



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
CURSO DE ODONTOLOGIA

MYLENA SABÓIA COSTA

Apigenina reduz hipernocicepção inflamatória em camundongos

FORTALEZA

2019

MYLENA SABÓIA COSTA

Apigenina reduz hipernocicepção inflamatória em camundongos

Trabalho apresentado à banca examinadora da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do título de bacharel em Odontologia.

Orientadora: Prof.^a Dr^a Vilma de Lima.

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C874a Costa, Mylena Sabóia.
Apigenina reduz hipernocicepção inflamatória em camundongos / Mylena Sabóia Costa. – 2019.
30 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia,
Odontologia e Enfermagem, Curso de Odontologia, Fortaleza, 2019.

Orientação: Profa. Dra. Vilma Lima.

Coorientação: Profa. Dra. Iracema Matos de Melo.

1. Apigenina . 2. Dor. 3. Nocicepção. I. Título.

CDD 617.6

MYLENA SABÓIA COSTA

Apigenina reduz hipernocicepção inflamatória em camundongos

Trabalho apresentado à banca examinadora da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do título de bacharel em Odontologia.

Orientadora: Prof.^a Dr^a Vilma de Lima.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr^a Vilma de Lima (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dr^a Iracema Matos de Melo
Universidade Federal do Ceará (UFC-Sobral)

Samia Jéssica da Silva Tavares
Cirurgiã-Dentista

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser tão bom comigo e pelo seu infinito amor. Minha gratidão é imensurável e indescritível.

Aos meus pais, Marcos Aurélio e Regina, que sempre estiveram presentes, me apoiaram e incentivaram a buscar meus ideais.

Ao meu irmão Antônio Neto que sempre me motivou, e por todo carinho e amor.

Ao meu namorado Rômulo Coutinho, por todo amor, amizade, compreensão, respeito e incentivo. Obrigada por estar ao meu lado durante esta jornada.

A minha orientadora Vilma Lima, pela oportunidade de fazer parte do laboratório e por todos os ensinamentos, que foram essenciais para a construção deste trabalho.

A minha querida coorientadora Iracema Melo, obrigada por todo conhecimento transmitido, dedicação, pelas oportunidades e por sempre acreditar e confiar em mim. Obrigada por toda paciência ao longo da construção desse trabalho. Saiba que para mim você é inspiração e exemplo.

A minha turma 2019.1, obrigada pela convivência diária. Em especial a minha dupla Fernanda Damasceno, por todo companheirismo e por ter tornado essa caminhada mais leve.

Aos membros do Laboratório de Osteofarmacologia, por todo companheirismo, amizade e ajuda durante os dois anos de convivência.

Aos membros do projeto Operation Smille College Association (OSCA), companheiros do PIBIC e a todos que, de alguma forma, fizeram parte da minha formação. Muito obrigada!

APRESENTAÇÃO

Este trabalho de conclusão de curso (TCC) está de acordo com o formato alternativo para TCC's e encontra-se sob o formato de artigo científico, seguindo as normas da Revista Brasileira de Farmacologia-RBF.

RESUMO

Apigenina (APG), um flavonoide encontrado abundantemente na camomila, possui efeitos ansiolíticos e anti-inflamatórios. Contudo, alguns dos seus mecanismos não são completamente compreendidos. Avaliou-se a atividade antinociceptiva da apigenina em animais. Foram utilizados 88 camundongos Swiss distribuídos em grupos não tratados (NT) e tratados com diclofenaco (DFC 10 mg/kg), morfina (5 mg/kg) ou APG (1, 3 e 9 mg/kg). A hipernocicepção foi avaliada nas fases neurogênica e inflamatória do teste de formalina, pelo teste Von Frey, amostras de tecidos plantares dos animais foram coletadas e analisadas por histologia, e na placa quente. Apenas a dose de APG (3 mg/kg) reduziu o tempo de lambertura da pata dos animais na fase inflamatória do teste da formalina, de maneira similar ao DCF ou morfina, o que é consistente com a redução da alodinia mecânica observada no teste de Von Frey nas 4^a e 24^a h após sensibilização por carragenina intraplantar. Quanto à fase inicial do teste de formalina, a APG, em nenhuma das doses utilizadas, alterou a nocicepção neurogênica, condizente com a ausência de efeitos antinociceptivos da APG no teste de placa quente, em comparação à morfina. Assim, sugere-se que a APG reduziu a hipernocicepção inflamatória em camundongos, independente de efeitos centrais.

Palavras-chave: Apigenina, Dor, Nocicepção.

ABSTRACT

Apigenin (APG), a flavonoid abundantly found in chamomile, has anxiolytic and anti-inflammatory effects. However, its mechanisms are not fully understood. The antinociceptive activity of apigenin was evaluated. In animals eighty eight Swiss mice distributed in untreated (NT) and treated with diclofenac (DFC 10 mg / kg), morphine (5 mg / kg) or APG (1, 3 and 9 mg / kg) were used. The hypernociception was evaluated in the neurogenic and inflammatory phases of the formalin test, by the Von Frey test, plantar tissue samples from the animals were collected and analyzed by histology, and in the hot plate. Only the intermediate dose of APG (3 mg / kg) reduced the paw licking time of the animals in the inflammatory phase of the formalin test, similar to the DCF or morphine, which is consistent with the reduction of mechanical allodynia observed in the test of Von Frey on the 4 fourth and 24 fourth hour after intraplantar carrageenan sensitization. As for the initial phase of the formalin test, APG, at any of the doses used, altered the neurogenic nociception, consistent with the absence of antinociceptive effects of APG in the hot plate test, compared to morphine. Thus, it is suggested that APG reduced inflammatory hypernociception in mice independently of central effects.

Key words: Apigenin, Causalgia, Pain Measurement.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	9
2. Metodologia.....	12
2.1. Seleção dos animais.....	12
2.2. Apigenina e outros fármacos.....	12
2.3. Protocolos experimentais de nocicepção e inflamação.....	13
2.3.1. Teste de formalina.....	13
2.3.2. Teste de Von Frey.....	13
2.3.3. Análise histopatológica.....	14
2.3.4. Teste de placa quente.....	15
2.3.5. Análise estatística.....	15
2.3.6. Aspectos éticos.....	16
3. Resultados e Discussão.....	16
4. Conclusão.....	24
5. Referências Bibliográficas.....	25
6. Anexos.....	30
Anexo A - Aprovação da comissão de ética no uso de animais.....	30

1 INTRODUÇÃO

O comitê de taxonomia da Associação Internacional para o Estudo da Dor (International Association for the Study of Pain, IASP) nos Estados Unidos em sua última atualização manteve o conceito de dor como “Uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal dano” (IASP, 2016).

