



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

ARTUR CHAGAS DE SOUSA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO TÓXICO E INFLUÊNCIA COMPORTAMENTAL DO
ALCALOIDE IMIDAZÓLICO EPIISOPILOTURINA DE *Pilocarpus microphyllus* NO
MODELO EXPERIMENTAL DE NEUROPATIA DO NERVO SAFENO EM *Rattus*
*novergicus***

FORTALEZA

2022

ARTUR CHAGAS DE SOUSA

AVALIAÇÃO DO EFEITO TÓXICO E INFLUÊNCIA COMPORTAMENTAL DO
ALCALOIDE IMIDAZÓLICO EPIISOPILOTURINA DE *Pilocarpus microphyllus* NO
MODELO EXPERIMENTAL DE NEUROPATIA DO NERVO SAFENO EM *Rattus*
novergicus

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)
apresentado curso de Farmácia da Faculdade
de Farmácia, Odontologia e Enfermagem
(FFOE) da Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial à obtenção do título de
bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof. Dra. Luzia Kalyne Almeida
Moreira Leal

Coorientadora: MSc. Khetyma Moreira
Fonseca

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

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

S696a Sousa, Artur Chagas de.
Avaliação do efeito tóxico e influência comportamental do alcaloide imidazólico Epiisopiloturina de
Pilocarpus microphyllus no modelo experimental de neuropatia do nervo safeno em *Rattus norvegicus* /
Artur Chagas de Sousa. – 2022.
62 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia,
Odontologia e Enfermagem, Curso de Farmácia, Fortaleza, 2022.
Orientação: Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal .
Coorientação: Profa. Ma. Khetyma Moreira Fonseca.

1. Epiisopiloturina. 2. Dor neuropática. 3. Toxicidade. I. Título.

CDD 615

ARTUR CHAGAS DE SOUSA

AVALIAÇÃO DO EFEITO TÓXICO E INFLUÊNCIA COMPORTAMENTAL DO
ALCALOIDE IMIDAZÓLICO EPIISOPILOTURINA DE *Pilocarpus microphyllus* NO
MODELO EXPERIMENTAL DE NEUROPATIA DO NERVO SAFENO EM *Rattus*
novergicus

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)
apresentado curso de Farmácia da Faculdade
de Farmácia, Odontologia e Enfermagem
(FFOE) da Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial à obtenção do título de
bacharel em Farmácia.

Aprovada em: 30/11/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Talita Magalhães Rocha
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

Prof. Dr. José Eduardo Ribeiro Honório Júnior
Centro Universitários Christus (UNICHRISTUS)

A Deus.

Aos meus pais, aos meus irmãos e à minha
família.

AGRADECIMENTOS

À Deus por estar sempre ao meu lado e ter me concedido os meios e forças para lutar por meus objetivos e sonhos.

À meus pais Antonio Chagas e Maria Eliane por todo o apoio e incentivo durante a minha graduação. Eles foram essenciais na minha caminhada até aqui.

À meus irmãos Edilene, Edilane, Adriano e Alisson.

Aos meus colegas de curso por compartilhar bons momentos durante a graduação.

À minha família por estar ao meu lado e em especial a minha tia Cátia Chagas.

À banca avaliadora por ter aceitado o convite.

Aos meus professores do ensino básico até a graduação, por terem compartilhado seus conhecimentos.

À minha orientadora Profa. Dra. Kalyne Leal por todo o apoio, por ter confiado em meu trabalho e aberto as portas para que eu pudesse vivenciar novas experiências no CEFAC.

À minha coorientadora Msc. Khetyma Moreira por ter participado ativamente da realização desta monografia e por todo o apoio e incentivo.

Agradeço ao CEFAC pela receptividade e conhecimentos valiosos aprendidos e passados com tanta dedicação e zelo pelos mestrandos, doutorandos e alunos de iniciação científica que realizaram este trabalho juntamente comigo.

À Fernanda Barbosa por toda a ajuda na elaboração da apresentação e pelos conselhos.

Também agradeço aos meus amigos da Igreja Adventista do Sétimo Dia de Catolé por todo o apoio e orações durante os anos da graduação, local onde sempre encontrei refúgio e forças.

Agradeço aos projetos de extensão que participei durante a graduação que enriqueceram minha formação: Liga Acadêmica de Neuroanatomia Clínica e Antropologia Forense, Projeto Imuno Ensina, Centro de Estudos em Atenção Farmacêutica e Projeto Núcleo de Estudo da Longevidade.

Gratidão também ao Laboratório de Oncologia Experimental, onde comecei minha experiência na iniciação científica logo no início da graduação, em especial a Profa. Dra. Cláudia Pessoa.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Aqui fica registrado a minha gratidão a todos que participaram direta e indiretamente da realização deste trabalho.

“Nada temos a temer quanto ao futuro, a menos que nos esqueçamos como Deus tem nos conduzido no passado.” (ELLEN G. WHITE, Testimonies, Life Sketches, 1915, p. 196).

RESUMO

A dor neuropática é classificada como uma dor crônica caracterizada pela lesão nas fibras nervosas sensitivas, causando alodinia e hiperalgesia. A farmacoterapia atual é restrita ao uso *off-label* de fármacos utilizados em outras doenças, dessa forma as plantas medicinais podem fornecer novas opções para o tratamento da dor neuropática. Nesse contexto, tem se destacado a Epiisopiloturina (EPIT), alcaloide isolado de sub-produto durante a extração de pilocarpina das folhas de *Pilocarpus microphyllus*. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da EPIT sobre parâmetros bioquímicos do sangue e o comportamento dos animais durante a sua avaliação no modelo de dor neuropática em ratos. Os animais foram tratados com EPIT (1,5; 3, 4 e 5 mg/kg, v.o.) e avaliados parâmetros bioquímicos (creatinina, ureia, HDL, triglicérides), hematológicos e comportamental, paralelo às avaliações da atividade antinociceptiva (teste do Von Frey), para avaliar de maneira preliminar possível toxicidade da EPIT. A avaliação comportamental deu-se através do teste do campo aberto. Após os testes comportamentais, os animais foram eutanasiados para a coleta de tecido hepático (determinação de glutathione reduzida (GSH) e malondialdeído (MDA) e rins para análise histopatológica juntamente com o fígado. A EPIT (1,5; 3 e 4,5 mg/kg) foi capaz de aumentar o limiar da dor nos animais que tiveram a substância administrada, além de influenciar positivamente no comportamento através do aumento do número de cruzamentos e *grooming* no teste do campo aberto. A EPIT não interferiu significativamente no aumento dos níveis de GSH e MDA induzido pela neuropatia. Os parâmetros bioquímicos (ureia, creatinina, HDL e triglicérides) não diferiram significativamente em relação ao grupo controle (não tratados). Não foram observadas alterações no número de hemácias, plaquetas e hemoglobina. A análise histopatológica do tecido hepático e renal mostrou algumas alterações (avaliada por escores) induzidos pela EPIT (1,5; 3 e 4,5 mg/kg). Nos rins, a dose de 1,5 mg/kg aumentou congestão vascular e infiltrado celular, enquanto no fígado as maiores doses foram as que induziram alterações em relação ao grupo controle (neuropatia, não tratado). Em conclusão, nosso estudo mostrou de forma inédita o efeito antinociceptivo da EPIT no modelo de dor neuropática induzida pela ligadura do nervo safeno, que parece não estar associado a uma toxicidade bioquímica, hematológica, e quanto aos estudos histopatológicos, estudos adicionais estão na agenda de pesquisa, muito embora os dados sugerem ausência de toxicidade importante.

