduced the nociceptive response (paw licking frequency) in the first and second stage and decreased the formation of edema. SLEE and fruticuline A significantly attenuated the effects induced by clonidine - increasing spontaneous locomotor activity (invaded squares and lifting) and decreasing emotionality (licking and freezing) compared to controls, the results were similar to the naive (non-depressive) group. The results of the comet and micronuclei tests revealed that SLEE did not cause damage to DNA but there was an increase in the number of apoptotic cells of the spleen after 72h of treatment with SLEE (1000 mg / kg). Based on the results, SLEE exhibits antihyperalgesic, antiarthritic, antidepressant, and antinociceptive activity, and fruticuline A appears to be one of the compounds responsible for the effects of SLEE. These results reinforce the antidepressant actions of SLEE and fruticuline A. The results still show low toxicity in the models tested, but other tests should be performed.

**Keywords:** Terpene, pain, clonidine, toxicity, arthritis, neuropathy, depression.

# SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	iii
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>5</b>
<b>2.1 Desenvolvimento de fármacos a partir de plantas medicinais</b>	<b>5</b>
<b>2.2 Gênero <i>Salvia</i> e sua atividade biológica na dor e depressão</b>	<b>6</b>
2.2.1 <i>Salvia lachnostachys</i> Benth	7
<b>2.3 Dor</b>	<b>9</b>
2.3.1 Dor nociceptiva	10
2.3.2 Mecanismos de indução de dor	11
2.3.3 Dor espontânea	12
2.3.4 Modelos experimentais de dor nociceptiva	13
2.3.5 Dor neuropática	13
2.3.6 Mecanismos de indução de dor neuropática	14
2.3.7 Modelos experimentais de neuropatia	16
<b>2.4 Artrite reumatoide</b>	<b>16</b>
2.4.1 Modelos experimentais de artrite	18
<b>2.5 Toxicidade</b>	<b>19</b>
2.5.1 Modelos experimentais de toxicogenética	20
2.5.1.1 Cometa	20
2.5.1.2 Micronúcleo em sangue periférico	21
2.5.1.3 Fagocitose esplênica	22
2.5.1.4 Apoptose	23
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>25</b>
<b>3.1 Objetivo Geral</b>	<b>25</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos</b>	<b>25</b>
Referências Bibliográficas	26
<b>ANEXO</b>	<b>43</b>
Anexo 1 – Artigo 1	44

Anexo 2 – Artigo 2	57
Anexo 3 – Aprovação no Comitê de Ética	94

# 1 INTRODUÇÃO

---

Segundo o Ministério do Meio Ambiente (2016), a flora brasileira apresenta uma das maiores diversidade mundial de plantas medicinais. Muitas dessas plantas são utilizadas no tratamento de diferentes fisiopatologias por diferentes populações onde na maioria das vezes, suas utilizações com fins terapêuticos são baseados no conhecimento empírico ou “medicina popular”. Em casos onde se observa eficácia terapêutica de determinadas plantas contra uma fisiopatologia específica ou não, estes se tornam fonte de disseminação de relatos sobre as propriedades terapêuticas de determinadas plantas, o que desperta ou estimula a investigação e realização de muitos estudos científicos (Matias *et al.*, 2013; Ramos *et al.*, 2016; Leonti *et al.*, 2017). Esses estudos implicam na busca e obtenção de prováveis novas substâncias químicas na tentativa de contribuir para desenvolvimento científico de novas drogas.

Nesse sentido, pesquisas e estudos atuais sobre a fisiopatologia da inflamação demonstram que muitos produtos naturais são capazes de atuar como anti-inflamatórios ou analgésicos inibindo a liberação de mediadores pró-inflamatórios, assim, inibindo a ativação de fatores de transcrição que implicaria na expressão de moléculas anti-inflamatórias (Maroon *et al.*, 2010; Bellik *et al.*, 2012; Barbosa *et al.*, 2013; Jahan *et al.*, 2017; Yoon *et al.*, 2017).

O gênero *Salvia* (Lamiaceae) que é distribuído mundialmente e encontrado no Brasil, especialmente na região sul do país (Erbano *et al.*, 2012) tem sido bastante estudada na atualidade (Mossi *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2012) em especial com relação a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva de algumas espécies do gênero *Salvia*, como por exemplo, a *S. officinalis* (Rodrigues *et al.*, 2012), *S. plebeia* (Jung *et al.*, 2009; Akram *et al.*, 2015), *S. miltiorrhiza* (Jiang *et al.*, 2013), *S. leriifolia* (Hosseinzadeh *et al.*, 2003) *S. sclarea* (Kostić *et al.*, 2017).

Compostos isolados de *S. miltiorrhizae* e *S. divinorum*, como o salvinorina A e o ácido salvianólico B apresentam efeitos anti-hiperalgésico em modelo de dor neuropática e efeito anti-inflamatório em roedores, onde o

mecanismo envolvido está relacionado com a modulação da ativação de receptores para a morfina e efeito direto sobre a modulação do estresse oxidativo respectivamente (Capasso *et al.*, 2008; Isacchi *et al.*, 2011).

Em contraste, informações científicas sobre o uso popular medicinal de *S. lachnostachys* Benth são escassos. Estudos fitoquímicos revelaram a presença de terpenos como ácido ursólico, oleanólico e a fruticulina A anteriormente em outras espécies do gênero *Salvia* (Kassuya *et al.*, 2009; Erbano, Marianna *et al.*, 2012). Consta na literatura diferentes estudos específicos com a fruticulina A que mostram as atividades biológicas desse composto tais como: atividade anti-bacteriana (Bisio *et al.*, 2008; Schito *et al.*, 2011), quimiopreventiva contra o câncer (Giacomelli *et al.*, 2013), inibição da migração de leucócitos e extravasamento proteico na pleurisia, e anti-hiperalgésica no modelo de carragenina em roedores (Piccinelli *et al.*, 2014). Piccinelli e colaboradores em 2014 demonstraram que quando administrado localmente, a fruticulina A, apresenta efeito anti-hiperalgésico no induzido por carragenina e no modelo experimental de hiperalgesia induzida por TNF (fator de necrose tumoral).

O TNF é um mediador químico produzido por várias linhagens celulares, entre elas os leucócitos mononucleares e células neuronais. Este mediador está diretamente relacionado ao processo da hiperalgesia, observada na dor inflamatória, nos danos neuronais observado durante a fisiopatologia da dor neuropática. Tanto em humanos quanto em animais experimentais com artrite reumatóide, pois induz a liberação de outras citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, modulando a atividade do endotélio vascular e aumentando a permeabilidade vascular (Kallioliás e Ivashkiv, 2016). Dessa forma a literatura relata que inibição dos efeitos evocados pelo TNF induz redução rápida da atividade neuronal nociceptiva dos neurônios aferentes localizados na medula espinal e no cérebro (Leung e Cahill, 2010; Kallioliás e Ivashkiv, 2016).

A dor e a hiperalgesia podem ser produzidos por danos teciduais ou infecções, características comuns do processo inflamatório (Hassani *et al.*, 2015). A inflamação estimula as fibras nervosas periféricas e altera o fluxo sanguíneo local e permeabilidade vascular, além disso, células ativadas

liberam mediadores como TNF, interleucinas (IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ ), fator de crescimento dos nervos, e prostaglandinas que induzem a dor inflamatória e neuropática (Sommer e Kress, 2004; Hassani *et al.*, 2015)

A dor neuropática é classificada como um tipo de dor crônica causada por uma lesão nervosa ou uma doença no sistema somatossensorial e possui mecanismos fisiopatológicos que não estão completamente esclarecidos. Pacientes com dor neuropática apresentam diversos sinais e sintomas neurológicos como, por exemplo, hiperalgesia, queimação, disestesia ou ainda anestesia, com grande incidência de doenças do sistema nervoso central (SNC), como a depressão. Os diversos sinais e sintomas observados durante a dor neuropática dificulta seu tratamento clínico efetivo (Barraza-Sandoval *et al.*, 2012; Snedecor *et al.*, 2013).

Neste sentido, estratégias terapêuticas para o controle da dor neuropática se restringem ao uso de fármacos alopáticos tais como: antiepiléticos, antidepressivos, anti-inflamatórios e potentes analgésicos o que determinam na maioria das vezes uma terapia parcialmente efetiva e acompanhada de muitos efeitos colaterais. Dessa forma, terapias alternativas que proporcionem um tratamento mais efetivo e seguro tornam-se cruciais na vigência da dor neuropática (Xie *et al.*, 2017).

Assim, o uso de produtos naturais contra a dor neuropática e concomitante depressão do SNC, têm sido considerado uma alternativa terapêutica nessas condições fisiopatológicas (Garg e Adams, 2012; Quintans *et al.*, 2013; Ghasemzadeh Rahbardar *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2017). No entanto, é plausível ressaltar a importância dos estudos e testes de toxicidade de produtos naturais, pois na população geral existe um grande número de indivíduos não tão bem informados que assumem como verdade a falsa crença de que por um medicamento ser de origem natural, este é isento de efeitos deletérios. A literatura relata que é imprescindível avaliar a segurança dos produtos à base de plantas medicinais.

Corroborando essa observação trabalhos publicados recentemente, mostraram que o uso indiscriminado de infusão de plantas medicinais por gestantes, plantas estas com atividade ansiolítica, digestiva, expectotante,



antibacteriana entre outras, produzem efeitos deletérios ao feto e à gestante, bem como danos inexoráveis ao DNA (De Araújo *et al.*, 2016; Martello *et al.*, 2016).

Pelo exposto, percebemos a importância de avaliar a atividade anti-hiperalgésica, anti-nociceptiva e antidepressiva de SLEE e fruticulina A, bem como o potencial genotóxico, mutagênico, apoptótico e imunoestimulatório de SLEE.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

### 2.1 Desenvolvimento de Fármacos a partir de Plantas Medicinais

Historicamente, o uso de plantas para fins terapêuticos tem os primeiros registros com data aproximada de 2.600 a.C., na Mesopotâmia, com aproximadamente 1000 substâncias derivadas de plantas catalogadas (Cragg e Newman, 2013). O desenvolvimento de produtos naturais ainda tem sido de grande interesse para comunidade científica, comercial e médica em todo o mundo, porém, o investimento da indústria farmacêutica nessa área tem diminuído em comparação com investimentos em modificações estruturais e a triagem de produtos sintéticos nos últimos anos (Cragg e Newman, 2013; Amirkia e Heinrich, 2015).