A dor comumente entendida é uma experiência complexa que envolve não só a transdução de estímulos nocivos de origens ambientais ou orgânicas, mas também o processamento cognitivo e emocional pelo cérebro (Basbaun *et al.*, 2009). Assim, os termos alodinia e hiperalgesia caracterizam-se respectivamente por dor causada por um estímulo que normalmente não provoca dor, e hiperalgesia caracteriza-se pelo aumento da sensibilidade à dor causada por um estímulo que normalmente provoca dor (IASP, 2014-2015), enquanto que, conforme o conceito de Sherrington, 1906, dada a existência de nociceptores, receptores relacionados a estímulos nocivos, em neurônios sensoriais primários ativados e sensibilizados por estímulos nocivos, o termo hipernocicepção é o melhor que se adequa aos estudos de nocicepção com animais (Cunha *et al.*, 2004).

A nocicepção aguda ocorre quando estímulos intensos e nocivos ativam os neurônios sensoriais especializados das fibras nervosas A δ e C. Em seguida, o potencial de ação é transferido via medula espinhal, que envia sinais de alerta para o cérebro. Os nociceptores associados às fibras A δ são especializados na transmissão da dor aguda e bem localizada, enquanto que as fibras C estão associadas às terminações nociceptivas polimodais e transmitem a dor profunda, difusa e em queimação (Guillot *et al.*, 2012; Julius & Basbaun, 2001).

Na maioria dos casos, a estimulação das terminações nociceptivas na periferia tem origem química. O excesso de estímulos mecânicos ou térmicos pode causar dor aguda, porém a persistência de tal dor, depois de removido o estímulo causal, ou a dor decorrente de alterações

inflamatórias ou isquêmicas nos tecidos, em geral, refletem alteração do ambiente químico dos neurônios aferentes de dor (Rang *et al.*, 2016).

A dor inflamatória é devida à sensibilização de nociceptores de neurônios sensoriais, o que provoca aumento na sensação de dor (hiperalgesia). Esta sensibilização ocorre pela ação direta de mediadores inflamatórios que são liberados após a lesão tecidual, tais como prostaglandinas (por exemplo, PGI₂, PGE₂) e aminas simpáticas (por exemplo, epinefrina, dopamina) que agem sobre receptores presentes na membrana dos nociceptores para desencadarem a ativação de vias de segundos mensageiros (Borghi *et al.*, 2013).

Tem sido demonstrado que outros mediadores da inflamação participam da modulação da nocicepção. Sabe-se que em tecido lesionado, mediadores como a bradicinina estimulam a liberação do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), o qual estimula a liberação de interleucinas 1 beta (IL-1 β) e IL-6. Estas últimas promovem a liberação das enzimas ciclo-oxigenases, as quais convertem o ácido araquidônico de membranas celulares em prostaglandinas. Tais prostanoides exercem papel central na inflamação e na dor (Chen *et al.*, 2013), tanto o é que os inibidores de ciclo-oxigenases, os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), são os fármacos mais visados para o tratamento da dor inflamatória.

No entanto, os AINES, apesar de promover a analgesia e a redução da resposta exacerbada do hospedeiro, esses fármacos são responsáveis pelo surgimento de efeitos colaterais importantes, tais como as úlceras gastrintestinais (Chen *et al.*, 2013), e as complicações e riscos cardiovasculares (Spektor & Fuster, 2005; Davies & Jamali, 2004). Nesse contexto, abordagens farmacológicas que não atuem diretamente na síntese das ciclo-oxigenases podem vir a ser interessantes sob o ponto de vista risco-benefícios. Grande atenção tem sido devotada a agentes dietéticos derivados de plantas como fonte de moléculas com propriedades terapêuticas diversas. Dentre estes, destaca-se a apigenina.

A apigenina (APG) é um composto biflavonóide, que são considerados pigmentos naturais que desempenham um papel fundamental na proteção do vegetal, especificamente uma flavona aglicona de diversos glicosídeos, mais conhecida como 4',5,7-trihidroxiflavona (Svehlíková *et al.*, 2004), encontrada em ampla variedade de plantas e herbáceas. A APG é consumida principalmente a partir de uma dieta rica em vegetais e frutas (Cardenas *et al.*, 2016; Márquez-Flores *et al.*, 2016), sendo sua fonte mais abundante o chá de camomila (Avallone *et al.*, 2000).

A APG tem demonstrado possuir muitas propriedades biológicas, as quais incluem efeitos ansiolíticos de maneira dose-dependente (Salehi *et al.*, 2019), efeitos antivirais, antibacterianos, antioxidantes, antiapoptose, bem como um potente efeito anticâncer com uma característica bastante peculiar por apresentar alta seletividade para células malignas e baixa atividade sobre as células normais (Siddique *et al.*, 2008). Adicionalmente, diversos estudos mostram evidências de que a APG possui propriedades analgésicas (El Shoubaky *et al.*, 2016; Pinheiro *et al.*, 2012) envolvendo os sistemas opioides e colinérgicos (Pinheiro *et al.*, 2012). Mais recentemente, Zhang e colaboradores demonstraram que a APG protegeu a barreira hematoencefálica por inibir a via inflamatória em animais com hemorragia subaracnoide (Zhang *et al.*, 2015).

De maneira geral, a APG tem recebido atenção por seus efeitos anti-inflamatórios (Márquez-Flores *et al.*, 2016) e mecanismos imunorregulatórios (Cardenas *et al.*, 2016). Estudos têm reportado que a APG, além de demonstrar capacidade de induzir apoptose em neutrófilos, é capaz de inibir NF- κ B, reduzindo citocinas pró- inflamatórias e óxido nítrico (Cardenas *et al.*, 2016; Duarte *et al.*, 2013), o que leva a crer que a APG possa ser efetiva em melhorar condições clínicas que envolvam esses mediadores químicos, como a dor inflamatória.

Nesse contexto, foi proposto avaliar a atividade antinociceptiva dessa substância em modelos clássicos de avaliação de dor, pois diante dos diversos efeitos gastrointestinais e cardiovasculares comuns aos AINEs, é importante descobrir novas abordagens terapêuticas que

apresentem propriedades analgésicas e/ou anti-inflamatórias com o mínimo de danos e se possível baixo custo.

2 METODOLOGIA

2.1 Animais

Foram utilizados 88 camundongos Swiss machos, com massa corpórea entre 20-24 gramas. Esses animais foram procedentes do Biotério Central do Campus do Pici-UFC, transferidos para o Biotério Setorial do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM; Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará-UFC), e mantidos em gaiolas apropriadas, em um ambiente com temperatura controlada (22-25 °C), exaustão de ar, ciclo de 12 h claro/escuro cada, com livre acesso a água potável e ração padrão comercial, respeitando o número máximo de 8 animais por gaiola pequena, própria para pequenos animais como camundongos (CEUA-UFC: 81/2016).

