



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

ANDRÉA SANTOS COSTA

**MECANISMOS DE AÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO E AVALIAÇÃO DA
TOXICIDADE *IN VITRO* DE *McLTP*₁, UMA PROTEÍNA ISOLADA DE SEMENTES
DE *Morinda citrifolia* L.**

FORTALEZA

2021

ANDRÉA SANTOS COSTA

MECANISMOS DE AÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO E AVALIAÇÃO DA
TOXICIDADE *IN VITRO* DE McLTP₁, UMA PROTEÍNA ISOLADA DE SEMENTES DE
Morinda citrifolia L.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira.

FORTALEZA

2021

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)

- C87m Costa, Andréa Santos.
Mecanismos de ação do efeito antinociceptivo e avaliação da toxicidade in vitro de McLTP1, uma proteína isolada de sementes de *Morinda citrifolia* L. / Andréa Santos Costa. – 2021.
121 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2021.
Orientação: Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira.
1. *Morinda citrifolia* L.. 2. Proteínas transferidoras de lipídeos. 3. Proteínas terapêuticas. 4. Atividade antinociceptiva. 5. Toxicidade pré-clínica. I. Título.

CDD 572

ANDRÉA SANTOS COSTA

MECANISMOS DE AÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO E AVALIAÇÃO DA
TOXICIDADE *IN VITRO* DE *McLTP*₁, UMA PROTEÍNA ISOLADA DE SEMENTES DE
Morinda citrifolia L.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovada em: 26/07/2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Delane Viana Gondim
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Alana de Freitas Pires
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dr. Ariclécio Cunha de Oliveira
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

À minha família, a quem
devo tudo o que sou e são
meu bem mais precioso.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela vida que me foi concedida e por me guiar e proteger, sempre me abençoando e dando força nos dias difíceis.

À minha família, que me apoia e me deu condições de perseguir meus objetivos com a melhor das torcidas. Em especial, à minha mãe Adriana e irmãos Izaura e Izaac, por todo o amor, cuidado, acolhimento, educação e incentivo. Também ao meu pai, por todo o amor, preocupação e dedicação. Ao tio Paulo e Tia Cléa que são segundos pais que a vida me proporcionou. Ao Pedro, Paulo, Dilauba e João Vicente, por estarem sempre ao meu lado.

Ao meu esposo Ricardo, pela dedicação e companheirismo, por todo o apoio e tentativas sem tamanho para deixar tudo mais leve. Que compartilha comigo os bons e ruins momentos e ilumina tudo ao redor.

Ao meu orientador, professor Hermógenes David, que por todos esses anos de iniciação científica, mestrado e doutorado me deixou ensinamentos sólidos e enraizados. A ele devo a maior parcela da profissional e cientista que sou. Vou sentir muitas saudades de bater na porta para pedir uma assinatura e esquecer das horas colocando todos os assuntos em dia. Respeito, admiração e carinho são meus sentimentos pelo meu orientador.

À minha amiga Dyély Campos, que foi determinante para a construção deste trabalho, que dividiu comigo sua generosidade, horas de experimento, de conversas, de risadas, de apoio e que hoje é família também.

Aos companheiros e amigos de laboratório Adrienne, Adson, Cristiane, Stephany, Rodolpho e Vilmara pela alegre convivência e por toda ajuda na condução dos experimentos.

Aos membros da minha banca examinadora, professores(as) Daniele Oliveira, Delane Gondim, Alana de Freitas e Ariclécio Cunha por dedicarem seu tempo e darem suas contribuições a este trabalho.

À professora Nylane Maria Nunes Alencar, que contribuiu enormemente para os experimentos de nocicepção em animais e sempre demonstra carinho, interesse e doação. Admiração imensurável pela professora. Estendo os agradecimentos aos integrantes do laboratório de Farmacologia Bioquímica.

Ao laboratório de Oncologia Experimental, especialmente ao professor Manoel Odorico de Moraes Filho, por toda contribuição nos experimentos de cito e genotoxicidade.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da UFC, pela excelência no que fazem, pela luta diária para manterem uma pesquisa produtiva e de qualidade e por todo o conhecimento transmitido ao longo de minha formação.

Aos demais funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e ao Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos que tanto se doam para essa instituição.

A todos os cientistas que trabalharam incansavelmente para encontrar soluções e nos dar esperança de dias melhores nesse ano tão difícil que foi de pandemia do coronavírus.

À Universidade Federal do Ceará por meio das atividades de capacitação no ensino e pesquisa realizadas no Laboratório de Química Medicinal (LQM), sob coordenação e orientação do Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de auxílio à pesquisa.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo do apoio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

“ Você não pode esperar construir um mundo melhor sem melhorar os indivíduos. Para esse fim, cada um de nós deve trabalhar para o seu próprio aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, compartilhar uma responsabilidade geral por toda a humanidade. ”

(Marie Curie)

RESUMO

A dor é uma condição crítica, especialmente em doenças crônicas, e novas abordagens terapêuticas têm sido exigidas. Dentre essas abordagens, as proteínas vegetais têm se destacado como moléculas promissoras com potencial para serem empregadas na saúde humana. Estudos anteriores mostraram que uma proteína transferidora de lipídios isolada de sementes de *Morinda citrifolia* L., denominada *McLTP*₁ (9,4 kDa), apresenta atividade antinociceptiva em camundongos. Além disso, a proteína não foi capaz de induzir toxicidade em camundongos, mesmo após administração diária (28 dias) em testes realizados de acordo com as diretrizes da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE). Este trabalho teve como objetivo investigar os mecanismos envolvidos na ação antinociceptiva de *McLTP*₁ e estudar sua toxicidade pré-clínica *in vitro*. *McLTP*₁ foi purificada a partir de sementes de noni conforme descrito anteriormente. Os mecanismos antinociceptivos da proteína foram estudados em diferentes modelos em camundongos após administração intraperitoneal ou oral (8 mg/kg). Todos os experimentos foram aprovados pelo CEUA-UFC (n° 65/2015). Neste estudo, a nocicepção induzida por estímulo térmico foi inibida por *McLTP*₁ e antagonizado pela naloxona (2 mg/kg, i.p.), demonstrando efeito supraespinhal via sistema opioide. Além disso, o pré-tratamento com L-NAME (20 mg/kg) ou glibenclamida (2 mg/kg) no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético, reverteu parcialmente o efeito de *McLTP*₁ (20,50%, i.p.; 33,33%, v.o. e 35,90%, i.p., 47,21% v.o., respectivamente), indicando a ativação da via NO/cGMP/K⁺ATP. *McLTP*₁ também reverteu a resposta nociceptiva no teste de lambadura da pata induzida por glutamato (3,7 ng/pata) e capsaicina (1,6 µg/pata) (78,30%, i.p.; 67,19%, v.o. e 45,45%, i.p.; 30,90%, v.o., respectivamente), sugerindo envolvimento do sistema glutamatérgico e de receptores vaniloides. Adicionalmente, o efeito antinociceptivo de *McLTP*₁ envolveu a modulação da inflamação, conforme evidenciado pela redução da hipernocicepção induzida por carragenina (300 µg/pata) ou PGE₂ (0,1 nmol/pata). Os resultados também revelaram que a proteína explora mecanismos antinociceptivos semelhantes por ambas as vias de administração (oral ou intraperitoneal). Em testes pré-clínicos de toxicidade *in vitro*, *McLTP*₁ (20, 40, 80, 160, 320 µg/mL) não apresentou alterações na viabilidade celular ou padrões de dano ao DNA em cultura de carcinoma hepatocelular humano (HepG2). Finalmente, o conhecimento dos mecanismos antinociceptivos de *McLTP*₁ abre a perspectiva de explorar essa proteína em outros modelos de doença, ampliando suas ações terapêuticas, além de fornecer contribuição inédita para a utilização do grupo das LTPs.

Palavras-chave: *Morinda citrifolia* L.; proteínas transferidoras de lipídeos; proteínas terapêuticas; atividade antinociceptiva; toxicidade pré-clínica.

ABSTRACT

Pain is a critical condition, especially in chronic diseases, and new therapeutic approaches have been demanded. Among these approaches, plant proteins have been highlighted as promising molecules with the potential to be employed in human health. Previous reports have shown that a lipid transfer protein isolated from *Morinda citrifolia* L. seeds, named *McLTP*₁ (9.4 kDa), displays antinociceptive activity in mice. Additionally, *McLTP*₁ was not able to induce toxicity in mice, even after daily administration (28 days) in tests performed according to guidelines of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). This work aimed to investigate the mechanisms underlying the antinociceptive action of *McLTP*₁ in pain models and to study its *in vitro* preclinical toxicity. *McLTP*₁ was purified from noni seeds as previously described. Antinociceptive mechanisms of *McLTP*₁ were studied in different mice models after intraperitoneal or oral administration (8 mg/kg). All experiments were approved by CEUA-UFC (n° 65-2015). In this study, thermal stimulus-induced nociception was inhibited by *McLTP*₁ and antagonized by naloxone (2 mg/kg, i.p.), demonstrating a supraspinal effect via the opioid system. In addition, pretreatment with L-NAME (20 mg/kg) or glibenclamide (2 mg/kg) in the acetic acid-induced abdominal writhing test partially reversed the *McLTP*₁ effect (20.50%, i.p.; 33.33%, p.o. and 35.90%, i.p., 47.21% p.o., respectively), indicating the NO/cGMP/K⁺ATP pathway activation. *McLTP*₁ also reversed the nociceptive response in the glutamate- (3.7 ng/paw) and capsaicin-induced (1.6 µg/paw) paw licking test (78.30%, i.p.; 67.19%, p.o. and 45.45%, i.p.; 30.90%, p.o., respectively), suggesting involvement glutamatergic system and vanilloid receptors. Moreover, the antinociceptive effect of protein involves modulating inflammation by suppressing the carrageenan- (300 µg/paw) or PGE₂-induced (0.1 nmol/paw) hypernociception. Interestingly, *McLTP*₁ explores similar antinociceptive mechanisms by both routes (oral or intraperitoneal). In preclinical *in vitro* toxicity tests, *McLTP*₁ (20, 40, 80, 160, 320 µg/mL) did not display any alterations in cell viability or patterns of DNA damage in cultured human hepatocellular carcinoma (HepG2). Overall, knowledge of the antinociceptive mechanisms of *McLTP*₁ opens the prospect of exploring this protein in other disease models, expanding its therapeutic actions, besides providing an unprecedented contribution to the use of LTPs group.

Keywords: *Morinda citrifolia* L.; lipid transfer protein; therapeutics proteins; antinociceptive activity; preclinical toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Visão geral do circuito nociceptivo.....	22
Figura 2 –	Ativação de neurônios nociceptivos.....	24
Figura 3 –	Representação dos aspectos gerais das partes de <i>Morinda citrifolia</i> L.....	40
Figura 4 –	Estrutura 3D de TaLTP1 (<i>Triticum aestivum</i> Lipid Transfer Protein).....	44
Figura 5 –	Figura 05 - Perfil eletroforético (SDS–PAGE 15%; 20 µg).....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Alguns fármacos utilizados no tratamento da dor.....	29
Tabela 2 –	Medicamentos de peptídeos aprovados pela FDA (2015-2020).....	36
Tabela 3 –	Sistemas de classificação de Proteínas Transferidoras de Lipídeos (LTPs).....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	5-hidroxitriptamina
ACTH	<i>Adrenocorticotropic hormone</i> (hormônio adenocorticotrófico)
AINES	Anti-inflamatórios não esteroides
ALT	Alanina transaminase
AMPA	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i> (ácido amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i> (adenosina trifosfato)
CCL	<i>Caulerpa cupressoides lectin</i> (lectina de <i>Caulerpa cupressoides</i>)
cGMP	<i>Cyclic guanosine monophosphate</i> (guanosina monofosfato cíclico)
CGRP	<i>Calcitonin gene-related peptide</i> (peptídeo relacionado com o gene da calcitonina)
COX-2	Ciclooxigenase tipo 2
COXs	Ciclooxigenases
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GABA	<i>Gamma aminobutyric acid</i> (ácido γ -amino-butírico)
GC	Guanilato ciclase
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
GRD	Gânglio da raiz dorsal;
i.p.	Via intraperitoneal
IASP	<i>International Association for the Study of Pain</i>
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i> (molécula de adesão intracelular 1)
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
L-NAME	<i>L-nitro-arginine methyl ester</i>
LTP	Lipid transfer protein

<i>McLTP</i> ₁	<i>Morinda citrifolia</i> lipid transfer protein type 1
<i>Mo-CBP</i> ₄	<i>Moringa oleifera</i> chitin-binding protein
NEMs	Novas entidades moleculares
NGF	<i>Nerve growth factor</i> (fator de crescimento neuronal)
NMDA	N-metil D-aspartato
NO	<i>Nitric oxid</i> (óxido nítrico)
NOs	<i>Nitric oxide synthase</i> (óxido nítrico sintase)
OCDE	Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico
PGE2	Prostaglandina E2
PKG	<i>Protein kinase G</i> (proteína quinase G)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SBED	Sociedade Brasileira de Estudos da Dor
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio)
SNC	Sistema nervoso central
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor α</i> (fator de necrose tumoral α)
TNJ	<i>Tahitian Noni</i> ® Juice
TRPV1	<i>Transient receptor potential vanilloid type 1</i> (receptor potencial vaniloide transiente tipo 1)
v.o.	Via oral

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO.....	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	Dor e nocicepção.....	19
2.1.1	<i>Fisiofarmacologia da dor.....</i>	21
2.2	Modelos animais de nocicepção.....	30
2.3	Potencial terapêutico de proteínas e peptídeos.....	34
2.4	<i>Morinda citrifolia</i> L.....	38
2.5	Proteínas Transferidoras de Lipídeos (LTPs)	43
3.	OBJETIVOS.....	48
3.1	Objetivo Geral.....	48
3.2	Objetivos Específicos.....	48
4	ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....	49
5	ARTIGO 1 - MECHANISMS UNDERLYING THE ANTINOCICEPTIVE EFFECT OF A LIPID TRANSFER PROTEIN ISOLATED FROM <i>Morinda citrifolia</i> SEEDS IN DIFFERENT MICE ACUTE PAIN MODELS.....	51
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	79
7	ARTIGO 2 - SAFETY ASSESSMENT OF A LIPID TRANSFER PROTEIN ISOLATED FROM <i>Morinda citrifolia</i> L. SEEDS, IN A PERSPECTIVE OF ITS USE AS A NOVEL ANTI-INFLAMMATORY DRUG.....	80
8	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	110
	REFERÊNCIAS.....	111
	APÊNDICE A – PRODUÇÕES CIENTÍFICAS DURANTE A PÓS- GRADUAÇÃO.....	124

1. APRESENTAÇÃO

Tendo como base a necessidade de desenvolver medicamentos cada vez mais sítio-específicos e com menos efeitos colaterais, especialmente no combate à dor que diminui a qualidade de vida de tantas pessoas e animais no mundo, esta tese foi organizada em duas linhas principais: uma voltada para a investigação do mecanismo de ação dos efeitos antinociceptivos de uma proteína isolada das sementes de *Morinda citrifolia* L., chamada *McLTP₁*; e outra voltada para estudos de sua segurança farmacológica *in vitro*.

Resumidamente, a primeira etapa abordará aspectos da dor, sua fisiofarmacologia, os principais mecanismos de antinocicepção e os modelos animais utilizados para entender como esses efeitos podem ser estudados por novas moléculas. Falaremos da espécie vegetal estudada (*Morinda citrifolia* L.) e das proteínas transferidoras de lipídeos (LTPs). Em especial, mostraremos as principais vias pelas quais o efeito antinociceptivo de *McLTP₁* é observado. Trabalhos recentes indicaram essa proteína como boa candidata a princípio ativo por seus efeitos farmacológicos, como atividade anti-inflamatória, protetora sobre sepse, antiulcerogênica e antinociceptiva. Nosso grupo é o primeiro a investigar essas ações terapêuticas para essa classe de proteínas. É válido destacar que além dos efeitos farmacológicos, *McLTP₁* possui outras características interessantes como termoestabilidade, resistência às proteases do trato gastrointestinal, estabilidade ao ser armazenada mesmo em temperatura ambiente por 6 meses e efeito antinociceptivo prolongado por 12 horas após a administração. Todas essas propriedades nos motivaram a avançar com experimentos visando investigar o mecanismo de ação antinociceptivo *in vivo* da proteína, os quais foram conduzidos em parceria com o Laboratório de Farmacologia e Bioquímica do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará e submetidos ao periódico *International Journal of Biological Macromolecules* com o título “*Mechanisms underlying the antinociceptive effect of a lipid transfer protein isolated from Morinda citrifolia seeds in different mice acute pain models*”.

Sabendo que as LTPs são conhecidas por seus efeitos alergênicos, o foco seguinte desta tese foi voltado para avançar os estudos de toxicidade iniciados durante o trabalho de mestrado. Os estudos de toxicidade pré-clínica *in vivo* com *McLTP₁* anteriores se mostraram promissores por não apresentarem efeitos indesejados nas análises de evolução de peso corpóreo, hematológicas, bioquímicas, histopatológicas ou comportamentais provocados pela

administração diária por via oral da proteína. Como experimentos *in vitro* também são pré-requisitos para a avaliação da segurança de novos princípios ativos para futuros medicamentos, foi realizada a avaliação do efeito de *McLTP₁* em linhagens celulares em modelos de toxicidade, obtidos em parceria com o Laboratório de Oncologia Experimental do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará. Os resultados são mostrados no artigo “*Safety assessment of a lipid transfer protein isolated from Morinda citrifolia L. seeds, in a perspective of its use as a novel anti-inflammatory drug*” a ser submetido no periódico “*Food and Chemical Toxicology*”.

Diante do exposto, algumas perguntas guiaram a proposta deste trabalho:

- Considerando que *McLTP₁* apresenta efeitos antinociceptivos promissores, qual o mecanismo de ação para tais efeitos?
- *McLTP₁* apresenta os mesmos mecanismos de ação após a administração oral e intraperitoneal?
- A modulação da dor seria em nível periférico ou teria ação também central?
- Considerando que diferentes mecanismos, tais como noradrenérgicos, colinérgicos e via NO/GMPc/K⁺ATP estão envolvidos na resposta nociceptiva ao ácido acético, qual a importância dessas vias para o efeito antinociceptivo de *McLTP₁*?
- Sabendo que a proteína não causou efeitos tóxicos em modelos pré-clínicos *in vivo*, haveria algum efeito *in vitro* cito ou genotóxico?

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Dor e nociceção

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (*International Association for the Study of Pain - IASP*) a dor é definida como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada, ou semelhante àquela associada, a dano real ou potencial ao tecido” (IASP, 2020). Essa definição implica um papel fisiológico para a dor que funciona como um alarme para evitar ou limitar o dano ao tecido, tendo uma função defensiva vital essencial (FORNASARI, 2014). Neste sentido, a dor é um sintoma clinicamente importante para a detecção e avaliação de doenças, bem como, para induzir um comportamento de sinalização e, como consequência, limitar os possíveis danos (MILLAN, 1999; ALMEIDA *et al.*, 2004). Ainda, a dor é uma experiência subjetiva, onde cada indivíduo sente de formas diferentes, sendo intensamente influenciada pelo estado emocional. Assim, pode ser interpretada como a soma de componente sensorial e componente emocional (GIESECKE *et al.*, 2005; LOESER e TREEDE, 2008) e, por isso, a intensidade de dor que um determinado estímulo provoca depende de muitos fatores para além do estímulo em si. É reconhecido clinicamente que muitos analgésicos, principalmente os que contêm morfina, podem reduzir substancialmente o sofrimento associado a dor. O componente afetivo pode ser, no mínimo, tão significativo quanto o componente antinociceptivo na ação destes fármacos (RANG *et al.*, 2016). Diante disso, o termo nociceção refere-se ao estímulo doloroso propriamente dito, sem levar em consideração o componente emocional, ou seja, engloba as vias neuroanatômicas, bem como os mecanismos neurológicos e os receptores específicos que detectam o estímulo lesivo (KANDEL *et al.*, 2003).

A classificação da dor é diversificada e depende do critério adotado. Temporalmente, pode ser dividida em tipos agudos e crônicos. A dor aguda está associada ao dano tecidual de início recente, ativação de nociceptores no local da lesão, e de duração provavelmente limitada, desaparecendo quando a injúria é sanada (CARR e GOUDAS, 1999). Já a dor crônica ocorre devido a uma lesão, podendo ser perpetuada por diferentes fatores causais e permanecer além do período esperado de cura. Outro fato que caracteriza a dor crônica é a ocorrência de plasticidade do sistema nervoso central e periférico e por manter-se após recuperação tecidual, o que torna o tratamento farmacológico mais difícil (LOESER; MELZACK, 1999; MILLAN, 1999).

A partir do entendimento fisiológico, a dor pode ser classificada em nociceptiva, neurogênica, neuropática, psicogênica ou inflamatória, e elas são resultantes, respectivamente, da estimulação excessiva dos nociceptores, lesão do tecido neural, disfunção de um nervo, fatores psicológicos, ou resultante de processos inflamatórios (MILLAN, 1999).

Em relação à dor nociceptiva, esta surge de dano real ou ameaça ao tecido não neural, devido à ativação de nociceptores. Consiste na estimulação persistente de nociceptores, seja por estímulo térmico, químico ou mecânico, ativando as vias centrais da dor. Esses nociceptores podem responder ao calor, frio, vibração e substâncias químicas liberadas pelos tecidos em resposta à privação de oxigênio, rompimento do tecido ou inflamação (MILLAN, 1999; WHO, 2012). Quando se trata da dor inflamatória, que é iniciada por uma lesão tecidual e consequente inflamação, esta pode evoluir para um quadro de alodinia, que ocorre quando há sensibilização a estímulos que normalmente não produzem ou produzem pouca sensação dolorosa no tecido inflamado, sendo este um fenômeno característico desse tipo de dor, mas que pode ter outras causas como em casos de dor neuropática (FANTONI, 2012).

Apesar das sensações dolorosas serem um importante aviso que o organismo necessita para sinalizar um processo de agressão, como já mencionado, a problemática da dor também interfere na homeostasia do indivíduo e da sua relação com os outros (KLAUMANN, WOUK, e SILLAS, 2008). A dor crônica, por exemplo, afeta entre 20 e 40% da população mundial em algum momento da vida e causa sofrimento, inaptidão ao trabalho, problemas psicossociais e prejuízos econômicos. Pelo menos 37% da população brasileira, ou 78 milhões de pessoas, relataram sentir dor de forma crônica persistente por mais de 3 meses (AGÊNCIA BRASIL, 2018). Um estudo epidemiológico inédito feito pela Sociedade Brasileira de Estudos da Dor (SBED), com 919 pessoas das cinco regiões do Brasil, mostrou que 42% dos entrevistados relataram algum tipo de sensação dolorosa e 37% disseram conviver com dor há pelo menos seis meses. Foi revelado que a maior incidência (42%) é na região Sul, seguido do Sudeste (38%), Norte (36%), Centro-Oeste (24%) e Nordeste (28%). Exceto no Nordeste, onde os homens (52%) relataram maior incidência, a dor aflige mais as mulheres nas demais regiões (SBED, 2016). Outros estudos mostraram a prevalência de dor em função dos níveis socioeconômicos e de escolaridade (SANTOS *et al.*, 2015; SÁ *et al.*, 2009).

O conhecimento da fisiofarmacologia da dor é uma importante ferramenta para o entendimento dos mecanismos desencadeantes dos processos dolorosos, sejam fisiológicos ou patológicos. Essas informações são úteis para a instituição de uma terapia analgésica eficiente, preventiva e multimodal, pois a síndrome dolorosa pode ser considerada uma doença, gerando

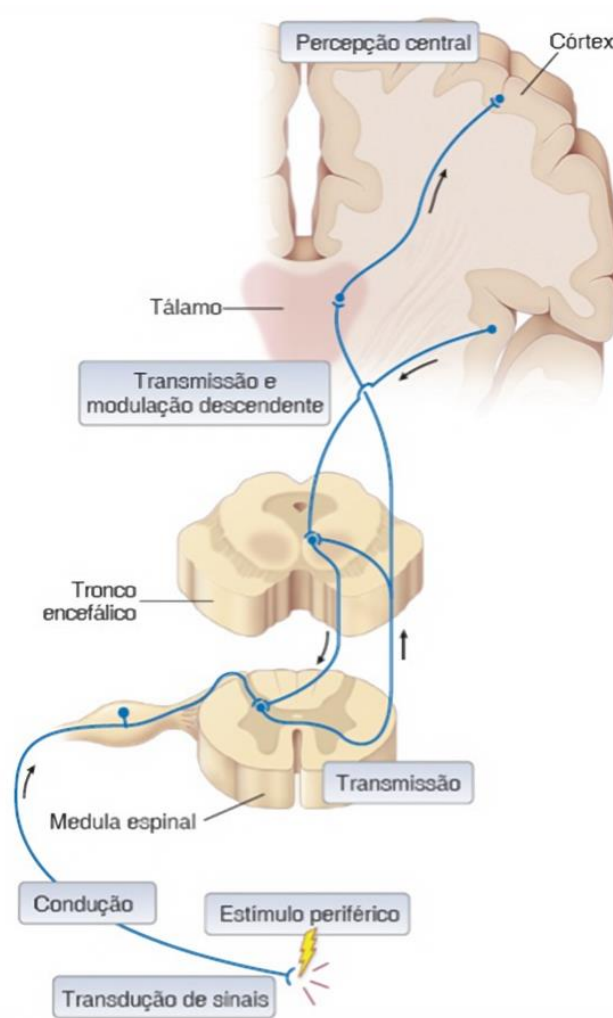
alterações na homeostasia orgânica que implicam em perda da qualidade de vida do paciente (KLAUMANN, WOUK e SILLAS, 2008).

2.1.1 Fisiofarmacologia da dor

O processo que ocorre entre a exposição inicial ao estímulo nocivo até a percepção da dor é uma via ascendente complexa e há diversos mecanismos envolvidos, os quais reconhecem o estímulo através de receptores específicos, os nociceptores (MILLAN, 1999). Os nociceptores são terminações nervosas livres que respondem a estímulos nociceptivos (mecânicos, térmicos ou químicos), detectando, assim, lesão nos tecidos. Na contramão do processo nociceptivo, uma via descendente pode ser ativada, inibindo a transmissão excitatória nociceptiva, que representa o mecanismo de antinocicepção. O potencial antinociceptivo de um produto natural, por exemplo, pode ser medido pelo seu poder de aumentar o limiar de excitação das terminações nervosas ao estímulo doloroso, ou então, fazer com que os nociceptores não percebam ou não respondam ao estímulo de dor promovido (MILLAN, 2002).

Como representado pela **figura 1**, a nocicepção consiste dos processos de transdução, caracterizada pela ativação dos nociceptores pelo estímulo nódico; transmissão, envolvendo o conjunto de vias sensitivas e mecanismos que permitem a passagem do impulso nervoso conduzido da periferia para o sistema nervoso central pelos neurônios; e modulação, que envolve o mecanismo de inibição da nocicepção e que é desencadeado pelas vias nociceptivas descendentes do cérebro para a medula espinhal (FERNANDES e GOMES, 2011). De forma simplificada, a nocicepção pode ser ocasionada por uma cadeia de três-neurônios: o neurônio de primeira ordem (aférente primário) originado na periferia e projetando-se para a medula espinhal; o neurônio de segunda ordem (neurônio de projeção), que ascende pela medula espinhal e projeta os sinais em neurônios localizados no bulbo, ponte, mesencéfalo, tálamo e o hipotálamo; e o neurônio de terceira ordem que é projetado para o córtex cerebral, onde a dor é finalmente percebida (MESSLINGER, 1997; TRANQUILLI, 2004).

Figura 1 – Visão geral do circuito nociceptivo.



A imagem ilustra que a ativação da terminação nervosa periférica por um estímulo nocivo leva à geração de potenciais de ação, que são conduzidos até o corno dorsal da medula espinal. A neurotransmissão no corno dorsal transmite o sinal a neurônios do SNC (sistema nervoso central), que enviam o sinal ao cérebro. Esse circuito também está sujeito a controle modulador descendente.

Fonte: Princípios de Farmacologia - A Base Fisiopatológica da Farmacologia, 3ª edição (2014).

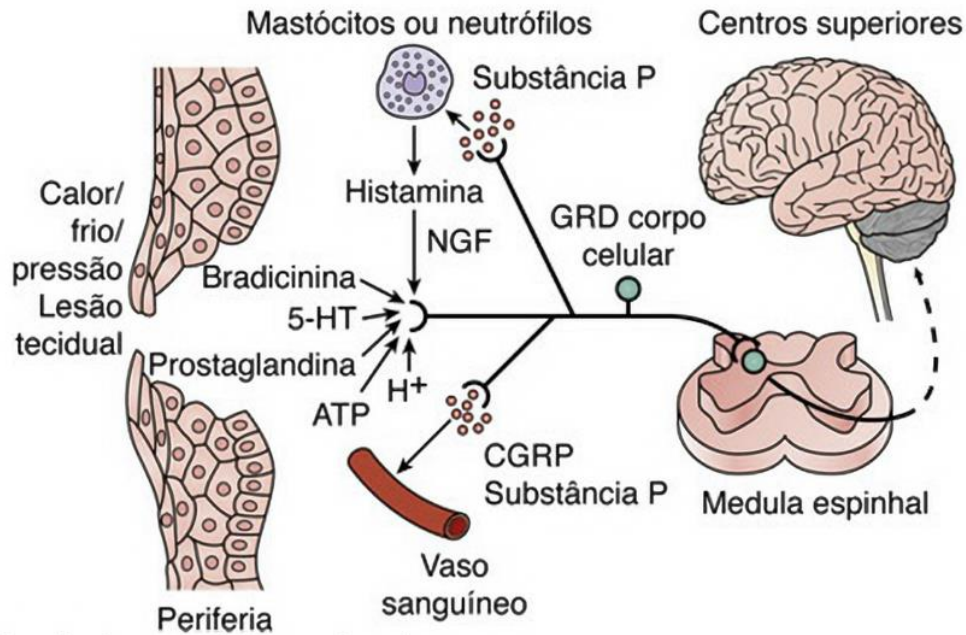
A transdução de estímulos nocivos externos e intensos despolariza as terminações periféricas dos neurônios sensoriais primários de “alto limiar”. Esses neurônios, os nociceptores, dada sua capacidade de responder a estímulos nocivos, são de alto limiar por necessitarem de um forte estímulo que potencialmente lesa o tecido, para despolarizar suas terminações nervosas. Sendo assim, transdução pode ser compreendida como um processo de transformação de estímulos nocivos em potenciais de ação do receptor, que são propagados pelas fibras nervosas (A δ e C, principalmente) (GOLAN, 2014). A maioria dos neurônios de fibras mielinizadas (A δ) transmitem dor aguda e bem localizada enquanto os de fibras não

mielinizadas (C) são associados às terminações nociceptivas polimodais e transmitem dor profunda, difusa e em queimação (HANG e DALE, 2016).