Palavras-chave: Epiisopiloturina; Dor neuropática; Toxicidade.

ABSTRACT

Neuropathic pain is classified as chronic pain characterized by damage to sensory nerve fibers, causing allodynia and hyperalgesia. Current pharmacotherapy is restricted to the off-label use of drugs used in other diseases, so medicinal plants can provide new options for the treatment of neuropathic pain. In this context, Epiisopiloturine (EPIT) has been highlighted, an alkaloid isolated from a by-product during the extraction of pilocarpine from the leaves of *Pilocarpus microphyllus*. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the effect of EPIT on blood biochemical parameters and animal behavior during its evaluation in the model of neuropathic pain in rats. The animals were treated with EPIT (1.5; 3, 4 and 5 mg/kg, p.o.) and biochemical parameters (creatinine, urea, HDL, triglycerides), hematological and behavioral parameters were evaluated, parallel to the evaluation of antinociceptive activity (Von test Frey), to preliminarily evaluate possible EPIT toxicity. The behavioral evaluation was carried out through the open field test. After the behavioral tests, the animals were euthanized for the collection of liver tissue (determination of reduced glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) and kidneys for histopathological analysis together with the liver. EPIT (1.5; 3 and 4.5 mg/kg) was able to increase the pain threshold in animals that had the substance administered, in addition to positively influencing behavior by increasing the number of crossings and grooming in the open field test. EPIT did not significantly interfere with the increase in levels of GSH and MDA induced by neuropathy. Biochemical parameters (urea, creatinine, HDL and triglycerides) did not differ significantly in relation to the control group (untreated). No changes were observed in the number of red blood cells, platelets and hemoglobin. Histopathological analysis of the hepatic and renal tissue showed some alterations (assessed by scores) induced by EPIT (1.5; 3 and 4.5 mg/kg). In the kidneys, the dose of 1.5 mg/kg increased vascular congestion and cellular infiltrate, while in the liver the highest doses were those that induced alterations in relation to the control group (neuropathy, untreated). In conclusion, our study showed, for the first time, the antinociceptive effect of EPIT in the model of neuropathic pain induced by saphenous nerve ligation, which does not seem to be associated with biochemical, hematological toxicity, and regarding histopathological studies, additional studies are on the agenda of research, although the data suggest an absence of important toxicity.

Keywords: Epiisopiloturine; neuropathic pain; toxicity .

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Estrutura química da Epiisopiloturina	23
Figura 2	- Limiar de nocicepção pelo teste de von Frey.....	37
Figura 3	- Número de cruzamentos no teste do campo aberto.....	38
Figura 4	- Exploração Vertical (<i>Rearing</i>) no teste do campo aberto.....	39
Figura 5	- Comportamento de autolimpeza (Grooming) no teste do campo aberto..	40
Figura 6	- Efeito das doses de EPIT (1,5; 3 e 4 mg/kg) no fígado dos animais.....	42
Figura 7	- Efeito das doses de EPIT (1,5; 3 e 4 mg/kg) no rim dos animais.....	44
Figura 8	- Efeito das doses de EPIT (1,5; 3 e 4 mg/kg) no número de hemácias, hemoglobina e plaquetas.....	46
Figura 9	- Efeito das doses de EPIT (1,5; 3 e 4 mg/kg) nos níveis bioquímicos de colesterol total, HDL, ureia e creatinina.....	48
Figura 10	- Efeito das doses de EPIT (1,5; 3 e 4 mg/kg) nos níveis de malondialdeído (MDA) e glutathiona reduzida (GSH).....	50

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	Distribuição dos grupos experimentais para os testes de parâmetros bioquímicos e histopatológicos.....	29
QUADRO 2	Distribuição dos grupos experimentais para os testes de von Frey e teste do campo aberto.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico,
ATC	Antidepressivo tricíclico
BTX-A	Toxina botulínica tipo A
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DTNB	Ácido 5,5-ditio-bis-(2- nitrobenzóico)
EPIL	Epiisopilosina
EPIT	Epiisopiloturina
ERO	Espécie reativa de oxigênio
GSH	Glutathione reduzida
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HE	Hematoxilina-eosina
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
ip	Intraperitoneal
IRSN	Inibidor da recaptação de serotonina e norepinefrina
KCl	Cloreto de potássio
LDH	Lactato desidrogenase
LPS	Lipopolissacarídeo
MDA	Malondialdeído
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide

NMDA	N-metil-D-aspartato
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NP-SH	Grupos sulfidrílicos não-protéico
SNC	Sistema nervoso central
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TENS	Estimulação elétrica transcutânea do nervo
TNF	Fator de necrose tumoral
TRPV1	Receptor de potencial transitório vaniloide subtipo 1
vo	Via oral

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
°C	grau centígrado
α	alfa
β	beta
δ	delta
K	kappa
μ	mu
μL	microlitro (s)
mL	mililitro
mN	miliNewton
kg	quilograma (s)
mg	miligrama (s)
mm	milímetro (s)
nm	nanômetro (s)
rpm	rotação por minuto
h	hora (s)
n°	número (s)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1	Dor neuropática.....	19
2.2	Tratamento da dor neuropática.....	20
2.3	Alcaloides como fonte de novos fármacos.....	22
2.4	Avaliação da analgesia e teste comportamental.....	24
2.4.1	<i>Teste de von Frey</i>.....	24
2.4.2	<i>Teste do campo aberto</i>.....	25
2.5	Avaliação da toxicidade do composto imidazólico Epiisopiloturina (EPIT).....	25
3	OBJETIVOS.....	27
3.1	Objetivo geral	27
3.2	Objetivos específicos.....	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1	Obtenção da Epiisopiloturina.....	28
4.2	Delineamento e local de pesquisa.....	28
4.3	População / Amostra	28
4.4	Delineamento experimental.....	29
4.5	Procedimento cirúrgico de indução da neuralgia por ligadura do nervo safeno.....	30
4.6	Protocolo de tratamento.....	31
4.7	Teste de von Frey e teste do campo aberto.....	31