2.2 Apigenina e outros fármacos

A apigenina (APG), 4',5,7-Trihidroxiflavona, 5,7-Dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4-benzopirona, apresentada como um sólido amarelo cristalino, foi adquirida junto à Sigma-Aldrich, com massa molar de 270,24 g/mol, número CAS 520-36-5, código do produto 10798 e com pureza acima de 95% (HPLC). Para a diluição da APG foi utilizado 4% de polissorbato 80 (Tween 80®; TW80).

Para os controles positivos nos ensaios de dor foram utilizados morfina (Dimorf®, ampola; Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira, SP, Brasil) e diclofenaco de sódio (Voltarem®, comprimido; Novartis, São Paulo, SP, Brasil), os quais foram diluídos em solução salina NaCl a 0,9%. A carragenina lâmbda foi adquirida pela SigmaAldrich, entregue pela filial Brasil.

Para eutanásia dos animais, foi utilizada a combinação de quetamina (Cetamin, Syntec®, Hortolândia, SP, Brasil) com cloridrato de xilazina (Xilazin, Syntec®, Hortolândia, SP, Brasil) em sobredose anestésica. O formol utilizado foi obtido da Dinâmica (Dinâmica, Diadema, SP, Brasil).

2.3 Protocolos experimentais de nociceção e inflamação

2.3.1 Teste da formalina

O teste da formalina foi realizado conforme descrito anteriormente (Hunskaar & Hole, 1987) utilizando 48 camundongos distribuídos em 6 grupos (n=8/grupo), os quais receberam por gavagem soluções de TW80 (10 µl/kg), definido como grupo não tratado (NT), apigenina (APG 1, 3 e 9 mg/kg) (Hassan *et al.*, 2017), morfina (5 mg/kg) ou diclofenaco (10 mg/kg), respectivamente. Após 30 min dos tratamentos, os animais receberam injeções de solução de formalina a 2,5%, administradas por via subcutânea intraplantar nas patas direitas. Para a análise da nociceção foi considerada a quantidade de tempo que o animal dispendeu lambendo suas patas desafiadas durante os primeiros 5 min (Fase 1, neurogênica) e entre 15 e 30 min seguintes (Fase 2, inflamatória). Os dados foram apresentados como média (Me) ± erro padrão da média do tempo que os animais dispenderam lambendo as suas patas.

2.3.2 Teste de Von Frey

A hipernociceção foi estudada pelo método de Von Frey, o qual avalia a sensibilidade tecidual a estímulo mecânico descrito por Frey, 1896, e modificado por Cunha *et al.*, 2004, para uma versão eletrônica em camundongos. Portanto, foi utilizado um analgesímetro digital (Insight© - Equipamentos, Pesquisa e Ensino; Ribeirão Preto, SP, Brasil) composto por um transdutor de pressão conectado a um contador digital, cuja intensidade de pressão é expressa em gramas força (gf). O contato do transdutor de pressão à pata é realizado através de uma ponteira descartável de

polipropileno (0,5 mm de diâmetro). Os animais foram colocados em caixas de acrílico (12x10x17 cm) durante 15 minutos para adaptação ao ambiente. O assoalho da caixa é constituído por uma rede metálica não maleável, sob o qual foi colocado um espelho para uma melhor visualização das patas dos animais sobre essa rede.

As alterações nos limiares nociceptivos foram avaliadas exercendo-se uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata do animal até a produção de uma resposta caracterizada como sacudida (“flinches”) da pata estimulada. Os estímulos são repetidos, em geral, até o animal apresentar três medidas similares com uma clara resposta de “flinch” após a retirada da pata. A intensidade de hipernocicepção foi quantificada como a variação na pressão obtida: [média de três valores expressos em gramas (força) observada antes do procedimento experimental (0 hora)] subtraída da [média de três valores em gramas (força) após a administração dos estímulos], que variam de acordo com o experimento (Jensen *et al.*, 1986).

A resposta comportamental do animal ao aparelho, isto é, o limiar nociceptivo, foi estudado em 16 animais alocados em 2 grupos de 8 camundongos cada, os quais foram avaliados antes (resposta basal) e após receberem por gavagem solução de Tween 80 (TW80 10 µl/kg), grupo NT ou APG 3 mg/kg. Após 30 min da administração de TW80 e APG foram aplicados o estímulo carragenina na pata direita (300 µg/intraplantar) nos animais de cada grupo, e reavaliados após 30 min, 1, 2 e 3 h e 1 dia. Os dados foram apresentados como intensidade de hipernocicepção que corresponde à variação de limiar de retirada da pata em gramas (Moller *et al.*, 1998).

2.3.3 Análise histopatológica

Para tal análise, os animais submetidos ao teste do Von Frey tiveram amostras de seus tecidos plantares removidas após a eutanásia. O tecido plantar da pata esquerda dos animais que receberam solução de Tween 80 (TW80 10 µl/kg) também foi removido e analisado como tecido normal. As amostras foram fixadas em solução tamponada de formaldeído a 10% durante 24 horas e

subsequentemente processadas em parafina para cortes seriados (4 μm) em lâminas e coradas por hematoxilina e eosina. Foi avaliada a intensidade do infiltrado inflamatório na região da derme e realizada uma categorização em escores que variaram de 0 a 3: escore 0, indicando infiltrado inflamatório leve; escore 1, indicando infiltrado inflamatório de leve a moderado; escore 2, indicando infiltrado inflamatório moderado; e escore 3, indicando infiltrado inflamatório intenso. As análises foram realizadas por um único examinador experiente e de forma cega, em um aumento de 400x.

2.3.4 Teste da placa quente

O teste da placa quente foi realizado conforme Eddy & Leimbach, 1953, descrito para a avaliação do efeito analgésico central de agentes farmacológicos. Cada camundongo foi colocado duas vezes sobre uma placa quente (55 ± 1 °C), separado com um intervalo de 30 minutos. O primeiro “trial” familiarizou o animal ao procedimento, e o segundo serviu como controle do tempo de reação como saltar ou lambear a pata. Os animais que mostraram um tempo de reação maior que 10 s foram dispensados do estudo. Imediatamente após o segundo “trial” (tempo de reação controle), 24 camundongos foram distribuídos em 3 grupos de 8 camundongos cada: Tween 80 (TW80 10 $\mu\text{l/kg}$) grupo NT, APG 3 mg/kg), morfina (5 mg/kg) ou diclofenaco (10 mg/kg). O tempo de reação foi mensurado imediatamente antes (tempo zero), e após 30, 60, 90, 120 e 180 min após administração por gavagem de cada um dos tratamentos ou veículo, com um tempo limite sobre a placa de 40 s. Os dados foram apresentados como média (Me) \pm erro padrão da média do tempo de reação dos animais sobre a placa em segundos.