Durante a transmissão, os potenciais de ação resultantes são conduzidos até o sistema nervoso central (SNC) pelos axônios dos neurônios sensoriais aferentes primários, que percorrem inicialmente os nervos periféricos e, em seguida, as raízes dorsais, que fazem sinapse em neurônios no corno dorsal da medula espinal (GOLAN, 2014). Após a transdução do estímulo e transmissão dos sinais elétricos ao sistema nervoso central, é no corno dorsal ou posterior da medula onde ocorre a integração inicial e a modulação da entrada do estímulo nociceptivo. Os neurônios de primeira ordem realizam sinapse com os de segunda ordem e propagam a mensagem nociceptiva (ALMEIDA *et al.*, 2009).

Muitos órgãos na periferia, incluindo pele e estruturas subcutâneas como articulações e músculos, possuem esses nociceptores que são ativados por estímulos nocivos (KANDEL *et al.*, 2003). Essa lesão pode resultar de estimulação mecânica intensa, temperaturas extremas, privação de oxigênio e exposição a certos produtos químicos, entre outras causas. As membranas dos nociceptores contêm canais iônicos que são ativados por estes tipos de estímulo, e com muitas afecções patológicas, a lesão tecidual é a causa imediata da dor e resulta em liberação local de uma variedade de substâncias químicas que atuam sobre as terminações nervosas, seja ativando-as diretamente, ou potencializando sua sensibilidade a outras formas de estimulação (RANG e DALE, 2016). Como exemplos de substâncias liberadas estão as proteases, ATP e íons H^+ (**Figura 2**). As proteases podem clivar um peptídeo extracelular abundante, o cininogênio, formando o peptídeo bradicinina. A bradicinina liga-se a uma molécula receptora específica, que aumenta a condutância iônica de alguns nociceptores. De maneira similar, o ATP causa a despolarização dos nociceptores por meio da ligação direta a canais iônicos que dependem do ATP para sua ativação e o K^+ extracelular despolariza diretamente as membranas neuronais (KANDEL *et al.*, 2003).

Figura 2 – Ativação de neurônios nociceptivos.



Diferentes estímulos (físicos e químicos) podem iniciar ou aumentar a taxa de disparo de potencial de ação nos neurônios aferentes primários nociceptivos. Essas fibras aferentes projetam-se para o corno dorsal da medula espinhal, onde fazem sinapse nos neurônios que se projetam para os centros superiores. Alguns dos principais componentes inflamatórios são mostrados, incluindo peptídeos (bradicinina), lipídios (prostaglandinas), neurotransmissores (5-HT) e ATP) e neurotrofinas (NGF). Cada um desses fatores sensibiliza (diminui o limiar) ou excita os terminais do nociceptor ao interagir com os receptores da superfície celular expressos por esses neurônios. A ativação do nociceptor não apenas transmite mensagens aferentes para o corno dorsal da medula espinhal (e daí para o cérebro), mas também inicia o processo de inflamação neurogênica. Esta é uma função eferente do nociceptor em que a liberação de neurotransmissores, como a substância P e CGRP, do terminal periférico induz vasodilatação e extravasamento de plasma, bem como ativação células não neuronais, incluindo mastócitos e neutrófilos. 5-HT = 5-hidroxitriptamina; ATP = trifosfato de adenosina; CGRP = peptídeo relacionado com o gene da calcitonina; GRD = gânglio da raiz dorsal; NGF = fator de crescimento neuronal.

Fonte: Rang & Dale: Farmacologia, 8ª edição, 2016, adaptado de Julius e Basbaum, Nature, 2001.

A transmissão sináptica no corno dorsal, entre os aferentes primários das fibras C e os neurônios de projeção secundários, apresenta componentes rápidos e lentos. Os aminoácidos glutamato e aspartato atuam como neurotransmissores excitatórios e evocam potenciais de ação nos neurônios do corno dorsal superficial, facilitando a transmissão nociceptiva (ROCHA *et al.*, 1994). O glutamato, atuando nos receptores ionotrópicos AMPA (amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato) e NMDA (N-metil-D-aspartato), medeia a transmissão excitatória rápida entre os neurônios sensoriais primários e secundários. Os neuropeptídeos, como as

taquicininas, substância P e peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGRP), bem como outros neuromoduladores sinápticos, são coliberados com o glutamato e produzem efeitos sinápticos mais lentos (GOLAN, 2012).

Em seguida, os neurônios de segunda ordem ascendem pela medula espinhal através do trato espinotalâmico, onde projetam as suas fibras terminais, especialmente no tálamo, onde neurônios de terceira ordem emitem axônios para diversas regiões, caracterizando diferentes vias ascendentes. No tálamo medial em particular, muitas células respondem especificamente a estímulos nociceptivos na periferia, e as lesões nesta área causam analgesia (SCHAIBLE e RICHTER, 2004).

A fim de restaurar a homeostasia, a transmissão sináptica na medula espinhal é regulada pelas ações de interneurônios inibitórios locais e projeções que descem do tronco encefálico para o corno dorsal. Como esses sistemas podem limitar a transferência da informação sensorial para o cérebro, eles representam um importante local de intervenção farmacológica. A modulação da dor através das vias descendentes inibitórias consiste na redução da liberação dos neurotransmissores excitatórios (glutamato, substância P e CGRP) a partir dos neurônios aferentes primários, por meio da liberação de neurotransmissores inibitórios a partir de interneurônios. Os principais neurotransmissores inibitórios no corno dorsal da medula espinhal são os peptídeos opioides, a norepinefrina, a serotonina (5-HT), a glicina e o ácido γ -amino-butírico (GABA) (GOLAN, 2014).

Com a sensibilização periférica, a dor pode ser anormalmente propagada por alterações na sinalização do neuropeptídeo que forma a base da inflamação neurogênica, envolvendo processos como vasodilatação, extravasamento de plasma, infiltração de citocinas e atração de macrófagos (CLARK, OLD e MALCANGIO, 2013). Uma vez ocorrido o dano ao tecido, vários mediadores químicos são liberados, como citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, prostaglandinas, bradicininas, fatores de crescimento, purinas, aminas, íons, entre outros (CHEN, YANG e GROSSER, 2013). Durante esse tipo de sensibilização, o limiar de excitação de nociceptores diminui de forma que estímulos não dolorosos ativam respostas dolorosas e estímulos nocivos evocam respostas ainda mais fortes do que no estado não sensibilizado (CAMPBELL e MEYER, 2006).

A dor aguda, em geral, é bem explicada em termos de nocicepção – estímulo nociceptivo excessivo originando sensação intensa e desagradável. Diferentemente, a maioria dos estados crônicos associa-se a aberrações da via fisiológica normal, dando origem a hiperalgesia (aumento da intensidade da dor associada a estímulo nocivo leve), alodinia (dor

provocada por estímulo não nocivo) ou dor espontânea sem qualquer estímulo precipitante (RANG e DALE, 2016).

Sabe-se que grande número de receptores e sistemas estão envolvidos na transmissão dolorosa. Por exemplo, os receptores opioides estão localizados pré e pós-sinápticamente, interrompendo a passagem de neurotransmissores através da sinapse nervosa que bloqueia ou atenua a experiência da dor. Esses receptores são acoplados à proteína G e divididos em três principais grupos: receptores mu (μ), delta (δ) e kappa (κ) com diferentes seletividades para os peptídeos endógenos individuais e para os vários opiáceos usados farmacologicamente (VANDERAH, 2007). Enquanto os agonistas do μ produzem euforia e promovem o enfrentamento do estresse, os agonistas do κ produzem disforia, respostas semelhantes ao estresse e afeto negativo, ao passo que os agonistas do δ reduzem a ansiedade e promovem o afeto positivo. A multiplicidade de receptores opioides inspirou o desenho de agonistas e antagonistas com diferentes potências, eficácias e seletividades para μ , δ e κ com base em relações de atividade de estrutura e com diferentes farmacocinéticas em um esforço para desenvolver analgésicos com menos efeitos adversos (PECINA *et al.*, 2018). Os receptores μ estão amplamente distribuídos em todo o encéfalo, e sua função relaciona-se com a integração motora-sensorial e percepção dolorosa. Os receptores δ são mais limitados em sua distribuição e encontram-se nas áreas relacionadas à olfação, neocórtex, caudado e putâmen, núcleo accumbens e amígdala. Parecem ter papel na integração motora, olfação e função cognitiva. Os receptores κ são observados no núcleo caudado e putâmen, accumbens, amígdala, hipotálamo, neuro-hipófise, eminência média e núcleo do trato solitário. Suas prováveis funções relacionam-se com balanço hídrico, percepção dolorosa e atividade neuroendócrina (BLOR, MAZE e SEGAL, 1991).

O óxido nítrico (NO, do inglês, *nitric oxide*) desempenha um papel complexo na modulação da transmissão nociceptiva tanto no sistema nervoso periférico como no sistema nervoso central. A ação nociceptiva do NO é conhecida por estimular a guanilil ciclase solúvel (GCs), que resulta na conversão de trifosfato de guanosina em GMPC, que então modula a atividade de muitos alvos nas células (PKG, canais iônicos e fosfodiesterases). O NO pode interagir com muitos sistemas, como os receptores NMDA e COXs, para induzir o efeito hiperalgésico. Além disso, o NO pode ter efeito duplo na regulação dos processos de dor, ou seja, pode mediar a nocicepção ou induzir um efeito antinociceptivo (CURY *et al.*, 2011). Em se tratando do efeito analgésico do NO, há evidências que esse efeito também dependa da ativação de uma via de sinalização intracelular, envolvendo a via dos canais de K^+ cGMP/PKG/ATP-sensíveis. Adicionalmente, dependendo do local de estímulo, a via da L-

arginina/NO/cGMP pode induzir efeitos diferentes (nociceptivo ou antinociceptivo), uma vez que a injeção subcutânea desses fármacos em animais gera efeito antinociceptivo, à medida que a administração intradérmica de fármacos capazes de ativar a via NO/cGMP induz fenômenos nociceptivos. Esses achados sugerem que o NO possui papéis opostos pela existência de diferentes subconjuntos de neurônios sensoriais primários nociceptivos (VIVANCOS, PARADA e FERREIRA, 2003). Dessa forma, a via do óxido nítrico, inegavelmente, contribui para os mecanismos de ação analgésica de opioides, antiinflamatórios e outros analgésicos e pode favorecer o desenvolvimento de estratégias de novas terapias medicamentosas (CURY *et al.*, 2011).

Os canais de K^+ também estão envolvidos no processo de antinocicepção. A abertura desses canais bloqueia a propagação do estímulo nociceptivo, por aumentar a condutância a esse íon para o exterior da célula que leva a hiperpolarização celular (RANG *et al.*, 2012). Entre os vários tipos de canais de potássio envolvidos na antinocicepção, pode ser destacado o canal de potássio sensível à ATP (K^+ ATP) que está envolvido em processos centrais e periféricos. Além disso, sugeriu-se que fármacos que agem através da via do NO ativam a enzima guanilato ciclase aumentando assim a produção de GMPc que irá ativar a proteína quinase G (PKG), levando à ativação dos canais de K^+ , causando hiperpolarização das membranas diminuindo assim a excitabilidade neuronal (FEIN, 2011).

O sistema colinérgico possui importância na regulação de diversas funções fisiológicas. A acetilcolina modula a nocicepção por um padrão complexo de efeitos, mediando via múltiplas classes de receptores, incluindo receptores muscarínicos e nicotínicos. A modulação da nocicepção pelo sistema colinérgico se dá pela ativação de vias inibitórias descendentes colinérgicas ou não colinérgicas, e pela ativação de interneurônios inibitórios no corno dorsal da medula espinal. Dessa forma, o sistema colinérgico é considerado um importante sistema endógeno de controle da dor, sendo um possível alvo farmacológico (MILLAN, 2002; RAMANATHAN *et al.*, 2015; VANPATTEN e AL-ABED, 2017).

O sistema noradrenérgico é crucial para várias atividades do corpo, incluindo a modulação da dor. Esse sistema parece modular diferentes componentes da experiência dolorosa e, conseqüentemente, sua manipulação tem resultados comportamentais distintos. Durante o controle descendente da dor originado do tronco cerebral, é liberada noradrenalina a partir dos axônios descendentes que controla a atividade dos neurônios nociceptivos no corno dorsal. Sabe-se que há interação dos receptores opioides tipo μ com os receptores adrenérgicos α_2 na modulação do processo nociceptivo. No corno dorsal, a ativação dos receptores adrenérgicos provoca uma redução moderada da estimulação dos neurônios de projeção pelas

fibras aferentes primárias, além da redução da liberação de transmissores pró-nociceptivos, como a substância P e o glutamato, a partir dos terminais centrais destas. Essa atividade antinociceptiva pode acontecer também por permitir interações com outros transmissores como a galanina, GABA e encefalinas, uma vez que as vias descendentes inibitórias adrenérgicas estão localizadas com estes transmissores (MANSIKKA *et al.*, 2012; LLORCA-TORRALBA *et al.*, 2016).

Assim, o tratamento bem-sucedido da dor deve ser focado em diferentes fatores: físicos, psicológicos, sociais, espirituais e culturais, já que cada indivíduo tem seu próprio limiar de dor (CIPAMONTI, 2012). Em relação aos tratamentos medicamentosos, a classificação destes para o controle da dor pode ser dividida em agentes analgésicos opioides e agentes analgésicos não opioides. Os opioides são reconhecidos como os medicamentos mais eficazes e amplamente usados no tratamento da dor intensa, já que atuam ativando os receptores opioides (NALAMACHU, 2013). Produzem analgesia através de sua ação no cérebro, no tronco encefálico, na medula espinal e nas terminações periféricas dos neurônios aferentes primários, atuando principalmente sobre o receptor opioide μ (mu) (GOLAN, 2009). Alguns dos agonistas opióides vastamente utilizados na medicina são morfina, oxicodona, fentanil, codeína, tramadol (KRAYCHETE *et al.*, 2014).

Entre os analgésicos não opioides, podemos destacar os AINES (anti-inflamatórios não esteroides), que atuam inibindo as enzimas cicloxigenases (COX), as quais catalisam a formação das prostaglandinas que medeiam o processo de inflamação. Ainda entre os não opioides estão os fármacos adjuvantes, como os antidepressivos, anticonvulsivantes, ansiolíticos e antipsicóticos, que são indicados para outras condições patológicas, mas possuem importante ação analgésica (QUEREMEL e DAVIS, 2021). A **tabela 1** sumariza alguns medicamentos com efeito analgésico vastamente utilizados, bem como o modo de ação e os efeitos adversos.

Tabela 1 – Alguns fármacos utilizados no tratamento da dor.

Agente	Modo de ação	Indicação	Efeitos colaterais
Ácido acetilsalicílico	Inibidor não seletivo de COX	Analgésico, antipirético, antiinflamatório, inibição da agregação de trombócitos	Asma analgésica, tríade de Samter, risco elevado de sangramento, síndrome de Reye, queixas gastrointestinais.
Ibuprofeno	Inibidor não seletivo de COX	Analgésico, antipirético, antiflogístico	Dores de cabeça, vertigem, zumbido, queixas gastrointestinais.
Paracetamol	Inibidor não seletivo de COX	Analgésico, antipirético	Hepatotoxicidade.
Celecoxibe	Inibidor seletivo de COX-2	Analgésico em quadros de artrite e artrose	Ataque cardíaco, acidente vascular cerebral.
Morfina	Liga-se aos receptores opioides	Analgésico para dor crônica	Náuseas e vômitos, depressão respiratória, sonolência, tontura, infertilidade, depressão, tolerância, dependência.
Codeína	Liga-se aos receptores opioides	Analgésico, antitussígeno	Constipação, sentidos confusos, sedação, sonolência.
Tramadol	Liga-se aos receptores opioides	Analgésico	Constipação, náuseas, xerostomia, dispepsia, tontura, sonolência, cefaleia, vertigem.
Fentanil	Liga-se aos receptores opioides	Analgésico de curta duração	Náuseas, vômitos, prisão de ventre, diarreia, coceira generalizada.
Metadona	Liga-se aos receptores opioides	Analgésico de longa duração, síndrome de abstinência a opioide	Náuseas; vômitos, sentidos confusos; tontura; sensação de queda iminente; sedação; sonolência.
Oxicodona	Liga-se aos receptores opioides	Analgésico	Sonolência, tontura, coceira, constipação, náusea, vômito.
Amitriptilina	Anticolinérgico	Antidepressivo	Tontura, sonolência, boca seca, náuseas, prisão de ventre, interação com vários outros medicamentos.
Gabapentina	Liga-se aos canais de cálcio	Anticonvulsivante	Sonolência, tontura, cansaço, ganho de peso, dor de cabeça, dificuldade de visão, tremor, dormência, perda de apetite, náuseas ou vômitos.

(LECTURI, 2021)

Como observado na tabela acima, apesar de estarem disponíveis uma gama de medicamentos para o tratamento da dor com diversificados modos de ação, os efeitos adversos

associados ao uso, especialmente em terapias mais prolongadas, limitam os protocolos ou a qualidade de vida dos pacientes. Assim, há uma busca por novas moléculas com potencial analgésico, que sejam potentes e diminuam ou eliminem esses efeitos indesejados.

Para identificar novos alvos e caracterizar o perfil analgésico potencial de novos compostos para o alívio da dor, uma série de modelos em animais experimentais foi desenvolvida, principalmente em roedores, refletindo vários tipos de dor. Dependendo do modelo, as medições podem abranger comportamentos espontâneos, bem como dor evocada por várias modalidades. Em contraste com a natureza polimórfica da dor que é descrita como uma sensação em humanos, a dor em animais pode ser estimada apenas examinando suas reações (XIE, 2011). Considerando o envolvimento de diferentes vias de sinalização no processo nociceptivo, a avaliação da nocicepção em modelos animais ainda é necessária como uma ferramenta importante na compreensão dos fenômenos álgicos. A observação de comportamentos estereotipados clássicos após a estimulação nociceptiva é de grande valia nos estudos envolvidos na transmissão e processamento da nocicepção, bem como na avaliação dos mecanismos de novos compostos com potencial analgésico (TJOLSEN e HOLE, 1997), por exemplo, que diferenciem a atividade antinociceptiva de uma molécula por mecanismos centrais, envolvendo mediadores imediatos; ou por mecanismos periféricos, envolvendo mediadores produzidos mais tardiamente, principalmente aqueles que são liberados durante o processo inflamatório.

2.2 Modelos animais de nocicepção

Como já abordado, a nocicepção, ou a capacidade de detectar um estímulo potencialmente prejudicial, é uma função fisiológica fundamental em mamíferos e, na verdade, em muitas outras espécies. No entanto, como não se pode dizer que os animais relatam dor, qualquer reação a tais estímulos não evidencia necessariamente experiência de dor (SANDKÜHLER, 2009). É limitado medir a dor em animais diretamente, já que a experiência emocional presumivelmente desagradável de dor é inferida de comportamentos semelhantes à dor que podem incluir a retirada de uma parte do corpo de um estímulo, agitação, um aumento de lambadura da área afetada e vocalizações após estimulação sensorial. Esses ensaios podem ser divididos em testes dependentes de estímulos e independentes de estímulos (ABBOUD *et al.*, 2021). A distinção entre nocicepção e dor, portanto, sublinha uma diferença fundamental na terminologia quando se refere a assuntos comunicantes e não comunicantes. Assim, como a medição da dor diretamente em roedores é insuficiente, foi necessário desenvolver métodos

indiretos para quantificar e avaliar comportamentos semelhantes à dor em animais não anestesiados que sejam confiáveis, reprodutíveis, sensíveis e específicos (MOGIL, 2009). Além disso, a ação farmacológica (por exemplo, eficácia, potência, duração de ação) de um amplo espectro de analgésicos para reduzir as respostas sensoriais reflexivas em modelos de roedores de nocicepção aguda e dor crônica têm demonstrado correspondência consistente com analgesia humana (YAKSH, 2006).

Os modelos animais de nocicepção têm dois componentes importantes: o método de estímulo e a posterior medição final do comportamento. Os modelos mais adequados, seja uma lesão, aplicação de agentes químicos ou outras manipulações, devem produzir nocicepção recapitulando os mecanismos de condições clínicas específicas. Medidas de comportamentos reflexivos, como limiares de retirada a estímulos nocivos, têm sido usadas há décadas para examinar os mecanismos de dor. Estes se mostraram claramente úteis para o avanço da compreensão da base fisiológica da nocicepção, identificação de neurotransmissores, receptores, mensageiros intracelulares e genes envolvidos em comportamentos de dor e permitiram melhor compreensão dos tratamentos farmacológicos e não farmacológicos existentes para a dor (GREGORY *et al.*, 2013).

Um dos primeiros métodos térmicos desenvolvidos é o teste de retirada da cauda (do inglês, *tail flick test*), onde um estímulo de calor é aplicado e a latência para remover a cauda é registrada. Esse teste foi primeiro relatado por D'amour e Smith (1941), mas houveram modificações posteriores. Esse teste é um reflexo espinal que ocorre em animais espinalizados, no entanto, a latência do movimento da cauda é modificada pelo tronco cerebral e locais corticais (DEWEY *et al.*, 1970). Posteriormente, o teste da placa quente foi desenvolvido e envolve o registro da latência para lamber ou retirar a pata da placa aquecida (WOOLFE e MACDONALD, 1944). Acredita-se que o ato de escolher qual pata levantar para evitar a placa de aquecimento requer estruturas supraespinhais, indicando que o teste da placa quente vai além dos reflexos nocifensivos e requer integração em estruturas superiores.

A dor visceral é normalmente estudada pela irritação do peritônio ou órgãos ocultos da pelve e do abdome e pela observação do comportamento doloroso. O modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético é usado para estudar os nociceptores que revestem o peritônio e mede a dor espontânea. Este teste é usado para avaliação de substâncias analgésicas, no entanto, é um modelo não seletivo para estudos de drogas antinociceptivas (COUTO *et al.*, 2011). A irritação local produzida pela injeção intraperitoneal do ácido acético provoca a liberação de uma variedade de mediadores, tais como a substância P, bradicininas,

prostaglandinas, bem como das citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α (PINHEIRO *et al.*, 2011).

O teste do glutamato é realizado aplicando-se solução de glutamato na pata traseira do animal que gera o comportamento de lambar ou morder a pata. Essas respostas comportamentais de dor são características de alodínia e hiperalgesia mecânica ou térmica, indicando que o glutamato tem um papel importante na transmissão dor. A ativação de receptores glutamatérgicos, especialmente do tipo NMDA, pode estimular a atividade de enzimas intracelulares e a produção de uma variedade de segundos mensageiros intracelulares, como óxido nítrico (NO), pela óxido nítrico sintase (NOS), que por sua vez produz hiperalgesia (BEIRITH, SANTOS e CALIXTO, 2002).

O modelo da capsaicina é feito com aplicação intradérmica ou tópica de capsaicina, um componente pungente da pimenta caiena que ativa o receptor potencial vaniloide transiente tipo 1 (TRPV1). Esse modelo tem sido usado para estudar mecanismos de hipersensibilidade mecânica e térmica em humanos e animais por décadas. No entanto, a capsaicina também induz uma reação exacerbada de uma maneira dependente da dose, indicando uma inflamação neurogênica e resultando em hipersensibilidade mecânica (até 4 h) e térmica (até 1 h) sustentada. Em particular, a capsaicina provoca uma hipersensibilidade mecânica primária no local da injeção a partir da estimulação direta dos nervos periféricos e uma hipersensibilidade mecânica secundária na área não lesada ao redor da injeção, que reflete principalmente o aumento do processamento da dor (SAKURADA, 1992; CHU *et al.*, 2020).

Como estímulo de dor inflamatória temos o modelo da carragenina, em que a injeção subcutânea de solução de carragenina induz um inchaço agudo que se torna máximo após 3–5 h da injeção e diminui em 24 h. Essa injeção está associada ao aumento da sensibilidade aos estímulos térmicos e mecânicos no local da lesão (hiperalgesia primária), bem como fora do local da lesão (hiperalgesia secundária). Dor espontânea, como proteção reforçada da pata traseira, redução do peso no membro posterior, comportamentos de esquiva e redução da atividade de corrida também são geralmente observados. Este modelo pode simular condições associadas a lesões de tecidos, como entorses, distensões e miosite (CHAPLAN *et al.*, 1994; JUNIOR, 2019).

As medidas comportamentais da sensibilidade mecânica são comumente usadas para medir a alodínia e a hiperalgesia. Originalmente usado para testar a sensibilidade mecânica em humanos, os limiares de retirada mecânica da pata usando filamentos de von Frey são comumente usados em roedores (DIXON, 1980). O teste de filamento de von Frey mede a hiperalgesia cutânea ou alodínia e é, portanto, mais útil para simular condições clínicas com

sensibilidade cutânea aprimorada, como dor neuropática, dor pós-operatória, inflamação ou mesmo osteoartrite (CUNHA *et al.*, 2004).

Outros modelos já foram relatados por reproduzirem doenças ou condições que alteram a estrutura e as funções do sistema nervoso, causando dor neuropática, como modelo de ligadura do nervo espinhal; causando dor inflamatória aguda ou crônica, como modelos de poliartrite, pancreatite, osteoartrite; causando dor disfuncional, como modelos de fibromialgia (KALIYAPERUMAL *et al.*, 2020), entre outros, que não foram foco de trabalho desta tese, mas que podem ser guiados posteriormente a partir dos resultados obtidos neste trabalho.

Os modelos clássicos de roedores geralmente são adequados para testes pré-clínicos. No entanto, ainda é passível de melhorias na busca de modelos animais mais refinados que imitem fielmente as doenças humanas. Em particular, considera-se as diferenças de sexo, variações genéticas ou interações de comorbidade que contribuam para descrever uma maior diversidade de mecanismos que expliquem com precisão as situações clínicas. Além disso, a definição de medidas comportamentais mais precisas ajudará a desenvolver um conjunto apropriado de experimentos para melhores mecanismos de testes e tratamentos potenciais (ABBOUD *et al.*, 2021).

Normas e diretrizes internacionais, bem como códigos e legislação específicos de cada país, foram desenvolvidos para proteger o bem-estar dos animais usados para pesquisa. Na verdade, é um requisito para a publicação de dados *in vivo* em periódicos de alta qualidade que os padrões e diretrizes relevantes sejam estritamente observados (McGRATH *et al.*, 2010). A estrutura para esses padrões e diretrizes é baseada nos princípios dos 3Rs (substituição, redução, refinamento; do inglês, *replace, reduce, refine*). Diante disso, esses vários modelos experimentais e métodos têm sido utilizados na descoberta de novas drogas antinociceptivas, incluindo o isolamento de moléculas a partir de plantas e outras fontes naturais, seguidos de estudos de eficácia e segurança.

O conhecimento sobre os mecanismos nociceptivos atingiu avanços significativos, porém contrasta diretamente com a ausência de avanços nas estratégias terapêuticas. Apesar dos progressos, a dor continua a ser insuficientemente tratada, sobretudo nos idosos. As doenças propensas a causar experiências dolorosas aumentam com a idade e causam dor nas articulações, lombares, musculoesqueléticas, fibromialgia, cefaleia, entre outras (JACKSON *et al.*, 2016). É conhecido que os fármacos utilizados para o controle da dor são os mesmos há décadas, como exemplo dos opioides e anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), que, sem dúvidas, são eficazes em grande parte das condições dolorosas, mas apresentam efeitos adversos que tornam o tratamento clínico limitado (NEGUS *et al.*, 2006; WOODCOCK *et al.*,

2007). Assim, grupos de pesquisa tem se empenhado em descobrir e estudar novas moléculas com potencial para aliviar a dor e, dentre essas, podemos destacar as proteínas e os peptídeos.

2.3 Potencial terapêutico de proteínas e peptídeos

A descoberta de um medicamento é um processo que visa identificar molécula sintética ou uma biomolécula para uma avaliação abrangente como um potencial candidato a medicamento (SINHA e VOHORA, 2018). Os produtos naturais contribuem muito para a história e o panorama de novas entidades moleculares (NEMs), possuem enorme diversidade estrutural e química que não pode ser igualada por nenhuma biblioteca de pequenas moléculas sintéticas e estimulam novas descobertas na química, biologia e medicina (NEWMAN e CRAGG, 2012). Uma avaliação de todas as NEMs em 2016 aprovadas pela FDA (*Food and Drug Administration*) revela que os produtos naturais e seus derivados representam mais de um terço de todas as NEMs. Quase metade deles são derivados de mamíferos, um quarto de microrganismos e um quarto de plantas (PATRIDGE *et al.*, 2016).

As plantas são importantes fontes de substâncias naturais biologicamente ativas, muitas das quais podem ser utilizadas como modelo para a síntese de compostos ativos e/ou seletivos para o tratamento de determinada doença. A descoberta de medicamentos a partir de plantas medicinais levou ao isolamento de drogas, como cocaína, codeína, digitoxina e quinina, além da morfina, das quais algumas ainda estão em uso (OJAH, 2020). Os estudos de plantas medicinais têm aumentado gradualmente em todo o mundo porque as fontes naturais e a variedade dessas plantas permitem que elas complementem as abordagens farmacológicas modernas (YI *et al.*, 2018). Adicionalmente, Oliveira (2005) destaca que os produtos naturais não só complementam moléculas sintéticas, mas exibem características relevantes insuperáveis por esses compostos. Uma característica chave dos produtos naturais é a sua enorme diversidade estrutural e química e são uma fonte de novos compostos com arranjos estruturais diversificados que possuem atividades biológicas interessantes e, assim, desempenham um papel inestimável no processo de descoberta de drogas (BRAHMACHARI, 2012). Com a crescente aceitação de que os constituintes da diversidade química das plantas medicinais são bem adequados para fornecer os suportes para futuras drogas, haverá mais desenvolvimento no uso de novos constituintes químicos (OJAH, 2020).

O uso de plantas medicinais tem uma longa história, no entanto, tem alguns inconvenientes, incluindo alterações de compostos a depender do clima, desenvolvimento simultâneo de compostos sinérgicos que levam a efeitos adversos, mudanças inesperadas na

bioatividade devido a variabilidade de preparo e armazenamento. Portanto, é interessante o isolamento dos compostos bioativos causadores dos efeitos farmacológicos, a fim de determinar esses efeitos, bem como possíveis doses tóxicas para controlar a qualidade da formulação terapêutica (JAMSHIDI-KIA *et al.*, 2018; ZHANG, 2011).

Proteínas e peptídeos possuem papel importante em novas terapias. Quando comparados com drogas típicas de baixa massa molecular que ainda dominam o mercado farmacêutico, peptídeos e proteínas são altamente seletivos por possuírem múltiplos pontos de contato com seu alvo. O fato de uma molécula ser mais seletiva, deve também resultar na diminuição dos possíveis efeitos colaterais e tóxicos gerados por sua administração (CRAIK *et al.*, 2013).

Como consequência, o mercado global de proteínas terapêuticas foi avaliado em cerca de US \$ 93,14 bilhões em 2018 e deve crescer para US \$ 172,87 bilhões, com uma taxa anual de crescimento de 16,7% até 2022. Esse mercado está crescendo muito mais rapidamente que o das pequenas moléculas e terá uma proporção ainda mais acentuada no futuro. Nos últimos cinco anos, a FDA aprovou 213 medicamentos, dentre os quais 44 são proteínas terapêuticas, principalmente anticorpos monoclonais (*THE BUSINESS RESEARCH COMPANY*, 2020). Diabetes, osteoporose, mieloma, linfoma, hiperparatireoidismo, dano na pele e dor, foram algumas doenças alvo dos medicamentos à base de peptídeos aprovados entre 2015-2020 (**Tabela 2**). É importante notar que vários dos novos medicamentos à base de peptídeos aceitos pela FDA surgiram a partir dos esforços de grupos acadêmicos. Isso destaca a importância de fomentar canais de cooperação sólidos e eficientes entre a academia e a indústria, com o objetivo de manter e melhorar o bem-estar da sociedade (LA TORRE e ALBERICIO, 2020).

