

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA, ANTI-HIPERALGÉSICA E
ANTI-DEPRESSIVA DO EXTRATO ETANÓLICO E DO COMPOSTO
ISOLADO FRUTICULINA A DE *Salvia lachnostachys Benth.* EM
ROEDORES**

ANA CLAUDIA PICCINELLI

**DOURADOS MS
2014**

ANA CLAUDIA PICCINELLI

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA, ANTI-HIPERALGÉSICA E
ANTI-DEPRESSIVA DO EXTRATO ETANÓLICO E DO COMPOSTO
ISOLADO FRUTICULINA A DE *Salvia lachnostachys Benth.* EM
ROEDORES**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal da Grande Dourados – Faculdade de
Ciências da Saúde, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Dra. Cândida Aparecida Leite Kassuya

**DOURADOS MS
2014**

Agradecimentos

Agradeço à Deus em primeiro lugar, por ter me dado a vida, a força necessária frente às adversidades e as oportunidades de grandes realizações pessoais e profissionais, pois as bênçãos e aprendizados me permitiram ser quem sou.

Aos meus pais, Mauro e Dânia e meus irmãos Caio e Lívia, os quais amo imensamente e agradeço pelo amor, apoio e vida em família. Chegar aonde cheguei sem vocês seria muito mais difícil.

Ao meu namorado, companheiro e amigo Egidio Tsuji, pelo incentivo, ajuda e carinho. Por sempre acreditar que eu estava no caminho certo. Te amo.

À minha orientadora Dra. Cândida Kassuya, por confiar no meu trabalho e minha capacidade, por entender as minhas limitações e ajudar no meu desenvolvimento profissional e pessoal, sempre atenciosa. Agradeço ainda pela oportunidade de trabalharmos juntas por mais alguns anos.

Às minhas amigas Natielli Oshiro, Daniela Oshiro, Pamela Vilela, Ranielle Vilela, Camila Colla, Débora Elisi e Kamila Postaue, pelos momentos de descontração, apoio, carinho e amizade. Cada uma é especial e única para mim.

Às colegas de mestrado e hoje amigas, Diana, Alexsandra, Juliane, Giselle, Joyce, Priscila, Isabela, Thaísa e Viviane, pelo aprendizado e amizade.

Às professoras da minha banca, Dra. Priscila Morato, Dra. Fabíola Soares e Mônica Kadri, pelas contribuições e disponibilidade em ajudar-nos neste trabalho.

Aos técnicos da Faculdade de Ciências da Saúde e professores do Mestrado em Ciências da Saúde, pela dedicação, ajuda e suporte, em especial aos que trabalharam diretamente conosco e possibilitaram a realização do nosso trabalho.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Mauro Antônio Piccinelli e Dânia Elisabeth Klein Piccinelli, que me ensinaram que caráter, humildade, honestidade e persistência devem ser praticados em todos os lugares e frente às diversas situações. Por terem acreditado na minha capacidade e me apoiado sempre. Á vocês o meu eterno amor e agradecimento.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

Sumário

Resumo.....	vi
Abstract.....	vii
Lista de Siglas e Abreviaturas	viii
1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DA LITERATURA	03
2.1 Desenvolvimento de fármacos a partir de plantas medicinais.....	03
2.2 Gênero <i>Salvia</i> e sua atividade biológica na dor e inflamação	04
2.2.1 <i>S. lachnostachys</i> e sua composição química	05
2.3 Diterpenos com atividade biológica na dor e inflamação	07
2.3.1 <i>Fruticulina A</i>	07
2.4 Processo inflamatório	08
2.5 Dor	11
2.5.1 Mecanismo periférico de transmissão sensorial	12
2.5.2 Transmissão sensorial no corno dorsal	13
2.5.3 Via nociceptiva descendente	14
2.5.4 A sensibilização central	15
2.5.5 Tipos de dor	16
2.5.6 Dor neuropática	17
2.5.7 Mecanismo de geração da dor neuropática	17
2.5.8 O papel das citocinas na dor neuropática	18
2.5.9 Tratamento da dor neuropática	19
2.6 Depressão	21
2.7 Relação entre dor e depressão	21
3 OBJETIVOS	23
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
ANEXO I.....	33
ANEXO II	59
ANEXO III.....	80

Resumo

Salvia lachnostachys Benth, Lamiaceae, é uma espécie endêmica do sul do Brasil. O extrato das suas folhas é constituído principalmente por ácido dodecanóico e fruticulina A, dentre outros componentes. A escassez de informações sobre as possíveis atividades biológicas desta espécie e também a evidência de um raro composto, a fruticulina A, ressalta a importância de estudos farmacológicos relacionados ao uso desta planta. O presente trabalho avaliou os efeitos anti-inflamatório, anti-hiperalgésico e anti-depressivo do extrato etanólico de *Salvia lachnostachys* (SLCH) e seu composto isolado fruticulina A. Modelos experimentais de inflamação aguda (edema de pata e pleurisia induzidos por injeção de carragenina) e hiperalgisia aguda (Von Frey eletrônico) foram desenvolvidos em camundongos. Em modelos de dor neuropática, a partir de lesão do nervo ciático, seguido por um modelo de depressão (teste do nado forçado) foram realizados em ratos. A administração oral de SLCH nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg diminuíram significativamente a formação do edema de pata, enquanto na pleurisia as doses de 100 e 300 mg/kg diminuíram significativamente o número total de leucócitos no lavado pleural e no extravasamento de proteínas. A administração oral de fruticulina A nas doses de 0,3 e 3 mg/kg diminuíram significativamente o total de leucócitos no lavado pleural, extravasamento protéico e edema de pata. Ambos o SLCH (100 mg/kg) e seu composto isolado fruticulina A (3 mg/kg) exibiram atividade anti-hiperalgésica em modelo de hiperalgisia mecânica induzida pela carragenina em camundongos. Em modelo de lesão de nervo ciático, o SLCH administrado na forma oral por 15 dias inibiu a sensibilidade mecânica e ao frio, assim como, diminuiu a imobilidade dos animais no teste do nado forçado. Desta forma, o presente estudo demonstrou que o SLCH é um agente anti-inflamatório, anti-hiperalgésico e anti-depressivo natural e que a fruticulina A é um dos compostos envolvidos nas propriedades do SLCH.

Palavras-chave: *Salvia lachnostachys*, inflamação, hiperalgisia, dor neuropática, fruticulina A.

Abstract

Salvia lachnostachys Benth., Lamiaceae, is an endemic specie from southern Brazil. The extract from leaves is mainly constituted by dodecanoic acid, fruticuline A and others components. The lack of information on the possible biological activities of this specie and also the evidence of a rare compound, fruticuline A, emphasizes the importance of pharmacological studies related to the use of this plant. The present work evaluated the anti-inflammatory, antihyperalgesic and antidepressive effects of the ethanolic extract of *Salvia lachnostachys* (SLCH) and its isolated compound fruticuline A. Experimental models of acute inflammation (paw oedema and pleurisy induced by carrageenan injection) and acute hyperalgesy (Electronic Von Frey) were developed in mice. In neuropathic pain model, with sciatic nerve injury, followed by a depression model (forced swim test) were done with rats. The oral administration of SLCH at doses of 30, 100 and 300 mg/kg significantly decreased paw oedema formation, while in pleurisy the dose of 100 and 300 mg/kg significantly decrease the total leucocytes number in pleural lavage and also the protein leakage. The oral administration of fruticuline A at doses of 0.3 and 3 mg/kg significantly decreased the total leucocytes number in pleural lavage, protein extravasation and paw edema. Both SLCH (100 mg/kg) and isolated compound fruticuline A (3 mg/kg) exhibited antihyperalgesic activity in carrageenan induced mechanical hyperalgesy in mice. In sciatic nerve injury model, SLCH administrated for 15 days by oral route inhibited mechanical and cold sensitivity, as well as reduced immobility in forced swim test. Therefore, the present study demonstrated that SLCH is a natural anti-inflammatory, antihyperalgesic and antidepressive agent and that fruticuline A is one of the compounds involved in SLCH properties.

Keywords: *Salvia lachnostachys*; inflammation; hyperalgesy; neuropathic pain; fruticuline A.

Lista de Siglas e Abreviaturas

AINE- anti-inflamatório não-esteroidal

Cg- carragenina

COX- cicloxigenase

FST- teste do nado forçado

i.p- intraperitoneal

IFN- interferon

IL- interleucina

ISRS- inibidor seletivo da recaptção de serotonina

MAPK- proteína quinase

NK1- receptor neuroquinina 1

PG- prostaglandina

PLP- potenciação à longo prazo

SLCH- extrato etanólico de *Salvia lacnostachys*

SNC- sistema nervoso central

SNI- lesão do nervo ciático

TGF- fator de crescimento

TLR- receptor Toll-like

TNF- fator de necrose tumoral

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais tem sido base para a medicina tradicional mundial por milhares de anos, e ainda hoje é considerado uma fonte importante de substâncias químicas que geram o desenvolvimento de novas drogas (Bellik et al., 2012). O Brasil, por sua vez, possui a maior diversidade natural do mundo e faz uso das plantas medicinais mais comumente a partir das observações populares. Esse conhecimento da medicina popular é responsável por disseminar as propriedades terapêuticas das plantas, e é a partir dessas indicações que muitos estudos químicos e farmacológicos são iniciados (Matias et al., 2013).

A resposta protetora do organismo humano frente a lesões e infecções é caracterizada pela inflamação e dor. Os medicamentos anti-inflamatórios disponíveis no mercado são ineficazes em curar doenças dolorosas crônicas e possuem diversos efeitos adversos quando utilizados em longo prazo. Evidências atuais demonstram que muitos produtos naturais são capazes de atuar como anti-inflamatórios ou analgésicos, a partir de seu mecanismo de ação, inibindo a liberação de mediadores inflamatórios, como o ácido araquidônico ou as citocinas, produzindo ou ativando segundos mensageiros, expressando fatores de transcrição ou ainda induzindo moléculas anti-inflamatórias (Barbosa et al., 2013; Bellik et al., 2013; Maroon et al., 2010).

A dor neuropática, da mesma forma, possui poucos medicamentos efetivos no alívio da mesma ou das consequências dessa condição, como por exemplo a depressão. A dor neuropática é classificada como um tipo de dor crônica causada por uma lesão ou uma doença no sistema somatossensorial, possui mecanismos fisiológicos não completamente esclarecidos. Além disso, pacientes com dor neuropática apresentam diversos sintomas neurológicos como, por exemplo, hiperalgesia, queimação, disestesia ou ainda anestesia, com grande incidência de doenças psicológicas, como a depressão. Esta união de fatores dificulta a escolha do tratamento, que muitas vezes se mostra ineficaz (Barraza-Sandoval et al., 2012; Snedecor et al., 2013). Portanto, alternativas de tratamento com o uso de produtos naturais para a dor neuropática e suas doenças associadas, tem sido foco de alguns estudos atualmente (Garg and Adams, 2012; Quintans et al., 2013).

O gênero *Salvia* (Lamiaceae) é distribuído mundialmente e encontrado no Brasil

especialmente na região sul do país, e suas várias espécies têm impulsionado diversos estudos farmacológicos e de isolamento de seus compostos (Mossi et al., 2011). Diferentes estudos farmacológicos descrevem as atividades anti-inflamatória e anti-nociceptiva de algumas de suas espécies, como por exemplo, a *S.officinalis* (Rodrigues et al., 2012), *S.plebéia* (Jung et al., 2009), *S.miltiorrhiza* (Jiang et al., 2013), *S.leriifolia* (Hosseinzadeh et al., 2003) entre outras.

S. lachnostachys Benth não possui relatos de uso medicinal popular ou estudos farmacológicos. Porém, sabe-se que esta espécie possui uma composição de ácidos terpênicos e fenólicos nas suas folhas e caule. Estudo fitoquímico recente observou a presença dos ácidos ursólico e oleanólico e o diterpeno fruticulina A, um composto raro na natureza e já isolado anteriormente em outras espécies do mesmo gênero (Erbano et al., 2012; Kassuya et al., 2009). Estudos *in vitro* com a fruticulina A demonstraram atividade anti-bacteriana (Bisio et al., 2008; Schito et al., 2011) e quimiopreventiva contra o câncer (Giacomelli et al., 2013). Não existem estudos *in vivo* com a fruticulina A.

A escassez de informações sobre as possíveis atividades biológicas desta espécie, assim como a evidência da presença de fruticulina A, ressalta a importância de estudos farmacológicos e toxicológicos relacionados com o uso desta planta. Portanto, o presente trabalho avaliou a atividade anti-inflamatória, anti-hiperalgésica e anti-depressiva do extrato de *S.lachnostachys* seu composto fruticulina A em modelos animais.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Desenvolvimento de fármacos a partir de plantas medicinais

Os primeiros relatos do uso de plantas medicinais aparecem em 2600a.C. na Mesopotâmia com cerca de 1000 substâncias documentadas (Cragg and Newman, 2013), dentre elas podemos citar os óleos da espécie *Cedrus* (Cedar) e *Cupressus sempervirens* (Cypress), *Glycyrrhiza glabra* (o alcaçuz), espécies de *Commiphora* (mirra) e a *Papaver somniferum* (suco de papoula), os quais são utilizados ainda hoje para o tratamento de doenças como tosse, resfriado, infecções e inflamação (Gurib-Fakim, 2006).

Desde essas épocas mais remotas, estudos estão sendo realizados e novas moléculas foram descobertas e apesar dessa intensa investigação, na flora terrestre estima-se que apenas 6% das aproximadamente 300.000 espécies de plantas tenham sido investigadas do ponto de vista farmacológico e 15% do fitoquímico (Cragg and Newman, 2013). Desta forma, os produtos naturais são considerados fonte de diversidade química para as descobertas farmacêuticas, sendo os metabólitos secundários resultados de diversos mecanismos de defesa (Mishra e Tiwari, 2011).

Diferentes áreas terapêuticas, como de doenças infecciosas e oncologia, têm se beneficiado com os fármacos naturais, capazes de interagir com alvos específicos no interior das células (Mishra e Tiwari, 2011). O conhecimento bioquímico e celular é capaz de fornecer ferramentas para a mensuração da potência e seletividade das drogas (Rishton, 2008). Para que essas drogas sejam estudadas, é necessário que seja realizado o isolamento, a separação e a determinação química dos produtos naturais, para que então os ensaios *in vitro* e *in vivo* sejam realizados (Phillipson, 2007).

O Brasil possui diversidade vegetal e animal abundantes, com mais de 55.000 espécies catalogadas, sendo que muitas delas não possuem estudos de seus efeitos biológicos. O Brasil, assim como outros países em desenvolvimento, faz uso das plantas medicinais em larga escala para o tratamento de enfermidades. As observações populares no uso das plantas medicinais possuem uma grande relevância, pois elas são responsáveis por disseminar as propriedades terapêuticas das plantas que não possuem estudos e não tem seus compostos químicos conhecidos. São a partir dessas indicações que muitos estudos químicos e farmacológicos são iniciados, com objetivo de comprovar a atividade

de determinada planta, quais compostos químicos estão envolvidos e garantir a segurança do seu uso (Matias et al., 2013).

2.2 Gênero *Salvia* e sua atividade biológica na dor e inflamação

O gênero *Salvia*, pertencente à família Lamiaceae, compreende em aproximadamente 1000 espécies distribuídas principalmente na América Central e do Sul (500 espécies) e na Ásia (300 espécies) (Walker e Sytsma, 2007). Seu cultivo é voltado especialmente para fins ornamentais, culinários e medicinais, sendo desta forma de grande importância econômica e etnofarmacológica. No Brasil, especialmente na região sul do país, a *Salvia* é considerada uma espécie bem adaptada, apesar de não pertencer originalmente ao país. Assim, sua utilização medicinal tem impulsionado diversos estudos farmacológicos e de isolamento de seus compostos (Mossi et al., 2011).

A Tabela 1 descreve diferentes estudos realizados com espécies do gênero *Salvia* que apresentam atividade anti-inflamatória e anti-nociceptiva. Dentre essas espécies, dois compostos isolados de *S. miltiorrhizae* e *S. divinorum*, o salvinorina A e o ácido salvianólico B, demonstraram efeito anti-hiperalgésico em modelo animal de dor neuropática e efeito anti-inflamatório, respectivamente (Capasso et al., 2008; Isacchi et al., 2011). Pode-se, desta forma, observar que há grande variedade de espécies neste gênero com atividades anti-inflamatória e anti-nociceptiva, apesar das diferenças dos compostos ativos, o que ressalta a importância dos estudos de caracterização fitoquímica e farmacológica deste gênero.

Tabela 1. Estudos farmacológicos de espécies do gênero *Salvia* com atividade anti-inflamatória e anti-nociceptiva.

Espécie de Sálvia	Tipo de extrato	Resultados obtidos	Autor e Ano
<i>S. officinalis</i>	Hidroalcoólico das folhas	Efeito anti-inflamatório e anti-nociceptivo	Rodrigues et al., 2012
<i>S. plebeia</i>	Etanólico das partes inteiras	Efeito anti-inflamatório, anti-angiogênico, anti-nociceptivo e antioxidante	Jung et al., 2009
	Fração PF2401-SF	Efeito anti-inflamatório nos macrófagos e na artrite aguda	Jiang et al., 2013
<i>S. miltiorrhiza</i>	Extrato em pó liofilizado	Efeito anti-inflamatório na colite	Wen et al., 2013
	Extrato lipossolúvel	Efeito anti-inflamatório pela inibição da expressão genética e proteica dos mediadores inflamatórios	Li et al., 2012
<i>S. leriifolia</i>	Aquoso da semente	Efeito anti-inflamatório agudo e crônico e anti-nociceptivo	Hosseinzadeh et al., 2003
<i>S. Hypoleuca</i>	Aquoso-metanólico das partes aéreas	Efeito anti-nociceptivo	Karami et al., 2013
<i>S. divinorum</i>	Etanólico das folhas	Efeito anti-inflamatório	Capasso et al., 2008
<i>S. splendens</i>	Aquoso-metanólico das folhas	Efeitos anti-inflamatório, hipoglicemiante e antioxidante	Moharram et al., 2012
<i>S. bicolor</i>	Extrato de éter de petróleo e extrato metanólico	Efeitos anti-inflamatório, analgésico e antioxidante	Ibrahim, 2012

2.2.1 *S. lachnostachys* e sua composição química

S. lachnostachys Benth (Figura 1) é composta de ácidos terpênicos e fenólicos, presentes nas suas folhas e caule. A partir do seu estudo fitoquímico foi possível observar a presença dos ácidos ursólico e oleanólico, muito comuns em diversas famílias botânicas incluindo a Lamiaceae, e o diterpeno fruticulina A, um composto muito raro na natureza e já isolado anteriormente em outras espécies do mesmo gênero, a *S. fruticulosa* Benth e a *S. corrugata* Vahl (Erbano et al., 2012). Estudo anterior do óleo essencial das folhas de *S.*

lachnostachys, evidenciou a presença de compostos alifáticos saturados em grande parte, principalmente o ácido dodecanóico (61.6% do total) e terpenos (aproximadamente 3%), sendo ao todo isolados 27 componentes (Kassuya et al., 2009).

Atualmente, não existem relatos do uso medicinal popular ou estudos farmacológicos com a *S. lachnostachys*. Desta forma, a escassez de informações sobre as possíveis atividades biológicas desta espécie, assim como a composição química já estudada e a evidência de um raro composto, ressalta a importância de estudos farmacológicos e toxicológicos relacionados com o uso desta planta. O presente trabalho baseou-se em relatos de outras espécies da mesma família, anteriormente estudadas quanto aos seus efeitos anti-nociceptivos e anti-inflamatórios, a fim de investigar esses possíveis efeitos na *S. lachnostachys* e seu composto isolado, também escasso em estudos farmacológicos, a fruticulina A.



Fig. 1- *Salvia lachnostachys* Benth. no campo. Foto tirada em Curitiba/ PR, no bairro Cidade Industrial de Curitiba. Fonte: acervo pessoal da Dr. Élide P. Santos.