2.3.5 Análise estatística

Os dados paramétricos estão apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Na comparação entre os grupos foi utilizada Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni ou o Test t de Student. Os dados não paramétricos estão apresentados como mediana

seguida de seus valores extremos e para análise entre os grupos foi utilizado Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Em todas as situações foi adotado o nível de significância $p < 0,05$. Para as análises foi utilizado o software GraphPad Prism 6, licenciado para Mac (San Diego, CA, USA).

2.3.6 Aspectos éticos

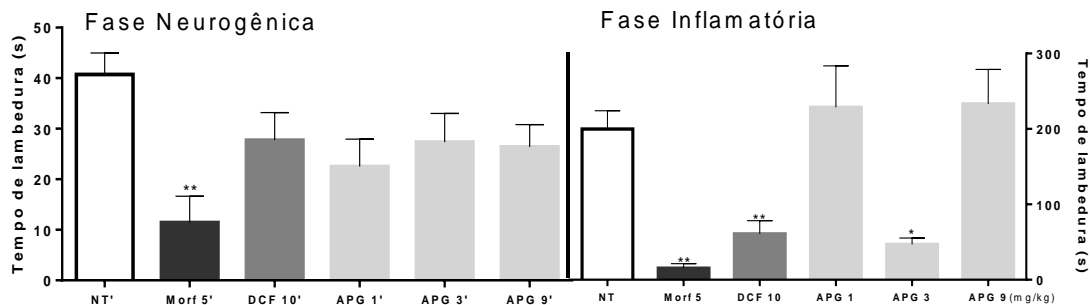
Todos os protocolos abordados foram previamente submetidos e aprovados pelo Comissão de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará, sob número 81/2016 (Anexo A). Os pesquisadores envolvidos se esforçaram em reduzir ao mínimo o número de animais utilizados, bem como o sofrimento dos mesmos de acordo com as orientações previstas na Lei Arouca 11.794/2008 e suas resoluções normativas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A administração de formalina na pata dos animais induziu uma resposta nociceptiva naqueles que não receberam tratamento, determinada durante os primeiros 5 min (Fase neurogênica) e também durante 15-30 min finais (Fase inflamatória), caracterizada pelo tempo de lambertura da pata dispendido pelos animais. Durante os primeiros 5 min, a administração de morfina (5 mg/kg) reduziu de forma significante esse tempo de lambertura da pata no teste da formalina em 73,1%, quando comparado ao grupo não tratado. O tratamento com diclofenaco (10 mg/kg) e as diferentes doses de apigenina não demonstraram diferença significante em relação ao grupo não tratado (Figura 1).

Na fase inflamatória, morfina (5 mg/kg) e diclofenaco (10 mg/kg) reduziram ($p < 0,05$) esse tempo em 91,3% e 65,9% respectivamente. (Figura 1). O tratamento com APG na dose de 3 mg/kg-gavagem, 30 min antes da indução do estímulo inflamatório com formalina a 2,5%, reduziu ($p < 0,05$) o tempo de lambertura da pata em 78,1% em relação ao grupo não tratado (Figura 1). As doses de APG 1 e 9 mg/kg não demonstraram diferença significante em relação ao grupo não tratado em nenhuma das fases.

Figura 1: Efeito do tratamento com apigenina no tempo de lambadura da pata em camundongos no teste da formalina.



Os animais foram tratados com morfina (Morf 5 mg/kg), diclofenaco (DCF 10 mg/kg), apigenina (APG) nas doses de 1,3 e 9 mg/kg, respectivamente, administrados por gavagem ou não receberam tratamento (NT). Após 30 min dos tratamentos, os animais receberam injeções de solução de formalina a 2,5%, administradas por via subcutânea intraplantar nas patas direitas. Os dados estão apresentados como Média ± EPM, de 8 animais por grupo, da quantidade de tempo que o animal passou lambendo suas patas desafiadas durante os primeiros 5 min (Fase A, neurogênica) e entre 15 e 30 min seguintes (Fase B, inflamatória). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em comparação ao NT (ANOVA, Bonferroni).

A resposta nociceptiva induzida por formalina em camundongos é um dos modelos mais comuns de inflamação aguda e acredita-se ser um evento bifásico. A fase inicial é de curta duração e inicia imediatamente após injeção, nos primeiros 5 minutos (fase neurogênica), sendo caracterizada pela ativação da fibra C devido a estímulos periféricos. A fase final após a injeção de formalina, entre 15 e 30 min (fase inflamatória), é um período mais longo e persistente causado por inflamação tecidual local e também por alterações funcionais no corno dorsal da medula espinal (Gorzalczany *et al.*, 2011).

O componente inflamatório da resposta nociceptiva, a segunda fase, começa após um período de silêncio de 10 a 15 minutos e é mediada pela liberação de mediadores, como bradicinina, histamina, aminas simpaticomiméticas, fator de necrose tumoral (TNF) e interleucinas. Além desses

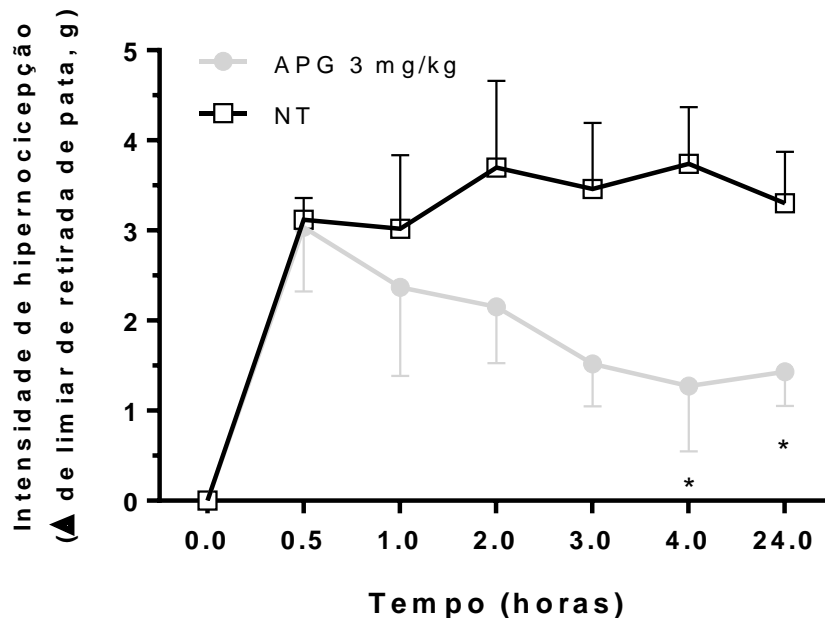
mediadores, os níveis locais de prostaglandinas são responsáveis pelo progresso da nocicepção e são o alvo de ação da maioria dos AINEs (Ferreira, 2013). No presente estudo, o efeito anti-inflamatório foi observado no tratamento com APG na dose de 3 mg/kg-gavagem, 30 min antes da indução do estímulo inflamatório pela formalina a 2,5%, entre os 15 e 30 min (Fase B, inflamatória), uma vez que proporcionou redução no tempo de lambertura da pata em 78,1% em relação ao grupo não tratado. Assim, acredita-se que APG reduziu a nocicepção na segunda fase devido a uma possível inibição da liberação de mediadores inflamatórios, como bradicinina, histamina, aminas simpaticomiméticas, TNF e interleucinas, liberados na pata dos camundongos ou diretamente bloqueando seus receptores.