4.7.1	Teste de von Frey.....	31
4.7.2	Teste do campo aberto.....	31
4.8	Análise histopatológica (fígado e rim).....	32
4.9	Hemograma e parâmetros bioquímicos.....	32
4.10	Estresse oxidativo.....	33
4.10.1	<i>Dosagem de malondialdeído (MDA)</i>	33
4.10.2	<i>Dosagem de glutathiona reduzida (GSH)</i>	33
4.11	Análise dos resultados.....	34
5	RESULTADOS.....	35
5.1	Efeito das doses de EPIT (1,5; 3 e 4,5 mg/kg) sobre o limiar nociceptivo e teste do campo aberto.....	35
5.2	Efeito da administração de EPIT nas doses 1,5; 3 e 4,5 mg/kg no fígado dos animais.....	41
5.3	Efeito da administração de EPIT nas doses 1,5; 3 e 4,5 mg/kg no rim dos animais.....	43
5.4	Efeito da administração de EPIT nas doses 1,5; 3 e 4,5 mg/kg no número de hemácias, hemoglobina e plaquetas.....	45
5.5	Efeito da administração de EPIT nas doses 1,5; 3 e 4,5 mg/kg nos níveis bioquímicos de Colesterol total, HDL, Ureia e Creatinina.....	47
5.6	Efeito da administração de EPIT nas doses 1,5; 3 e 4,5 mg/kg nos níveis de Malondialdeído (MDA) e Glutathiona reduzida (GSH).....	49
6	DISCUSSÃO.....	51
7	CONCLUSÃO.....	54
	REFERÊNCIAS.....	55

1 INTRODUÇÃO

A dor neuropática (DN) é caracterizada pela ativação anormal das vias de condução da dor e se manifesta como alodínia mecânica e hipersensibilidade térmica resultante da ativação de algumas vias nociceptivas (WONG *et al.*, 2020). Assim, na tentativa de inibir a ativação destas vias, a farmacoterapia atual ainda não obteve sucesso e, associado a isto, tem-se vários efeitos adversos decorrentes dos fármacos utilizados que interferem na qualidade de vida dos pacientes. Baseado nisto, o estudo dos metabólitos secundários advindos das plantas tem sido extensivamente estudados como fonte de novas alternativas terapêuticas (DALLAZEN *et al.*, 2022).

Dessa forma, as plantas podem ser uma ampla fonte de moléculas bioativas que podem ser utilizadas no tratamento da dor neuropática (QUINTANS *et al.*, 2014). Entre as classes de produtos naturais, o alcaloide Epiisopiloturina (EPIT) é uma substância obtida da planta nativa do Norte e Nordeste *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardlew, que demonstrou atividade antiinflamatória em estudos anteriores (ROCHA *et al.*, 2019; CARVALHO *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2013; NICOLAU *et al.*, 2017; SOUSA, 2022). Portanto, o Centro de Estudos Farmacêuticos e Cosméticos (CEFAC) da Universidade Federal do Ceará, vem estudando a utilização da EPIT no modelo experimental de dor neuropática induzida por ligadura do nervo safeno em *Rattus norvegicus* para determinar sua bioatividade. Mas, além de determinar a atividade farmacológica da EPIT *in vivo*, é importante que seja determinada a sua atividade tóxica no modelo experimental, para que seja traçado o perfil de segurança e eficácia.

Baseado nas informações supracitadas faz-se necessário realizar a determinação da atividade tóxica da EPIT no modelo experimental de dor neuropática. A atividade tóxica será mensurada pela determinação dos níveis bioquímicos de Glutathione Reduzida (GSH) e Malondialdeído (MDA) no fígado para investigação do estresse oxidativo induzido pela substância teste (AYALA; MUÑOZ; ARGUELLES, 2014; OWEN; BUTTERFIELD, 2010; TSIKAS, 2016; DRAPER; HADLEY, 1990). De forma complementar serão realizados hemograma e determinação de parâmetros bioquímicos do sangue periférico, além de exames histopatológicos em rim e fígado para traçar o perfil de toxicidade (KHEIRIPOUR *et al.*, 2008; RAHDAR *et al.* 2021; MALAYAPPAN *et al.*, 2021). Para avaliar o limiar nociceptivo será utilizado o teste de von Frey na mensuração da alodinia mecânica e o teste de campo aberto será utilizado para avaliar o comportamento dos animais tratados com EPIT nas concentrações (1,5; 3 e 4,5 mg/kg) (DEUIS; DVORAKOVA; VETTER, 2017;

SILVA-CARDOSO *et al.*, 2021; PRUT; BELZUNG, 2003; KRAEUTER; GUEST; SARNYIA, 2019). Não há relatos na literatura de trabalhos que traçaram o perfil de toxicidade associado a testes comportamentais no modelo animal de dor neuropática, dessa forma o presente trabalho será inédito e servirá de suporte para outros possíveis futuros ensaios pré-clínicos *in vivo* e clínicos utilizando a EPIT.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Dor neuropática

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) define a dor como “experiência sensitiva e emocional desagradável associada, ou semelhante àquela associada, a uma lesão tecidual real ou potencial”. A dor, portanto, engloba componentes psicológicos, sociais, culturais e fisiopatológicos. Dentre os tipos de dores está a dor crônica que é caracterizada pela duração prolongada dos estímulos dolorosos, afetando negativamente a qualidade de vida das pessoas que são acometidas (COHEN; VASE; HOOTEN, 2021). Nesta categoria está a dor neuropática, que é definida pela IASP como “dor decorrente de doenças ou lesões que afetam o sistema somatossensorial”. No Brasil é estimado que cerca de 40% da população é acometida de dores crônicas, sendo 10% desse total com características de dor neuropática. Dessa forma, a dor neuropática tem grande importância clínica (POSSO; PALMEIRA; VIEIRA, 2016).

A sintomatologia da dor neuropática varia bastante entre os indivíduos, considerando que cada pessoa tem uma percepção individual da dor. Diferentes mecanismos fisiopatológicos que acometem os nervos periféricos ou causam desregulação da percepção da dor a nível do sistema nervoso central são atualmente conhecidos, embora não elucidem completamente a complexidade da dor neuropática (MEACHAM *et al.*, 2017; FINNERUP *et al.*, 2021)

Na dor neuropática, as lesões nas fibras nervosas são conhecidamente envolvidas na fisiopatologia, podendo induzir o aumento da expressão de canais de sódio dependentes de voltagem e alterações nos canais de potássio dependentes de voltagem, causando alterações nas excitabilidades nervosas e aumentando a sensibilidade à dor, que são características da alodinia. Também as lesões nervosas induzem a expressão aumentada de receptores de potencial transitório vaniloide subtipo 1 (TRPV1). Os receptores TRPV1 são ativados fisiologicamente na presença de temperaturas em torno de 41°C, mas na presença de lesão nervosa nas terminações nociceptivas, estes são ativados inclusive pela própria temperatura normal do corpo, causando a hiperalgesia ao calor. Os processos inflamatórios decorrentes das lesões das fibras nervosas causam a ativação e migração de macrófagos que irão liberar citocinas pró-inflamatórias aumentando a sensibilidade à dor (MEACHAM *et al.*, 2017; BARON; WASNER, 2010; LEE; NEUMEISTER, 2020).

A nível de sistema nervoso central (SNC) a liberação contínua de neurotransmissores excitatórios pelas fibras periféricas aferentes no corno dorsal da medula espinhal, causam alterações pós-sinápticas como o aumento na expressão de receptores de glutamato AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico,) e NMDA (N-Metil-D-Aspartato) nestes neurônios de segunda ordem. Assim, a amplificação do sinal de dor é potencializado. A desregulação da modulação da dor na medula espinhal por mecanismos inibitórios envolvendo o sistema opióide, serotoninérgico e noradrenérgico pode estar desbalanceado em relação às vias excitatórias da dor. Diversos outros mecanismos e condições de saúde também estão relacionados à dor neuropática como processos infecciosos, tumores e alterações metabólicas (BARON; WASNER, 2010; LEE; NEUMEISTER, 2020).