2.3 Diterpenos com atividade biológica na dor e inflamação

Diterpenos ou diterpenóides são metabólitos secundários da classe dos terpenos, que contêm quatro unidades de isopreno e possuem estrutura de base $C_{20}H_{32}$. Essas substâncias naturais, comumente encontradas em plantas, possuem diversos efeitos terapêuticos, como propriedades antibacteriana, antifúngica, citotóxica e em sua maioria efeitos anti-inflamatórios (Salminen et al., 2008).

Estudos com o diterpeno Kahweol e o Cafestol, extraídos do café, demonstraram atividades anti-inflamatória e anti-nociceptiva, respectivamente (Cárdenas et al., 2011; Guzzo et al., 2012). Da mesma forma, o Neorogioltriol, extraído de uma alga vermelha chamada *Laurencia glandulifera* apresentou atividade anti-inflamatória em estudos *in vivo* e *in vitro* (Chatter et al., 2011). Em sementes de *Vitex negundo* foram isolados sete diferentes diterpenos, dentre estes cinco deles demonstraram resultados significativos na diminuição da expressão de proteínas pró-inflamatórias, demonstrando assim seu potencial como agente anti-inflamatório (Zheng et al., 2010).

Em espécies de *Salvia*, os diterpenos salvinatorina A e o ácido salvianólico B, demonstraram seus efeitos anti-hiperalgésico em modelo animal de dor neuropática e efeito anti-inflamatório, como anteriormente citado (Capasso et al., 2008; Isacchi et al., 2011; Lamb et al., 2012).

2.3.1 Fruticulina A

A fruticulina A (Figura 2) é um diterpenóide raramente encontrado na natureza. Três diferentes espécies de sálvia, sendo elas *S. fruticulosa* (Rodríguez-Hahn et al., 1989), *S. lachnostrachys* (Erbano et al., 2012) e a *S. corrugata* (Bisio et al., 2008), possuem a fruticulina A na sua composição e poucos estudos foram realizados, a fim de relatar as propriedades biológicas deste composto.

A Fruticulina A demonstrou atividade bacteriostática em bactérias gram-positivas (Bisio et al., 2008), assim como efetividade na diminuição do biofilme desse tipo de bactéria (Schito et al., 2011) e, em estudo mais recente o composto apresentou atividade quimiopreventiva no câncer (Giacomelli et al., 2013). Não existem estudos científicos *in vivo* com o composto.

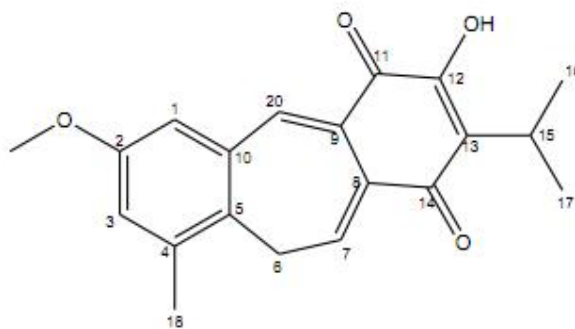


Figura 2. Estrutura química da Fruticulina A.

2.4 Processo inflamatório

O processo inflamatório é considerado uma resposta patofisiológica inata a uma infecção ou dano tecidual (Ortega-Gómez et al., 2013). Apesar de existirem relatos sobre inflamação em textos médicos antigos, os sintomas clínicos, denominados sinais cardinais, foram descritos apenas no primeiro século d.C. por Cornelius Celsus em Roma, os quais são conhecidos até hoje: calor, tumor, rubor e dor. As referências fisiológicas dos sinais cardinais caracterizadas por migração de leucócitos e mudanças vasculares na inflamação aguda, somente foram descritas posteriormente por Augustus Waller em 1846 e Julius Cohnheim em 1867 (Medzhitov, 2010; Ryan e Majno, 1977).

O tipo de via inflamatória é dependente do indutor do processo inflamatório. No caso de patógenos bacterianos, a ativação ocorre a partir dos receptores do sistema imune inato, como os receptores Toll-like (TLRs) (Medzhitov, 2010). O início da cascata inflamatória está associado com a liberação de mediadores pró-inflamatório e células teciduais, como os macrófagos e mastócitos (Walzog e Gaehtgens, 2000). A resposta imune inata ou adaptativa só ocorre quando os leucócitos atravessam os vasos sanguíneos, através do processo de diapedese, ou seja, a partir da interação leucócito-endotélio (Muller, 2013).

Mediadores como a histamina, bradicinina, serotonina, produtos da cascata do ácido araquidônico, adenosina, neuropeptídeos como a substância P e citocinas como a interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral (TNF) e as quimiocinas são responsáveis por induzir a expressão de moléculas de adesão e a secreção de mediadores solúveis, os quais permitem a interação dos leucócitos com as células endoteliais (Walzog e Gaehtgens, 2000). Além disso, agem no tecido-alvo, promovendo a vasodilatação e extravasamento de

neutrófilos e de plasma para o tecido afetado. Os neutrófilos, macrófagos e mastócitos recrutados, auxiliados pelos componentes plasmáticos como os anticorpos, são responsáveis por procurar e destruir os patógenos invasores. Além dos mediadores inflamatórios é importante ressaltar que o organismo frente a uma inflamação também induz a liberação/produção de substância anti-inflamatórias e/ou resolutorias do processo inflamatório como resolvinas, protectinas e lipoxinas (Medzhitov, 2010).

Quando existe a liberação dos mediadores inflamatórios há também alteração no mecanismo periférico do estímulo nociceptivo, resultando em resposta exagerada dos estímulos nociceptivos (hiperalgesia), dor espontânea (alodinia) e diminuição na percepção do estímulo doloroso. Com isso, outras substâncias são liberadas, como a substância P, que ocasiona vasodilatação, degranulação de mastócitos, liberação de enzimas lisossômicas, prostaglandinas e IL-1 e IL-6 (Carvalho e Lemônica, 1998).

As citocinas são proteínas de sinalização celular que são liberados pelos neurônios, células do sistema imunológico ou ainda pelas células gliais que induzem uma resposta inflamatória, contribuindo para o dano axonal e também modulando a sensibilidade espontânea, regulação homeostática e atividade dos nociceptores. As citocinas podem ser classificadas em cinco categorias: as interleucinas (IL), os interferons (IFN), os fatores de necrose tumoral (TNF), os fatores de crescimento (TGF) e as quimiocinas (Gwak et al., 2012; Wang et al., 2012)..

As principais citocinas pró-inflamatórias como a IL-1- α , IL-1- β , IL-6 e o TNF são responsáveis pela resposta aguda e agem como pirógenos endógenos, regulando a síntese de mediadores secundários e atraindo células inflamatórias. Por outro lado, a IL-4, IL-10, IL-16 e TGF- β são responsáveis por inibir a produção das citocinas pró-inflamatórias, a fim de controlar a magnitude do processo inflamatório (Ren et al., 2013).

As quimiocinas, por sua vez, são induzidas nos mastócitos e macrófagos e agem como reguladores endógenos estimulando a migração dos neutrófilos e monócitos e garantindo a homeostasia celular. Este grupo de pequenas proteínas (C, CC, CXC e CX3C) pode ser classificado por seu padrão de expressão, que pode ser induzível, homeostático ou constitutivo (Koenen e Weber, 2011).

A persistência e intensidade da inflamação alteram as respostas sistêmicas, como por exemplo, a leucopoiese da medula óssea ou ainda a resposta de fase aguda do fígado. Essas consequências negativas do processo inflamatório precisam ser controladas ou então

o tecido afetado pode sofrer danos irreversíveis através do estresse oxidativo, liberação enzimática ou ainda choque generalizado (Rauch et al., 2013). Quando persistente o processo inflamatório torna-se crônico, com mecanismos patológicos mais complexos e consequências prejudiciais. Dentre as doenças caracterizadas por inflamação crônica podemos citar a artrite reumatóide, o lúpus eritematoso, a aterosclerose e doenças inflamatórias intestinais (Carvalho e Lemônica, 1998).

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) são amplamente prescritos para o alívio da dor e inflamação. Seu mecanismo de ação anti-inflamatório está envolvido com sua habilidade de inibir a liberação da cicloxigenase-1 constitutiva (COX-1) e da cicloxigenase-2 (COX-2), e conseqüentemente, a síntese e liberação das prostaglandinas (PGs), responsáveis pela formação do edema, vasodilatação e sensibilização nociceptiva. Porém, sabe-se ainda que devido à inibição das PGs estomacais, esses medicamentos estão relacionados com efeitos adversos gastrointestinais e renais (Barbosa et al., 2013; Tarp et al., 2012).

Os AINES seletivos para a cicloxigenase-2 (COX-2), como o rofecoxibe e o celecoxibe foram desenvolvidos a fim de evitar os efeitos adversos gastrointestinais e clinicamente possuem eficácia semelhante aos AINES não-seletivos, como por exemplo, o ibuprofeno e o naproxeno, porém, efeitos adversos cardiovasculares (infarto do miocárdio, trombose, hipertensão arterial e hipertensão sistólica isolada), além de edema, hepatotoxicidade e distúrbio visual terem sido observados após sua liberação comercial (Sostres et al., 2010; Tarp et al., 2012). Neste caso, os efeitos adversos estão relacionados com a inibição da síntese e liberação das prostaciclina, responsáveis pela ativação e agregação plaquetária e vasodilatação. Além disso, o balanço alterado entre as prostaglandinas e os tromboxanos contribui para o aumento da inibição da agregação plaquetária e vasoconstricção (Mattia e Coluzzi, 2005).

Os glicocorticóides, classificados como anti-inflamatórios esteroidais (AIES), possuem eficácia em diversas doenças inflamatórias e imunológicas, como artrite reumatóide, asma e dermatites. Seu mecanismo de ação relaciona-se a sua capacidade de interferir em múltiplas vias de transdução de sinal, além disso, são capazes de ativar genes anti-inflamatórios (IL-10 e a lipocortin-1) e reprimir genes inflamatórios (citocinas e COX-2). Muitos efeitos adversos estão relacionados ao seu uso prolongado e ação metabólica, dentre eles podemos citar: osteoporose, fraqueza do músculo esquelético, dislipidemia,

hipertensão, resistência periférica à insulina, irritação gástrica, úlcera péptica, entre outros (Barbosa et al., 2013; Torres et al., 2012).

2.5 Dor

Atualmente existem diversas definições para dor; a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP- International Association for the Study of Pain) define dor como sendo “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada com o dano tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tais lesões” (Loeser e Melzack, 1999; Lumley et al., 2011), ou seja, a dor é uma experiência multidimensional que envolve processos sensoriais, emocionais, sociais e culturais que respondem a um estímulo provocando reação motora, reflexo, vocalização, reajuste postural e mudança comportamental a fim de reduzir a sensação dolorosa (Chudler e Dong, 1995; Rijavec e Grubic, 2012).

A dor é considerada como uma experiência individual e subjetiva, dificultando assim sua mensuração (Sousa, 2002). Desta forma uma experiência física de dor depende de substratos neurais distintos e pode ser dividida em dois componentes: o sensorial e o afetivo. O sensorial é aquele que determina os aspectos discriminativos da dor como a duração do estímulo, sua intensidade ou localização; já o afetivo determina a aflição e o sofrimento, que são os aspectos desagradáveis da dor (Eisenberger, 2012).

Os nociceptores, presentes na pele, articulações, músculos e órgãos, são responsáveis por conduzir a informação sensorial ao sistema nervoso central que existe um dano tecidual periférico e que este deve ser reparado (Geffeney e Goodman, 2012). Essa percepção da dor (ou nocicepção) tem grande importância e é fundamental para a sobrevivência (Khuong e Neely, 2013).

Por outro lado o componente afetivo se faz extremamente complexo. Os processos emocionais influenciam e por vezes agravam a saúde física em geral e a dor é capaz de provocar grande desconforto e reações negativas (Lumley et al., 2011; Perl, 2011). 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 (Chapman e Gavrin, 1993).

Desta forma a dor pode ser gerada mesmo que não exista a nocicepção, mas quando o sistema nervoso seja ele central ou periférico é danificado de alguma forma. A partir daí a dor passa de uma resposta natural do organismo e se torna uma doença crônica. As consequências negativas desse processo geram no cérebro reações como depressão, medo

ansiedade entre outras alterações comportamentais além da presença da dor (Julius e Basbaum, 2001; Loeser, 2000).

De forma geral, a dor pode ser classificada por seu mecanismo, local ou natureza. A dor aguda ou nociceptiva possui curta duração, servindo como um sinal de alerta a danos agudos nos tecidos e a ativação dos nociceptores. Já a dor crônica tem longa duração e não possui função de defesa, se tornado uma doença caracterizada por hipersensibilidade nociceptiva ou dor espontânea (Abbadie, 2005; Loeser e Melzack, 1999; Lumley et al., 2011).

2.5.1 Mecanismo periférico da transmissão sensorial

O estímulo nociceptivo, o principal desencadeador da dor, é responsável por ativar os nociceptores (órgãos sensoriais periféricos) que são as terminações das fibras nervosas presentes nos tecidos de todo o corpo, e que são ativadas quando existe um estímulo de alta intensidade, causando dano ou potencial dano tecidual (Coutaux et al., 2005). Os nervos periféricos incluem as fibras aferentes mielinizadas, que podem ser de pequeno ou médio diâmetro (fibras A δ) ou de grande diâmetro (fibras A α e A β) e as fibras aferentes não mielinizadas de pequeno diâmetro (fibras C) (Tabela 1). O diâmetro de cada fibra determina sua capacidade de condução e seu potencial de ação nos nervos periféricos. Como a maioria dos nociceptores são fibras A δ e C, suas diferentes velocidades de condução representam a primeira (rápida) e a segunda resposta (lenta) de dor, respectivamente (Basbaum et al., 2009; Julius e Basbaum, 2001).

Tabela 2. Fibras aferentes primárias e suas características. Adaptado de Julius e Basbaum, 2001.

Fibras Aα e Aβ	Fibras Aδ	Fibras C
Mielinizadas	Levemente mielinizada	Não mielinizada
Diâmetro grande	Diâmetro médio	Diâmetro pequeno
Toque leve e Propiocepção	Nocicepção (térmica mecânica e química)	Temperatura inócua, coceira e nocicepção (térmica e química)

As fibras A δ são divididas em duas classes principais: o tipo I, que são aquelas que respondem aos estímulos mecânicos e térmicos elevados (< 50° C) e o tipo II que tem menor resposta aos estímulos térmicos e maior resposta aos estímulos mecânicos. As fibras C, por sua vez, são mais sensíveis aos estímulos químicos (capsaicina e histamina) e a uma variedade de pruritogênios produtores de coceira, mas também apresentam fibras chamadas de nociceptores silenciosos que são responsivos ao calor e mecanicamente insensíveis (Tabela 2) (Basbaum et al., 2009).

Os corpos celulares dos nociceptores localizam-se nos gânglios da raiz ganglionar dorsal e na cadeia ganglionar trigeminal, composta por nervos da face. Ambos possuem uma ramificação axonal central e periférica responsável pela inervação do órgão-alvo e da medula espinhal, respectivamente (Basbaum et al., 2009). Esses neurônios sensoriais primários (nociceptores) são ativados através de estímulos térmicos, mecânicos ou elétricos, como anteriormente citado, e esses sinais geram correntes despolarizantes por receptores especializados no terminal dos nociceptores (Costigan e Woolf, 2000). Os nociceptores podem ser modulados a partir de suas propriedades receptoras, isto é, são responsáveis pelos sinais de dor aguda e também contribuem para a evolução da dor crônica (alodinia) (Geffeney e Goodman, 2012; Julius e Basbaum, 2001).

Quando ocorre o estímulo nocivo, este é traduzido em sinais elétricos nas terminações nervosas e a propagação deste sinal elétrico entre a periferia e a medula espinhal ou tronco cerebral segue um caminho axonal direto. Os nociceptores têm como seu principal neurotransmissor o glutamato e outros componentes (substância P e calcitonina, por exemplo), que são importantes nas sinalizações sinápticas centrais e eferentes na pele. Mudanças bioquímicas, como a ativação das MAPK, podem ocorrer devido ao potencial de ação dos nociceptores e alteram a expressão genética e o fenótipo funcional doloroso (Dubin e Patapoutian, 2010).

2.5.2 Transmissão sensorial no corno dorsal

O axônio central, localizado na raiz ganglionar dorsal na medula espinhal inerva vários segmentos da coluna vertebral e termina predominantemente nas lâminas I, II e V do corno dorsal sobre os neurônios do relé e neurônios locais, que são responsáveis pela modificação do sinal recebido. Os neurônios do tálamo, mesencéfalo e relé conduzem até o córtex singular e somatosensorial os aspectos sensório-discriminativos e afetivo-cognitivos da dor (Dubin e Patapoutian, 2010).

No corno dorsal, os neurônios excitatórios e inibitórios modulam a transmissão de sinais nociceptivos, que por fim transmitem a percepção de dor e as necessidades comportamentais e homeostáticas necessárias (Dubin e Patapoutian, 2010). A saída do corno dorsal para os centros superiores do cérebro ocorre através de neurônios com projeção espinhal através das vias nociceptivas ascendentes (D’Mello e Dickenson, 2008).

A medula espinhal faz ligação com os nociceptores através de vários tipos de células neuronais e dependendo da especificidade do sinal sináptico existem diferentes tipos de informação sensorial. A estimulação repetitiva dos neurônios induz uma resposta aumentada, que também é influenciada por interneuronios GABAérgicos inibitórios e glutamatérgicos excitatórios que podem aumentar ou diminuir a resposta das células nociceptivas, influenciando na transmissão da resposta pelo corno dorsal. Estudos têm demonstrado que outros tipos de células neuronais, como os astrócitos e a microglia, são capazes de influenciar a transmissão dolorosa através do corno dorsal, principalmente em condições patológicas (D’Mello e Dickenson, 2008).

2.5.3 Via nociceptiva descendente

Grande parte dos neurônios que se projetam para o cérebro se encontram na lâmina I e a maioria deles expressam o receptor da substância P, chamado de neuroquinina 1 (NK1), uma substância responsiva à estimulação nociva e que é liberada pelos nociceptores. Essas células NK1-positivas projetam os sinais de dor para o tálamo, a matéria cinzenta periaquedutal e parabraquial. Além disso, sua projeção também abrange algumas áreas do tronco cerebral como a medula ventromedial, uma área que transmite sinais descendentes de volta para o corno dorsal (D’Mello e Dickenson, 2008) .

Áreas límbicas do cérebro influenciam a via descendente da dor e incorporam a ela o componente emocional e afetivo. Outro caminho que fornece a experiência sensorial da dor é encontrado nas lâminas mais profundas (III e IV) que projetam sinais predominantemente para o tálamo, e é a partir deste que a transmissão nociceptiva chega às regiões corticais (D’Mello e Dickenson, 2008; Heinricher et al., 2009). No córtex existem várias regiões corticais, chamadas de “matrizes da dor”, que podem ou não serem ativadas durante a experiência dolorosa, tornando esta particular (D’Mello e Dickenson, 2008).

Durante muitas décadas, as áreas de controle das vias inibitórias descendentes responsáveis pela anti-nocicepção (analgesia endógena) eram o foco dos estudos. Nos dias de hoje sabe-se que o controle descendente pode ser facilitatório ou inibitório, podendo ser

alterado em diferentes estados patológicos, emocionais e comportamentais. Por exemplo, em casos de estresse intenso ocorre a diminuição da resposta aos estímulos nocivos (hipoalgesia) enquanto que em casos de inflamação ou lesão nervosa ocorre um aumento dessa resposta (hiperalgesia). Desta forma, quando existe a facilitação descendente ocorre também a sensibilização central, causando o desenvolvimento da hiperalgesia e favorecendo a transição da dor aguda para a dor crônica (Heinricher et al., 2009).

2.5.4 A sensibilização central

Quando não existe lesão tecidual a sensibilidade elevada retorna aos níveis normais e para que uma nova sinalização nociceptiva aconteça é necessário que haja novamente estímulos de alta intensidade. Esse sistema somatossensorial adaptativo é responsável por sensibilizar os nociceptores, e esta sensibilização desencadeada pelo sistema nervoso central (SNC) é causada pela plasticidade sináptica que foi o primeiro exemplo de sensibilização central do mecanismo de dor estudado. A partir daí descobriu-se outras formas de sensibilização nociceptiva que causam dor em condições patológicas ou normais, dentre elas podemos citar o mecanismo químico, funcional ou ainda de plasticidade estrutural (Latremoliere e Woolf, 2009).