Tabela 2. Medicamentos de proteínas/peptídeos aprovados pela FDA (2015-2020).

Ano	Nome comercial	Indicação
2015	Insulin Degludec Tresiba®	Diabetes
2015	Ixazomib Ninlar®	Mieloma múltiplo
2016	Adlyxin Lixisenatide®	Diabetes
2017	Abaloparatide Tymlos®	Osteoporose
2017	Angiotensin II Giapreza®	Hipotensão
2017	Etelcalcetide Parsabiv®	Hiperparatiroidismo
2017	Macimorelin Macrilen®	Deficiência no hormônio de crescimento
2017	Plecanatide Trulance®	Constipação idiopática crônica
2017	Semaglutide Ozempic®	Diabetes
2018	¹⁷⁷ Lu DOTA-TATE Lutathera®	Tumores neuroendócrinos
2019	⁶⁸ Ga DOTA-TOC®	Tumores neuroendócrinos
2019	Afamelanotide Scenesse®	Dano na pele e dor
2019	Bremelanotide Vyleesi®	Desejo sexual hipoativo em mulheres
2019	Enfortumab Vedotin-Ejfv PADCEV®	Nectina-4 expressa em câncer
2019	Polatuzumab Vedotin-Piiq Polivy®	Linfoma
2020	Imcivree®	Controle de peso
2020	Hepcludex®	Infecção crônica causada pelo vírus da hepatite D

US Food and Drug Administration 2021.

A América do Norte é a região dominante no mercado de medicamentos de proteínas, devido ao maior trabalho de pesquisa e desenvolvimento de proteínas terapêuticas em andamento na América do Norte e na Europa. A crescente conscientização entre indivíduos e profissionais de saúde da importância das proteínas terapêuticas alimentou esse mercado. Ásia-Pacífico e América Latina são os mercados mais lucrativos, e essas duas regiões provavelmente exibirão uma taxa de crescimento forte durante os próximos anos (*LIFE SCIENCES E TRANSFORMATIONAL HEALTH*, 2020).

Peptídeos isolados de fontes naturais, como insulina e hormônio adenocorticotrófico (ACTH), forneceram medicamentos que salvaram vidas na primeira metade do século XX. Quando a elucidação da sequência e a síntese química de peptídeos se

tornaram viáveis na década de 1950, a oxitocina e a vasopressina sintéticas também entraram em uso clínico. Venenos de artrópodes e cefalópodes tornaram-se um tesouro de peptídeos bioativos e o isolamento de produtos naturais de fontes exóticas tornou-se uma estratégia popular para a identificação de novas terapêuticas potenciais (LAU e DUNN, 2018). Em relação aos peptídeos e proteínas de plantas, muitos trabalhos mostram o potencial de aplicação dessas proteínas na saúde, inclusive em tratamentos contra nocicepção e dor.

Trabalhos já considerados clássicos pela literatura destacam o papel quimiopreventivo de inibidores de proteases em modelos de carcinogênese experimental, particularmente de moléculas capazes de inibir a quimiotripsina e enzimas *quimiotripsina-like*, tal como tem sido descrito para o inibidor de Bowman-Birk isolado a partir de sementes de soja (*Glycine max*) (KENNEDY, 1998). Rasouli *et al.* 2017, relataram potencial antiangiogênico dependente da dose (5–40 µg/ml) do inibidor de tripsina (3 kDa) purificado de sementes de melão (*Cucumis melo*) demonstrando que o efeito antitumoral devido à inibição da proliferação de células endoteliais, migração e tubulogênese e pode ser considerado como antagonista do receptor de integrina com potencial para interromper vários aspectos da angiogênese e progressão do tumor.

Dados da literatura também mostraram que proteínas do látex da planta *Calotropis procera*, apresentaram efeitos farmacológicos quando testadas em diferentes modelos experimentais justificando o seu uso medicinal para tais finalidades (SILVA *et al.*, 2010). Pereira *et al.* (2011) mostraram que as sementes de *Moringa oleifera* apresentam uma proteína ligante à quitina (*Mo-CBP₄*) capaz de inibir de forma significativa na dose de 10 mg/kg (via intraperitoneal e oral) as contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos, um modelo experimental de dor inflamatória tradicionalmente utilizado como ferramenta de triagem para descoberta de novos agentes analgésicos.

Albuminas extraídas de sementes de *Crotalaria retusa* (20 mg/kg, i.p.) mostraram atividade antiinflamatória e antinociceptiva provavelmente devido ao efeito inibitório sobre a migração de neutrófilos da lectina presente nesses extratos proteicos (ARAGÃO *et al.*, 2017). Em um modelo inflamatório crônico, Rivanor *et al.*, 2014, demonstraram pela primeira vez o efeito anti-inflamatório de uma lectina de *Caulerpa cupressoides* (CCL) na dose de 10 mg/kg (via intravenosa), em um modelo de artrite na articulação temporomandibular induzida por zymosan em ratos. Foi demonstrado posteriormente que o mecanismo antinociceptivo é parcialmente dependente da inibição de TNF- α , IL-1 β , COX-2 e ICAM-1 e independente do sistema canabinoide e opioide NO/cGMP/PKG/K⁺/ATP (RIVANOR *et al.*, 2018). Um estudo com outra lectina de *Lonchocarpus araripensis* mostrou o efeito antinociceptivo atribuído a essa

proteína (10 mg/kg, via intravenosa) e o envolvimento com a via L-arginina/NO/GMPc/K⁺ ATP (ASSREUY *et al.*, 2020).

As proteínas e os peptídeos podem ser considerados produtos bioativos ideais porque intervêm, essencialmente, em todos os processos biológicos e reações, caracterizando-se por elevada eficiência e potência, ou seja, atuam especificamente e em baixas concentrações. Dessa forma, a aplicação das proteínas e peptídeos, como moléculas terapêuticas, é de grande importância para o tratamento de várias doenças (WANG, 1999).

De acordo com o exposto, as proteínas e peptídeos se tornam uma alternativa viável para a obtenção de novos fármacos, visto que doses pequenas tem potencial para promover efeitos semelhantes às drogas disponibilizadas no mercado, desfavorecendo a ocorrência de efeitos adversos. Entretanto, a manutenção da complexidade estrutural dessas macromoléculas pode ser uma barreira para que sejam usadas terapêuticamente, visto que possuem conformação tridimensional, com estrutura secundária, terciária e em alguns casos quaternária, com ligações frágeis e grupos químicos reativos. A perda dessas estruturas ou até mesmo modificações na cadeia de resíduos dos aminoácidos podem provocar a perda da atividade, meia-vida plasmática curta e biodisponibilidade oral limitada (SINHA e TREHAN, 2003; LAU e DUNN, 2018). Logo, a busca por proteínas terapêuticas que naturalmente resistam a essas problemáticas somadas a estratégias de *drug delivery* cada vez mais modernas, são realizadas vastamente.

Entre as inúmeras espécies vegetais de interesse medicinal, pode ser destacada a *Morinda citrifolia* L., uma vez que, uma grande variedade de compostos naturais tem sido encontrada com propriedades farmacológicas interessantes, inclusive potencial antinociceptivo atribuído a uma proteína extraída dessa espécie, que é relatado por nosso grupo de pesquisa.

2.4 *Morinda citrifolia* L.

Noni é o nome comum de *Morinda citrifolia* L., também chamada de Indian mulberry, Ba Ji Tian, nono, fruta queijo e nhau dependendo da cultura de cada país e região (WANG *et al.*, 2002). É uma árvore pequena, originária do Sudeste da Ásia, tendo sido difundida pelo homem através da Índia até as ilhas da Polinésia Francesa, onde a planta tem sido consumida há séculos para fins medicinais (WANG *et al.*, 2002; BUI *et al.*, 2006).

A espécie *Morinda citrifolia* L. pertence à família Rubiaceae; subfamília Rubioideae; ao gênero *Morinda* e é da espécie *M. citrifolia*. A árvore tem um porte pequeno, arbustivo ou arbóreo, medindo, geralmente, cerca de 3 a 4 metros de altura, podendo chegar até 10 metros. Possui folhas grandes e elípticas, com 5-17 cm de comprimento e 10-40 cm de largura. Possui flores pequenas, tubulares e brancas, agrupadas e inseridas em pedúnculo (MORTON, 1992; DIXON, McMILLEN e ETKIN, 1999). O fruto tem formato oval, com 4 a 10 cm de comprimento e 2 a 6 cm de largura. Sua cor é dependente do seu estágio de maturação: à medida que o fruto avança para o estágio final, a cor varia de verde, passando por amarelo e finalmente apresentando um tom branco (McCLATHEY, 2002; WANG *et al.*, 2002). Sua polpa é carnosa, suculenta, de sabor e aroma desagradáveis, devido ao ácido butírico exalado (VEIGA *et al.*, 2005). As sementes de *M. citrifolia* L. têm aproximadamente 4 a 9 mm de comprimento, possuem coloração marrom, com formato oblongo triangular, semelhante à semente de maçã (NELSON, 2005). O aspecto geral das principais partes da planta é mostrado na **Figura 3**.

Endêmica em regiões tropicais, a planta se adaptou bem às características edafoclimáticas do Brasil e aplica-se adequadamente à problemática do uso irracional de plantas. Não há relatos de quando o noni foi introduzido no Brasil, mas é encontrada cultivada em pomares caseiros especialmente na região Nordeste (BARBOSA *et al.*, 2017). Segundo Correia *et al.* (2011), o cultivo do noni é relatado nos Estados do Rio Grande do Norte, Acre, São Paulo, Minas Gerais, Pará, Sergipe, Ceará, dentre outros. No Ceará, a EMBRAPA Agroindústria Tropical estabeleceu o cultivo de noni e trabalhos desenvolvidos pela empresa foram realizados a fim de empregar tratamentos pré-germinativos para abreviar o tempo, aumentar e uniformizar a germinação das sementes de noni. Os frutos produzidos pela EMBRAPA no município de Trairí (Ceará) possuem o peso médio de 166 g, o comprimento médio de 101 mm e a largura média de 56 mm. Foi relatado que para cada quilo de fruto, são obtidas em torno de 1.200 sementes (SOUSA, 2010).

Figura 3 – Representação dos aspectos gerais das partes de *Morinda citrifolia* L.



(A) Visão geral da planta de *Morinda citrifolia* L., (B) das folhas, (C) flores (D) frutos e (E) sementes. Fontes: Nelson, 2005; Reserthealth.com, 2012; Mountain-nsea.blogspot.com, 2012.

Há alguns anos tem sido verificado o crescente interesse e uso popular deste pequeno arbusto, pois têm sido difundidas informações sobre a sua capacidade de cura de diversas enfermidades, inclusive o câncer. Alguns desses estudos chegam a afirmar que o fruto alcança mais de 120 problemas de saúde que podem ser tratados, e até curados, com a planta e seus extratos (RODRIGUEZ, 2004). Experimentos *in vitro* e *in vivo* com o suco, extratos ou compostos isolados demonstram que o noni pode conferir benefícios à saúde por promover efeito antimicrobiano (JAYARAMAN *et al.*, 2008; MURRAY *et al.*, 2008; WEST *et al.*, 2012; SAGHIRI *et al.*, 2013), atividade anticancerígena (LV *et al.*, 2011; NUALSANIT *et al.*, 2012), antioxidante (LIN *et al.*, 2013; MASUDA *et al.*, 2013; KRISHNAIAH *et al.*, 2015), antifúngica (JAYARAMAN *et al.*, 2008); no sistema cardiovascular, antimicrobiana e anti-sepse

(JAYARAMAN *et al.*, 2008; WEST *et al.*, 2012), anti-inflamatória (SU *et al.*, 2001; DUSSOSSOY *et al.*, 2011; PALU *et al.*, 2012, FLETCHER *et al.*, 2013).

Em relação ao potencial analgésico da planta, YOUNOS *et al.*, (1990) mostraram que o extrato aquoso da raiz do noni administrado pela via intraperitoneal (800 mg/kg) reduziu significativamente o número de contorções abdominais em camundongos. Esse efeito foi antagonizado por naloxona, o que indicou um efeito central tipo morfínico. Um dos principais estudos em relação a atividade analgésica foi realizado por WANG *et al.* (2002) que observaram que ratos alimentados com o fruto obtiveram maior tolerância à dor quando comparado ao grupo escolhido como placebo. Os autores afirmaram que esta propriedade é devido a presença de fitoconstituintes alcalóides em sua composição química. Já Basar *et al.* (2010) mostraram o efeito antinociceptivo do purê dos frutos (solução a 10% p/v) no teste da placa quente em camundongos, em que houve redução da sensibilidade à dor comparativamente ao analgésico central tramadol. O efeito foi parcialmente revertido pela naloxona, sugerindo uma possível ação opioide. O extrato aquoso da folha de Noni exibiu ação antinociceptiva em um teste de contorção induzido por ácido acético (SERAFINI *et al.*, 2011). A fração clorofórmica extraída da raiz rica em damnacanthol mostrou efeitos antinociceptivos por reduzir nocicepção no teste da formalina. Esses efeitos são mediados, em parte, pela interferência com receptores de histamina em camundongos (OKUSADA *et al.*, 2011). Um estudo a partir dos frutos liofilizados mostrou atividade antinociceptiva dependente da dose (250 mg/kg e 500 mg/kg) após administração oral nos testes de imersão da cauda e teste da formalina, indicando mecanismo central e periférico (SINGH *et al.*, 2013). Sousa (2017) mostrou que a fração polissacarídica sulfatada extraída dos frutos (10 mg/kg, i.p.) possui efeito antinociceptivo evidenciado no teste das contorções abdominais e na segunda fase do teste da formalina.

Apesar dos efeitos farmacológicos relatados, alguns trabalhos que têm ressaltado que o consumo indiscriminado de produtos dessa espécie, sem o conhecimento prévio de seus princípios ativos e efeitos tóxicos, podem ocasionar problemas graves à saúde. Millionig *et al.* (2005) descreveram o primeiro caso de hepatotoxicidade relacionado ao consumo de suco de noni. Um homem de 45 anos foi encaminhado à Divisão Clínica de Gastroenterologia e Hepatologia da Universidade Médica de Insbrueque, Áustria, por apresentar níveis elevados de transaminases. Posteriormente, o paciente admitiu que estava ingerindo diariamente, nas últimas semanas, um copo de suco de noni. O relato sugeriu uma reação de hepatotoxicidade por drogas, o que foi confirmado por uma biópsia hepática. O paciente interrompeu imediatamente o consumo do produto e em um mês os níveis de transaminases estavam normalizados. Stadlbauer *et al.* (2005) relataram mais dois casos de hepatotoxicidade

associados ao consumo de suco de noni. Um homem de 29 anos com histórico de hepatite aguda após tratamento de uma infecção respiratória com paracetamol foi readmitido após um ano com um quadro de insuficiência hepática aguda. O paciente relatou ter consumido 1,5 litros do suco Tahitian Noni® Juice (TNJ) nas três semanas anteriores, além de ter ingerido diariamente nos últimos nove dias cerca de sete gramas de uma mistura de ervas chinesas. Outras causas potenciais de insuficiência hepática foram descartadas e os autores classificaram como “possível” a relação de causalidade entre o consumo suco de noni e a doença hepática, segundo critério internacional de avaliação. Um outro estudo com noventa e seis pessoas sobre as propriedades gerais do noni teve o afastamento de uma das participantes por apresentar elevação nos níveis das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), ambas diretamente e intensamente ligadas ao fígado (NDA, 2006). Os autores (MILLONIG *et al.*, 2005 e STADLBAUER *et al.*, 2005) sugerem que as antraquinonas poderiam ser as substâncias responsáveis por essa ação hepatotóxica relatada. Moraes *et al.*, (2016) mostraram que o extrato aquoso dos frutos de *M. citrifolia*, a 5 e 10 mg/kg, predominantemente, induz hepatotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade no fígado, medula óssea e células de sangue periférico de ratos. Estes resultados sugerem efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos e instabilidade genética, o que indica precauções quanto ao consumo de formulações de medicamentos ou preparações populares baseadas nessa substância.

Apesar de estudos acerca do potencial terapêutico e efeitos adversos do consumo da planta, associados majoritariamente com metabólitos secundários, os estudos com proteínas do noni ainda representam uma parcela mínima quando comparada a pequenas moléculas. Dessa forma, sabendo das características vantajosas das proteínas nas terapias citadas anteriormente, nossa equipe iniciou a investigação bioquímica e farmacológica das proteínas das sementes de *Morinda citrifolia* L. visando identificar princípios bioativos promissores para o tratamento da inflamação e da dor que tivessem segurança farmacológica para os futuros recursos terapêuticos.

Baseados nesses relatos, nosso grupo de pesquisa isolou a partir de sementes de *Morinda citrifolia* L. uma proteína transferidora de lipídeos do tipo 1, que mostrou ter efeito antinociceptivo promissor (CAMPOS *et al.*, 2016).

2.5 Proteínas Transferidoras de Lipídeos (LTPs)

As LTPs de plantas são moléculas pequenas, de ponto isoelétrico básico (8 -10) e são codificadas por uma família multigênica (KIRUBAKARAN, 2008; CARVALHO e GOMES, 2007; KADER 1996). Podem ser classificadas em dois grupos principais diferenciados pela massa molecular (KALLA *et al.*, 1994): LTP do tipo 1, com massa de 9 kDa e LTP do tipo 2, com massa molecular de 7 kDa. Esse sistema de classificação foi insuficiente para classificar todas as LTPs somente pelo parâmetro de massa molecular, então outros sistemas de classificação foram propostos (**Tabela 3**) (BOUTROT *et al.*, 2008; EDSTAM *et al.*, 2011; JOLY e MATTON 2015), embora a classificação convencional dos tipos LTP1 e LTP2 seja mais utilizada.

Tabela 3 - Sistemas de classificação de Proteínas Transferidoras de Lipídeos (LTPs).

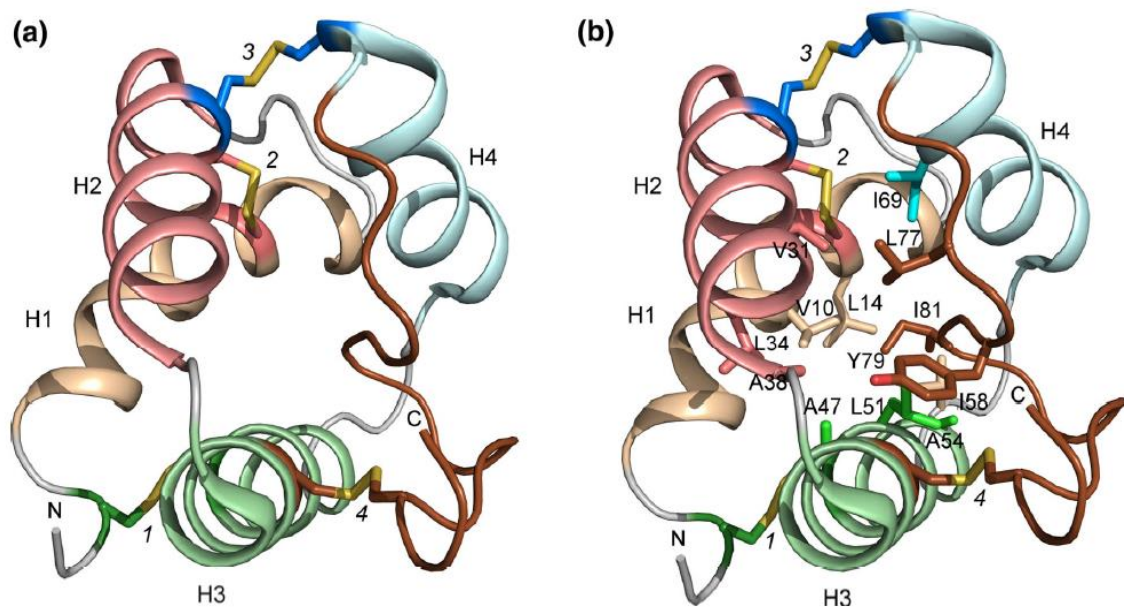
Tipos	Parâmetro	Referência
LTP1 e LTP2	Massa molecular	Kalla <i>et al.</i> , 1994.
LTPI, LTPII, LTPIII, LTPIV, LTPV, LTPVI, LTPVII, LTPVIII, LTPIX	Similaridade de sequência	Boutrot <i>et al.</i> , 2008.
LTP1, LTP2, LTPc, LTPd, LTPg, LTPe, LTPf, LTPh, LTPj e LTPk	Similaridade da sequência	Edstam <i>et al.</i> , 2011.
LTP1, LTP2, LTPc, LTPe, LTPd, LTPg, LTPx	Conservação de cisteínas	Joly e Matton, 2015.

As LTPs do tipo 1 são compostas por aproximadamente 90-95 resíduos de aminoácidos, dos quais oito são cisteínas em posições conservadas ao longo da estrutura primária (EDSTAM *et al.*, 2011). Essas oito cisteínas estão ligadas entre si de modo a formar quatro pontes dissulfeto que auxiliam na estrutura terciária da proteína (HAN *et al.*, 2001 e SALCEDO *et al.*, 2007) conferindo estabilidade estrutural.

Estruturas tridimensionais de LTP1s de plantas, determinadas por cristalografia de raios X ou espectroscopia de RMN (Ressonância Magnética Nuclear), são compostas de quatro α -hélices e uma região C-terminal (GIZATULLINA *et al.*, 2013). A estrutura geral das LTP1s

é estabilizada pelas quatro pontes dissulfeto e caracterizada pela presença de uma cavidade hidrofóbica com espaço suficiente para a ligação de uma ou duas moléculas de lipídeos (KADER, 1996). A **figura 4** ilustra essas características com a estrutura tridimensional de uma LTP1 de trigo (*Triticum aestivum*) (SALMINEN, BLOMQUIVIS e EDQVIS, 2016). Em função de sua estrutura compacta, as LTPs tendem a ser extremamente estáveis, resistindo à desnaturação térmica e à digestão com pepsina (ASERO *et al.*, 2001; LINDORFF-LARSEN e WINTHER, 2000; PASTORELLO *et al.*, 2003; SCHEURER *et al.*, 2004; WU *et al.*, 2004), característica interessante para uma possível administração pela via oral.

Figura 4 - Estrutura 3D de TaLTP1 (*Triticum aestivum* Lipid Transfer Protein).



(a) As quatro hélices na dobra 3D de TaLTP1 são estabilizadas por quatro pontes dissulfeto. A primeira ponte (1; resíduos Cys mostrados como bastões verdes) liga a parte N-terminal (N) a H3 (verde), a segunda (2; Cys como bastões rosa) conecta H1 (rosa claro) a H2 (rosa), o terceiro (3; Cys como bastões azuis) conecta H2 (rosa) a H4 (ciano claro), e a última ponte dissulfeto (4; Cys como bastões marrons) liga a parte C-terminal (C; marrom) a H3. (b) A cavidade interna de TaLTP1 é formada por resíduos de cada uma das hélices. Os resíduos que revestem a cavidade são mostrados como bastões e coloridos da mesma forma que as hélices.

Interações hidrofóbicas desempenham um papel importante na ligação de lipídeos. LTP1s de plantas ligam uma grande variedade de moléculas hidrofóbicas, incluindo ácidos graxos, desde C10 a C18, fosfolipídeos, lisoderivados, prostaglandina, e acil-coenzima A (GOMAR *et al.*, 1996; SODANO *et al.*, 1997; LERCHE *et al.*, 1997; CHARVOLIN *et al.*, 1999; TASSIN-MOINDROT *et al.*, 2000; HAN *et al.*, 2001). Embora as LTP1s exibam dobras

semelhantes, a sua capacidade de ligação a lipídeos depende da forma e do volume da cavidade interna, da localização dos aminoácidos no interior da cavidade interna, e variações na organização dos elementos da estrutura secundária. A capacidade das LTP1s de retirar lipídeos de micelas ou bicamadas também varia de uma proteína para outra (GIZATULLINA *et al.*, 2013). Interessantemente, a atividade de transferência de lipídeos das LTPs, poderia ser vantajosa quando aplicada na entrega de drogas (sistemas de *drug delivery*), solucionando problemas relacionados à permeabilidade da membrana lipídica, podendo ser utilizada na farmacologia e na indústria de medicamentos e cosméticos (SHI *et al.*, 2013).

As LTPs nas plantas podem estar envolvidas em diversos processos da fisiologia celular e desenvolvimento: formação da cera e cutina, adesão do tubo polínico, maturação e germinação de sementes, amadurecimento de frutos, respostas a estresses bióticos e abióticos (FICH, SEGERSON e ROSE, 2016; GUO, GE e MA, 2013, GANGGADHAR *et al.*, 2016; DIZ *et al.*, 2011). Além disso, estão envolvidas na defesa direta contra patógenos bacterianos, fúngicos e virais, mas seu mecanismo de ação ainda não é totalmente compreendido (LI *et al.*, 2016; YEATS e ROSE, 2008). Sua atividade antimicrobiana se deve principalmente à capacidade de perturbar a integridade e a permeabilidade das membranas biológicas dos patógenos (ZOTTICH *et al.*, 2011).

Adicionalmente, sabe-se que essa classe de proteínas está relacionada com ocorrências alérgicas, como exemplo, as Rosáceas da região do Mediterrâneo, com reações alérgicas causadas por proteínas transferidoras de lipídeos não específicas pertencentes à família LTP1 (SALCEDO *et al.*, 2007, VAN REE, 2002). A ampla distribuição de LTP1 em alimentos derivados de plantas, a recente evidência de alergias alimentares induzidas por LTP1 de um número de espécies botanicamente diferentes de *Rosaceae* (CIARDIELLO *et al.*, 2010; KRAUSE *et al.* 2009, PASTORELLO *et al.*, 2000, PASTORELLO *et al.*, 2003, SAN MIGUEL-MONCIN *et al.*, 2003) e a demonstração de reação cruzada imunológica entre LTP1 de tais espécies (ASERO *et al.*, 2002; AL., 2004, TORDESILLAS *et al.*, 2009) indicam que estas proteínas representam pan-alérgenos de plantas.

Nosso grupo de pesquisa isolou, a partir de sementes de *Morinda citrifolia* L., uma LTP do tipo 1, nomeada *McLTP*₁. Estruturalmente, essa proteína possui massa de 9,4 kDa estimadas por espectrometria de massas e um rendimento de 6,12% do extrato proteico bruto. Os primeiros 33 resíduos aminoácidos obtidos de *McLTP*₁ (AVPCGQVSSALSPCMSYLTGGGDDPEARCCAGV) mostraram similaridade com outras proteínas transferidoras de lipídeos (LTPs) de outras espécies (*Triticum aestivum*, *Aegilops*

tauschii e *Vigna radiata*) incluindo quatro dos oito resíduos de cisteína conservados em outras LTPs (CAMPOS *et al.*, 2016).

Quanto à atividade anti-inflamatória de *McLTP*₁, em testes realizados, houve redução da migração celular em modelos experimentais de peritonite induzida por carragenina e a diminuição do edema de pata induzido por carragenina e dextrana. Além disso, a proteína demonstrou a capacidade de inibir significativamente a produção das citocinas IL-1, IL-6 e TNF- α ($p < 0,05$) e promover um aumento na produção da citocina anti-inflamatória IL-10, sugerindo que os efeitos anti-inflamatórios observados para *McLTP*₁ podem estar relacionados à modulação dos níveis de citocinas (CAMPOS *et al.*, 2017). Em todos os testes realizados para verificar a atividade anti-inflamatória de *McLTP*₁, o efeito foi observado por ambas as vias de administração (oral e intraperitoneal), mostrando que a proteína é capaz de resistir às proteases naturais do trato gastrointestinal e atingir o sítio que desencadeia o efeito terapêutico, sem a necessidade de administração por outras vias menos interessantes, como a endovenosa. Somado a isso, foi detectada proteína circulante no plasma dos animais após sua administração por gavagem. O trabalho provou que a atividade antinociceptiva se mantém por até 12 horas após o tratamento oral e que a proteína mantém estabilidade estrutural, mostradas por dicroísmo circular e atividade quando armazenada por até 6 meses, protegida da incidência de luz (COSTA, 2016).

Um estudo ainda mais recente, mostrou que *McLTP*₁ tem efeito antibacteriano e protetor sobre a sepse. O trabalho concluiu que além de inibir o crescimento do fungo do gênero *Candida*, *McLTP*₁ foi capaz de potencializar o efeito do antibiótico anfotericina B. O efeito antibacteriano foi observado em bactérias gram-positivas do gênero *Staphylococcus* spp. e, adicionalmente, foi capaz de reduzir a atividade de fatores de virulência bacterianos e de modular o efeito do antibiótico oxacilina. Em tratamentos profiláticos e terapêuticos, *McLTP*₁ aumentou a sobrevivência dos animais com sepse (SOUZA *et al.*, 2018).

Os estudos anteriores também mostraram o efeito antinociceptivo dependente da dose de *McLTP*₁ em testes *in vivo*, no modelo das contorções induzidas por ácido acético. O pré-tratamento de camundongos com *McLTP*₁ (8 mg/kg, i.p. e v.o.) também diminuiu as fases neurogênica e inflamatória da nocicepção no teste da formalina e indicaram que mecanismos opioides podem estar envolvidos nas propriedades analgésicas dessa proteína (CAMPOS *et al.*, 2016). O trabalho abriu a perspectiva de explorar as vias pelas quais a proteína demonstra ação antinociceptiva.

Sabendo dos possíveis efeitos alergênicos destacados na literatura para outras LTPs, nosso grupo de pesquisa vem buscando entender se *McLTP*₁ também teria esse potencial. Lutif

(2015) realizou alinhamentos com a sequência N-terminal de *McLTP*₁ que mostrou similaridade com alérgenos de trigo, amendoim e kiwi, entretanto, Costa (2016) mostrou que *McLTP*₁ não foi capaz de causar toxicidade em camundongos, sem mudanças significativas nos parâmetros comportamentais, bioquímicos, hematológicos e histopatológicos, mesmo quando a proteína foi administrada diariamente por 28 dias na dose terapêutica (8 mg/kg), utilizando modelos definidos pela OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*). Também foi testada a dose de 80 mg/kg no modelo de toxicidade aguda e, após 14 dias, os animais não apresentaram alterações em qualquer parâmetro (COSTA, 2016).

A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) propõe que os estudos pré-clínicos de segurança sejam guiados por: estudos de toxicidade de dose única (aguda), toxicidade de doses repetidas, toxicidade reprodutiva, citotoxicidade, genotoxicidade, tolerância local e carcinogenicidade além de estudos de interesse na avaliação da segurança farmacológica e toxicocinética (ANVISA, 2013). Logo, estudos de toxicidade pré-clínicos *in vitro* somados aos dados já obtidos *in vivo* de toxicidade de *McLTP*₁ são importantes para avaliar sua segurança.