Em decorrência da complexidade dos mecanismos fisiopatológicos da dor neuropática, é importante que sejam disponibilizados no mercado farmacêutico novos fármacos para o tratamento desta condição. Muitos pacientes sofrem com a refratariedade aos tratamentos farmacológicos e não-farmacológicos disponíveis na clínica. Além disso, o impacto na vida social, emocional e econômica dos pacientes com dor neuropática é considerável e preocupante (AKYUZ; KENIS, 2013).

2.2 Tratamentos da dor neuropática

O tratamento da dor neuropática é desafiador e necessita de um acompanhamento multiprofissional dos pacientes. As condições emocionais, fisiopatológicas, idade, comorbidades e percepções pessoais influenciam diretamente na resposta ao tratamento e precisam ser avaliadas. É preciso antes de instituir o tratamento, realizar educação em saúde destes pacientes para conscientização acerca das suas condições de saúde, estabelecimento de metas terapêuticas e aumentar a adesão à farmacoterapia e terapias não-farmacológicas, quando necessário (BARON; WASNER, 2010).

No tratamento farmacológico da dor neuropática, estão disponíveis na primeira linha os gabapentinóides pregabalina e gabapentina, fármacos que agem através da ligação à subunidade $\alpha 2$ - δ dos canais de cálcio dependente de voltagem, causando a redução do influxo de cálcio intracelular com consequente alteração na liberação de neurotransmissores em terminais centrais de nociceptores. Apesar das poucas interações medicamentosas com outros fármacos, a pregabalina e gabapentina precisam ser utilizadas com cautela em pacientes com insuficiência renal e idosos, devido ao risco de sofrer quedas. Também é associado ao uso dos gabapentinóides efeitos adversos como vertigem, letargia e edema periférico. A pregabalina

apresenta características farmacocinéticas favoráveis que permitem sua ação analgésica mais rápida em relação a gabapentina (DERRY *et al.*, 2019; BARON; WASNER, 2010; ONAKPOYA *et al.*, 2019; CAVALLI, 2019).

Ademais, na primeira linha de tratamento da dor neuropática, estão os antidepressivos tricíclicos (ATCs), que são bloqueadores da recaptação de serotonina e norepinefrina e, em menor nível, de dopamina. A amitriptilina, representante do grupo dos ATCs, também irá tratar a depressão e ansiedade, que são comorbidades prevalentes nos pacientes com dor neuropática. O uso dos ATCs requer avaliação clínica, devido a capacidade de bloquear também os receptores adrenérgicos, histamínicos e muscarínicos, causando reações adversas que podem inviabilizar a continuidade do tratamento em alguns pacientes. Em pacientes com distúrbios na condução cardíaca, os ATCs são contraindicados, bem como em pacientes com hiperplasia prostática e glaucoma. Outro grupo de antidepressivos que podem ser utilizados no manejo da dor neuropática são os inibidores da recaptação de serotonina e norepinefrina (IRSNS) a nível sináptico. A duloxetina e a venlafaxina, representantes deste grupo, precisam também ser utilizadas com critério em pacientes com doenças cardíacas (FINNERUP *et al.*, 2015; OBATTA, 2017; CAVALLI *et al.*, 2019; BARON; WASNER, 2010).

Na segunda linha de tratamento, a lidocaína tópica é utilizada na concentração de 5%, na forma de gel ou adesivo. A lidocaína pode ser utilizada no manejo da dor neuropática periférica por bloquear de forma inespecífica canais de sódio em fibras periféricas aferentes. Os efeitos adversos da lidocaína tópica são leves e se restringem principalmente no local de aplicação, sendo seu principal nos casos em que a causa da dor neuropática é localizada, não envolvendo mecanismos centrais. O tramadol, agonista dos receptores μ -opiídeos e também inibidor da recaptação de serotonina e norepinefrina, é utilizado como alternativa na segunda linha de tratamento. Os principais efeitos adversos do tramadol são constipação, convulsões, náuseas e vômitos (CAVALLI, 2019; FINNERUP, 2015; BARON; WASNER, 2010).

Por fim, a terceira linha de tratamento da dor neuropática é composta pelos opioides fortes, que são utilizados sobretudo nos casos de dor neuropática decorrentes de cânceres, dor neuropática aguda e exacerbação da dor que necessita alívio rápido. A utilização da morfina e oxicodona na clínica é restrita devido à capacidade de causarem dependência e por terem efeitos adversos graves. Outra alternativa na terceira linha é a utilização da Toxina Botulínica Tipo A (BTX-A), nos casos de dor neuropática periférica refratária (CAVALLI *et*

al., 2019; MOISSET *et al.*, 2020; ALLES; SMITH, 2018; FINNERUP, 2015; O'CONNOR; DWORKIN, 2009).

Em relação à prevenção da dor neuropática, atualmente apenas a vacina contra o vírus Herpes Zoster é eficaz para prevenir a doença nos casos de dor neuropática pós-herpética (OXMAN *et al.*, 2005).

De forma complementar ao tratamento medicamentoso, as medidas não farmacológicas para o tratamento da dor neuropática podem ser realizadas utilizando fisioterapia como diatermia, compressas quentes e frias, estimulação elétrica transcutânea do nervo (TENS), estimulação magnética transcraniana, fluidoterapia e hidroterapia. A técnica de TENS, mostrou eficácia por sugerir a ativação de mecanismos centrais de analgesia, bem como a eletroestimulação que pode estimular a microcirculação endoneural. A terapia com laser também pode ser utilizada na fisioterapia para diminuir a dor e inflamação. Outras medidas incluem técnicas de reabilitação que objetivam a diminuição da dor, aumento da qualidade de vida e diminuição na utilização de medicamentos no manejo da dor neuropática. Exercícios terapêuticos podem ser incluídos no tratamento, além de psicoterapia, terapia de respiração e relaxamento muscular, terapia do espelho. Todas essas técnicas e procedimentos necessitam ser aplicadas em conjunto com a farmacoterapia da dor neuropática para alcançar melhores resultados (AKYUZ; KENIS, 2013; MOKHTARI *et al.*, 2020).

2.3 Alcaloides como fonte de novos fármacos

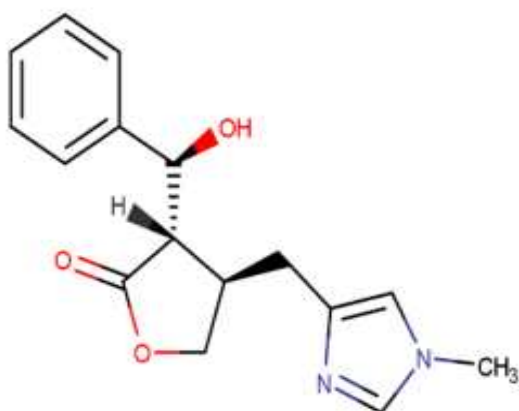
O uso de plantas como fonte de produtos naturais, mostra um grande potencial para utilização em várias doenças e podem ser de grande importância para a indústria farmacêutica. Até o ano de 2013, o Dicionário de Produtos Naturais registrou cerca de 200.000 metabólitos de origem natural, além de cerca de 15% das intervenções medicamentosas em andamento no banco de dados do site ClinicalTrials.gov estarem relacionadas a fármacos de origem natural. Em relação ao desenvolvimento de medicamentos, 28% dos lançamentos de fármacos no mercado entre os anos de 1981 e 2002 eram produtos naturais ou derivados destes (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015; KATZ; BALTZ, 2016; MORAES *et al.*, 2015).