A literatura tem relatado que a apigenina tem ação anti-inflamatória, por um impedimento de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β (Mohammad *et al.*, 2016), e redução significativa de maneira dose dependente dos níveis plasmáticos de IL-6, TNF- α e PGE₂ em comparação com grupos não tratados, além de um efeito antagônico na prostaglandina, bradicina, histamina e serotonina (El Shoubaky *et al.*, 2016). Desse modo sugere-se que a APG é um agente antinociceptivo nesse modelo de hipernocicepção inflamatória por inibir a produção de citocinas e prostaglandinas. Ademais, no que concerne à melhor dose de APG, o presente estudo está de acordo com o que foi evidenciado anteriormente por Mascaraque *et al.*, 2015 em um modelo de colite em ratos. Esses autores, utilizando APG nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg por via oral, mostraram que embora a dose de 10 mg/kg tenha sido equivalente à dose de 3 mg/kg na redução da colite, a dose de 3 mg/kg foi a mais indicada para redução de TNF- α , IL-6 e IL-1 β . Desse modo, esses autores demonstraram que a curva dose-resposta estabilizou-se em 3 mg/kg (Mascaraque *et al.*, 2015). Assim, selecionamos a dose de 3 mg/kg para as demais análises desse estudo e avaliação dos efeitos antinociceptivos da APG.

Considerando a carragenina como estímulo para hipernocicepção mecânica plantar, no modelo de Von Frey, evidenciamos que a administração de carragenina na pata dos camundongos

induziu uma resposta nociceptiva nos animais que não receberam tratamento, demonstrada pelo aumento da intensidade de hipernocicepção, calculada a partir da variação entre o limiar de nocicepção basal e após 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h e 24 h do estímulo com carragenina. A dose de APG (3 mg/kg) administrada 30 minutos antes da indução do estímulo inflamatório por carragenina, mostrou uma tendência à redução da hipernocicepção nas primeiras horas, atingindo redução significativa nas últimas horas, em que reduziu ($p < 0,05$) na 4ª h o limiar de hipernocicepção em 65,9% e na 24ª h em 56,7%, em relação ao grupo não tratado (Figura 2A).

Figura 2: Efeito do tratamento com apigenina sobre a hipernocicepção mecânica plantar induzida por carragenina.



Os animais receberam por gavagem apigenina (APG) na dose de 3 mg/kg ou não receberam tratamento (NT), e após 30 min foram aplicados os estímulos Carragenina (300 µg/intraplantar) em todos os animais de cada grupo. O teste nociceptivo (hipernocicepção mecânica plantar - Von-Frey Eletrônico) foi avaliado antes (resposta basal) e reavaliado após a administração do estímulo, 30 min, 1, 2, 3, 4 e 24 h. Os dados representam a variação da média do limiar de retirada da pata em gramas (intensidade da hipernocicepção) + EPM de um determinado momento em relação ao valor basal, de 8 animais por grupo. * $p < 0,05$ relação ao grupo NT (Teste t de Student).

Nossos dados mostraram que o tratamento com APG antes da indução do estímulo inflamatório pela carragenina foi capaz de reduzir a hipernocicepção mecânica plantar, isto é, reduziu a hipernocicepção inflamatória, corroborando, assim com a redução da hipernocicepção induzida por formalina.

Vivancos e colaboradores (2004) demonstraram que o Von Frey Eletrônico é uma ferramenta útil para caracterização de novos mediadores nociceptivos e também para avaliar novas classes de analgésicos periféricos, sejam inibidores da enzima ciclo-oxigenase (COX) ou bloqueadores diretos do nociceptor em curso de hipernocicepção. Experimentalmente, foi demonstrado que a carragenina induz hipernocicepção mecânica em ratos por ativar uma cascata sequencial de citocinas (CUNHA FQ *et al.*, 1992). Em camundongos, a cascata de citocinas começa com a liberação de TNF- α (atuando no receptor TNF-R1) e de queratinócito derivado de quimiocina (KC), que estimula a liberação de IL-1 β . Os mediadores finais dessa cascata são prostaglandinas liberadas pela IL-1 β e aminas simpáticas liberadas pelo KC, indicando que a liberação de mediadores primários responsáveis pela hipernocicepção é precedida por uma cascata de citocinas (CUNHA *et al.*, 2005). Desse modo, assim como no modelo de formalina, a hipernocicepção mecânica plantar induzida por carragenina também é resultante da liberação de citocinas, prostanoídes e aminas simpaticomiméticas.

De fato, a resposta nociceptiva induzido por carragenina é um processo bifásico, semelhante ao que ocorre no modelo da formalina. Na primeira fase, uma hora após a injeção de carragenina, ocorre a liberação de serotonina e histamina, enquanto que na segunda fase predominam bradicinina, proteases e prostaglandina, e são liberadas duas a três horas, após a injeção de carragenina (Ouachrif *et al.*, 2012). Nesse contexto, embora a APG tenha mostrado uma tendência de redução do limiar de hipernocicepção ao longo do tempo do experimento, a sua eficácia na quarta hora indica seu efeito antagônico na prostaglandina, bradicinina e proteases, em detrimento de histamina e serotonina. Além disso, um estudo de El Shoubaky *et al.*, 2016 mostrou que a injeção de carragenina em patas direitas de ratos induziu elevação nos níveis plasmáticos de IL-1 β ,

IL-6, TNF- α e PGE₂, enquanto a apigenina reduziu esses mediadores de forma significativa e dose-dependente comparado com o grupo não tratado. Desse modo, corroborando os achados do teste de formalina, sugere-se que a APG é um agente antinociceptivo nesse modelo de inflamação por inibir a produção de citocinas e prostaglandinas.

