

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Avaliação das atividades antinociceptiva e antidepressiva do óleo essencial dos frutos de *Schinus terebinthifolius* e dos compostos (R)-(+)-limoneno e α -felandreno em roedores

ANA CLAUDIA PICCINELLI

**Dourados-MS
2017**

ANA CLAUDIA PICCINELLI

Avaliação das atividades antinociceptiva e antidepressiva do óleo essencial dos frutos de *Schinus terebinthifolius* e dos compostos (R)-(+)-limoneno e α -felandreno em roedores

Área do CNPq: Ciências da Saúde.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Profa. Dra. Cândida Aparecida Leite Kassuya.

Co-orientador: Profa. Dra. Priscila Neder Morato.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

P587a	<p>Piccinelli, Ana Claudia.</p> <p>Avaliação das atividades antinoceptiva do óleo essencial dos frutos de <i>Schinus terebinthifolius</i> e dos compostos (R)-(+)-limoneno e α- felandreno em roedores . / Ana Claudia Piccinelli. – Dourados, MS : UFGD, 2017.</p> <p>80f.</p> <p>Orientadora: Prof. Dra. Candida Aparecida Leite Kassuya.</p> <p>Tese (Doutorado em Ciência da Saúde) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. HIV. 2. Hiperalgisia mecânica. 3. Depressão. 4. Limonemo 5. Felandreno. 6. Schinus terebinthifolius. I. Título.</p>
-------	--

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu esposo Egidio, pelo amor e carinho, apoio incondicional e por acreditar em mim em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, que me deu saúde para trilhar este caminho, me protegeu e permitiu que essa conquista se realizasse. Tudo está em Suas mãos, minha vida, meu lar, minha família e meu trabalho.

Aos meus pais, pelos valores que me ensinaram, pelo amor que posso sentir todos os dias, pelo esforço que fizeram e tudo que abriram mão em suas vidas para que eu chegasse até aqui.

Ao meu esposo Egidio, minha nova família, pelo amor dedicado que tem por mim e por me incentivar e acreditar. Essa conquista não é minha apenas, e sim nossa. Te amo.

Aos meus irmãos e familiares, por estarem presente em minha vida e torcerem por mim.

À minha orientadora Prof. Dra. Cândida Aparecida Leite Kassuya, pelos ensinamentos e oportunidades, pela disponibilidade e por acompanhar meu desenvolvimento profissional.

À minha co-orientadora e amiga, Prof. Dra. Priscila Neder Morato, pela paciência, amizade e por estar sempre presente em minha vida.

Ao professor Dr. Edward Ziff, pelos ensinamentos além da ciência, grande mestre com quem tive oportunidade de trabalhar, minha admiração e gratidão. Thank you for trusting I could accomplish this!

À professora Dra. Elizabete Konkiewitz, pelos ensinamentos e oportunidades, e a todos os professores que participaram direta ou indiretamente do desenvolvimento da minha pesquisa.

Aos amigos que fiz durante essa caminhada, àqueles que estarão sempre em meu coração e que podem contar comigo a qualquer hora; Marcelo, Joyce, Juci, Fernanda, Diana, Giseli, Lidiane, Fernando, Maicon, Danieli, Pablo e David.

Aos colegas de laboratório, técnicos, funcionários e alunos com quem tive oportunidade de trabalhar, obrigada!

À todos que torceram por mim, aos meus amigos mais queridos e todos que passaram pela minha vida e contribuíram para meu desenvolvimento e crescimento. Minha imensa gratidão!

EPÍGRAFE

“Não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu,
é sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu,
é sobre ser abrigo e também ter morada em outros corações,
e assim ter amigos contigo em todas as situações.”

(Ana Vilela)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Estrutura da glicoproteína envelope gp120 do HIV interagindo [...]	15
Figura 2- Exemplares de frutos maduros de “pimenta brasileira” (<i>S. terebinthifolius</i>)	24
Figura 3- Estrutura química do R-limoneno e dois dos seus metabólitos [...]	25
Figura 4- Estrutura química do α -felandreno	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μL	Microlitros
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ART	Antiretroviral therapy (terapias antirretrovirais)
ATP	Adenosina trifosfato
BHE	Barreira hematoencefálica
CCR2	Receptor de quimiocina CC2
CCR3	Receptor de quimiocina CC3
CCR5	Receptor de quimiocina CC5
CD4	Grupamento de diferenciação 4
CVCR4	Receptor de quimiocina CXC 4
DAMP	Padrões moleculares associados a danos
DL50	Dose letal mediana
GM-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos-monócitos
Gp120	Glicoproteína 120
Gp160	Glicoproteína 160
Gp41	Glicoproteína 41
h	Hora
HIV	Human Immunodeficiency vírus (Vírus da imunodeficiência humana)
HMGB1	Proteína de alta mobilidade
HPA	Hipotalâmico-pituitário-adrenal
HSP90	Proteína “ <i>heat shock</i> ” 90
HSPs	Proteínas “ <i>heat shock</i> ”
IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenase
IFN- α	Interferon alfa
IFN- γ	Interferon gama
IL-1 β	Interleucina 1-beta

IL-6	Interleucina 6
Kg	Quilograma
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1
MCP-2	Proteína quimiotática de monócitos 2
mg	miligramas
NF-κB	Fator nuclear Kappa-B
NMDA	N-metil D-Aspartato
NO	Nitric Oxide (Óxido Nítrico)
PKC	Proteína quinase C
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa
TRPA-1	Potencial receptor transiente
WHO	World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

Avaliação das atividades antinociceptiva e antidepressiva do óleo essencial dos frutos de *Schinus terebinthifolius* e dos compostos (R)-(+)-limoneno e α -felandreno em roedores

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antihiperalgésica do óleo essencial dos frutos de *S. terebinthifolius* e os compostos isolados (R)-(+)-limoneno e α -felandreno em modelos de lesão do nervo ciático e injeção intratecal de citocinas ou gp120 em roedores. No primeiro artigo que compõe nosso estudo, avaliou-se a atividade antihiperalgésica e antidepressiva dos tratamentos orais por 15 dias de *S. terebinthifolius* (100 mg/kg), do limoneno e felandreno (10mg/kg) em modelo de lesão de nervo ciático em ratos. A administração do óleo essencial e dos compostos inibiu significativamente a hiperalgisia mecânica e a imobilidade, porém apenas o felandreno foi capaz de prevenir o aumento da sensibilidade ao frio. Concluiu-se que tanto o óleo essencial como os compostos exibiram atividade antihiperalgésica e antidepressiva. Investigamos assim, o potencial antihiperalgésico do limoneno em camundongos após a injeção intratecal de gp120 ou IL-1 β ou TNF- α . Os animais foram tratados oralmente com o limoneno (10mg/kg) e após uma hora receberam uma injeção gp120 entre as vértebras L5 e L6 (50 e 300pg) ou IL-1 β (1000pg) ou TNF- α (500ng). Os resultados demonstraram que o limoneno reverteu significativamente a hiperalgisia induzida pela gp120 após 3 horas da injeção e alterou ainda os níveis de IL-1 β e IL-10 no sangue dos animais. O limoneno também foi capaz de inibir significativamente a hiperalgisia mecânica induzida pelo TNF- α e IL-1 β e modulou da expressão de SOD e HSP90 nas células da medula espinhal. O composto α -felandreno (10mg/kg) também foi testado e os resultados demonstraram que a administração intratecal de gp120 e IL-1 β aumentou significativamente a sensibilidade mecânica e sensibilidade ao frio em camundongos e o felandreno foi capaz de reverter esses efeitos após 2 e 3 horas. Concluímos, assim, que o limoneno e o felandreno possuem atividade antihiperalgésica através da modulação da produção de citocinas inflamatórias.

Palavras-chave: HIV, gp120, hiperalgisia mecânica, depressão, limoneno, felandreno, *Schinus terebinthifolius*.

Evaluation of antinociceptive and antidepressant activities of the essential oil of *Schinus terebinthifolius* fruits and the compounds (R)-(+)-limonene and α -phellandrene in rodents

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the compounds (R)-(+)-limonene and α -phellandrene in models of sciatic nerve injury and intrathecal cytokine injection or gp120 in rodents. In the first article of our study, we have evaluated the antihyperalgesic and antidepressive activities of the 15-day oral treatment with *S. terebinthifolius* (100 mg/kg), limonene and phellandrene (10mg/kg) in sciatic nerve injury model in rats. Administration of the essential oil and compounds did not interfere with the locomotor activity of the animals and still significantly inhibited mechanical hyperalgesia and immobility, but only phellandrene was able to prevent increased sensitivity to cold. Based on the data, we can conclude that both the essential oil and the compounds exhibited antihyperalgesic and antidepressant activity. We also have investigated the antihyperalgesic potential of limonene in mice following intrathecal injection of gp120 or IL-1 β or TNF- α . Animals were orally treated with limonene (10mg/kg) and after one hour received an injection of gp120 between the L5 and L6 vertebrae (50 and 300pg) or IL-1 β (1000pg) or TNF- α (500ng). The results have demonstrated that limonene significantly reversed gp120-induced hyperalgesia after 3 hours of injection and also increased levels of IL-1 β and IL-10 in the blood of the animals. Limonene was also able to significantly inhibit TNF- α and IL1 β -induced mechanical hyperalgesia and modulate SOD and HSP90 expression in the spinal cord cells. Phellandrene (10mg/kg) compound was also tested, and results have demonstrated that intrathecal administration of gp120 or IL-1 β significantly increased mechanical sensitivity and cold sensitivity in mice and that phellandrene was capable to reverse these effects after 2 and 3 hours. We have concluded limonene and phellandrene have antihyperalgesic activity through cytokine production modulation.

Keywords: HIV, gp120, mechanical hyperalgesia, depression, limonene, phellandrene, *Schinus terebinthifolius*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1 HIV e dor crônica.....	14
2.2 A gp120.....	14
2.3 Hiperalgisia induzida pela gp120.....	15
2.4 Gp120 e neuroinflamação.....	17
2.5 Depressão induzida pela inflamação do SNC.....	19
2.6 A importância do estudo com plantas medicinais.....	21
2.7 Óleos essenciais.....	23
2.8 <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi.....	24
2.9 (R)-(+)-Limoneno.....	26
2.10 α -Felandreno.....	28
3 OBJETIVOS.....	30
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
5 APÊNDICES.....	39
Artigo 1 publicado na revista Nutritional Neuroscience (fator de impacto 2015:2,616).....	40
Artigo 2 publicado na revista Life Sciences (fator de impacto 2015: 2,627).....	49
Artigo 3 nas normas da revista Nutritional Neuroscience (fator de impacto 2015:2,616).....	57
6 ANEXOS.....	72

1 INTRODUÇÃO

Sabe-se hoje que, dentre os pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), 40% desenvolvem dor crônica, sendo esta considerada a desordem neurológica mais prevalente (SHI et al., 2016). A glicoproteína 120 (gp120), proteína envelope do vírus HIV, cruza a barreira hematoencefálica e causa neurotoxicidade, além do aumento da produção de citocinas inflamatórias, aumento do estresse oxidativo e ativação dos receptores NMDA (N-metil D-Aspartato) (MCRAE, 2016; NASIRINEZHAD et al., 2015), sendo responsável pelo desenvolvimento da dor crônica através de uma patogenia independente (YUAN et al., 2014).

A injeção de gp120 na periferia ou no Sistema Nervoso Central (SNC) em roedores foi capaz de contribuir para a produção de dor, comportamento doloroso e ainda neurotoxicidade, corroborando com as teorias para sua atividade. Dentre as alterações observadas estão: a ativação de células da glia e consequente liberação de citocinas pró-inflamatórias (LORAM et al., 2010; ZHENG et al., 2011), principalmente a interleucina 1- β (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), produzindo hiperalgesia térmica e alodinia mecânica (MILLIGAN et al., 2000; MILLIGAN et al., 2001). Além das citocinas, os marcadores de estresse oxidativo, como o Óxido Nítrico (NO), tornam-se elevados durante a infecção cerebral pelo HIV-1 (ASHRAF et al., 2014).

Evidências atuais tem observado que a neuroinflamação leva ao desenvolvimento da depressão, porém ainda é controverso se a inflamação causa depressão, ou se esta é mera consequência do episódio depressivo, embora haja evidências consideráveis de que a inflamação seria a responsável pelo desenvolvimento neurobiológico da depressão (FINNELL; WOOD, 2016). Sabe-se que existe uma relação entre o neurocircuito do estresse e a imunidade, que é capaz de ativar vias inflamatórias nas células mononucleares do sangue periférico, e assim ativar o fator nuclear kappa B (NF- κ B), e consequentemente aumentar os níveis de citocinas pró-inflamatórias circulantes, como por exemplo, a interleucina-6 (IL-6), o que leva ao desenvolvimento da alteração comportamental (MILLER; RAISON, 2016).

As plantas aromáticas, caracterizadas pela presença de óleo essencial em sua composição, são amplamente estudadas por seus potenciais benefícios terapêuticos como: na prevenção e tratamento do câncer, nas doenças cardiovasculares, no diabetes, nas doenças inflamatórias, nas infecções bacterianas e ainda, como agente gastroprotetor, antioxidante e

anticonvulsivante (DE ALMEIDA et al., 2011). Uma dessas espécies, a *Schinus terebinthifolius* Raddi, conhecida como “Cabuí”, “Aroeira-vermelha”, “Aroeira-pimenteira”, “Pimenta Brasileira” ou “Christmas-berry”, é utilizada na medicina popular para o tratamento de úlceras, problemas respiratórios, cicatrização, reumatismo, gota, tumores, diarreia, problemas de pele, artrite e inflamação. Estudo químico realizado com a planta indicou a presença de alguns componentes do óleo essencial, sendo eles: o α -pineno, sabineno, z-salven, β -pineno, α -funebreno, (R)-(+)-limoneno, mirceno e o alfa-felandreno (FORMAGIO et al., 2011).

Dentre estes, o (R)-(+)-limoneno e α -felandreno, ambos compostos terpenoides, são de interesse ao presente estudo, devido evidências anteriores. O limoneno é abundantemente encontrado no óleo essencial de frutas cítricas (RUSSO, 2011), e já foi estudado por sua ação antinociceptiva (DO AMARAL et al., 2007), existindo ainda evidências de sua atividade anti-inflamatória (REHMAN et al., 2014), bloqueio da fosforilação do NF- κ B sendo ainda considerado um inibidor de NO induzido através da via da IL-1 β (RUFINO et al., 2015). O felandreno, da mesma forma, apresentou evidências de atividade anti-inflamatória (SIQUEIRA et al., 2016), sendo capaz de modular a migração de neutrófilos e inibir a produção de citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-6) e atividade antinociceptiva do α -felandreno em modelos de nocicepção inflamatória e hipernocicepção mecânica (LIMA et al., 2012).

Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antihiperálgica do óleo essencial dos frutos de *S. terebinthifolius* e os compostos isolados (R)-(+)-limoneno e α -felandreno em modelos de lesão do nervo ciático e injeção intratecal de citocinas ou gp120 em roedores.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HIV e dor crônica

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO), existem cerca de 35 milhões de pacientes portadores do vírus HIV em todo o mundo, dentre os quais, aproximadamente 40% desenvolvem dor crônica, e essa prevalência aumenta para 75% com o progresso da doença, sendo essa condição considerada como a desordem neurológica mais prevalente entre essas pessoas (SHI et al., 2016). Os sintomas mais comuns nos pacientes com HIV-1 associado à dor crônica são: dores de cabeça, dor somática e dor visceral. Tal condição causa diminuição na qualidade de vida dessas pessoas e é uma das principais causas de busca por assistência médica (YUAN, et al., 2014).

Além disso, juntamente com as manifestações dolorosas, 30% dos pacientes com HIV/SIDA desenvolvem neuropatia periférica (YUAN, et al., 2014), caracterizada por ser semelhante a outros tipos de dor neuropática, por exemplo como a neuropatia diabética, que afeta principalmente a inervação distal dos pés e mãos e causa sensação de queimação, hiperestesia e parestesia (NASIRINEZHAD et al., 2015). As intervenções medicamentosas oferecem apenas alívio dos sintomas, mas não a cura (YUAN, et al., 2014), as mais utilizadas são os anticonvulsivantes, como a pregabalina e antidepressivos, como a amitriptilina, porém ambos com pouca eficácia clínica (SAGEN; CASTELLANOS; HAMA, 2016).

Existem dois mecanismos principais propostos para explicar como a neuropatia sensorial induzida pelo HIV ocorre: a primeira é o da neurotoxicidade induzida pela proteína envelope do vírus HIV, a gp120 ou ainda devido ao uso de drogas antirretrovirais (ART). A neurotoxicidade causada pelas drogas ART é indiscutível, porém sabe-se que existe prevalência de neuropatia em pacientes que nunca fizeram o uso dessas substâncias, sugerindo que existem mecanismos adicionais ou alternativos para o desenvolvimento da condição (MOSS et al., 2015). O entendimento de como a infecção pelo vírus HIV-1 leva ao surgimento da dor crônica é fundamental para o desenvolvimento de uma terapia efetiva (YUAN, et al., 2014).

2.2 A gp120

A gp120 é uma proteína envelope do vírus HIV com função de permitir a entrada viral nas células, além de facilitar a replicação e a progressão da doença. Como outras proteínas

envelope, ela é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) e causar toxicidade neuronal por si só. Indiretamente a gp120 causa o aumento da produção de citocinas inflamatórias, aumenta o estresse oxidativo, pela ativação dos receptores NMDA e a permeabilidade da BHE, estimulando a liberação do cálcio intracelular, a ativação das proteínas quinase C (PKC) e aumentando a migração de monócitos (MCRAE, 2016; NASIRINEZHAD et al., 2015).

Na figura 1, podemos observar que a entrada do vírus HIV-1 é feita pela clivagem da proteína gp160, em subunidades gp120 e gp41. A gp120 age diretamente com os receptores do grupamento de diferenciação 4 (CD4) das células, o que favorece a estabilidade de sua molécula, que pode então interagir com receptores de quimiocina CXCR4 e/ou CC-5 (CCR5), e causar uma mudança conformacional na gp41, para que esta possa entrar na membrana celular e iniciar a fusão do envelope viral com a célula (WELLS; MERCENIER, 2008).

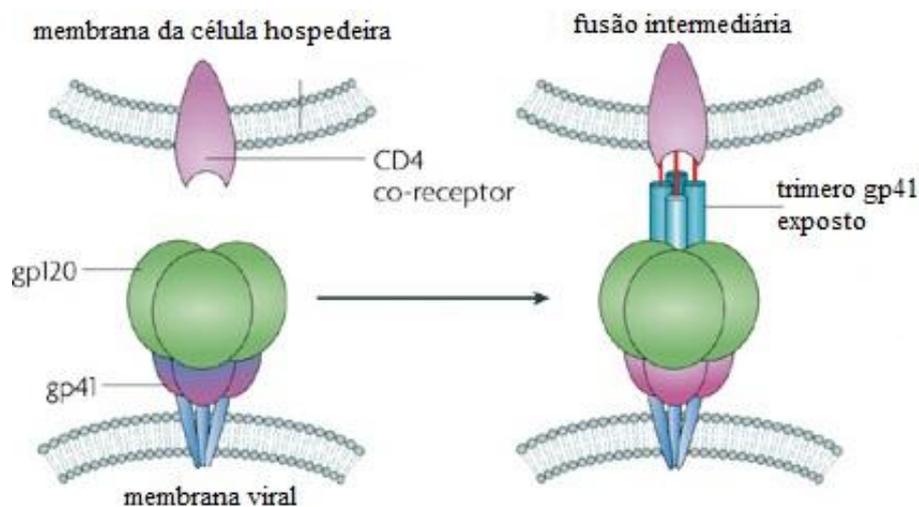


Fig. 1. Estrutura da glicoproteína envelope gp120 do HIV interagindo com receptores CD4. Fonte: Adaptado de Wells; Mercenier (2008, p. 359).

2.3 Hiperalgisia induzida pela gp120

A hiperalgisia é definida como um aumento da resposta dolorosa produzida por um estímulo que normalmente causaria dor e juntamente com a alodinia, que por sua vez é um tipo de sensibilidade causada por um estímulo que normalmente não causaria dor, são sintomas característicos de dor neuropática ou qualquer tipo de dor crônica, que abrangem

uma série de diferentes condições causadas por lesão ou doença em partes do sistema nervoso que sinaliza a informação somatossensorial (JENSEN; FINNERUP, 2014).

Dependendo do tipo de fibra aferente afetada uma perda correspondente na função sensorial pode ser observada, sendo a hiperalgesia e a alodinia em alguns, mas não todos os casos, resultados de uma hiperexcitabilidade no sistema nervoso e nem sempre implicam em um único mecanismo. Sua classificação é de acordo com a modalidade sensorial usada para gerar dor, podendo ser de estímulo mecânico (dinâmico, estático e pontual) e térmico (frio ou quente) presentes em várias condições como na neuralgia trigeminal, lesão no nervo periférico, condições de dor neuropática central, como a lesão da medula espinhal (JENSEN; FINNERUP, 2014).

A hiperalgesia pode ser induzida pela simples administração de IL-1 ou TNF, e a importância das citocinas inflamatórias na hiperalgesia é clara, porém o mecanismo pelo qual as citocinas podem ativar o SNC é controverso, mas a ativação dos nervos periféricos parece ser um mecanismo mais aceito. Quando existe a administração de substâncias indutoras como as citocinas, há uma sinalização para o cérebro via vago subdiafragmático, pois esses agentes ativam os neurônios sensoriais vagais, elevando a expressão de cFos. Esta ativação pode ser secundária a ativação de estruturas sensoriais especializadas chamadas paraganglio, com característica de quimiorreceptores, expressando locais de ligação de IL-1 e formando sinapses aferentes em fibras vagais sensoriais. O acúmulo de macrófagos, mastócitos e células dendríticas no tecido conjuntivo próximo ao paraganglio são considerados células linfoides associadas aos nervos e tem a capacidade de expressar IL-1, podendo assim reconhecer rapidamente uma infecção, sinalizar para o cérebro e liberar esta citocina ao paraganglio vizinho (WATKINS; MAIER, 1999).

Quando há injeção intratecal de gp120, observa-se ativação da micróglia da medula espinhal e o surgimento de astrócitos, os quais estão envolvidos no desenvolvimento da hiperalgesia e alodinia. Ocorre também um rápido aumento de IL-1 na medula espinhal dorsal, não apenas no conteúdo intracelular, mas também liberada no espaço extracelular (WATKINS; MAIER, 1999).

Evidência que analisou amostras de tecido *postmortem* de pacientes HIV-1 positivo revelou que a quantidade de gp120 no corno da medula espinhal era 10 vezes maior naqueles que apresentavam dor crônica em comparação com pacientes negativos para este tipo de dor. Relataram ainda que a dor associada ao nível de gp120 não está ligada a um aumento da

replicação viral sistêmica ou no SNC, o que aponta para uma patogenia independente da gp120 no desenvolvimento da dor crônica (YUAN, et al., 2014).

Em modelos experimentais com animais, a aplicação de gp120, periférica ou centralmente, contribui para a produção de dor, comportamento nociceptivo e neurotoxicidade. Um dos mecanismos propostos para a indução de dor pela gp120 é através da gliose espinhal, que causaria alguns efeitos indiretos, como a ativação das células da glia e a liberação de citocinas inflamatórias. A ativação dos astrócitos parece contribuir diretamente no desenvolvimento doloroso e de outras desordens neurológicas. A injeção de gp120 nas patas dos animais é capaz de causar hipersensibilidade e excitação dos neurônios nociceptivos primários, enquanto a injeção intratecal induz a dor aguda e liberação de citocinas pró-inflamatórias na medula espinhal (LORAM et al., 2010; ZHENG et al., 2011).

Milligan et al. (2001) observaram que a injeção intratecal de gp120 causa hiperalgesia térmica e alodinia mecânica e que tais alterações estão diretamente ligadas a produção de citocinas inflamatórias, em especial a IL-1 e o TNF- α . Primeiramente, a IL-1 β e o TNF- α são liberados e estimulam diretamente os neurônios de transmissão da dor no corno dorsal. Posteriormente, neurônios do cérebro também são capazes de expressar receptores para a IL-1 β e o TNF- α . A IL-1 β quando administrada sozinha na supra espinhal é capaz de desenvolver comportamento doloroso nos animais rapidamente, e uma dor específica da excitação dos neurônios trigeminais do corno dorsal. Observou-se ainda, uma ligação entre a atividade de ambas as citocinas, pois quando bloqueadas as ações do TNF- α endógeno, preveniu-se a liberação de IL-1 β (MILLIGAN et al., 2000; MILLIGAN et al., 2001).

Corroborando com os resultados citados, Zheng et al. (2011), mostraram que a gp120 é capaz de induzir a liberação de IL-1 β e TNF- α e que ambas agem de forma sinérgica. A inflamação dos nervos periféricos causa aumento da atividade elétrica das fibras sensoriais C/A δ , levando a mudanças transcricionais e pós-transcricionais nos neurônios de segunda ordem, o que é característico de dor crônica. Tais danos inflamatórios resultam na ativação da glia na medula espinhal e aumento da liberação de TNF- α .

2.4 Gp120 e neuroinflamação

A neuroinflamação é uma resposta imune associada à infecção cerebral causada pela infecção do vírus HIV-1, a qual tem um importante papel no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (LOUBOUTIN et al., 2010; ASHRAF et al., 2014). A gp120 por sua vez,

causa apoptose celular em regiões cerebrais, como no córtex e hipocampo, através de uma ligação entre os co-receptores da membrana celular neuronal (CCR3, CCR5 e CXCR4), e através das vias da proteína-G acoplada causando a apoptose. O que ocorre é um aumento de células da glia e liberação de araquidonato, que dificulta a receptação de glutamato pelos astrócitos e neurônios, levando a uma ativação prolongada dos receptores NMDA e interrupção da homeostase celular de Ca^{2+} , gerando ainda, produção de superóxido e peróxido, causando o estresse oxidativo, morte das células neuronais após a permeabilização mitocondrial, liberação do citocromo C e ativação das capsases e endonucleases (LOUBOUTIN; STRAYER, 2014).

Diversas citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ) e marcadores de estresse oxidativo, como o NO, tornam-se elevados durante a infecção cerebral pelo HIV-1 (ASHRAF et al., 2014). O NF- κ B está envolvido em diferentes respostas celulares, dentre elas a morte celular, apoptose e inflamação. Sabe-se inclusive, que a indução de proteínas quimiotáticas de monócitos 1 e 2 (MCP-1 e MCP-2) em astrócitos está diretamente relacionada à via do NF- κ B e que a inibição desta via após o tratamento com gp120, leva a níveis reduzidos de TNF- α . Da mesma forma, demonstrou-se que a via do NF- κ B é a mediadora da produção de IL-1 β , IL-8 e IL-6, e que existe uma cinética similar dessas três citocinas nos astrócitos após tratamento com gp120 (SHAH et al., 2011; SHAH; KUMAR, 2010).

O modelo de lesão do nervo ciático induz a expressão de MCP-1, ligante natural de CCR5, em macrófagos e células de Schwann no nervo lesionado, e quando neutralizada é capaz de reduzir a alodinia e hiperalgesia térmica. O papel do processo inflamatório na dor crônica já é previamente estabelecido e sabe-se que existe o envolvimento dos receptores CCR5 e CCR2 no desenvolvimento da dor neuropática. Estudo realizado com animais geneticamente modificados observou que naqueles animais sem CCR5 não houve o desenvolvimento da hipersensibilidade mecânica ou térmica após a injúria do nervo ciático. Pode-se observar ainda que quando CCR2/CCR5 são bloqueados ocorre redução da ativação da micróglia espinhal após lesão do nervo, a abolição do recrutamento de monócitos e macrófagos para o parênquima espinhal e a prevenção do aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias ao longo da via de sinalização da dor (PADI et al., 2012; MERINO et al., 2011).

Shah et al. (2011) demonstraram que existe um aumento da fosforilação de I κ B α e uma translocação da p50 do citoplasma para o núcleo das células pela via do NF- κ B, a qual é

dependente da gp120. De forma similar, o estresse oxidativo tem-se demonstrado um importante mecanismo dependente da gp120. A resposta do organismo frente a uma injúria oxidativa leva a uma cascata de resposta ao estresse, aumentando os níveis intracelulares de agentes antioxidantes e ao mesmo tempo removendo os componentes já danificados. Os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) são controlados por antioxidantes endógenos, como por exemplo, o superóxido dismutase (SOD) (LOUBOUTIN; STRAYER, 2014).

A gp120, juntamente com a Tat, outra proteína do vírus HIV-1, são capazes de reduzir a neurogênese, especialmente no hipocampo, levando a geração de novos neurônios com desenvolvimento dendrítico irregular. O hipocampo desempenha importante envolvimento na memória, aprendizagem e emoção, e alterações nessa região do cérebro estão relacionadas com doenças neurodegenerativas e psiquiátricas, sendo particularmente suscetível a inflamação (FERREL; GIUNTA, 2014).

2.5 Depressão induzida pela inflamação do SNC

A depressão é considerada uma condição natural de etiologia multifatorial e neurobiologia complexa. Há vinte anos já era possível encontrar evidências de pacientes com depressão que apresentavam quadros de inflamação aumentados, porém a teoria que prevalecia para explicar o quadro depressivo baseava-se na hipótese baseada na via monoaminérgica. Atualmente, outras teorias neurobiológicas existem para explicar a depressão, e dentre eles a hipótese inflamatória tem ganhado atenção, e novos dados baseados em estudos clínicos e pré-clínicos tem demonstrado a relação bidirecional entre a depressão, a inflamação e as citocinas inflamatórias (HO et al., 2017).