O mecanismo de sensibilização central é uma possível explicação para as mudanças no limiar da sensibilidade dolorosa alterada e compreende em alterações no SNC. Essa sensibilização central revela a dor como uma sensação sensorial ilusória, sem que haja qualquer estímulo periférico e nesse caso o que ocorre é o desenvolvimento ou aumento da atividade espontânea e diminuição da ativação dos estímulos periféricos. O estímulo nocivo deve ser intenso, repetido e duradouro para que haja a sensibilização central e o mecanismo envolvido é dependente dos receptores NMDA, do glutamato e dos canais iônicos (Basbaum et al., 2009; Latremoliere e Woolf, 2009).

A sensibilização central dos neurônios do corno dorsal ocorre quando existem alterações neuroplásticas dos nociceptores-C, levando a uma atividade espontânea aumentada. Esse processo envolve a despolarização induzida pelo influxo de cálcio nos canais de cálcio voltagem-dependente, liberando assim, neuropeptídios e glutamato dos nociceptores, desencadeando processos secundários, como a produção de prostaglandinas, síntese de óxido nítrico e ativação glial. O objetivo desse processo é induzir uma resposta adaptativa de proteção, porém, a entrada aferente prolongada faz com que a sensibilização central dure mais que o necessário e desenvolva a dor neuropática (Taylor, 2009).

Desta forma, sabe-se que a sinalização nociceptiva é fundamental para a sobrevivência; porém quando existem certas circunstâncias fisiopatológicas, pode ocorrer uma dor não benéfica ao organismo devido a uma estimulação sensorial deturpada, provocando respostas exageradas e distorcidas, causando dor através de estímulos não dolorosos ou ainda um estímulo doloroso maior do que o normal (hiperalgesia ou hipernocicepção). Em casos mais graves, os nociceptores periféricos deturpados começam a estimular os potenciais de ação sem que haja qualquer estímulo externo e essa condição, que dura meses ou anos e aparece, por exemplo, em casos de dor neuropática e artrite, causando uma condição debilitante e sofrida para o paciente (Linley et al., 2010).

2.5.5 Tipos de dor

A dor pode ser classificada de duas formas: dor aguda e dor crônica, como anteriormente citado. Na dor aguda ou nociceptiva existe normalmente a ativação dos nociceptores no local do dano tecidual, portanto é necessário que haja o estímulo local para que esse tipo de dor se manifeste, normalmente depois de procedimentos cirúrgicos ou algumas doenças, sendo sempre acompanhada do processo de cicatrização e inflamação. Assim sua principal característica é sua curta duração e seu mecanismo envolve a ativação dos nociceptores com a finalidade de sinalizar um perigo eminente ao organismo (Abbadie, 2005; Loeser e Melzack, 1999; Lumley et al., 2011).

A dor crônica, por outro lado, é comumente ligada a doenças ou danos teciduais, mas diferente da dor aguda ela é prolongada por outros fatores. A dor nesses casos excede a capacidade do corpo de cicatrização e afeta o sistema nervoso central que sofre deturpação e se torna incapaz de retornar ao seu estado normal. As dores crônicas, como a fibromialgia, dor neuropática ou artrite e outras doenças inflamatórias se caracterizam por dor intensa e normalmente não possuem tratamentos eficazes, pois fatores afetivos, ambientais e individuais contribuem para a persistência e intensidade da dor (Afilalo e Morlion, 2013; Loeser e Melzack, 1999).

Para ser considerada crônica, a dor precisa se estender por no mínimo três meses e normalmente apresenta maiores complicações. O ponto inicial ocorre quando o alarme de dor aguda perde sua eficiência e ocorrem mudanças neurobiológicas, psicológicas e sociais, impossibilitando o estado de homeostasia. Conseqüentemente, o tratamento tradicional de dor deve ser concomitante ao acompanhamento psicológico, devido às

alterações de humor, abuso de substâncias e dificuldade sociais que os pacientes com dor crônica apresentam (Lumley et al., 2011).

Acredita-se hoje que a plasticidade que o sistema nervoso central sofre pela estimulação dos nociceptores envolve algumas regiões do cérebro como o córtex e o hipocampo, responsáveis pela aprendizagem e memória, além do corno dorsal e o córtex cingulado (Price e Ghosh, 2013). Assim, as diferentes terapias, com drogas de diferentes mecanismos não são capazes de abordar tanto o mecanismo nociceptivo quanto o mecanismo central, dificultando o tratamento da dor crônica (Afilalo e Morlion, 2013).

2.5.6 Dor neuropática

A dor neuropática é classificada atualmente pela Associação para o Estudo da Dor como um tipo de dor crônica causada por uma lesão ou uma doença no sistema somatossensorial. A falta de uma fonte para a nocicepção é uma das características dessa manifestação e para sua avaliação clínica são necessários testes de diagnósticos adequados e habilidades clínicas especiais, normalmente realizadas quando existe a suspeita do comprometimento nervoso. A dor neuropática apresenta diversos sintomas neurológicos como, por exemplo, hiperalgesia, queimação, disestesia ou ainda anestesia, podendo se manifestar de forma contínua ou como episódios isolados (Barraza-Sandoval et al., 2012; Vargas-Espinosa et al., 2012).

Podemos classificar a dor neuropática com base na localização anatômica do envolvimento neurológico, isto é, como periférica ou central. Na clínica ela pode se apresentar em diversas doenças, como: em lesões da medula espinhal, esclerose múltipla, nevralgias, inflamação, invasão tumoral, estresse, doença auto-imune entre outras. Porém, independentemente se periférica ou central esse tipo de dor é causada por uma hipersensibilidade neuronal em diferentes áreas deturpadas no SNC, podendo apresentar muitas características em comum (Del Rey et al., 2012; Vargas-Espinosa et al., 2012; Xu et al., 2012). Estima-se que no mundo existam milhões de pacientes que tem sua saúde geral e qualidade de vida (trabalho, humor, sono, vida social) comprometida pela dor neuropática (Xu et al., 2012).

2.5.7 Mecanismo da geração da dor neuropática

Os fenômenos de sensibilização periférica e central, que causam alodinia e hiperalgesia em casos de dor neuropática, são dependentes de uma variedade de processos

neuromodulatórios. Entre eles podemos citar a ativação dos receptores NMDA do corno dorsal, vigorosa ativação da resposta inflamatória na medula espinhal, microglia e astrócitos, bem como a produção de TNF, interleucinas e CCL2 (Swartjes et al., 2013).

Estudos mostram que na periferia, as lesões neuropáticas iniciam uma sensibilização, induzindo 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 recrutam 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, onde a modulação facilitatória descendente reforça a transmissão sensorial no corno dorsal da medula (Xu et al., 2012).

Modelos animais tem 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)

2.5.8 O papel das citocinas na dor neuropática

As citocinas contribuem para a patogênese da dor neuropática, em particular o fator de necrose tumoral (TNF), a interleucina-1 (IL-1) e a interleucina-6 (IL-6), as quais têm sido associadas ao desenvolvimento da dor neuropática em experimentos animais e humanos (Leung e Cahill, 2010). Em modelos experimentais de lesão espinhal, as células neuronais e gliais liberam citocinas pró-inflamatórias, principalmente o TNF e a IL-6, demonstrando assim a influência direta na ativação glial, seja na fase aguda ou crônica do desenvolvimento de dor neuropática (Gwak et al., 2012). Outra evidência recente mostrou que a presença de expressão dos genes de IL-6 e IL-8 em biópsias da pele de pacientes com dor neuropática (Wang et al., 2012).

No contexto da dor neuropática o TNF está envolvido no aumento da produção de agentes próalgésicos. Evidências mostram que a injeção de TNF no nervo ciático está associada com o edema do nervo e com o desenvolvimento da hiperalgesia e alodinia, além de ativação de macrófagos e lesão nas células de Schwann (Leung e Cahill, 2010; Xu e Yaksh, 2011). Além disso, o TNF diminuiu o limiar mecânico dos nociceptores-C, causando dano permanente a alguns deles. No corno dorsal os níveis de TNF aumentaram após dano no nervo periférico, assim como os níveis de dois receptores de TNF (TNFR1 e o TNFR2). Quando os neurônios do corno dorsal são lesionados eles respondem a quantidades muito baixas de TNF e apresentam descargas extremamente avançadas, o que provavelmente explicaria a alodinia e o comportamento doloroso nos casos de dor neuropática (Xu e Yaksh, 2011).

A família da IL-1 por sua vez, inclui a IL-1 α e a IL-1 β , sendo a última encontrada em maior quantidade na microglia e nos macrófagos. Evidências mostram que existe uma relação em potencial entre a IL-1 β , a apoptose neuronal e a dor neuropática, apesar de não existirem mecanismos bem estabelecidos para esta relação (Mika, 2008). Sabe-se apenas que essa interleucina está envolvida na regulação da plasticidade sináptica e nos processamentos de memória. Experimentos com animais e humanos têm demonstrado que mudanças na expressão de IL-1 β interferem nas funções cognitivas e sintomas depressivos quando associados com a dor crônica (Del Rey et al., 2012).

Finalmente, a IL-6, também dentre as citocinas mais importantes na dor neuropática, é um importante mediador inflamatório e modulador da resposta imune. Recentemente, estudos têm demonstrado a presença da IL-6 em diversas neuropatologias como a demência, o Alzheimer, a AIDS, a esclerose múltipla, traumas do SNC entre outras. Os efeitos inibitórios da IL-6 na hiperexcitabilidade neuronal, após uma injúria, demonstram que esta citocina está envolvida e possivelmente modula a dor neuropática, porém com mecanismos ainda não determinados (Mika, 2008).

2.5.9 Tratamentos na dor neuropática

Atualmente, a forma mais importante de tratamento em casos de dor neuropática é a abordagem farmacológica, porém, com resultados insatisfatórios quando se trata do alívio da dor. Esse fato acontece, pois as recomendações farmacológicas se baseiam apenas na intensidade da dor do paciente e os sintomas apresentados, e não é levada em conta a

heterogeneidade dos mecanismos responsáveis pela dor neuropática e os aspectos emocionais e psicológicos coexistentes (Baron et al., 2010; Finnerup et al., 2010).

Os pacientes devem ser orientados quanto aos efeitos colaterais, à eficácia e a tolerabilidade do tratamento farmacológico para que expectativas sejam evitadas, já que resultados significativos são de no mínimo 30% na redução da dor e outros pontos como a qualidade de vida e saúde, aspectos sociais e emocionais e distúrbios de sono também devem ser considerados quando a eficácia do medicamento é analisada. Na clínica, a abordagem terapêutica se faz, normalmente, com uma abordagem interdisciplinar, incluindo tratamentos farmacológicos e não-farmacológicos como terapia, por exemplo, principalmente em casos em que a dor coexiste com outros distúrbios como a ansiedade e a depressão (Baron et al., 2010). Dentre as drogas utilizadas no tratamento da dor neuropática temos os opióides, a lidocaína tópica, os antidepressivos tricíclicos, os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) e os anticonvulsivantes (Baron et al., 2010; Schestatsky, 2009; Snedecor et al., 2013; Swartjes et al., 2013).

Estudo recente mostrou através de uma revisão sistemática que não existem estudos clínicos e dados suficientes para que haja uma comparação entre as terapias farmacológicas utilizadas para a dor neuropática e que a droga pregabalina (anticonvulsivante) foi a mais estudada apresentando uma eficácia favorável no tratamento da dor neuropática (Snedecor et al., 2013). Outro estudo analisou a eficácia dos opióides, mostrando que apesar de não existirem evidências, alguns opióides podem apresentar maior efetividade que outros em pacientes com dor neuropática. Sabe-se, porém, que essa diferença de eficácia deve-se a muitas variantes como a individualidade do paciente, o receptor opióide a qual o medicamento tem afinidade, diferentes subtipos de proteína-G envolvidos na doença e os diferentes estados de dor neuropática (Smith, 2012).

Os antidepressivos tricíclicos, por sua vez, apresentam um efeito analgésico independente dos efeitos antidepressivos, podendo assim ser eficazes não somente na dor, mas como também na depressão associada a esta. Os ISRS, também se mostraram eficazes no controle da dor em casos de polineuropatias, porém ambas as classes não apresentam estudos de eficácia em outras síndromes de dor neuropática (Baron et al., 2010). Desta forma, pode-se observar como são limitadas as opções farmacológicas para o tratamento da dor neuropática e que maiores estudos são necessários para avaliar a eficácia dos medicamentos atualmente utilizados.

2.6 Depressão

A depressão, um distúrbio mental, possui uma prevalência mundial de 10-20%, sendo que 15% dos pacientes cometem suicídio. Tais valores demonstram o quanto comum são os casos de depressão e como é alta a taxa de mortalidade dos pacientes acometidos. Estima-se que no ano de 2020 esse distúrbio será o número um no mundo (Rijavec e Grubic, 2012). De acordo com a Associação Americana de Psiquiatria (American Psychiatric Association), os sintomas característicos da depressão são: anorexia, perda de peso, letargia, fadiga, distúrbios do sono, hiperalgesia, falta de concentração e redução da atividade locomotora (Maes et al., 2012).

O transtorno depressivo maior é caracterizado por uma interação entre fatores genéticos, biológicos e ambientais com uma patogênese complexa e que envolve diversos sistemas biológicos. Desta forma, muitos estudos têm sido realizados a fim de entender melhor os mecanismos envolvidos nesta doença, e sabe-se que uma evidência importante é que as alterações fisiológicas que ocorrem não são apenas no SNC, mas também na periferia (Hepgul et al., 2013).

Ainda de acordo com Hepgul e colaboradores (2013), pacientes com depressão apresentam anormalidades hormonais e imunológicas, como níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias, mudanças de neuroplasticidade, alterações no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, além de mudanças nos mecanismos de estresse oxidativo, demonstrando assim a natureza neuroprogressiva desta doença.

Muitas outras teorias existem para explicar a patogênese da depressão, dentre elas temos a hipótese das monoaminas, baseada na deficiência das monoaminas, principalmente a serotonina e norepinefrina; teorias comportamentais e cognitivas; a hipótese neurogênica e a hipótese neurodegenerativa. Porém atualmente, os mecanismos da neuroinflamação e da neurodegeneração têm ganhado maior relevância, principalmente, pois ainda não se sabe qual seria o possível papel dos glicocorticóides em ambos os mecanismos (Zunszain et al., 2011).

2.7 A relação entre dor e depressão

Em torno de 50% dos pacientes com depressão apresentam sintomas físicos dolorosos inexplicáveis como fadiga, dores musculares, nas juntas, nas costas e dores de cabeça, demonstrando dessa forma como a dor e as depressões estão interligadas. A

coexistência de ambas as doenças envolve principalmente vias neurobiológicas como alguns neurotransmissores (glutamato, substância P, serotonina, norepinefrina, dopamina, fator neurotrópico e ácido gama-aminobutírico), os quais são ativados tanto na dor quanto na depressão sem descartar a importância de outros fatores, como acima citado (Rijavec e Grubic, 2012).

Por outro lado, a depressão afeta de 30 a 100% dos pacientes com dor crônica, causando deficiências emocionais e cognitivas (Wang et al., 2011). Provas científicas relacionam a depressão com a dor crônica, como em casos de dor neuropática e fibromialgia, através do mecanismo de sensibilização central, pois ambas as doenças possuem bases neurobiológicas de alterações neuroplásticas e de expressão gênica semelhantes. Dessa forma, a etiologia de dor crônica, depressão e transtornos de ansiedade têm sido postulados como “neurosensibilização”.

Wang e colaboradores (2011) demonstraram que a cirurgia de lesão do nervo ciático em roedores, comumente utilizada como modelo de dor neuropática, induziu rapidamente um comportamento depressivo nos animais operados e que a depressão crônica apresentada é simultânea com a hipersensibilidade sensorial. Porém os mecanismos responsáveis por tal relação ainda não estão bem esclarecidos, e uma das causas poderia envolver eventos inflamatórios ou o stress pós-operatório. Sabe-se ainda, que a dor é capaz de alterar a conectividade sináptica no córtex pré-frontal e no hipocampo, alterando dessa forma a sinalização dopaminérgica, conhecida por induzir sintomas na depressão, não podendo ser descartada como uma possível explicação.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a atividade anti-inflamatória, anti-hiperalgésica e anti-depressiva do extrato de *Salvia lachnostachys* em roedores.

3.2 Específicos

- Verificar se o extrato de *S. lachnostachys* e da fruticulina A possuem ação anti-inflamatória no modelo de indução de pleurisia e edema de pata com carragenina em camundongos;
- Verificar se o extrato de *S. lachnostachys* e da fruticulina A possuem ação anti-hiperalgésica no modelo de hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina, de forma local ou sistêmica, avaliada com von Frey eletrônico em camundongos;
- Analisar se o extrato de *S. lachnostachys* possui ação anti-hiperalgésica em modelo de lesão de nervo ciático avaliada com o Von Frey eletrônico em ratos;
- Analisar se o extrato de *S. lachnostachys* diminui a sensibilidade ao frio em modelo de lesão de nervo ciático no teste de acetona em ratos;
- Avaliar se o extrato de *S. lachnostachys* possui ação anti-depressiva no teste de nado forçado em modelo de lesão de nervo ciático em ratos.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbadie C. Chemokines, chemokine receptors and pain. *Trends of Immunology*. 2005; 10: 529-534.

Afilalo M, Morlion B. Efficacy of tapentadol ER for managing moderate to severe chronic pain. *Pain physician*. 2013; 16: 27-40.

Barbosa FL, Moris LS, Riva D, Stefanello MEA, Zampronio AR. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the ethanolic extract, fractions and 8-methoxylapachenol from *Sinningia allagophylla* tubers. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2013; 113: 1-7.

Baron R, Binder A, Wasner G. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *The Lancet Neurology*. 2010; 9: 807-819.

Barraza-Sandoval G, Casanova-Mollá J, Valls-Solé J. Neurophysiological assessment of painful neuropathies. *Expert Review of Neurotherapeutics*. 2012; 12: 1297-1310.

Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*. 2009; 139: 267-284.

Bellik Y, Boukraâ L, Alzahrani HA, Bakhotmah BB, Abdellah F, Hammoudi SM, Iguer-Ouada M. Molecular Mechanism Underlying Anti-Inflammatory and Anti-Allergic Activities of Phytochemicals: An Update. *Molecules*. 2012; 18: 322-353.

Bisio A, Romussi G, Russo E, Cafaggi S, Schito AM, Repetto B, De Tommasi N. Antimicrobial activity of the ornamental species *Salvia corrugata*, a potential new crop for extractive purposes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008; 56: 10468-10472.

Capasso R, Borrelli F, Zjawiony J, Kutrzeba L, Aviello G, Sarnelli G, Capasso F, Izzo A. The hallucinogenic herb *Salvia divinorum* and its active ingredient salvinorin A reduce inflammation-induced hypermotility in mice. *Neurogastroenterology & Motility*. 2008; 20: 142-148.

Cárdenas C, Quesada AR, Medina MA. Anti-angiogenic and anti-inflammatory properties of kahweol, a coffee diterpene. *Plos One*. 2011; 6: 23407.

- Carvalho WA, Lemônica L. Mecanismos celulares e moleculares da dor inflamatória. Modulação periférica e avanços terapêuticos. *Revista Brasileira de Anestesiologia*. 1998; 48: 137-158.
- Chapman C R, Gavrin J. Suffering and its relationship to pain. *Journal of Palliative Care*. 1993; 9: 5-13.
- Chatter R, Othman RB, Rabhi S, Kladi M, Tarhouni S, Vagias C, Roussis V, Guizani-Tabbane L, Kharrat R. *In vivo* and *In vitro* anti-inflammatory activity of neorogioltriol, a new diterpene extracted from red algae *Laurencia glandulifera*. *Marine Drugs*. 2011; 9: 1293-1306.
- Chudler EH, Dong WK. The role of the basal ganglia in nociception and pain. *Pain*. 1995; 60: 3-38.
- Costigan M, Woolf C J. Pain: molecular mechanisms. *Journal of Pain*. 2000; 3: 35-44.
- Coutaux A, Adam F, Willer JC, Le Bars D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. *Joint Bone Spine*. 2005; 72: 359-371.
- Cragg GM, Newman D J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013; 1830: 3670-3695.
- D'Mello R, Dickenson A. Spinal cord mechanisms of pain. *British Journal of Anaesthesia*. 2008; 101: 8-16.
- Del Rey A, Apkarian AV, Martina M, Basedovsky HO. Chronic neuropathic pain-like behavior and brain-borne IL-1 β . *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2012; 1262: 101-107.
- Dubin AE, Patapoutian A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *The Journal of Clinical Investigation*. 2010; 11: 3760-3772.
- Eisenberger NI. The neural bases of social pain: evidence for shared representations with physical pain. *Psychosomatic Medicine*. 2012; 74: 126-35.
- Erbano M, Ehrenfried CA, Stefanello MEA, Dos Santos EP. Morphoanatomical and phytochemical studies of *Salvia lachnostachys* (Lamiaceae). *Microscopy Research and Technique*. 2012; 75: 1737-1744.