Produtos naturais são considerados fonte de diversidade e complexidade química, sendo os metabólitos secundários resultados de mecanismos de defesa que a planta produz com relação ao ambiente em que ela vive (Mishra e Tiwari, 2011; Leonti *et al.*, 2017). Estimativas apontam que aproximadamente 500.000 espécies de plantas superiores tenham sido investigadas do ponto de vista farmacológico e 15% do ponto de vista fitoquímico (Cragg e Newman, 2013).

O Brasil possui mais de 55.000 espécies catalogadas em sua diversidade vegetal e animal e muitas delas não são alvo de estudos (Fonseca, 2012). Assim como em outros países em desenvolvimento, a população brasileira faz uso das plantas medicinais para o tratamento de enfermidades, onde o conhecimento empírico tem contribuído significativamente para o estudo de novas substâncias biologicamente ativas a partir da flora medicinal, porém são estudos complexos já que as plantas podem ser aplicadas para diferentes indicações terapêuticas (Cragg e Newman, 2013; Leonti *et al.*, 2017).

Dessa forma pode-se afirmar que por meio do conhecimento empírico de diferentes populações, estudos químicos e farmacológicos são iniciados, para investigar a eficácia e segurança do uso dessas plantas ou de substâncias biologicamente ativas derivadas de plantas medicinais (Mohd Ali *et al.*, 2012;

Matias *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2016).

## **2.2 Gênero *Salvia* e sua Atividade Biológica na Dor e Depressão**

O gênero *Salvia*, pertencente à família Lamiaceae, compreende aproximadamente 1000 espécies distribuídas principalmente na América Central e do Sul (500 espécies) e na Ásia (300 espécies) (Walker e Sytsma, 2007). O cultivo é voltado, especialmente, para fins ornamentais, culinários e medicinais, sendo, desta forma, de grande importância econômica e etnofarmacológica. No Brasil, é comum na região sul do país e a utilização para fins medicinal tem impulsionado diversos estudos farmacológicos e de isolamento dos compostos químicos de plantas desse gênero (Mossi *et al.*, 2011; Mohd Ali *et al.*, 2012; Yue *et al.*, 2014).

Diferentes estudos realizados com espécies do gênero *Salvia* apresentam atividade analgésica, antinociceptiva e anti-hiperalgésica. De acordo com Kaviani e colaboradores (2014), a aromaterapia realizada através da infusão das flores de *S. officinalis*, reduziu significativamente a dor de mulheres em trabalho de parto, 30 minutos após a inalação. Outro estudo demonstrou a atividade antinociceptiva em ratos que foi avaliada com as espécies *S. hypoleuca*, *S. limbata* e *S. macrosiphon* (Karami *et al.*, 2013). A atividade antidepressiva foi evidenciada em testes realizados com ácido salvianólico isolado de *S. miltiorrhizae* (Feng *et al.*, 2012), 5-O-(6-rhamnosylglucoside)-7-hydroxy-4'-methoxyflavanone isolado de *S. elegans* Vahl (González-Cortazar *et al.*, 2013), salvinatorina A (Braidia *et al.*, 2009; Harden *et al.*, 2012) o óleo essencial de *Salvia sclarea* (Seol *et al.*, 2010).

Dentre essas espécies, dois compostos isolados de *S. miltiorrhizae* e *S. divinorum*, o salvinatorina A e o ácido salvianólico B, demonstraram seus efeitos anti-hiperalgésico em modelo animal de dor neuropática e efeito anti-inflamatório (Chen e Liu, 2006; Capasso *et al.*, 2008; Isacchi *et al.*, 2011). O salvinatorina A também apresentou potencial na redução da alodinia mecânica e hiperatividade neuronal espinhal induzida pela formalina, contribuindo para o estabelecimento de disfunções associadas com a dor crônica (Guida *et al.*,

2012).

### 2.2.1 *Salvia lachnostachys* Benth

*Salvia lachnostachys* Benth (Fig. 1) é uma espécie endêmica do sul do Brasil, considerada uma das espécies mais geograficamente restritas. Encontrada principalmente no Estado do Paraná, é caracterizada por ser uma erva perene (Erbano *et al.*, 2012).

Estudos fitoquímicos com *S. lachnostachys* Benth demonstraram a presença dos ácidos ursólico e oleanólico, muito comuns em diversas famílias botânicas, incluindo a Lamiaceae e o diterpeno fruticulina A (Erbano *et al.*, 2012). Fruticulina A, foi anteriormente isolada de outras espécies como a *S. fruticulosa* Benth, *S. corrugata* Vahl (Rodríguez-Hahn *et al.*, 1989; Erbano *et al.*, 2012) e *S. corrugata* (Bisio *et al.*, 2008; Erbano, M. *et al.*, 2012).

Estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa utilizando o óleo essencial das folhas de *S. lachnostachys*, evidenciaram compostos alifáticos saturados, principalmente o ácido dodecanóico e terpenos (aproximadamente 3%), sendo ao todo caracterizado 27 componentes (Kassuya *et al.*, 2009).

Figura 1 Fotografia de *Salvia lachnostachys* Benth.



Fonte: Acervo pessoal Dra. Elide Pereira dos Santos

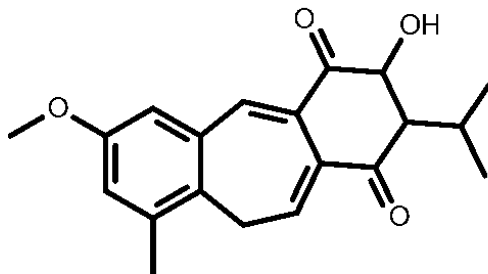
Em continuidade um estudo, comprovou o potencial anti-inflamatório e analgésico do extrato e da fruticulina A, no modelo de edema de pata e pleurisia induzido por carragenina (Piccinelli *et al.*, 2014).

A fruticulina A (Fig. 2) é um diterpeno que possui atividade antinociceptiva e anti-hiperalgésica em modelo de hiperalgisia induzida por carragenina (Piccinelli *et al.*, 2014), bacteriostática em bactérias gram-positivas (Bisio *et al.*, 2008), assim como efetividade na diminuição do biofilme desse tipo de bactérias (Schito *et al.*, 2011) e atividade preventiva contra o câncer (Giacomelli *et al.*, 2013).

Diterpenos são metabólitos secundários da classe dos terpenos, com estrutura composta por pelo menos 20 carbonos. São substâncias naturais, comumente encontradas em plantas e tem componentes com potencial terapêutico, como propriedades antibacteriana, antidepressiva no SNC, antifúngica, citotóxica, antiproliferativa em células cancerígenas, anti-HIV e efeitos anti-inflamatórios (Salminen *et al.*, 2008; Machado *et al.*, 2013; Abrão *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015). O carnosol, diterpeno extraído de *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae), também apresenta atividade antidepressiva (Machado *et al.*, 2013), antinociceptiva e anti-inflamatória (Zhai *et al.*, 2014).

Em espécies de *Salvia*, os diterpenos salvivorina A e o ácido salvianólico B, apresentaram atividade anti-hiperalgésica em modelo animal de dor neuropática e efeito anti-inflamatório (Capasso *et al.*, 2008; Isacchi *et al.*, 2011; Lamb *et al.*, 2012).

Figura 2. Estrutura química da fruticulina A.



Fonte: Oliveira e colaboradores (2016)

## **2.3 Dor**

A dor é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP – International Association for the Study of Pain) sendo “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada com um dano tecidual real ou potencial” (IASP, 1979). É um fenômeno de difícil aceitação ou convivência, essa percepção da dor tem grande importância e é fundamental para a sobrevivência (Khuong e Neely, 2013).

Em geral, a dor recebe classificação pelo tempo de duração (agudo ou crônico) ou pelo mecanismo fisiopatológico (nociceptiva, neuropática ou mista). Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2012), a classificação pelo tempo de duração pode ser aguda (ocorre quando estímulo excessivo gera uma sensação intensa e desagradável) e a crônica, associada a alterações fisiológicas dando origem a hiperalgesia (aumento da intensidade da dor associada a um estímulo nocivo leve), alodinia (dor provocada por um estímulo não nocivo) ou dor espontânea (sem qualquer estímulo definida por dor contínua ou recorrente que persiste além do tempo normal esperado de cura). No entanto, essa classificação não é essencial para a determinação do tratamento.

A classificação pelo mecanismo fisiopatológico diferencia em dor nociceptiva, neuropática ou mista.

### **2.3.1 Dor Nociceptiva**

A dor nociceptiva resulta da ativação direta de nociceptores da pele e outros tecidos em resposta a uma lesão tecidual, inflamação ou câncer. Esses são responsáveis por conduzir a informação sensorial ao sistema nervoso central alertando sobre um dano tecidual periférico que precisa ser reparado (Geffeney e Goodman, 2012; Khuong e Neely, 2013).

Esta dor também pode originar sem nenhuma causa óbvia, como é o caso da neuralgia do trigêmeo, ou até mesmo persistir quando não há mais a lesão, como o exemplo da dor do membro fantasma (Rang et al., 2012).

Um dos fatores mais importantes que afetam a percepção e aceitação da dor são fatores psicológicos e características individuais, incluindo os traços de personalidade (Yadollahi *et al.*, 2014), tornando-se uma experiência multidimensional que envolve processos sensoriais, emocionais, sociais e culturais (Romão *et al.*, 2011). Neste contexto, o reflexo apresentado estabelece reações motoras, vocalização, reajuste postural e até mesmo mudança comportamental (Rijavec e Grubic, 2012; Ben Boujema *et al.*, 2015).

O estado emocional temporário e/ou a exposição ao estresse têm relação direta com o processo sensorial da dor, podendo ser capaz de provocar desconfortos e reações negativas ao tratamento ou recuperação, implicando no aumento da sensibilidade a dor (Zautra *et al.*, 2001; Sibille *et al.*, 2012).

Os mecanismos de ação centrais no desenvolvimento da dor, bem como as alterações emocionais negativas, se devem a uma perturbação límbica e um desequilíbrio biológico patológico (Neugebauer, 2015). Dessa forma a dor pode ser gerada mesmo que não exista a nocicepção, ou seja, ainda que uma lesão real não exista. Isto acontece quando o sistema nervoso, central ou periférico, é lesionado.

Essa situação, que transcende a resposta natural do organismo, pode, a partir de então, se tornar uma patologia crônica, com longa duração e sem função de defesa, caracterizada por hipersensibilidade nociceptiva ou dor espontânea, trazendo consequências negativas para o cérebro, traduzidas em reações como a depressão, ansiedade, medo, entre outras alterações, somadas a própria incidência da dor (Lumley *et al.*, 2011; Liang *et al.*, 2015; Simons *et al.*, 2015).