A fim de confirmar a relação da atividade anti-inflamatória da APG como possível causa de seu efeito antinociceptivo demonstrado no presente estudo, o tecido plantar dos animais submetidos ao teste de hipernocicepção mecânica plantar induzido por carragenina foi avaliado por histologia. Foi demonstrado, que as amostras teciduais dos animais que não receberam tratamento e em cuja pata não foi administrada carragenina apresentou um infiltrado inflamatório leve [Normal: 0(0-0)] (Tabela 1, Figura 3A). Em contrapartida, a resposta nociceptiva observada no teste do Von Frey nos animais foi associada a um intenso infiltrado inflamatório, sendo demonstrado um aumento significativo desse infiltrado na pata dos animais em que foi administrado carragenina e que não receberam tratamento, em relação ao observado na pata Normal [NT: 3(3-3)] (Tabela 1, Figura 3B). O tratamento com APG (3 mg/kg) reduziu o infiltrado inflamatório no tecido plantar de forma significativa em relação àquele de animais NT, apresentando infiltrado de leve a moderado [APG 3 mg/kg: 1(0-2)] (Tabela 1, Figura 3C). Assim, além da redução de mediadores inflamatórios já relatada na literatura, a APG mostrou-se capaz de reduzir o infiltrado inflamatório, confirmando seu efeito anti-inflamatório. Tais achados podem explicar a redução da nocicepção nos modelos utilizados no presente estudo, modelos estes classicamente conhecidos como de hipernocicepção inflamatória.

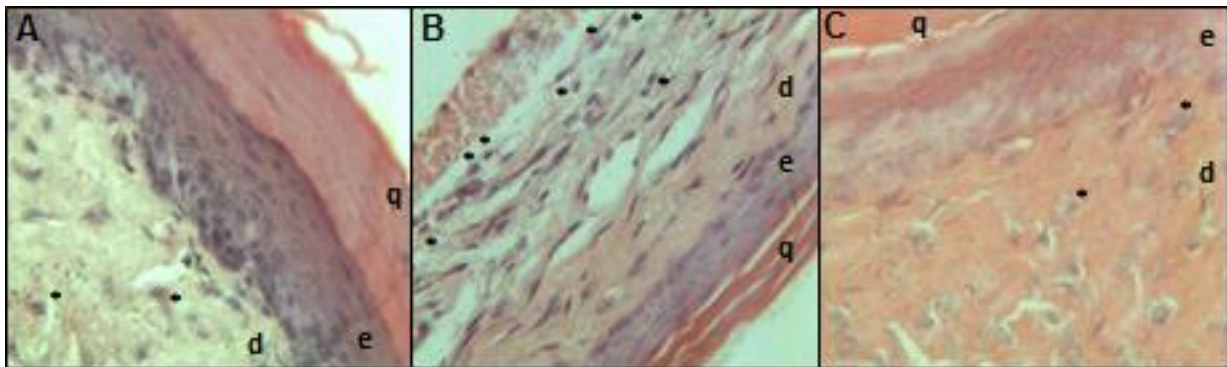
Tabela 1: Efeito do tratamento com apigenina no infiltrado inflamatório na pata de animais desafiadas com carragenina.

Análise	Grupo	Normal	NT	APG 3 mg/kg
				Carragenina
Histopatologia		0 (0-0)	3 (3-3) [#]	1 (0-2) [*]

(escores)

Os animais receberam por gavagem apigenina (APG) na dose de 3 e mg/kg ou não receberam tratamento (NT), e após 30 min foram aplicados os estímulos Carragenina na pata direita (300 µg/intraplantar) em todos os animais de cada grupo. O tecido plantar direito dos animais NT e APG e o esquerdo dos animais NT foram removidos. Os dados representam a mediana (valores extremos), de 8 animais por grupo. [#]p<0,05 em relação ao Normal; *p<0,05 relação ao grupo NT (Kruskal-Wallis e Mann-Whitney).

Figura 3: Aspecto histológico da pata de animais desafiadas com carragenina

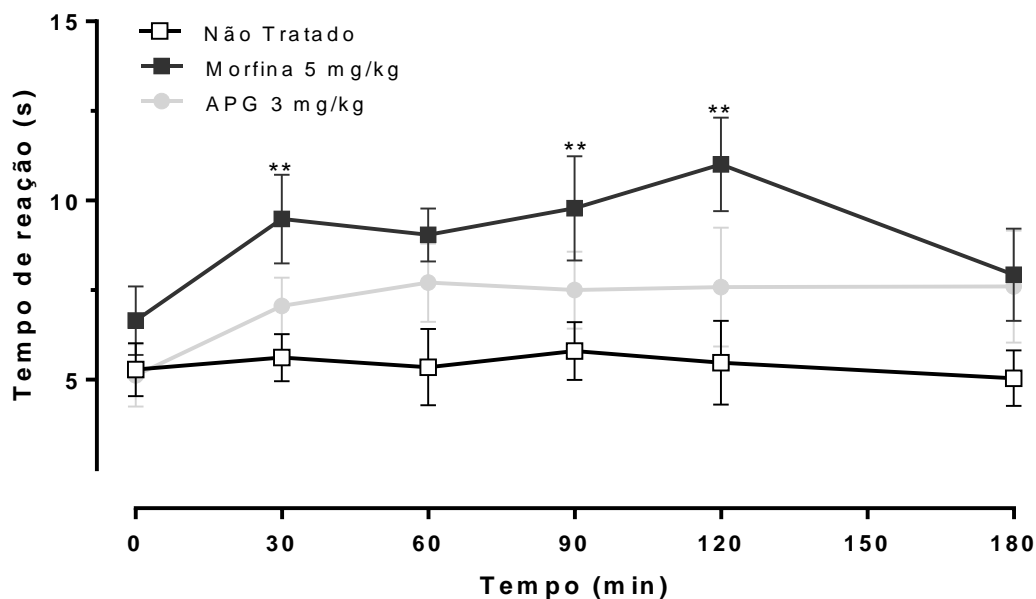


(A) Grupo Normal. (B) Grupo Não Tratado. (C) Grupo APG 3mg/kg. Estruturas da pele: queratina (q), epiderme (e) e derme (d). Aumento de 400x.

Nesse contexto, como a inflamação também é acompanhada de dor, a maioria dos agentes anti-inflamatórios tem um potencial antinociceptivo. A atividade analgésica periférica das drogas pode ser via inibição de ciclo-oxigenases (COX), lipoxigenases e/ou de outros mediadores, enquanto a ação analgésica central pode ser através da inibição dos receptores centrais de dor (Santos *et al.*, 2003). Assim, embora a APG não tenha reduzido a nocicepção na fase neurogênica no modelo de formalina, foi feito o teste da placa quente para investigação de possível efeito central da APG.