Finnerup NB, Sindrup SH, Jensen TS. The evidence for pharmacological treatment of neuropathic pain. *Pain*. 2010; 150: 573-581.

Garg G, Adams JD. Treatment of neuropathic pain with plant medicines. *Chinese Journal of Integrative Medicine*. 2012; 18: 565-570.

Geffeney S L, Goodman, MB. How we feel: ion channel partnerships that detect mechanical inputs and give rise to touch and pain perception. *Neuron*. 2012; 74: 609-619.

Giacomelli E, Bertrand S, Nievergelt A, Zwick V, Simoes-Pires C, Marcourt L, Rivara-Minten E, Cuendet M, Bisio A, Wolfender JL. Cancer chemopreventive diterpenes from *Salvia corrugata*. *Phytochemistry*. 2013; 96: 257-264.

Gurib-Fakim A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*. 2006; 27: 1-93.

Guzzo LS, Perez AC, Romero TR, Azevedo AO, Duarte ID. Cafestol, a coffee-specific diterpene, induces peripheral antinociception mediated by endogenous opioid peptides. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2012; 39: 412-416.

Gwak Y S, Kang J, Unabia GC, Hulsebosch CE. Spatial and temporal activation of spinal glial cells: role of gliopathy in central neuropathic pain following spinal cord injury in rats. *Experimental Neurology*. 2012; 234: 362-372.

Heinricher MM, Tavares I, Leith JL, Lumb BM. Descending control of nociception: specificity, recruitment and plasticity. *Brain Research Reviews*. 2009; 60: 214-225.

Hepgul N, Cattaneo A, Zunszain PA, Pariante CM. Depression pathogenesis and treatment: what can we learn from blood mRNA expression? *BMC Medicine*. 2013; 11: 28, 2013.

Hosseinzadeh H, Haddadkhodaparast MH, Arash AR. Antinociceptive, antiinflammatory and acute toxicity effects of *Salvia leriifolia* Benth. seed extract in mice and rats. *Phytotherapy Research*. 2003; 17: 422-425.

Ibrahim TA. Chemical composition and biological activity of extracts from *Salvia bicolor* Desf. growing in Egypt. *Molecules*. 2012; 17: 11315-11334.

Isacchi B, Fabbri V, Galeotti N, Bergonzi MC, Karioti A, Ghelardini C, Vannucchi MG, Bilia AR. Salvianolic acid B and its liposomal formulations: anti-hyperalgesic activity in the treatment of neuropathic pain. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011; 44: 552-558.

Jiang WY, Jeon BH, Kim YC, Lee SH, Sohn DH, Seo GS. PF2401-SF, standardized fraction of *Salvia miltiorrhiza* shows anti-inflammatory activity in macrophages and acute arthritis *in vivo*. *International Immunopharmacology*. 2013; 16: 160-164.

Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*. 2001; 413: 203-210.

Jung HJ, Song YS, Lim CJ, Park EH. Anti-inflammatory, anti-angiogenic and anti-nociceptive activities of an ethanol extract of *Salvia plebeia* R. Brown. *Journal of Ethnopharmacology*. 2009; 126: 355-360.

Karami M, Shamerani MM, Alemy S, Gohari A, Vostacolae SE. Comparison antinociceptive activity of the aqueous methanolic extracts of *Salvia hypoleuca*. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2013a; 20: 2755-2759.

Kassuya CA, Wisniewski Jr A, Simionatto EL, Santos EP, Stefanello ME. Composição dos óleos essenciais de *Salvia lachnostachys* e *S. melissiflora* (Lamiaceae). *Latin American Journal of Pharmacy*. 2009; 28: 919-921.

Khuong TM, Neely GG. Conserved systems and functional genomic assessment of nociception. *FEBS Journal*. 2013; 280: 5298-5306.

Koenen RR, Weber C. Chemokines: established and novel targets in atherosclerosis. *EMBO Molecular Medicine*. 2011; 3: 713-725.

Lamb K, Tidgewell K, Simpson DS, Bohn LM, Prisinzano TE. 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. *Drug and Alcohol Dependence*. 2012; 121: 181-188.

Latremoliere A, Woolf CJ. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *The Journal of Pain*. 2009; 10: 895-926.

Leung L, Cahill CM. TNF- α and neuropathic pain-a review. *Journal of Neuroinflammation*. 2010; 16: 7-27.

Li M, Zhang L, Cai RL, Gao Y, Qi Y.. Lipid-soluble Extracts from *Salvia miltiorrhiza* Inhibit Production of LPS-induced Inflammatory Mediators via NF- κ B Modulation in RAW 264.7 Cells and Perform Antiinflammatory Effects In Vivo. *Phytotherapy Research*. 2012; 26: 1195-1204.

Linley JE, Rose K, Ooi L, Gamper N. Understanding inflammatory pain: ion channels contributing to acute and chronic nociception. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*. 2010; 459: 657-669.

Loeser JD. Pain and suffering. *The Clinical Journal of Pain*. 2000; 16:2-6.

Loeser JD, Melzack R. Pain: an overview. *Lancet*. 1999; 353: 1607-1609.

Lumlwy MA, Cohen JL, Borszcz GS, Cano A, Raddcliffe AM, Porter LS, Schubiner H, Keefe FJ. Pain and emotion: a biopsychosocial review of recent research. *Journal of Clinical Psychology*. 2011; 67: 942-968.

Maes M, Berk M, Goehler L, Song C, Anderson G, Gatecki P, Leonard B. Depression and sickness behavior are Janus-faced responses to shared inflammatory pathways. *BMC Medicine*. 2012; 10: 66.

Maroon JC, Bost JW, Maroon A. Natural anti-inflammatory agents for pain relief. *Surgical Neurology International*. 2010; 1: 80.

Matias EF, Alves EF, Santos BS, de Souza CES, Ferreira JVA, de Lavor AKS, Figueiredo FG, de Lima LF, dos Santos FAV, Peixoto FSN, Colares AV, Boligon AA, Saraiva RA, Athayde ML, da Rocha JB, Menezes IRA, Coutinho HDM, da Costa JG. Biological Activities and Chemical Characterization of *Cordia verbenacea* DC. as Tool to Validate the Ethnobiological Usage. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013; 2013: 164215.

Mattia C, Coluzzi F. COX-2 inhibitors: pharmacological data and adverse effects. *Minerva Anestesiologica*. 2005; 71: 461.

Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*. 2010; 140: 771-776.

Mika J. Modulation of microglia can attenuate neuropathic pain symptoms and enhance morphine effectiveness. *Pharmacological Reports*. 2008; 60: 297-307.

Mishra BB, Tiwari VK. Natural products: an evolving role in future drug discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2011. 46: 4769-4807.

Moharram FA, Marzouk MS, El-Shenawy SM, Gaara AH, El Kady WM. Polyphenolic profile and biological activity of *Salvia splendens* leaves. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2012; 64: 1678-1687.

Mossi A, Cansian R, Paroul N, Toniazzo G, Oliveira J, Pierozan M, Pauletti G, Rota L, Santos A, Serafini L. Morphological characterisation and agronomical parameters of different species of *Salvia* sp. (Lamiaceae). *Brazilian Journal of Biology*. 2011; 71: 121-129.

Muller W. Getting Leukocytes to the Site of Inflammation. *Veterinary Pathology Online*. 2013; 50: 7-22.

Ortega-Gómez A, Perretti M, Soehnlein O. Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Molecular Medicine*. 2013; 5: 661-674.

Perl ER. Pain mechanisms: a commentary on concepts and issues. *Progress Neurobiology*. 2011; 94: 20-38.

Phillipson JD. Phytochemistry and pharmacognosy. *Phytochemistry*. 2007; 68: 2960-2972.

Price TJ, Ghosh S. ZIPping to pain relief: The role (or not) of PKMzeta in chronic pain. *Molecular Pain*. 2013 9: 6.

Quintans JS, Antonioli AR, Almeida JR, Santana-Filho VJ, Quintans-Júnior LJ. Natural Products Evaluated in Neuropathic Pain Models—A Systematic Review. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2013.

Rauch I, Müller M, Decker T. The regulation of inflammation by interferons and their STATs. *JAK-STAT*. 2013; 2:1.

Ren L, Hu H, Sun X, Li F, Zhou JJ, Wang YM. The roles of inflammatory cytokines in the pathogenesis of ossification of ligamentum flavum. *American Journal of Translational Research*. 2013; 5: 582.

Rijavec N, Grubic VN. Depression and pain: often together but still a clinical challenge: a review. *Psychiatria Danubina*. 2012; 4: 346-352.

Rishton GM. Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present day issues. *The American Journal of Cardiology*. 2008; 101:43-49.

Rodrigues MRA, Kanazawa LKS, Neves TLM, Silva CF, Horst H, Pizzolatti MG, Santos ARS, Baggio CH, Werner MF. Antinociceptive and anti-inflammatory potential of extract and isolated compounds from leaves of *Salvia officinalis* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 2012; 139: 519-526..

Rodríguez-Hahn L, Baldomero E, Sánchez C, Estebanes L, Cárdenas J, Soriano-García, Rúben Toscano TP.. Abietane type diterpenoids from *Salvia fruticulosa*. A revision of the structure of fruticuline B. *Phytochemistry*. 1989; 28: 567-570.

Ryan G, Majno G. Acute inflammation. A review. *The American Journal of Pathology*. 1977; 86: 183.

Salminen A, Lehtonen M, Suuronen T, Kaarniranta K, Huuskonen J. Terpenoids: natural inhibitors of Nf- κ B signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. *Celular and Molecular Life Sciences*. 2008; 65: 2979-2999.

Schestatsky P. Definição, diagnóstico e tratamento da dor neuropática. *Revista HCPA*. 2009; 28: 3.

Schito A, Piatti G, Stauder M, Bisio A, Giacomelli E, Romussi G, Pruzzo C. Effects of demethylfruticuline A and fruticuline A from *Salvia corrugate* Vahl. on biofilm production *in vitro* by multiresistant strains of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2011; 37: 129-134.

Smith HS. Opioids and neuropathic pain. *Pain Physician*. 2012; 15: 93-110.

Snedecor SJ, Sudharshan L, Cappelleri JC, Sadosky A, Desai P, Julundhwala YJ, Botteman M. Systematic review and comparison of pharmacologic therapies for neuropathic pain associated with spinal cord injury. *Journal of Pain Research*. 2013; 6: 539-547.

Sostres C, Gargallo CJ, Arroyo MT, Lanás A. et al. Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2010; 24: 121-132.

Sousa FAEF. Dor: o quinto sinal vital. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*. 2002; 10: 446-447.

Swartjes M, Niesters M, Heij L, Dunne A, Aarts L, Hand CC, Kim H, Brines M, Cerami A, Dahan A. Ketamine Does Not Produce Relief of Neuropathic Pain in Mice Lacking the β -Common Receptor (CD131). *PLOS ONE*. 2013; 8: e71326.

Tarp S, Bartels EM, Bliddal H, Furst DE, Boers M, Danneskiold-Samsøe B, Rasmussen M, Christensen R. et al. Effect of nonsteroidal antiinflammatory drugs on the C-reactive protein level in rheumatoid arthritis: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Arthritis & Rheumatism*. 2012; 64: 3511-3521.

Taylor BK. Spinal inhibitory neurotransmission in neuropathic pain. *Current Pain and Headache Reports*. 2009; 13: 208-214.

Torres RC, Insuela DBR, Carvalho VDF. Mecanismos celulares e moleculares da ação antiinflamatória dos glicocorticoides. *Corpus et Scientia*. 2012; 8: 36-51.

Vargas-Espinosa ML, Sanmaetí-García G, Vázquez-Delgado E, Gay-Escoda C. Antiepileptic drugs for the treatment of neuropathic pain: A systematic review. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*. 2012; 17: e786.

Walker JB, Sytsma KJ. Staminal evolution in the genus *Salvia* (Lamiaceae): molecular phylogenetic evidence for multiple origins of the staminal lever. *Annals of Botany*. 2007; 100: 375-391.

Walzog B, Gaehtgens P. Adhesion molecules: the path to a new understanding of acute inflammation. *Physiology*. 2000; 15: 107-113.

Wang J, Goffer Y, Xu D, Tukey DS, Shamir DB, Eberle SE, Zou AH, Blanck TJ, Ziff EB.. A Single Sub-anesthetic Dose of Ketamine Relieves Depression-like Behaviors Induced by Neuropathic Pain in Rats. *Anesthesiology*. 2011; 115: 812-821.

Wang XM, Lehky TJ, Brell JM, Dorsey SG. Discovering cytokines as targets for chemotherapy-induced painful peripheral neuropathy. *Cytokine*. 2012; 59: 3-9.

Wen XD, Wang CZ, Yu C, Zhang Z, Calway T, Wang Y, Li P, Yuan CS. Salvia miltiorrhiza (Dan Shen) Significantly Ameliorates Colon Inflammation in Dextran Sulfate Sodium Induced Colitis. *The American Journal of Chinese Medicine*. 2013; 41: 1097-1108.

Xu B, Descalzi G, Ye HR, Zhuo M, Wang YW. Translational investigation and treatment of neuropathic pain. *Molecular Pain*. 2012; 8: 15.

Xu Q, Yaksh TL. A brief comparison of the pathophysiology of inflammatory versus neuropathic pain. *Current Opinion in Anaesthesiology*. 2011; 24: 400.

Zheng CJ, Huang BK, Wang Y, Ye Q, Han T, Zhang QY, Zhang H, Qin LP. Anti-inflammatory diterpenes from the seeds of *Vitex negundo*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2010; 18: 175-181.

Zunszain PA, Anacker C, Cattaneo A, Carvalho LA, Pariante CM. Glucocorticoids, cytokines and brain abnormalities in depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2011; 35: 722-729.

Artigo 1 submetido a revista Phytomedicine (fator de impacto- 2.972) :

ANTI-INFLAMMATORY AND ANTI-HYPERALGESIC ACTIVITY OF EXTRACT
AND FRUTICULINE A FROM *Salvia lachnostachys* IN MICE

**ANTI-INFLAMMATORY AND ANTIHYPERALGESIC ACTIVITY OF
EXTRACT AND FRUTICULIN A FROM *Salvia lachnostachys* IN MICE**

A. C. Piccinelli^a, D. F. S. Aquino^a, R. L. B. Strapasson^b, E. P. Santos^c, M. E. A. Stefanello^b, R.J. Oliveira^d, C. A. L. Kassuya^a

^aFederal University of Grande Dourados, College of Health Science, Dourados, MS, Brazil

^bFederal University of Paraná, Chemistry Department, Curitiba, PR, Brazil.

^cFederal University of Paraná, Botany Department, Curitiba, PR, Brazil.

^dFederal University of Mato Grosso do Sul, “Dr. Hélio Mandetta” School of Medicine, Campo Grande, MS, Brazil.

**Corresponding author:* Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 79825-070, MS, Brazil, Phone: +55 67 3410-2326 Fax: +55 67 3410-2326. *E-mail address:* candida2005@gmail.com

ABSTRACT

Salvia lachnostachys Benth., Lamiaceae, is an endemic specie from southern Brazil. The ethanolic extract from leaves is mainly constituted by fruticulin A and a mixture of oleanolic and ursolic acids. Our study aimed to evaluate the anti-inflammatory and analgesic effects of ethanolic extract of *Salvia lachnostachys* (SLCH) and its isolated compound fruticulin A in experimental models of inflammation (paw oedema and pleurisy induced by carrageenan injection) and hyperalgesia (Electronic Von Frey), performed in mice. The oral administration of SLCH at doses of 30, 100 and 300 mg/kg significantly decreased paw oedema formation, while in pleurisy the dose of 100 and 300 mg/kg significantly decreased the total leucocytes number in pleural lavage and also the protein leakage. The compound fruticulin A was isolated from SLCH and identified by NMR analysis. The oral administration of fruticulin A at doses of 0.3 and 3 mg/kg significantly decreased the total leucocytes number in pleural lavage, protein extravasation and paw edema. Both SLCH (100 mg/kg) and isolated compound fruticulin A (3 mg/kg) exhibited antihyperalgesic activity in carrageenan induced mechanical hyperalgesia in mice. Local administration of fruticulin A (3 mg/kg) also significantly prevented mechanical hyperalgesia, demonstrating a local antihyperalgesic effect. In the study of the mechanism of action, local administration of fruticulin A (3 mg/kg), significantly inhibited TNF-, but not L-DOPA induced mechanical hyperalgesia. In conclusion, the present study showed that SLCH is an anti-inflammatory and analgesic natural agent. The results lead us to conclude that fruticulin A is a compound involved in the anti-inflammatory and antihyperalgesic properties of SLCH with a TNF related mechanism.

Keywords: Lamiaceae; inflammation; hyperalgesia; *Salvia lachnostachys*; fruticulin A; TNF.

INTRODUCTION

Since ancient times, plants have been used across the world as a safe natural source of therapeutic agents because of their pharmacological principles. Even with a relative safe in use, the population feels more confident in spreading their usage to others. According to the World Health Organization (WHO), nowadays 70-80% of the world population has the traditional medicine as a primary healthcare (D'Cruz et al., 2010).

The available therapy for inflammatory and pain states is often inadequate. The reasons for that involve severe side effects, resulted from long use and lacks efficacy. Thus, studies with new analgesic and anti-inflammatory drugs that provide efficacy and safety are needed, and natural products are an option for the development of new drugs as an extensive therapeutic source (Recio et al., 2012; da Silva et al., 2012).

The genus *Salvia*, Lamiaceae family, consists of about 900 species distributed in tropical and subtropical regions. They are usually used as condiments and/or used for several therapeutic properties in folk medicine (Kassuya et al., 2009). In Brazil, there are 61 native species however, there are a few pharmacological studies about them (Erbano et al., 2012).

Salvia lachnostachys Benth. is endemic to southern Brazil and according to a chemical study, the essential oil of its leaves and flowers has mostly long-chain aliphatic acids and terpenoids as minor components (Kassuya et al., 2009). The phytochemical study demonstrated the presence of the diterpene fruticulic acid and ursolic and oleanolic acids (Erbano et al., 2012). Fruticulic acid has been recently studied and presented antibacterial (Bisio et al., 2008; Schito et al., 2011) and cancer chemopreventive activities (Giacomelli et al., 2013).

Therefore the lack of pharmacological studies with this specie of *Salvia* and the presence of terpenoids in its composition, led us to evaluate the anti-inflammatory and antihyperalgesic effect of the ethanolic extract of *Salvia lachnostachys* and its isolated compound fruticulin A in experimental models of inflammation and hyperalgesia in mice.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material

The plant material was collected from natural populations in Curitiba, Parana state, Brazil (25°30'44.6"S, 49°18'7.13"W), by E.P. Santos (number 1251), and a voucher was included in the herbaria UPCB (Herbarium of the Federal University of Paraná).

Preparation of the ethanolic extract and isolation of fruticulin A

Dried and powdered leaves of *S. lachnostachys* were extracted with hexane followed by ethanol, yielding the ethanolic extract (SLCH) after solvent removal. The phytochemical study of SLCH lead to isolation of fruticulin A (Figure 1). Detailed experimental procedures were previously described (Erbano et al., 2012).

Animals

To the experimental procedures were used adult male and female Swiss mice with approximately weight of 20 g and 50 days age at the beginning of the experiments. These animals were provided from the Federal University of Grande Dourados (UFGD) biotherium. The animals were kept in collective cages (5 animals per cage) under controlled temperature (23 ± 1 ° C) and light cycle (12 h light / dark), treated with water and commercial diet *ad libitum*. All experimental procedures were approved for research by the ethics committee on laboratory animals of UFGD (Nbr. 013/2013).