### **2.3.2 Mecanismos de Indução da Dor**

O principal desencadeador da dor é o estímulo nociceptivo, responsável por ativar as terminações dos neurônios aferentes nociceptivos. Estas terminações são ativadas quando existe um estímulo de alta intensidade, causando dano ou potencial dano tecidual. A especificidade do nociceptor (térmica, mecânica ou química) é estabelecida pela expressão de canais



iônicos (Woolf e Ma, 2007).

Em condições normais, a dor associa-se a atividade de impulsos em fibras aferentes primárias de pequeno diâmetro dos nervos periféricos, ativados por estímulos mecânicos, térmicos e químicos. Os nervos periféricos incluem as fibras aferentes mielinizadas, fibras A $\delta$ , A $\alpha$  e A $\beta$  e C, esta não mielinizada. A maioria das fibras nociceptivas é do tipo A $\delta$  e C. As fibras A $\delta$  de pequeno diâmetro geram uma dor latejante bem localizada. As fibras C de pequeno diâmetro, que levam a uma baixa velocidade de condução do impulso, geram uma dor em queimação e difusa (Rang *et al.*, 2012).

Os corpos celulares das fibras aferentes nociceptivas situam-se nos gânglios da raiz dorsal e na cadeia ganglionar trigeminal. Ambos possuem ramificação axonal central e periférica responsável pela inervação do órgão-alvo e da medula espinhal, respectivamente (Basbaum *et al.*, 2009). Os impulsos sensoriais são transformados e transmitidos aos centros cerebrais através de diversos caminhos, por meio dos quais é gerada a percepção da dor, juntamente com seus componentes emocionais e aversivos (Woolf e Ma, 2007; Gangadharan e Kuner, 2013).

### **2.3.3 Dor Espontânea**

A dor espontânea pode surgir a partir de moléculas de sinalização continuamente lançadas após dano tecidual ou inflamação que atuam nos terminais periféricos nociceptores, conduzindo uma despolarização suficiente para iniciar potenciais de ação ou produzir uma redução no limiar de dor, de tal forma que as temperaturas ambientes normais ou a pulsação dos vasos sanguíneos ativarão os nociceptores (Costigan e Woolf, 2000).

Os nociceptores são projetados para iniciar a atividade apenas no terminal periférico. Quaisquer potenciais de ação que se originam a partir do axônio ou corpo celular representam disparo ectópico patológico e produzem uma entrada sensorial na ausência de estímulos sensoriais ou de inflamação periférica, resultando em uma hiperexcitabilidade anormal da membrana (Hadley, Bahia e Taylor-Clark, 2014).

Em alguns modelos experimentais em roedores, após a inflamação

periférica e lesões dos nervos periféricos, ocorre o levantamento espontâneo da pata. Esta situação correlaciona-se com a atividade espontânea em fibras C, mas não com alodinia, o que implica que a dor espontânea é impulsionada a partir da periferia e difere mecanicamente de dores evocadas por estímulo (Bennett e Xie, 1988; Djouhri *et al.*, 2006).

Alterações na expressão, alosteria, plasticidade de canais iônicos podem determinar lesão neural periférica, gerando potencial de ação que pode estimular as fibras vizinhas intactas e ocasionar uma fonte ainda maior de tal atividade espontânea (Djouhri *et al.*, 2006). Uma explicação para isto, é que as fibras intactas são expostas a moléculas de sinalização produzidas pelas células de Schwann, tais como TNF.

#### **2.3.4 Modelos Experimentais de Dor Nociceptiva**

Os estudos experimentais de dor são geralmente realizados com roedores. Entre os modelos, podemos encontrar na literatura o teste de formalina, pelo qual é possível evidenciar as duas fases da sensibilidade dolorosa, a primeira fase caracterizada pela dor neurogênica e a segunda acompanhada por inflamação (Hunskar *et al.*, 1985; Holanda *et al.*, 2015), contorções abdominais induzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético (Leite *et al.*, 2014), placa quente (Van Eick, 1967; Barbosa, *et al.*, 2013) e retirada da cauda (Zhang *et al.*, 2016).

#### **2.3.5 Dor Neuropática**

Estimativas indicam que a dor neuropática afeta entre 3,3% a 8,2% da população em geral (Haanpää, 2011) e a depressão afeta, aproximadamente, 300 milhões de pessoas (WHO, 2017), sendo estas condições consideradas problemas de saúde pública.

As estratégias terapêuticas para controle da dor neuropática e alterações comportamentais atualmente se restringem à falta de medicamentos

específicos para essas alterações. Sendo a abordagem farmacológica a forma mais importante de tratamento em casos de dor neuropática, porém, com resultados insatisfatórios quando se trata do alívio da dor. Esse fato ocorre, pois as recomendações farmacológicas se baseiam apenas na intensidade da dor do paciente e nos sintomas, além disso, fatores sociais, psicológicos, contextuais e experiências prévias do individual estão envolvidos na resposta terapêutica a analgésicos (Carlino, Frisaldi e Benedetti, 2014).

Uma observação plausível é que deve-se ser levada em consideração a heterogeneidade dos mecanismos responsáveis pela dor neuropática e os aspectos emocionais e psicológicos coexistentes (Baron *et al.*, 2010; Finnerup *et al.*, 2010).

### **2.3.6 Mecanismos de Indução de Dor Neuropática**

O surgimento da lesão nervosa pode ocorrer devido a um trauma mecânico, doenças metabólicas (diabetes), uso crônico de medicamentos neurotóxicos (quimioterápicos), infecções (HIV) ou até mesmo por invasão tumoral (Costigan e Woolf, 2000; Dworkin *et al.*, 2003).

A lesão de nervos periféricos é frequentemente acompanhada de inflamação local transitória, a qual contribui para o início da sensação de dor. Sendo assim, na dor neuropática estão envolvidos múltiplos mediadores inflamatórios (Woolf, 2010a; Ji e Strichartz, 2004). A lesão de nervo periférico pode resultar em muitas alterações, incluindo disfunção motora, dor e comorbidades cognitivas e emocionais associadas.

Estudos mostram que a extensão da hiperalgesia está diretamente relacionada com a extensão da resposta inflamatória no sítio da lesão do nervo. Além disso, drogas anti-inflamatórias aliviam a hiperalgesia em modelos animais de dor neuropática, com lesão de nervos periféricos (Bennett *et al.*, 2000; Woolf, 2010).

A dor crônica pode ser prejudicial para o bem-estar geral e o funcionamento do organismo, pois está associada as alterações estruturais e funcionais no cérebro (Tajerian *et al.*, 2013) e assim como moleculares

induzidas por lesão persistente após a fase de recuperação inicial, tornando-se de difícil reversão. Isto é devido, em parte, a alterações moleculares e funcionais que têm lugar na periferia, bem como o sistema nervoso central (Tajerian *et al.*, 2013). Portanto, não surpreende que a lesão muitas vezes seja acompanhada de alterações locais ou sistêmicas na expressão gênica. Pesquisas recentes identificaram interações entre lesão e alterações transcricionais no sistema nervoso. Estas alterações podem ocorrer em diferentes níveis: moléculas individuais, sinapses, função celular, no sangue e no cérebro (Grace *et al.*, 2012, Poh *et al.*, 2012).

A sensibilização periférica e central do sistema nervoso, que causam alodinia e hiperalgesia em casos de dor neuropática, são fenômenos dependentes de uma variedade de processos neuromodulatórios, como a ativação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (N-metil D-Aspartato) do corno dorsal, vigorosa ativação da resposta inflamatória na medula espinhal, microglia e astrócitos, bem como a produção de TNF, interleucinas (Swartjes *et al.*, 2013).

A literatura relata que periféricamente, as lesões neuropáticas evocam uma sensibilização que induz uma atividade anormal em longo prazo nas vias aferentes primárias, o que está associado a alterações na excitabilidade dos nociceptores (Taylor, 2009; Xu *et al.*, 2012). Na medula espinhal, ocorre uma potenciação de longo prazo (PLP) na transmissão excitatória sensorial. A regulação positiva dos receptores AMPA pós-sinápticos recruta sinapses silenciosas que contribuem para a PLP. No córtex, por sua vez, a dor neuropática está ligada a indução da PLP de fase tardia em sinapses corticais, pelas quais a modulação facilitatória descendente reforça a transmissão sensorial no corno dorsal da medula (Xu *et al.*, 2012).

Modelos animais têm sido de grande importância para que as alterações moleculares e celulares que ocorrem na dor neuropática sejam identificadas. Em uma compressão do nervo ciático, por exemplo, sabe-se que existe uma PLP das sinapses das fibras C aumentando a atividade da coluna vertebral para que esta configure a dor crônica, conduzindo potenciais de ação nos neurônios do corno dorsal (Taylor, 2009; Xu *et al.*, 2012). Apesar das

particularidades de cada modelo experimental, todos eles apresentam alterações inflamatórias pós-lesão, além de recrutamento de macrófagos e neutrófilos, o que indica que o microambiente inflamatório e a liberação de mediadores estão diretamente ligados ao desenvolvimento da dor neuropática (Leung e Cahill, 2010)

Uma observação importante é que durante a resposta neuroinflamatória, citocinas são expressas como TNF, IL-1-beta, IL-6 e interferon-gamma, podem ter um efeito deletério na função cerebral. A inflamação é processo intimamente relacionado à depressão do SNC (Zunszain *et al.*, 2012). Existem dados na literatura sugerindo a participação de citocinas na depressão, sendo inclusive proposta uma teoria citocinérgica da depressão do SNC. O aumento nos níveis de citocinas inflamatórias durante a infecção pode levar a um estado em que o indivíduo não se envolve com o mundo (sinal depressivo), apresentando anedonia, fadiga e dor. Esta condição, denominada comportamento doentio “sickness behavior”, pode ter um valor evolutivo em que ele estabelece um período de retirada durante o qual o organismo pode recuperar de infecção (Zunszain *et al.*, 2012). Os dados que suportam esta hipótese citocinérgica derivam tanto da clínica como da pesquisa pré-clínica (Dantzer e Kelley, 2007). Estudos de doenças humanas mostram uma estreita ligação entre a elevação de TNF no SNC e sintomas depressivos (Zunszain *et al.*, 2012).

### **2.3.7 Modelos Experimentais de Neuropatia**

Entre os modelos de dor neuropática com uma ou múltiplas lesões neuronais, estão a ligação dos nervos L5 e L6 (SNL), ligadura do nervo ciático e corte de nervos (SNI) (Bennett e Xie, 1988; Decosterd e Woolf, 2000), sendo que o animal desenvolve alodinia mecânica na pata. As vantagens destes modelos é que têm um início de dor neuropática conhecido e os limites de duração de retirada de pata são reprodutíveis.