Os alcalóides constituem uma das classes de produtos naturais mais rica em bioatividade, dando origem a medicamentos comercializados e utilizados na prática clínica como hioscina (antiemético), morfina (alívio da dor), colchicina (tratamento da gota), ergotamina (tratamento da enxaqueca), galantamina (Alzheimer), vincristina e vimblastina

(antineoplásicos). (HEINRICH *et al.*, 2021; HEINRICH; AMIRKIA, 2014). Nesse contexto, uma das famílias de espécies vegetais que tem contribuído significativamente na descoberta de novos alcalóides têm sido a família Rutaceae constituída aproximadamente por 161 gêneros e 2070 espécies, sendo que muitas destas têm importância econômica, devido ao seu valor medicinal (PIRANI, J.R. & GROPPPO, 2012; ROCHA *et al.*, 2017). O gênero *Pilocarpus* pertence a essa família e contém espécies medicinais que são originárias do Brasil e países vizinhos (LIMA *et al.*, 2017). A espécie *Pilocarpus microphyllus*, pertencente a este gênero, é conhecida mundialmente devido a presença do alcaloide pilocarpina nas suas folhas (PINHEIRO, 2002; LIMA *et al.*, 2017). A pilocarpina é produzido no Brasil em escala industrial e exportado para a indústria farmacêutica internacional (BRANDÃO, 2008) devido a sua utilização para o tratamento do glaucoma e xerostomia (GIL-MONTOYA *et al.*, 2016; THIEME; RENIER; SCHUART, 2013).

No processo de obtenção da pilocarpina a partir da extração das folhas da planta *Pilocarpus microphyllus*, podem ser obtidos também os compostos Epiisopiloturina (EPIT) e Epiisopilosina (EPIL). A EPIT e EPIL diferem da pilocarpina pela presença de um grupamento hidrobenzílico ao invés de um etílico, e assemelha-se a ela por sua estrutura formada pela presença de um anel imidazólico ligado a um ciclopentano heterocíclico por meio de uma ligação C-C. A similaridade entre as estruturas destes compostos torna a Epiisopiloturina e a Epiisopilosina promissores quanto as suas propriedades biologicamente ativas, e pouco se conhece sobre todas as propriedades desses alcaloides (SANTOS; MORENO, 2004; TEDESCHI *et al.*, 1973).

Figura 1 - Estrutura química da Epiisopiloturina



Estudos passados mostraram a atividade inibitória da Epiisopiloturina contra *Schistosoma mansoni* b (VERAS *et al.*, 2012; ROCHA, 2017). Ademais, estudo mais recente de Silva e colaboradores (2013), demonstrou a atividade anti-inflamatória da Epiisopiloturina (1mg/kg, via intraperitoneal), no modelo de edema de pata e peritonite induzida por carragenina, através da redução nos níveis de TNF, IL-1 β , atividade da enzima mieloperoxidase e redução na contagem total e diferencial de leucócitos. Também foi demonstrada as propriedades antinociceptivas, através do modelo de dor contorção induzida por ácido acético, teste da placa quente e teste de nocicepção induzida por formalina. Outro grupo de pesquisa também mostrou que a EPIT nas concentrações de 3, 10 e 30mg/kg, via oral (vo) e intraperitoneal (ip), foram capazes de reduzir os danos teciduais no modelo animal de gastrite induzida por naproxeno (80 mg/kg, ip) (NICOLAU *et al.*, 2017).

Em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, foi demonstrado de maneira inédita a ação antiinflamatória da Epiisopiloturina (EPIT) e a Epiisopilosina (EPIL) em neutrófilo humano, por reduzirem a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), modularem o influxo de Ca²⁺ intracelular, reduzirem a expressão de NF- κ B citosólico e a inibirem a produção de TNF e IL-6 (ROCHA *et al.*, 2019). Nosso grupo de pesquisa também demonstrou recentemente a atividade anti-inflamatória in vitro da EPIT em modelo de neuroinflamação induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em células de microglia BV2 (SOUSA, 2022). Portanto nas pesquisas não clínicas, os modelos experimentais têm um papel essencial no desenvolvimento de novos fármacos, sendo, por exemplo, relevantes para mimetizar distúrbios periféricos em humanos e avaliar possíveis efeitos tóxicos de novos candidatos a fármacos (GILRON; BARON; JENSEN, 2015)

2.4 Avaliação da analgesia e teste comportamental

2.4.1 Teste de von Frey

Na dor neuropática a alodinia é decorrente das alterações provocadas pelas lesões nas fibras nervosas, aumentando a expressão de canais de sódio dependentes de voltagem e modificações no funcionamento dos canais de potássio dependentes de voltagem. A metodologia desenvolvida pelo fisiologista Maximilian von Frey, é um método que permite realizar a mensuração da alodinia mecânica em ratos, medida em mili Newton (mN) pelo analgesímetro digital von Frey. Um estímulo que geralmente não é aversivo é aplicado pelo filamento do analgesímetro digital von Frey, gerando a resposta de retirada da pata do animal.

O aparelho registra o valor necessário para gerar o estímulo aversivo, quantificando o nível de alodinia mecânica do animal (DEUIS; DVORAKOVA; VETTER, 2017; SILVA-CARDOSO et al., 2021).

2.4.2 Teste do campo aberto

O teste do campo aberto é um modelo experimental utilizado na avaliação do comportamento de animais a fim de avaliar possíveis efeitos estimulatórios ou inibitórios no sistema nervoso central. Neste teste são avaliados comportamentos como locomoção horizontal, medido através do cruzamentos das linhas horizontais do campo aberto; Inclinações do animal (rearing) e comportamento de lavar a pelagem (*grooming*). Dessa forma o teste do campo aberto irá complementar o teste de von Frey, sendo avaliado se a dor está influenciando no comportamento dos animais submetidos ao teste do campo aberto e como a EPIT está influenciando (PRUT; BELZUNG, 2003; KRAEUTER; GUEST; SARNYIA, 2019).

2.5 Avaliação da toxicidade do composto imidazólico Epiisopiloturina (EPIT)

O uso de plantas medicinais, por ser de fácil acesso à população e por muitas vezes não possuir sua eficácia e segurança bem estabelecidas, torna-se um risco para quem as usa, podendo vir a causar efeitos deletérios. Dessa forma, destaca-se a importância das pesquisas voltadas para o estabelecimento da segurança de plantas medicinais e fitoterápicos, estando incluso as pesquisas envolvendo toxicidade in vivo do composto imidazólico Epiisopiloturina (EPIT) (PEDROSO *et al.*, 2021; SERPELONI *et al.*, 2008).