Reagents

λ -Carrageenan, TNF, L-DOPA, Bradford reagent, and dexamethasone were purchased from Sigma-Aldrich ® Co. LLC (St. Louis, MO, USA).

Model of Carrageenan induced Paw Oedema

Each experimental methodology was conducted in two stages. In the first stage we tested the crude ethanolic extract at 3 different doses and in the second stage we tested the isolated compound, fruticulin A also in 3 different doses. Doses were determined in a pilot study and according to literature data (Karami et al., 2013b).

Male animals were divided into experimental groups (n = 5 animals / group). Group 1 (control) was treated orally with vehicle (10 mL / kg of saline 0.9% saline). Different groups of mice received by oral route doses of the crude ethanolic extract of *S. lachnostachys* (30, 100 and 300mg/kg) or isolated compound fruticulin A (0.3, 1 and 3 mg) dissolved in 0.9% saline solution. The positive control group received dexamethasone at the dose of 1 mg/kg by subcutaneous route. 1 hour after the treatments, animals received, in the right hind paw, 50 μ L of 0.9% saline solution containing 300 μ g of carrageenan. The same volume of saline solution was administered in the left hind paws which were used as control. Edema was measured with a paw plethysmometer (PANLAB- Havard) at the times 0.5, 1, 2 and 4 hours after carrageenan application (Formagio et al., 2013; Kassuya et al., 2005; Winter et al., 1962).

Model of Carrageenan induced pleurisy

Female animals were divided into experimental groups (n=5 animals/ group). SLCH was tested orally at 3 different doses (30, 100, and 300 mg/kg) and the isolated compound fruticulin A was tested orally at three different doses (0.3, 1 and 3 mg/kg) one hour before carrageenan injection. Positive control group received 1 mg/kg of

dexamethasone, subcutaneously, 1 hour before carrageenan application. Pleurisy was induced applying 0.25 ml suspension containing 300 µg of carrageenan (dilution in phosphate buffered saline PBS, pH = 7.4) in the mice pleural cavity according to the technique previously described (Vinegar et al., 1973). Four hours after induction of pleurisy, animals were euthanized and the pleural inflammatory exudate was collected through pleural lavage with 1 ml of sterile saline. The exudate volume was measured, and an aliquot of 50 µL was diluted with Turk's solution (1:20). Total leukocytes were counted in a Neubauer chamber, considering the four external quadrants, in a light microscope.

In each ELISA microwell plate was added 10 µL of pleural lavage and 300 µL of Bradford. Protein measurement was performed colorimetrically (TP-photometer Reader / Thermo Plate ®) at the laboratory of Microbiology, Faculty of Health Sciences, FCS - UFGD.

Model of Carrageenan-induced hyperalgesia

One day earlier the basal measurement was performed in all animals. Mice were housed in containment boxes (WxDxH 230 x 200 x 180 mm - Insight ®) in a steel mesh with 1 cm diameter spacing for a period of 1 hour and the digital analgesymeter (Insight ® - EFF 301 - Digital analgesymeter - von Frey) was used in order to determine the similar mean baseline of mechanical stimulus in the right hind paw (Chaplan et al., 1994; Mori et al., 2011).

At the following day, each group of male mice (n = 6 / group) received orally (gavage) 0.9% saline solution or SLCH 300 mg/kg or fruticulin A 3 mg/kg. One hour after oral treatment, animals received 300 µg of carrageenan injection, subcutaneously (λ-carrageenan - Sigma-Aldrich ®), in the right hind paw. Then, each animal was housed in the same containment boxes under the same steel mesh. Mechanical

hyperalgesia was measured at the times 3 and 4 hours after carrageenan injection using the digital analgesymeter previously described.

The same procedures were performed with an injection of fruticulin A (1µg/paw, 20 µL) and a control group (saline 0.9% v/v) to evaluate local antihyperalgesic activity of the compound (Barbosa et al., 2013).

TNF- and L-DOPA-induced hyperalgesia

To evaluate the effect of the compound on hyperalgesia induced by different stimuli, basal mechanical withdrawal threshold of mice was assessed with digital analgesymeter as described before, and then the animals were treated with fruticulin A (1µg/paw, 20 µL) or the same volume of vehicle (saline 0.9% v/v), and after 15 minutes, they received TNF (1 pg/paw in a volume of 20 µL) or L-DOPA (10 µg/paw) in a volume of 20 µL (Cunha et al., 2005; Cunha et al., 2008) . Mechanical hyperalgesia was also measured after 3 h (Barbosa et al., 2013).

Statistical Analysis

Data are presented as mean ± S.E.M. Differences between groups was evaluated by analyses of variance (one-way ANOVA) followed by the Newman-Keuls test (the symbols were included in the figures) or Bonferroni test (symbols were not included in the figures). The number of animals per group is indicated in the legends. Statistical differences were considered to be significant at P<0.05. *Asterisks or # denote significant difference compared with groups.

RESULTS

Effects of SLCH and fruticulin A against carrageenan induced oedema

The results of first test using SLCH (30, 100, and 300mg/kg) were showed in

Figure 2. The Cg injection in the right hind paw of the animals induced edema, peaking at 2 h. Oral treatment with SLCH was able to significantly inhibit the edema formation in a dose-dependent manner. The maximum inhibitions were $84 \pm 3\%$ at the dose of 300 mg/kg and $77 \pm 3\%$ at the dose of 100 mg/kg after 2 hours of Cg injection, with $P < 0.01$.

The statistical analyses (symbols not included in the figures) with ANOVA with post-test Bonferroni (comparing all pairs of columns) showed that all doses tested of SLCH (except the group treated with 30 mg/kg – Figure 2C), fruticulin A and dexamethasone (Figure 2 and 3) had statistical differences from control group. All doses tested of SLCH did not differ between groups and dexamethasone group in Figure 2A, 2B, and 2D therefore in Figure 2C the dose of 300 mg/kg group were significantly different from treated group with dose of 30 mg/kg and group.

We can also observe that administration of fruticulin A significantly decreased paw edema in mice at doses of 1 and 3 mg/kg (Figure 3C), with no significant difference between both doses. The maximum inhibitions were $54 \pm 11\%$ at the dose of 1 mg/kg and $55 \pm 11\%$ at the dose of 3 mg/kg after 2 hours of Cg injection, with $P < 0.05$. The statistical analyses (symbols not included in the figures) with ANOVA with post-test Bonferroni (comparing all pairs of columns) showed that all doses tested of fruticulin A did not differ between groups and dexamethasone group in Figure 2A, 2B, and 2D, therefore in Figure 2C the dose of 30 mg/kg group were significantly different from 100 and 300 mg/kg and dexamethasone group.

The anti-inflammatory activity of SLCH and fruticulin A on carrageenan induced leukocyte migration and protein extravasation in pleural cavity

In the pleurisy test, the number of total leukocyte counted in a Neubauer

chamber significantly ($P < 0.01$) decreased in groups SLCH 30, 100 and 300 mg/kg (Figure 4A), when compared to the control group, with no significant difference between both doses. The maximum inhibitions were respectively $46 \pm 6\%$ and $24 \pm 6\%$.

There was also a significant decrease in protein dosage of pleural lavage for the group SLCH 100 and 300 mg/kg ($P < 0.01$), when compared to the control group (Figure 4B). The anti-inflammatory steroidal group (DEX) had a decrease in leukocyte migration and also in protein extravasation (Figure 4).

In the evaluation of fruticulin A in the model of pleurisy, the two tested doses (0.3, 1 and 3 mg/kg) showed significant effects with $P < 0.01$, decreasing the total leukocyte count in a dose-dependent manner compared to the control group (Figure 5A). The maximum inhibitions were respectively $31 \pm 7\%$ and $54 \pm 3\%$.

The amount of protein measured in pleural lavage was also significantly lower for fruticulin A groups when compared to the control group, with $P < 0.05$ at dose of 0.3 and 1 mg/kg and $P < 0.01$ at dose of 3 mg/kg (Figure 5B).

Analyzing the results by ANOVA with post-test Bonferroni, all naïve groups differ significantly from control groups in Figure 4 and 5. Moreover, all doses tested of SLCH (except the group treated with 30 mg/kg – Figure 4B), fruticulin A, and dexamethasone (Figure 2 and 3) had statistical differences from control group. In figure 4A, the group treated with SLCH at dose of 100 mg/kg differed from others group. And in figure 5A, the group treated with dexamethasone had statistical differences from others group. All doses tested of SLCH did not differ between groups and dexamethasone group in Figure 5.

The anti-hyperalgesic activity of oral administration of SLCH and local and oral administration of fruticuline A on carrageenan induced mechanical sensitivity in

mice

Carrageenan injection decreased significantly the basal values, measured by electronic von Frey mechanical stimulation. It is possible to see in Figure 6 that the substances orally tested (SLCH 300 mg/kg and fruticulin A 3 mg/kg) relieved hyperalgesia, so that the animals withstood the strength applied to the von Frey filaments. Maximum inhibitions were $61 \pm 15\%$ for SLCH 300 mg/kg after 3 hours of Cg injection and $72 \pm 13\%$ and $53 \pm 11\%$ for SLCH 300 mg/kg and fruticulin A 3 mg/kg, respectively, after 4 hours of Cg injection.

Local administration of compound fruticulin A ($1\mu\text{g}/\text{paw}$, $20\ \mu\text{L}$) significantly prevented the decrease of the threshold of sensitivity, with maximum inhibition of $72 \pm 15\%$ after 3 hours and $72 \pm 15\%$ after 4 hours of Cg injection, with $P < 0.05$ (Figure 7).

The anti-allodynic activity of local administration of fruticulin A on TNF- or L-DOPA- induced hypernociception

TNF injection decreased significantly the basal values of measure by electronic von Frey mechanical stimulation. Local administration of fruticulin A inhibited the hyperalgesic effects of TNF, but not L-DOPA, significantly preventing the decrease of the threshold of sensitivity, being of 72 ± 7 at a dose of $1\mu\text{g}/\text{paw}$, after 3 hours of TNF injection, with $P < 0.05$ (Figure 8).

DISCUSSION

In the present study we evaluated the anti-inflammatory and antihyperalgesic actions of extract from leaves of *S. lachnostachys* in oedema, pleurisy and hypernociception induced by mechanical stimuli in carrageenan models in mice. It was also observed that the dose based in yield of the isolated compound fruticulin A, but not the mixture of ursolic and oleanolic acids (results not shown), was able to reduce the oedema, the leukocytes migration, protein leakage and hypernociception induced by

carrageenan. Fruticulin A also demonstrated an antihyperalgesic effect when administered locally, inhibiting both carrageenan and TNF hyperalgesia. However, there is little pharmacological information in the literature to support the possible activity of extracts or compounds derived from *S. lachnostachys*. To our knowledge, the present study represents the first research that demonstrates the pharmacological properties of extract of *S. lachnostachys* leaves in adult male and female mice.

Salvia genus, belonging to the Lamiaceae family, comprises approximately 100 species distributed mainly in Central and South America (500 species) and Asia (300 species) (Walker and Sysma, 2007). It is commonly used for ornamental, culinary and medicinal purposes, and has great economic and ethnopharmacological importance (Mossi et al., 2011). Several studies demonstrated different species of *Salvia* with anti-inflammatory and anti-nociceptive activity, among them we have *S. officinalis* (Rodrigues et al., 2012), *S. plebeian* (Jung et al., 2009), *S. miltiorriza* (Wen et al., 2013), *S. leriifolia* (Hosseinzadeh et al., 2003), *S. hypoleuca* (Karami et al., 2013a), *S. divinorum* (Capasso et al., 2008), *S. splendens* (Moharram et al., 2012), *S. bicolor* (Ibrahim, 2012). Currently, there are no reports of folk use or pharmacological studies with *S. lachnostachys* and, our study showed for the first time the ability of the extract from leaves to inhibit some parameters of inflammation such as mechanical pain, leukocyte migration, oedema, and plasma leakage in experimental inflammatory models.

Previous study from our group showed that the essential oil from the leaves of *S. lachnostachys* contains mainly aliphatic fatty acids, such as, dodecanoic acid (61.6% of total), and a minor fraction of sesquiterpenes (about 12%) (Kassuya et al., 2009). In contrast, ethanolic extract is rich in diterpenes and triterpenes. Diterpenes, commonly found in plants belonging to Lamiaceae family, have various therapeutic effects, such

as antibacterial, antifungal, cytotoxic and, mostly anti-inflammatory activity (Salminen et al., 2008). Studies with the diterpene kahweol and cafestol, isolated from coffee extract, showed antinociceptive and antiinflammatory activities, respectively (Cardenas et al., 2011; Guzzo et al., 2012). Likewise, Neorogioltriol, extracted from a red alga called *Laurencia glandulifera* demonstrated anti-inflammatory activity *in vivo* and *in vitro* (Chatter et al., 2011). In the seeds of *Vitex negundo* seven different diterpenes have been isolated, among these, five of them showed significant results in decreased expression of proinflammatory proteins, demonstrating its potential as an anti-inflammatory agent (Zheng et al., 2010).

In species of *Salvia*, *S. miltiorrhizae* and *S. divinorum*, diterpenes salvinin A and B salvianolic acid demonstrated its anti-hyperalgesic effects in animal models of neuropathic pain and anti-inflammatory effect, respectively (Capasso et al., 2008; Isacchi et al., 2011; Lamb et al., 2012). The diterpene fruticulin A, assayed in this work, is a rare compound in nature and, has been previously isolated only from *S. fruticulosa* Benth (Rodriguez-Hahn et al, 1989) and *S. corrugata* Vahl (Bisio et al., 2008). In addition to previously reported antibacterial (Bisio et al., 2008; Schito et al., 2011) and cancer chemopreventive (Giacomelli et al, 2013) activities of fruticulin A, the present work describes the effects of this compound in leukocyte migration, protein extravasation and oedema. The results suggest that the fruticulin A is responsible, at least in part for anti-inflammatory action of SLCH.

The carrageenan inflammatory agent is capable to induced inflammatory pain by a mechanism of nociceptor sensibilization (Barbosa et al., 2013). Oedema formation induced by carrageenan is characterized as a biphasic event: the first phase (0-2 hours) is mediated by histamine and serotonin followed by bradykinin, prostaglandins and lysosome while the late phase (2-6 hours) is related with the production of TNF,

interleukins (IL-1 β and IL-6) and nitric oxide (Li et al., 2013). Similarly, carrageenan induced hypernociception is also dependent of mediators as bradykinin, TNF, prostaglandin, keratinocyte-derived chemokine (KC) and sympathetic amines (Cunha et al., 2005; Cunha et al., 2008).

TNF is produced by mononuclear phagocytes and is responsible for immune responses and induction of other inflammatory cytokines (Ma et al., 2013). Therefore, TNF may be involved in both oedema formation and hyperalgesia, which may explain the effects of fruticulin A on the animal models performed. The other pathway of carrageenan-induced hyperalgesia involves the sympathetic amines, the L-DOPA injection activates this pathway but fruticulin A did not interfere in this activation showing that this pathway is not important for fruticulin A anti-hyperalgesic effects. These results suggested that the main mechanism responsible by SLCH and fruticulin A antihyperalgesic actions could involves TNF pathway.

CONCLUSION

The present study showed that the extract from leaves of *S. lachnostachys* (SLCH) has anti-inflammatory and antihyperalgesic effects in oedema, pleurisy and hyperalgesia induced by carrageenan models in mice. Fruticulin A, a diterpene found in *S. lachnostachys*, seems to be responsible for SLCH effects, when tested in a dose based in extract yield orally and locally, and was able to reduce the oedema, the leukocytes migration, protein leakage and hyperalgesia induced by carrageenan. TNF seems to be involved on its mechanism of action however other possible mechanisms should be investigated. To our knowledge, the present study represents the first research that demonstrates the pharmacological properties of extract of *S. lachnostachys* leaves and fruticulin A in mice.

Conflict of interest

No conflict to disclose.

Acknowledgement

The authors are thankful to CAPES and CNPq for the financial support.

REFERENCES

Barbosa FL, Moris LS, Riva D, Stefanello MEA, Zampronio AR. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the ethanolic extract, fractions and 8-methoxylapachenol from *Sinningia allagophylla* tubers. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2013; 113: 1-7.

Bisio A, Romussi G, Russo E, Cafaggi S, Schito AM, Repetto B, De Tommasi N. Antimicrobial activity of the ornamental species *Salvia corrugate*, a potential new crop for extractive purposes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008; 56: 10468-10472.

Capasso R, Borrelli F, Zjawiony J, Kutrzeba L, Aviello G, Sarnelli G, Capasso F, Izzo A. The hallucinogenic herb *Salvia divinorum* and its active ingredient salvinorin A reduce inflammation-induced hypermotility in mice. *Neurogastroenterology & Motility*. 2008; 20: 142-148.

Cárdenas C, Quesada AR, Medina MA. Anti-angiogenic and anti-inflammatory properties of kahweol, a coffee diterpene. *Plos One*. 2011; 6: 23407.

Chaplan S, Bach F, Pogrel J, Chung J, Yaksh T. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *Journal of Neuroscience Methods*. 1994; 53: 55-63.

Chatter R, Othman RB, Rabhi S, Kladi M, Tarhouni S, Vagias C, Roussis V, Guizani-Tabbane L, Kharrat R. *In vivo* and *In vitro* anti-inflammatory activity of neorogioltriol, a new diterpene extracted from red algae *Laurencia glandulifera*. *Marine Drugs*. 2011; 9: 1293-1306.

Cunha T, Verri W, Silva J, Poole S, Cunha F, Ferreira S. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005; 102: 1755-1760.

Cunha TM, Verri WA, Schivo IR, Napimoga MH, Parada CA, Poole S, Teixeira MM, Ferreira SH, Cunha FQ. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. *Journal of Leukocyte Biology*. 2008; 83: 824-832.

D'Cruz SC, Vaithinathan S, Jubendradass R, Mathur PP. Effects of plants and plant products on the testis. *Asian Journal of Andrology*. 2010; 12: 468- 479.

da Silva KA, Manjavachi MN, Paszcuk AF, Pivatto M, Viegas Jr C, Bolzani VS, Calixto JB. Plant derived alkaloid (-)- cassine induces anti-inflammatory and anti-hyperalgesic effects in both acute and chronic inflammatory and neuropathic pain models. *Neuropharmacology*. 2012; 62: 967-977.

Erbano M, Ehrenfried CA, Stefanello MEA, Dos Santos EP. Morphoanatomical and phytochemical studies of *Salvia lachnostachys* (Lamiaceae). *Microscopy Research and Technique*. 2012; 75: 1737-1744.

Formagio AS, Kassuya CA, Neto FF, Volobuff CR, Iriguchi EK, Vieira MC, Foglio MA. The flavonoid content and antiproliferative, hypoglycaemic, anti-inflammatory and free radical scavenging activities of *Annona dioica* St. Hill. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2013; 13:14.

Giacomelli E, Bertrand S, Nievergelt A, Zwick V, Simoes-Pires C, Marcourt L, Rivara-Minten E, Cuendet M, Bisio A, Wolfender JL. Cancer chemopreventive diterpenes from *Salvia corrugata*. *Phytochemistry*. 2013; 96: 257-264.

Guzzo LS, Perez AC, Romero TR, Azevedo AO, Duarte ID. Cafestol, a coffee-specific diterpene, induces peripheral antinociception mediated by endogenous opioid peptides. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2012; 39: 412-416.

Hosseinzadeh H, Haddadkhodaparast MH, Arash AR. Antinociceptive, antiinflammatory and acute toxicity effects of *Salvia lerifolia* Benth. seed extract in mice and rats. *Phytotherapy Research*. 2003; 17: 422-425.

Ibrahim TA. Chemical composition and biological activity of extracts from *Salvia bicolor* Desf. growing in Egypt. *Molecules*. 2012; 17: 11315-11334.

Isacchi B, Fabbri V, Galeotti N, Bergonzi MC, Karioti A, Ghelardini C, Vannucchi MG, Bilia AR. Salvianolic acid B and its liposomal formulations: anti-hyperalgesic activity in the treatment of neuropathic pain. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011; 44: 552-558.