## **2.4 Artrite Reumatoide**

A artrite reumatoide (AR) é uma doença crônica, sistêmica, inflamatória, dolorosa e incapacitante de etiologia desconhecida, provavelmente complexa e multifatorial (Farzaei *et al.*, 2016; Hernández-Hernández e Díaz-González, 2016). Como a fisiopatologia central da AR ocorre na membrana sinovial, a limitação articular é uma manifestação típica da doença, que resulta na destruição da articulação, com deformação, deficiência e diminuição da expectativa de vida (Alvarez-Nemegyei *et al.*, 2016). Isso, além do fato de que a maioria dos pacientes com AR também sofrem de perda muscular, que contribui para a diminuição da função física e qualidade de vida nesses pacientes (Hernández-Hernández e Díaz-González, 2016). A prevalência global estimada de AR é de 0,3 a 1,0%, representando uma das doenças inflamatórias crônicas mais prevalentes (Brodszky *et al.*, 2017).

A doença afeta o sistema sinovial, tecido presente nas articulações, os sinoviócitos e os macrófagos produzem mediadores inflamatórios (TNF, Interleucinas 1 $\beta$ , IL-6 e IL-17, enzimas proteolíticas (metaloproteinases e colagenases) que promovem a destruição de cartilagem (Farzaei *et al.*, 2016). Citocinas pró-inflamatórias, como Interleucina-1b (IL-1b), IL-6 e TNF, estimulam as manifestações articulares da AR através de aumento da infiltração de células inflamatórias, particularmente células T, células B, e macrófagos e erosão óssea. A ativação de células T resulta na produção de autoanticorpos e no lançamento de TNF e IL-6, levando a lesões articulares e extra-articulares (Farzaei *et al.*, 2016).

Atualmente o tratamento medicamentoso é realizado com fármacos antirreumáticos modificadores da doença (ARMD), geralmente melhoram os sintomas e podem reduzir a atividade da doença na AR, porém são medicamentos de início de ação lenta (meses), e que leva a desistência do tratamento, para amenizar essa situação é prescrito em conjunto analgésicos ou anti-inflamatórios, para diminuição dos sintomas (Fernández-Llanio Comella *et al.*, 2016; Brodszky *et al.*, 2017). Entretanto o paciente deve ser monitorado mensalmente devido aos efeitos adversos (náuseas, diarreia, mielossupressão, hepatotoxicidade, leucopenia, hipertensão arterial, insuficiência cardíaca

congestiva e trombose).

Por outro lado, terapias alternativas podem representar uma oportunidade para melhorar a qualidade de vida dos pacientes com AR e, no futuro, podem ser integrados ao tratamento (Fernández-Llanio Comella *et al.*, 2016). A literatura relata que os diterpenos possuem propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras, podendo melhorar o prognóstico da doença (Farzaei *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2017).

As plantas são fontes de agentes anti-inflamatórios e antiartríticos, como exemplo a *Uncaria tomentosa* e *Harpagophytum procumbens* popularmente conhecida como unha de gato e garra do diabo (Castilhos *et al.*, 2015; Gusman *et al.*, 2015; Parenti *et al.*, 2015; Elisha *et al.*, 2016), podendo ser atribuída essas propriedades farmacológicas à presença de fenóis, flavonoides, taninos, flavonóis, prontocianidinas, compostos nitrogenados, vitaminas e terpenoides (Chi *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2016). O principal efeito observado após os testes com as plantas medicinais é a inibição de TNF e/ou óxido nítrico, gerando assim a melhora no quadro de AR (Wang *et al.*, 2011; Gusman *et al.*, 2015; Farzaei *et al.*, 2016).

#### **2.4.1 Modelos Experimentais de Artrite**

Espécie de camundongos C57BL/6 são as mais utilizadas nos modelos de artrite, com a incidência no desenvolvimento de artrite de 100%, baixa variação e início sincronizado (Bäcklund *et al.*, 2013; Atkinson e Nansen, 2017).

Entre os métodos podemos citar a indução por injeção de CFA (Adjuvante Completo de Freund contendo *Mycobacterium tuberculosis*) intraplantar (Fig. 3) ou na articulação do joelho (Matthys, 2005; Ito *et al.*, 2017). A resposta inflamatória nesse modelo é dependente de células T e compartilha algumas características com AR humana como: edema das extremidades, infiltração de linfócitos, destruição das cartilagens, reabsorção óssea e perda de função das articulações. As duas macromoléculas principais na cartilagem normal são o colágeno do tipo 2 e as glicosaminoglicanas, na técnica de indução de artrite por injeção intra-articular de CFA contendo colagenase tipo

II (Nirmal *et al.*, 2017), a enzima pode levar a destruição das articulações por degradar o colágeno do tipo 2, que só esta presente na cartilagem articular das articulações. Na clínica médica a fase inicial da artrite reumatoide é caracterizado por aumento na prevalência de anticorpos de colágeno tipo 2 e de células T (Cho *et al.*, 2007)

Outro método experimental consiste na utilização de linhagens com modificação genética caracterizados por aumento na expressão gênica do gene de transcrição de TNF, o que leva ao desenvolvendo de artrite autoimune espontaneamente até os 2 meses de idade, apresentando infiltrado leucocitário, e hiperplasia sinovial (Sardar e Andersson, 2016). Há também outra linhagem SKG/Jcl, que são modificados geneticamente e desenvolvem espontaneamente artrite crônica autoimune mediada por células T, os animais desenvolvem sinovite severa, deformação de joelho.



Figura 3. Pata direita com artrite, após a indução por CFA (*Mycobacterium tuberculosis*), em A o animal controle, em B o animal controle positivo tratado com dexametasona, 21 dias após a indução.



**Fonte:** Joyce Alencar Santos

## 2.5 Toxicidade

É preocupante e negligente o uso de plantas para fins medicinais, sem o prévio conhecimento de sua segurança e eficácia terapêutica. A fim de garantir à população brasileira o acesso seguro e racional de plantas medicinais bem como dos fitoterápicos, promover o uso sustentável da biodiversidade e o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional, o Ministério da Saúde implantou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, através do Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006 (Brasil, 2006).

Para que uma planta medicinal seja utilizada de maneira segura pela população, uma série de testes toxicológicos deve ser realizada. A ANVISA propôs um roteiro para os estudos toxicológicos de fitoterápicos, publicado em 31 de janeiro de 2013: GUIA PARA A CONDUÇÃO DE ESTUDOS NÃO CLÍNICOS DE SEGURANÇA NECESSÁRIOS AO DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS, com base nas diretrizes internacionais da OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) e outras agências regulatórias que normatizam os estudos de toxicidade pré-clínicos para novos fármacos. Estes guias contêm os parâmetros mínimos para realização de toxicologia pré-clínica evidenciando a necessidade de melhoria da qualidade

técnica dos fitoterápicos (Brasil, 2013; OECD., 2015; OECD, 2016).

Em termos toxicológicos, qualquer substância pode apresentar característica tóxica que é dependente da dose, concentração, via de administração ou exposição e a frequência de administração dessa substância (Pantano *et al.*, 2016; Yates *et al.*, 2017). Corroborando com essas informações, várias análises toxicológicas já foram realizadas em plantas de uso medicinal, e muitas destas análises revelaram a presença de efeitos tóxicos em diversas espécies vegetais (Chen *et al.*, 2016; De Araújo *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2016). Como exemplo, pode-se citar o caso da *Aloe vera* L. (babosa) que apesar da ação cicatrizante, antibacteriana, antifúngica e antivirótica, também pode apresentar ação nefrotóxica em doses altas (Matos, 2000). O *Phyllanthus amarus* (quebra-pedra) também pode ser considerado tóxico em altas doses, devido a presença dos alcaloides pirrolizidínicos (Matos, 2000).

É importante salientar que o envenenamento provocado pelo tratamento com *S. plebeia*, segundo a literatura chinesa a planta pode ser utilizada para o tratamento de doenças infecciosas, porém neste relato de caso o paciente fez o uso para o tratamento de gripe, sem saber a dose adequada ou a interação com outros medicamentos, o que gerou disfunção de múltiplos órgãos (Yang *et al.*, 2016). Este fato demonstra a importância da avaliação e divulgação sobre os riscos que uma planta pode gerar.

## **2.5.1 Modelos Experimentais de Toxicogenética**

### **2.5.1.1 Cometa**

O teste do cometa ou teste de eletroforese em gel de célula única, é uma técnica rápida e quantitativa que possibilita a visualização de danos no DNA e/ou na eficácia no mecanismo de reparo do DNA em células eucarióticas (Møller, 2006), o aumento dos níveis de dano do DNA e mecanismos de reparação ineficazes são os eventos biomoleculares subjacentes na patogênese da maioria das doenças que ameaçam a vida, como câncer e

doenças degenerativas (Møller, 2006; Gunasekarana *et al.*, 2015; Bonassi *et al.*, 2016). Esse ensaio é baseado na quantificação de fragmentos de DNA que migram para fora do nucleóide da célula durante a eletroforese e permite avaliar danos que podem ser reparados (Kang *et al.*, 2013). Foi padronizado pela OECD (Oecd, 2016), e pode ser realizado *in vitro* ou *in vivo*, no entanto, os resultados *in vivo* podem refletir absorção, excreção, distribuição e metabolismo das substâncias avaliadas, enquanto o *in vitro* é ideal para resultados prévios minimizando o número de animais no teste (Kang *et al.*, 2013).

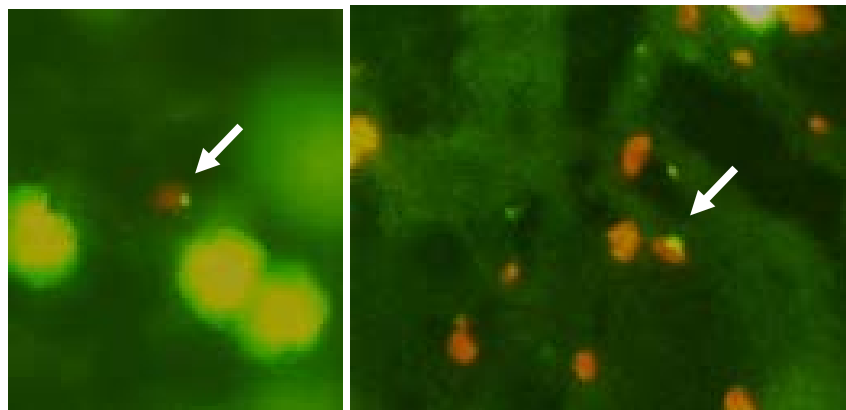
Em suma, as suspensões de células individuais são incorporadas em gel de agarose e lisadas. Considerando que as amostras de sangue são suspensões de células individuais por natureza, os tecidos precisam ser rompido por tratamento mecânico ou enzimático. O tratamento de lise remove membranas celulares e nucleares e proteínas, o que deixa o DNA embutido em gel na forma de nucleóides, seguindo o tratamento alcalino e eletroforese, e então o DNA migra para o ânodo de uma maneira que é dependente do número de lesões nos nucleóides. A extensão da migração é visualizada num microscópio de fluorescência após coloração do DNA. Na forma simples do ensaio cometa, o DNA migra porque contém quebras que podem surgir da ação direta de compostos genotóxicos e locais de reparo transitórios e por este teste é quantificado os danos no DNA (Møller, 2006; Oliveira *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2015).