No teste de placa quente, o tratamento com morfina (5 mg/kg), utilizada como controle positivo, induziu um aumento do tempo de reação dos animais de forma significativa em relação ao grupo NT, nos tempos de 30, 90 e 120 minutos, evidenciando sua atividade analgésica central (Figura 4). A APG (3 mg/kg), por sua vez, não demonstrou efeito antinociceptivo central, sendo semelhante ($p>0,05$) ao grupo NT em todos os momentos avaliados (Figura 4), corroborando os achados do teste da formalina, em que a APG não apresentou efeitos significantes na fase neurogênica.

Figura 4: Efeito da Apigenina no decorrer dos tempos de reação a estímulos térmicos (placa quente) induzidos em camundongos.



Os animais foram tratados com morfina (Morf 5 mg/kg), apigenina (APG 3 mg/kg), respectivamente, administrados por gavagem ou não receberam tratamento (NT). O tempo de reação foi mensurado imediatamente antes (tempo zero), e após 30, 60, 90, 120 e 180 min após administração de cada um dos tratamentos ou veículo, com um tempo limite sobre a placa de 40 s. Os dados estão apresentados como Média \pm EPM, de 8 animais por grupo, do tempo de reação do animal como saltar ou lambe a pata. ** $p<0,01$ em comparação ao NT (ANOVA, Bonferroni).

O teste da placa quente é considerado um modelo específico para drogas analgésicas de ação central, as quais exercem seus efeitos analgésicos via receptores supra espinhais e espinhais

(Nemirovsky *et al.*, 2001). Este teste, na estimulação térmica, está associado à neurotransmissão central, na qual o calor ativa os nociceptores (fibras A δ e C), impulsionando o estímulo em direção ao corno dorsal da medula espinal e, subsequentemente, para os centros corticais (Pinheiro *et al.*, 2011).

No presente estudo, enquanto a morfina causou um aumento significativo nos tempos de reação do teste, a APG na dose utilizada não teve efeito, excluindo, assim, o sistema nervoso central como um local relevante de sua ação. Esses dados estão de acordo com outros estudos, em que embora doses maiores de APG, 20 a 50 mg/kg, tenham aumentando os tempos de reação dos animais no teste da placa quente (El Shoubaky *et al.*, 2016; Özkay *et al.*, 2013), doses mais baixas de APG (5 mg/kg) também administradas por gavagem (Özkay *et al.*, 2013), ou doses de 3 até 10 mg/kg administradas por via intraperitoneal não aumentaram esse tempo de reação (Rylski *et al.*, 1979). Assim, a baixa dose de APG, utilizada no presente estudo para o teste da placa quente, parece ser o motivo para sua falta de efeito antinociceptivo central.

4 CONCLUSÃO

Em conclusão, o presente estudo mostra que a APG na dose de 3 mg/kg foi capaz de inibir a hiperalgesia inflamatória em testes farmacológicos clássicos, sugerindo que esta possui propriedades anti-inflamatórias e antinociceptivas periféricas importantes. No entanto, essa dose de APG não apresentou efeitos antinociceptivos centrais.

VII. REFERÊNCIAS

- Avallone R, Zanolini P, Puia G, Kleinschnitz M, Schreier P, Baraldi M. Pharmacological Profile of Apigenin, a Flavonoid Isolated from *Matricaria chamomilla*. *Biochem. Pharmacol.* 59: 1387–1394, 2000.
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell.* 139(2): 267-284, 2009.
- Borghi S. M, Carvalho TT, Staurengo-Ferrari L, Hohmann MSN, Pinge-Filho P, Casagrande R, & Verri WA. Vitexin Inhibits Inflammatory Pain in Mice by Targeting TRPV1, Oxidative Stress, and Cytokines. *Journal of Natural Products.* 76(6): 1141–1149, 2013.
- Cardenas H, Arango D, Nicholas C, Duarte S, Nuovo G.J, HE W, Voss OH, Gonzalezmeija ME, Guttridge DC, Grotewold E, Doseff AL. Dietary Apigenin Exerts ImmuneRegulatory Activity in Vivo by Reducing NF- κ B Activity, Halting Leukocyte Infiltration and Restoring Normal Metabolic Function. *Int. J. Mol. Sci.* 17: 323-340, 2016.
- Chen L, Yang G, Grosser T. Prostanoids and inflammatory pain. *Prostag. and other lip. Med.* 104(105): 58-66, 2013.
- Cunha TM, Verri-Jr WA, Vivancos GG, Moreira IF, Reis S, Parada CA, Cunha FQ, Ferreira SH. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. *Braz9. J. Med. Biol. Res.* 3: 401-407, 2004.
- Cunha TM, Verri WA, Silva Jr JS , Poole S, Cunha FQ , Ferreira SH. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Pnas* 102 (5) : 1755–1760, 2005.
- Davies NM, Jamali F. COX-2 selective inhibitors cardiac toxicity: getting to the heart of the matter. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 7(3): 332-336, 2004.
- Di Rosa M, Willoughby DA. Screens for anti-inflammatory drugs. *J Pharm Pharmacol.* 23 :297–298, 1971.

Duarte S, Arango D, Parihar A, Hamel P, Yasmeen R, Doseff AL. Apigenin protects endothelial cells from lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation by decreasing caspase-3 activation and modulating mitochondrial function. *Int. J. Mol. Sci.* 14: 17664–17679, 2013.

Eddy NB, Leimbach D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl- and dithienylbutylamines. *J. Pharmacol.* 107: 385-393, 1953.

El shoubaky GA, Abdel-Daim MM, Mansour MH, Salem EA. Isolation and Identification of a Flavone Apigenin from Marine Red Alga *Acanthophora spicifera* with Antinociceptive and AntiInflammatory Activities. *J. Exp. Neurosci.* 10: 21-29, 2016.

Guillot X, Semerano L, Decker P, Falgarone G, Boissier MC. Pain and immunity. *Joint Bone Spine.* 79(3): 228-236, 2012.

Hassan SM., Marwa KM, Sadek SA, Abo-Youssef AM. Protective effects of apigenin and myricetin against cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. *Pharmaceutical Biology.* 55(1): 766–774, 2017.

Hunskar S, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain.* 30(1):103---114, 1987.

IASP - International Association for the Study Of Pain (Org. LOESER, J.D. et al., USA). *Classification of Chronic Pain, Second Edition (Revised): Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definitions of Pain Terms.* 2016. Updated by the IASP Taxonomy Working Group. Disponível em: <https://www.iasp-pain.org/PublicationsNews/Content.aspx?ItemNumber=1673>. Acesso em maio de 2019.