As ações farmacológicas citadas anteriormente, bem como os testes de estabilidade e toxicidade mostram que *McLTP*₁ é uma molécula promissora. O mecanismo de ação anti-inflamatório foi explorado e, diante do potencial antinociceptivo relatado por nosso grupo de pesquisa, se faz necessário conhecer seus mecanismos de ação, bem como avançar nos estudos de segurança farmacológica, de modo a investigar suas potencialidades de uso racional.

Diante do exposto, a seguinte hipótese foi elaborada:

“*McLTP*₁ modula a nociceção central e periféricamente, via receptores opioides e por inibição da hipernociceção inflamatória, independente da via de administração, além de apresentar segurança pré-clínica sem danos cito ou genotóxicos.”

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Determinar os mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo de *McLTP*₁ utilizando administração pelas vias oral e intraperitoneal.
- Verificar a toxicidade pré-clínica de *McLTP*₁ em modelos *in vitro*.

3.2 Objetivos Específicos

- Estudar a participação dos mecanismos centrais e periféricos no efeito antinociceptivo de *McLTP*₁;
- Investigar a participação da via opioide nas ações de *McLTP*₁;
- Avaliar a participação da via NO/cGMP/K⁺ATP, receptores α 2-adrenérgicos e muscarínicos no efeito antinociceptivo de *McLTP*₁ pelo teste das contorções induzidas por ácido acético;
- Verificar a participação do sistema glutamatérgico e receptores vaniloides nas ações da proteína no teste de labedura da pata;
- Investigar o efeito da *McLTP*₁ em modelo de hipernocicepção mecânica utilizando carragenina e PGE2 como estímulo nociceptivo;
- Comparar os mecanismos antinociceptivos utilizados pela proteína nas diferentes vias de administração (intraperitoneal ou oral);
- Avaliar atividade depressora dos animais tratados com *McLTP*₁ no teste de rotarod;
- Avançar nos estudos de toxicidade pela investigação do potencial cito e genotóxico de *McLTP*₁.

4. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

As sementes de *Morinda citrifolia* L. foram doadas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisa de Agroindústria Tropical (CNPAT EMBRAPA), Fortaleza – Ceará. O plantio da espécie está localizado na Fazenda Antônio Alberto (latitude: 3°19'54.59"S/longitude: 39°18'50.89"O), no município do Trairi - Ceará. As sementes foram utilizadas para a produção de uma farinha fina em moinho elétrico de café. A farinha foi tratada com éter de petróleo (1:10 (m/v)), à temperatura ambiente, para remoção dos lipídeos e, posteriormente, armazenadas à 4 °C até sua utilização.

McLTP₁ foi purificada de acordo com a metodologia descrita por Campos *et al.* (2016), com modificações. Para obtenção do extrato total, a farinha delipidada das sementes de noni foi suspensa em tampão de extração Tris-HCl 50 mM, pH 8,5, contendo NaCl 250 mM na proporção de 1:5 (m/v). A suspensão foi mantida sob contínua agitação por 3 horas (4 °C) e após esse intervalo foi filtrada em pano de trama fina. O material retido no tecido de filtração foi ressuspensionado no tampão de extração na proporção de 1:3 (m/v) e re-extraído por 2 horas sob as mesmas condições sendo, em seguida, filtrado. Os filtrados foram combinados e centrifugados a 10.000 x g (30 minutos, 4 °C) e o sobrenadante foi utilizado para quantificação de proteínas (BRADFORD, 1976). O extrato obtido foi posto em contato com ácido tricloroacético (TCA) 2,5 %, sob agitação, à temperatura ambiente e armazenado a -20 °C por 30 minutos para precipitação das proteínas. O material foi centrifugado a 10.000 x g (30 minutos, 4 °C) e o sobrenadante submetido a uma diálise exaustiva contra água destilada (cut-off 3 kDa). Amostras (14 mL) da fração solúvel em TCA 2,5 % foram submetidas à ultrafiltração (Vivaspin®/cut off 30 kDa) a 8.000 x g (30 minutos, 4 °C) e, em seguida, o material foi liofilizado. Após a obtenção de cada lote de proteína liofilizada, a pureza foi verificada por eletroforese em gel de poliacrilamida, seguindo o protocolo descrito por Laemmli (1970). O perfil eletroforético foi verificado como indicado na **figura 05**.

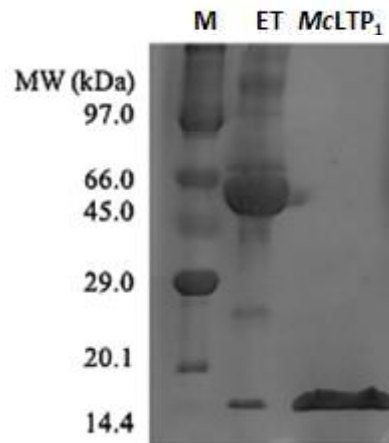


Figura 5 - Perfil eletroforético (SDS–PAGE 15%; 20 µg). M - Marcador de massa molecular (kDa); ET: Extrato total das sementes de *Morinda citrifolia*; *McLTP*₁: proteína purificada. Bandas proteicas foram coradas com *Coomassie Brilliant Blue R-250*.

A partir da proteína liofilizada em estoque, foram conduzidos os estudos referentes ao mecanismo antinociceptivo de *McLTP*₁, que deu origem ao **artigo 1** intitulado “*Mechanisms underlying the antinociceptive effect of a lipid transfer protein isolated from Morinda citrifolia seeds in different mice acute pain models*”, e experimentos relacionados à toxicidade pré-clínica *in vitro* (citotoxicidade e genotoxicidade) de *McLTP*₁ que foram agregados aos resultados obtidos anteriormente durante o trabalho de mestrado da autora desta tese, que além de outros objetivos, investigou a toxicidade pré-clínica de *McLTP*₁ em modelos animais em dose única e em doses repetidas. O trabalho intitulado “*Safety assessment of a lipid transfer protein isolated from Morinda citrifolia L. seeds, in a perspective of its use as a novel anti-inflammatory drug*” engloba todos os dados de toxicidade pré-clínica realizados até o momento com a proteína e está descrito como **artigo 2**.

5. ARTIGO 1

Mechanisms underlying the antinociceptive effect of a lipid transfer protein isolated from *Morinda citrifolia* seeds in different mice acute pain models

Andréa S. Costa^a, Dyély C. O. Campos^a, Luana D. Carmo^b, Nylane M. N. Alencar^b, Maria E. A. de Moraes^b, Raquel de O. Rocha^c, Hermógenes D. Oliveira^{a*}

^a Department of Biochemistry and Molecular Biology, Campus do Pici Prof. Prisco Bezerra, 60440-900, Fortaleza, CE, Brazil

^b Drug Research and Development Center, Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, 60430-270 Fortaleza, CE, Brazil

^c Department of Plant Pathology, Center for Applied Genetic Technologies, University of Georgia, 30602, Athens, Georgia, USA

* Corresponding author: Hermógenes D. Oliveira [hermogenes@ufc.br] . Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Campus do Pici Prof. Prisco Bezerra, 60440-900, Fortaleza, CE, Brazil. Tel.: + 55 85 3366 9789; Fax: + 55 85 3366 9139.

Abstract

Previous reports have shown that a lipid transfer protein isolated from *Morinda citrifolia* L. seeds (*McLTP*₁, 9.4 kDa) displays antinociceptive activity in mice. This work aimed to investigate the mechanisms underlying the antinociceptive action of *McLTP*₁ in acute pain models. *McLTP*₁ (8 mg/kg) was purified as previously described and intraperitoneally or orally administered in mice. Thermal pain tests (hot plate and tail-flick) indicated an antinociceptive effect at the central supraspinal level, antagonized by naloxone (2 mg/kg, i.p.). Pretreatment with L-NAME (20 mg/kg) or glibenclamide (2 mg/kg) in the acetic acid-induced abdominal writhing test partially reversed the *McLTP*₁ effect, indicating that its action may result from the NO/cGMP/K⁺ATP pathway activation. *McLTP*₁ also reversed the nociceptive response in the glutamate- (3.7 ng/paw) and capsaicin-induced (1.6 µg/paw) paw licking test. Moreover, the antinociceptive effect of protein involves modulating inflammation by suppressing the carrageenan- (300 µg/paw) or PGE₂-induced (0.1 nmol/paw) hypernociception. Interestingly, *McLTP*₁ explores similar antinociceptive mechanisms when administered by oral or intraperitoneal routes. This study provides preclinical evidence that the antinociceptive action of *McLTP*₁ involves, at the central level, the opioid system activation. The stimulation of the NO/cGMP/K⁺ATP pathway and the blockade of the action/release of the inflammatory mediators, the TRPV1 modulation, and possibly the direct stimulation of nociceptive receptors by glutamate are mechanisms explored by *McLTP*₁ at the peripheral level.

Keywords: *Morinda citrifolia* L.; Lipid transfer protein; Antinociceptive mechanism.

1 Introduction

Pain is an alarm signal for maintaining and protecting the body against tissue damage. If this alarm relates to damage coming from outside the nervous system, it is classified as nociceptive. However, if the pain arises from abnormal neural activity, it is considered neuropathic [1]. Despite being a protective response, unrelieved pain is accompanied by functional adverse effects that ultimately lead to a decline in quality of life, including negative financial impacts to the patient and society [2]. One of the best strategies to provide adequate pain management is using modern drugs, yet many of them still present adverse effects that restrict their use [3].

Most first-line therapy drugs currently available still lack either long-term effectiveness (e.g., prolonged use of opioids increases pain sensitivity, instead of providing pain relief) or have an inadequate risk-benefit ratio (e.g., systemic administration of lidocaine reduces pain but simultaneously induces cardiac arrest) [4].

According to Chessel, Dudley, and Billinton [5], small-molecule drug therapies have dominated pain treatment. Nonetheless, most medical treatments do not work well and have numerous toxicities that preclude their long-term use. For example, standard therapies still use opioids and nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) with unacceptable toxicities, such as factors including cardiovascular risk, central side effects, tolerance to the pharmacological effect, and potential dependence [6].

Compared to small-molecule drugs, proteins used in therapeutics have distinct and advantageous traits: they have significantly greater surface area for binding, a higher affinity to the target, which decreases the potential for off-target effects, their metabolic products are known and safe, and due to their unique structure, it is possible to obtain stronger patent protection and explore proteins engineering tools to extend their half-life, enhance stability, and reduce immunogenicity [7-8].

Recently, some studies have characterized the antinociceptive activities displayed by various plant proteins. Aragão *et al.* [9] demonstrated that albumins (20 mg/kg; intraperitoneal route) obtained from seeds of *Crotalaria retusa* had significant anti-inflammatory, antinociceptive effects, and these activities involved the inhibition of neutrophil migration. Pires *et al.* [10] showed the antinociceptive activity of the lectin purified from *Lonchocarpus campestris* seeds after administration by intravenous route (10 mg/kg). Another lectin extracted from *Parkia platycephala* showed orofacial antinociceptive potential in zebrafish through the modulation of TRPV1 channels (20 μ L; intraperitoneal; 0.1 mg/mL) [11].

In recent years, our research group has demonstrated that a lipid transfer protein called *McLTP*₁ (9.4 kDa; UniprotKB accession number C0HJH5), isolated from *Morinda citrifolia* seeds, proved to be heat-stable and resistant to pepsin, trypsin, and chymotrypsin digestion. *McLTP*₁ (8 mg/kg) administered by intraperitoneal and oral route reduced the number of abdominal constrictions induced by acetic acid in mice and decreased neurogenic and inflammatory phases of nociception in the formalin test [12].

Regarding the anti-inflammatory effects of *McLTP*₁, the results obtained by Campos *et al.* [13] indicated the mechanism by which this protein prevents inflammation involves the modulation of pro and anti-inflammatory cytokines. However, the mode of action involved in its antinociceptive effects has not been fully understood. Thus, the present study intended to assess the mechanisms implicated in the effects of *McLTP*₁, using classical models of nociception, focusing on peripheral and central mechanisms. The *McLTP*₁ mechanisms were investigated after its oral or intraperitoneal administration to mice, providing a reference for future clinical use.

2 Materials and methods

2.1 Reagents and Drugs

Chemicals used for protein purification were analytical grade and obtained from local suppliers. Acetic acid, atropine, capsaicin, capsaizepine, glibenclamide, indomethacin, L-glutamic acid, N ω -nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride, prostaglandin E₂ and yohimbine were purchased from Sigma-Aldrich (USA). Morphine sulfate and naloxone chlorhydrate were obtained from Cristalia (Brazil).

2.2. Animals

Male Swiss mice (20-25 g) were obtained from the Central Animal Facility of the Federal University of Ceará - Brazil. They were housed at 25 ± 1 °C under a 12-h light-dark cycle with food and water provided *ad libitum*. The experiments were performed with 8 animals/group and *McLTP*₁ administered orally (p.o.) or intraperitoneally (i.p.) at the dose of 8 mg/kg. The vehicle used was 0.9 % NaCl. Care, handling, and experimental procedures were based on the Directive 2010/63/EU guidelines of the European Parliament and the European Union Council. The Institutional Committee approved the testing protocols for the Ethical Use of Animals of the Federal University of Ceará (CEUA - UFC no. 65/15).

2.3. Purification of *McLTP*₁

This study was registered in the SisGen - National Management System for Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge (SisGen - nº A174C2B). Noni seeds (*M. citrifolia* L.) were used to produce flour using a coffee grinder. The obtained flour was defatted with petroleum ether (1:10 w/v) at room temperature and used for protein extraction. Purification of *McLTP*₁ was performed according to the previously established method by

Campos *et al.* [12]. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis of *McLTP*₁ was performed under non reducing conditions on slab gels (10 x 8 cm x 0.75 mm, 15%) under constant (20 mA) current [14] to access the protein purity. After electrophoresis, the gels were stained with 0.5% R250 Coomassie blue for protein visualization.

To investigate the antinociceptive mechanisms of *McLTP*₁, the purified protein was solubilized in sterile saline (0.9% NaCl) immediately before the intraperitoneal or oral administration to mice. The total protein concentrations of *McLTP*₁ samples were estimated using the Bradford method [15], using bovine serum albumin as the standard.

2.4 Determination of central mechanisms involved in the antinociceptive effect of *McLTP*₁

2.4.1 Hot plate test

The hot-plate test was used to evaluate the participation of antinociceptive mechanisms by *McLTP*₁ at the central supraspinal level. The measurement of acute thermal nociception was performed as described by Franzotti *et al.* [16]. The animals were randomly divided into groups (n=8) and put on the surface of a heated plate at 55 ± 0.5 °C (AVS, Brasil). Mice were treated with vehicle (0.9% NaCl; p.o.), *McLTP*₁ (8 mg/kg; p.o. or i.p.), or the opioid analgesic morphine (5 mg/kg; s.c.). Additional testing included groups receiving morphine (5 mg/kg; s.c.) or *McLTP*₁ (8 mg/kg; p.o. or i.p.) 20 min after the treatment with naloxone (2 mg/kg, i.p.). The latency time of paw licking or jumping was recorded as seconds, and the cut-off time was fixed at 40 s. The nociceptive responses were observed at 30, 60, 90, 120, and 150 min following the treatments.

2.4.2 Tail immersion test

The tail immersion test was used to assess the nociception of *McLTP*₁ at the central spinal level. It was performed according to Alviano *et al.*, [17]. Mice were placed in a container tube, and one-third of the tail was immersed in a water bath set to 50 ± 1 °C. To prevent possible tissue damage, the cut-off time was determined at 20 s. The reaction time necessary for the animal to withdraw its tail was registered after 30 min (i.p.) or 60 min (p.o.) of *McLTP*₁ administration (8 mg/kg) and 20 min after morphine administration (5 mg/kg; s.c.).

2.5 Identification of peripheral mechanisms involved in the antinociceptive effect of *McLTP*₁

2.5.1 Acetic acid-induced abdominal writhing test

To pharmacologically characterize the antinociception induced by *McLTP*₁, the following drugs were used: L-nitro arginine methyl ester (L-NAME 20 mg/kg, i.p.); glibenclamide (2 mg/kg, i.p.); yohimbine (1 mg/kg, i.p.); and atropine (2 mg/kg, i.p.). Drugs were administered 30 min before *McLTP*₁ (8 mg/kg, p.o. or i.p.), and the nociceptive response was evaluated in mice 30 min (i.p.) or 60 min (p.o.) after *McLTP*₁ treatment to mice. Acetic acid was used as an inducer of abdominal writhing in this test [18], and the total number of writhings was recorded over 20 min following administration of 1% (v/v) acetic acid solution (0.1 mL/10 g body weight, i.p.). The antinociceptive effect was expressed as a percentage of inhibition of abdominal writhings compared to the control groups.

2.5.2 Glutamate or capsaicin-induced nociception

The participation of glutamate receptors was evaluated using the method described by Beirith *et al.* [19]. The participation of vanilloid receptor (TRPV1) in this study was verified by performing the capsaicin test according to Sakurada *et al.* [20]. Mice were pretreated with

vehicle (0.9% NaCl) or *McLTP*₁ (8 mg/kg, i.p.) 30 min before injection of glutamate (20 µL, 3.7 ng/paw) or capsaicin (20 µL, 1.6 µg/paw) in the intraplantar region of the right hind paws. Mice were also pretreated orally with *McLTP*₁ (8 mg/kg), 60 min before administering capsaicin or glutamate. In some experiments, animals received an intraplantar injection of capsazepine (a capsaicin receptor antagonist, 3.8 pg/paw) 30 min before the capsaicin injection. Immediately animals were placed in individual chambers, and the period in which the animal remained licking or biting the capsaicin- or glutamate-injected paw was counted for 5 or 15 minutes, respectively.

2.5.3 Mechanical hypernociception induced by carrageenan and PGE₂

Mechanical hyperalgesia was assessed by an electronic version of von Frey filaments (Insight Instruments LTDA, Ribeirão Preto, Brazil). The mechanical paw withdrawal threshold measurement was carried out using the up-and-down paradigm, as described previously by Chaplan *et al.* [21]. Mice were first acclimatized (1 and 2 h) in individual clear plexiglass boxes on an elevated wire mesh platform to allow access to the plantar surface of the hind paws. Then, von Frey filaments of increasing stiffness (0.02 and 1.4 g) were applied to the plantar surface of the animal hind with pressure high enough to bend the filament. Quick withdrawal of the hind paw during or immediately after application was considered a positive response. The intensity of the pressure (in grams) at the moment of paw withdrawal was automatically recorded.

The mechanical threshold was tested before (baseline) and after carrageenan (Cg; 300 µg/paw) or prostaglandin E₂ (PGE₂, 0.1 nmol/paw) intraplantar administration. Threshold values were assessed in mice pretreated with vehicle (0.9% NaCl) or *McLTP*₁ (8 mg/kg, i.p.) 30 min before the administration of Cg or PGE₂. When administered *McLTP*₁ (8 mg/kg) orally, mice received Cg or PGE₂ only 60 min after the treatment. Indomethacin (10 mg/kg, s.c.) was

used as a positive control in carrageenan-induced hyperalgesia protocols. The results were expressed as delta (Δ) withdrawal threshold (in grams), obtained by subtracting the measurements at each time point (1, 3, and 5 h after i.pl. carrageenan injection or 30 min after PGE₂-treatment) from the baseline values.

2.6. Rotarod

To evaluate the possible effects of *McLTP*₁ on mice motor coordination, the animals were submitted to the rotarod test [22]. Mice were selected 24 h previously by eliminating those which did not remain on the bar for three consecutive periods of 60 s. Animals were treated 30 minutes before the test with the vehicle (0.9% NaCl), *McLTP*₁ (8 mg/kg, i.p.), or diazepam (4 mg/kg, i.p.). For oral treatment, *McLTP*₁ (8 mg/kg) was administered 60 minutes before the test. The results were expressed as the time in sets for which the mice remained on the rotarod. The cut-off time used in this test was 60 s.

2.7 Statistical analysis

Statistical comparisons were performed using analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's tests available in GraphPad Prism™ (version 5.00, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). The results in this study are presented as the mean \pm SEM. P values lower than 0.05 were considered to indicate significant differences.

3. Results and Discussion

The management of pain using currently available analgesics has been overshadowed by various adverse effects. Morphine, the main drug of choice for treating pain, is known to cause dependence and tolerance upon its prolonged use [23]. Given the high prevalence of pain and the complications of pain management, there is a noticeable need to develop new analgesic drugs.

Formerly, our research group demonstrated that *McLTP₁*, a lipid transfer protein isolated from noni seeds, displayed antinociceptive activity after intraperitoneal and oral administration in mice [12]. Seeking to gain new insights into the mode of action of *McLTP₁*, the effects of this protein were studied in different models of nociception, exploring central and peripheral mechanisms of pain in a perspective of its use as a new therapeutic agent against pain.

Hot-plate and tail immersion tests were initially performed to verify the possible central antinociceptive activity of *McLTP₁*. The two tests are distinguished by the tendency of mice to respond to the pain stimuli that lead through the neuronal pathways [24]. These two thermal pain assays measure nociception primarily processed by supraspinal (hot plate) and spinally-mediated (tail immersion) responses [25].

Table 1 shows the antinociceptive profile of oral and intraperitoneal-administered *McLTP₁* (8 mg/kg), assessed during the hot-plate test. Pre-treatment with *McLTP₁* exhibited significant antinociceptive activity ($p < 0.05$) for all times of measurements via the oral route and the treatment maintained the effect up to 120 min when via the intraperitoneal route. The effect presented by *McLTP₁* after 30 min (i.p.) and 60 min (i.p. and p.o.) was not statistically different ($p > 0.05$) from the results obtained after treating the animals with morphine (5 mg/kg, s.c.). Pretreatment with naloxone (2 mg/kg, i.p.), a non-selective opioid antagonist, reversed *McLTP₁* antinociceptive activity administered by both routes. The ability of *McLTP₁* to prolong

the latency of feeling thermal discomfort suggests the involvement of centrally-mediated antinociception, given the response is considered supra spinally mediated in the hot plate test. Additionally, the effects of *McLTP*₁ explore an opioid-mediated mechanism since it was reversed by naloxone.

Table 1. Antinociceptive effect of *McLTP*₁ using the hot-plate test in mice.

Treatment	Dose (mg/kg)	Reaction time after the first stimulus (s)				
		30 min	60 min	90 min	120 min	150 min
Vehicle	-	16 ± 0.8	17 ± 1.2	15 ± 0.9	16 ± 0.1	16 ± 0.9
<i>McLTP</i> ₁ , i.p.	8	36 ± 0.6 [*]	34 ± 0.8 [*]	26 ± 0.7 ^{*,a}	20 ± 0.2 ^{*,a}	16 ± 0.7 ^a
<i>McLTP</i> ₁ , p.o.	8	22 ± 0.7 ^{*,a}	39 ± 0.5 [*]	21 ± 0.7 ^{*,a}	20 ± 0.2 ^{*,a}	20 ± 0.5 [*]
Morphine	5	38 ± 0.9 [*]	34 ± 0.7 [*]	34 ± 0.4 [*]	26 ± 0.9 [*]	21 ± 0.9 [*]
Nal + Morphine	2 + 5	10 ± 0.4 ^{*,a}	8 ± 0.9 ^{*,a}	13 ± 0.5 ^a	13 ± 0.3 ^{*,a}	14 ± 0.1 ^a
Nal + <i>McLTP</i> ₁ , i.p.	2 + 8	12 ± 0.9 ^{*,a}	11 ± 0.6 ^{*,a}	11 ± 0.6 ^{*,a}	12 ± 0.9 ^{*,a}	14 ± 0.6 ^a
Nal + <i>McLTP</i> ₁ , p.o.	2 + 8	14 ± 0.4 ^a	10 ± 0.4 ^{*,a}	10 ± 0.4 ^{*,a}	10 ± 0.8 ^{*,a}	11 ± 0.3 ^{*,a}

The results are shown as mean ± SEM (n = 8) of the reaction time after the thermal stimulus in seconds (s). Vehicle = saline (0.9% NaCl), Nal = Naloxone (2 mg/kg; i.p.). The animals were pretreated with *McLTP*₁ 8 mg/kg 30 min (i.p.) or 60 min (p.o.) before the application of the thermal stimulus. **p* < 0.05 vs. the vehicle group and ^a*p* < 0.05 vs. the morphine group (One-way ANOVA, followed by Tukey's test).

The antinociceptive effect of *McLTP*₁ on tail immersion test in mice is shown in Fig. 1. The dose of 8 mg/kg of *McLTP*₁ failed to increase the reaction time to the thermal stimulus, regardless of the route of administration. Morphine (5 mg/kg, s.c.) significantly

reduced ($p < 0.05$) the antinociceptive response in this test. These observations suggest that *McLTP*₁ does not operate in the spinal mechanism in the nociceptive transmission.

Campos *et al*, [12] showed that the pretreatment of mice with *McLTP*₁ (8 mg/kg, i.p. and p.o.) decreased neurogenic and inflammatory phases of nociception in the formalin test. Likewise, naloxone (2 mg/kg, i.p.) antagonized the antinociceptive effect of *McLTP*₁, suggesting that the analgesic properties of this protein are mediated by opioid mechanisms, thus corroborating with the results previously obtained in the hot plate test.

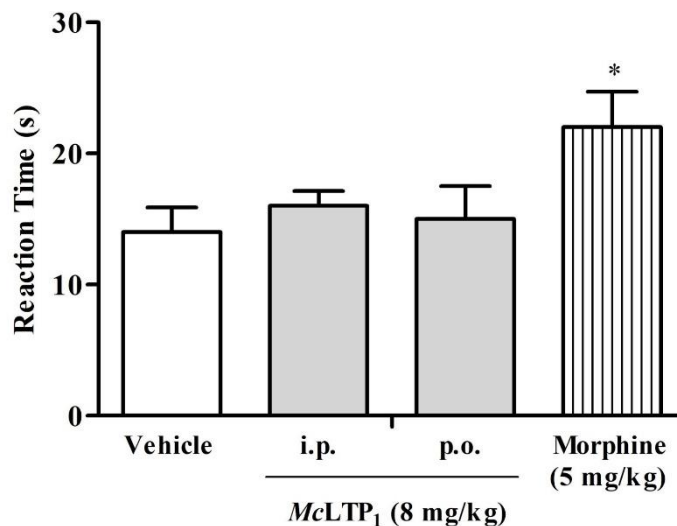


Fig. 1. Effect of *McLTP*₁ on pain-induced responses in tail immersion test. The results show the mean \pm SEM ($n = 8$). Vehicle = saline (0.9% NaCl). The animals were pretreated with *McLTP*₁ 8 mg/kg 30 min (i.p.) or 60 min (p.o.) before the application of the thermal stimulus. * $p < 0.05$ indicates a significant difference compared to the vehicle group using one-way ANOVA, followed by Tukey's test.

Despite extensive research efforts, oral delivery of therapeutic peptides or proteins is still a challenge for pharmaceutical industries and researchers. A number of factors, including high proteolytic activity and low pH conditions of the gastrointestinal tract, act as major barriers in the successful delivery of intact peptides/proteins to the targeted site [26]. Interestingly,

*McLTP*₁ shows an antinociceptive effect and a common mode of action by both oral and intraperitoneal routes.

Previously, *McLTP*₁ ability to inhibit nociceptive responses suggested a peripheral antinociception mode of action [12]. Based on this, we decided to determine further the mechanism of action of *McLTP*₁ in the acetic acid-induced abdominal writhing test, a nonselective antinociceptive model. It has been known that acetic acid, used to induce abdominal writhings, causes algisia by liberating various endogenous substances that excite the peripheral nociceptors, including histamine, prostaglandins, bradykinin, substance P, and cytokines [27, 28].

Pretreatment of mice with L-NAME (20 mg/kg, i.p.), an inhibitor of nitric oxide synthase (NOS), partially reversed the antinociceptive effect of *McLTP*₁ (8 mg/kg) in 20.50% concerned to i.p. treatment and in 33.33%, when investigated the oral treatment with this protein. Moreover, glibenclamide (2 mg/kg, i.p.), an ATP-sensitive K⁺ channel antagonist, was also able to reverse the antinociceptive effect of *McLTP*₁ (in 35.90% and 47.21% of inhibition of abdominal writhes, respectively) (Fig. 2). This data supports the idea that the *McLTP*₁ produces its peripheral antinociceptive effect with the participation of the NO/cGMP/K⁺ATP pathway. Other plant proteins have demonstrated the involvement of this pathway in their antinociceptive effect. Assreuy *et al.* [29] showed that the antinociceptive effect of *Lonchocarpus araripensis* lectin (10 mg/kg; i.v.) involved activation of the L-arginine/NO/cGMP/K⁺ATP pathway.

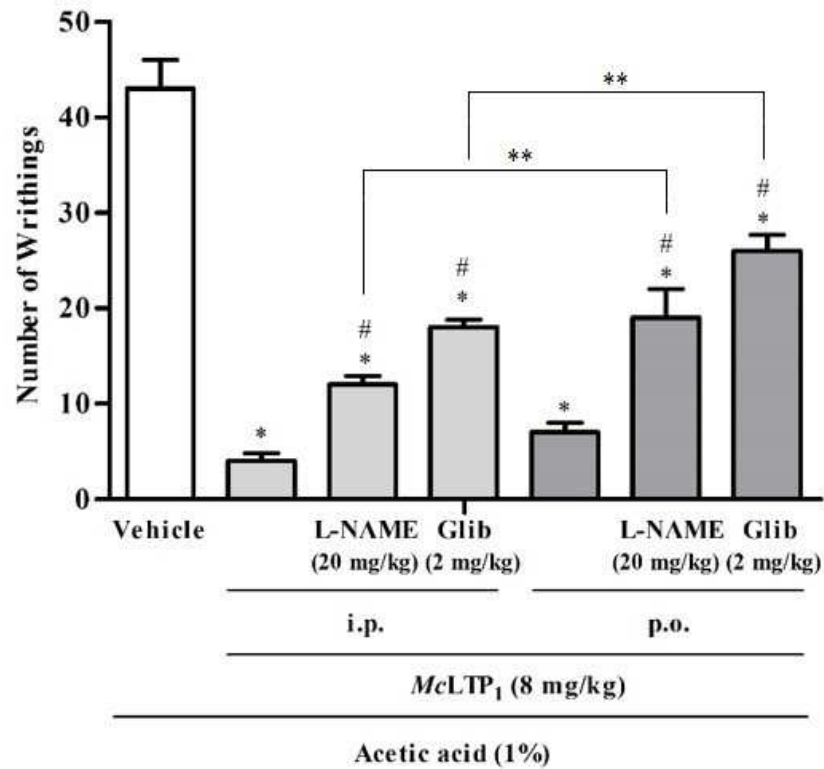


Fig. 2. Involvement of NO/cGMP/K⁺ATP pathway in the modulation of antinociceptive responses by *McLTP*₁ using the acetic acid-induced writhing test in mice. Vehicle = saline (0.9% NaCl), L-NAME (20 mg/kg, i.p.), and glibenclamide (2 mg/kg, i.p.) were administered 30 min before *McLTP*₁. The nociceptive response was evaluated in mice 30 min (i.p.) or 60 min (p.o.) after the treatment with *McLTP*₁ (8 mg/kg). The results show the mean ± SEM (n = 8). **p* < 0.05 indicates a significant difference compared to the vehicle group. #*p* < 0.05 indicates a significant difference when compared L-NAME or glibenclamide with *McLTP*₁ only. ***p* < 0.05 indicates a significant difference when compared *McLTP*₁ i.p. with *McLTP*₁ p.o. after administration of L-NAME or glibenclamide, using one-way ANOVA, followed by Tukey's test.