A Epiisopiloturina (EPIT), por apresentar melhor atividade antiinflamatória e antinociceptiva demonstrada em ensaios anteriores, foi selecionada para os estudos in vivo de avaliação da toxicidade no modelo experimental de dor neuropática. Foi demonstrado por nosso grupo de pesquisa que a EPIT não causa redução da viabilidade celular em neutrófilos humanos, seguindo as metodologias do ensaio do 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) e Lactato Desidrogenase (LDH) (ROCHA et al., 2019). Em células de mamíferos, utilizando a linhagem de fibroblastos de rim de macaco (Células Vero), outro grupo de pesquisa demonstrou que a EPIT também não apresenta atividade citotóxica significativa nestas células pelo Ensaio de

Cristal Violeta (ROCHA et., 2017). Apesar destes achados in vitro, ensaios in vivo são necessários para estabelecer possíveis efeitos tóxicos da EPIT nos sistemas e órgãos.

O fígado, como principal órgão de metabolização de xenobióticos, está mais suscetível a efeitos danosos de substâncias exógenas, portanto, o modelo experimental de dor neuropática em *Rattus novergicus* será submetido ao tratamento com EPIT (1,5; 3 e 4,5 mg/kg) para avaliação dos possíveis efeitos tóxicos, por meio do estudo de biomarcadores de estresse oxidativo no tecido hepático. Através da dosagem dos níveis de malondialdeído (MDA) e glutathiona reduzida (GSH), será possível avaliar se a EPIT induz estresse oxidativo no tecido hepático (AYALA; MUÑOZ; ARGUELLES, 2014; TSIKAS, 2016; DRAPER; HADLEY, 1990; OWEN; BUTTERFIELD, 2010). Também será realizado o estudo dos parâmetros hematológicos para verificar a toxicidade da EPIT nas hemácias, plaquetas e leucócitos, considerando que o sangue é o principal tecido de transporte dos xenobióticos. Os níveis bioquímicos de creatinina e ureia também serão mensurados para avaliar a função renal no modelo experimental após o tratamento com a EPIT em diferentes concentrações. E, de forma complementar, será feita a determinação de colesterol total e HDL (lipoproteína de alta densidade) para verificar possíveis alterações bioquímicas induzidas pela EPIT no modelo experimental de dor neuropática (KHEIRIPOUR *et al.*, 2008; RAHDAR *et al.*, 2021; MALAYAPPAN *et al.*, 2021).

Por fim, a análise histopatológica dos tecidos hepáticos e renal pode ser realizada para elucidar possíveis danos teciduais induzidos pela EPIT no modelo experimental de dor neuropática (GUNADI et al., 2020). Dessa forma, mediante estes estudos de toxicidade in vivo, busca-se estabelecer de forma inédita o perfil de toxicidade da Epiisopiloturina no modelo experimental de Neuropatia do Nervo Safeno em *Rattus novergicus*.

3 OBJETIVOS:

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar o possível efeito tóxico e comportamental do alcaloide imidazólico Epiisopiloturina (EPIT) de *Pilocarpus microphyllus* no modelo experimental de neuropatia do nervo safeno em *Rattus norvegicus*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da EPIT sobre o limiar nociceptivo ao longo do desenvolvimento da neuropatia através do uso de analgesímetro digital, e se esse efeito está associado ou não a alterações comportamentais por meio do teste do campo aberto.
- Observar por meio da análise histopatológica dos segmentos hepáticos e renais se a administração crônica da EPIT poderá causar dano tóxico.
- Verificar se há alterações no hemograma e nos níveis bioquímicos de Creatinina, Uréia, Colesterol total e Lipoproteína de Alta Densidade (HDL) resultante da administração crônica EPIT;
- Determinar atividade antioxidante da EPIT por meio das dosagens de Malondialdeído (MDA) e Glutathiona Reduzida (GSH).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção da Epiisopiloturina

O alcaloide Epiisopiloturina (EPIT) (99,7% de pureza) foi isolado de sub-produto gerado durante a extração da Pilocarpina das folhas de *P. microphyllus*. A EPIT foi cedida pela Phytobios LTDA (Grupo Centroflora, Barueri-SP), sendo a pilocarpina seu produto comercial.

4.2 Delineamento e local da pesquisa

Os estudos em animais foram realizados após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal do Ceará. O projeto seguiu os princípios e normas internacionalmente aceitas para utilização de animais em projetos de pesquisa e do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). Todos os procedimentos cirúrgicos foram de acordo com a Lei Federal 11.794 de outubro de 2008, da nova resolução normativa do CONCEA, resolução nº 37, de 15 de fevereiro de 2018, regida pela Sociedade Brasileira de Ciências de Animais de Laboratório. Sendo aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) da UFC, sob o protocolo nº 24251021-0.

4.3 População / Amostra

Para a realização do estudo foram utilizados ratos machos do gênero Wistar, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC) e mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da UFC, alojados em gaiolas com água e ração ad libitum e aclimatados com ciclos naturais dia/noite de 12/12h. A alimentação foi retirada 15-18 h antes dos experimentos, tendo os animais livre acesso à água.

A previsão do número de animais nesta pesquisa foi baseada em Daniel (2008), que coloca uma equação utilizada para a determinação do tamanho de uma amostra sem reposição, sendo que a utilização do desvio padrão obtido na fórmula aponta para $n = 8$ animais por grupo, utilizando um intervalo de confiança de 95%.

4.4 Delineamento Experimental

Os animais foram divididos nos seguintes grupos, sendo 8 animais por grupo:

Quadro 1 - Distribuição do grupos experimentais para os testes de parâmetros bioquímicos e histopatológicos

Grupo	Característica	Tratamento
Controle	Controle Experimental	Solução salina a 0,9%
Sham	Falso operado (realização do ato cirúrgico sem ligadura do nervo safeno)	Solução salina 0,9%
Neuropatia	Indução da ligadura do nervo safeno	Solução salina 0,9%
EPIT 1,5	Indução da d do nervo safeno	EPIT 1,5 mg/kg
EPIT 3	Indução da ligadura do nervo safeno	EPIT 3,0 mg/kg
EPIT 4,5	Indução da ligadura do nervo safeno	EPIT 4,5 mg/kg

Fonte: autoria própria

Os mesmos animais utilizados nos testes bioquímicos e histopatológicos foram utilizados na avaliação da EPIT no teste de von Frey e no teste do campo aberto. O grupo pregabalina (droga padrão) também foi considerado nestes testes, conforme o quadro 2.