### **2.5.1.2 Micronúcleo em sangue periférico**

O teste de micronúcleo foi desenvolvido para testes de genotoxicidade e detecção de mutagenicidade de agentes químicos que induzem a formação de pequenos fragmentos de DNA ligados à membrana celular (conhecidos como micronúcleos) (Oliveira *et al.*, 2009; Bonassi *et al.*, 2016; Dar *et al.*, 2016; Hayashi, 2016). Uma vantagem deste teste em relação ao cometa é a estabilidade e persistência do dano ao DNA, pois o teste do cometa mensura apenas danos primários que podem ser reparados (Bonassi *et al.*, 2016).

A técnica de micronúcleo utilizando sangue periférico baseia-se em depositar uma gota de sangue sob um lâmina previamente corada com alaranjado de acridina, que é um agente intercalante de DNA, como as hemácias não possuem núcleo, a fluorescência emitida é vermelha, devido a presença de RNA, já os micronúcleos que possuem DNA em sua constituição emite a fluorescência amarela (Fig. 4).

Figura 4. Imagem de microscopia de epifluorescência, imagem apresenta o micronúcleo (verde) em uma hemácia (vermelho), na seta, em uma amostra de sangue periférico.



**Fonte:** Joyce Alencar Santos

A avaliação de micronúcleo é um procedimento amplamente utilizado em pesquisas toxicogenéticas, para avaliação da capacidade cancerígena de um composto. A literatura apresenta técnicas diferentes; utilizando sangue periférico corado com alaranjado de acridina e a técnica que utiliza a medula óssea, corada por Giemsa, sendo ambas adequadas para este tipo de avaliação, no entanto, a técnica que utiliza o sangue periférico, proporciona várias amostras de material em um mesmo animal sem a necessidade de eutanásia a cada coleta, permitindo avaliar o animal ao longo de um tratamento e /ou a recuperação do animal durante o teste (Oliveira *et al.*, 2016).

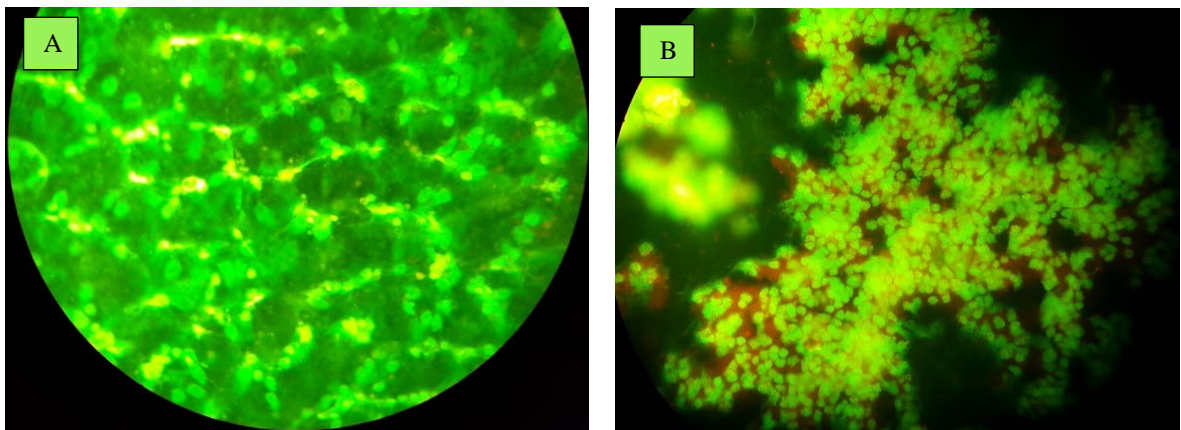
### **2.5.1.3 Fagocitose Esplênica**

O baço é um órgão linfóide, constituído por uma polpa branca

circundada pela polpa vermelha, ele possui uma grande quantidade de células fagocitárias, que atuam na remoção de hemácias defeituosas ou senescentes da circulação, atuando também na defesa do organismo contra microrganismos presentes na circulação sanguínea, sendo de grande importância na resposta imunitária antifúngica e antibacteriana. Evidenciando seu envolvimento nos processos de imunomodulação. O teste de fagocitose esplênica foi realizado para identificar possíveis efeitos imunomodulatórios de *S. lachnostachys* (Oliveira *et al.*, 2015).

Para este teste um fragmento do baço (aproximadamente 1/3 do tamanho do órgão) é macerado com solução fisiológica – salina (0.9% NaCl), 100 µL de da suspensão celular, é colocado sobre uma lâmina, previamente corada com alaranjado de acridina, as lâminas são analisadas em microscópio de epifluorescência para avaliar presença ou ausência de fagocitose (Fig. 5) (Oliveira *et al.*, 2015).

Figura 5. Microscopia de epifluorescência, em uma amostra de baço. Em A, células normais e em B células com início de fagocitose (sombra avermelhada), após o tratamento com ciclofosfamida.



**Fonte:** Joyce Alencar Santos

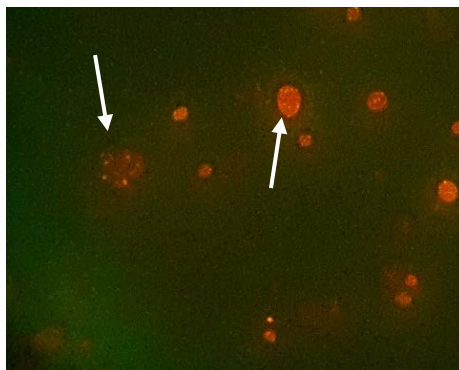
#### 2.5.1.4 Apoptose

A apoptose é um processo natural de morte celular programada, e é caracterizada pela clivagem da cromatina e um colapso nuclear, seguido da condensação do citoplasma e suas mudanças na membrana plasmática com a

ausência de inflamação, sendo uma forma fisiológica responsável pelo balanceamento da proliferação celular e manutenção das células que sofrem constantemente renovação celular, funciona também como um mecanismo de defesa por meio do qual células lesadas ou potencialmente perigosas podem ser eliminadas para o bem do organismo como um todo.

Muitos xenobióticos podem desencadear alterações no DNA e as células que apresentam dano ao DNA podem ser eliminadas do organismo através da apoptose (Navarro *et al.*, 2014; Carvalho *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2015), no teste a morte celular por apoptose pode ser investigada em diferentes órgãos, como o fígado, rim e baço. Para tanto é realizado um macerado com o tecido alvo, e colocado sobre uma lamina, fixado e corado com alaranjado de acridina, as células apoptóticas são de fácil visualização, pois apresentam tamanho aumentado e fragmentação de núcleo (Fig. 6) (Navarro *et al.*, 2014).

Figura 6. Células de fígado em apoptose, apresentando a célula em tamanho aumentado e núcleo fragmentado (seta), em microscopia de epifluorescência.



**Fonte:** Joyce Alencar Santos

### 3. OBJETIVOS

---

#### 3.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade farmacológica e toxicológica do extrato etanólico das folhas de *S. lachnostachys* (SLEE) e a fruticulina A *in vivo*.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Verificar a atividade antinociceptiva de SLEE e a fruticulina A no teste de formalina em camundongos;
- Analisar o potencial anti-hiperalgésico de SLEE frente ao estímulo mecânico e ao frio em modelo de lesão de nervo ciático avaliada com filamento eletrônico de von Frey em ratos;
- Avaliar o potencial anti-hiperalgésico e antidepressivo após a indução de dor crônica em modelo de artrite;
- Avaliar ação antidepressiva de SLEE através do teste de nado forçado em modelo de lesão de nervo ciático em ratos e no modelo de indução por clonidina;
- Determinar a atividade mutagênica de SLEE por meio do ensaio do micronúcleo em sangue periférico;
- Avaliar a atividade apoptótica de SLEE através do ensaio de apoptose em baço, rim e fígado;
- Avaliar a atividade genotóxica de SLEE pelo teste do cometa *in vivo*;

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRÃO, F. et al. *Copaifera langsdorffii* oleoresin and its isolated compounds: antibacterial effect and antiproliferative activity in cancer cell lines. **BMC Complement Altern Med**, v. 15, n. 1, p. 443, 2015. ISSN 1472-6882.

AKRAM, M. et al. Heme oxygenase 1-mediated novel anti-inflammatory activities of *Salvia plebeia* and its active components. **J Ethnopharmacol**, v. 174, p. 322-30, Nov 2015. ISSN 1872-7573.

ALVAREZ-NEMEGYEI, J.; BUENFIL-RELLO, F. A.; PACHECO-PANTOJA, E. L. Association between body composition and disease activity in rheumatoid arthritis. A systematic review. **Reumatol Clin**, v. 12, n. 4, p. 190-5, 2016 Jul-Aug 2016. ISSN 1885-1398.

AMIRKIA, V.; HEINRICH, M. Natural products and drug discovery: a survey of stakeholders in industry and academia. **Front Pharmacol**, v. 6, p. 237, 2015. ISSN 1663-9812.

ATKINSON, S. M.; NANSEN, A. Pharmacological Value of Murine Delayed-type Hypersensitivity Arthritis: A Robust Mouse Model of Rheumatoid Arthritis in C57BL/6 Mice. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 120, n. 2, p. 108-114, Feb 2017. ISSN 1742-7843.

BÄCKLUND, J. et al. C57BL/6 mice need MHC class II Aq to develop collagen-induced arthritis dependent on autoreactive T cells. **Ann Rheum Dis**, v. 72, n. 7, p. 1225-32, Jul 2013. ISSN 1468-2060.

BARBOSA, F. L. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the ethanolic extract, fractions and 8-methoxylapachenol from *Sinningia allagophylla* tubers. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 113, n. 1, p. 1-7, Jul 2013. ISSN 1742-7843.

BARON, R.; BINDER, A.; WASNER, G. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. **The Lancet Neurology**, v. 9, n. 8, p. 807-819, 2010. ISSN 1474-4422.