Herein, we also investigated the involvement of muscarinic and α 2-adrenergic receptors in the antinociceptive effects of *McLTP*₁. Pretreatment of mice with atropine (2 mg/kg) was not able to reverse the antinociceptive effect of *McLTP*₁, administered by oral or intraperitoneal routes. Similar to the results observed for the pretreatment with atropine, the administration of yohimbine (1 mg/kg), an α 2-adrenoceptor antagonist, did not cause loss of the antinociceptive effects of *McLTP*₁ (data not shown). Thus, our data support the idea that

adrenergic or muscarinic receptors are unlikely to be involved in the antinociceptive action of *McLTP*₁.

The excitatory amino acid glutamate acts as a significant neurotransmitter participating in many physiological and pathological states. Evidence indicates that it plays a substantial role in nociceptive processing at the peripheral, spinal cord, and supraspinal sites via different types of glutamate receptors [30- 31]. To verify whether *McLTP*₁ interferes with the glutamate-mediated nociceptive transmission, the glutamate paw licking test was conducted.

The results obtained in the glutamate test are depicted in Fig. 3. *McLTP*₁-treated animals displayed a significant ($p < 0.05$) reduction in paw licking time, exhibiting a decrease of 78.30% (i.p.) and 67.19% (p.o.) of the nociceptive behavior caused by i.pl. injection of glutamate into the mouse hind paw, compared to the vehicle group. Such findings suggest that the antinociception induced by *McLTP*₁ is associated with its interaction with the glutamatergic system. However, these findings are preliminary, and further experiments are necessary to elucidate what class of glutamate receptors (GluRs) - ionotropic or metabotropic - are precisely related to the antinociceptive effects described above.

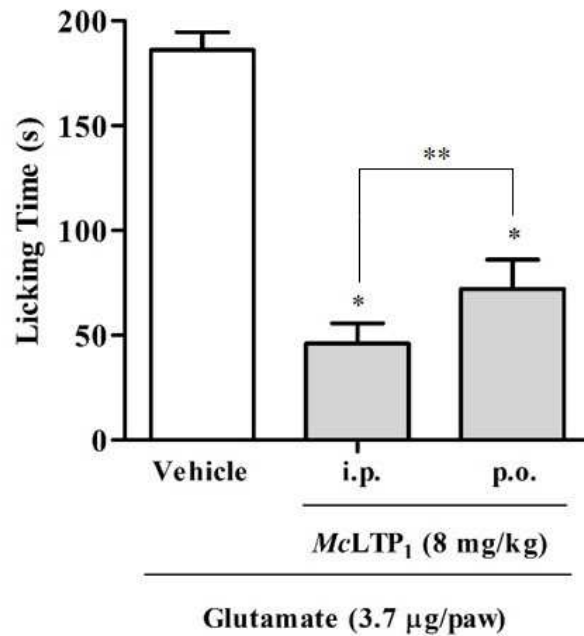
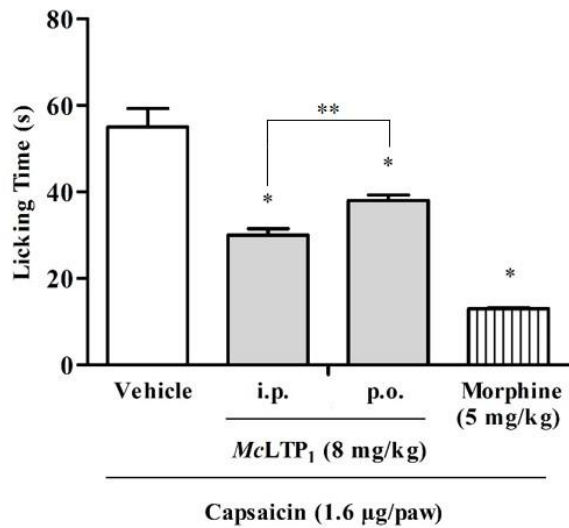


Fig. 3. Effect of *McLTP*₁ on nociception induced by intraplantar administration of glutamate in mice. Animals were treated with vehicle (saline) or *McLTP*₁ (8 mg/kg; 30 min, i.p. or 60 min, v.o.) before the intraplantar injection of glutamate. The results show the mean \pm SEM (n = 8). * p < 0.05 indicates a significant difference compared to the vehicle group and ** p < 0.05 indicates a significant difference when compared *McLTP*₁ i.p. with *McLTP*₁ p.o. using one-way ANOVA, followed by Tukey's test.

To evaluate if pain induced by TRPV1 channels activation was also prevented by *McLTP*₁ treatment (8 mg/kg i.p. or p.o.), this protein was administered in mice submitted to the capsaicin-induced nociception model. The TRPV1 receptor is a ligand-gated, non-selective cation channel essential for pain stimuli such as endogenous lipids, capsaicin, heat, and low pH. For example, capsaicin injection into the skin, muscle, or joint elicits burning pain by activating specific TRPV1-containing nociceptors on the sensory nerve endings, producing a local neurogenic type of inflammation, and induces pain [32]. Besides activation of vanilloid receptors, capsaicin also causes the release of neurokinins, neuropeptides, excitatory amino acids (glutamate and aspartate), nitric oxide (NO), and pro-inflammatory peripheral mediators [33].

The TRPV1 activator capsaicin induced a licking behavior characteristic of nociception, as shown in Fig.4. When 8 mg/kg *McLTP*₁ was administered by intraperitoneal route or oral gavage, a reduction of licking induced by capsaicin was observed with a percentage of inhibition of 45.45% and 30.9%, respectively ($p < 0.05$). By contrast, the antinociceptive effect of *McLTP*₁ was significantly reversed by administering the vanilloid antagonist capsazepine, which suggests the modulation of the TRPV1 receptors in the antinociceptive effect of this protein.

A.



B.

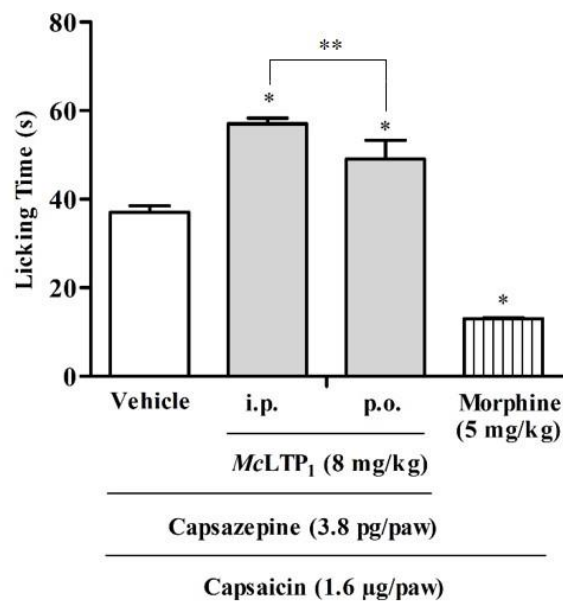


Fig. 4. Effect of *McLTP*₁ on nociception induced by capsaicin (A) and pretreated with the TRPV1 receptor antagonist (capsazepine) (B) in mice. The animals were treated with vehicle (saline) or *McLTP*₁ (8 mg/kg; 30 min, i.p. or 60 min, v.o.) before the intraplantar injection of capsaicin (1.6 µg/paw) or capsazepine (3.8 pg/paw), and the nociception was evaluated. The results show the mean ± SEM (n = 8). **p* < 0.05 indicates a significant difference compared to the vehicle group and ***p* < 0.05 indicates a significant difference when compared *McLTP*₁ i.p. with *McLTP*₁ p.o. using one-way ANOVA, followed by Tukey's test.

We recently described the anti-inflammatory actions of *McLTP*₁ (8 mg/kg) intraperitoneally or orally administered in mice by inhibiting cell migration in the carrageenan-induced peritonitis model and carrageenan-induced paw edema formation [13]. It has been reported elsewhere that carrageenan injection in mice's hind paws releases pro-inflammatory agents such as prostaglandins and sympathetic amines, eliciting an enhanced pain response called hypernociception [34, 35].

Based on the idea that pain is a classical sign of inflammation and one of the main reasons that lead the patients to look for treatments, the effect of *McLTP*₁ was investigated in the hypernociception induced by carrageenan and also the direct-acting mediator PGE₂.

As depicted in Fig. 5, *McLTP*₁ at the dose of 8 mg/kg significantly reduced Cg-induced mechanical hypernociception at all the evaluated times (1 h: 56.41% (i.p.) and 46.15% (p.o.); 3 h: 63.26% (i.p.) and 57.14% (p.o.); 5 h: 66.66% (i.p.) and 55.56% (p.o.)), with the maximum effect observed from 3 to 5 h after stimulus injection, regardless of the route of administration of the protein. Indomethacin (10 mg/kg), used as a positive control drug, also produced a significant ($p < 0.05$) anti-hypernociceptive effect 1 h after Cg injection, reaching a maximum effect in 3 h, compared to the negative control (saline). Furthermore, the treatment of mice with *McLTP*₁ (8 mg/kg) also reduced significantly ($p < 0.05$) the mechanical hyperalgesia induced by intraplantar injection of PGE₂ by 50,0% when administered intraperitoneally and by 25,0% after oral administration (Fig. 6).

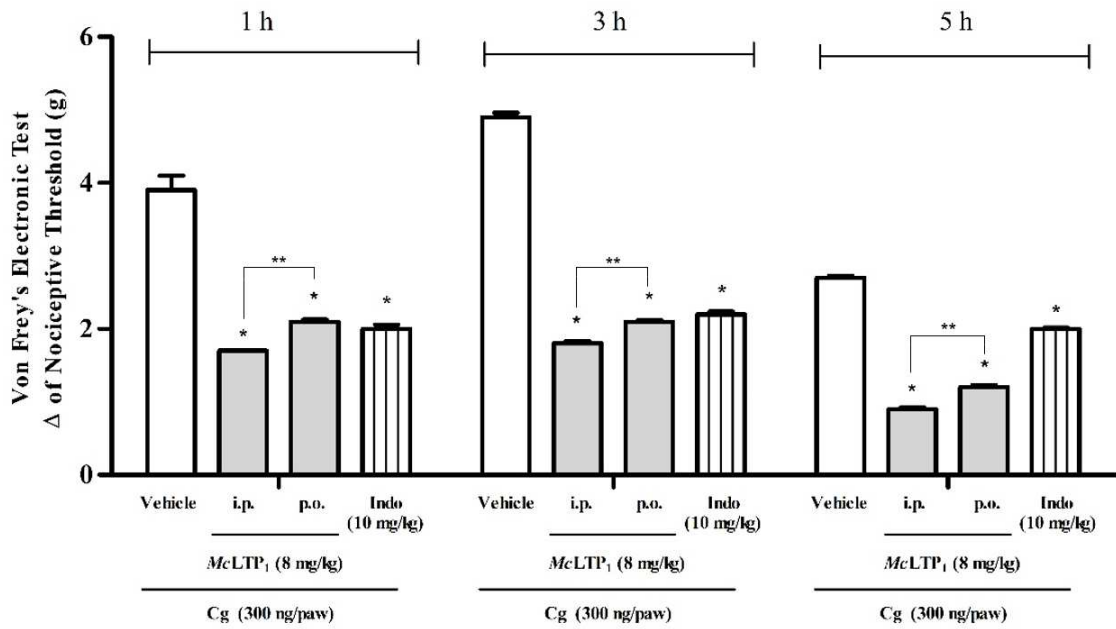


Fig. 5. Effect of *McLTP*₁ on carrageenan-induced mechanical hypernociception. The animals were treated with vehicle (saline), *McLTP*₁ (8 mg/kg; 30 min, i.p. or 60 min, v.o.), or indomethacin (10 mg/kg) before the intraplantar injection of carrageenan (300 μg/paw). The results show the mean ± SEM (n = 8). **p* < 0.05 indicates a significant difference compared to the vehicle group and ***p* < 0.05 indicates a significant difference when compared *McLTP*₁ i.p. with *McLTP*₁ p.o. using one-way ANOVA, followed by Tukey's test.

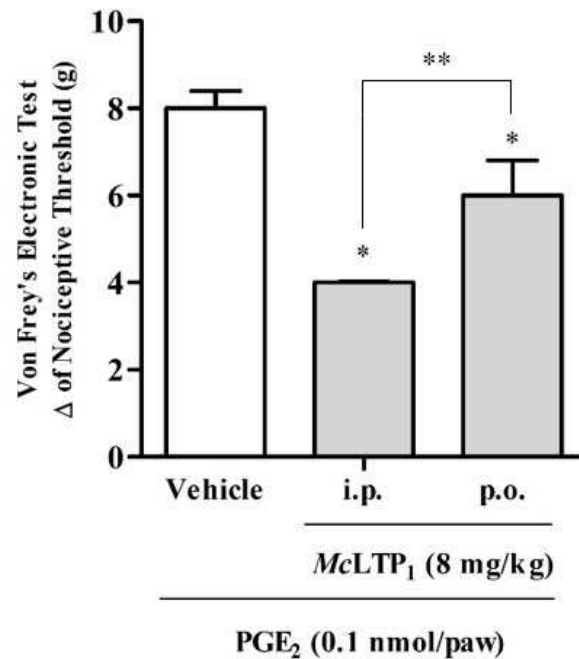


Fig. 6. Effect of *McLTP*₁ on prostaglandin E₂ (PGE₂)-induced mechanical hyperalgesia. The animals were treated with vehicle (0.9% NaCl), *McLTP*₁ (8 mg/kg; 30 min, i.p. or 60 min, p.o.) before the intraplantar injection of PGE₂ (0.1 nmol/paw). The mechanical evaluation of the intensity of hypernociception (Δ withdrawal threshold in grams) was tested before (baseline) and after PGE₂ intraplantar administration by the electronic von Frey method. The results show the mean \pm SEM (n = 8). * p < 0.05 indicates a significant difference when compared to the vehicle group and ** p < 0.05 indicates a significant difference when compared *McLTP*₁ i.p. with *McLTP*₁ p.o. using one-way ANOVA, followed by Tukey's test.

The anti-hyperalgesic activity demonstrated by *McLTP*₁ can be explained by its anti-inflammatory effect reported previously. *McLTP*₁ showed the ability to significantly inhibit the production of the cytokines IL-1 β , IL-6, and TNF- α (p < 0.05) and to promote an increase in the production of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in the Cg-induced paw edema in mice [13]. This finding can be linked to our earlier results in which the pretreatment of mice with L-NAME or glibenclamide partially reversed the antinociceptive effect of *McLTP*₁, indicating that this protein could also prevent hyperalgesia by activating the NO/cGMP/K⁺ATP pathway.

According to Cunha *et al.* [36], the hypernociception elicited by PGE₂ is independent of the production of other inflammatory mediators or recruitment of cells. The fact that *McLTP*₁ treatment also inhibited PGE₂-induced hypernociception implies that this protein directly reduces nociceptor sensitization or that *McLTP*₁ can even induce an endogenous mediator through this action.

To investigate *McLTP*₁'s effect on mice motor coordination, we used the rotarod test. The results of vehicle and *McLTP*₁ (8 mg/kg i.p. or p.o.) treated animals were not different between them in the rota-rod test, suggesting that *McLTP*₁ does not impair motor coordination. As expected, the positive control diazepam (4 mg/kg) produced significant motor incoordination compared to the vehicle. Thus, *McLTP*₁ does not induce false-positive results in other behavioral experiments (Fig. 7).

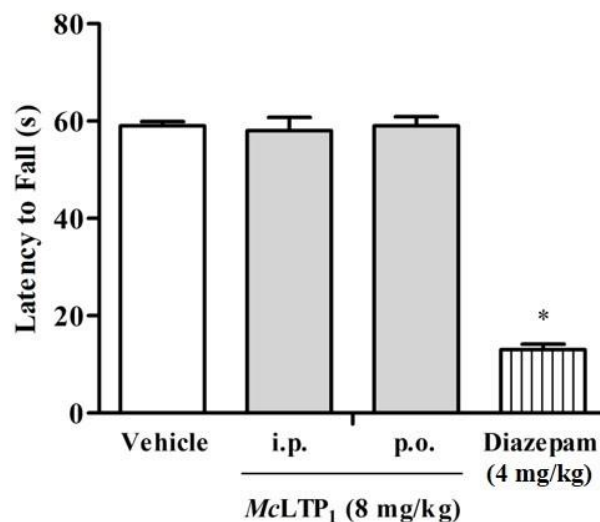


Fig. 7. Effect of *McLTP*₁ and diazepam in the rotarod in mice. Animals were treated with vehicle (saline), *McLTP*₁ (8 mg/kg; 30 min, i.p. or 60 min, p.o.), or diazepam (4 mg/kg, i.p.) before the test. The results show the mean \pm SEM (n = 8). **p* < 0.05 indicates a significant difference when compared to the vehicle group using one-way ANOVA, followed by Tukey's test.

In summary, the data obtained in this work reinforce the idea that, beyond the modulation of nociception through a central mechanism, *McLTP*₁ also modulates the nociception through peripheral mechanisms involving modulation of the NO/cGMP/K⁺ATP pathway, glutamatergic system, vanilloid receptors, and antihyperalgesic effect, suggesting that it acts downstream of PGE₂. To the best of our knowledge, there are no other reports on the mechanisms of lipid transfer proteins that emphasize their antinociceptive potential.

Notwithstanding extensive research efforts, oral delivery of therapeutic protein is still a challenge. Factors such as high proteolytic activity and low pH conditions of the gastrointestinal tract act as significant barriers in the successful delivery of intact protein to the targeted site. Despite these drawbacks, the antinociceptive response mechanisms explored by *McLTP*₁ were the same for both routes of administration, which reinforces the idea that the use of protein by the oral route can be a good choice for the clinical treatment of pain.

*McLTP*₁ collaborates as one of the plant proteins whose mechanism of action in pain and inflammation has been better characterized, which opens new perspectives for developing drugs using this protein as an active principle.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP).

References

- [1] D.L. Ellison, **Physiology of Pain**, Critical Care Nursing Clinics of North America. 29 (2017) 397-406. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cnc.2017.08.001>.
- [2] B.J. Sessle, **Unrelieved Pain: A Crisis**, Pain Research and Management. 16 (2011) 416-420. <http://dx.doi.org/10.1155/2011/513423>.
- [3] R.J. Bonnie, M.A. Ford, J.K. Phillips, **Pain management and the opioid epidemic: Balancing societal and individual benefits and risks of prescription opioid use**, National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. Washington, DC (2017). <https://doi.org/10.17226/24781>.
- [4] H.J. Hijma, G.J. Groeneveld, **Analgesic drug development: proof-of-mechanism and proof-of-concept in early phase clinical studies**, Medicine in Drug Discovery. 10 (2021) 100083. <https://doi.org/10.1016/j.medidd.2021.100083>.
- [5] I.P. Chessell, A. Dudley; A. Billinton, **Biologics: the next generation of analgesic drugs?**, Drug Discovery Today. 17 (2012) 875-879. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2012.03.005>.
- [6] V.J. Hruby, **Multivalent peptide and peptidomimetic ligands for the treatment of pain without toxicities and addiction**, Peptides. 116 (2019) 63-67. <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2019.02.004>.
- [7] J.R. Kintzing, M.V.F. Interrante, J.R. Cochran, **Emerging Strategies for Developing Next-Generation Protein Therapeutics for Cancer Treatment**, Trends In Pharmacological Sciences. 37 (2016) 993-1008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2016.10.005>.
- [8] G. Kresse, **Biosimilars – Science, status, and strategic perspective**, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 72 (2009) 479-486. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2009.02.014>.
- [9] D.P. Aragão, B.S. Souza, T.V. Brito, L.A.B. Santana, R.M.P. Silva, A.P. Oliveira, A.C.T.C. Pereira, G.P. Ferreira, A.L.R. Barbosa, J.S. Oliveira, **The anti-inflammatory and**

antinociceptive activity of albumins from *Crotalaria retusa* seeds, *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 93 (2017) 536-542. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.06.078>.

[10] A.F. Pires, G.F.O. Marques, N.M.N. Alencar, M.G.Q. Martins, M.T.L. Silva, K.S. Nascimento, B.S. Cavada, M.A.S. Assreuy, **Inhibitory effect of *Lonchocarpus araripensis* lectin in rat acute models of inflammation**, *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 91 (2019) e20180991. <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201920180991>.

[11] G.O. Leite, S.A.A.R. Santos, F.M.D.H. Bezerra, F.E.S. Silva, A.D.C. Ribeiro, R.R. Roma, R.R.S. Silva, M.H.C Santos, ALE Santos, CS Teixeira, AR Campos, **Is the orofacial antinociceptive effect of lectins intrinsically related to their specificity to monosaccharides?**, *International Journal of Biological Macromolecules*. 161 (2020) 1079-1085. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.132.

[12] D.C.O. Campos, A.S. Costa, A.D.R. Lima, F.D.A. Silva, M.D.P. Lobo, A.C.O. Monteiro-Moreira,; R.A. Moreira, L.K.M. Leal, D. Miron, I.M. Vasconcelos. H.D. Oliveira, **First isolation and antinociceptive activity of a lipid transfer protein from noni (*Morinda citrifolia*) seeds**, *International Journal of Biological Macromolecules*. 86 (2016) 71-79. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.029>.

[13] D.C.O. Campos, A.S. Costa, P.B. Luz, P.M.G. Soares, N.M.N. Alencar, H.D. Oliveira, ***Morinda citrifolia* lipid transfer protein 1 exhibits anti-inflammatory activity by modulation of pro- and anti-inflammatory cytokines**, *International Journal of Biological Macromolecules*. 103 (2017) 1121-1129. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.148>.

[14] U.K. Laemmli, **Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4**, *Nature*. 227 (1970) 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>.

[15] M.M. Bradford, **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**, *Anal. Biochem*. 72 (1976) 248-254. doi: 10.1006/abio.1976.9999.

- [16] E.M. Franzotti, C.V. Santos, H.M. Rodrigues, R.H. Mourão, M.R. Andrade, A.R. Antonioli, **Anti-inflammatory, analgesic activity and acute toxicity of *Sida cordifolia* L. (Malva-branca)**, Journal of Ethnopharmacology. 72 (2000) 273–277. doi: 10.1016/s0378-8741(00)00205-1.
- [17] D.S. Alviano, K.F. Rodrigues, S.G. Leitão, M.L. Rodrigues, M.E. Matheus, P.D. Fernandes, A.R. Antonioli, C.S. Alviano, **Antinociceptive and free radical scavenging activities of *Cocos nucifera* L. (Palmae) husk fiber aqueous extract**, Journal of Ethnopharmacology. 92 (2004) 269-273. doi: 10.1016/j.jep.2004.03.013.
- [18] R. Koster, M. Anderson, J. De Beer, **Acetic acid for analgesic screening**, Fed. Proc. 18 (1959) 412-417.
- [19] A. Beirith, A.R.S. Santos, J.B. Calixto, **Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw**, Brain Res. 924 (2002) 219-228. doi: 10.1016/s0006-8993(01)03240-1.
- [20] T. Sakurada, K. Katsumata, K. Tan-No, S. Sakurada, K. Kisara, **The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord**, Neuropharmacology. 31 (1992) 1279-1285. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(92\)90057-V](https://doi.org/10.1016/0028-3908(92)90057-V).
- [21] S.R. Chaplan, F.W. Bach, J.W. Pogrel, J.M. Chung, T.L. Yaksh, **Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw**, J. Neurosci. Methods. 53 (1994) 55-63. doi: 10.1016/0165-0270(94)90144-9.
- [22] J.H. Rosland, S. Hunskaar, K. Hole, **Diazepam attenuates morphine antinociception test-dependently in mice**, Pharmacol. Toxicol. 66 (1990) 382-386, 1990. doi: 10.1111/j.1600-0773.1990.tb00766.x.
- [23] H. Rang, M. Dale, J. Ritter, R. Flower, G. Henderson, **Rang & Dale's Pharmacology**, 7th ed., Elsevier, London, 2012.

- [24] H. Zeashan, G. Amresh, C.V. Rao, S. Singh, **Antinociceptive activity of *Amaranthus spinosus* in experimental animals**, J. Ethnopharmacol. 122 (2009) 492-496. doi: 10.1016/j.jep.2009.01.031.
- [25] C.M. Nealon, C. Patel, B.L. Worley, A.N. Henderson-Redmond, D.J. Morgan, T.A. Czyzyk, **Alterations in nociception and morphine antinociception in mice fed a high-fat diet**, Brain Research Bulletin. 138 (2018) 64-72. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.06.019>.
- [26] S. Gupta, A. Jain, M. Chakraborty, J.K. Sahni, J.A.S. Dang, **Oral delivery of therapeutic proteins and peptides: a review on recent developments**, Drug Delivery. 20 (2013) 237-246. doi: 10.3109/10717544.2013.819611
- [27] H.O. Collier, L.C. Dinneen, C.A. Johnson, C. Schneider, **The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse**, Br. J. Pharmacol. 32 (1968) 295-310. doi:10.1111/j.1476-5381.1968.tb00973.x
- [28] D. Le Bars, M. Gozariu, S.W. Cadden, **Animal models of nociception**, Pharmacological Reviews. 53 (2001) 597–652. PMID: 11734620.
- [29] A.M.S Assreuy, R.M.F Amorim, S.L. Martins, M.G.Q. Martins, J.B. Cajazeiras, M.T.L. Silva, A.F. Pires, K.S. Nascimento, B. S. Cavada, M.R.L. Mota, **Antinociceptive effect of *Lonchocarpus araripensis* lectin: activation of L-arginine/NO/cGMP/K⁺ATP signaling pathway**, Inflammopharmacol. 28 (2020) 1623–1631. <https://doi.org/10.1007/s10787-020-00729z>.
- [30] M.E. Fundytus, **Glutamate receptors and nociception: implications for the drug treatment of pain**, CNS Drugs. 15 (2001) 29-58. doi: 10.2165/00023210-200115010-00004.
- [31] V. Neugebauer, **Peripheral metabotropic glutamate receptors: fight the pain where it hurts**, Trends in Neurosciences. 24 (2001) 550–552. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(00\)02007-5](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(00)02007-5).

- [32] M. Tominaga, M.J. Caterina, A.B. Malmberg, T.A. Rosen, H.Gilbert, K. Skinner, B.E. Raumann, A.I. Basbaum, D. Julius, **The Cloned Capsaicin Receptor Integrates Multiple Pain-Producing Stimuli**, *Neuron*. 21 (1998) 531-543. [_https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80564-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80564-4).
- [33] M.J. Caterina, D. Julius, **The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway**, *Annu. Rev. Neurosci.* 24 (2001) 487–517. doi: 10.1146/annurev.neuro.24.1.487.
- [34] C.J. Morris, **Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse**, *Methods in Molecular Biology*. 225 (2003) 115-121.
- [35] K. Hargreaves, R. Dubner, F. Brown, C. Flores, J. Joris. **A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia**, *Pain*. 32 (1988) 77-88. doi: 10.1016/0304-3959(88)90026-7.
- [36] T.M. Cunha, S. Poole, S.H. Ferreira, F.Q. Cunha, **Role of cytokines in mediating mechanical hypernociception in a model of delayed-type hypersensitivity in mice**, *Eur J Pain*, 12 (2008) 1059-1068. doi: 10.1016/j.ejpain.2008.02.003.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos indicam que os mecanismos pelos quais *McLTP1* inibe a nocicepção tem participação do sistema nervoso central, ativação de receptores opióides e mostra envolvimento com a via de NO/GMPc/PKC-K⁺, com o sistema glutamatérgico, além da modulação dos canais TRVP1. É interessante ressaltar que nosso grupo de pesquisa é o primeiro a relatar o efeito antinociceptivo para as LTPs e o respectivo mecanismo envolvido nesse efeito. Vários outros estudos mostram o potencial terapêutico de proteínas de diversas origens, mas sabe-se que essas moléculas são estruturalmente frágeis, o que limita o tempo que permanece ativa ou a via de administração, limitando os tratamentos. Foi relatado anteriormente que uma das características das LTPs é sua alta estabilidade, e aqui demonstramos que os mecanismos envolvidos nos efeito antinociceptivo de *McLTP1* se dá pela via intraperitoneal, como também pela via oral, que seria a via de administração mais aceita para um futuro fármaco com esse efeito. Os resultados aqui apresentados, podem guiar os próximos modelos a serem estudados com a proteína, incluindo modelos de dor crônica.

7. ARTIGO 2

Safety assessment of a lipid transfer protein isolated from *Morinda citrifolia* L. seeds, in a perspective of its use as a novel anti-inflammatory drug

Andréa S. Costa^a, Dyély C. O. Campos^a, Amanda D. R. Lima^a, Adrienne M. Lima^a, Vilmara de Farias^a, Daniele O. B. Sousa^a, Pedro M. G. Soares^b, Bruno C. Cavalcanti^c, Manoel O. de Moraes^c, Hermógenes D. Oliveira^{a*}

^a Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Campus do Pici Prof. Prisco Bezerra, 60440-900, Fortaleza, CE, Brazil

^b Department of Morphology, Federal University of Ceará, 60416-030, Fortaleza, CE, Brazil

^c Drug Research and Development Center, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

* Corresponding author: Hermógenes D. Oliveira [hermogenes@ufc.br]. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Campus do Pici Prof. Prisco Bezerra, 60440-900, Fortaleza, CE, Brazil. Tel.: + 55 85 3366 9817; Fax: + 55 85 3366 9789.

Abstract

McLTP₁ (9.4 kDa; UniProt Accession Number: C0HJH5) is a lipid transfer protein isolated from *Morinda citrifolia* L. seeds, that exhibits anti-inflammatory activity in mice, through the modulation of pro- and anti-inflammatory cytokine levels. Given the promising therapeutic effects of *McLTP₁* for the treatment of inflammatory conditions, this work proposed to gain insights about the safety of this protein after oral administration to mice. Initially, the bioavailability of *McLTP₁* (8 mg/kg) in blood samples and the time-course of its pharmacological effects were investigated. Subsequently, the acute, subacute, and immunogenic effects of *McLTP₁* were evaluated to assess its safety profile. *McLTP₁* was immunodetected in mice blood samples from up to 8 h and displayed a significant ($p < 0.05$) antinociceptive activity up to 12 h after the oral administration. In the *ex vivo* experiments, *McLTP₁* was immunodetected after incubation in mice plasma for 24 h at 37 °C. Surprisingly, *McLTP₁* (8 or 80 mg/kg) did not produce any hazardous symptoms or death in the acute toxicity test. Furthermore, subacute treatment with *McLTP₁* (8 mg/kg) did not show any changes in body weight, hematological, biochemical, macroscopic, histopathological parameters of vital organs, as well as allergic symptoms. In *in vitro* toxicity tests, *McLTP₁* (20, 40, 80, 160, 320 µg/mL) did not display any alterations in cell viability or patterns of DNA damage in cultured human hepatocellular carcinoma (HepG2). The results revealed that at the therapeutic dose of 8 mg/kg, *McLTP₁* can be regarded as safe.

Keywords: Noni; Plant proteins; Lipid transfer protein; Preclinical safety;

Highlights

- *McLTP*₁ was detected in mice blood samples from up to 8 h after oral administration.
- *McLTP*₁ did not produce signs of toxicity, allergic symptoms or deaths in mice.
- *McLTP*₁ did not show cytotoxicity or genotoxicity
- *McLTP*₁ at the therapeutic dose of 8 mg/kg can be regarded as safe.