Quadro 2 - Distribuição dos grupos experimentais para os testes de von Frey e teste do campo aberto

Grupo	Característica	Tratamento
Controle	Controle Experimental	Solução salina a 0,9%
Sham	Falso operado (realização do ato cirúrgico sem ligadura do nervo safeno)	Solução salina a 0,9%
Pregabalina	Indução da ligadura do nervo safeno	Pregabalina 30 mg/kg
Neuropatia	Indução da ligadura do nervo safeno	Solução salina a 0,9%
EPIT 1,5	Indução da ligadura do nervo safeno	EPIT 1,5 mg/kg
EPIT 3	Indução da ligadura do nervo safeno	EPIT 3,0 mg/kg
EPIT 4,5	Indução da ligadura do nervo safeno	EPIT 4,5 mg/kg

Fonte: autoria própria

4.5 Procedimento Cirúrgico de Indução da Neuralgia por Ligadura do Nervo Safeno

Na realização da indução cirúrgica da neuralgia por ligadura do nervo safeno, inicialmente, os animais foram devidamente anestesiados com cetamina (10%) e xilazina (2%) nas doses de 100 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente, e administradas por via intraperitoneal (ip). Em seguida os animais foram posicionados em decúbito dorsal e devidamente tricotomizados na região da superfície da coxa. Após isso foi feita uma incisão (6-7 mm) na superfície medial anterior da coxa direita a uma distância de 5 mm medial ao canal inguinal, sendo a incisão cutânea sagital-medial ao nervo safeno.

Em seguida o nervo foi suavemente exposto e nos grupos operados ele foi preso ao redor do nervo, com quatro ligaduras frouxas feitas com uma sutura de nylon 8.0, com intervalos de 1mm entre si. No grupo Sham, o nervo foi deixado intacto. Após o procedimento, a incisão foi suturada, e os animais acondicionados em gaiolas.

4.6 Protocolo de tratamento

Para a determinação dos parâmetros bioquímicos e alterações histopatológicas, no 2º dia após a indução da Neuralgia por Ligadura do Nervo Safeno, os grupos Controle, Sham (falso operado) e Neuropatia receberam solução salina a 0,9%, via oral (vo) por 21 dias. Os grupos EPIT receberam doses de 1,5 a 4,5 mg/kg, vo, de Epiisopiloturina durante 21 dias. Para os testes comportamentais de von Frey e campo aberto, foi incluído também o grupo Pregabalina que recebeu o fármaco na dosagem de 30 mg/kg, vo, durante 21 dias.

4.7 Teste de von Frey e teste do campo aberto

4.7.1 Teste de von Frey

Para o teste de nocicepção, por estimulação mecânica, os animais serão submetidos a sessões de condicionamento durante 10 minutos, até cessar a atividade. O limiar de nocicepção do animal será aferido através do registro da intensidade de força aplicada na superfície plantar de ambas as patas traseiras, já que esta região da pele está no centro das distribuições plantares do nervo safeno.

Os testes de nocicepção mecânica serão realizados em um ambiente silencioso e na penumbra, aleatoriamente, por grupo e número de animais, durante 7, 14 e 21 dias, duas vezes ao dia e a cada 3 dias. Durante o período de teste, a elevação da pata devido a atividade locomotora normal será ignorada. Estudos preliminares realizados mostraram que o filamento de von Frey de 2 g praticamente não produz resposta de retirada da pata em animais normais, o que foi considerado como adequado para avaliar alodinia mecânica por meio do analgesímetro digital.

Dessa forma, o monofilamento será aplicado 5 vezes com intervalos de 1 a 2 segundos, em diferentes regiões da superfície plantar de ambas as patas traseiras. A resposta de retirada foi considerada válida apenas quando a pata traseira foi completamente retirada do contato com a plataforma (CUNHA *et al.*, 2005).

4.7.2 Campo aberto

Para o teste de atividade locomotora, os animais serão submetidos a sessões de condicionamento durante 10 minutos, até cessar a atividade. A atividade motora do animal será aferida, através de um software, o qual, analisará os seguintes parâmetros: self grooming, número de entradas em zona e tempo de permanência, perímetro percorrido, trajetória e detecção de movimentação de cruzamentos

Nesse teste, os animais serão colocados em um ambiente silencioso e na penumbra, aleatoriamente, por grupo e número de animais durante 7, 14 e 21 dias, a cada 3 dias. Durante 15 minutos, os animais ficarão em ambientação no espaço de realização do experimento. Em seguida, eles serão colocados em uma arena de acrílico quadrada preta com o piso dividido em quadrantes iguais e deixados para explorar o ambiente durante 5 minutos, no qual, durante este período será registrado por meio de um software, os parâmetros já citados (HSIAO et al., 2012).

4.8 Análise histopatológica (fígado e rim)

Foi realizada em colaboração com o Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará. Após a eutanásia, os fragmentos de fígado e rins removidos foram fixados por imersão em formol tamponado a 10%. Durante o processamento do tecido este foi submetido à desidratação. Em seguida, foi realizada a diafanização em xilol e impregnação pela parafina. A inclusão foi realizada em blocos de parafina. Os cortes histológicos foram preparados por microtomia, a 4 µm, e corados pela técnica de rotina da Hematoxilina Eosina (HE). Exame microscópico detalhado dos fragmentos completos dos órgãos foi realizado em todos os grupos. Foi analisada 01 lâmina contendo todos os órgãos por animal.

A classificação da extensão da lesão foi realizada por meio de escore histopatológico (GIBSON-CORLEY; OLIVER; MEYERHOLZ, 2013). As análises foram feitas no Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará.

4.9 Hemograma e parâmetros bioquímicos

Os animais foram anestesiados com a combinação de Xilazina (10 mg/kg, ip) e cetamina (100 mg/kg, ip), para a obtenção das amostras de sangue periférico por meio do plexo orbital, coletados no tubo de coleta contendo heparina sódica 50 U/mL para realização do hemograma e exames bioquímicos. Foram analisados os resultados de número total de:

eritrócitos ($106/\text{mm}^3$), hemoglobina (g/dL), leucócitos ($103/\text{mm}^3$) e plaquetas ($103/\text{mm}^3$); a concentração de hemoglobina (g/dl); determinação do hematócrito (%); Creatinina, ureia, dosagem de colesterol total e HDL. Todos os dados foram analisados estatisticamente para verificar possíveis alterações (KHEIRIPOUR *et al.*, 2008; RAHDAR *et al.*, 2021; MALAYAPPAN *et al.*, 2021).

4.10 Estresse Oxidativo

Para esta análise foi necessário a coleta do segmento hepático após a eutanásia dos animais.

4.10.1 Dosagem de malondialdeído (MDA)

O malondialdeído (MDA) constitui um indicador de peroxidação lipídica, e sua dosagem permite investigar o estresse oxidativo pelo método baseado na reação dessa substância com o ácido tiobarbitúrico - TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). Nesta reação duas moléculas de TBARS reagem estequiometricamente com uma molécula de MDA a fim de ser formado um cromóforo róseo. Inicialmente foi preparado um homogenato a 10% do tecido hepático macerado em cloreto de potássio (KCl) a 1,15%. Deste homogenato, 62,5 μL foram adicionados em microtubo seguido de adição de 375 μL de ácido fosfórico (1%) e 125 μL de ácido tiobarbitúrico (0,6%). Em seguida, as amostras foram imersas em banho maria por 45 min a 100°C. Decorrido este tempo, foi adicionado a cada amostra 500 μL de n-butanol e a mistura foi centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos. Posteriormente, 200 μL da fase superior foram inseridas em placas de 96 poços e a absorbância foi medida em um leitor de microplacas a 535nm. (TSIKAS, 2016; DRAPER; HADLEY, 1990).