Apesar de controversas, evidências consideráveis tem demonstrado que a inflamação seria grande responsável pelo desenvolvimento neurobiológico da depressão (FINNELL; WOOD, 2016). Dentre as doenças inflamatórias em pacientes com depressão, as mais comumente associadas são os transtornos gerais da tireoide, artrite reumatoide, doença de Crohn, doença do intestino irritável, fibromialgia e doenças cardiovasculares (PEACOCK; SCHEIDERER; KELLERMANN, 2016).

Há uma relação entre o neurocircuito do estresse e a imunidade, que formam juntos, um sistema integrado a fim de proteger o organismo frente a ameaças ambientais. O estresse é capaz de ativar vias inflamatórias nas células mononucleares do sangue periférico, e assim ativar o NF- κ B, e conseqüentemente aumentar os níveis de citocinas pró-inflamatórias

circulantes, como por exemplo, a IL-6. Indivíduos com alto risco de desenvolver depressão, como aqueles que sofreram um trauma, apresentam resposta inflamatória aumentada frente aos estressores cotidianos quando comparados a indivíduos com baixo risco, e essa probabilidade aumenta quanto maior é o estressor psicossocial vivido pelo indivíduo, que pode desenvolver a depressão em um curto período de tempo (MILLER; RAISON, 2016).

Novos tratamentos do câncer pela administração de IFN- γ e IFN- α ou do fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) tem como principal efeito colateral o desenvolvimento de episódios depressivos transitórios em pacientes sem histórico prévio de depressão. Em modelos animais, as evidências apontam que após a estimulação do sistema imune seja pela injeção de lipopolissacarídeo (LPS), de citocinas pró-inflamatórias ou indução de infecção bacteriana existe o desenvolvimento de neuroinflamação e do comportamento depressivo, caracterizado pelo desespero comportamental ou anedonia e o bloqueio da IL-1 β no cérebro foi capaz de prevenir a anedonia em modelo animal de indução de estresse (FINNELL; WOOD, 2016).

Em uma revisão sistemática realizada por Martínez-Cengotitabengoa et al. (2016), concluiu-se que os níveis de algumas citocinas pró-inflamatórias, como IL-8, IL-6, e o TNF- α , poderiam servir como biomarcadores para futuro sintomas de depressão e devem ser explorados como possibilidade. Antagonistas de TNF- α tem papel atenuante nos sintomas depressivos e melhora dos déficits cognitivos de pacientes, assim como, juntamente com a IL-6 podem servir como marcadores na incidência de outras doenças, como a esclerose múltipla. Os autores citam ainda, que o principal mecanismo de ação dessas citocinas seria na ativação do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (HPA) e nos transportadores neuronais de serotonina e pela estimulação da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), o que causaria a depleção de triptofano.

Desta forma, a depressão está associada à estimulação do NF- κ B, e a partir deste a liberação de ROS, IL-1 β e TNF α , e o estresse psicossocial é capaz de ativar essa cascata. Uma super ativação do eixo HPA leva a um aumento de histamina e norepinefrina, as quais podem agir no sistema imune e iniciar a migração de células inflamatórias, estimulação do NF- κ B e via das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK,) aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias, dentre as principais temos a IL-1, a mais potente ativadora, a IL-6 e TNF- α (PEACOCK; SCHEIDERER; KELLERMANN, 2016).

Dano neuronal também induz a inflamação e exerce diversos efeitos nocivos ao cérebro e tem papel crucial no desenvolvimento de distúrbios mentais e depressão. As regiões mais comumente afetadas pelo dano inflamatório dos neurônios ou pela apoptose são o hipocampo, a amígdala e o hipotálamo, regiões ligadas ao desenvolvimento da depressão e a inibição da inflamação nessas regiões poderia produzir um efeito protetivo dos neurônios e melhorar o comportamento depressivo (ZHOU et al., 2016).

Os inflamassomas têm sido o foco recente dos estudos que demonstram a relação entre a ativação do sistema imune, o estresse e a inflamação. Os inflamassomas são proteínas complexas que se formam nas células mielóides como uma resposta a microrganismos patogênicos e não patogênicos. Na depressão, essas proteínas são liberadas pelo estímulo dos padrões moleculares associados a danos, os DAMPs, incluindo o ATP (adenosina trifosfato), as proteínas “*heat shock*” (HSPs), o ácido úrico, a proteína HMGB1, uma proteína de alta mobilidade, e outras moléculas ligadas ao estresse oxidativo (MILLER; RAISON, 2016).

Os DAMPs ativam as vias de sinalização inflamatória, através do NF- κ B e o inflamassoma NLRP3. O NLRP3 ativa a caspase 1 e leva a produção de IL-1 β e ao mesmo tempo cliva o receptor de glicocorticóides, contribuindo para uma resistência a essas substâncias. O NF- κ B transcreve genes da produção de citocinas pró-inflamatórias, as quais tem acesso ao cérebro através das vias humoral e neural. O estresse também leva a ativação da micróglia, ativa os receptores CCL2, que por sua vez, atrai as células mielóides ativadas para o cérebro. Quando estas chegam ao cérebro, ativam os macrófagos e podem perpetuar a resposta inflamatória (MILLER; RAISON, 2016).

2.6 A importância do estudo com plantas medicinais

O uso de plantas medicinais e extratos têm sido empregados na medicina tradicional por séculos especialmente na América do Sul, África e Ásia. Estima-se que 60% das espécies de plantas com sementes são utilizadas em práticas terapêuticas em diferentes doenças como obesidade, artrite reumatoide, diabetes, malária e ainda distúrbios neurológicos que afetam o SNC. A aplicação do uso das plantas era, até recentemente, baseada apenas na continuidade social e étnica e nas descobertas empíricas, porém, atualmente criaram-se estratégias de pesquisa e validação científica para o estudo das plantas medicinais, com fases clínicas e pré-clínicas de pesquisa (LUNDSTRON; PHAM; DINH, 2017).

Em países desenvolvidos 65-80% da população utilizam as plantas medicinais como primeira escolha de tratamento. O Brasil acompanha as estatísticas apresentadas, e tal fato deve-se a falta de acesso da população aos medicamentos, a assistência médica e farmacêutica ou ainda devido ao alto custo das drogas convencionais. Existe ainda a crença de que os tratamentos com plantas tenham características de maior segurança e tal fato tem levado ao aumento de casos de reações adversas pelo uso de plantas medicinais. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu algumas diretrizes com a finalidade de controlar e garantir a eficácia e segurança do uso de plantas no Brasil e para que um candidato seja considerado fitomedicamento deve ter no mínimo 20 anos de uso tradicional ou testes clínicos e pré-clínicos que atestem eficácia e segurança (MAZZARI; PRIETO, 2014).

Atualmente existem 71 plantas na RENISUS (Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS), sendo a *Schinus terebinthifolius* uma das plantas nesta lista, juntamente com outras de diferentes espécies e gêneros como, por exemplo, a alcachofra (*Cynara scolymus L*) e a cascara sagrada (*Rhamnus purshiana*) (MAZZARI; PRIETO, 2014; SILVA-JÚNIOR et al., 2015). Apesar disso, o mercado de plantas medicinais no Brasil é considerado apenas modesto, com menos de 5% do mercado brasileiro de medicamentos, e apesar do grande número de publicações de artigos científicos pelos cientistas brasileiros e o grande interesse na biodiversidade, apenas um medicamento fitoterápico, o Acheflan®, produzido com o óleo da planta *Cordia verbenacea*, encontra-se no mercado entre os 20 produtos mais vendidos no país (DUTRA et al., 2016).

Os produtos naturais são ainda uma importante fonte no desenvolvimento de novas drogas e entidades químicas. Dentre alguns medicamentos no mercado podemos citar um antimalárico potente, o Arteether, derivado da artemisinina, uma lactona sesquiterpênica isolada de uma planta medicinal chamada de *Artemisia annua L.*, tradicionalmente usada na medicina popular chinesa e o Tiotrópio, usado no tratamento de doença pulmonar obstrutiva crônica, formulado a partir do ipratropio, que por sua vez deriva da atropina, isolada da *Atropa belladonna L* (BALUNAS; KINGHORN, 2005).

Exemplos de sucesso como esses incentivam a melhora da qualidade e aumento da quantidade de compostos a entrarem em fase de desenvolvimento de novos medicamentos, mesmo sendo o processo de descoberta de uma nova droga caro, custando 800 milhões de dólares em 2006 e atualmente 2,6 bilhões de dólares (aumento de 146%) (BALUNAS; KINGHORN, 2005; MULLARD, 2014). Quando derivado de uma planta medicinal esse

processo de desenvolvimento tende a ser mais longo e complicado, visto que os produtos naturais são isolados normalmente em pequenas quantidades e por isso, muitas indústrias farmacêuticas tem reduzido a pesquisa com plantas medicinais. Alternativas que melhorariam o desenvolvimento dos produtos naturais envolvem uma colaboração entre a química sintética e a química medicinal, a fim de determinar a possibilidade da síntese ou semi-síntese dessas drogas ou ainda a criação de bibliotecas que reúnam informações sobre essas descobertas (BALUNAS; KINGHORN, 2005).

2.7 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são formados a partir de plantas aromáticas como metabólitos secundários. São óleos voláteis, naturais, com complexa composição e forte odor. Na natureza os óleos essenciais têm função de proteção das plantas como antibacteriano, antifúngico, antiviral e inseticida (BAKKALI et al., 2008; ABAD et al., 2012). Os usos não terapêuticos são como ingredientes para dar sabor a comidas e bebidas e como fragrância em comidas e cosméticos (DE ALMEIDA et al., 2011; VERALLO-ROWELL; KATALBAS; PANGASINAN, 2016; STEFANELLO; PASCOAL; SALVADOR, 2011). Sua composição química é complexa, com cerca de 20-60 componentes, sendo que 2-3 desses normalmente se encontram em maior concentração e são esses os responsáveis por determinar as propriedades biológicas nele encontradas (ABAD et al., 2012).

Seus componentes químicos incluem dois principais grupos, o primeiro e mais importante é composto pelos terpenos e o segundo por compostos aromáticos e alifáticos, todos caracterizados por seu baixo peso molecular (ABAD et al., 2012). Os terpenos são formados por uma combinação de várias unidades de 5-carbonos (C5), chamados de isopreno. Sua biossíntese é precursora de várias classes de terpenos como: os monoterpenos (C10), os sesquiterpenos (C15), os hemiterpenos (C5), os diterpenos (C20), os triterpenos (C30) e os tetraterpenos (C40) (BAKKALI et al., 2008).

As plantas aromáticas são amplamente estudadas por seus potenciais e benefícios terapêuticos, os quais são dependentes da presença dos óleos essenciais (DE ALMEIDA et al., 2011). Na medicina complementar e alternativa a aplicação dos óleos essenciais os torna populares mundialmente principalmente como antimicrobianos, na modulação do humor (ansiolíticos e antidepressivos) e analgésicos (VERALLO-ROWELL; KATALBAS;

PANGASINAN, 2016; STEFANELLO; PASCOAL; SALVADOR, 2011; VAN DER WATT; JANCA, 2008).

Devido a sua variabilidade química, alguns cuidados devem ser tomados no seu uso. O uso excessivo, a ingestão acidental e reações alérgicas cutâneas estão entre os problemas de segurança. As variações em sua composição ocorrem de acordo com o clima, o solo em que foi cultivada a planta e o processo de produção e armazenamento. Desta forma, cuidados com o uso e estudos de eficácia e toxicidade devem ser realizados (VAN DER WATT; JANCA, 2008).

A composição química dos óleos essenciais pode indicar seu possível uso terapêutico. Como exemplo, podemos citar o óleo de lavanda (*Lavandula angustifolia*) e seus principais compostos o acetato de linalilo e o linalol, que demonstraram atividade anestésica local em modelos *in vitro* e *in vivo*; e o óleo essencial da camomila (*Matricaria recutita*) e seu composto o α -bisabolol, por sua atividade anti-inflamatória, também em modelos animais (LUA; ZAKARIA, 2012). Choi et al. (2000) encontraram evidências de atividade antioxidante em 34 tipos de óleos essenciais derivados de frutas cítricas, com maior atividade naqueles que continham geraniol, terpinoleno e γ -terpineno. Apesar das inúmeras evidências científicas, sabe-se que a bioatividade dos óleos essenciais resulta de uma interação complexa entre seus constituintes, os quais podem produzir respostas antagônicas ou sinérgicas (LV et al., 2015).

2.8 *Schinus terebinthifolius* Raddi

Pertencente a família Anacardiaceae Lindl., o gênero *Schinus* é conhecido por seu cultivo ornamental, tendo como principais representantes das suas 25 espécies temos a *Schinus molle* L. e a *Schinus terebinthifolius*. Endêmicas na América Central e do Sul, também crescem em regiões tropicais e semitropicais e são caracterizadas como produtoras de óleo essencial, amplamente utilizado na indústria (ELSHAFIE et al., 2016; ABDOL; SALEH; KHALIL, 2015).

A *S. terebinthifolius* (Figura 2), ocorre no Brasil da Bahia ao Rio Grande do Sul e é conhecida como “Cabuí”, “Aroeira-vermelha”, “Aroeira-pimenteira”, “Pimenta Brasileira” ou “*Christmas-berry*”. Na medicina popular, esta espécie tem sido utilizada na forma de infusão ou decocção para o tratamento de úlceras, problemas respiratórios, cicatrização, reumatismo, gota, tumores, diarreia, problemas de pele, artrite e inflamação e, portanto já foi incluída na

Farmacopeia Brasileira (LIMA et al., 2009; FEDEL-MIYASATO et al., 2014; NOCCHI et al., 2016).



Fig 2. Exemplares de frutos maduros de “pimenta brasileira” (*S. terebinthifolius*). Foto: Sheldon Navie. Fonte: Weeds of Australia: Biosecurity Queensland Edition. Disponível em: https://keyserver.lucidcentral.org/weeds/data/media/Html/schinus_terebinthifolius.pdf

Dentre os estudos recentes realizados com a *S. terebinthifolius* demonstrou-se que seu extrato hidroalcoólico possui efeito cicatrizante, impede a migração de neutrófilos, é antiartrítico (ROSAS et al., 2015; SCHEIBE et al., 2016) e ainda possui atividade contra o vírus Herpes simples tipo I (NOCCHI et al., 2016). Evidências também sugerem efeito antimicrobiano do extrato de suas folhas e frutos (MELO et al., 2014; TONIAL et al., 2016; COSTA et al., 2015), assim como efeito cicatrizante de seu óleo essencial (ESTEVÃO et al., 2015). Extrato metanólico produzido a partir das folhas de *S. terebinthifolius* é evidenciado como anti-inflamatório, imunomodulador, quimiopreventivo e cicatrizante (FEDEL-MIYASATO et al., 2014a; FEDEL-MIYASATO et al., 2014b). Estudos de toxicidade foram capazes de demonstrar um efeito hepatoprotetor do seu extrato seco (ABDOU; SALEH; KHALIL, 2015), sem apresentar sinais de toxicidade aguda ou subaguda (LIMA et al., 2009).