1. Introduction

While phylogenetically designed to protect the body from invasion by other organisms or from events that cause cellular damage, inflammatory reactions are often detrimental and have been recognized to play a role in the pathophysiology of numerous relevant disorders including cardiovascular diseases, diabetes, arthritis, and cancer (Schultze and Rosenstiel, 2018; Madrigal *et al.*, 2019). Therefore, considerable efforts have been devoted to seek effective alternatives to achieve therapeutic efficacy in various inflammatory dysfunctions.

Notably, several drugs currently used as an anti-inflammatory are derived from plants or are synthesised based on natural products (Allijn *et al.*, 2019). Over the past 25 years, the number of pre-clinical studies by Brazilian researchers related to anti-inflammatory effects and immunomodulatory medicinal plants is astonishing. Conversely, a limited number of clinical studies have emerged from these studies (Dutra *et al.*, 2016).

Although small-molecule drugs remain valuable, protein-based drugs have emerged as a way to correct diverse pathologies (Pakuska *et al.*, 2016). Therapeutic proteins have several advantages over small molecules, presenting a highly specific set of functions that cannot be imitated by simpler chemical compounds. Consequently, there is often a lower potential for interfere with the normal biological processes and cause adverse effects (Leader and Golan, 2008; Diz *et al.*, 2011). Numerous plant proteins have been investigated for this purpose, many showing promising outcomes.

Morinda citrifolia L. or noni (Rubiaceae) is one of the most important medicinal plants of ancient Pacific Island cultures. This species is used for more than 2000 years to treat a variety of diseases (Sang *et al.*, 2001, Dixon *et al.*, 1999 and Mc Clatchey, 2002). Some major components have been identified in the noni plant, and some of them have been associated with the therapeutic effects of the plant (Assi *et al.*, 2015).

Recently, Campos *et al.*, (2016), reported the isolation of a thermostable lipid transfer protein (LTP) from noni seeds, named *McLTP₁*, with promising activity against inflammation and pain when administered by the oral route. This protein exhibited an anti-inflammatory effect by modulating of pro- and anti-inflammatory cytokine levels (Campos *et al.*, 2017), improved the survival rate and diminished the overwhelming inflammatory responses in CLP-induced sepsis in mice (Souza *et al.*, 2018).

Although the promising therapeutic effects presented by *McLTP₁*, lipid transfer proteins are also potent allergens, and represent a major factor contributing to the severe systemic reactions often observed in allergic patients (Ramazzina *et al.*, 2012). Thus, toxicity should be performed with *McLTP₁* considering use as a novel anti-inflammatory drug. This study aimed to evaluate whether *McLTP₁* present toxicity when administered orally. Besides, this investigation evaluated detection of the protein in the systemic circulation and permanence of the antinociceptive effect.

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals

Tris(hydroxymethyl)aminomethane, trichloroacetic acid, Coomassie Brilliant Blue G-250, goat anti-rabbit IgG, p-nitrophenyl phosphate disodium substrate, 3-(4, 5-dimethyliazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide were purchased from Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO. Dulbecco's Modified Eagle Medium were purchased from Gibco, Life Technologies. Other chemicals used were of analytical grade and obtained from local suppliers.

2.2 *Noni seeds and purification of McLTP₁*

Noni (*M. citrifolia* L.) seeds were supplied by Embrapa Agroindústria Tropical (Embrapa – CNPAT), Ceará, Brazil. The seeds were powdered using a kitchen blender, defatted with petroleum ether (mass ratio 1:10 w/v) and then stored at –20 °C until isolation of *McLTP₁*.

McLTP₁ was purified according to the methodology proposed by Campos *et al.* (2016). The content of protein fraction was estimated using the method of Bradford (1976) and the purity of *McLTP₁* was checked by SDS-PAGE under non-reducing conditions, with a 15 wt% acrylamide gel (Laemmli, 1970). The proteins were dyed with Coomassie Brilliant Blue G-250. For the preparation of the doses of *McLTP₁*, the lyophilized protein was solubilized in saline (NaCl 0.15 M) or ultrapure water immediately before the experiments.

2.3 *Animals*

Male and nulliparous non-pregnant female Swiss mice (25–30g) divided into groups of six animals were obtained from Biotério Central of Federal University of Ceará. The animals were maintained in standard laboratory conditions (25 °C and light/dark cycles i.e., 12/12 h) and were fed with standard food and water ad libitum. Care, handling and experimental procedures were performed in accordance with the ethical standards established by the National Guidelines for the Use of Experimental Animals of Brazil and the experimental protocols were approved by the Committee for the Ethical Use of Animals of Federal University of Ceará (CEUA no. 37/13).

2.4 *Immunization with McLTP₁ and preparation of polyclonal antiserum*

Polyclonal antibodies against *McLTP₁* was prepared in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*, breed New Zealand White). Firstly, each rabbit was injected with 100 µg of *McLTP₁*

mixed with Freund's complete adjuvant (1:1, v/v). Subsequently, each rabbit was administered three additional doses of 50 µg of *McLTP*₁ per injection mixed with equal volumes of Freund's incomplete adjuvant at 14, 21 and 49-day intervals. Blood samples were taken from the central ear artery at 14 days post-inoculation, allowed to clot at room temperature for 1 h and then centrifuged at 3000 rpm for 10 min to obtain the serum, which was stored at -20 °C until assayed. Different dilutions of the positive serum (containing anti-*McLTP*₁ antibody) and the negative serum (without anti-*McLTP*₁ antibody) were screened in order to study the sensitivity of the anti-*McLTP*₁ antibody. The dilutions assayed were 0, 1/100, 1/500, and 1/1000.

*2.5 Immunodetection of *McLTP*₁ in blood samples after oral administration to mice*

Groups of six male mice were firstly treated orally with *McLTP*₁ at the dose of 8 mg/kg. Before and after 2, 4, 8, and 12 hours of protein administration, the animals were lightly anaesthetized with isoflurane, and blood samples (0.2 mL) were collected by retro-orbital sinus puncture using heparinized microhematocrit tubes. Plasma was separated from the blood collected, and the *McLTP*₁ levels were detected using ELISA.

Briefly, ELISA plates were coated (100 µl per well) with *McLTP*₁ 1:20 dilution (w/v) in 0.05 M carbonate buffer, pH 9.6 (Clark and Adams, 1977). ELISA plates were incubated at 37 °C for 1 h, followed by three washings at 3 min intervals with PBS plus 0.05% (v/v) Tween-20 (PBS-T). Antiserum diluted in antibody buffer [PBS-T plus 2% polyvinylpyrrolidone (MP Biomedicals, Santa Ana, CA) and 0.2% albumin (MP Biomedicals)] was added, and ELISA plates were incubated at 37 °C for 1 h. After washing ELISA plates with PBS-T, goat anti-rabbit IgG-alkaline phosphatase (ALP) conjugate (Sigma–Aldrich) in antibody buffer was added at a 1:2000 dilution and incubated for 1 h at 37 °C. Finally, ELISA plates were washed with PBS-T and p-nitrophenyl phosphate (Sigma–Aldrich, 1 mg/ml) in 0.1 M diethanolamine buffer, pH 9.8 was added as a substrate. ELISA plates were read at

40 min following the addition of substrate for the development of yellow color at OD405 in a SpectraMax plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). The protein amount was measured using a calibration curve previously made with serial dilutions of *McLTP*₁ (130–4.16 µg/mL) solubilized in sterile water.

2.6 *Ex-Vivo Plasma Stability of McLTP₁*

A plasma sample from mice was incubated with *McLTP*₁ at 37 °C for 24 hours at a final concentration of 0.8 mg/mL. An aliquot (200 µL) was taken before incubation of the protein with plasma (control group) and 0, 2, 4, 8, 12 and 24 hours after incubation and precipitated with trichloroacetic acid (2,5%) with subsequent centrifugation for 15' at 8000 rpm.. The supernatant was analysed by ELISA test according to the methodology described previously. The protein amount was measured using a calibration curve previously made with serial dilutions of *McLTP*₁ (130–4.16 µg/mL) solubilized in sterile water.

2.7 *Time course of the antinociceptive effect of McLTP₁*

The antinociceptive activity was performed following the method of Collier *et al.* (1968). The animals were divided into groups (6 animals/group), and *McLTP*₁ was administered by oral route at a dose of 8 mg/kg. After 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 24 hours of the administration of *McLTP*₁, the animals received acetic acid (1%) intraperitoneally and was counted the number of abdominal writhes during 20 min. The control group received only saline (0.15 M NaCl) by the oral route. The antinociceptive effect was expressed as a percentage of the inhibition of abdominal writhing.

2.8 Acute oral toxicity study

This toxicity study based on Guideline 423 of the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD, 2001). In this method, nulliparous and non-pregnant female were fasted for four h and received a single dose of *McLTP*₁ 8, 80 mg/kg or 0.15 M saline (control) by gavage (n = 3/group). Animals were observed 6 and 12 h after *McLTP*₁ administration and were monitored on a daily base throughout 14 days after treatment. Mice death occurrence and gross behaviour such as piloerection, palpebral ptosis, abdominal contortions, locomotion, hypothermia, muscular tonus, shacking, posterior paws paralysation, salivation, bronchial secretion and convulsions were evaluated. Body weights, food and water consumption were recorded before, during, and at the end of the experiment.

2.9 Repeated dose 28-day oral toxicity study

This test was performed according to the Guideline 407 of the OECD (1995). *McLTP*₁ (8 mg/kg) or 0.15 M saline was given by gavage once a day for 28 days into two groups: males and females (5 animals/group). Mice gross behaviour, mortality, body weight gain and food intake were recorded throughout the repeated treatment. Measurements of body weight gain were performed every two days. At the end of the experiment (28th day), blood and urine samples were collected into sterile tubes, and the animals were euthanatized by cervical dislocation. Vital organs, including the kidney, heart, pancreas, lungs, liver, small intestine and stomach were weighed individually and the relative organ weights (as a % of BW) were calculated. The stomachs were washed with saline and examined for macroscopical mucosal lesions by an observer unaware of the treatment protocol.

2.9.1 Haematological parameters

Hematological examinations were performed using an automatic hematology analyzer Vet ABC (scil Animal Care Company, Gurnee, IL, USA) and the following parameters were determined: hemoglobin (HGB), red blood cells counts (RBC), hematocrit (HCT), mean corpuscular volume (MCV), mean cell hemoglobin (MCH), mean cell corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), white blood cell counts (WBC) and platelet counts (PLT).

2.9.2 Biochemical analysis and urinalysis

Blood samples were collected in different tubes without the anticoagulant, were centrifuged at 3000 rpm for 15 min, and serum was immediately separated. The clinical chemistry parameters measured included aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (AP), total protein (PRO), blood glucose (GLU), total cholesterol (COL), triglycerides (TRI), uric acid (UAC) and creatinine (CRE). The qualitative analyses of urobilinogen, glucose, ketonic bodies, bilirubins, protein, nitrite and pH, were performed by using urinalysis strips (Multistix 10 SG, Siemens).

2.9.3 Histopathology

Two animals from each treatment group were randomly chosen for histological analysis. Vital organs extracted (kidneys, heart, pancreas, liver, small intestine, lungs and stomach) from experimental mice and fixed in 10% formol-saline were dehydrated in graded alcohol, embedded in paraffin. After four μm thick sliced sections being stained by Hematoxylin-Eosin (H·E), morphological analyses were performed by an experienced pathologist blinded to the source of the tissue. Images of H·E samples were taken with TS100 inverted microscope (Nikon, Japan), and photographed under $\times 200$ magnification.

2.10 *In vitro* toxicity of *McLTP₁*

2.10.1 *Cell culture conditions*

The human hepatocellular carcinoma (HepG2/C3A) were obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank (Rido de Janeiro, Brazil). The cells were maintained in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Gibco, Life Technologies) medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin at 37°C with 5% CO₂. In all experiments, the cells received the treatments after 24 hours of cell stabilization.

2.10.2 *Cytotoxicity using MTT assay*

The cytotoxicity test was based on the protocol described by Mossmann (1983). In this procedure, each well (96 well plate) were seeded with 104 cells and was tested following concentrations of the *McLTP₁* (20, 40, 80, 160, 320 µg/mL) in the culture medium. After 24 hours of treatment, the supernatant was discarded, and 200 µL MTT (0.167mg/mL) were added to each well. The cells were incubated at 37 °C for 4 hours. Then, the MTT solution was completely removed from wells and added 200 µL DMSO/well to dilute the formazan crystals. Each sample used to perform the reading in a spectrophotometer at 540 nm. For the control group, it carried out the same procedure, except for the addition of *McLTP₁*.

2.10.3 *Genotoxicity using Comet assay*

The comet assay was performed as described by Singh *et al.* (1988) with minor modifications. At the end of the treatment with *McLTP₁* (20, 40, 80, 160, 320 µg/mL) for 24 h, cells were washed with ice-cold PBS, detached with 100 µL trypsin (0.15%) and resuspended in complete DMEM medium. After, 20 µL of cell suspension (~10⁶ cells/mL) was mixed with 100 µL of 0.75% low melting point agarose and immediately spread onto a glass microscope

slide precoated with a layer of 1% normal melting point agarose. The agarose was cooled to 4 °C for 5 min. The slides were incubated in ice-cold lysis solution (2.5 M NaCl, 10 mM Tris, 100 mM EDTA, 1% Triton X-100 and 10% DMSO, pH 10.0) at 4 °C for a minimum period of 1 h to remove proteins, remain only the nucleoids. After the lysis procedure, the slides were placed in a horizontal electrophoresis system and covered with buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH > 13.0) for 20 min at 4 °C to allow DNA unwinding and expression of alkali-labile sites. Electrophoresis was carried out for 20 min at 25 V and 300 mA (0.86 V/cm) in the absence of light. After electrophoresis, the slides were neutralized (0.4 M Tris, pH 7.5), stained with ethidium bromide (20 µg/mL) and analyzed using a fluorescence microscope. Images of 100 randomly selected cells (50 cells from each of two replicate slides) were analyzed for each concentration of test substance. Cells were scored visually and assigned to one of five classes, according to tail size (from undamaged-0, to maximally damaged-4), and a damage index value was calculated for each sample of cells. Damage index thus ranged from 0 (completely undamaged: 100 cells 0) to 400 (with maximum damage: 100 cells 4) (Collins, 2004).

2.12 Statistical analysis

The results are presented as mean \pm SD. The statistical analysis of the results was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test using GraphPad Prism 6.0 software (San Diego, CA, USA). Differences between groups were considered significant at a level of $p < 0.05$.

3. Results

3.1 Immunodetection of *McLTP*₁ in blood samples and plasma stability assay

ELISA-based analysis demonstrated that *McLTP*₁ (8 mg/kg) was immunodetected in the plasma samples of mice 2 h after oral administration. The concentration of *McLTP*₁ reached the highest level at this point time ($37.05 \pm 3.00 \mu\text{g/mL}$) when compared to control group (0 h; $p < 0.05$). A significant reduction in the *McLTP*₁ levels was observed in the 4 and 8 h time intervals following the oral administration of the protein. Twelve hours after mice treatment, no significant amount of *McLTP*₁ was immunodetected (Fig. 1a). *In vitro* *McLTP*₁ was very stable in mice plasma at 37°C, with no measurable degradation after 12 hours (Fig. 1b).

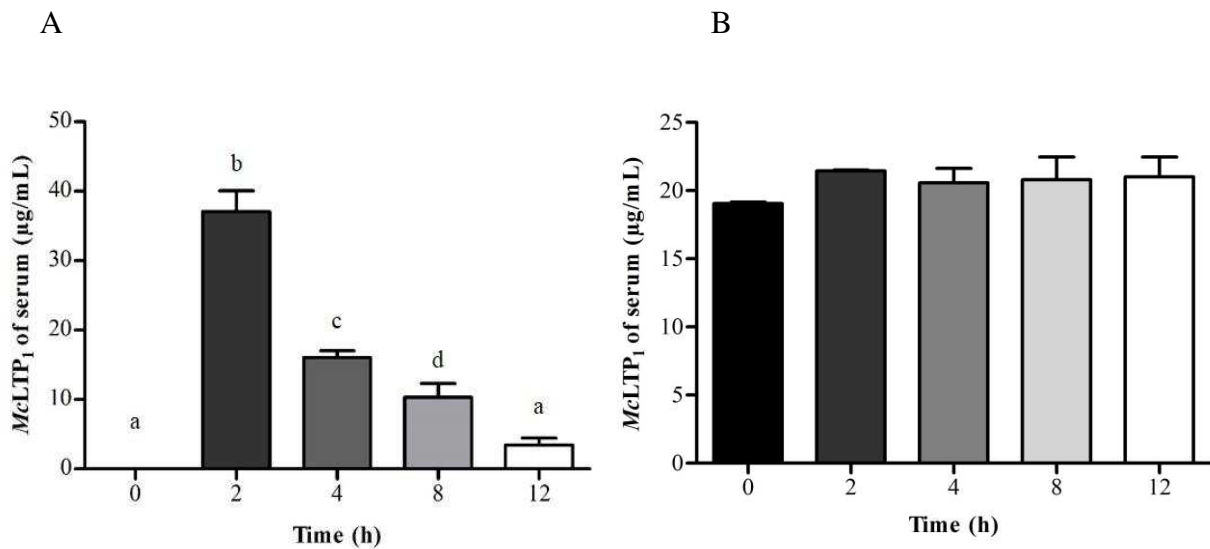


Fig. 1 - (A) Immunodetection of *McLTP*₁ in the mice plasma samples after oral administration to mice. *McLTP*₁ was administered at a dose of 8 mg/kg (p.o.). Results expressed as the mean \pm standard deviation (n = 6 mice/group). Different letters represent significant differences between observed times ($p < 0.05$, Tukey's test). (B) Stability of *McLTP*₁ in the mice plasma. *McLTP*₁ (20 $\mu\text{g/mL}$) was incubated with the mice plasma, and its concentration was measured using polyclonal antibodies anti-*McLTP*₁ prepared in rabbits. Results expressed as the mean \pm standard deviation (n = 6 mice/group).

3.2 Time course of the antinociceptive effect of *McLTP₁*

As shown in Fig. 2, *McLTP₁* (8 mg/kg; p.o.) was able to reduce significantly ($p < 0.05$) the number of abdominal writhes in mice with the maximum antinociceptive activity (85.71% of inhibition) observed 2 h after the treatment. As shown in Fig. 2 the the antinociceptive effect of *McLTP₁* remained significantly different from the control group ($p < 0.05$) for at least 12 h (33.33% of inhibition of abdominal writhes). After 24 h of the oral treatment with *McLTP₁* no significant antinociceptive effect was observed.

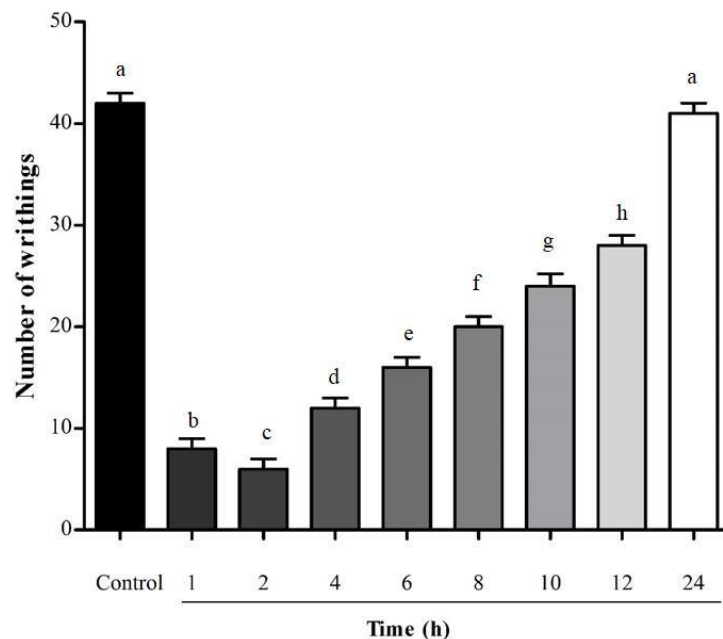


Fig. 2 - Time course of the antinociceptive effect of *McLTP₁* in mice. Mice were pretreated with *McLTP₁* by oral route in the dose of 8 mg/kg 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, and 24 hours before the induction of abdominal writhes. The number of writhes was counted during a 20 min period after the i.p. administration of 1% acetic acid (100 μ L/10 g). The columns represent the average \pm standard deviation ($n = 6$ mice/group). Different letters represent significant differences between observed times ($p < 0.05$, Tukey's test).

3.3 Toxicity study

During the two weeks' test period no death or a significant decrease in body weight and food intake was observed following oral administration of a single dose (8 or 80 mg/kg) of *McLTP₁*. At the time of necropsy, no gross abnormalities were observed in internal organs,

even in the highest dosage used in this experiment (80 mg/kg). Moreover, no mortality was observed in any group treated orally with *McLTP*₁.

In the subacute toxicity, no mortality or treatment-related irregular clinical symptoms were found in any of the *McLTP*₁ fed (8 mg/kg/day) groups during the 4-week study. The mean food intake was 5.11 ± 0.42 g/day and no change in gain in BW between *McLTP*₁ and control groups (Fig. 4). Abnormalities like diarrhoea, constipation or other gastrointestinal disorders were not observed among the groups. After necropsy, no macroscopic alterations were seen.

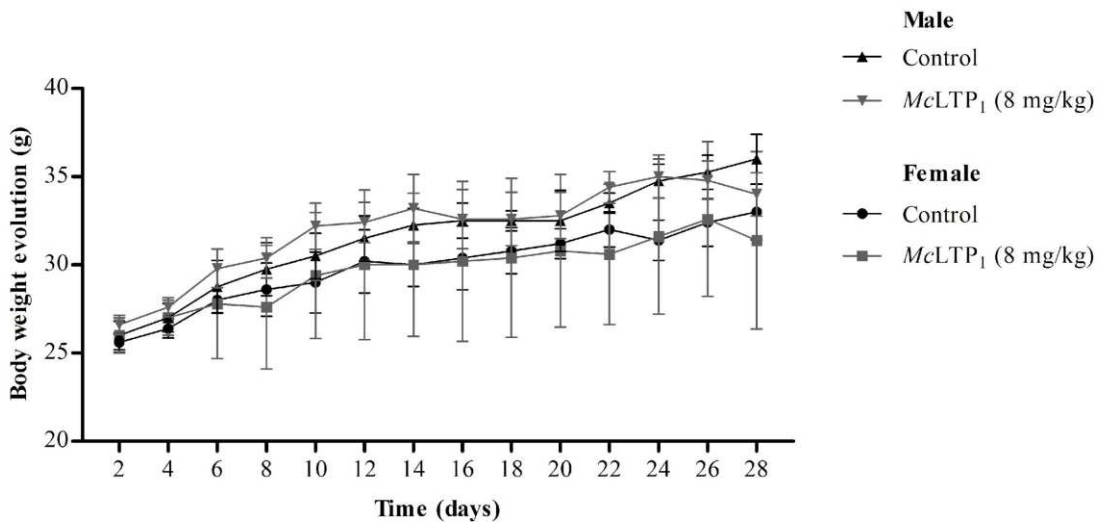


Figure 04 - Body weight evolution of male and female mice after 28 days treatment with *McLTP*₁. Mice were administered by gavage with *McLTP*₁ (8mg/kg/day) solubilized in saline (0.15 M NaCl) immediately before the administration. Control group received only the vehicle. The columns represent the average \pm standard deviation (n = 5 mice/group).

3.3.1 Haematological parameters

The results of the haematological parameters for male and female mice are summarised in Table 01. There was a non-significant difference in RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC and WBC counts in *McLTP*₁-treated groups compared to control group, except in the platelet

count from males, that was reduced from 718.12 ± 72.44 to 585.40 ± 186.78 when compared to the group.

Table 01 - Hematological parameters of male and female mice after 28 days treatment with *McLTP₁*.

Parameter	Male		Female	
	Control	<i>McLTP₁</i> (8 mg/kg/day)	Control	<i>McLTP₁</i> (8 mg/kg/day)
WBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	3.38 ± 1.07	3.78 ± 0.87	3.96 ± 0.83	4.82 ± 2.13
RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	8.41 ± 0.03	9.22 ± 0.87	8.61 ± 0.83	8.25 ± 0.75
HGB (g/dL)	13.93 ± 0.39	14.66 ± 1.15	14.68 ± 1.13	14.54 ± 0.78
HCT (%)	41.85 ± 1.27	45.00 ± 4.58	44.46 ± 4.74	42.38 ± 5.04
PLT ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	718.12 ± 72.44	$585.40 \pm 186.78^*$	584.00 ± 64.15	649.2 ± 110.22
MCV (μm^3)	49.87 ± 1.54	49.00 ± 1.41	51.80 ± 1.92	51.20 ± 3.27
MCH (μg)	16.75 ± 0.44	15.90 ± 0.33	17.12 ± 0.81	17.64 ± 0.99
MCHC (g/dL)	33.30 ± 1.25	32.66 ± 1.00	33.12 ± 1.14	34.44 ± 2.41

The values presented as means \pm SD (5 mice/sex/group). WBC = white blood cell count; RBC = red blood cell count; HGB = hemoglobin; HCT = hematocrit; PLT = platelet count; MCV = mean corpuscular volume; MCH = mean corpuscular hemoglobin; MCHC = mean corpuscular hemoglobin concentration. *compared with control group, $p < 0.05$, Tukey's test.

3.4.2 Biochemical parameters and urinalysis

The biochemical profiles of the treated and control groups shown in Table 02. No significant changes of serum biochemical indices observed between treated group and control group at the 28th Day. No significant differences found between the *McLTP₁*-treated groups and the controls for specific gravity, pH, leukocyte, nitrite, protein, glucose, ketone, urobilinogen, bilirubin, and blood in the urine (data not shown).

Table 02 - Biochemical parameters of male and female mice after 28 days treatment daily with *McLTP₁*.

Parameter	Male		Female	
	Control	<i>McLTP₁</i>	Control	<i>McLTP₁</i>
AST (U/L)	59.33 ± 12.85	51.0 ± 9.55	65.00 ± 12.51	62.80 ± 33.09
ALT (U/L)	50.50 ± 5.44	68.5 ± 10.40	47.80 ± 1.64	63.25 ± 26.89
AP (U/L)	363.50 ± 102.72	416.00 ± 110.39	337.2 ± 75.13	414.40 ± 135.82
GLU (mg/dL)	176.66 ± 4.04	171.80 ± 31.45	124.8 ± 45.48	166.40 ± 35.27
CRE (mg/dL)	0.32 ± 0.05	0.44 ± 0.05	0.325 ± 0.05	0.34 ± 0.05
PRO (mg/dL)	5.75 ± 0.25	5.48 ± 0.60	5.60 ± 0.46	5.00 ± 0.24
UAC (mg/dL)	2.97 ± 1.71	1.52 ± 0.51	2.14 ± 0.96	1.46 ± 0.54
COL (mg/dL)	119.50 ± 9.03	149.80 ± 24.15	90.80 ± 21.58	104.60 ± 23.70
TRI (mg/dL)	234.00 ± 56.00	152.4 ± 67.00	182.6 ± 23.02	148.80 ± 48.79

The values presented as means ± standard deviation (5 mice/sex/group). Serum aspartate aminotransferase (AST), serum alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (AP), fasting glucose (GLU), blood creatinine (CRE), total protein (PRO), uric acid (UAC), total cholesterol (COL), triglycerides (TRI). Compared with control group, $P < 0.05$, Tukey's test.

3.4.4 Organ weights

No *McLTP*₁ treatment-related changes observed in the relative kidney, heart, pancreas, liver, lungs and stomach weights of male or female mice, as compared to the respective control group. Significant decreases of the relative small intestine weights observed in males treated with *McLTP*₁ compared with the control group (Table 03). Gross visual observations found no gastric mucosa macroscopic damage after daily treatment with the protein.

Table 03 - Relative organ weights of male and female mice after 28 days treatment daily with *McLTP*₁.

Organ	Male		Female	
	Control	<i>McLTP</i> ₁	Control	<i>McLTP</i> ₁
Kidneys	1.97 ± 0.08	1.78 ± 0.11	1.53 ± 0.16	1.51 ± 0.26
Heart	0.68 ± 0.09	0.53 ± 0.05	0.53 ± 0.25	0.63 ± 0.05
Pancreas	0.47 ± 0.04	0.55 ± 0.13	0.57 ± 0.25	0.71 ± 0.16
Liver	5.79 ± 0.39	6.09 ± 0.43	5.23 ± 0.40	5.62 ± 1.00
Small intestine	6.76 ± 0.57	5.24 ± 0.19*	7.29 ± 0.62	6.37 ± 1.65
Lungs	0.755 ± 0.09	0.76 ± 0.09	0.65 ± 0.10	0.79 ± 0.10
Stomach	1.11 ± 0.12	1.23 ± 0.07	1.32 ± 0.20	1.34 ± 0.15

The values presented as means ± standard deviation (5 mice/sex/group). P <0.05, Tukey's test.

3.4.5 Histopathology

No histopathological changes in kidney, heart, pancreas, liver, small intestine, lungs and stomach evaluated in the animals of each group. No significant organ architecture changes or gross pathology observed (Figure 05).