Jung HJ, Song YS, Lim CJ, Park EH. Anti-inflammatory, anti-angiogenic and anti-nociceptive activities of an ethanol extract of *Salvia plebeia* R. Brown. *Journal of Ethnopharmacology*. 2009; 126: 355-360.

Karami M, Shamerani MM, Aley S, Gohari A, Vostacolae SE. Comparison antinociceptive activity of the aqueous methanolic extracts of *Salvia hypoleuca*. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2013a; 20: 2755-2759.

Karami M, Shamerani MM, Hossini E, Gohari A, Ebrahimzadeh MA, Nosrati A. Antinociceptive activity and effect of methanol extracts of three *Salvia* spp. on withdrawal syndrome in mice. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2013b; 3: 457-459.

Kassuya CA, Leite DF, de Melo LV, Rehder VL, Calixto JB. Anti-inflammatory properties of extracts, fractions and lignans isolated from *Phyllanthus amarus*. *Planta medica*. 2005; 71: 721-726.

Kassuya CA, Wisniewski Jr A, Simionatto EL, Santos EP, Stefanello ME. Composição dos óleos essenciais de *Salvia lachnostachys* e *S. melissiflora* (Lamiaceae). *Latin American Journal of Pharmacy*. 2009; 28: 919-921.

Lamb K, Tidgewell K, Simpson DS, Bohn LM, Prisinzano TE. 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. *Drug and Alcohol Dependence*. 2012; 121: 181-188.

Li CW, Wu XL, Zhao XN, Su ZQ, Chen HM, Wang XF, Zhang XJ, Zeng HF, Chen JN, Li YC. Anti-inflammatory property of the ethanol extract of the root and rhizome of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. *Scientific World Journal*. 2013; 2013: 434151.

Ma Y, Li Y, Li X, Wu Y. Anti-inflammatory effects of 4-Methylcyclopentadecanone on edema models in mice. *International Journal of Molecular Science*. 2013; 14: 23980-23992.

Moharram FA, Marzouk MS, El-Shenawy SM, Gaara AH, El Kady WM. Polyphenolic profile and biological activity of *Salvia splendens* leaves. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2012; 64: 1678-1687.

Mori LS, Boller S, Kassuya CAL, Stefanello MEA, Zampronio AR. Analgesic effects of the ethanolic extract from *Magnolia ovate* (Magnoliaceae) trunk bark and of N-acetylxypine, a semi-synthetic analogue of xylopine. *Phytomedicine*. 2011; 18: 143-147.

Mossi A, Cansian R, Paroul N, Toniazzo G, Oliveira J, Pierozan M, Pauletti G, Rota L, Santos A, Serafini L. Morphological characterisation and agronomical parameters of different species of *Salvia* sp. (Lamiaceae). *Brazilian Journal of Biology*. 2011; 71: 121-129.

Recio MC, Andujar I, Rios JL. Anti-inflammatory agents from plants: progress and potential. *Current Medicinal Chemistry*. 2012; 19: 10468- 10472.

Rodrigues MRA, Kanazawa LKS, Neves TLM, Silva CF, Horst H, Pizzolatti MG, Santos ARS, Baggio CH, Werner MF. Antinociceptive and anti-inflammatory potencial of extract and isolated compounds from leaves of *Salvia officinalis* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 2012; 139: 519-526.

Salminen A, Lehtonen M, Suuronen T, Kaarniranta K, Huuskonen J. Terpenoids: natural inhibitors of Nf- κ B signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. *Celular and Molecular Life Sciences*. 2008; 65: 2979-2999.

Schito A, Piatti G, Stauder M, Bisio A, Giacomelli E, Romussi G, Pruzzo C. Effects of demethylfruticuline A and fruticuline A from *Salvia corrugate* Vahl. on biofilm production *in vitro* by multiresistant strains of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2011; 37: 129-134.

Vinegar R, Truax JF, Selph JL. Some quantitative temporal characteristics of carragenan-induced pleurisy in the rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1973; 143: 711-714.

Walker JB, Sytsma KJ. Staminal evolution in the genus *Salvia* (Lamiaceae): molecular phylogenetic evidence for multiple origins of the staminal lever. *Annals of Botany*. 2007; 100: 375-391.

Wen XD, Wang CZ, Yu C, Zhang Z, Calway T, Wang Y, Li P, Yuan CS. *Salvia miltiorrhiza* (Dan Shen) significantly ameliorates colon inflammation in dextran sulfate sodium induced colitis. *The American Journal of Chinese Medicine*. 2013; 41: 1097-1108.

Winter CA, Risley EA, Nuss GW. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1962; 111: 544-547.

Zheng CJ, Huang BK, Wang Y, Ye Q, Han T, Zhang QY, Zhang H, Qin LP. Anti-inflammatory diterpenes from seeds of *Vitex negundo*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2010; 18: 175-181.

Legends to figures

Figure 1 - Structure of fruticulins A

Figure 2 – Effect of oral administration of SLCH on carrageenan-induced paw edema in mice. Animals received the SLCH (30, 100 or 300 mg/kg, p.o.) or vehicle, and after 1h an intraplantar injection of carrageenan (300µg/ paw). Graphics A, B, C and D represent the evaluation of paw oedema after 0,5, 1, 2 and 4hs respectively, after carrageenan injection. Each bar represents the mean ± SEM of 5 animals. * P <0.05, **P < 0.01 when compared the control-treated group. Differences between groups were analyzed by analysis of variance (one-way ANOVA) followed by the Newman-Keuls test.

Figure 3 – Effect of oral administration of Fruticulin A on carrageenan -induced paw edema in mice. Animals received fruticulin A (0,3, 1 and 3 mg/kg, p.o.) or vehicle, and after 1h an intraplantar injection of carrageenan (300 µg/ paw). Graphics A, B, C and D represent the evaluation of paw oedema after 0.5, 1, 2 and 4hs respectively, after carrageenan injection. Each bar represents the mean ± SEM of 5 animals. * P < 0.05, ** P < 0.01 compared with the control-treated group. Differences between groups were analyzed by analysis of variance (one-way ANOVA) followed by the Newman-Keuls test.

Figure 4 - Effect of oral administration of SLCH at inhibition of the leukocyte migration (A) and protein extravasation (B) on pleurisy test in mice. Mice were treated one hour before an intrapleural injection of carrageenan, with SLCH (30, 100 and 300 mg/kg p.o.), dexamethasone (DEX- 1 mg/kg, s.c.) or saline solution (V). Naive group (N), also treated with saline p.o., received an intrapleural injection of sterile saline. Pleural cavity was washed with PBS/EDTA 10mM. Cells were counted and plasma leakage was analyzed. In A number of cells that migrated to pleural cavity 4 hours after carrageenan injection. In B, plasma leakage was measured by Bradford's reaction. The bars express the mean±SEM of 5 animals. The symbol * compared with vehicle (V) vs SLCH or DEX treated groups and # compared the vehicle treated group with Naive. #P<0.001, *P<0.05, **P<0.01. Differences between groups were analyzed by analysis of variance (one-way ANOVA) followed by the Newman-Keuls test.

Figure 5 - Effect of oral administration of fruticulin A at inhibition of the leukocyte migration (A) and protein extravasation (B) on pleurisy test in mice. Mice were treated one hour before an intrapleural injection of carrageenan, with Fruticulin A (0,3, 1 and 3 mg/kg p.o.), dexamethasone (DEX- 1 mg/kg, s.c.) or saline solution (V). Naive group (N), also treated with saline p.o., received an intrapleural injection of sterile saline.

Pleural cavity was washed with PBS/EDTA 10mM. Cells were counted and plasma leakage was analyzed. In A number of cells that migrated to pleural cavity 4 hours after carrageenan injection. In B, plasma leakage was measured by Bradford's reaction. The symbol * compared with vehicle (V) vs fruticulin A or DEX treated groups and # compared the vehicle treated group with Naive. #P<0.001, *P<0.05, **P<0.01. Differences between groups were analyzed by analysis of variance (one-way ANOVA) followed by the Newman-Keuls test.

Figure 6 - Effect of oral administration of SLCH or fruticulin A at paw withdraw threshold, on Von Frey test in mice. Animals received SLCH (300 mg/kg) or fruticulin A (3 mg/kg) or vehicle and after one hour 300 µg of carrageenan injection in the right hind paw. Mechanical hyperalgesia was measured at the times 3 and 4 hours after carrageenan injection using the digital analgesymeter. The bars express the mean±SEM of 6 animals. The symbol * compared with vehicle (V) vs SLCH or fruticulin A treated groups and # compared the control group before (basal) and after carrageenan' treatment. #P<0.001, *P<0.05, **P<0.01 ***P<0.001. Differences between groups were analyzed by analysis of variance (one-way ANOVA) followed by the Newman-Keuls test.

Figure 7 - Effect of local administration of fruticulin A at paw withdraw threshold, on Von Frey test in mice. Animals received fruticulin A (1µg/paw) or vehicle and after one hour 300 µg of carrageenan injection in the right hind paw. Mechanical hyperalgesia was measured at the times 3 and 4 hours after carrageenan injection using the digital analgesymeter. The bars express the mean±SEM of 5 animals. The bars express the mean±SEM of 6 animals. The symbol * compared with vehicle (V) vs fruticulin A treated groups and # compared the control group before (basal) and after carrageenan'

treatment. # $P < 0.001$, * $P < 0.05$ Differences between groups were analyzed by analysis of variance (one-way ANOVA) followed by the Newman-Keuls test.

Figure 8- Effect of local administration of fruticulin A at paw withdraw threshold, on mechanical allodynia induced by TNF or L-DOPA in mice. Animals received fruticulin A ($1 \mu\text{g/paw}$) or vehicle and after 15 minutes 1pg/paw of TNF injection in the right hind paw. Mechanical hyperalgesia was measured at the times 3 hours after TNF injection using the digital analgesymeter. The bars express the mean \pm SEM of 5 animals. The bars express the mean \pm SEM of 6 animals. The symbol * compared with vehicle (V) vs fruticulin A treated groups and # compared the control group before (basal) and after TNF' or L-DOPA' treatment. # $P < 0.001$, * $P < 0.05$, # difference in comparison with basal threshold levels or the vehicle-treated group. Differences between groups were analyzed by analysis of variance (one-way ANOVA) followed by the Newman-Keuls test.