Nosso interesse por essa planta foi resultado de um estudo anterior de nosso grupo que mostrou atividade anti-inflamatória do óleo essencial dos frutos de *S. terebinthifolius*, o qual apresentou uma porcentagem de extração de $6,54 \pm 1,06\%$ e dentre os seus componentes químicos principais foi possível observar a presença predominante de monoterpenos (85,81%), dentre estes o α -pineno (12,59%), δ -3-careno (30,37%), limoneno (17,44%), α -felandreno (12,60%), mirceno (5,82%) e o-cimeno (3,46%); os sesquiterpenos apareceram

em menores proporções (5.34%) (FORMAGIO et al., 2011). Tal perspectiva nos possibilitou os estudos envolvendo os compostos terpenoides isolados: o limoneno e o felandreno.

2.9 (R)-(+)-Limoneno

O limoneno é o segundo terpenoide mais encontrado na natureza, precursor de outros monoterpenoides através de esquemas sintéticos específicos de cada espécie onde é encontrado (RUSSO, 2011). Este composto aromático está presente no óleo essencial de frutas cítricas como laranjas e limões. É utilizado como flavorizante e aromatizante em diversos produtos como bebidas, comidas, perfumes e fragrâncias. Pode ser usado ainda como solvente, na produção de resinas e como potente agente no controle de insetos (PARK et al., 2011; LIMA et al., 2012; GIARRATANA et al., 2015).

O R-limoneno ((R)-p-menta-1,8-dieno) ou seu isômero o S-limoneno, é o principal componente do óleo essencial das frutas cítricas, podendo chegar a 90% da sua composição. Este monoterpeno é altamente metabolizado *in vivo*. Evidências mostram que no plasma de humanos e ratos, seu metabólito ácido R-perílico é o mais encontrado, além de outros como o álcool perílico, o ácido dihidroperílico, o limoneno-1, 2- diol, o limoneno-8, 9- diol e um isômero do ácido perílico (Figura 3). Após sua administração oral leva de 2-4 horas para atingir sua maior concentração no sangue e de 1-2 horas no cérebro. Em um estudo com humanos, o ácido perílico, atingiu seu nível plasmático máximo 1 hora após o consumo de uma preparação cítrica com R-limoneno (FUKUMOTO et al., 2006).

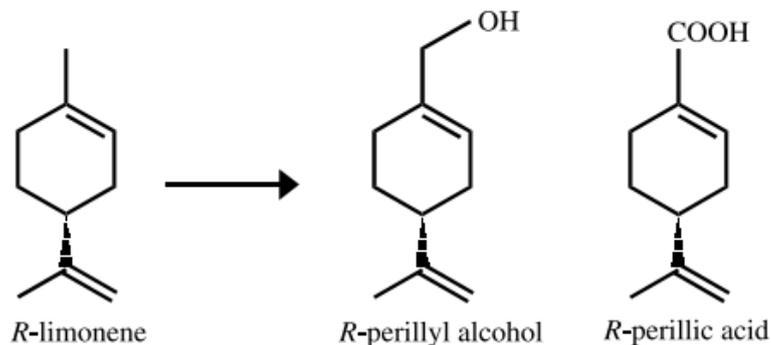


Fig.3 Estrutura química do R-limoneno e dois dos seus metabólitos, o R- álcool perílico e o R- ácido perílico. Fonte: Adaptado de Fukumoto et al. (2006, p.74).

Estudos anteriores mostraram que ratos tratados com óleos ou extratos cítricos com alta concentração de limoneno têm efeito ansiolítico, com um aumento de serotonina no

córtex pré-frontal e de dopamina no hipocampo (RUSSO, 2011; PULTRINI; GALINDO; COSTA, 2006), efeito antidepressivo (KOMORI et al., 1995; POTDAR; KIBILE, 2011) e ainda atividade anti-inflamatória (FORMAGIO et al., 2011; SOUZA et al., 2003). Além disso, um estudo clínico com pacientes hospitalizados que foram expostos a fragrâncias cítricas no ar ambiente, tiveram resultados significantes na diminuição dos escores de depressão, estimulação imunológica e descontinuação da medicação antidepressiva (RUSSO, 2011).

O limoneno, por sua vez, também tem sido amplamente estudado e demonstrou produzir apoptose nas células de câncer de mamas, efeito contra acnes e dermatófitos, diminuição do refluxo gastroesofágico (RUSSO, 2011), efeito ansiolítico (LIMA et al., 2012), e ainda atividade imunomodulatória (LAPPAS; LAPPAS, 2012). Outras evidências sugerem ainda que o limoneno possui atividade anti-herpética na fase inicial da multiplicação viral (ASTANI; SCHNITZLER, 2014) e tem eficácia antibacteriana (MONTIRONI; CARIDDI; REINOSO, 2016; SUBRAMENIUM; VIJAYAKUMAR; PANDIAN, 2015).

De forma mais importante para o presente trabalho, podemos citar alguns estudos que evidenciam os efeitos antinociceptivos do limoneno (DO AMARAL et al., 2007), mostrando sua ação como agonista dos receptores de adenosina A₂, responsáveis pela regulação do sono, além de induzir a ativação da proteína quinase A, aumentar o AMPc citosólico (PARK et al., 2011), sua capacidade de estimular os canais potencial receptor transiente, oTRPA1 quando utilizado na forma tópica e inibir a nocicepção induzida pelo estresse oxidativo quando administrado sistemicamente (KAIMOTO et al., 2016), existindo ainda evidências de sua atividade anti-inflamatória, através da possível diminuição da produção de citocinas inflamatórias (CHI et al., 2013), sendo ainda considerado um inibidor de ON induzido pela IL-1 β (RUFINO et al., 2015) e como opção do tratamento de alergia inflamatória pulmonar (HANSEN et al., 2016).

Araújo-Filho et al. (2017), observaram em seu estudo que a atividade anti-hiperalgésica do limoneno diminui a expressão de c-FOS na medula espinhal, o que sugere uma modulação da transmissão de dor através das lâminas I e II do corno dorsal, responsáveis por transmitir os impulsos dolorosos até as áreas supramedulares. Tais evidências corroboraram e contribuíram para nosso estudo.

Kim et al. (2013), realizaram estudo de avaliação de risco no uso do d-limoneno e através deste observou-se que o composto possui um curto tempo de meia-vida (entre 12 e 24h) e sua excreção se faz através da urina. Depois de inalado na dose de 450 mg/m³ por duas horas, observou-se três fases de eliminação, com meias-vidas de aproximadamente 3, 33 e 750 minutos, respectivamente, com 1% do absorvido sendo eliminado inalterado no ar exalado e aproximadamente 0,003% eliminado de forma inalterada pela urina. O limoneno em altas concentrações mostrou-se irritante para a pele, porém não alergênico, conferindo a este composto a categoria de químico com baixa toxicidade.

Rehman et al. (2014) em um estudo que avaliou toxicidade renal induzida por doxorubicina mostrou que o d-limoneno possui efeito protetivo, possivelmente atenuando o estresse oxidativo e dano inflamatório de tecidos, não encontrando evidências de toxicidade, mutagenicidade, carcinogenicidade ou ainda nefrotoxicidade.

2.10 α -Felandreno

O felandreno ou α -felandreno (α -PA; 5-isopropil-2-metil-1,3-ciclohexadieno) (Figura 4) é um monoterpene cíclico, que pode ocorrer de duas formas enantioméricas, o (-)- α -felandreno e o (+)- α -felandreno. Este composto pode ser encontrado em diversos óleos essenciais como os óleos de *Eucalyptus*, *Piper*, *Citrus*, *Mentha*, *Pinus*, entre outros. Da mesma forma que o limoneno, é utilizado na indústria como fragrância e é caracterizado por um aroma cítrico característico (SIQUEIRA et al., 2016; LIMA et al., 2012; ISCAN et al., 2012; GUIMARÃES; QUINTANS; QUINTANS, 2013).

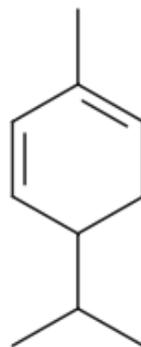


Fig.4 Estrutura química do α -felandreno. Fonte: Lima et al., (2012, p. 284).

Estudos anteriores demonstraram que o α -felandreno possui atividade antimicrobiana para diferentes bactérias, fungos e leveduras, assim como seus metabólitos

(ISCAN et al., 2012; GUIMARÃES; QUINTANS; QUINTANS, 2013). Estudos com culturas de células cancerígenas demonstraram a capacidade de o felandreno induzir morte celular e autofagia, apontando diversos mecanismos para tais efeitos, dentre eles pela regulação do NF- κ B (HSIEH et al., 2014; HSIEH et al., 2015; LIN et al., 2015).

A capacidade anti-inflamatória do α -felandreno também pode ser observada no trabalho de Siqueira et al. (2016), onde este composto foi capaz de modular a migração de neutrófilos, adesão e rolamento de leucócitos e ainda inibiu a produção de citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-6). Lima et al. (2012), recentemente estudaram a atividade antinociceptiva do α -felandreno em modelos de nocicepção inflamatória e aguda, além de hipernocicepção mecânica. Todos os modelos estudados apresentaram resultados significativos. Mostrou-se ainda, que tais resultados estão relacionados com possíveis mecanismos envolvendo o sistema opioide via K^+ , canais de ATP, o sistema glutamatérgico e uma interação dos monoterpenos com os receptores muscarínicos e o sistema adrenérgico. A administração oral do composto não apresentou citotoxicidade e é efetiva com doses muito baixas, sendo a dose letal (DL50) de 5700 mg/kg em ratos.

3 OBJETIVOS

GERAL

Avaliar a atividade antihiperálgica e antidepressiva do óleo essencial dos frutos de *S. terebinthifolius* e dos compostos isolados (R)-(+)-limoneno e α - felandreno em modelos de lesão do nervo ciático e injeção intratecal de citocinas ou gp120 em roedores.

ESPECÍFICOS

Estudar a atividade antihiperálgica do óleo essencial dos frutos de *S. terebinthifolius* e dos compostos isolados (R)-(+)-limoneno e α - felandreno administrados via oral em modelo de dor neuropática induzida pela lesão do nervo ciático em ratos;

Estudar a atividade antidepressiva do óleo essencial dos frutos de *S. terebinthifolius* e dos compostos isolados (R)-(+)-limoneno e α - felandreno administrados via oral em modelo de dor neuropática induzida pela lesão do nervo ciático em ratos;

Estudar a atividade antihiperálgica do composto isolado (R)-(+)-limoneno administrado via oral em modelo de injeção intratecal de citocinas (IL-1 β e TNF- α) ou gp120;

Quantificar os níveis de IL-1 β e IL-10 em amostras de sangue de camundongos após indução da hiperálgia por injeção intratecal gp120 e avaliar a eficácia do tratamento oral do composto (R)-(+)-limoneno na alteração desses parâmetros;

Analisar a expressão das proteínas HSP-90 e SOD em amostras de medula espinhal de camundongos em modelo de injeção intratecal de citocinas (IL-1 β e TNF- α) ou gp120 e avaliar a eficácia do tratamento oral do composto (R)-(+)-limoneno na alteração desses parâmetros;

Estudar a atividade antihiperálgica do composto isolado α -felandreno administrado via oral em modelo de injeção intratecal de IL-1 β ou gp120.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, M.J.; BEDOYA, L.M.; APAZA, L.; BERMEJO, P. The Artemisia L. Genus: a review of bioactive essential oils. *Molecules*. v. 17, n.3, p.2542-2566, 2012.

ABDOU, R.H.; SALEH, S.Y.; KHALIL, W.F. Toxicological and biochemical studies on *Schinus terebinthifolius* concerning its curative and hepatoprotective effects against carbon tetracholide-induced liver injury. *Pharmacognosy Magazine*, v.11, p.93-101, 2015.

ARAÚJO-FILHO, H.G.; PEREIRA, E.W.M.; REZENDE, M.M.; MENEZES, P.P.; ARAÚJO, A.A.S; BARRETO, R.R.S., MARTINS, A.O.B., ALBUQUERQUE, T.R.; SILVA, B.A.F.; ALCANTARA, I.S.; COUTINHO, H.D.M.; MENEZES, I.R.A.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; QUINTANS, J.S.S. D-limonene exhibits superior antihyperalgesic effects in a β -Cyclodextrincomplexed form in chronic musculoskeletal pain reducing Fos protein expression on spinal cord in mice. *Neuroscience*, v.358, p.158-169, 2017.

ASHRAF, T.; JIANG, W.; HOQUE, M.T.; HENDERSON, J.; WU, C.; BENDAYAN, R. Role of anti-inflammatory compounds in human immunodeficiency virus-1 glycoprotein120-mediated brain inflammation. *Journal of Neuroinflammation*, v.11, p.91, 2014.

ASTANI, A.; SCHNITZLER, P. Antiviral activity of monoterpenes beta-pinene and limonene against herpes simplex virus in vitro. *Iranian Journal of Microbiology*, v.6, n.3, p.149-155, 2014.

BALUNAS, M.J.; KINGHORN, A.D. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, v. 78, p.431-441, 2005.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, M.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils- A review. *Food and Chemical Toxicology*, v.46, n.2, p.446-475, 2008.

CHI, G.; WEI, M.; XIE, X.; SOROMOU, L.W.; LIU, F.; ZHAO, S. Suppression of MAPK and NF- κ B pathways by limonene contributes to attenuation of lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in acute lung injury. *Inflammation*, v.36, n.2, p.501-511, 2013.

CHOI, H.S.; SONG, H.S.; UKEDA, H.; SAWAMURA, M. Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: detection using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.48, p.4156-4160, 2000.

COSTA, C.O.D.; RIBEIRO, P.R.; LOUREIRO, M.B.; SIMÕES, R.C.; CASTRO, R.D.; FERNANDEZ, L.G. Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activities of extracts prepared from different tissues of *Schinus terebinthifolius* raddi that occurs in the cost of Bahia, Brazil. *Pharmacognosy Magazine*, v.11, n.43, p.607-614, 2015.

DE ALMEIDA, R.N.; AGRA, M.F.; MAIOR, F.N.; DE SOUSA, D.P. Essential oils and their constituents: anticonvulsant activity. *Molecules*, v.16, n.3, p.2726-2742, 2011.