BARRAZA-SANDOVAL, G.; CASANOVA-MOLLÁ, J.; VALLS-SOLÉ, J. Neurophysiological assessment of painful neuropathies. **Expert rev neurother**, v. 12, n. 11, p. 1297-1310, 2012. ISSN 1473-7175.

BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-84, Oct 16 2009. ISSN 1097-4172 (Electronic) 0092-8674 (Linking).

BELLIK, Y. et al. Molecular Mechanism Underlying Anti-Inflammatory and Anti-Allergic Activities of Phytochemicals: An Update. **Molecules**, v. 18, n. 1, p. 322-353, 2012.

BEN BOUJEMA, M. et al. Nitrous oxide persistently alleviates pain hypersensitivity in neuropathic rats: A dose-dependent effect. **Pain Res Manag**, v. 20, n. 6, p. 309-15, 2015 Nov-Dec 2015. ISSN 1918-1523.

BENNETT, A. D.; EVERHART, A. W.; HULSEBOSCH, C. E. Intrathecal administration of an NMDA or a non-NMDA receptor antagonist reduces mechanical but not thermal allodynia in a rodent model of chronic central pain after spinal cord injury. **Brain Res**, v. 859, n. 1, p. 72-82, Mar 2000. ISSN 0006-8993.

BENNETT, G. J.; XIE, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, v. 33, n. 1, p. 87-107, Apr 1988. ISSN 0304-3959.

BISIO, A. et al. Antimicrobial activity of the ornamental species *Salvia corrugata*, a potential new crop for extractive purposes. **J Agric Food Chem**, v. 56, n. 22, p. 10468-10472, 2008. ISSN 0021-8561.

BONASSI, S.; MILIĆ, M.; NERI, M. Frequency of micronuclei and other biomarkers of DNA damage in populations exposed to dusts, asbestos and other fibers. A systematic review. **Mutat Res**, v. 770, n. Pt A, p. 106-118, 2016 Oct - Dec 2016. ISSN 1873-135X.

BRAIDA, D. et al. Potential anxiolytic- and antidepressant-like effects of salvinin A, the main active ingredient of *Salvia divinorum*, in rodents. **Br J Pharmacol**, v. 157, n. 5, p. 844-53, Jul 2009. ISSN 1476-5381.

BRASIL. **Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. 2: 31 p. 2013.

BRASIL. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Ministério da Saúde**, v. 1, p. 60, 2006. ISSN 85-334-1092-1.

BRODSZKY, V. et al. Determinants of biological drug survival in rheumatoid arthritis: evidence from a Hungarian rheumatology center over 8 years of retrospective data. **Clinicoecon Outcomes Res**, v. 9, p. 139-147, 2017.

BÄCKLUND, J. et al. C57BL/6 mice need MHC class II Aq to develop collagen-induced arthritis dependent on autoreactive T cells. **Ann Rheum Dis**, v. 72, n. 7, p. 1225-32, Jul 2013. ISSN 1468-2060.

CAPASSO, R. et al. The hallucinogenic herb *Salvia divinorum* and its active ingredient salvinin A reduce inflammation-induced hypermotility in mice. **J Neurogastroenterol Motil**, v. 20, n. 2, p. 142-148, 2008. ISSN 1365-2982.

CARLINO, E.; FRISALDI, E.; BENEDETTI, F. Pain and the context. **Nat Rev Rheumatol**, v. 10, n. 6, p. 348-55, Jun 2014. ISSN 1759-4804

CARVALHO, P. C. et al. Diaryl sulfide analogs of combretastatin A-4: Toxicogenetic, immunomodulatory and apoptotic evaluations and prospects for use as a new chemotherapeutic drug. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 40, n. 3, p. 715-21, Nov 2015. ISSN 1872-7077.

CASTILHOS, L. G. et al. Effect of *Uncaria tomentosa* extract on purinergic enzyme activities in lymphocytes of rats submitted to experimental adjuvant arthritis model. **BMC Complement Altern Med**, v. 15, p. 189, Jun 2015. ISSN 1472-6882.

CHEN, J. et al. Detection and toxicity evaluation of pyrrolizidine alkaloids in medicinal plants *Gynura bicolor* and *G. divaricata* collected from different Chinese locations. **Chem Biodivers**, Sep 2016. ISSN 1612-1880.

CHEN, S.; LIU, X. M. Effect of *Salvia miltiorrhiza* injection on hyperpolarization-activated current channels in dorsal root ganglion neurons of rats. **Yao Xue Xue Bao**, v. 41, n. 11, p. 1038-43, Nov 2006. ISSN 0513-4870.

CHI, S. et al. Genus *Tinospora*: Ethnopharmacology, Phytochemistry, and Pharmacology. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2016, p. 9232593, 2016. ISSN 1741-427X.

CHO, Y. G. et al. Type II collagen autoimmunity in a mouse model of human rheumatoid arthritis. **Autoimmun Rev**, v. 7, n. 1, p. 65-70, Nov 2007. ISSN 1568-9972.

COSTIGAN, M.; WOOLF, C. J. Pain: molecular mechanisms. **J Pain**, v. 1, n. 3 Suppl, p. 35-44, Sep 2000. ISSN 1526-5900.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochim Biophys Acta.** , 2013. ISSN 0304-4165.

DANTZER, R.; KELLEY, K. W. Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior. **Brain Behav Immun**, v. 21, n. 2, p. 153-60, Feb 2007. ISSN 0889-1591.

DAR, S. A. et al. *Podophyllum hexandrum* ameliorates endosulfan-induced genotoxicity and mutagenicity in freshwater cyprinid fish crucian carp. **Pharm Biol**, p. 1-11, Oct 2016. ISSN 1744-5116.

DE ARAÚJO, C. R. et al. Use of Medicinal Plants with Teratogenic and Abortive Effects by Pregnant Women in a City in Northeastern Brazil. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 38, n. 3, p. 127-31, Mar 2016. ISSN 1806-9339.

DECOSTERD, I.; WOOLF, C. J. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. **Pain**, v. 87, n. 2, p. 149-58, Aug 2000. ISSN 0304-3959.

DJOUHRI, L. et al. Spontaneous pain, both neuropathic and inflammatory, is related to frequency of spontaneous firing in intact C-fiber nociceptors. **J Neurosci**, v. 26, n. 4, p. 1281-92, Jan 2006. ISSN 1529-2401.

DWORKIN, R. H. et al. Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. **Arch Neurol**, v. 60, n. 11, p. 1524-34, Nov 2003. ISSN 0003-9942.

ELISHA, I. L. et al. The anti-arthritic, anti-inflammatory, antioxidant activity and relationships with total phenolics and total flavonoids of nine South African plants used traditionally to treat arthritis. **BMC Complement Altern Med**, v. 16, p. 307, 2016. ISSN 1472-6882.

ERBANO, M. et al. Morphoanatomical and phytochemical studies of *Salvia lachnostachys* (Lamiaceae). **Microsc Res Tech**, v. 75, n. 12, p. 1737-44, Dec 2012. ISSN 1097-0029.

FARZAEI, M. H. et al. A mechanistic review on medicinal plants used for rheumatoid arthritis in traditional Persian medicine. **J Pharm Pharmacol**, v. 68, n. 10, p. 1233-48, Oct 2016. ISSN 2042-7158.

FENG, Y. et al. Antidepressant-like effects of salvianolic acid B in the mouse forced swim and tail suspension tests. **Life Sci**, v. 90, n. 25-26, p. 1010-4, Jun 2012. ISSN 1879-0631.

FERNÁNDEZ-LLANIO COMELLA, N.; FERNÁNDEZ MATILLA, M.; CASTELLANO CUESTA, J. A. Have complementary therapies demonstrated effectiveness in rheumatoid arthritis? **Reumatol Clin**, v. 12, n. 3, p. 151-7, 2016 May-Jun 2016. ISSN 1885-1398.

FINNERUP, N. B.; SINDRUP, S. H.; JENSEN, T. S. The evidence for pharmacological treatment of neuropathic pain. **Pain**, v. 150, n. 3, p. 573-581, 2010. ISSN 0304-3959.

FONSECA, M.C.M. **Epamig pesquisa, produção de Plantas Medicinais para Aplicação no SUS**. Espaço para o produtor, Viçosa, 2012.

GANGADHARAN, V.; KUNER, R. Pain hypersensitivity mechanisms at a glance. **Dis Model Mech**, v. 6, n. 4, p. 889-95, Jul 2013. ISSN 1754-8411.

GARG, G.; ADAMS, J. D. Treatment of neuropathic pain with plant medicines. **Chin J integr med**, v. 18, n. 8, p. 565-570, 2012. ISSN 1672-0415.

GEFFENEY, S. L.; GOODMAN, M. B. How we feel: ion channel partnerships that detect mechanical inputs and give rise to touch and pain perception. **Neuron**, v. 74, n. 4, p. 609-619, 2012. ISSN 0896-6273.

GHASEMZADEH RAHBARDAR, M. et al. Anti-inflammatory effects of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L. and rosmarinic acid in a rat model of neuropathic pain. **Biomed Pharmacother**, v. 86, p. 441-449, Feb 2017. ISSN 1950-6007.

GIACOMELLI, E. et al. Cancer chemopreventive diterpenes from *Salvia corrugata*. **Phytochemistry**, 2013. ISSN 0031-9422.

GONZÁLEZ-CORTAZAR, M. et al. Isosakuranetin-5-O-rutinoside: a new flavanone with antidepressant activity isolated from *Salvia elegans* Vahl. **Molecules**, v. 18, n. 11, p. 13260-70, 2013. ISSN 1420-3049.

GRACE, P. M. et al. Harnessing pain heterogeneity and RNA transcriptome to identify blood-based pain biomarkers: a novel correlational study design and bioinformatics approach in a graded chronic constriction injury model. **J Neurochem**, v. 122, n. 5, p. 976-94, Sep 2012. ISSN 1471-4159.

GUIDA, F. et al. Salvinatorin A reduces mechanical allodynia and spinal neuronal hyperexcitability induced by peripheral formalin injection. **Mol Pain**, v. 8, p. 60, 2012. ISSN 1744-8069.

GUNASEKARANA, V.; RAJ, G. V.; CHAND, P. A comprehensive review on clinical applications of comet assay. **J Clin Diagn Res**, v. 9, n. 3, p. GE01-5, Mar 2015. ISSN 2249-782X.

GUSMAN, G. S. et al. Evaluation of the Effects of Some Brazilian Medicinal Plants on the Production of TNF-  $\alpha$  and CCL2 by THP-1 Cells. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2015, p. 497123, 2015. ISSN 1741-427X.

HAANPÄÄ, M. Are neuropathic pain screening tools useful for patients with spinal cord injury? **Pain**, v. 152, n. 4, p. 715-6, Apr 2011. ISSN 1872-6623.