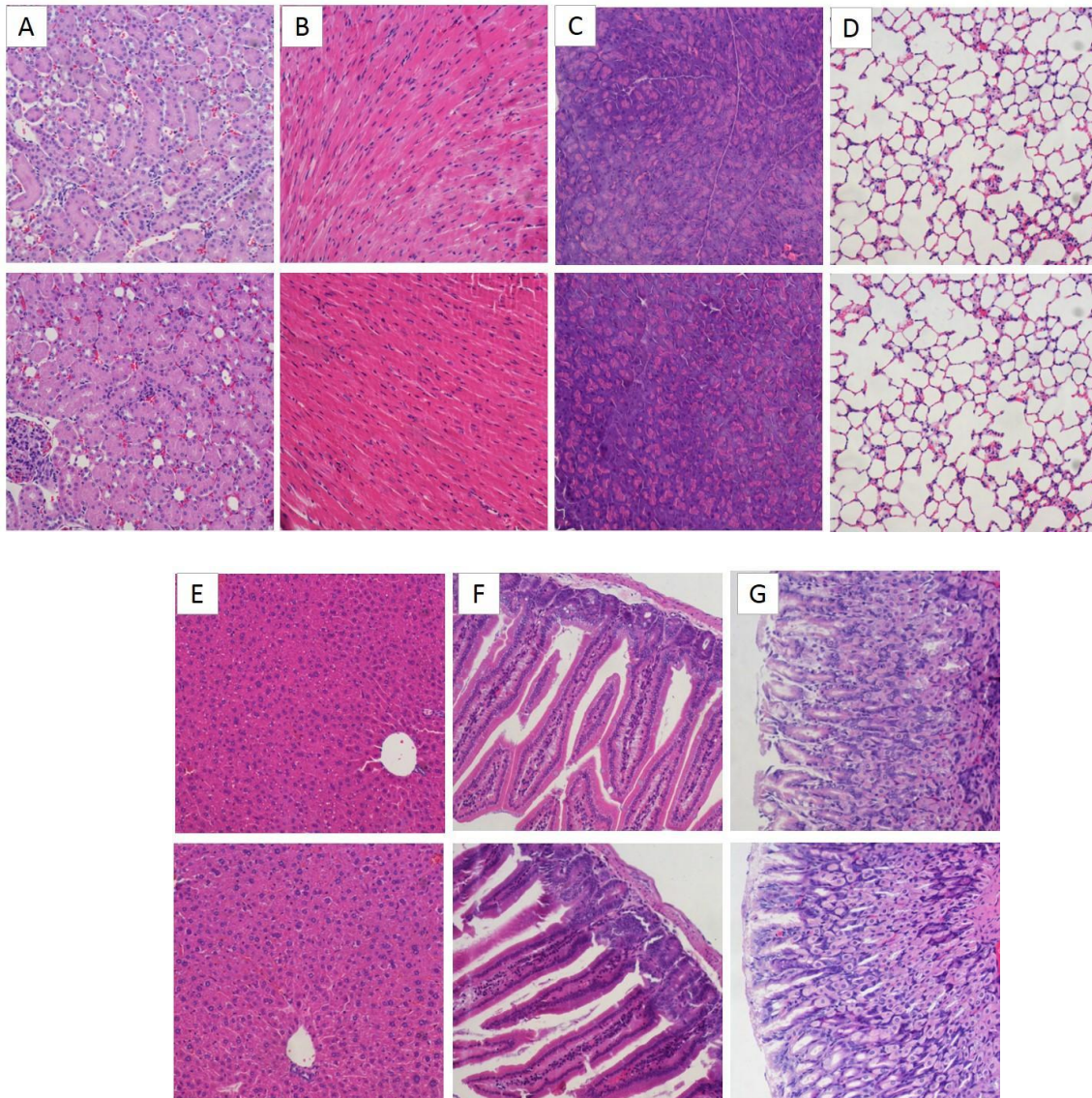


Figure 05 - Histological analysis of the mice treated organ *McLTP*₁ in the test repeated dose toxicity. Effect of *McLTP*₁ (8 mg/kg/day) on histological findings of (A) kidney; (B) heart; (C) pancreas; (D) lung; (E) liver; (F) small intestine and (G) stomach tissue in mice during 28 days repeated dose toxicity study. The figures above refer to the control group; below figures refer to the group treated with the protein. The photomicrographs show the histology of selected tissues stained with hematoxylin-eosin. Objective lens adjusted with 200x magnification.

3.4.6 Cytotoxicity

No sign of toxicity detected in human hepatocellular carcinoma strain. Even the highest concentration *McLTP*₁-tested (320 µg/ml) the cells remained the maximum cellular integrity, as shown in Figure 06.

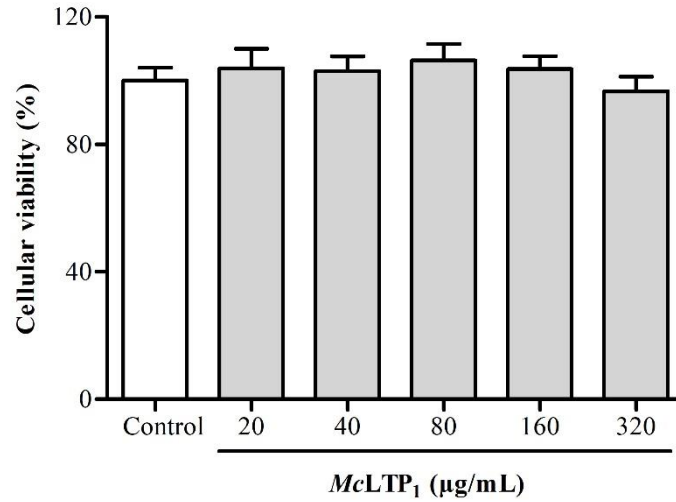


Figure 06 - *McLTP*₁ cytotoxic effect in the cell line of human hepatocarcinoma (HepG2/C3a) after 24 hours of cell stabilisation. Statistical analysis was performed by Turkey's Multiple Comparison Test ($p < 0.05$).

3.4.7 Genotoxicity

Our data from comet assay, as shown in **Figure 07**, pointed out *McLTP*₁-exposed cells does not increases the DNA migration pattern after electrophoresis in cultures treated at concentrations ranging from 20 to 320 µg/mL , as seen by damage index (DI) values.

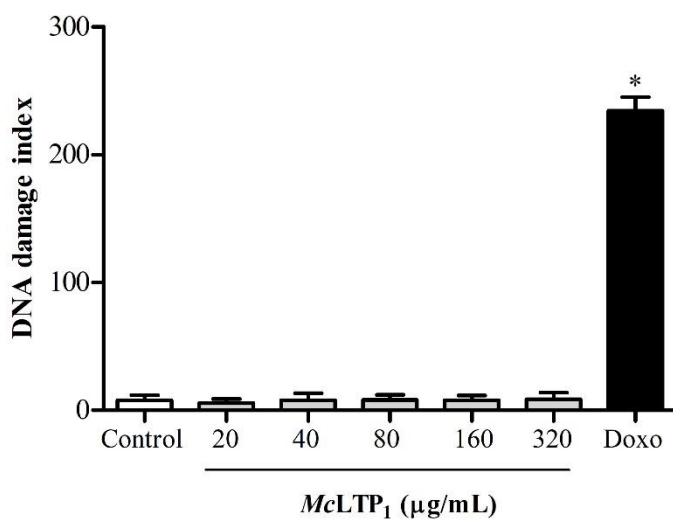


Figure 07 - *McLTP₁* genotoxic effect in the cell line of human hepatocarcinoma (HepG2/C3a) after 24 hours of cell stabilisation. Statistical analysis was performed by Turkey's Multiple Comparison Test ($p < 0.05$).

4. Discussion

Traditionally, anti-inflammatory therapies have focused on strategies to decrease or neutralize the level of pro-inflammatory mediators and/or inhibit the recruitment of leukocytes and their activation. These therapies include non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID), glucocorticoid (GC) receptor agonists (synthetic GCs) and antibodies or inhibitors targeting specific pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)-1. Current pharmacological strategies are based upon inhibition of endogenous factors that participate in normal physiology and therefore, they may trigger imbalance of the homeostasis and undesirable side effects. For instance, glucocorticoids may induce osteoporosis and NSAIDs can trigger gastric ulceration (Alessandri *et al.*, 2013).

McLTP₁ demonstrated the ability to significantly inhibit the production of the cytokines IL-1 β , IL-6, and TNF- α and to promote an increase in the production of the anti-inflammatory cytokine IL-10. Because they operate almost exclusively in extracellular compartments, anti-cytokine therapies have little or no organ toxicities and gastrointestinal disturbances and are thus well tolerated. Therefore, *McLTP₁* may be an alternative to non-steroidal anti-inflammatory drugs (Campos *et al.*, 2017).

The demonstration of the toxicity profile of this protein is needed as the modern medicine require the determination of the extent of its safety because along with being effective, there is an extreme need for this combination therapy to be safe for long term uses (Ohdo, 2003). To ensure the effectiveness and safety of this protein for human use, systematic studies are needed to predict risks of toxicity, and to provide scientific information for selecting safe doses (Neergheen-Bhujun, 2013).

The previously tests showed that *McLTP₁* can be administered orally, being resistant to proteolytic digestion in the gastrointestinal tract (Campos *et al.*, 2016). Thus, this

was the route used in the study. In addition, oral delivery is the most sought-after the route of administration for most of the drugs and pharmaceutical products (Elsayed *et al.*, 2009).

After oral administration of *McLTP*₁, it was possible to detect the protein in the systemic circulation of treated animals showing that the protein or part of it was able to pass through the gastrointestinal barrier. In addition, the time of larger amount of protein detected corroborates with the time of better antinociceptive effect, two hours after administration, being this relationship between the effect and the detected protein observed for the 12 hours.

Proteolytic degradation of peptide-based drugs is often considered as major weakness limiting systemic therapeutic applications. Therefore, huge efforts are typically devoted to stabilize sequences against proteases present in serum or plasma, obtained as supernatants after complete blood coagulation or centrifugation of blood supplemented with anticoagulants, respectively (Hoffmann and Knappe, 2017). *In vivo* stability tests have shown that even after 12 hours, there is still circulating free protein, which was corroborated by detection of the *McLTP*₁ after incubation *ex vivo* in the plasma for 12 hours. The LTP structure, stabilised by four disulphide bridges consists of four α -helices packed against a C-terminal region, forming a tunnel-like hydrophobic cavity, able to lodge amphiphilic molecules. This compact folding confers high proteolytic digestion resistance to LTP (Asero *et al.*, 2001 and Cavatorta *et al.*, 2010), a probable reason for the resistance of *McLTP*₁ to plasma proteolysis.

Acute toxicity tests are generally the initial step in the assessment and evaluation of the toxic characteristics of a substance. The method uses pre-defined doses and the results allow a substance to be ranked and classified according to the Globally Harmonised System (GHS) for the classification of chemicals, which cause acute toxicity (OECD, 2001). In this toxicity study, intragastric administration of *McLTP*₁ at the dose of 8 mg/kg or 80 mg/kg produced no lethal effects or any other symptom of toxicity, could be classified in category 2 the GHS until now.

Subacute toxicity assessment can evaluate the cumulative toxic effects of substance and forms basis for later subchronic toxicity assessment (Garcia *et al.*, 2016; Heredia *et al.*, 2012). After 28 days of daily protein administration (8 mg/kg), there was no mortality or any behavioural change in treated animals. Furthermore, blood examination is a useful instrument for the diagnosis and monitoring of animals, as well as to distinguish pathogenic processes from those that might be purely physiological (Christopher *et al.*, 1999). Treatment with *McLTP*₁ did not cause changes in the haematological parameters evaluated, except the platelet count that showed to be significantly different from the male control group. However, changes were within the range of normal laboratory reference and are considered as biological or incidental variations but not as treatment-related changes (Santos *et al.*, 2016). In addition, biochemical parameters, such as ALT activity, correlate with hepatic necrosis and indicate an alteration in hepatic functions (Mangus *et al.*, 2015). Biochemical analysis of the treated with *McLTP*₁ and control groups showed that there was no significant difference in the levels of ALT, AST and AP, usual markers of liver toxicity.

Increased or decreased organ weight has been observed as a sensitive indicator of organ toxicity (Islam *et al.*, 2002). The analysed organs (kidneys, heart, pancreas, liver, intestine, lungs and stomach) after the 28 days of observation did not present alterations in their relative weight, except the intestine of the males treated with the protein. However, the histopathological analysis did not detect alteration in the architecture of mice intestines. Therefore, the NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) was determined to be 8 mg/kg/day for both sexes of mice given the experimental conditions of this study.

Most drugs can cause different variations and be presented in diverse spectrums of complications, such as mucosal inflammation, ulceration, bleeding, penetration, perforation of the oesophagus, and even death (Dağ *et al.*, 2014). Usually prescribed for musculoskeletal complaints such as rheumatoid arthritis and short-term management of pain in osteoarthritis,

NSAIDs are associated with gastrointestinal tract complications (Drina *et al.*, 2017). Therefore, the daily administration of *McLTP*₁ is not able to induce lesions in the stomach, usually caused by the use of NSAIDs, which generate an imbalance of the gastric secretion and the protective stomach mucous. Thus, *McLTP*₁ presents advantages over some drugs, so far not to have performed frequent adverse effects to these drugs under the conditions tested in this study.

Unfortunately, LTPs are also potent allergens. Although the sensitization via the respiratory route is believed to account for the majority of LTP allergy (pollen food syndrome), and even skin contact has been proposed as a route of exposure, the ingestion of LTP-containing fruits or vegetables seems to be responsible for the primary sensitization. Primary food allergy can be accompanied by the possibility of severe allergic symptoms, and anaphylaxis has been associated with LTPs in various plant-derived foods (Van Winkle and Chang, 2014). Anaphylaxis may present with urticaria, dyspnea, hypoxia, hypotension, itching, redness, swelling, abdominal pain, vomiting, conjunctivitis, among other symptoms, which were not observed after administration of the protein.

Campos *et al.*, 2017 showed that the anti-inflammatory effect of *McLTP*₁ is involved with the stimulation of interleukin 10 (IL-10). This interleukin is the most potent anti-inflammatory cytokine produced by almost all innate and adaptive immune cells and is considered a tolerogenic and anti-inflammatory, because it blocks the production of pro-inflammatory cytokines and the capacity of myeloid cells to efficiently activate T-cells (Moore *et al.*, 2001). Thus, despite the allergenic characteristics attributed to LTPs, *McLTP*₁ has not presented any relevant evidence of adverse effects, so far.

Cell-based assays play an important role in the drug development process and safety assessment of chemicals and drugs as a fast, cost-effective and straightforward approach to reduce animal testing (Pfuhler *et al.*, 2020). The cytotoxicity analysis is one of the most important indicators of the biological evaluation system *in vitro*, and with the development of

modern cell biology, experimental techniques to evaluate cytotoxicity are also continuously being developed and improved (Li *et al.*, 2015). Genotoxicity testing is an essential element of the safety assessment of nearly all types of compounds on the market (Stampar *et al.*, 2021). *McLTP₁* was not able to cause cytotoxicity or genotoxicity even at the highest concentration (320 µg/mL) in human hepatocellular carcinoma (HepG2/C3a) cell line after 24 hours of cell stabilisation. The *in vitro* system HepG2 cells are commonly used in toxicological studies (Juan-Garcia *et al.*, 2019). These cells are easy to handle and have been widely used in cytotoxicity and genotoxicity studies (Queiroz *et al.*, 2014). The cells can be used to assess the genotoxicity of both direct and indirect mutagens (Valentin-Severin *et al.*, 2003) and have been utilised in a significant number of experiments to evaluate the genotoxicity of pure compounds and complex mixtures. In conclusion, the tests carried out in this work showed that *McLTP₁* is a protein with prolonged therapeutic effect, resistant to extreme conditions after oral administration and proved to be safe, even in subchronic protocols. Therefore, this study shows an original perspective of tests for producing an efficient and safe anti-inflammatory drug with *McLTP₁* as the active principle.

Conflict of interest

The authors declared that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP).

References

- Alessandri, A. L., Sousa, L. P., Lucas, C. D., Rossi, A. G., Pinho, V., & Teixeira, M. M. (2013). Resolution of inflammation: Mechanisms and opportunity for drug development. *Pharmacology & Therapeutics*, *139*(2).
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.04.006>
- Allijn, I. E., Brinkhuis, R. P., Storm, G., & Schiffelers, R. M. (2019). Anti-Inflammatory Properties of Plant Derived Natural Products – A Systematic Review. *Current Medicinal Chemistry*, *26*(24). <https://doi.org/10.2174/0929867325666190523123357>
- Asero, R., Tedeschi, A., Lorini, M., Salimbeni, R., Zanoletti, T., & Miadonna, A. (2001). Chronic urticaria: novel clinical and serological aspects. *Clinical & Experimental Allergy*, *31*(7). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.2001.01131.x>
- Campos, D. C. O., Costa, A. S., Lima, A. D. R., Silva, F. D. A., Lobo, M. D. P., Monteiro-Moreira, A. C. O., Moreira, R. A., Leal, L. K. A. M., Miron, D., Vasconcelos, I. M., & Oliveira, H. D. (2016). First isolation and antinociceptive activity of a lipid transfer protein from noni (*Morinda citrifolia*) seeds. *International Journal of Biological Macromolecules*, *86*, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.029>
- Campos, D. C. O., Costa, A. S., Luz, P. B., Soares, P. M. G., Alencar, N. M. N., & Oliveira, H. D. (2017). *Morinda citrifolia* lipid transfer protein 1 exhibits anti-inflammatory activity by modulation of pro- and anti-inflammatory cytokines. *International Journal of Biological Macromolecules*, *103*. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.148>
- Cavatorta, V., Sforza, S., Aquino, G., Galaverna, G., Dossena, A., Pastorello, E. A., & Marchelli, R. (2010). In vitro gastrointestinal digestion of the major peach allergen Pru p 3, a lipid transfer protein: Molecular characterization of the products and assessment of their IgE binding abilities. *Molecular Nutrition & Food Research*, *54*(10).
<https://doi.org/10.1002/mnfr.200900552>
- Dag, M. S., Aydinli, M., Ozturk, Z. A., Turkbeyler, I. H., Koruk, I., Savas, M. C., Koruk, M., & Kadayifci, A. (2020). Drug- and herb-induced liver injury: A case series from a single center. *The Turkish Journal of Gastroenterology*, *25*(1).
<https://doi.org/10.5152/tjg.2014.4486>
- Dixon, A. R., Mcmillen, H., & Etkin, N. L. (1999). Ferment this: The transformation of Noni, a traditional polynesian medicine (*Morinda Citrifolia*, Rubiaceae). *Economic Botany*,

- 53(1). <https://doi.org/10.1007/BF02860792>
- Drina, M. (2017). Peptic ulcer disease and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Australian Prescriber*, 40(3). <https://doi.org/10.18773/austprescr.2017.037>
- Dutra, R. C., Campos, M. M., Santos, A. R. S., & Calixto, J. B. (2016). Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacological Research*, 112. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.021>
- Elsayed, A., Remawi, M. Al, Qinna, N., Farouk, A., & Badwan, A. (2009). Formulation and characterization of an oily-based system for oral delivery of insulin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 73(2). <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2009.06.004>
- Holfeld, L., Hoffmann, R., & Knappe, D. (2017). Correlating uptake and activity of proline-rich antimicrobial peptides in Escherichia coli. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(23). <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0496-2>
- Leader, B., Baca, Q. J., & Golan, D. E. (2008). Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 7(1), 21–39. <https://doi.org/10.1038/nrd2399>
- Lv, L., Chen, H., Ho, C.-T., & Sang, S. (2011). Chemical components of the roots of Noni (Morinda citrifolia) and their cytotoxic effects. *Fitoterapia*, 82(4). <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.02.008>
- Mangus, R. S., Fridell, J. A., Kubal, C. A., Davis, J. P., & Joseph Tector, A. (2015). Elevated alanine aminotransferase (ALT) in the deceased donor: impact on early post-transplant liver allograft function. *Liver International*, 35(2). <https://doi.org/10.1111/liv.12508>
- McClatchey, W. (2002). From Polynesian Healers to Health Food Stores: Changing Perspectives of Morinda citrifolia(Rubiaceae). *Integrative Cancer Therapies*, 1(2). <https://doi.org/10.1177/1534735402001002002>
- Mellado-García, P., Puerto, M., Pichardo, S., Llana-Ruiz-Cabello, M., Moyano, R., Blanco, A., Jos, A., & Cameán, A. M. (2016). Toxicological evaluation of an Allium-based commercial product in a 90-day feeding study in Sprague–Dawley rats. *Food and Chemical Toxicology*, 90. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.01.019>
- Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., & O'Garra, A. (2001). I
 <sc>NTERLEUKIN</sc> -10 <sc>AND THE</sc> I <sc>NTERLEUKIN</sc>

-10 R <sc>ECEPTOR</sc>. *Annual Review of Immunology*, 19(1).

<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.683>

Neergheen-Bhujun, V. S. (2013). Underestimating the Toxicological Challenges Associated with the Use of Herbal Medicinal Products in Developing Countries. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/804086>

Pfuhler, S., van Benthem, J., Curren, R., Doak, S. H., Dusinska, M., Hayashi, M., Heflich, R. H., Kidd, D., Kirkland, D., Luan, Y., Ouedraogo, G., Reisinger, K., Sofuni, T., van Acker, F., Yang, Y., & Corvi, R. (2020). Use of in vitro 3D tissue models in genotoxicity testing: Strategic fit, validation status and way forward. Report of the working group from the 7th International Workshop on Genotoxicity Testing (IWGT). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 850–851.

<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2020.503135>

Queiroz, T. B., Santos, G. F., Ventura, S. C., Hiruma-Lima, C. A., Gaivão, I. O. M., & Maistro, E. L. (2017). Cytotoxic and genotoxic potential of geraniol in peripheral blood mononuclear cells and human hepatoma cell line (HepG2). *Genetics and Molecular Research*, 16(3). <https://doi.org/10.4238/gmr16039777>

Ramazzina, I., Amato, S., Passera, E., Sforza, S., Mistrello, G., Berni, R., & Folli, C. (2012). Isoform identification, recombinant production and characterization of the allergen lipid transfer protein 1 from pear (Pyr c 3). *Gene*, 491(2), 173–181.

<https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.09.034>

Schultze, J. L., & Rosenstiel, P. (2018). Systems Medicine in Chronic Inflammatory Diseases. *Immunity*, 48(4). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.03.022>

Souza, A. A., Costa, A. S., Campos, D. C. O., Batista, A. H. M., Sales, G. W. P., Nogueira, N. A. P., Alves, K. M. M., Coelho-de-Souza, A. N., & Oliveira, H. D. (2018). Lipid transfer protein isolated from noni seeds displays antibacterial activity in vitro and improves survival in lethal sepsis induced by CLP in mice. *Biochimie*, 149.

<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.03.011>

Štampar, M., Sedighi Frandsen, H., Rogowska-Wrzesinska, A., Wrzesinski, K., Filipič, M., & Žegura, B. (2021). Hepatocellular carcinoma (HepG2/C3A) cell-based 3D model for genotoxicity testing of chemicals. *Science of The Total Environment*, 755.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143255>

Valentin-Severin, I., Le Hegarat, L., Lhuguenot, J.-C., Le Bon, A.-M., & Chagnon, M.-C. (2003). Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 536(1–2). [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(03\)00031-7](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(03)00031-7)

Van Winkle, R. C., & Chang, C. (2014). The Biochemical Basis and Clinical Evidence of Food Allergy Due to Lipid Transfer Proteins: A Comprehensive Review. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 46(3). <https://doi.org/10.1007/s12016-012-8338-7>

8. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Além de mostrar os efeitos terapêuticos associados às proteínas isoladas pelo nosso grupo de pesquisa, como a *McLTP₁*, existe a preocupação constante de estudar a segurança dessas moléculas, utilizando modelos sugeridos por órgãos reguladores, como a ANVISA, OECD e FDA, para sugerir seu uso racional que guiarão a utilização de ferramentas de biologia molecular ou formulações específicas. Estudos anteriores mostraram que a proteína, até o momento, não apresentou toxicidade em qualquer modelo *in vivo*. Somando-se a esses estudos, os modelos *in vitro* analisados nesta tese também não mostraram efeitos potencialmente tóxicos oriundos de *McLTP₁*. Logo, além dos efeitos farmacológicos promissores, foi mostrado que a proteína pode ser segura para administração de um futuro fármaco e outros testes de segurança farmacológica podem ser guiados a partir dos dados aqui relatados.

REFERÊNCIAS

ABBOUD, C.; DUVEAU, A.; BOUALI-BENAZZOUZ, R.; MASSÉ, K.; MATTAR, J.; BROCHOIRE, L.; FOSSAT, P.; BOUÉ-GRABOT, E.; HLEIHEL, W.; LANDRY, M. Animal models of pain: diversity and benefits. **J Neurosci Methods**. n. 15; v. 348, p. 108997, 2021.

AGÊNCIA BRASIL. Dor crônica afeta pelo menos 37% dos brasileiros. 2018. Disponível em: <https://agenciabrasil.ebc.com.br/saude/noticia/2018-09/dor-cronica-afeta-pelo-menos-37-dos-brasileiros>. Acesso em: 07 mar. 2021.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. **ANVISA (Brasília)**. 2013.

ALMEIDA JUNIOR, S. In vivo methods for the evaluation of anti-inflammatory and antinociceptive potential. **BrJP**. v. 2(4), p. 386-389, 2019.

ALMEIDA, R. N. Rosewood Oil Induces Sedation and Inhibits Compound Action Potential in Rodents. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 124, p. 440-443, 2009.

ALMEIDA, T.F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Res**. n. 12, v. 1000(1-2), p. 40-56, 2004.

ARAGÃO, D.P.; SOUZA, B.S.; BRITO, T.V.; SANTANA, L.A.B.; SILVA, R.M.P.; OLIVEIRA, A.P.; PEREIRA, A.C.T.C.; FERREIRA, G.P.; BARBOSA, A.L.R.; OLIVEIRA, J.S. The anti-inflammatory and antinociceptive activity of albumins from *Crotalaria retusa* seeds. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 93, p. 536-542, 2017.

ASERO R., MISTRELLO G., RONCAROLO D., DE VRIES S.C., GAUTIER M.F., CIURANA CLF. Lipid transfer protein: a pan-allergen in plant-derived foods that is highly resistant to pepsin digestion. **Int Arch Allergy Immunol**. v. 124, p. 67–69, 2001.

ASSREUY, A.M.S.; AMORIM, R.M.F.; MARTINS, S.L.; MARTINS, M.G.Q.; CAJAZEIRAS, J.B.; SILVA, M.T.L.; PIRES, A.F.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B. S.; MOTA, M.R.L. Antinociceptive effect of *Lonchocarpus araripensis* lectin: activation of L-arginine/NO/cGMP/K⁺ATP signaling pathway, **Inflammopharmacol**. v. 28, p. 1623–1631, 2020.

BARBOSA, A.; COSTA, I.C.; ZUCOLOTTO, S.; GIORDANI, R.B. *Morinda citrifolia*: fatos e riscos sobre o uso do noni. **Revista Fitos**. Rio de Janeiro. v. 11(2), p. 119-249, 2017.

BASAR, S.; UHLENHU, T K.; HÖGGER, P.; SCHÖNE, F.; WESTENDORF, J. Atividade analgésica e antiinflamatória da fruta *Morinda citrifolia* L. (Noni). **Phytother Res**. v. 24(1), p. 38-42, 2010.

BEIRITH, A.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Res**. v. 924, p. 219–228, 2002.

BOUTROT, F.; CHANTRET, N.; GAUTIER, M.F. Genome-wide analysis of the rice and Arabidopsis non-specific lipid transfer protein (nsLtp) gene families and identification of wheat nsLtp genes by EST data mining. **BMC Genomics**. v. 21;9, p. 86, 2008.

BRAHMACHARI, G. Natural products in drug Discovery: impacts and opportunities – an assessment. **Universidade Visva-Bharati**. v. 1, p. 1-10, 2012.

BUI, A.K.; BACIC, A.; PETTOLINO, F. Polysaccharide composition of the fruit juice of *Morinda citrifolia* (Noni). **Phytochemistry**. v. 67(12), p. 1271-5, 2006.

CAMPBELL, J.N.; MEYER, R.A. Mechanisms of neuropathic pain. **Neuron**. v. 52(1), p. 77-92, 2006.

CAMPOS, D.C.O.; COSTA, A.S.; LIMA, A.D.; SILVA, F.D.; LOBO, M.D.P.; MOREIRA, A.C.O.M; MOREIRA, R. A.; LEAL, L.K.A.M.; MIRONC, D.; VASCONCELOS, I.M.; OLIVEIRA, D.H. First isolation and antinociceptive activity of a lipid transfer protein from noni (*Morinda citrifolia*) seeds. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 86, p. 71-79, 2016.

CAMPOS, D.C.O.; COSTA, A.S.; LUZ, P.B.; SOARES, P.M.G.; ALENCAR, N.M.N.; H.D. OLIVEIRA. *Morinda citrifolia* lipid transfer protein 1 exhibits anti-inflammatory activity by modulation of pro- and anti-inflammatory cytokines. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 103, p. 1121-1129, 2017.

CARR, D.B.; GOUDAS, L.C. Acute Pain. **The Lancet**, 353, 2051-2058, 1999.

CARVALHO, A. O.; GOMES, V. Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology-a concise review. **Peptides**. v. 28, p. 1144-1153, 2007.

CHAPLAN, S.R.; BACH, F.W.; POGREL, J.W.; CHUNG, J.M.; YAKSH, T.L. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw, **J. Neurosci. Methods**. v. 53, p. 55-63, 1994.

CHARVOLIN, D.; DOULIEZ, J. P.; MARION, D.; COHEN-ADDAD, C.; PEBAYPEYROULA, E. The crystal structure of a wheat nonspecific lipid transfer protein (ns-LTP1) complexed with two molecules of phospholipid at 2.1 Å resolution. **European Journal of Biochemistry/FEBS**. v. 264, n. 2, p. 562–568, 1999.

CHEN, L., YANG, G., GROSSER, T. Prostanoids and inflammatory pain. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**. v. 104-105, p. 58-66, 2013.

CHU, Y.; COHEN, B.E.; CHUANG, H.H. A single TRPV1 amino acid controls species sensitivity to capsaicin. **Sci Rep**. n. 8038, 2020.

CIARDIELLO, M. A.; PALAZZO, P.; BERNARDI, M. L.; CARRATORE, V.; GIANGRIECO, I.; LONGO, V.; MELIS, M.; TAMBURRINI, M.; ZENNARO, D.; MARI, A.; COLOMBO, P. Biochemical, immunological and clinical characterization of a cross-reactive nonspecific lipid transfer protein 1 from mulberry. **Allergy**. v. 65, p. 597–605, 2010.

CORREIA, A.A.S. *et al.* Caracterização química e físico-química da polpa do noni (*Morinda citrifolia*) cultivado no estado do Ceará. **Alimentos e Nutrição**. v. 22, p. 609-615, 2011.

COSTA, A.S. Avaliação da estabilidade e da toxicidade pré-clínica de uma proteína isolada de sementes de noni (*Morinda citrifolia* L.), como etapas preliminares para seu uso terapêutico em humanos. **Dissertação** (Mestrado em Bioquímica). Universidade Federal do Ceará. 2016.

COUTO, V. M.; VILELA, F. C.; DIAS, D. F.; SANTOS, M. H.; SONCINI, R.; NASCIMENTO, C. G.; GIUSTI-PAIVA, A. Antinociceptive effect of extract of *Emilia sonchifolia* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, n. 2, p. 348 – 353, 2011.

CRAIK, D.J.; FAIRLIE, D.P.; LIRAS, S.; PRICE, D. The future of peptide-based drugs. **Chem Biol Drug Des.** V. 81(1), p. 136-47, 2013.

CUNHA, T.M.; VERRI, W.A; VIVANCOS, G.G.; MOREIRA, I.F.; REIAS, S.; PARADA, C.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Braz J Med Biol Res.** v. 37, p. 401-407, 2004.

CURY, Y.; PICOLO G.; GUTIERREZ, V.P.; FERREIRA, S.H. Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. **Nitric Oxide.** n. 30, v. 25(3), p. 243-254, 2011.

DE LA TORRE, B.G.; ALBERICIO, F. The Pharmaceutical Industry in 2019. An Analysis of FDA Drug Approvals from the Perspective of molecules. **Molecules.** v. 25, p. 745, 2020.

DEWEY, W.L.; HARRIS, L.S.; HOWES, J.F.; NUIE, J.A. The effect of various neurohumoral modulators on the activity of morphine and the narcotic antagonists in the tail-flick and phenylquinone tests. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 175, p. 435–442, 1970.

DIXON, A.R., MCMILLEN, H., ETKIN, N.L.. Ferment this: the transformation of Noni, a traditional Polynesian medicine (*Morinda citrifolia*, Rubiaceae). **Ecological Botany.** v. 53, p. 51–68, 1999.

DIXON, W. J. Efficient Analysis of Experimental Observations. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology.** v. 20(1), p. 441–462, 1980.