DO AMARAL, J.F.; SILVA, M.I.; NETO, M.R.; NETO, P.F.; MOURA, B.A.; DE MELO, C.T.; DE ARAÚJO, F.L.; DE SOUSA, D.P.; DE VASCONCELOS, P.F.; DE VASCONCELOS, S.M.; DE SOUSA, F.C. Antinociceptive effect of the monoterpene R-(+)-limonene in mice. *Biological and Pharmaceutival Bulletin*, v.30, n.7, p.1217-1220, 2007.

DUTRA, R.C.; CAMPOS, M.M.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacological Research*, v.112, p.4-29, 2016.

ELSHAFIE, H.S.; GHANNEY, N.; MANG, S.M.; FERCHICHI, A.; CAMELE, I. An *in vitro* attempt for controlling severe phytopathogens and human pathogens using essential oils from Mediterranean plants of genus *Schinus*. *Journal of Medicinal Food*, v.19, n.3, p.266-273, 2016.

ESTEVIÃO, L.R.M.; DE MEDEIROS, J.P.; SIMÕES, R.S.; ARANTES, R.M.E.; RACHID, M.A.; DA SILVA, R.M.G.; MENDONÇA, F.S.; EVÊNCIO-NETO, J. Mast cell concentration and skin wound contraction in rats treated with brazilian pepper essential oil (*Schinus terebinthifolius*). *Acta Cirurgica Brasileira*, v.30, n. 4, 2015.

FEDEL-MIYASATO, L.E.S.; FORMAGIO, A.S.N.; AUHAREK, S.A.; KASSUYA, C.A.L.; NAVARRO, S.D.; CUNHA-LAURA, A.L.; MONREAL, A.C.D.; VIEIRA, M.C.; OLIVEIRA, R.J. Antigenotoxic and antimutagenic effects of *Schinus terebinthifolius* raddi in allium cepa and swiss mice: a comparative study. *Genetics and Molecular Research*, v. 13, n.2, p.3411-3425, 2014 (a).

FEDEL-MIYASATO, L.E.S.; KASSUYA, C.A.L.; AUHAREK, S.A.; FORMAGIO, A.S.N.; CARDOSO, C.A.L.; MAURO, M.O.; CUNHA-LAURA, A.L.; MONREAL, A.C.D.; VIEIRA, M.C.; OLIVEIRA, R.J. Evaluation of anti-inflammatory, immunomodulatory, chemopreventive and wound healing potentials from *Schinus terebinthifolius* methanolic extract. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.24, n.5, p.565-575, 2014 (b).

FERREL, D.; GIUNTA, B. The impact of HIV-1 on neurogenesis: Implications for HAND. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v.71, n.22, p.4387-4392, 2014.

FINNELL, J.E.; WOOD, S.K. Neuroinflammation at the interface of depression and cardiovascular disease: Evidence from rodent models of social stress. *Neurobiology of Stress*, v. 4, p.1-14, 2016.

FORMAGIO, A.S.N.; IRIGUCHI, E.K.K.; ROVEDA, L.M.; VIEIRA, M.C.; CARDOSO, C.A.L.; ZARATE, N.A.H.; KASSUYA, C.A.L. Chemical composition and anti-inflammatory activity of the essential oil of *Schinus terebinthifolius* Raddi (anacardiaceae) fruits. *Latin American Journal of Pharmacy*, v.30, n.8, p.555-559, 2011.

FUKUMOTO, S.; SAWASAKI, E.; OKUYAMA, S.; MIYAKE, Y.; YOKOGOSHI, H. Flavor components of monoterpenes in citrus essential oils enhance the release of monoamines from rat brain slices. *Nutritional Neuroscience*, v.9, n.1-2, p.73-80, 2006.

GIARRATANA, F.; MUSCOLINO, D.; PANEBIANCO, F.; PATANIA, A.; BENIANTI, C.; ZIINO, G.; GIUFFRIDA, A. Activity of (R)-(+)-limonene against anisakis larvae. *Italian Journal of Food Safety*, v.4, n.4, 2015.

GUIMARÃES, A.G.; QUINTANS, J.S.; QUINTANS, L.J. Monoterpenes with analgesic activity--a systematic review. *Phytotherapy Research*, v.27, n.1, p.1-15, 2013.

HANSEN, J.S.; NORGAARD, A.W.; KOPONEN, I.K.; SORLI, J.B.; PAIDI, M.D.; HANSEN, S.W.; CLAUSEN, P.A.; NIELSEN, G.D.; WOLKOFF, P.; LARSEN, S.T. Limonene and its ozone-initiated reaction products attenuate allergic lung inflammation in mice. *Journal of Immunotoxicology*, v.13, n.6, p.793-803, 2016.

HO, P.S.; YEN, C.H.; CHEN, C.Y.; HUANG, S.Y.; LIANG, C.S. Changes in cytokine and chemokine expression distinguish dysthymic disorder from major depression and healthy controls. *Psychiatry Research*, v.248, p.20-27, 2017.

HSIEH, S.L.; LI, Y.C.; CHANG, W.C.; CHUNG, J.G.; HSIEH, L.C.; WU, C.C. Induction of necrosis in human liver tumor cells by α -phellandrene. *Nutrition and Cancer*, v.66, n.6, p.970-979, 2014.

HSIEH, L.C.; HSIEH, S.L.; CHEN, C.T.; CHUNG, J.G.; WANG, J.J.; WU, C.C. Induction of α -phellandrene on autophagy in human liver tumor cells. *The American Journal of Chinese Medicine*, v. 43, n.1, p.121-136, 2015.

İŞCAN, G.; KIRIMER, N.; DEMIRCI, F.; DEMIRCI, B.; NOMA, Y.; BAŞER, K.H. Biotransformation of (-)-(R)- α -phellandrene: antimicrobial activity of its major metabolite. *Chemistry Biodiversity*, v.9, n.8, p.1525-1532, 2012.

JENSEN, T.S.; FINNERUP, N.B. Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: clinical manifestations and mechanisms. *The Lancet Neurology*, v.13, n.9, p.924-935, 2014.

KAIMOTO, T.; HATAKEYAMA, Y.; TAKAHASHI, K.; IMAGAWA, T.; TOMINAGA, M.; OHTA, T. Involvement of transient receptor potential A1 channel in algescic and analgesic actions of the organic compound limonene. *European Journal of Pain*, v.20, n.7, p.1155-1165, 2016.

KIM, Y.W.; KIM, M.J.; CHUNG, B.Y.; BANG, Y.; LIM, S.K.; CHOI, S.M.; LIM, D.S.; CHO, M.C.; YOON, K.; KIM, H.S.; KIM, K.B.; KIM, Y.S.; KWACK, S.J.; LEE, B.M. Safety evaluation and risk assessment of d-Limonene. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, v.16, n.1, p.17-38, 2013.

KOMORI, T.; FUJIWARA, R.; TANIDA, M.; NOMURA, J.; YOKOYAMA, M.M. Effects of citrus fragrance on immune function and depressive states. *Neuroimmunomodulation*, v. 2, n.3, p.174-180, 1995.

LAPPAS, C.M.; LAPPAS, N.T. D-Limonene modulates T lymphocyte activity and viability. *Cellular Immunology*, v.279, n.1, p.30-41, 2012.

LIMA, D.F.; BRANDÃO, M.S.; MOURA, J.B.; LEITÃO, J.M.; CARVALHO, F.A.; MIÚRA, L.M.; LEITE, J.R.; SOUSA, D.P.; ALMEIDA, F.R. Antinociceptive activity of the monoterpene α -phellandrene in rodents: possible mechanisms of action. *J Pharm Pharmacol*. 2012; 64(2):283-292.

LIMA, L.B.; VASCONCELOS, C.F.B.; MARANHÃO, H.M.L.; LEITE, V.R.; FERREIRA, P.A.; ANDRADE, B.A.; ARAÚJO, E.L.; XAVIER, H.S.; LAFAYETTE, S.S.L.; WANDERLEY, A.G. Acute and subacute toxicity of *Schinus terebinthifolius* bark extract. *J Ethnopharmacol*. 2009; 126(3):468-473.

LIMA, N.G.; DE SOUSA, D.P.; PIMENTA, F.C.; ALVES, M.F.; DE SOUSA, F.S.; MACEDO, R.O.; CARDOSO, R.B.; DE MORAIS, L.C.; MELO DINIZ, M.F.; DE ALMEIDA, R.N. Anxiolytic-like activity and GC-MS analysis of (R)-(+)-limonene fragrance, a natural compound found in food and plants. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v.103, n.3, p.450-454, 2012.

LIN, J.J.; WU, C.C.; HSU, S.C.; WENG, S.W.; MA, Y.S.; HUANG, Y.P.; LIN, J.G.; CHUNG, J.G. Alpha-phellandrene-induced DNA damage and affect DNA repair protein expression in WEHI-3 murine leukemia cells in vitro. *Environmental Toxicology*, v.30, n.11, p.1322-1330, 2015.

LORAM, L.C.; HARRISON, J.A.; CHAO, L.; TAYLOR, F.R.; REDDY, A.; TRAVIS, C.L.; GIFFARD, R.; AL-ABED, Y.; TRACEY, K.; MAIER, S.F.; WATKINS, LR. Intrathecal injection of an alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor agonist attenuates gp120-induced mechanical allodynia and spinal pro-inflammatory cytokine profiles in rats. *Brain, Behavior and Immunity*, v.24, n.6, p.959-967, 2010.

LOUBOUTIN, J.P.; REYES, B.A.; AGRAWAL, L.; VAN BOCKSTAELE, E.J.; STRAYER, D.S. HIV-1 gp120-induced neuroinflammation: relationship to neuron loss and protection by rSV40-delivered antioxidant enzymes. *Experimental Neurology*, v.221, n.1, p.231-245, 2010. LOUBOUTIN, J.P.; STRAYER, D.S. Role of Oxidative Stress in HIV-1-Associated Neurocognitive Disorder and Protection by Gene Delivery of Antioxidant Enzymes. *Antioxidants*, v.3, n.4, p.770-797, 2014.

LUA, P.L.; ZAKARIA, N.S. A brief review of current scientific evidence involving aromatherapy use for nausea and vomiting. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, v.18, n.6, p.534-540, 2012.

LUNDSTROM, K.; PHAM, H.T.; DINH, L.D. Interaction of Plant Extracts with Central Nervous System Receptors. *Medicines*, v.4, n.1, p.12, 2017.

LV, X.; ZHAO, S.; NING, Z.; ZENG, H.; SHU, Y.; TAO, O.; XIAO, C.; LU, C.; LIU, Y. Citrus fruits as a treasure trove of active natural , metabolites that potentially provide benefits for human health. *Chemistry Central Journal*, v.9, p.68, 2015.

MARTÍNEZ-CENGOTITABENGOA, M.; CARRASCÓN, L.; O'BRIEN, J.T.; DÍAZ-GUTIÉRREZ, M.J.; BERMÚDEZ-AMPUDIA, C.; SANADA, K.; ARRASATE, M.; GONZÁLEZ-PINTO, A. Peripheral Inflammatory Parameters in Late-Life Depression: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*, v.17, n.12, p.2022, 2016.

MAZZARI, A.L.D.A.; PRIETO, J.M. Herbal medicines in Brazil: pharmacokinetic profile and potential herb-drug interactions. *Frontiers in Pharmacology*, v.5, p.162, 2014.

MCRAE, M. HIV and viral protein effects on the blood brain barrier. *Tissue Barriers*, v.4, n.1, 2016.

MELO, M.C.S.; GADELHA, D.N.B.; OLIVEIRA, T.K.B.; BRANDT, C.T. Alcohol extract of *Schinus terebinthifolius* raddi (anacardiaceae) as a local antimicrobial agente in severe autogenously fecal peritonitis in rats. *Acta Cirurgica Brasileira*, v.29(supl.1), 2014.

MERINO, J.J.; MONTES, M.L.; BLANCO, A.; BUSTOS, M.J.; OREJA-GUEVARA, C.; BAYÓN, C.; CUADRADO, A.; LUBRINI, G.; CAMBRÓN, I.; MUÑOZ, A.; CEBOLLA, S.; GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ, M.; BERNARDINO, J.I.; ARRIBAS, J.R.; FIALA, M. Neuropatogénesis inducida por el virus del sida: Estrategias terapéuticas frente a la neurodegeneración inducida por la glucoproteína gp120/Tat en el sistema nervioso central. *Revista de Neurología*, v.52, n.2, p.101-111, 2011.

MILLER, A.H.; RAISON, C.L. The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. *Nature Reviews Immunology*, v.16, n.1, p.22-34, 2016.

MILLIGAN, E.D.; MEHMERT, K.K.; HINDE, J.L.; HARVEY, L.O.; MARTIN, D.; TRACEY, K.J.; MAIER, S.F.; WATKINS, L.R. Thermal hyperalgesia and mechanical allodynia produced by intrathecal administration of the human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) envelope glycoprotein, gp120. *Brain Research*, v.861, n.7, p.105-116, 2000.

MILLIGAN, E.D.; O'CONNOR, K.A.; NGUYEN, K.T.; ARMSTRONG, C.B.; TWINING, C.; GAYKEMA, R.P.; HOLGUIN, A.; MARTIN, D.; MAIER, S.F.; WATKINS, L.R. Intrathecal HIV-1 envelope glycoprotein gp120 induces enhanced pain states mediated by spinal cord proinflammatory cytokines. *Journal of Neuroscience*, v.21, n.8, p.2808-2819, 2001.

MONTIRONI, I.D.; CARIDDI, L.N.; REINOSO, E.B. Evaluation of the antimicrobial efficacy of *Minthostachys verticillata* essential oil and limonene against *Streptococcus uberis* strains isolated from bovine mastitis. *Revista Argentina de Microbiología*, v.48, n.3, p.210-216, 2016.

MOSS, P.J.; HUANG, W.; DAWES, J.; OKUSE, K.; MCMAHON, S.B.; RICE, A.S.C. Macrophage-sensory neuronal interaction in HIV-1 gp120-induced neurotoxicity. *British Journal of Anaesthesia*, v.114, n.3, p.499-508, 2015.

Mullard, A. New drugs cost US\$2.6 billion to develop. *Nature Reviews Drug Discovery*. V.13, P. 877, 2014.

NASIRINEZHAD, F.; JERGOVA, S.; PEARSON, J.P.; SAGEN, J. Attenuation of persistent pain-related behavior by fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitors in a rat model of HIV sensory neuropathy. *Neuropharmacology*, v.95, p.100-109, 2015.

NOCCHI, S.R.; DE MOURA-COSTA, G.F.; NOVELLO, C.R.; RODRIGUES, J.; LONGHINI, R.; DE MELLO, J.C.P.; FILHO, B.P.D.; NAKAMURA, C.V.; UEDA-NAKAMURA, T. In vitro cytotoxicity and anti-herpes simplex virus type 1 activity of hydroethanolic extract, fractions, and isolated compounds from stem bark of *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Pharmacognosy Magazine*, v.12, n.46, p.160-164, 2016.