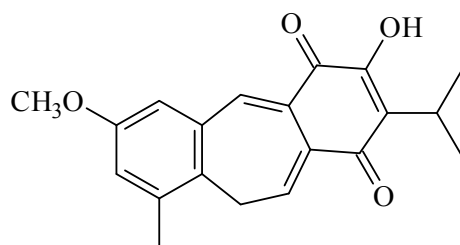


Figure 1 - Piccinelli et al., 2014

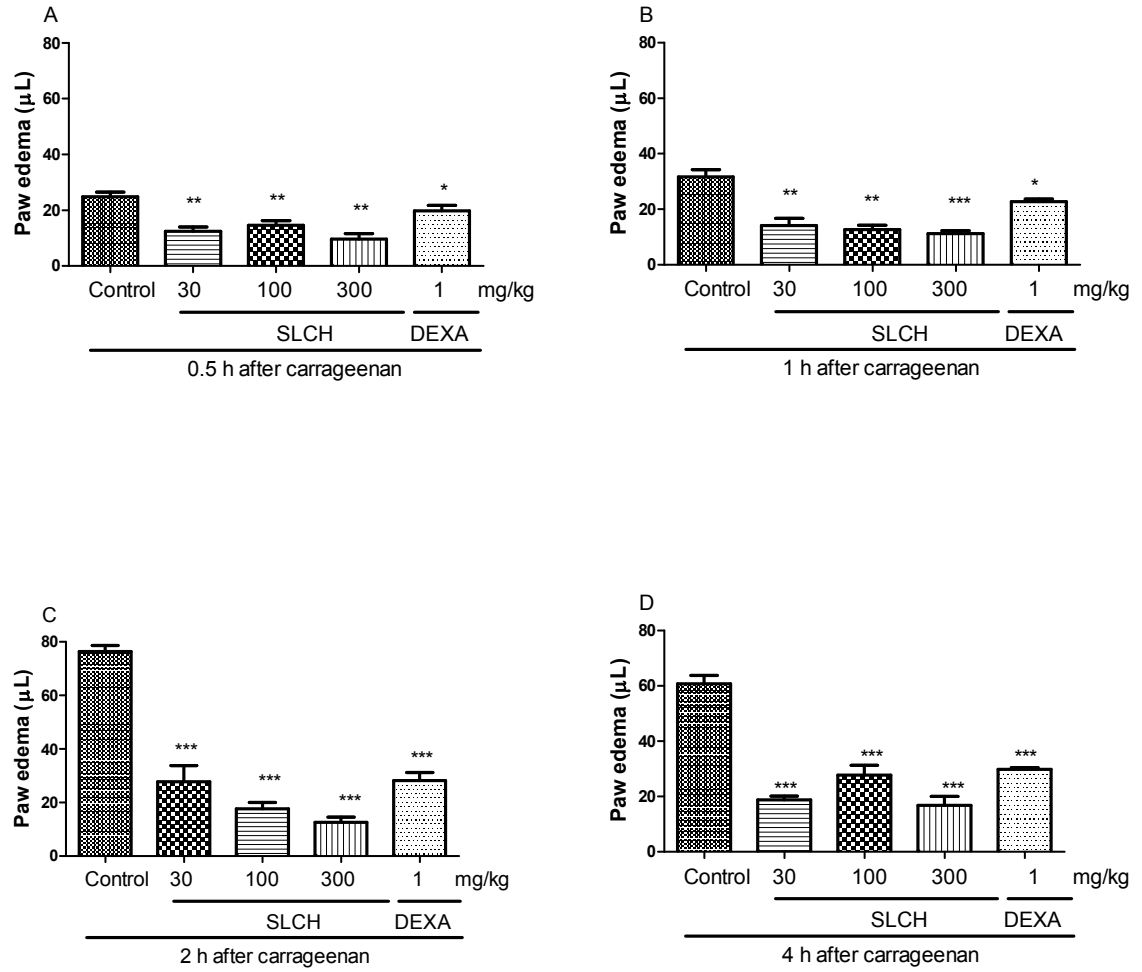


Figure 2- Piccinelli et. al., 2014

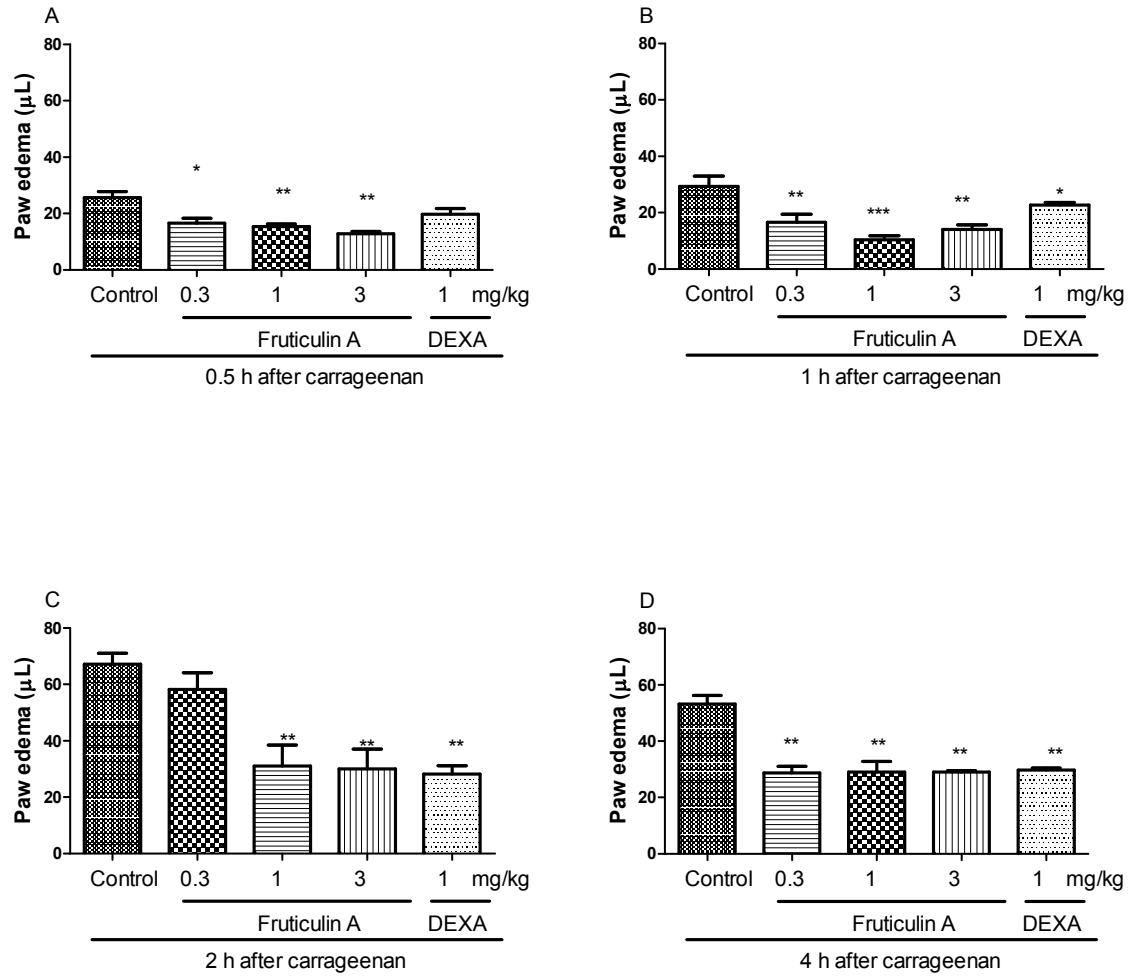


Figure 3- Piccinelli et. al., 2013

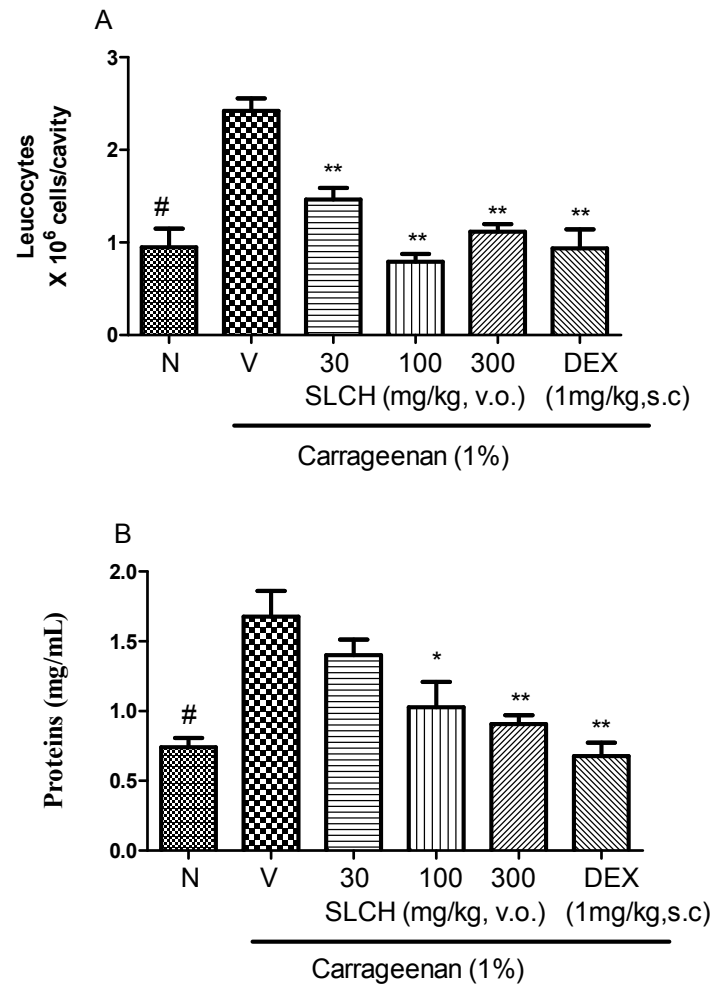


Figure 4- Piccinelli et. al., 2013

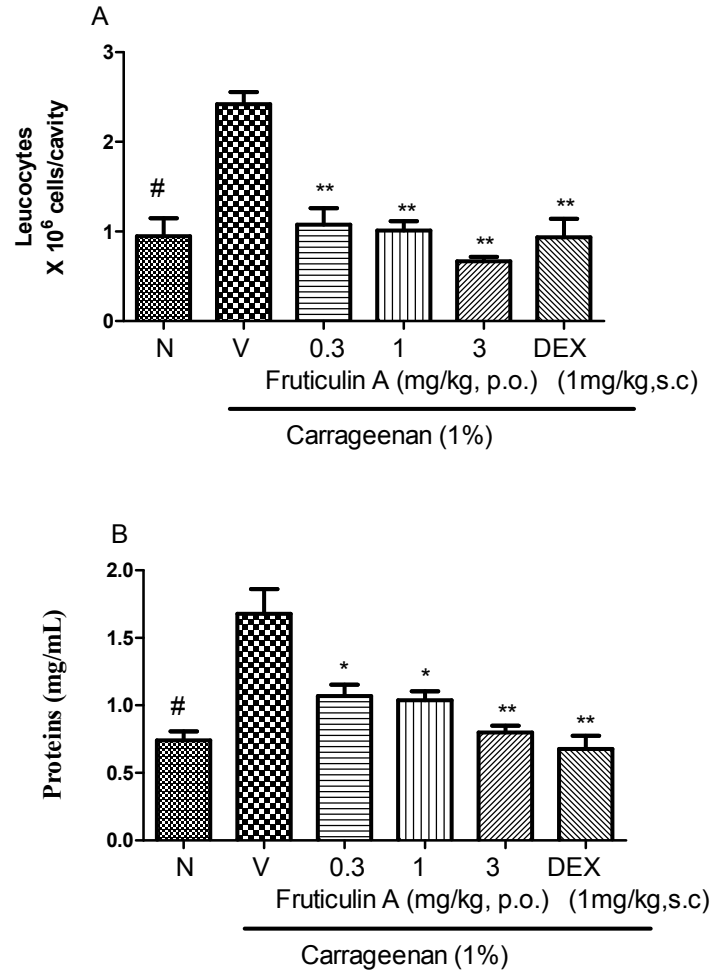


Figure 5- Piccinelli et al., 2014

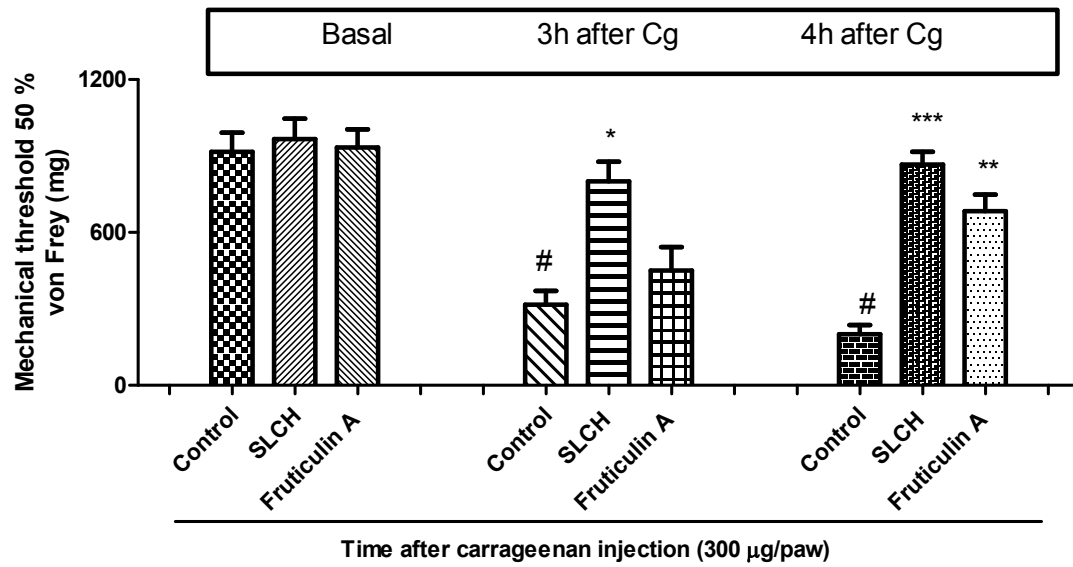


Figure 6- Piccinelli et. al., 2014

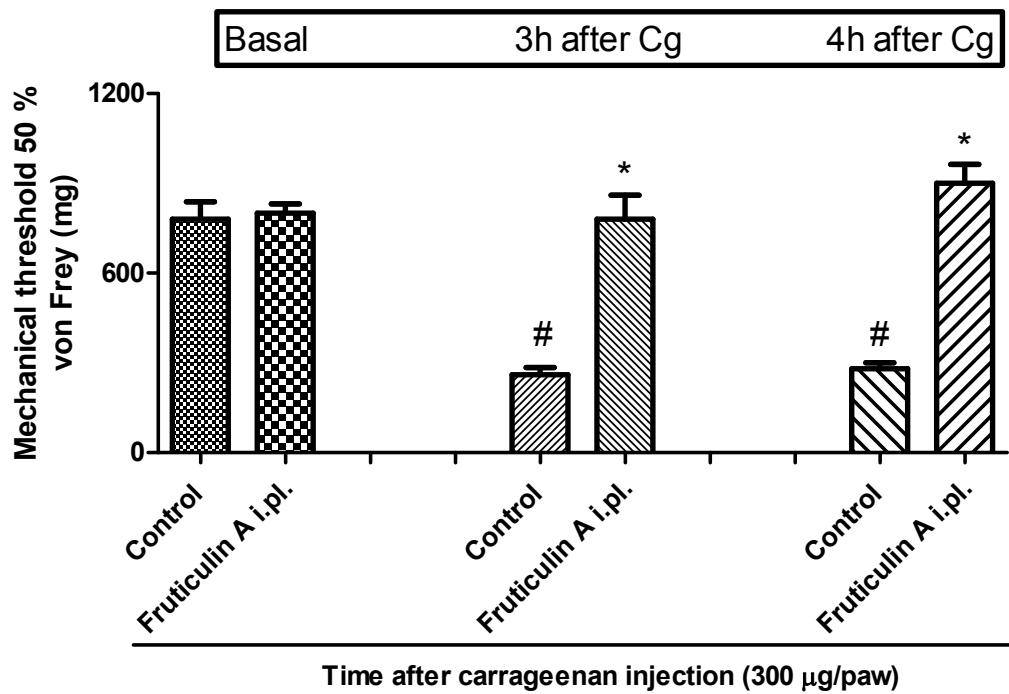


Figure 7- Piccinelli et. al., 2014

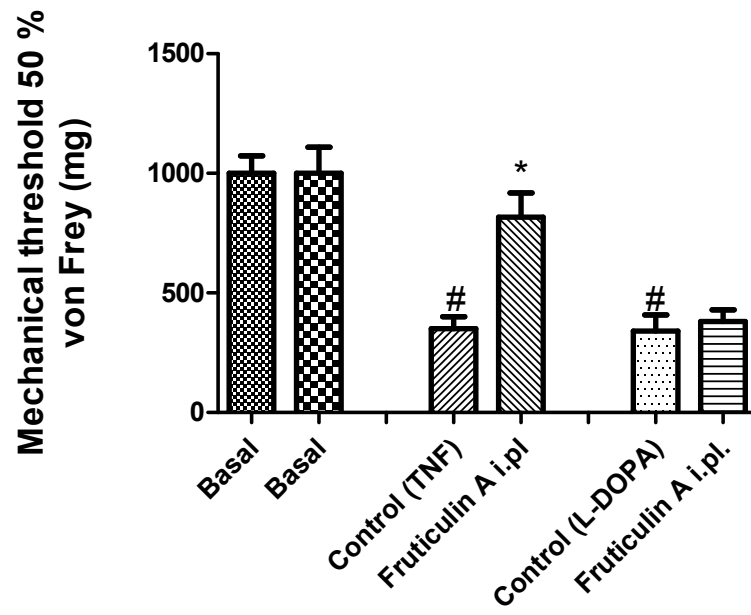


Figure 8- Piccinelli et. al., 2014

ANEXO II

Artigo 2 submetido a revista Nutritional Neuroscience (fator de impacto- 1.647) :

ANTI-HYPERALGESIC AND ANTIDEPRESSIVE ACTIONS OF EXTRACT OBTAINED FROM

Salvia lachnostachys Benth LEAVES IN NEUROPATHIC PAIN

**ANTI-HYPERALGIC AND ANTIDEPRESSIVE ACTIONS OF THE EXTRACT
OBTAINED FROM *Salvia lachnostachys* Benth LEAVES IN NEUROPATHIC
PAIN**

***Ana Claudia Piccinelli^a, Maria Élide Stefanello^b, Elide Pereira^c, Edward
Benjamim Ziff^d, Cândida Aparecida Leite Kassuya^a.***

^a*Federal University of Grande Dourados, College of Health Science, Dourados,
MS, Brazil*

^b*Federal University of Grande Dourados, College of chemistry, Curitiba, PR,
Brazil*

^c*Federal University of Grande Dourados, College of Botany, Curitiba, PR, Brazil*

^d*Department of Biochemistry and Molecular Pharmacology, New York
University*

School of Medicine, New York NY 10016, USA

* Corresponding author. Address for correspondence: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, Rodovia Dourados - Itaum, km 12, Dourados, Mato Grosso do Sul, CEP 79804-970, Brazil. Phone: + 55 67 34102327. Fax: + 55 67 34102320. E-mail: candida2005@gmail.com

ABSTRACT

Objectives: The present work has investigated the antihyperalgesic and antidepressant activities of the ethanolic extract of *S. lachnostachys* leaves in SNI experimental model in rats.

Methods: In the present work, ethanolic extract from *S. lachnostachys* leaves were assayed for their effects on spared nerve injury (SNI) induced mechanical hyperalgesia, cold hypersensitivity and depressive-like behavior (immobility in forced swim test) in rats.

Results: Oral administration for up to 15 days of ethanolic extract of *S. lachnostachys* (SLCH), and also subcutaneous 10 mg/kg dose of ketamine (positive control) significantly inhibited SNI-induced mechanical hyperalgesia and increased immobility in the forced swim test. Finally, on the 15th day of oral treatment SLCH prevented the SNI-induced increase in sensitivity to a cold stimulus.

Conclusion: Together, the results of the present work show that *S. lachnostachys* exhibit antihyperalgesic effects against mechanical and cold stimuli and anti-depressive activity in SNI rats.

Keywords: *Salvia lachnostachys*; rat; depression; neuropathic pain, fruticuline

A.

INTRODUCTION

Neuropathic pain is a type of chronic pain developed from a disease or a direct damage on the somatosensory nervous system, which contrasts with the normal plasticity in nociceptive pain (Xu et al., 2012). This persisting kind of pain characterized by hyperalgesia, hyperpatia and allodynia, affects millions of people worldwide and has been considered the most difficult type of chronic pain to treat, disturbing patients' quality of life and society (Baron et al., 2010; Leung and Cahill, 2010). Spared nerve injury (SNI) experimental model induces chronic mechanical and thermal hypersensitivity, with an immediate beginning and prolonged action and it is largely reproduced as a good neuropathic pain model in animals (Decosterd and Woolf, 2000).

Studies suggest that neuropathic pain is commonly associated with cognitive and emotional comorbidities, such as depression, and the mechanism seems to be involved with central sensitization and structural changes in the brain (Raison, 2009). Due to this complex interaction, there are no effective therapeutic strategies to control both pain and behavioral and cognitive changes, which are based on anticonvulsants and opioids, normally ineffective (Finnerup et al., 2010; Snedecor et al., 2013).

Salvia genus, belonging to the Lamiaceae family, comprises approximately 1000 species distributed worldwide (Walker and Sytsma, 2007). The antidepressive and anxiolytic effects have been observed in some reports with species of salvia, as *Salvia divinorum* and *Salvia officinalis* (Braidia et al., 2009; Kennedy et al., 2005). Many others studies demonstrated anti-inflammatory and anti-nociceptive activities in different species from Salvia

genus (Jiang et al., 2013; Jung et al., 2009; Karami et al., 2013; Rodrigues et al., 2012).

Salvia lachnostachys Benth is composed of terpene and phenolic acids present in its leaves and stems. From its phytochemical study it was observed the presence of oleanolic and ursolic acids and a diterpene called Fruticulina A, a very rare compound in nature which has been previously isolated from other species of the same genus (Erbano et al., 2012). Previous study from our group observed anti-inflammatory and analgesic activities of the ethanolic extract of *S. lachnostachys* in experimental models with mice (unpublished data).

For these reasons, we have investigated the antihyperalgesic and antidepressant activities of the ethanolic extract of *S. lachnostachys* leaves using SNI as an experimental model for hypernociception and depression in rats.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material

The plant material was collected in the natural habitat in the steep vegetation in Curitiba, Parana' state, Brazil (25830044.6@S, 4981807.13@W, 932 m above sea level), by E.P. Santos (number 1251). Part of the material was separated for phytochemical studies, and a voucher was included in the herbaria UPCB (Herbarium of the Federal University of Paraná). The remaining material, including mature leaves and young stem fragments, was fixed in a solution of formalin:acetic acid:alcohol (FAA; 1:1:18, 70% ethanol,v/v) and stored in 70% ethanol.

Extractions and isolation.

Dried and powdered leaves of *S. lachnostachys* were extracted with hexane followed by ethanol, yielding the ethanolic extract (SLCH) after solvent removal. The phytochemical study of SLCH lead to isolation of fruticuline A. Detailed experimental procedures were previously described (Erbano et al., 2012).

Animals

Experiments were conducted using male *Wistar* rats (250—350 g), maintained on a 12-h light/12-h dark cycle in a room kept at a constant temperature of 22 ± 1 °C, controlled humidity (60—80%) and with food and water provided *ad libitum*. The animals were acclimatized to the experimentation room for at least 2 h before testing and were used only once throughout the experiments. All experimental procedures were approved for research by the ethics committee on laboratory animals of UFGD (Nbr. 17/2013).

Spared nerve injury model and treatments

Animals were anesthetized using ketamine hydrochloride (60 mg/kg, i.p.) and xylazine (10 mg/kg i.p.). An incision was made through the biceps femoralis muscle and the right sciatic nerve was exposed at the level of its trifurcation into the sural, tibial and common peroneal nerves. Each of the tibial and common peroneal nerves was tightly ligated by two knots 4 mm apart using 6.0 silk and then completely severed in between, leaving the sural nerve intact (Bourquin et al., 2006; Decosterd and Woolf, 2000). After transection, the muscle fascia and skin were sutured. The SNI model was implemented in 40 animals. An

additional 16 animals were used as sham controls, in which the sciatic nerve was exposed but not manipulated.

SNI-treated groups.

Extract, ketamine or control vehicle was administered to SNI animals and divided in groups: i) the control group, which received orally (once a day) the vehicle used to dissolve the extract (in physiological saline); ii) the SNI group that received orally (once a day) ethanolic extract of *S. lachnostachys* leaves (SLCH) at a 100 mg/kg dose, iii) the SNI animals that received only ketamine (10 mg/kg, intraperitoneal route) as positive control. The dose of SLCH was determined based on a previous study from our group (unpublished results) and according to literature data (Karami et al., 2013).

Pain behavioral testing

All operated animals (SNI, SNI plus treated groups and sham rats) were studied behaviorally at 10 and 15 days post-surgery. Mechanical and cold sensitivities (3, 5, 7, 10, and 15 days after SNI procedures) as well as forced swim behavior (10 and 15 days after SNI procedures) were examined in all animals.

Mechanical sensitivity

Mechanical sensitivity of the hind paw was measured by determining withdrawal thresholds. Nociceptive thresholds (g) were estimated using an electronic version of the von Frey test. A constantly increasing pressure was applied to the right hind paw until the rats vocalized or withdrew their hind paws. This indicated the level at which the rats felt pain (Ito et al., 2001). The animals were placed individually in a small (35×20×15 cm) plastic cage with an open

wire mesh bottom. Before testing, the rats were left in the test cages for 15–20 min until their grooming and exploratory behaviors ceased and all four paws were placed on the ground. All tests were performed on the left hind paws. The analgesimeter was applied perpendicularly to the planter surface of the paw with an upward force just sufficient to bend the apparatus. When testing SNI animals, special care was taken to stimulate the lateral plantar surface, which is the area of the skin innervated by the sural nerve (Decosterd and Woolf, 2000). Paw withdrawals due to locomotion or weight shifting were not counted and such trials were repeated.

Cold sensitivity

Cold hyperalgesia was measured by the acetone drop test as described by Decosterd and Woolf (2000). A blunt needle connected to a syringe was used to drop 30 μ l of acetone on the paw and the duration (in seconds) of the paw withdrawal was recorded. Minimal and maximal cut-offs were assigned at 0.5 and 20 sec, respectively. Paw withdrawals due to locomotion or weight shifting were not counted and such trials were repeated.

Forced swim test (FST)

One day before SNI surgery, each rat was exposed to forced swim stress in a 15 minute swim session. The test was conducted using the method of Porsolt et al. (Porsolt et al., 1977) with modifications. Rats were individually forced to swim in an open cylindrical container (diameter 60 cm, height 100 cm), containing 30 cm of water at 25 ± 1 °C; the total duration of immobility during a 5 min test was observed.

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm S.E.M. Differences between groups was evaluated by analyses of variance (one-way ANOVA) followed by the Newman-Keuls test. The number of animals per group is indicated in the legends. Statistical differences were considered to be significant at $p < 0.05$. *Asterisks denote significant difference compared to vehicle-treated group.

RESULTS

Extract from S. lachnostachys leaves prevented SNI induced mechanical sensitivity in rats

The development of mechanical hyperalgesia was evaluated at 3, 5, 7, 10 and 15 days after surgery. Figure 1 shows that mechanical hyperalgesia can be detected from the 3 day post surgery in the SNI group and that the SNI group differs significantly from the sham-operated and basal groups. At 3 and 5 days (Figure 1A and 1B) SLCH did not show significant increased sensitivity to a mechanical stimulus. On the other hand, it is possible to observe significant results from 7 day (Figure 1C) of treatment.

At 10 and 15 days, the sensitivity to a mechanical stimulus increased approximately 5 fold in the SNI group relative to the controls (Figure 1D and 1E). Furthermore, treatment with the SLCH at 100 mg/kg, given once a day for 15 days after surgery, prevented approximately 100% ($p < 0.001$) the SNI induced increase in sensitivity to a mechanical stimulus when measured post surgery. The treatment with ketamine was able of blocked the mechanical hyperalgesia induced by SNI in all days tested.

Extract from S. lachnostachys leaves prevented SNI induced immobility

Increases in immobility in the forced swim test were induced by SNI in rats both at 10 and 15 days post surgery. Figure 2 shows an increase of approximately 2 fold in immobility in forced swimming at the 15th day post surgery when compared to sham animals. The essential oil from SLCH (100 mg/kg) was given once a day for 15 days after surgery. On the 15th day of oral treatment, the SNI increased in immobility was almost completely blocked ($p < 0.05$). The treatment with ketamine was able of reduced significantly immobility induced by SNI (Figure 2).

Extract from S. lachnostachys leaves prevented SNI induced cold sensitivity in rats

The development of cold sensitivity was evaluated at 10 and 15 days after surgery. Figure 5 shows that cold sensitivity could be detected, that sensitivity to a cold stimulus was increased approximately 7 fold and that the SNI-operated group differs significantly from the sham-operated and basal groups ($p < 0.05$) (Figure 3). On the 15th day of daily oral treatment with extract from *S. lachnostachys* leaves the SNI-induced increase in sensitivity to a cold stimulus was significantly reduced (Figure 3B). The treatment with ketamine was able of inhibit significantly the cold sensitivity induced by SNI.

DISCUSSION

In the present investigation, administration of SLCH (100 mg/kg, daily for 15 days) attenuated SNI painful responses (i.e., mechanical hyperalgesia, cold sensibility) and depressive behavior (immobility) as well. Based on data and with support from the literature, it may be proposed that SLCH produced an

ameliorative effect in SNI-induced painful peripheral neuropathy by virtue of its multiple effects: anti-inflammatory, antinociceptive and antidepressive actions manifested in terms of alleviation of SNI-induced behavioral alterations (mechanical hyperalgesia, cold hypersensitivity and forced swimming).