HADLEY, S. H.; BAHIA, P. K.; TAYLOR-CLARK, T. E. Sensory nerve terminal mitochondrial dysfunction induces hyperexcitability in airway nociceptors via protein kinase C. **Mol Pharmacol**, v. 85, n. 6, p. 839-48, Jun 2014. ISSN 1521-0111

HARDEN, M. T. et al. Antidepressive effects of the  $\kappa$ -opioid receptor agonist salvinatorin A in a rat model of anhedonia. **Behav Pharmacol**, v. 23, n. 7, p. 710-5, Oct 2012. ISSN 1473-5849.

HASSANI, F. V. et al. Effects of silymarin on neuropathic pain and formalin-induced nociception in mice. **Iran J Basic Med Sci**, v. 18, n. 7, p. 715-20, Jul 2015. ISSN 2008-3866.

HAYASHI, M. The micronucleus test-most widely used in vivo genotoxicity test. **Genes Environ**, v. 38, p. 18, 2016. ISSN 1880-7046.

HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, M. V.; DÍAZ-GONZÁLEZ, F. Role of physical activity in the management and assessment of rheumatoid arthritis patients. **Reumatol Clin**, Jun 2016. ISSN 1885-1398.

HOLANDA, A. D. et al. Central adenosine A1 and A2A receptors mediate the antinociceptive effects of neuropeptide S in the mouse formalin test. **Life Sci**, v. 120, p. 8-12, Jan 2015. ISSN 1879-0631.

HOSSEINZADEH, H.; HADDADKHODAPARAST, M. H.; ARASH, A. R. Antinociceptive, antiinflammatory and acute toxicity effects of *Salvia leriifolia* Benth. seed extract in mice and rats. **Phytother Res**, v. 17, n. 4, p. 422-425, 2003. ISSN 1099-1573.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O. B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **J Neurosci Methods**, v. 14, n. 1, p. 69-76, Jun 1985. ISSN 0165-0270.

IASP. Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP Subcommittee on Taxonomy. **Pain**, v. 6, n. 3, p. 249, Jun 1979. ISSN 0304-3959.

ISACCHI, B. et al. Salvianolic acid B and its liposomal formulations: Anti-hyperalgesic activity in the treatment of neuropathic pain. **Eur J Pharm Sci**, v. 44, n. 4, p. 552-558, 2011. ISSN 0928-0987.

ITO, M. et al. A novel JAK inhibitor, peficitinib, demonstrates potent efficacy in a rat adjuvant-induced arthritis model. **J Pharmacol Sci**, v. 133, n. 1, p. 25-33, Jan 2017. ISSN 1347-8648.

JAHAN, S. et al. Therapeutic Targeting of NLRP3 Inflammasomes by Natural Products and Pharmaceuticals: A Novel Mechanistic Approach for Inflammatory Diseases. **Curr Med Chem**, Feb 2017. ISSN 1875-533X.

JI, R. R.; STRICHARTZ, G. Cell signaling and the genesis of neuropathic pain. **Sci STKE**, v. 2004, n. 252, p. reE14, Sep 2004. ISSN 1525-8882.

JIANG, W.-Y. et al. PF2401-SF, standardized fraction of *Salvia miltiorrhiza* shows anti-inflammatory activity in macrophages and acute arthritis *in vivo*. **Int immunopharmacol**, 2013. ISSN 1567-5769.

JUNG, H.-J. et al. Anti-inflammatory, anti-angiogenic and anti-nociceptive activities of an ethanol extract of *Salvia plebeia* R. Brown. **J Ethnopharmacol**, v. 126, n. 2, p. 355-360, 2009. ISSN 0378-8741.

KALLIOLIAS, G. D.; IVASHKIV, L. B. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. **Nat Rev Rheumatol**, v. 12, n. 1, p. 49-62, Jan 2016. ISSN 1759-4804.

KANG, S. H. et al. Recent advances in in vivo genotoxicity testing: prediction of carcinogenic potential using comet and micronucleus assay in animal models. **J Cancer Prev**, v. 18, n. 4, p. 277-88, Dec 2013. ISSN 2288-3649.

KARAMI, M. et al. Antinociceptive activity and effect of methanol extracts of three salvia spp. On withdrawal syndrome in mice. **Adv Pharm Bull**, v. 3, n. 2, p. 457-9, 2013. ISSN 2228-5881.

KASSUYA, C. A. et al. Composição dos Óleos Essenciais de *Salvia lachnostachys* e *S. melissiflora* (Lamiaceae). **Lat. Am. J. Pharm**, v. 28, n. 6, p. 919-21, 2009.

KAVIANI, M. et al. Comparison of the effect of aromatherapy with *Jasminum officinale* and *Salvia officinale* on pain severity and labor outcome in nulliparous women. **Iran J Nurs Midwifery Res**, v. 19, n. 6, p. 666-72, Nov 2014. ISSN 1735-9066.

KHUONG, T. M.; NEELY, G. G. Conserved systems and functional genomic assessment of nociception. **FEBS J**, v. 280, n. 21, p. 5298-306, Nov 2013. ISSN 1742-4658.

KOSTIĆ, M. et al. Anti-inflammatory effect of the *Salvia sclarea* L. ethanolic extract on lipopolysaccharide-induced periodontitis in rats. **J Ethnopharmacol**, Jan 2017. ISSN 1872-7573.



LAMB, K. et al. Antinociceptive effects of herkinorin, a MOP receptor agonist derived from salvinorin A in the formalin test in rats: New concepts in mu opioid receptor pharmacology: From a symposium on new concepts in mu-opioid pharmacology. **Drug alcohol depend**, v. 121, n. 3, p. 181-188, 2012. ISSN 0376-8716.

LEE, T. H. et al. Vitamin D status and its associations with rheumatoid arthritis in Korean women: the Korean National Health and Nutrition Examination Survey 2008-2014. **J Exerc Rehabil**, v. 12, n. 6, p. 610-617, Dec 2016. ISSN 2288-176X.

LEITE, F. C. et al. Curine, an alkaloid isolated from *Chondrodendron platyphyllum* inhibits prostaglandin E2 in experimental models of inflammation and pain. **Planta Med**, v. 80, n. 13, p. 1072-8, Aug 2014. ISSN 1439-0221.

LEONTI, M. et al. Reverse Ethnopharmacology and Drug Discovery. **J Ethnopharmacol**, Jan 2017. ISSN 1872-7573.

LEUNG, L.; CAHILL, C. M. TNF- $\alpha$  and neuropathic pain-a review. **J Neuroinflammation**, v. 7, n. 27, p. 1-11, 2010.

LI, W. F. et al. Henrin A: A New Anti-HIV Ent-Kaurane Diterpene from *Pteris henryi*. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 11, p. 27978-87, 2015. ISSN 1422-0067.

LIANG, L. et al. Epigenetic regulation of chronic pain. **Epigenomics**, v. 7, n. 2, p. 235-45, 2015. ISSN 1750-192X.

LUMLEY, M. A. et al. Pain and emotion: a biopsychosocial review of recent research. **J Clin Psychol**, v. 67, n. 9, p. 942-68, Sep 2011. ISSN 1097-4679.

MACHADO, D. G. et al. Antidepressant-like effects of fractions, essential oil, carnosol and betulinic acid isolated from *Rosmarinus officinalis* L. **Food Chem**, v. 136, n. 2, p. 999-1005, Jan 2013. ISSN 0308-8146.

MAROON, J. C.; BOST, J. W.; MAROON, A. Natural anti-inflammatory agents for pain relief. **Surg neurol int**, v. 1, 2010.

MARTELLO, M. D. et al. Campomanesia adamantium extract induces DNA damage, apoptosis, and affects cyclophosphamide metabolism. **Genet Mol Res**, v. 15, n. 2, Apr 2016. ISSN 1676-5680.

MATIAS, E. F. F. et al. Biological Activities and Chemical Characterization of *Cordia verbenacea* DC. as Tool to Validate the Ethnobiological Usage. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2013, 2013. ISSN 1741-427X.

MATOS, F. J. D. A. **Plantas Medicinais: Guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil**. 3ª. Fortaleza: Imprensa Universitária da UFC, 2000. ISBN 978-85-7282-008-x.

MATTHYS, P. [The effect of interferon-gamma in collagen-induced arthritis in mice shows a mechanism of expanding Mac-1+ blood cells during its pathogenesis]. **Verh K Acad Geneesk Belg**, v. 67, n. 2, p. 125-37, 2005. ISSN 0302-6469.

MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: an evolving role in future drug discovery. **Eur J Med Chem**, v. 46, n. 10, p. 4769-4807, 2011. ISSN 0223-5234.

MOHD ALI, N. et al. The promising future of chia, *Salvia hispanica* L. **J Biomed Biotechnol**, v. 2012, p. 171956, 2012. ISSN 1110-7251.

MOSSI, A. et al. Morphological characterisation and agronomical parameters of different species of *Salvia* sp.(Lamiaceae). **Braz J Biol**, v. 71, n. 1, p. 121-129, 2011. ISSN 1519-6984.

MØLLER, P. The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 98, n. 4, p. 336-45, Apr 2006. ISSN 1742-7835.

NAVARRO, S. D. et al. A new synthetic resorcinolic lipid 3-heptyl-3,4,6-trimethoxy-3H-isobenzofuran-1-one: evaluation of toxicology and ability to potentiate the mutagenic and apoptotic effects of cyclophosphamide. **Eur J Med Chem**, v. 75, p. 132-42, Mar 2014. ISSN 1768-3254.

NEUGEBAUER, V. Amygdala pain mechanisms. **Handb Exp Pharmacol**, v. 227, p. 261-84, 2015. ISSN 0171-2004.

NIRMAL, P. S. et al. New herbal composition (OA-F2) protects cartilage degeneration in a rat model of collagenase induced osteoarthritis. **BMC Complement Altern Med**, v. 17, n. 1, p. 6, Jan 2017. ISSN 1472-6882.

OECD. **Test No. 489: In vivo mammalian alkaline comet assay**. Paris: OECD Publishing, 2016. ISBN 9789264264885 (PDF).

OECD. **Test No. 422: Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test**. Paris: OECD Publishing, 2015.

Oliveira AM, Nascimento MF, Ferreira MR, Moura DF, Souza TG, Silva GC, et al. Evaluation of acute toxicity, genotoxicity and inhibitory effect on acute inflammation of an ethanol extract of *Morus alba* L. (Moraceae) in mice. *J Ethnopharmacol*. 2016. doi: 10.1016/j.jep.2016.09.004. PubMed PMID: 27596329.