PADI, S.S.; SHI, X.Q.; ZHAO, Y.Q.; RUFF, M.R.; BAICHO, N.; PERT, C.B.; ZHANG, J. Attenuation of rodent neuropathic pain by an orally active peptide, RAP-103, which potently blocks CCR2- and CCR5-mediated monocyte chemotaxis and inflammation. *Pain*. v.53, n.1, p.95-106, 2012.

PARK, H.M.; LEE, J.H.; YAOYAO, J.; LEE, S.J. Limonene, a natural cyclic terpene, is an agonistic ligand for adenosine A (2A) receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.404, n.1, p.345-348, 2011.

PEACOCK, B.N.; SCHEIDERER, D.J.; KELLERMANN, G.H. Biomolecular aspects of depression: A retrospective analysis. *Comprehensive Psychiatry*, v.73, p.168-180, 2016.

POTDAR, V.H.; KIBILE, S.J. Evaluation of antidepressant-like effect of *Citrus Maxima* leaves in animal models of depression. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, v.14, n.5, p.478, 2011.

PULTRINI, A.M.; GALINDO, L.A.; COSTA, M. Effects of the essential oil from *Citrus aurantium* L. in experimental anxiety models in mice. *Life Sciences*, v.78, n.15, p.1720-1725, 2006.

REHMAN, M.U.; TAHIR, M.; KHAN, A.Q.; KHAN, R.; ODAY-O-HAMIZA ATEEF A.; HASSAN, S.K.; RASHID, S.; ALI, N.; ZEESHAN, M.; SULTANA, S. D-limonene suppresses doxorubicin-induced oxidative stress and inflammation via repression of COX-2, iNOS, and NF κ B in kidneys of Wistar rats. *Experimental Biology and Medicine*, v.239, n.4, p.465-476, 2014.

ROSAS, E.C.; CORREA, L.B.; PÁDUA, T.A.; COSTA, T.E.M.M.; MAZZEI, J.L.; HERINGER, A.P.; BIZARRO, C.A.; KAPLAN, M.A.C.; FIGUEIREDO, M.R.; HENRIQUES, M.G. Anti-inflammatory effect of *Schinus terebinthifolius* raddi hydroalcoholic extract on neutrophil migration in zymosan-induced arthritis. *Journal of Ethnopharmacology*, v.175, p.490-498, 2015.

RUFINO, A.T.; RIBEIRO, M.; SOUSA, C.; JUDAS, F.; SALGUEIRO, L.; CAVALEIRO, C.; MENDES, A.F. Evaluation of the anti-inflammatory, anti-catabolic and pro-anabolic effects of E-caryophyllene, myrcene and limonene in a cell model of osteoarthritis. *European Journal of Pharmacology*, v.750, p.141-150, 2015.

RUSSO, E.B. Taming THC: potencial cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *British Journal of Pharmacology*, v.163, n.7, p.1344-1364, 2011.

SAGEN, J.; CASTELLANOS, D.A.; HAMA, A.T. Antinociceptive effects of topical mepivacaine in a rat model of HIV-associated peripheral neuropathic pain. *Journal of Pain Research*, v.9, p.361-371, 2016.

SCHEIBE, C.L.; RIBAS-FILHO, J.M.; CZECZKO, N.G.; MALAFAIA, O.; BARBOZA, L.E.D.; RIBAS, F.M.; WENDLER, E.; TORRES, O.; LOVATO, F.C.; SCAPINI, J.G.S. *Schinus terebinthifolius* raddi (aroeira) and *Orbignya phalerata* mart. (babassu) effect in cecorrhaphy healing in rats. *Acta Cirurgica Brasileira*, v.31, n.6, 2016.

SHAH, A.; VERMA, A.S.; PATEL, K.H.; NOEL, R.; RIVERA-AMILL, V.; SILVERSTEIN, P.S.; CHAUDHARY, S.; BHAT, H.K.; STAMATATOS, L.; SINGH, D.P.; BUCH, S.; KUMAR, A. HIV-1 gp120 induces expression of IL-6 through a nuclear factor-kappa B-dependent mechanism: suppression by gp120 specific small interfering RNA. *Plos One*, v.6, n.6, 2011.

SHAH, A.; KUMAR, A. HIV-1 gp120-mediated increases in IL-8 production in astrocytes are mediated through the NF- κ B pathway and can be silenced by gp120-specific siRNA. *Journal of Neuroinflammation*, v.7, p.96, 2010.

SHI, Y.; SHU, J.; LIANG, Z.; YUAN, S.; TANG, S. Oligodendrocytes in HIV-associated pain pathogenesis. *Molecular Pain*, v.12, p.1-7, 2016.

SIQUEIRA, H.D.; NETO, B.S.; SOUSA, D.P.; GOMES, B.S.; DA SILVA, F.V.; CUNHA, F.V.; WANDERLEY, C.W.; PINHEIRO, G.; CÂNDIDO, A.G.; WONG, D.V.; RIBEIRO, R.A.; LIMA-JÚNIOR, R.C.; OLIVEIRA, F.A. α -Phellandrene, a cyclic monoterpene, attenuates inflammatory response through neutrophil migration inhibition and mast cell degranulation. *Life Sciences*, v.160, p.27-33, 2016.

SILVA-JÚNIOR, E.F.; AQUINO, P.G.V.; SANTOS-JÚNIOR, P.F.S.; NASCIMENTO, I.J.S.; GOMES, E.A.; SILVA, A.L.L., VERISSIMO, R.C.S.S., AQUINO, T.M.; ARAÚJO-JÚNIOR, J.X. Phytochemical compounds and pharmacological properties from *Schinus molle* Linnaeus and *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, v. 7, n.12, p. 389-393, 2015.

SOUZA, M.C.; SIANI, A.C.; RAMOS, M.F.; MENEZES-DE-LIMA, O.J.; HENRIQUES, M.G. Evaluation of anti-inflammatory activity of essential oils from two Asteraceae species. *Die Pharmazie*, v.58, n.8, p.582-586, 2003.

STEFANELLO, M.E.; PASCOAL, A.C.R.F.; SALVADOR, M.J. Essential Oils from Neotropical Myrtaceae: Chemical Diversity and Biological Properties. *Chemistry Biodiversity*, v.8, n.1, p.73-94, 2011.

SUBRAMENIUM, G.A.; VIJAYAKUMAR, K.; PANDIAN, S.K. Limonene inhibits streptococcal biofilm formation by targeting surface-associated virulence factors. *Journal of Medical Microbiology*, v.64, n.8, p.879-890, 2015.

TONIAL, F.; MAIA, B.H.L.N.S.; GOMES-FIGUEIREDO, J.A.; SOBOTTKA, A.M.; BERTOL, C.D.; NEPEL, A.; SAVI, D.C.; VICENTE, V.A.; GOMES, R.R.; GLIENKE, C. Influence of culturing conditions on bioprospecting and the antimicrobial potential of endophytic fungi from *Schinus terebinthifolius*. *Current Microbiology*, v.72, n.2, p.173-183, 2016.

VAN DER WATT, G.; JANCA, A. Aromatherapy in nursing and mental health care. *Contemporary Nurse*, v.30, n.1, p.69, 2008.

VERALLO-ROWELL VM, KATALBAS SS, PANGASINAN JP. Natural (mineral, vegetable, coconut, essential) oils and contact dermatitis. *Current Allergy and Asthma Reports*, v.16, n.7, p.51, 2016.

WATKINS, L.R.; MAIER, S.F. Implications of immune-to-brain communication for sickness and pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.96, n.14, p.7710-7713, 1999.

WELLS JM, MERCENIER A. Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, v.6, p.349-362, 2008.

YUAN S, SHI Y, CHEN J, ZHOU X, LI G, GELMAN BB, LISINICCHIA JG, CARLTON SM, FERGUSON MR, TAN A, SARNA SK, TANG S. Gp120 in the pathogenesis of human HIV-associated pain. *Annals Neurology*, v.75, n.6, p.837-850, 2014.

ZHENG W, OUYANG H, ZHENG X, LIU S, MATA M, FINK DJ, HAO S. Glial TNF α in the spinal cord regulates neuropathic pain induced by HIV gp120 application in rats. *Molecular Pain*, v.7, n.40, 2011.

ZHOU XY, ZHANG F, HU XT, CHEN J, TANG RX, ZHENG KY, SONG YJ. Depression can be prevented by astaxanthin through inhibition of hippocampal inflammation in diabetic mice. *Brain Research*, v.1653, p.262-268, 2016.

5 APÊNDICES

Artigo 1 publicado na revista Nutritional Neuroscience (fator de impacto 2015:2,616)

Antihyperalgesic and antidepressive actions of (R)-(+)-limonene, α -phellandrene, and essential oil from *Schinus terebinthifolius* fruits in a neuropathic pain model

Ana Claudia Piccinelli, Joyce Alencar Santos, Elisabete Castelon Konkiewitz, Silvia Aparecida Oesterreich, Anelise Samara Nazari Formagio, Julio Croda, Edward Benjamim Ziff, Cândida Aparecida Leite Kassuya.

Nutritional Neuroscience, v.18, p.217-224, 2015.

Artigo 2 publicado na revista Life Sciences (fator de impacto 2015: 2,627)

Limonene reduces hyperalgesia induced by gp120 and cytokines by modulation of IL-1 β
and protein expression in spinal cord of mice

Ana Claudia Piccinelli, Priscila Neder Morato, Julio Croda, Jared Sampson, Xiangpeng
Kong, Elisabete Castelon Konkiewitz, Edward B. Ziff, Jaime Amaya-Farfan, Cândida
Aparecida Leite Kassuya

Life Sciences, 2017.

Artigo 3 nas normas da revista Nutritional Neuroscience (fator de impacto 2015:2,616)

Evaluation of antihyperalgesic activity of α -phellandrene after intrathecal injection of gp-120
or IL-1 β

Ana Claudia Piccinelli, Julio Croda, Jared Sampson, Xiangpeng Kong, Elisabete Castelon
Konkiewitz, Edward Benjamim Ziff, Cândida Aparecida Leite Kassuya

2017

EVALUATION OF ANTIHYPERALGESIC ACTIVITY OF α -PHELLANDRENE AFTER
INTRATHECAL INJECTION OF GP-120 OR IL-1 β

Ana Claudia Piccinelli^a, Julio Croda^a, Jared Sampson^b, Xiangpeng Kong^b, Elisabete Castelon
Konkiewitz^a, Edward Benjamim Ziff^b, Cândida Aparecida Leite Kassuya^a

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

^b*Department of Biochemistry and Molecular Pharmacology, New York University School of
Medicine, New York, USA.*

**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

Objectives: the present study has evaluated the effects of oral administration of α -phellandrene in a model of hyperalgesia induced by intrathecal injection of gp120 or IL-1 β in mice.

Methods: One hour after oral treatment with with α -phellandrene (10 mg/kg), IL-1 β (1000 pg) or gp120 (300 pg) were injected between the L5 and L6 vertebrae through intact skin. Mechanical and cold sensitivity was performed at 2 and 3 hours after intrathecal injection of IL-1 β or gp120.

Results: Intrathecal injection of gp120 was able to increase mechanical sensitivity in mice and oral treatment with phellandrene prevented gp120-induced mechanical and cold sensitivity after 2 and 3 hours of the injection, when compared to control group. The same way, intrathecal injection of IL-1 β was able to increase mechanical and cold sensitivity in mice and oral treatment with phellandrene prevented IL-1 β -induced mechanical sensitivity but not cold sensitivity.

Discussion: we have demonstrated gp120 and IL-1 β when administered intrathecally in mice may cause significant increase in cold and mechanical sensitivity. Phellandrene has presented antihyperalgesic activity, because when administered orally is able to modulate this response by decreasing hyperalgesia induced by intrathecal injections of gp120 and IL-1 β .

Keywords: Essential oil, hyperalgesia, cytokines, HIV, chronic pain.

INTRODUCTION

Essential oils are characterized as very complex natural mixtures, containing 20 to 60 compounds at different concentrations and among them there are two or three major components in high concentrations (20-70%). These major components are able to determine the biological activities of the essential oils and normally, they are composed of terpenes and terpenoids (1). Terpenes are one of the largest groups of available natural products and they have important roles in biology function of plants and several uses in medicine, food and chemical industry (2). Great diversity of terpenes can also be observed in bacteria, fungi, algae, plants, especially in essential oils, and insects and marine organisms (3).

α - Phellandrene is a cyclic monoterpene named as 5- isopropyl-2-methyl-1,3-cyclohexadiene and it can be found in the essential oils of different plants (4). In a previous study with *Schinus terebinthifolius* Raddi essential oil from the fruit have revealed the presence of monoterpenes in 85% of the sample and among them α -phellandrene (5), which presents anti-inflammatory and antinociceptive activities (4, 6-8). Our group have observed phellandrene caused reduction in neuropathic pain and depression in sciatic nerve injury model with rats (8) and the mechanism of action was suggested by Lima et al. (2012) (7) involves the glutamatergic, opioid, nitrenergic, cholinergic, and adrenergic systems but it is not completely elucidated.

Gp120 envelope protein from HIV virus is known to induce toxic actions on the dorsal root ganglia sensory neurons and spinal cord (9). When injected intrathecally it could cause thermal hyperalgesia and mechanical allodynia in animal models. The mechanism involves the release of IL-1 β and TNF- α , that stimulates dorsal horn pain transmission neurons, and these actions create rapidly pain behaviors and pain-specific excitation of trigeminal dorsal

horn neurons. Intrathecal cytokines injected alone, as IL-1 β , or with other cytokine is able to facilitate pain in spinal cord and when blocked, pain facilitation is attenuated (10-11).

Therefore, the present study aimed to evaluate the effects of oral administration of α -phellandrene in a model of hyperalgesia induced by intrathecal injection of gp120 or IL-1 β in mice.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male *Swiss* mice (18-23g) were used for all experiments procedures and divided in groups of 6. Animals were obtained from the bioterium of the College of Health Sciences at UFGD and 12-h light/12-h dark cycle in a room kept at a constant temperature of 22 ± 1 °C, with controlled humidity (60-80%) and food and water provided *ad libitum*. Ethics committee on laboratory animals of UFGD has approved the procedures (Nbr. 022/2014).

Materials and reagentes

α -phellandrene and IL-1 β were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Gp120 was produced and donated by Prof. Dr. Shan Lu from University of Massachusetts Medical School.

Expression of gp120

Prof. Dr. Shan Lu provided the pJW4303 plasmid containing the codon-optimized gene segment of gp120 strain ZM109. For ZM109 gp120 production, DNA plasmid was prepared using Plasmid Plus Maxi Kit (Qiagen). Freestyle HEK293F cells (Life Technologies) were used to express gp120 protein, and they were cultured in suspension in 293 Freestyle media (Life Technologies) in a growth incubator at 37°C, 5% CO₂, and 85%

humidity, after transient transfection using polyethylenimine (PEI; Polysciences, Inc.).