Julius D, Basbaum AI. Review article Molecular mechanisms of nociception. *Nature.* 413(6852): 203-210, 2001.

Nemirovsky A, Chen L, Zelman V, Jurna I. The antinociceptive effect of the combination of spinal morphine with systemic morphine or buprenorphine. *Anesth Analg.* 93 : 197-203, 2001.

Ouachrif A, Khalki H, Chaib S, Mountassir H , Aboufatima R , Farouk G , Benharraf A , Chait A. Comparative study of the anti-inflammatory and antinociceptive effects of two varieties of *Punica granatum*. *Pharm Biol.* 50: 429–438, 2012.

- Özkay ÜD, Can ÖD. Anti-nociceptive effect of vitexin mediated by the opioid system in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*.109 : 23–30, 2013.
- Pinheiro BG, Silva ASB, Souza GEP, Figueiredo JG, Cunha FQ, Lahlou S, et al. Chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory effects in rodents of the essential oil of *Peperomia serpens* (Sw.) Loud. *J Ethnopharmacol*.138: 479–86, 2011.
- Pinheiro MM, Boylan F, Fernandes PD. Antinociceptive effect of the *Orbignya speciosa* Mart. (Babassu) leaves: Evidence for the involvement of apigenin. *Life Sci*.91: 293–300, 2012.
- Santos DR, Calixto JB, Souza GE. Effect of a kinin B2 receptor antagonist on LPS- and cytokine-induced neutrophil migration in rats. *Br J Pharmacol*. 139:271–278, 2003.
- Salehi B, Venditti A, Sharifi-Rad M, Kręgiel D, Sharifi-Rad J, Durazzo A, Lucarini M, Santini A, Souto EB, Novellino E, Antolak H, Azzini E, Setzer WN, Martins N. The Therapeutic Potential of Apigenin. *Int. J. Mol. Sci*. 20(6): 1305, 2019.
- Rylski M, Duriasz-Rowińska H, Rewerski W. The analgesic action of some flavonoids in the hot plate test. *Acta Physiol Pol*. 30(3): 385-8, 1979.
- Viola H.; Wasowski C, Levi DE, Stein M.; Wolfman C, Silveira R, Dajas F, Medina JH, Paladini AC. Apigenin, a component of *Matricaria recutita* flowers, is a central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects. *Planta Med*. 61: 213–216, 1995.
- Williams TJ, Peck MJ. Role of prostaglandin-mediated vasodilatation in inflammation. *Nature*.270: 530–532, 1977.
- Zhang T, SU, J, Guo B, Wang K, LI X, Liang G. Apigenin protects blood–brain barrier and ameliorates early brain injury by inhibiting TLR4-mediated inflammatory pathway in subarachnoid hemorrhage rats. *Internat. Immunopharmacol*. 28: 79–87, 2015.
- Vivancos GG, Verri-Jr WA, Cunha TM, Schivo IRS, Parada CA, Cunha FQ, Ferreira SH. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. *Braz. J. Med. Biol. Res*. 37(3): 391-399, 2004.

Spektor G & Fuster V. Drug Insight: inibidores da ciclo-oxigenase 2 e risco cardiovascular - onde estamos agora?. *Nature Clinical Practice Medicina Cardiovascular*. 2:290 – 300, 2005.

Rang HP & Dale MM. *Rang & Dale Farmacologia*. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

Švehlíková V, Bennett RN, Mellon FA, Needs PW, Piacente S, Kroon PA, Bao Y. Isolation, identification and stability of acylated derivatives of apigenin 7-*O*-glucoside from chamomile (*Chamomilla recutita* L) *Rauschert Phytochemistry*. 65:2323–2332, 2004.

Márquez-Flores YK, Villegas I, Cárdeno A, Rosillo MÁ, Alarcón-de-la-Lastra C. Apigenin supplementation protects the development of dextran sulfate sodium-induced murine experimental colitis by inhibiting canonical and non-canonical inflammasome signaling pathways. *J Nutr Biochem*.30:143, 2016.

Siddique YH¹, Beg T, Afzal M. Antigenotoxic effect of apigenin against anti-cancerous drugs. *Toxicol In Vitro*. 22(3) :625-31, 2008.

Jensen K, Andersen HO, Olesen J, Lindblom U. Pressurepain threshold in human temporal region. *Evaluation of a new pressure algometer*. 25(3): 313 – 323, 1986.

Möller KA, Johansson B, Berge OG. Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer. *Journal of Neuroscience Method*. 84: 41-47, 1998.

Gorzalczany S, López P, Acevedo C, Ferraro G. Anti-inflammatory effect of *Lithrea molleoides* extracts and isolated active compounds. *Journal of Ethnopharmacology*. 133: 994-998, 2011.

Ferreira T R, Filho SB, Borgatto AF.; Lopes LC. Analgésicos, antipiréticos e anti-inflamatórios não esteroidais em prescrições pediátricas. *Ciê. Saúde Coletiva*. Vol. 18, n°12, págs. 3695-3704, 2013.

Mohammad EF, Hasan WA, Mohamed EG. Natural antioxidant flavonoids in formalin-induced mice paw inflammation; inhibition of mitochondrial sorbitol dehydrogenase activity. *J BiochemMol Toxicol*. 2016.

Mascaraque C, González R, Suárez MD, Zarzuelo A, Sánchez de Medina F, Martínez-Augustin O. Intestinal anti-inflammatory activity of apigenin K in two rat colitis models induced by trinitrobenzenesulfonic acid and dextran sulphate sodium. *Br J Nutr*.113(4):618-26, 2015.

Cunha FQ, Poole S, Lorenzetti BB, Ferreira SH. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol.* 107(3):660-4, 1992.

ANEXOS

Anexo A - Aprovação do estudo pela Comissão de Ética no Uso de Animais – UFC



Universidade Federal do Ceará
 Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
 Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
 Cep: 60430-270 Fortaleza-CE

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DA APIGENINA EM CAMUNDONGOS: PAPEL DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIO**", protocolo nº81/2016, sob responsabilidade do Profa. Dra. Vilma de Lima, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de nº8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião realizada em 28 de março de 2017.

Vigência do projeto	01/02/2017 a 31/02/2019
Espécie/Linhagem	Camundongo heterogênico Swiss
Nº de Animais	392
Peso/Idade	20-24g Adulto
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 30 de março de 2017

Alexandre Havt Bindá

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá
 Coordenador do CEUA - UFC

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
ALEXANDRE HAVT BINDÁ
 COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM
 ANIMAIS - CEUA/UFC - MATRÍCULA SIAPE: 1666882