OLIVEIRA, C. S. et al. Cytotoxic abietane-derivative diterpenoids of *Salvia lachnostachys*. **Phytochemistry Letters**, v. 17, p. 3, 2016.

OLIVEIRA, R. J. et al. Evaluation of chemopreventive activity of glutamine by the comet and the micronucleus assay in mice's peripheral blood. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 28, n. 1, p. 120-4, Jul 2009. ISSN 1382-6689.

\_\_\_\_\_. A novel cytosporone 3-Heptyl-4,6-dihydroxy-3H-isobenzofuran-1-one: synthesis; toxicological, apoptotic and immunomodulatory properties; and potentiation of mutagenic damage. **BMC Cancer**, v. 15, p. 561, Jul 2015. ISSN 1471-2407.

\_\_\_\_\_. Pre-treatment with glutamine reduces genetic damage due to cancer treatment with cisplatin. **Genet Mol Res**, v. 12, n. 4, p. 6040-51, Dec 2013. ISSN 1676-5680.

PANTANO, F. et al. Hepatotoxicity Induced by "the 3Ks": Kava, Kratom and Khat. **Int J Mol Sci**, v. 17, n. 4, p. 580, Apr 2016. ISSN 1422-0067.

PARENTI, C. et al. Involvement of the Heme-Oxygenase Pathway in the Antiallodynic and Antihyperalgesic Activity of Harpagophytum procumbens in Rats. **Molecules**, v. 20, n. 9, p. 16758-69, Sep 2015. ISSN 1420-3049.

PICCINELLI, A. C. et al. Anti-Inflammatory and Antihyperalgesic Activities of Ethanolic Extract and Fruticulin A from *Salvia lachnostachys* Leaves in Mice. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2014, p. 835914, 2014. ISSN 1741-427X.

POH, K. W. et al. Comprehensive gene expression profiling in the prefrontal cortex links immune activation and neutrophil infiltration to antinociception. **J Neurosci**, v. 32, n. 1, p. 35-45, Jan 2012. ISSN 1529-2401.

QUINTANS, J. S. et al. Natural Products Evaluated in Neuropathic Pain Models—A Systematic Review. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, 2013. ISSN 1742-7843.

RAMOS, L. S. et al. Popular medicinal uses of *Calea uniflora* Less. (Asteraceae) and its contribution to the study of Brazilian medicinal plants. **An Acad Bras Cienc**, v. 88, n. 4, p. 2319-2330, 2016 Oct-Dec 2016. ISSN 1678-2690.

RANG, H.P. et al. Farmacologia. 7<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

RIJAVEC, N.; GRUBIC, V. N. Depression and pain: often together but still a clinical challenge: a review. **Psychiatr Danub**, v. 24, n. 4, p. 346-52, Dec 2012. ISSN 0353-5053.

RODRIGUES, M. R. A. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory potential of extract and isolated compounds from the leaves of *Salvia officinalis* in mice. **J Ethnopharmacol**, v. 139, n. 2, p. 519-526, 2012. ISSN 0378-8741.

RODRÍGUEZ-HAHN, L. et al. Abietane type diterpenoids from *Salvia fruticulosa*. A revision of the structure of fruticuline B. **Phytochemistry**, v. 28, n. 2, p. 567-570, 1989. ISSN 0031-9422.

ROMÃO, A. P. et al. Chronic pelvic pain: multifactorial influences. **J Eval Clin Pract**, v. 17, n. 6, p. 1137-9, Dec 2011. ISSN 1365-2753.

SALMINEN, A. et al. Terpenoids: natural inhibitors of NF- $\kappa$ B signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. **Cell Mol Life Sci**, v. 65, n. 19, p. 2979-2999, 2008. ISSN 1420-682X.

SARDAR, S.; ANDERSSON, Å. Old and new therapeutics for Rheumatoid Arthritis: *in vivo* models and drug development. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, v. 38, n. 1, p. 2-13, 2016. ISSN 1532-2513.

SCHITO, A. et al. Effects of demethylfruticuline A and fruticuline A from *Salvia corrugata* Vahl. on biofilm production *in vitro* by multiresistant strains of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Enterococcus faecalis*. **Int J Antimicrob Agents**, v. 37, n. 2, p. 129-134, 2011. ISSN 0924-8579.

SEOL, G. H. et al. Antidepressant-like effect of *Salvia sclarea* is explained by modulation of dopamine activities in rats. **J Ethnopharmacol**, v. 130, n. 1, p. 187-90, Jul 2010. ISSN 1872-7573.

SIBILLE, K. T. et al. Affect balance style, experimental pain sensitivity, and pain-related responses. **Clin J Pain**, v. 28, n. 5, p. 410-7, Jun 2012. ISSN 1536-5409.

SIMONS, L. E. et al. Fear of pain in pediatric headache. **Cephalalgia**, v. 35, n. 1, p. 36-44, Jan 2015. ISSN 1468-2982.

SINGH, H. et al. Ameliorative potential of *Alstonia scholaris* (Linn.) R. Br. against chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. **BMC Complement Altern Med**, v. 17, n. 1, p. 63, Jan 2017. ISSN 1472-6882.

SNEDECOR, S. J. et al. Systematic review and comparison of pharmacologic therapies for neuropathic pain associated with spinal cord injury. **J pain res**, v. 6, p. 539, 2013.

SOMMER, C.; KRESS, M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. **Neurosci Lett**, v. 361, n. 1-3, p. 184-7, May 2004. ISSN 0304-3940.

SWARTJES, M. et al. Ketamine Does Not Produce Relief of Neuropathic Pain in Mice Lacking the  $\beta$ -Common Receptor (CD131). **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e71326, 2013. ISSN 1932-6203.

TAJERIAN, M. et al. Peripheral nerve injury is associated with chronic, reversible changes in global DNA methylation in the mouse prefrontal cortex. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e55259, 2013. ISSN 1932-6203.

TAYLOR, B. K. Spinal inhibitory neurotransmission in neuropathic pain. **Curr Pain Headache Rep**, v. 13, n. 3, p. 208-214, 2009. ISSN 1531-3433.

VAN EICK, A. J. A change in the response of the mouse in the "hot plate" analgesia-test, owing to a central action of atropine and related compounds. **Acta Physiol Pharmacol Neerl**, v. 14, n. 4, p. 499-500, Dec 1967. ISSN 0001-6748.

WALKER, J. B.; SYTSMA, K. J. Staminal evolution in the genus *Salvia* (Lamiaceae): molecular phylogenetic evidence for multiple origins of the staminal lever. **Annals of Botany**, v. 100, n. 2, p. 375-391, 2007. ISSN 0305-7364.

WANG, L. et al. The analgesic and anti-rheumatic effects of *Thladiantha dubia* fruit crude polysaccharide fraction in mice and rats. **J Ethnopharmacol**, v. 137, n. 3, p. 1381-7, Oct 2011. ISSN 1872-7573.

WHO. World Health Organization, 2017. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs369/en/>

WHO. World Health Organization. Persisting pain in children package: WHO guidelines on the pharmacological, treatment of persisting pain in children with medical illnesses. 2012

WOOLF, C. J. Overcoming obstacles to developing new analgesics. **Nat Med**, v. 16, n. 11, p. 1241-7, Nov 2010. ISSN 1546-170X.

WOOLF, C. J.; MA, Q. Nociceptors--noxious stimulus detectors. **Neuron**, v. 55, n. 3, p. 353-64, Aug 2007. ISSN 0896-6273.

XIE, X. et al. Analgesic Microneedle Patch for Neuropathic Pain Therapy. **ACS Nano**, v. 11, n. 1, p. 395-406, Jan 2017. ISSN 1936-086X.

XU, B. et al. Translational investigation and treatment of neuropathic pain. **Mol Pain**, v. 8, p. 15, 2012.

YADOLLAHI, P. et al. The study of predicting role of personality traits in the perception of labor pain. **Iran J Nurs Midwifery Res**, v. 19, n. 7 Suppl 1, p. S97-S102, Feb 2014. ISSN 1735-9066.

YANG, X. et al. A Case Report of Poisoning Caused by Incorrect Use of Salvia. **Am J Case Rep**, v. 17, p. 580-3, Aug 2016. ISSN 1941-5923.

YATES, A. A. et al. Bioactive nutrients - Time for tolerable upper intake levels to address safety. **Regul Toxicol Pharmacol**, v. 84, p. 94-101, Mar 2017. ISSN 1096-0295.

YOON, J. J. et al. Anti-rheumatoid Arthritis Effect of Kaejadan via Analgesic and Antiinflammatory Activity *in vivo* and *in vitro*. **Phytother Res**, Jan 2017. ISSN 1099-1573.

YUE, S. et al. *Salvia miltiorrhiza* compounds protect the liver from acute injury by regulation of p38 and NFκB signaling in Kupffer cells. **Pharm Biol**, p. 1-8, Jul 2014. ISSN 1744-5116.

ZAUTRA, A. et al. Examinations of chronic pain and affect relationships: applications of a dynamic model of affect. **J Consult Clin Psychol**, v. 69, n. 5, p. 786-95, Oct 2001. ISSN 0022-006X.

ZHAI, C. et al. Identification of natural compound carnosol as a novel TRPA1 receptor agonist. **Molecules**, v. 19, n. 11, p. 18733-46, 2014. ISSN 1420-3049.

ZHANG, H. et al. The antinociceptive effect and mechanism of action of SY0916. **Int Immunopharmacol**, v. 32, p. 16-23, Mar 2016. ISSN 1878-1705.

ZHAO, S. et al. Complementary and Alternative Medicine Use in Rheumatoid Arthritis: Considerations for the Pharmacological Management of Elderly Patients. **Drugs Aging**, Feb 2017. ISSN 1179-1969.

ZUNSZAIN, P. A. et al. Interleukin-1β: a new regulator of the kynurenine pathway affecting human hippocampal neurogenesis. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 4, p. 939-49, Mar 2012. ISSN 1740-634X.



## ANEXO

---

### **Anexo 1 –**

Este trabalho deu origem ao artigo “**Antidepressive and antinociceptive effects of ethanolic extract and fruticuline A from *Salvia lachnostachys* Benth leaves on rodents**” publicado no periódico “**Plos One**” (Fator de impacto 3.54, Qualis A1 na área Biotecnologia) em Fevereiro de 2017.

### **Anexo 2 –**

Este trabalho deu origem ao artigo “**Genetic toxicological assessment and anti-arthritic effects of an ethanolic extract obtained from *Salvia lachnostachys leaves***” Submetido ao periódico “**Regulatory Toxicology and Pharmacology**” (Fator de impacto 2.24, Qualis B1 na área Biotecnologia) em Janeiro de 2017.



A pedido da autora os Anexos foram retirados do pdf.