1 mg of plasmid per 1 L transfected culture was combined with 4.5 ml of 1 mg/ml PEI and 94.5 ml of DMEM to 100 ml total volume, vortexed vigorously, and incubated 30 min at RT. From stock suspension culture grown in 293 Freestyle media, 1×10^9 HEK293F cells were pelleted for 5 min at 500 x g and resuspended in 30 ml fresh DMEM. The DNA mixture was slowly added to the cells, and the mixture placed in the growth incubator with gentle shaking (80 rpm).

After 4 hours, the transfected cells were pelleted again, resuspended in 30 ml DMEM, and added to 293 Freestyle media to 1L total volume. Then transfected cells were returned to the growth incubator shaking at 120 rpm for protein expression. Media supernatant was harvested 96 h post-transfection. The cells were pelleted for 30 min at 500 g, and the supernatant collected, sterile-filtered, and stored at 4°C overnight.

Purification of gp120

Supernatant of cell culture was prepared for affinity chromatography in a two-step process using tangential-flow filtration (TFF). We have concentrated sample in approximately 20-fold (to 50 ml) using a 10 kDa MiniMate TFF capsule (Pall), and buffer changed by continuous diafiltration with 5 volumes of 1x PBS. Lentil lectin sepharose beads (GE Healthcare) were added, and rocked at 4°C overnight for binding. Beads were washed with 1x PBS, and the gp120 protein eluted with 20 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl, 1.6 M α -D-methylglucoside. Protein-containing fractions, determined by SDS-PAGE, were pooled, and the sample was concentrated to 100 μ l and buffer changed into 1x PBS via centrifugal ultrafiltration (Vivaspin 2, Sartorius-Stedim). The concentration was adjusted to 1 mg/ml with 1x PBS, and the sample flash cooled in liquid nitrogen and stored at -80°C until use.

Intrathecal injection

One hour after oral treatment with with α -phellandrene (10 mg/kg), IL-1 β (1000 pg) or gp120 (300 pg) were diluted in saline solution (0.9%) and injected with a Hamilton micro-syringe (25 μ L) between the L5 and L6 vertebrae through intact skin. Total volume was 5 μ L (12).

Animals were divided in 6 per group among the following groups: control group, which received sterile saline solution by oral and intrathecal routes; positive control group, which received gp120 or IL-1 β by intrathecal injection and saline solution by oral route; and phellandrene group, treated with the compound by oral route and with gp120 or cytokines by intrathecal injection.

Mechanical sensitivity test

Animals were placed individually in acrylic boxes for an hour for habituation right after intrathecal injections. Mechanical sensitivity was performed at 2 and 3 hours after intrathecal injection of IL-1 β or gp120. And it was determined by measuring the paw withdrawal threshold using an electronic analgesimeter (Model EFF-301, InSight®, Ribeirão Preto, Brazil). The arm of the device was placed on the right hind paw of the animal and pressure was determined, in grams, after the paw withdrawal (11, 13).

Cold sensitivity test

Cold sensitivity test was performed after the mechanical sensitivity test at 2 and 3 hours after intrathecal injection. A syringe with 20 μ L of acetone was positioned close to the back right paw of the animal and liquid was released. Animals were observed for 20 seconds and the number of paw withdrawals was counted (14).

Statistical analysis

GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) was used to analyse the data and they were presented as mean \pm S.E.M. Differences between groups were evaluated by one-way ANOVA, followed by the Newman-Keuls test. Statistical differences were considered significant at $p < 0.05$. *Asterisks or # denote significant differences when comparing the groups.

RESULTS

Intrathecal injection of gp120 was able to increase mechanical sensitivity in mice and oral treatment with phellandrene prevented gp120-induced mechanical sensitivity

In figure 1, it is possible to observe that gp120 at dose of 300pg significantly increased mechanical sensitivity at 2(A) and 3 (B) hours after injection, when compared to control group and that oral administration of phellandrene at dose of 10 mg/kg significantly prevented hypersensitivity after gp120 injection. Maximal inhibitions were $59 \pm 13\%$ after 2 hours and $89 \pm 8\%$ (* $p < 0,05$) after 3 hours.

Intrathecal injection of gp120 was able to increase cold sensitivity in mice and oral treatment with phellandrene prevented gp120-induced cold hypersensitivity

Gp120 at dose of 300 pg increased significantly cold sensitivity and phellandrene at dose of 10 mg/kg was also able to significantly prevent hypersensitivity after 2 (Figure 1C) and 3 (Figure 1D) hours after the injection. Maximal inhibitions were $91 \pm 18\%$ e $90 \pm 14\%$ (* $p < 0,05$) after 2 and 3 hours, respectively.

Intrathecal injection of IL-1 β was able to increase mechanical and cold sensitivity in mice and oral treatment with phellandrene prevented IL-1 β -induced mechanical sensitivity but not cold sensitivity

Intrathecal injection of IL-1 β at dose of 1000 pg was able to significantly increase mechanical and cold sensitivity in mice after 2 and 3 hours, as seen in Figure 2. Oral administration of phellandrene at dose of 10 mg/kg significantly reversed sensitivity when compared to control and 61 \pm 12% (*p<0,05), respectively.

However, in figure 2 C and D, we found that phellandrene when administered orally was not able to decrease cold sensitivity after IL-1 β -intrathecal injection after 2 and 3 hours, when compared to control group.

DISCUSSION

The results of the present investigation have demonstrated that α -phellandrene produces anti-hyperalgesic activity in gp120-induced pain behavior model and it is also able to modulate the response of IL-1 β . Mechanical and cold sensitivity was evaluated and oral administration of 10mg/kg of phellandrene reversed hyperalgesia after 2 and 3 hours after the intrathecal injection of gp120, when compared to control group.

Envelope protein gp120 is responsible for the entry of HIV into cells together with CD4 glycoprotein and chemokine receptors on cell surface. In the Central Nervous System (CNS), gp120 interaction with CXCR4 receptors and the consequent release of cytokines and astrocytes activation may contribute directly to HIV-associated neurological disorders (13). In 90% of patients with infectious diseases, such as AIDS, presents chronic pain, which is perceived to arise not only from de injury tissue but also from healthy sites and it happens possibly through the activation of glial cells in spinal cord and the consequent release of cytokines, leading to exaggerated pain states (15).

Animal models have demonstrated gp120 can produce pain hypersensitivity when directly injected in the hindpaws (16), in sciatic nerve (13) or intrathecally (10,11). Yuan et al.

(2014) (17), have observed that gp120 injected intrathecally induces progressive degeneration of nerves fibers in the plantar hind paws of mice and that this animal model recapitulates pain-positive HIV-1 patients by causing peripheral axons degeneration and upregulation of IL-1 β and TNF- α in the spinal cord root. The spinal cellular basis of chronic pain proposed was central sensitization, through several signaling pathways, as JNK, ERK, and CaMKII signaling.

Glial cells activation and consequent release of pro-inflammatory cytokines, including IL-1 β in the spinal dorsal horn are involved in many types of pathological conditions, including peripheral nerve injury. In neuropathic rats, endogenous IL-1 β regulates non-NMDA glutamate receptor activities in postsynaptic neurons and also glutamate release through coupling with presynaptic NMDA receptors (17). Intrathecal administration of IL-1 β can alter wide-dynamic range neurons response even when damage to peripheral tissues or primary afferent neurons is absent. It may also facilitate A-fibre, and C-fibre responses, suggesting centrally mediated enhancement of nociceptive processing (18).

The frequency of withdrawal responses to both innocuous and noxious mechanical stimuli after intrathecal injection of IL-1 β was previous demonstrated, which indicates its capacity to develop mechanical allodynia and hyperalgesia and direct influence in central pain mechanisms, even in the absence of inflammation or injury (18). Our results have demonstrated IL-1 β injected intrathecally is able to produce significant increase in the frequency of withdrawal responses indicative of allodynia and hyperalgesia after mechanical and cold stimulus and that oral administration of α -phellandrene increased mechanical and cold sensitivity after 2 hours, but only mechanical sensitivity after 3 hours of the injections, when compared to control group.

Antiinflammatory and antinociceptive activities have been described as well. Siqueira et al., (2016) (4), have observed phellandrene was capable to modulate neutrophil migration, adhesion and rolling of leukocytes and also inhibited the production of inflammatory cytokines. Lima et al., (2012) (7), have described its antinociceptive effects in models of inflammatory and acute nociception, besides mechanical hypernociception, and that these results are related to possible mechanisms involving the K⁺ opioid pathways, ATP channels, the glutamatergic system and an interaction of the monoterpenes with the muscarinic receptors and the adrenergic system. These results corroborate with our findings of the antihyperalgesic activity of phellandrene and its capacity to inhibit IL-1 β actions in CNS, with possible mechanism of action related to the inhibition of inflammatory cytokines.

In conclusion, the present results demonstrate that both gp120 and IL-1 β when administered intrathecally in mice may cause significant increase in cold and mechanical sensitivity. Phellandrene when administered orally is able to modulate this response by decreasing hyperalgesia induced by intrathecal injections of gp120 and IL-1 β , demonstrating its antinociceptive action.

Acknowledgments

The authors would like to thank UFGD - Universidade Federal da Grande Dourados, CNPq for providing financial support (564506/2010-9) and CAPES for providing a visiting professor fellowship in science program without borders for Edward Ziff (137/2012).

REFERENCES

1. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem Toxicol.* 2008; 46(2):446-475.

2. Xu J, Ai Y, Wang J, Xu J, Zhang Y, Yang D. Converting S-limonene synthase to pinene or phellandrene synthases reveals the plasticity of the active site. *Phytochem.* 2017; 137:34-41.
3. Gonzalez-Burgos E, Gomez-Serranillos MP. Terpene Compounds in Nature: A Review of Their Potential Antioxidant Activity. *Curr Med Chem.* 2012; 19(31):5319-5341.
4. Siqueira HD, Neto BS, Sousa DP, Gomes BS, da Silva FV, Cunha FV, Wanderley CW, Pinheiro G, Cândido AG, Wong DV, Ribeiro RA, Lima-Júnior RC, Oliveira FA. α -Phellandrene, a cyclic monoterpene, attenuates inflammatory response through neutrophil migration inhibition and mast cell degranulation. *Life Sci.* 2016; 160:27-33.
5. Formagio ASN, Iriguchi EKK, Roveda LM, Vieira MC, Cardoso CAL, Zarate NAH, et al. Chemical composition and anti-inflammatory activity of the essential oil of *Schinus terebinthifolius Raddi* (anacardiaceae) fruits. *Lat Am J Pharm.* 2011; 30:1555-9.
6. Lima NG, De Sousa DP, Pimenta FC, Alves MF, De Souza FS, Macedo RO, et al. Anxiolytic-like activity and GC-MS analysis of (R)-(+)-limonene fragrance, a natural compound found in foods and plants. *Pharmacol Biochem Behav* 2013; 103(3):450-4.
7. Lima DF, Brandao MS, Moura JB, Leitao JM, Carvalho FA, Miura LM, et al. Antinociceptive activity of the monoterpene alpha-phellandrene in rodents: possible mechanisms of action. *J Pharm Pharmacol* 2012; 64(2):283-92.
8. Piccinelli AC, Santos JA, Konkiewitz EC, Oesterreich SA, Formagio ASN, Croda J, Ziff EB, Kassuya CAL. Antihyperalgesic and antidepressive actions of (R)-(+)-limonene, α -phellandrene, and essential oil from *Schinus terebinthifolius* fruits in a neuropathic pain model, *Nutr Neurosci.* 2015; 18:217-224.
9. Huang W, Zheng W, Liu S, Zeng W, Levitt RC, Candiotti KA, Lubarsky DA, Hao S. HSV-mediated p55TNFSR reduces neuropathic pain induced by HIV gp120 in rats through CXCR4 activity. *Gene Ther.* 2014, 21(3):328-36.
10. Milligan ED, O'Connor KA, Nguyen KT, Armstrong CB, Twining C, Gaykema RP, Holguin A, Martin D, Maier SF, Watkins LR. Intrathecal HIV-1 envelope glycoprotein gp120 induces enhanced pain states mediated by spinal cord proinflammatory cytokines, *J Neurosci.* 2001; 21(8):2808-2819.
11. Piccinelli AC, Morato PN, Dos Santos Barbosa M, Croda J, Sampson J, Kong X, Konkiewitz EC, Ziff EB, Amaya-Farfan J, Kassuya CA. Limonene reduces hyperalgesia induced by gp120 and cytokines by modulation of IL-1 β and protein expression in spinal cord of mice. *Life Sci.* 2017; 174:28-34.
12. Murai N, Tsukamoto M, Tamura S, Aoki T, Matsuoka N. Antinociceptive effects of AS1069562, the (+)-isomer of indeloxazine, on spinal hypersensitivity induced by intrathecal injection of prostaglandin in mice: Comparison with duloxetine and amitriptyline. *Eur J Pharmacol.* 2014; 733:54-61.
13. Zheng W, Ouyang H, Zheng X, Liu S, Mata M, Fink DJ, Hao S. Glial TNF α in the spinal cord regulates neuropathic pain induced by HIV gp120 application in rats. *Mol Pain.* 2011; 7: 40.
14. Vachon P, Millecamps M, Low L, Thompsosn SJ, Pailleux F, Beaudry F, Bushnell CM, Stone LS. Alleviation of chronic neuropathic pain by environmental enrichment in mice well after the establishment of chronic pain. *Behav Brain Funct.* 2013; 9:22.
15. Watkins LR, Milligan ED, Maier, SF. Glial activation: a driving force for pathological pain. *Trends Neurosci.* 2001; 24(8):450-455.
16. Oh SB, Tran PB, Gillard SE, Hurley RW, Hammond DL, Miller RJ. Chemokines and glycoprotein120 produce pain hypersensitivity by directly exciting primary nociceptive neurons. *J Neurosci.* 2001; 21:5027-5035.

17. Yuan SB, Shi Y, Chen J, Zhou X, Li G, Gelman BB, Lisinicchia JG, Carlton SM, Ferguson MR, Tan A, Sarna SK, Tang SJ. Gp120 in the pathogenesis of human immunodeficiency virus-associated pain. *Ann Neurol.* 2014; 75(6):837-50.
18. Reeve AJ, Patel S, Fox A, Walker K, Urban L. Intrathecally administered endotoxin or cytokines produce allodynia, hyperalgesia and changes in spinal cord neuronal responses to nociceptive stimuli in the rat. *Eur J Pain.* 2000; 4(3):247-57.
19. Işcan G, Kirimer N, Demirci F, Demirci B, Noma Y, Baser KHC. Biotransformation of (-)-(R)- α -Phellandrene: Antimicrobial Activity of Its Major Metabolite. *Chem Biodivers.* 2012; 9(8):1525-1532.
20. Guimarães AG, Quintans JS, Quintans LJ. Monoterpenes with analgesic activity--a systematic review. *Phytother Res.* 2013; 27(1):1-15.
21. Hsieh SL, Li YC, Chang WC, Chung JG, Hsieh LC, Wu CC. Induction of necrosis in human liver tumor cells by α -phellandrene. *Nutr Cancer.* 2014; 66(6):970-979.
22. Hsieh LC, Hsieh SL, Chen CT, Chung JG, Wang JJ, WU CC. Induction of α -phellandrene on autophagy in human liver tumor cells. *Am J Chin Med.* 2015; 43(1):121-136.
23. Lin JJ, Wu CC, Hsu SC, Weng SW, Ma YS, Huang YP, Lin JG, Chung JG. Alpha-phellandrene-induced DNA damage and affect DNA repair protein expression in WEHI-3 murine leukemia cells in vitro. *Environ Toxicol.* 2015; 30(11):1322-1330.