DIZ, M.S.; CARVALHO, A.O.; RIBEIRO, S.F.. CUNHA, M.; BELTRAMINI, L.; RODRIGUES, R.; NASCIMENTO, V.V.; MACHADO, O.L.; GOMES, V.M. Characterisation, immunolocalisation and antifungal activity of a lipid transfer protein from chili pepper (*Capsicum annuum*) seeds with novel α -amylase inhibitory properties. **Physiol Plant.** v. 142(3), p. 233-46, 2011.

DUSSOSSOY, E.; BRAT, P.; BONY, E.; BOUDARD, F.; POUCHERET, P.; MERTZ, C.; GIAIMIS, J.; MICHEL, A. Characterization, anti-oxidative and anti-inflammatory effects of Costa Rican noni juice (*Morinda citrifolia* L.). **J. Ethnopharmacol.** v. 133, n. 1, p. 108–115, 2011.

EDSTAM, M.M. Evolutionary history of the non-specific lipid transfer proteins. **Mol. Plant.** v. 4, p. 947–964. 2011.

ELIZABETH, A.K.C.; MALCANGIO, M. Neuropathic pain and cytokines: current perspectives. **Journal of Pain Research**. v. 6, p. 803–814, 2013.

FANTONI, D.T. Fatos históricos: a dor como sinal vital; A ética no tratamento da dor; Princípios básicos de farmacocinética e farmacodinâmica dos analgésicos para alívio da dor. In: . Tratamento da dor na clínica de pequenos animais. Rio de Janeiro: **Elsevier**, p.3-27, 2012.

FEIN, A. NOCICEPTORES: As células que sentem dor. Ribeirão Preto – SP: **Dor On Line**. 106, 2011.

FERNANDES, B. H. P.; GOMES, C. R. G. Mecanismos e aspectos anatômicos da dor. **Revista Saúde e Pesquisa**. v. 4, n. 2, p. 237-246, 2011.

FICH, E.A.; SEGERSON, N.A., ROSE, J. K. The plant polyester cutin: biosynthesis, structure, and biological roles. **Annu. Rev. Plant Biol.** v. 67, p. 207–233, 2016

FLETCHER, H.M.; DAWKINS, J.; RATTRAY, C.; WHARFE, G.; REID, M.; GORDON-STRACHAN, G. *Morinda citrifolia* (noni) as an anti-inflammatory treatment in women with primary dysmenorrhoea: a randomised double-blind placebo-controlled trial treatment in women with primary dysmenorrhoea: a randomised double-blind placebo-controlled trial. **Obstet. Gynecol. Int.** p. 1–6, 2013.

FORNASARI, D., COACCIOLI, S. Pharmacology of pain. **Reumatismo**. n. 6, v. 66 (1), p. 14-7, 2014.

FRED, E.; D'AMOUR; SMITH, D.L. A method for determining loss of pain sensation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 72(1), p. 74-79, 1941.

GANGADHAR, B.H.; SAJEESH, K.; VENKATESH, J.; BASKAR, V.; ABHINANDAN, K.; YU, J.W.; PRASAD, R.; MISHRA, R.K. Enhanced Tolerance of Transgenic Potato Plants Over-Expressing Non-specific Lipid Transfer Protein-1 (StnsLTP1) against Multiple Abiotic Stresses. **Front Plant Sci**. v. 22;7:1228, 2016.

GIESECKE, T.; GRACELY, R.H.; WILLIAMS, D.A.; GEISSER, M.E. PETZKE, F.W.; CLAUW, D.J. The relationship between depression, clinical pain, and experimental pain in a chronic pain cohort. **Arthritis Rheum**. v. 52(5), p. 1577-84, 2005.

GIZATULLINA, A. K.; FINKINA, E. I.; MINEEV, K. S.; MELNIKOVA, D. N.; BOGDANOV, I. V.; TELEZHINSKAYA, I. N.; BALANDIN, S. V.; SHENKAREV, Z. O. ; ARSENIIEV, A. S.; OVCHINNIKOVA, T. V. Recombinant production and solution structure of lipid transfer protein from lentil *Lens culinaris*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 439, p. 427–432, 2013.

GOLAN, D. Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia. 3. ed. **Rio de Janeiro: Guanabara**. Koogan, 2014.

GOMAR, J.; PETIT, M. C.; SODANO, P.; DENISE, S. Y.; MARION, D.; KADER, J. C.; VOVELLE, F.; PTAK, M. Solution structure and lipid binding of a nonspecific lipid transfer protein extracted from maize seeds. **Protein Science**. v. 5, p. 565–577, 1996.

- GREGORY, N.S.; HARRIS, A.L.; ROBINSON, C.R.; DOUGHERTY, P.M.; FUCHS, P.N. An overview of animal models of pain: disease models and outcome measures. **J Pain**. v. 14, p. 1255-1269, 2013.
- GUO, C.; GE, X.; MA, H. The rice OsDIL gene plays a role in drought tolerance at vegetative and reproductive stages. **Plant Mol. Biol.** v. 82, p. 239–253, 2013.
- HAN, G. W.; LEE, J. Y.; SONG, H. K.; CHANG, C.; MIN, K.; MOON, J. Structural basis of non-specific lipid binding in maize lipid-transfer protein complexes revealed by high-resolution X-ray crystallography. **Journal of Molecular Biology**, v. 308, n. 2, p. 263–278, 2001.
- HAN, G.W., LEE, J.Y., SONG, H.K., CHANG, C., MIN, K., MOON, J., SHIN, D.H., KOPKA, M.L., SAWAYA, M.R., YUAN, H.S. Structural basis of nonspecific lipid binding in maize lipid-transfer protein complexes revealed by high-resolution X-ray crystallography. **J. Mol. Biol.** v. 308, p. 263–278, 2001.
- INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN (IASP). **IASP taxonomy**. Washington, D.C., 2020.
- JACKSON, T.; THOMAS, S.; STABILE, V.; SHOTWELL, M.; HAN, X. A systematic review and meta-analysis of the global burden of chronic pain without clear etiology in low- and middle-income countries: trends in heterogeneous data and a proposal for new assessment methods. **Anesth Analg**. v. 123, p. 739-748. 2016.
- JAMSHIDI-KIA, F.; LORIGOOINI, Z.; AMINI-KHOEI, H. Medicinal plants: Past history and future perspective. **J Herbmed Pharmacol**. v. 7(1), p. 1-7, 2018.
- JAYARAMAN, S. K.; MANOHARAN, M. S.; ILLANCHEZIAN, S. Antibacterial, antifungal and tumor cell suppression potential of *Morinda citrifolia* fruit extracts. **Int. J. Integr. Biol.** v. 3, p. 44, 2008.
- JOLSEN, A.; HOLE, K. Animal models of analgesia. The pharmacology of pain. **Springer**. v. 130, 1997.
- JOLY, V.; MATTON, D.P. KAPPA, a simple algorithm for discovery and clustering of proteins defined by a key amino acid pattern: a case study of the cysteine-rich proteins. **Bioinformatics**. v. 31, p. 1716–1723, 2015.
- KADER J.C., Lipid-transfer protein in plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* v. 47, p. 627–654. 1996.
- KALIYAPERUMAL, S.; WILSON, K.; AEFNER, F.; DEAN, C. Animal Models of Peripheral Pain: Biology Review and Application for Drug Discovery. **Toxicol Pathol.** v. 48(1), p. 202-219, 2020.
- KALLA, SHIMAMOTO, R., K., POTTER, R., NIELSEN, P.S., LINNESTAD, C., OLSEN, O.A. The promoter of the barley aleurone-specific gene encoding a putative 7 kDa lipid

transfer protein confers aleurone cell-specific expression in transgenic Rice **Plant J.** v. 6, p. 849–860, 1994.

KANDEL, E. R. *Princípios da Neurociência*. 4. Ed. Barueri, SP: Manole, 2003.

KENNEDY, A. R. Chemopreventive Agents: Protease Inhibitors. **Pharmacology e Therapeutics Journal**, v. 78, n. 3, p. 167-209, 1998.

KIRUBAKARAN, S.I., BEGUM, S.M., ULAGANATHAN, K.; SAKTHIVEL, N. (2008). Characterization of a new antifungal lipid transfer protein from wheat. **Plant Physiol. Biochem.** v. 46, p. 918-927. 2008.

KLAUMANN, P. R.1; WOUK, A. F. P. F.2; SILLAS, T.1. Pathophysiology of pain. **Archives of Veterinary Science.** v. 13, p. 1-12, 2008.

KRAUSE, S.; REESE, G.; RANDOW, S.; ZENNARO, D.; QUARATINO, D.; PALAZZO, P.; CIARDIELLO M.A.; PETERSEN, A.; BECKER, W.M.; MARI, A. Lipid transfer protein (Ara h 9) as a new peanut allergen relevant for a Mediterranean allergic population. **J Allergy Clin Immunol.** v. 124(4), p. 771-8.e5, 2009.

KRAYCHETE, D.C; DE SIQUEIRA, J.T.T; ZAKKA, T.R.M; GARCIA, J.B.S. Recommendations for the use of opioids in Brazil: Part III. Use in special situations (postoperative pain, musculoskeletal pain, neuropathic pain, gestation and lactation). **Rev. Dor.** v. 15;(2), 2014.

LAU, J.L.; DUNN, M.K. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. **Bioorg Med Chem.** v. 1;26(10), p. 2700-2707, 2018.

LECTURE. **Pain Relief: The Pharmacology of Analgesics and Non-Steroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs)**. Disponível em: <https://www.lecturio.com/magazine/pain-relief/>. 2020.

LERCHE, M. H.; KRAGELUND, B. B.; BECH, L. M.; POULSEN, F. M. Barley lipid-transfer protein complexed with palmitoyl CoA: the structure reveals a hydrophobic binding site that can expand to fit both large and small lipid-like ligands. **Structure**, v. 5, p. 291–306, 1997.

LIN, Y.; CHANG, Y.; YANG, D.; TZANG, B.; CHEN, Y. Beneficial effects of noni (*Morinda citrifolia* L.) juice on livers of high-fat dietary hamsters. **Food Chem.**, v. 140 n. 1–2, p. 31–38, 2013.

LINDORFF-LARSEN, K.; WINTER, J. R. Surprisingly high stability of barley lipid transfer protein, LTP1, towards denaturant, heat and proteases. **FEBS Letters**, v. 488, n. 3, p. 145-148, 2001.

LLORCA-TORRALBA, M.; BORGES, G.; NETO, F.; MICO, J.A.; BERROCOSO, E. Noradrenergic Locus Coeruleus pathways in pain modulation. **Neuroscience**. n. 3, v. 338, p. 93-113, 2016.

LOESER, J.D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **Lancet.** 8;353(9164):1607-9, 1999.

- LOESER, J.D.; TREEDE, R.D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**. n. 31, v. 137(3), p. 473-7, 2008.
- LV, L.; CHEN, H.; HO, C.; SANG, S. Chemical components of the roots of noni (*Morinda citrifolia*) and their cytotoxic effects. **Fitoterapia**. v. 82, n. 4, p. 704–708, 2011.
- MANSIKKA, H.; ZHOU, L.; DONOVAN, D.M.; PERTOVAARA, A.; RAJA, N.S. MASUDA, M.; MURATA, K.; FUKUHAMA, A.; NARUTO, S.; FUJITA, T.; UWAYA, A.; ISAMI, F.; MATSUDA, H. Inhibitory effects of constituents of *Morinda citrifolia* seeds on elastase and tyrosinase. **Journal Natural of Medicine**, v. 63, p. 267–273, 2009.
- McCLATHEY, W. From Polynesian Healers to Health Food Stores: Changing Perspectives of *Morinda citrifolia* (Rubiaceae). **Integrative Cancer Therapies**. v. 1, p. 110-120, 2002.
- McGRATH, J.C.; DRUMMOND, G.B.; MCLACHLAN, E.M.; KILKENNY, C.; WAINWRIGHT, C.L. **Guidelines for reporting experiments involving animals: the Arrive guidelines**. p. 1573-1576, 2010.
- MESSESLINGER, K. What is a nociceptor? **Anaesthetist**. v. 46, p. 142-53, 1997.
- MILLAN M.J. Descending control of pain. **Prog Neurobiol**. v. 66(6), p. 355-474, 2002.
- MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol**. v. 57(1), p. 1-164, 1999.
- MILLONIG, G.; STADLMANN, S. AND WOLFGANG, V. Herbal hepatotoxicity: acute hepatitis caused by a Noni preparation (*Morinda citrifolia*). **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**. v. 17 (4), p. 445-447, 2005.
- MOGIL, J.S. Animal models of pain: progress and challenges. **Nat. Rev. Neurosci**. v. 10, p. 283-294, 2009.
- MORAES, G. P. *et al.* Toxicogenetic profile of rats treated with aqueous extract from *Morinda citrifolia* fruits. **Journal of Medicinal Plants Research**. v. 10(2), p. 18-28, 2016.
- MORTON, J.F. The ocean-going noni, or Indian Mulberry (*Morinda citrifolia*, Rubiaceae) and some of its “colorfum” relatives”. **Econ Bot**. v. 46, p. 241-256, 1992.
- MURRAY, P.E.; MURRAY, R.M.; NAMEROW, K.N.; KUTTLER, S.; GARCIA-GODOY, F.. Evaluation of *Morinda citrifolia* as an endodontic irrigant. **J. Endod**. v.34, n.1, p. 66–70, 2008.
- NALAMACHU, S. An overview of pain management: the clinical efficacy and value of treatment. **The American journal of managed care**. v. 19, p. s261-6, 2013.
- NEGUS, S. S. Preclinical assessment of candidate analgesic drugs: recent advances and future challenges. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 319, p. 507-14, 2006.

NELSON, S.C. Noni seeds handling and seedling production. **Fruits and nuts**. Cooperative extension service/CTAHR, University of Hawaii at Mānoa. 2005.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J Nat Prod**. v. 75(3), p. 311-35, 2012.

NUALSANIT, P. ROJANAPANTHU, W. GRITSANAPAN, S.H. LEE, D. LAWSON, S.J. BAEK. Damnacanthal, a noni component, exhibits antitumorigenic activity in human colorectal cancer cells. **J. Nutr. Biochem**. v. 23, n. 8, p. 915–923, 2012.

OJAH, E.O. Medicinal plants: Prospective drug candidates against the dreaded Coronavirus. **Iberoamerican Journal of Medicine**. p. 314-321, 2020.

OKUSADA, K.; NAKAMOTO, K.; NISHIDA, M. The antinociceptive and anti-inflammatory action of the CHCl₃-soluble phase and its main active component, damnacanthal, isolated from the root of *Morinda citrifolia*. **Biol Pharm Bull**. v. 34, p. 103–107, 2011.

OLIVEIRA, A.C.P.; ENDRINGER, D.C.; AMORIM, L.A.S.; BRANDÃO, M.G.L.; COELHO, M.M. Effect of the extracts and fractions of *Baccharis trimera* and *Syzygium cumini* on glycaemia of diabetic and non-diabetic mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 3, p. 465-469, 2005.

PALU, A.K.; WEST, B.J.; JARAKAE J. C. Noni seed oil topical safety, efficacy, and potential mechanisms of action. **J. Cosmet., Dermatol. Sci. Appl.**, v. 2, n. 2, p. 74–78, 2012.

PASTORELLO, E. A.; FARIOLI, L.; PRAVETTONI, V.; SPANO, M.; SCIBOLA, E.; TRAMBAIOLI, C.; GIUFFRIDA, M. G.; ANSALONI, R.; GODOVACZIMMERMANN, J.; CONTI, A.; FORTUNATO, D.; ORTOLANI, C. The maize major allergen, which is responsible for food-induced allergic reactions, is a lipid transfer protein. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 106, p. 744–751, 2000.

PASTORELLO, E. A.; FARIOLI, L.; PRAVETTONI, V.; ORTOLANI, C.; FORTUNATO, D.; GIUFFRIDA, M. G. Identification of grape and wine allergens as an endochitinase 4, a lipid-transfer protein, and a thaumatin LTP crossreacting with the peach major allergen. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, n. 2, p. 350–359, 2003.

PATRIDGE, E.; GAREISS, P.; KINCH, M.S.; HOYER, D. An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. **Drug Discov Today**. v. 21(2), p. 204-207, 2016.

PEREIRA, M.L., OLIVEIRA, H.D., OLIVEIRA, J.T., GIFONI, J.M., ROCHA, R. O., SOUSA, D.O., VASCONCELOS, I.M. Purification of a chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seeds with potential to relieve pain and inflammation. **Protein Pept Lett**. v. 18(11), p. 1078-1085. 2011.

PINHEIRO, B.; SILVA, A.; SOUZA, G.; FIGUEIREDO, J.; CUNHA, F.; LAHLOU, S.; SILVA, J.K.; MAIA, J. G.; SOUSA, P. J. Chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory effects in rodents of the essential oil of *Peperomia serpens* (Sw.) Loud. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 188, p. 479–486, 2011.

RAJA, S.N.; CARR, D.B.; COHEN, M.; FINNERUP, N.B.; FLOR, H.; GIBSON, S., et al. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. **Pain**. v. 23, 2020.

RAMANATHAN, D. S. Cholinergic systems are essential for late-stage maturation and refinement of motor cortical circuits. **Journal of Neurophysiology**. v. 113, p. 1585–1597, 2015.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J.; HENDERSON, G. **Farmacologia**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

RASOULI, H.; PARVANEH, S.; MAHNAM, A.; RASTEGARI-POUYANI, M., HOSEINKHANI, Z.; MANSOURI, K. Anti-angiogenic potential of trypsin inhibitor purified from *Cucumis melo* seeds: Homology modeling and molecular docking perspective. **Int J Biol Macromol**. v. 96, p. 118-128, 2017.

RIPAMONTI, C.I.. Pain management. **Annals of Oncology**. v. 23, p. x294–x301, 2012.

RIVANOR, R.L.C.; CHAVES, H.V.; VAL, D.R.; FREITAS, A.R.; LEMOS, J.C.; RODRIGUES, J.A.; PEREIRA, K.M.; ARAÚJO, I.W.; BEZERRA, M.M.; BENEVIDES, N.M. A lectin from the green seaweed *Caulerpa cupressoides* reduces mechanical hypernociception and inflammation in the rat temporomandibular joint during zymosan-induced arthritis. **Int Immunopharmacol**. v. 21(1), p. 34-43, 2014.

RIVANOR, R.L.D.C.; VAL, D.R.; RIBEIRO, N.A.; SILVEIRA, F.D.; ASSIS, E.L.; FRANCO, Á.X.; VIEIRA, L.V.; QUEIROZ, I.N.L.; CHAVES, H.V.; BEZERRA, M.M.; BENEVIDES, N.M.B. A lectin fraction from green seaweed *Caulerpa cupressoides* inhibits inflammatory nociception in the temporomandibular joint of rats dependent from peripheral mechanisms. **Int J Biol Macromol**. v. 115, p. 331-340, 2018.

ROCHA, A.P.C.; KRAYCHETE, D.C.; LEMONICA, L.; CARVALHO L.R.; BARROS, G.A.M.; GARCIA, J. B.S.; SAKATA R.K. Pain: Current Aspects on Peripheral and Central Sensitization. **Rev Bras Anesthesiol**. v. 57, n. 1, p. 94-105, 2007.

RODRIGUEZ, F. M.; PINEDO, M. D. Mito y realidad de *Morinda citrifolia* L. (noni). **Rev. Cubana Plantas Méd.** v. 9, p. 3, 2004.

SÁ, K. *et al.* Prevalência de dor crônica e fatores associados na população de Salvador, Bahia. **Revista de Saúde Pública [online]**. v. 43, p. 622-630, 2009.

SAGHIRI, M. A.; GARCIA-GODOI, F.; ASGAR, K.; LOFTI, M. The effect of *Morinda citrifolia* juice as an endodontic irrigant on smear layer and microhardness of root canal dentin. **Oral Sci. Int**. v. 10, n. 2, p. 53–57, 2013.

SAKURADA, T.; KATSUMATA, K.; TAN-NO, K.; SAKURADA, S.; KISARA, K. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. **Neuropharmacology**. v. 31(12), p. 1279-85, 1992.

SALCEDO G, SANCHEZ-MONGE R, DIAZ-PERALES A, GARCIA-CASADO G, BARBER D. Plant non-specific lipid transfer proteins as food and pollen allergens. **Clin Exp Allergy**. v. 34(9), p. 1336-1341. 2004.

SALMINEN, T.A.; BLOMQVIST, K.; EDQVIST, J. Lipid transfer proteins: classification, nomenclature, structure, and function. **Plant**. v. 244(5), p. 971-997, 2016.

SAN MIGUEL-MONCIN, M.; KRAIL, M.; SCHEURER, S.; ENRIQUE, E.; ALONSO, R.; CONTI, A.; CISTERÓ-BAHÍMA, A.; VIETHS, S. Lettuce anaphylaxis: identification of a lipid transfer protein as the major allergen. **Allergy**, v. 58, p. 511–517, 2003.

SANDKÜHLER, J. Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. **Physiol Rev**. v. 89, p. 707-758, 2009.

SANTOS, F.A.A. Prevalência de dor crônica e sua associação com a situação sociodemográfica e atividade física no lazer em idosos de Florianópolis, Santa Catarina: estudo de base populacional. **Revista Brasileira de Epidemiologia [online]**. v. 18, p. 234-247, 2015.

SCHAIBLE, H. G.; RICHTER, F. Pathophysiology of pain. **Langenbecks Arch. Surg.**, v. 389, p. 237-243, 2004.

SCHEURER S, LAUER I, FOETISCH K, MONCIN MS, RETZEK M, HARTZ C. Strong allergenicity of Pru a 3, the lipid transfer protein from cherry, is related to high stability against thermal processing and digestion. **J Allergy Clin Immunol**. v. 114, p. 900–907, 2004.

SERAFINI, M.R.; SANTOS, R.C.; GUIMARÃES, A.G. *Morinda citrifolia* Linn leaf extract possesses antioxidant activities and reduces nociceptive behavior and leukocyte migration. **J Med Food**. v. 14, p. 1159–1166, 2011.

SHI, Z.; WANG, Z.; XU, H. L.; TIAN, Y.; LI, X.; BAO, J. K.; SUN, S. R.; YUE, B. S. Modeling, docking and dynamics simulations of a non-specific lipid transfer protein from *Peganum harmala* L. **Computational Biology and Chemistry**, v. 47, p. 56– 65, 2013.

SILVA , M.C.C. *et al.* Therapeutic and biological activities of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. v. 3(4), p. 332-336, 2010.

SINHA, S.; VOHORA, D. Drug discovery and development: an overview. Cap 2. **Elsevier**. Jamia Hamdard University, New Delhi, India. 2018.

SINHA, V.R., TREHAN, A. Biodegradable microspheres for protein delivery. **J Control Release**. v. 90(3), p. 261-80. 2003.

SODANO, P.; CAILLE, A.; SY, D.; DE PERSON, G.; MARION, D.; PTAK, M. 1H NMR and fluorescence studies of the complexation of DMPG by wheat nonspecific lipid transfer protein. **FEBS Letters**, v. 416, p. 130–134, 1997.

SOUSA, J.A.; AQUINO, A. R. L.; FREIRE, F. C. O. F.; NETO, P. A. F. S. Comunicado técnico: produção de mudas de noni (*Morinda citrifolia* L.). **EMBRAPA**. 2010.

SOUSA, S.G. Efeito anti-inflamatório e antinociceptivo da fração polissacarídica sulfatada extraída de *Morinda citrifolia* (noni). **Dissertação**. UFPI. 2017.

SOUZA, A.A.; COSTA, A.S.; CAMPOS, D.C.O.; BATISTA, A.H.M.; SALES, G.W.P.; NOGUEIRA, N.A.P.; ALVES, K.M.M.; COELHO-DE-SOUZA, A.N.; OLIVEIRA, H.D. Lipid transfer protein isolated from noni seeds displays antibacterial activity in vitro and improves survival in lethal sepsis induced by CLP in mice. **Biochimie**. v. 149, p. 9-17, 2018.

SOUZA, J.B; PERISSINOTTI, D., FONSECA, P.; OLIVEIRA JR, J. O.; GROSSMAN, E., POSSO, I. Sociedade Brasileira de Estudos da Dor (SBED) - Epidemiology: Chronic Pain states. – **16th World Congress on Pain**, Yokohama, 2016.

STADLBAUER, V.; FICKERT, P.; LACKNER, C.; SCHMERLAIB, J.; KRISPER, P.; TRAUNER, M.; STAUBER, R.E. Hepatotoxicity of Noni juice: report of two cases. **World J Gastroenterol**. v. 14;11(30), p. 4758-60, 2005.

SU, C., WANG, M.Y., NOWICKI, D., JENSEN, J., ANDERSON, G. Selective cox-2 inhibition of *Morinda citrifolia* (Noni) in vitro. In: The Proceedings of the Eicosanoids and Other Bioactive Lipids in Cancer. **Inflammation and Related Disease**. The 7th Annual Conference, Loews Vanderbilt Plaza, Nashville, Tennessee, USA, 2001.

TASSIN-MOINDROT, S.; CAILLE, A.; DOULIEZ, J. P.; MARION, D.; VOVELLE, F. The wide binding properties of a wheat nonspecific lipid transfer protein. Solution structure of a complex with prostaglandin B2. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 1117–1124, 2000.

THE BUSINESS RESEARCH COMPANY. Global Protein Therapeutics Market Outlook. 2020.

MANSIKKA, H.; ZHOU, L.; DONOVAN, D.M.; PERTOVAARA, A.; RAJA, S.N. The role of μ -opioid receptors in inflammatory hyperalgesia and $\alpha 2$ -adrenoceptor-mediated antihyperalgesia. **Neuroscience**. v. 113, p. 339-349, 2002.

TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. A. Noni: frutífera medicinal em introdução e aclimação no Brasil. **O Agrônomo**, 57:20-21, 2005.

TORDESILLAS, L.; PACIOS, L. F.; PALACIN, A.; QUIRCE, S.; ARMENTIA, A.; BARBER, D.; SALCEDO, G.; DÍAZ-PERALES, A. Molecular basis of allergen cross-reactivity: non-specific lipid transfer proteins from wheat flour and peach fruit as models. **Molecular Immunology**, v. 47, p. 534–540, 2009.

TRANQUILLI, W. J. Fisiologia da dor aguda. In: GREENE, S. A. **Segredos em anestesia veterinária e manejo da dor**. Porto Alegre: Artmed, p. 399-402, 2004.

VAN REE, R. Clinical importance of non-specific lipid transfer proteins as food allergens. **Biochemical Society Transactions**, v. 30, p. 910–913, 2002.

- VANDERAH, T. W. Pathophysiology of pain. **Medical Clinics of North America**. p. 91, p. 1-12, 2007.
- VANPATTEN, S.; AL-ABED, Y. The challenges of modulating the “rest and digest” system: acetylcholine receptors as drug targets. **Drug Discovery Today**. v. 22, p. 97–104, 2017.
- VEIGA, R. F. A.; BARBOSA, W.; HIROCE, R.; MENÇAÇOLLI, S. J.; TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. A. Noni: frutífera medicinal em introdução e aclimatação no Brasil. **O Agrônômico**. v. 57, p. 20-21, 2005.
- WANG W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. **Int J Pharm**. v. 185(2), p.129-88. 1999.
- WANG, M.Y.; WEST, B.J.; JENSEN, C.J.; NOWICKI, D.; SU, C.; PALU, A.K.; ANDERSON, G. *Morinda citrifolia* (Noni): a literature review and recent advances in Noni research. **Acta Pharmacol Sin**. v. 23(12), p. 1127-41, 2002.
- WEST, B. J.; PALMER, S. K.; DENG, S.; PAULO, A. K. Antimicrobial activity of an iridoid rich extract from *Morinda citrifolia* fruit. **Curr. Res. J. Biol. Sci**. v. 4, n. 1, p. 52–54, 2012.
- WOODCOCK, J.; WITTER, J.; DIONNE, R. A. Stimulating the development of mechanism-based, individualized pain therapies. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. 9, p.703-10. 2007.
- WOOLF, C.J. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. **Pain**. v. 87(2), p. 149-58, 2000.
- WOOLFE, G. MACDONALD, A.D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (demerol). **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 80(3), p. 300-307, 1944.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Guidelines on the Pharmacological Treatment of Persisting Pain in Children with Medical Illnesses. **Geneva: World Health Organization**; 2012.
- YAKSH, T. L. Central pharmacology of nociceptive transmission. Textbook pain, 4 ed. **Edinburgo: Elsevier Churchill Livingston**. p. 371-415, 2006.
- YEATS, T.H.; ROSE, J.K. The biochemistry and biology of extracellular plant lipid-transfer proteins (LTPs). **Protein Sci**. v. 17(2), p. 191-198, 2008.
- YOUNOS, C. e col. Analgesic and Behavioral effects of *Morinda citrifolia*. **Planta Medica**. v. 56, p. 430 – 434, 1990.

ZHANG, L.; RAVIPATI, A.S.; KOYYALAMUDI, S.R.; JEONG, S.C.; REDDY, N.; SMITH, P.T.; BARTLETT, J.; SHANMUGAM, K.; MÜNCH, G.; WU, M.J. Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected medicinal plants containing phenolic and flavonoid compounds. **J Agric Food Chem.** v. 14;59(23), p. 12361-7, 2011.

ZOTTICH, U.; CUNHA, M.; CARVALHO, A.O.; DIAS, G.B.; SILVA, N.C.; SANTOS, I.S.; NASCIMENTO, V.V.; MIGUEL, E.C.; MACHADO, O.L.; GOMES, V.M. Purification, biochemical characterization and antifungal activity of a new lipid transfer protein (LTP) from *Coffea canephora* seeds with α -amylase inhibitor properties. **Biochim Biophys Acta.** v. 1810(4), p. 375-83, 2011.

APÊNDICE A – PRODUÇÕES CIENTÍFICAS DURANTE A PÓS-GRADUAÇÃO

Coautorias em artigos publicados:

- First isolation and antinociceptive activity of a lipid transfer protein from noni (*Morinda citrifolia*) seeds;
- *Morinda citrifolia* lipid transfer protein 1 exhibits anti-inflammatory activity by modulation of pro- and anti-inflammatory cytokines;
- Lipid transfer protein isolated from noni seeds displays antibacterial activity *in vitro* and improves survival in lethal sepsis induced by CLP in mice;

Patente depositada:

- Aplicação de uma proteína isolada de sementes de *Morinda citrifolia* L., para o tratamento e prevenção da úlcera péptica.

Submissões em andamento:

- Protein isolated from the seed of *Morinda citrifolia* L. prevents irinotecan-induced intestinal mucositis in mice;
- *Morinda citrifolia* lipid transfer protein confers gastroprotective and hepatoprotective effects against inflammation and oxidative stress in mice;
- The protein-enriched fraction from *Spirulina platensis* protects hemiparkinsonian rats against neuroinflammation and oxidative stress;
- Cysteine proteases from noni fruits (*Morinda citrifolia* L.) are promising in the hydrolysis of wheat gluten and safe as a new food ingredient.

Projetos parceiros em andamento:

- Proteína isolada de sementes de *Morinda citrifolia* L. (McLTP₁) como ferramenta terapêutica nos efeitos colaterais da quimioterapia: estudo dos aspectos estruturais, dos mecanismos de ação e vias de sinalização envolvidas;