Chronic neuropathic pain is a health problem and the peripheral nerve injury is one of etiological factor, which can result in many changes, including associated pain, cognitive and depressive-like behavior (Alvarado et al., 2013). The molecular mechanisms to explain the relation between pain and depression is not well understood. Pain has been shown to alter synaptic connectivity at the prefrontal cortex and hippocampus, changing dopamine signaling, which may trigger negative symptoms of depression. Another possible hypothesis is that neuropathy, caused by SNI, develops chronic stress or neuroinflammation and that may generate depression (Wang et al., 2011).

As the therapeutic strategies for control of pain is limited for unspecific drugs, new strategies are required to improve neuropathic pain treatment. For drug discovery some researches are focused in experimental models testing natural products from medicinal plants. For example, Salvianolic acid B, from *Salvia miltiorrhiza*, and new pharmaceutical formulation obtained was effective against chronic constriction injury of the sciatic nerve (CCI) in rats (Isacchi et al., 2011). Additionally, several studies demonstrated different species of *Salvia* with anti-nociceptive or antidepressive activity. Among them we have *S. verticillata* (Naderi et al., 2011), *S. sclarea* (Seol et al., 2010) and *S. divinorum* (Hanes, 2001) studied for their antidepressive activity and *S. officinalis* (Rodrigues et al., 2012), *S. plebeia* (Jung et al., 2009), *S. hypoleuca* (Karami et

al., 2013), *S. bicolor* (Ibrahim, 2012) and *S. leriifolia* (Hosseinzadeh et al., 2003) for their analgesic effects.

Currently, there are no reports of pharmacological studies with *S. lachnostachys* and our study showed for the first time the ability of the extract from leaves to reduce neuropathic pain and depression in SNI model. Previous results from our group showed that the main chemical composition of *Salvia lachnostachys* Benth extract (SLCH) is oleanolic and ursolic acids, very common compounds in several plants of Lamiaceae family, and a diterpene called fruticuline A (Erbano et al., 2012). SLCH and fruticuline A also exhibited anti-inflammatory and antihypernociceptive effects in carrageenan induced oedema, pleurisy and mechanical pain (unpublished results).

In animal models, pain is assessed by sensory hypersensitivity while depression can be measured by forced swim test or sucrose preference (Wang et al., 2011). The forced swim test is the most commonly used behavioral test for assessment of depression in animal models and screening new antidepressant agents and exploring the underlying mechanism of depression because of its quick application (Porsolt et al., 1977; Zhang et al., 2013). Some studies have shown that ketamine produces fast antidepressant effects in rodents because it can rapidly increase synaptic proteins and the number and function of synaptic connections in the prefrontal cortex and reduce synaptic deficits (Gould et al., 2004; Yang et al., 2013; Zhang et al., 2013).

Porsolt et al. (1977) tested antidepressants standards and noted that these reduced immobility in the FST, which would be a supposed antidepressant effect. In the present study, the administration of ketamine at a dose of 10 mg/kg significantly decreased the immobility time of rats testing FST.

This result is consistent with previous studies done by Gould et al. (2004) and Yang et al. (2013), and confirmed that antidepressants activity inhibits these models such as SLCH.

Our results also demonstrated that SLCH (100mg/kg) administered for 15 days induced antihyperalgesic and antidepressive actions in SNI induced mechanical hypernociception, cold sensitivity and depressive-like behavior in rats. The presence of diterpenes in extract composition, especially fruticuline A, may explain these effects supported by our previous study that shows its anti-inflammatory and antihyperalgesic activities. Chronic pain and depression resulting from neuropathy remain without effective treatment. Thus, the present study may have clinical relevance for the development of new anti-hyperalgesic and/or antidepressive drugs.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank FUNDECT - Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul, FNDCT - Fundo Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico, MCT - Ministério da Ciência e Tecnologia, CNPq - National Council for Technological and Scientific Development and UFGD - Universidade Federal da Grande Dourados. This work was supported by a grant from CAPES.

REFERENCES

Alvarado, S., Tajerian, M., Millecamps, M., Suderman, M., Stone, L.S., Szyf, M., 2013. Peripheral nerve injury is accompanied by chronic transcriptome-wide changes in the mouse prefrontal cortex. *Mol Pain* 9, 21.

- Baron, R., Binder, A., Wasner, G., 2010. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *The Lancet Neurology* 9, 807-819.
- Bourquin, A.F., Suveges, M., Pertin, M., Gilliard, N., Sardy, S., Davison, A.C., Spahn, D.R., Decosterd, I., 2006. Assessment and analysis of mechanical allodynia-like behavior induced by spared nerve injury (SNI) in the mouse. *Pain* 122, 14 e11-14.
- Braida, D., Capurro, V., Zani, A., Rubino, T., Viganò, D., Parolaro, D., Sala, M., 2009. Potential anxiolytic-and antidepressant-like effects of salvinatorin A, the main active ingredient of *Salvia divinorum*, in rodents. *British Journal of Pharmacology* 157, 844-853.
- Decosterd, I., Woolf, C.J., 2000. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 87, 149-158.
- Erbano, M., Ehrenfried, C.A., Stefanello, M.É.A., Dos Santos, É.P., 2012. Morphoanatomical and phytochemical studies of *Salvia lachnostachys* (Lamiaceae). *Microscopy Research Techniques* 75, 1737-1744.
- Finnerup, N.B., Sindrup, S.H., Jensen, T.S., 2010. The evidence for pharmacological treatment of neuropathic pain. *Pain* 150, 573-581.
- Gould, T.D., Einat, H., Bhat, R., Manji, H.K., 2004. AR-A 014418, a selective GSK-3 inhibitor, produces antidepressant-like effects in the forced swim test. *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 7, 387-390.
- Hanes, K.R., 2001. Antidepressant effects of the herb *Salvia divinorum*: a case report. *Journal of Clinical Psychopharmacology* 21, 634-635.
- Hosseinzadeh, H., Haddadkhodaparast, M.H., Arash, A.R., 2003. Antinociceptive, antiinflammatory and acute toxicity effects of *Salvia leriifolia* Benth. seed extract in mice and rats. *Phytotherapy Research* 17, 422-425.
- Ibrahim, T.A., 2012. Chemical Composition and Biological Activity of Extracts from *Salvia bicolor* Desf. Growing in Egypt. *Molecules* 17, 11315-11334.
- Isacchi, B., Fabbri, V., Galeotti, N., Bergonzi, M.C., Karioti, A., Ghelardini, C., Vannucchi, M.G., Bilia, A.R., 2011. Salvianolic acid B and its liposomal formulations: Anti-hyperalgesic activity in the treatment of neuropathic pain. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 44, 552-558.
- Ito, S., Okuda-Ashitaka, E., Minami, T., 2001. Central and peripheral roles of prostaglandins in pain and their interactions with novel neuropeptides nociceptin and nocistatin. *Neuroscience Research* 41, 299-332.
- Jiang, W.-Y., Jeon, B.-H., Kim, Y.-C., Lee, S.H., Sohn, D.H., Seo, G.S., 2013. PF2401-SF, standardized fraction of *Salvia miltiorrhiza* shows anti-inflammatory activity in macrophages and acute arthritis in vivo. *International Immunopharmacology*.
- Jung, H.-J., Song, Y.S., Lim, C.-J., Park, E.-H., 2009. Anti-inflammatory, anti-angiogenic and anti-nociceptive activities of an ethanol extract of *Salvia plebeia* R. Brown. *Journal of Ethnopharmacology* 126, 355-360.
- Karami, M., Shamerani, M., Alemy, S., Gohari, A., Vostacolae, S.E., 2013. Comparison antinociceptive activity of the aqueous methanolic extracts of *Salvia Hypoleuca*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*.
- Kennedy, D.O., Pace, S., Haskell, C., Okello, E.J., Milne, A., Scholey, A.B., 2005. Effects of cholinesterase inhibiting sage (*Salvia officinalis*) on mood, anxiety and

performance on a psychological stressor battery. *Neuropsychopharmacology* 31, 845-852.

Leung, L., Cahill, C.M., 2010. Review TNF- α and neuropathic pain-a review. *Journal of Neuroinflammation*.

Naderi, N., Akhavan, N., Aziz Ahari, F., Zamani, N., Kamalinejad, M., Shokrzadeh, M., Ahangar, N., Motamedi, F., 2011. Effects of Hydroalcoholic Extract from *Salvia verticillata* on Pharmacological Models of Seizure, Anxiety and Depression in Mice. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 10, 535-545.

Porsolt, R., Bertin, A., Jalfre, M., 1977. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie* 229, 327.

Raison, V.M.C.L., 2009. Neurobiology of depression, fibromyalgia and neuropathic pain. *Frontiers in Bioscience* 14, 5291-5338.

Rodrigues, M.R.A., Kanazawa, L.K.S., Neves, T.L.M.d., Silva, C.F.d., Horst, H., Pizzolatti, M.G., Santos, A.R.S., Baggio, C.H., Werner, M.F.d.P., 2012. Antinociceptive and anti-inflammatory potential of extract and isolated compounds from the leaves of *Salvia officinalis* in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 139, 519-526.

Seol, G.H., Shim, H.S., Kim, P.-J., Moon, H.K., Lee, K.H., Shim, I., Suh, S.H., Min, S.S., 2010. Antidepressant-like effect of *Salvia sclarea* is explained by modulation of dopamine activities in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 130, 187-190.

Snedecor, S.J., Sudharshan, L., Cappelleri, J.C., Sadosky, A., Desai, P., Jalundhwala, Y.J., Botteman, M., 2013. Systematic review and comparison of pharmacologic therapies for neuropathic pain associated with spinal cord injury. *Journal of pain research* 6, 539.

Walker, J.B., Sytsma, K.J., 2007. Staminal evolution in the genus *Salvia* (Lamiaceae): molecular phylogenetic evidence for multiple origins of the staminal lever. *Annals of Botany* 100, 375-391.

Wang, J., Goffer, Y., Xu, D., Tukey, D.S., Shamir, D., Eberle, S.E., Zou, A.H., Blanck, T.J., Ziff, E.B., 2011. A Single Sub-anesthetic Dose of Ketamine Relieves Depression-like Behaviors Induced by Neuropathic Pain in Rats. *Anesthesiology* 115, 812.

Xu, B., Descalzi, G., Ye, H.-R., Zhuo, M., Wang, Y.-W., 2012. Translational investigation and treatment of neuropathic pain. *Molecular Pain* 8, 15.

Yang, L.-M., Yu, L., Jin, H.-J., Zhao, H., 2013. Substance P receptor antagonist in lateral habenula improves rat depression-like behaviors. *Brain Research Bulletin*.

Zhang, L., Ridgway, L.D., Wetzel, M.D., Ngo, J., Yin, W., Kumar, D., Goodman, J.C., Groves, M.D., Marchetti, D., 2013. The Identification and Characterization of Breast Cancer CTCs Competent for Brain Metastasis. *Science Translational Medicine* 5, 180ra148.

Legends to figures

Figure 1 – Effect of oral administration of the ethanolic extract of *S. lachnostachys* leaves on SNI-induced increase in mechanical sensitivity in rats. Animals received SLCH (100 mg/kg, p.o.), ketamine (10 mg/kg, i.p.) or vehicle once a day for 15 days after SNI and sham procedures. In (A, B, C, D and E) bars show the basal value (before surgery), ketamine and mechanical hyperalgesia values at 3, 5, 7, 10 and 15 days after SNI, respectively. Bars express the mean \pm SEM of 6 animals compared with vehicle (SNI) vs treated, sham group. * $P < 0.001$ or # $P < 0.001$. Differences between groups were analyzed by analysis of variance (one-way ANOVA) followed by the Newman-Keuls test.

Figure 2 – Effect of oral administration of the ethanolic extract of *S. lachnostachys* leaves on SNI-induced increase in immobility in the forced swim test in rats. Animals received SLCH (100 mg/kg, p.o.), ketamine (10 mg/kg, i.p.) or vehicle once a day for 15 days after SNI and sham procedures. Bars show the time of immobility on the 10th and 15th day after SNI. Bars express the mean \pm SEM of 8 animals compared with vehicle (SNI) vs treated, sham group. * $P < 0.05$ or # $P < 0.001$. Differences between groups were analyzed by analysis of variance (one-way ANOVA) followed by the Newman-Keuls test.

Figure 3 – Effect of oral administration of ethanolic extract of *S. lachnostachys* leaves on SNI-induced increase in cold sensitivity in rats. Animals received

SLCH (100 mg/kg, p.o.), ketamine (10 mg/kg, i.p.) or vehicle once a day for 15 days after SNI and sham procedures. In (A), bars show the basal value (before surgery), the time of response to cold stimulus on the 10th day after SNI analyzed in Sham, SNI (control) and SNI rats treated with SLCH or ketamine. In (B), bars show the basal value (before surgery) of cold sensitivity on 15th day after SNI analyzed in Sham, SNI (control) and SNI rats treated with SLCH or ketamine. The bars express the mean \pm SEM of 8 animals compared with vehicle (SNI) vs treated, sham group. * P <0.05, or # P <0.05. Differences between groups were analyzed by analysis of variance (one-way ANOVA) followed by the Newman-Keuls test.

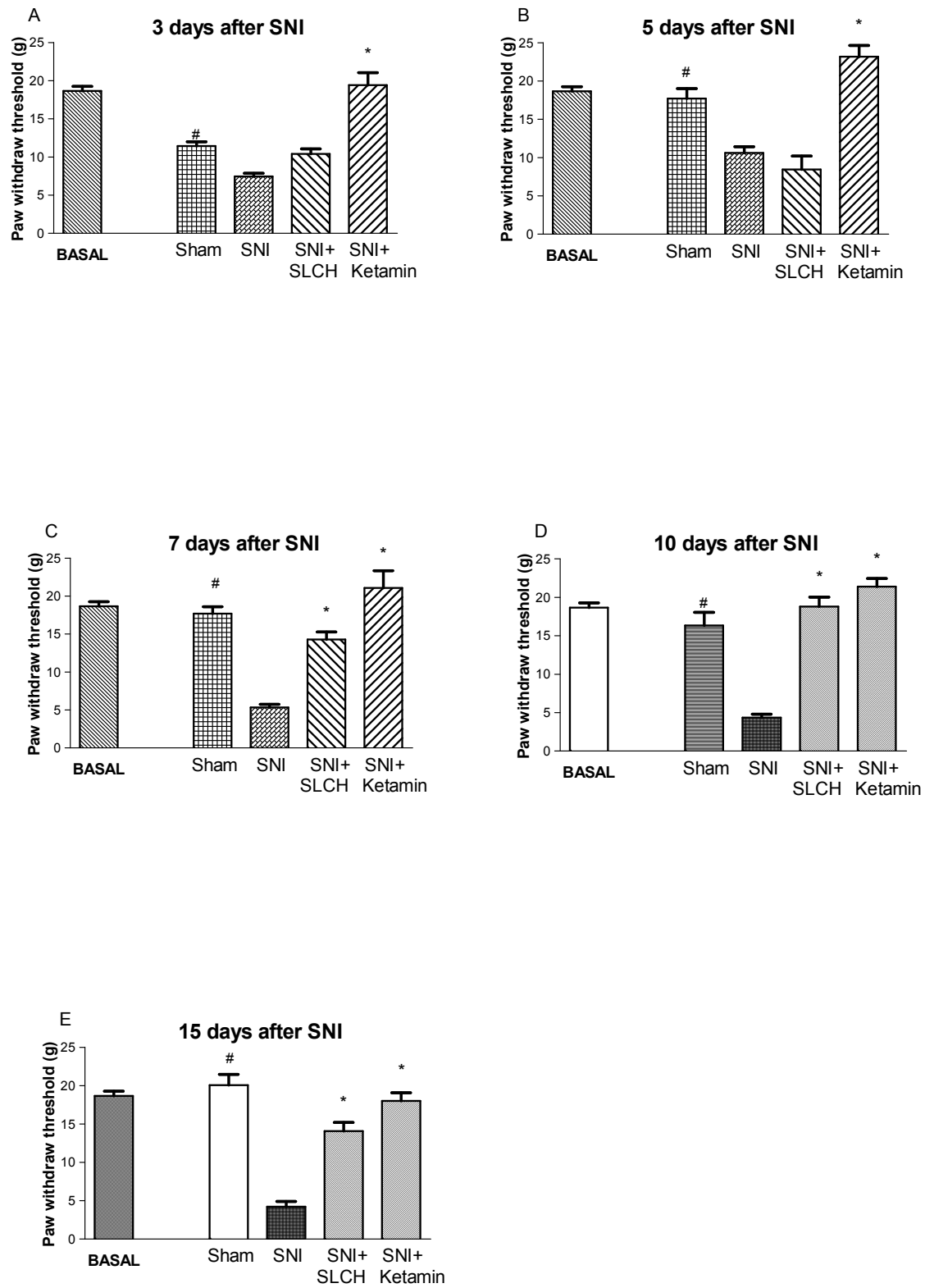


Figure 1 – Piccinelli et al., 2014

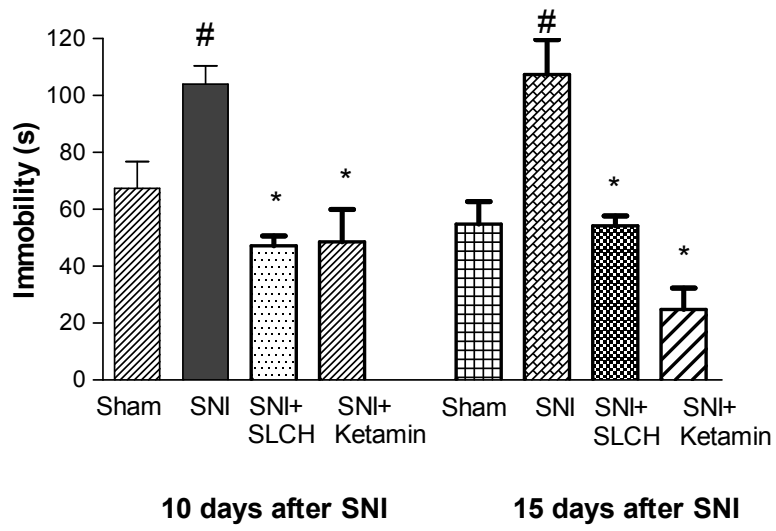


Figure 2 – Piccinelli et al., 2013

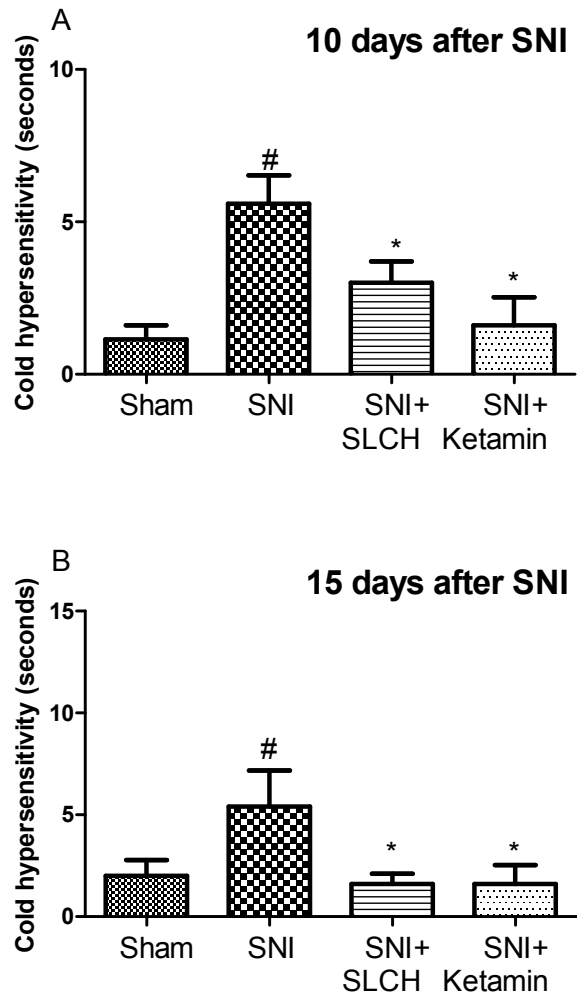


Figure 3 – Piccinelli et al., 2013

ANEXO III