Legends to Figures

Figure 1 – (A and B) Effects of oral administration of phellandrene on the mechanical sensitivity test in mice after intrathecal injection of gp120. Animals received intrathecal injection of gp120 (300pg) or saline solution. Mechanical sensitivity was assessed at 2 and at 3 hours after the injections. (C and D) Effects of oral administration of phellandrene on cold hypersensitivity test in mice after intrathecal injection of gp120. Animals received intrathecal injection of gp120 (300pg) or saline solution. Cold hypersensitivity was assessed at 2 and 3 hours after injection. Statistical analyses were expressed as mean \pm SEM of 6 animals, with control compared with the treated group. * $P < 0.05$ or ** $P < 0.001$, one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test.

Figure 2 – (A and B) Effects of oral administration of phellandrene on the mechanical sensitivity test in mice after intrathecal injection of IL-1 β . Animals received intrathecal injection of IL-1 β (1000pg) or saline solution. Mechanical sensitivity was assessed at 2 and at 3 hours after the injections. (C and D) Effects of oral administration of phellandrene on cold hypersensitivity test in mice after intrathecal injection of IL-1 β . Animals received intrathecal injection of IL-1 β (1000pg) or saline solution. Cold hypersensitivity was assessed at 2 and 3

hours after injection. Statistical analyses were expressed as mean \pm SEM of 6 animals, with control compared with the treated group. * P <0.05 or ** P <0.001, one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test.

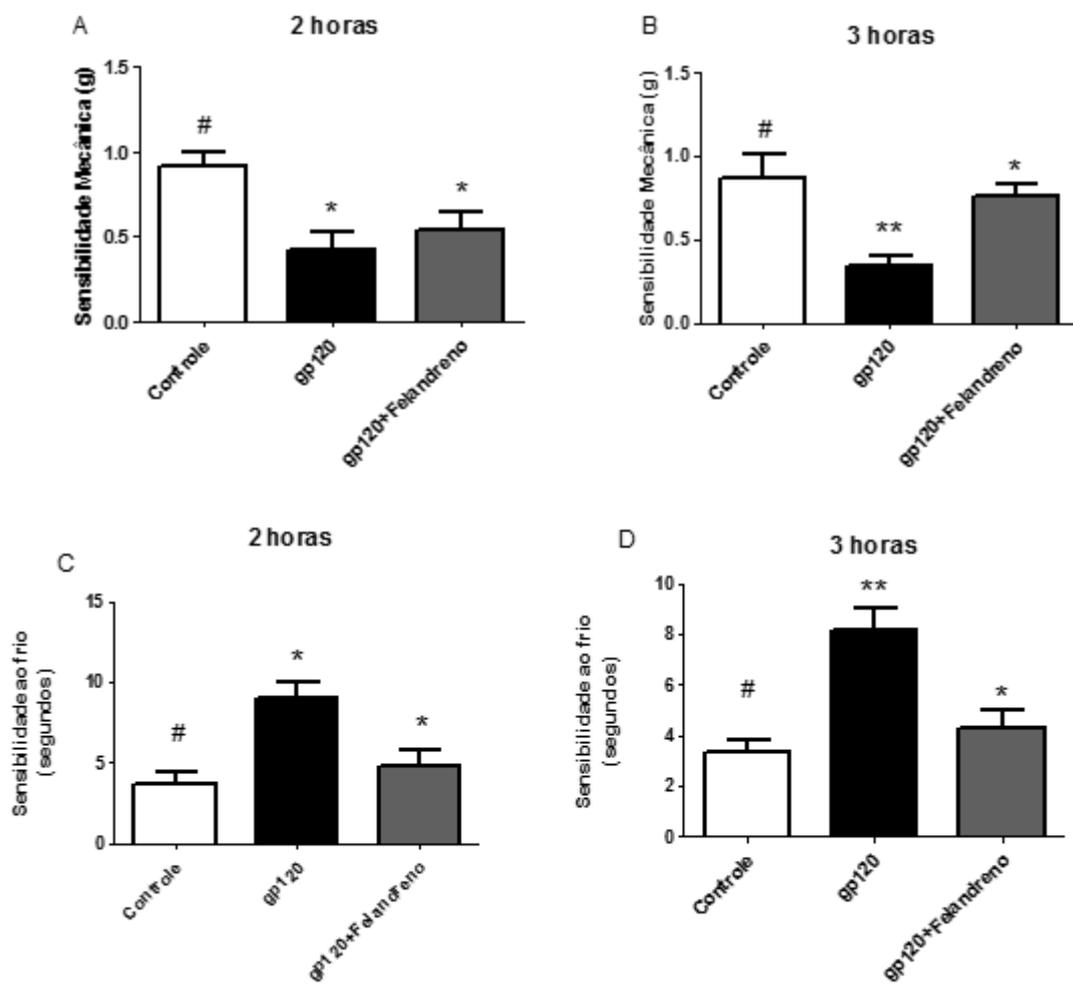


Figure 1- Piccinelli et al. 2017.

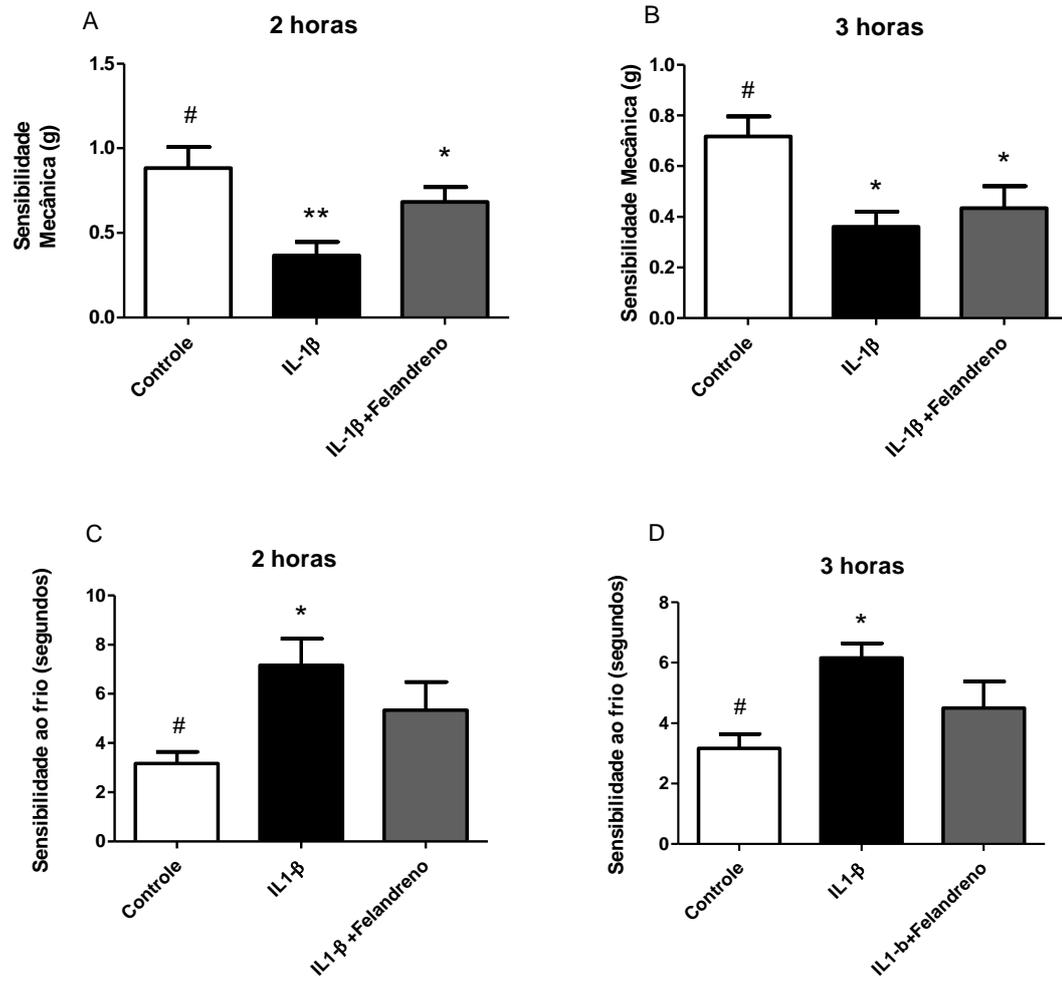


Figure 2- Piccinelli et al. 2017.

6 ANEXOS

Protocolos de padronização das técnicas de cirurgia de lesão do nervo ciático e injeção intratecal de gp120.

Aprovação do CEUA- Comitê de ética no uso de animais

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Procedimento Operacional Padrão

Cirurgia de lesão do Nervo Ciático



Dourados, Março de 2016

1-Materiais

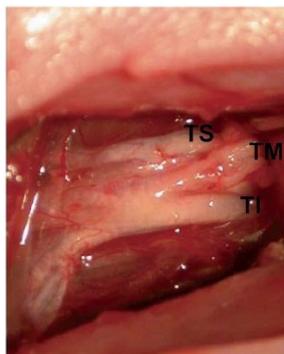
Procedimento	Material	Check
Preparação dos animais	Xilasina Quetamina Agulha Hipodérmica	
Cirurgia	Bisturi Tesouras e outros materiais cirúrgicos Solução salina Fio de sutura 5.0 ou 6.0	

2- Preparar os animais

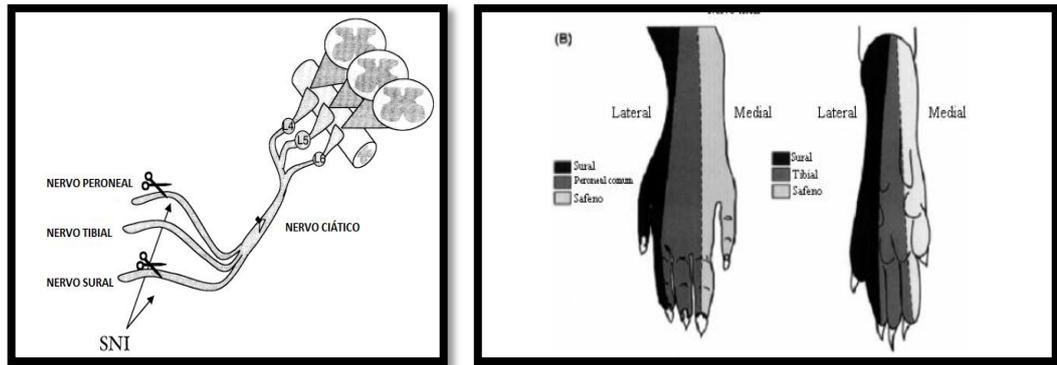
Os animais serão anestesiados com cetamina hidrocloreto (60mg/kg, i.p.) e xilasina (10mg/kg i.p.). Testar os estímulos musculares e ocular para ter certeza que a anestesia está completa.

3- Cirurgia

A incisão será feita no músculo do bíceps femoral (aproximadamente 2 dedos de distância da pata do animal) e o nervo ciático direito será exposto no nível da trifurcação dos nervos de sural, tibial e comum nervos peroneal (fibular).



Cada um dos nervos tibial e fibular comum será fortemente ligado por dois nós de quatro milímetros distante usando 6.0 de seda e, em seguida, será completamente cortada no meio, deixando o nervo sural intacto. Após o corte, o músculo e pele devem ser suturado por pontos separados. Importante que os fios de sutura não sejam absorvíveis internamente.



Após a cirurgia manter os animais aquecidos até que se recupere da anestesia.

4- Técnica Sutura em Pontos Simples

Segurar o porta-agulha na mão dominante e montar a agulha prendendo-a na junção do terço proximal com o terço médio em um ângulo de 90 graus.

- Na mão não dominante, segurar uma pinça com dente à maneira de uma caneta. Em seguida, everter, gentilmente, a borda da ferida sem comprimir demasiadamente o tecido.
- Com o movimento de pronação do punho, inserir a agulha na pele em um ângulo de 90 graus. Posteriormente, realizar a supinação do punho para transfixar a agulha em um trajeto curvilíneo através do músculo ou da derme e do tecido subcutâneo.
- Quando chegar ao centro da ferida, fixar a ponta da agulha com a pinça temporariamente, para montar a agulha no porta-agulha antes de completar a outra metade da ferida.
- Everter o bordo oposto da ferida e transfixar a agulha com o movimento de supinação do punho, iniciando nos planos mais profundos do centro da ferida até a exteriorização da agulha no músculo ou na pele.
- Puxar o fio de sutura, deixando 3 cm de cauda no orifício de entrada (ou mais se for inexperiente, pois no momento do nó, o manipulador pode puxar a cauda do fio de sutura se quiser).
- Confeccionar o nó de cirurgião, seguido por mais 2 nós simples. Puxar o nó para um lado da ferida, de modo que este não fique sobre os bordos colapsados. Isto impede que o nó seja incorporado ao coágulo que se forma durante a cicatrização.
- Cortar o fio com uma tesoura, deixando caudas de aproximadamente 0.3 cm.
- Não há regras quanto ao número de pontos necessários para um determinado comprimento deve-se colocar um número suficiente de pontos de modo que todas as aberturas nas margens da ferida sejam fechadas.

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Procedimento Operacional Padrão

Indução intratecal de hiperalgesia com gp120



Dourados, Novembro de 2016

1-Materiais

Seringa de Hamilton (Adaptada para injeção)

Anestesico Isoflurano

Vidro com tampa

2-5.2 Injeção intratecal

Os animais devem ser anestesiados com isoflurano com um vidro com tampa e algodão. Assim que o animal perde os sentidos é rapidamente retirado para que a injeção seja realizada.

A gp120 ou outra substância a ser injetada deverá estar preparada em uma microseringa de Hamilton (25 μ L) e injetada entre as vértebras L5 e L6 através da pele intacta. O volume injetado será de no máximo 5 μ L.

O importante é sentir o espaço entre as vertebrae em questão, pode-se erguer um pouco o animal para facilitar. Quando a agulha entra no local correto a cauda do animal sofre um pequeno espasmo, sinal que a injeção está no lugar correto.

3. Fotos do procedimento