4.10.2 Dosagem dos níveis de glutathiona reduzida (GSH)

A glutathiona é um antioxidante endógeno que é consumido na presença de estresse oxidativo, desta forma, a redução dos seus níveis está relacionada a presença de estresse oxidativo.

A concentração de GSH no segmento hepático foi realizada de acordo com o método descrito por Sedlak e Lindsay (1968). Para determinação dos níveis de grupos sulfidrílicos não-protéicos (NP-SH), uma amostra de 50 a 100 mg do segmento hepático dos

animais foi homogeneizada em 1 mL de EDTA 0,02M para cada 100mg de tecido. Aliquotas de 100µL do homogeneizado foram misturadas a 80µL de água destilada e a 20µL de ácido tricloroacético (TCA) a 50% para precipitação de proteínas. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 3.000 rpm a 4°C. Um total de 100µL do sobrenadante foi adicionado a 200µL de tampão Tris 0,4M (pH 8,9) e 5 µL de ácido 5,5-ditio-bis-(2- nitrobenzóico) (DTNB, Sigma Aldrich, EUA) 0,01M. A mistura foi então agitada por 3 minutos e a absorbância lida a 412 nm. As concentrações de grupos sulfidrílicos não-protéicos foram expressas em µg de GSH/mg de tecido a partir da curva padrão (OWEN; BUTTERFIELD, 2010).

4.11 Análise dos resultados

Os dados obtidos foram analisados utilizando o *software GraphPad Prism* (GraphPad Software, San Diego, USA). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$, e para a expressão dos resultados, os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média. Os dados foram analisados por meio de ANOVA seguido pelo teste Kruskal Wallis e pós teste de Dunnett's .

5 RESULTADOS

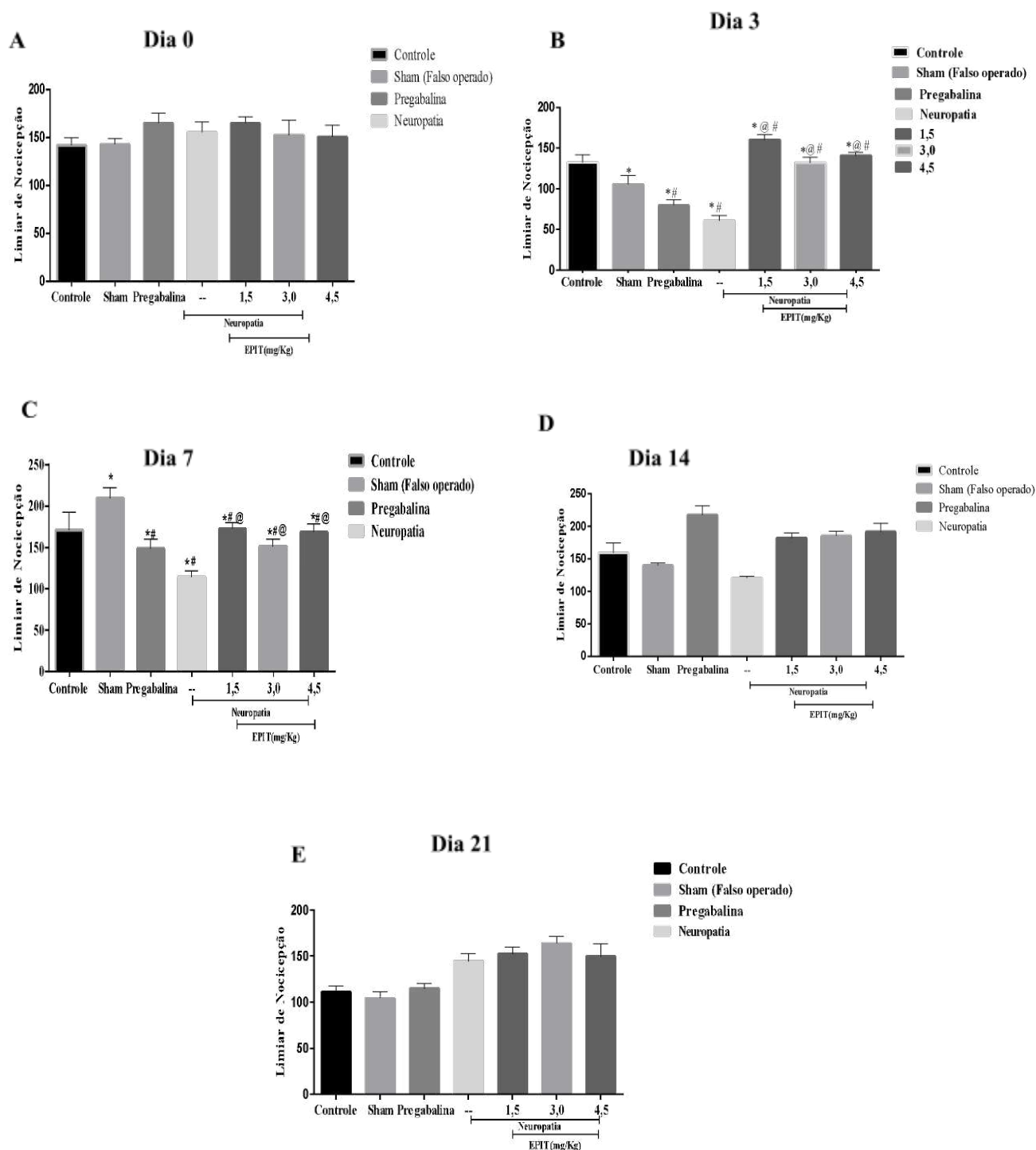
5.1 Efeito das doses de EPIT (1,5; 3 E 4,5 mg/kg) sobre o limiar nociceptivo e teste do campo aberto

O teste de von Frey permite avaliar a alodinia mecânica dos animais, medido através do analgesímetro. Conforme é possível observar no gráfico A da figura 2, no Dia 0 todos os animais dos grupos experimentais apresentaram limiar de nocicepção semelhante, medido pelo analgesímetro digital de von Frey. Foi realizada no dia 1 a ligadura do nervo safeno dos grupos experimentais EPIT, Pregabalina e Neuropatia, além de ter sido feita a falsa operação no grupo Sham. No Dia 3, após a indução da neuralgia do nervo safeno, o grupo Neuropatia apresentou redução estatisticamente significativa no limiar de dor, em comparação ao grupo Sham e Controle, demonstrando que o modelo experimental foi capaz de causar alodinia mecânica, característica da dor neuropática. Também no Dia 3, conforme a figura 2, os grupos EPIT (1,5; 3 e 4,5 mg/kg) aumentaram significativamente o limiar de nocicepção em relação ao grupo Neuropatia, denotando um efeito analgésico considerável da substância. Nos grupos EPIT (1,5; 3 e 4,5 mg/kg), o aumento do limiar da dor se manteve elevado e estabilizado, em relação ao grupo Neuropatia, durante todos os 21 dias de experimento, visto nos gráficos da figura 2.

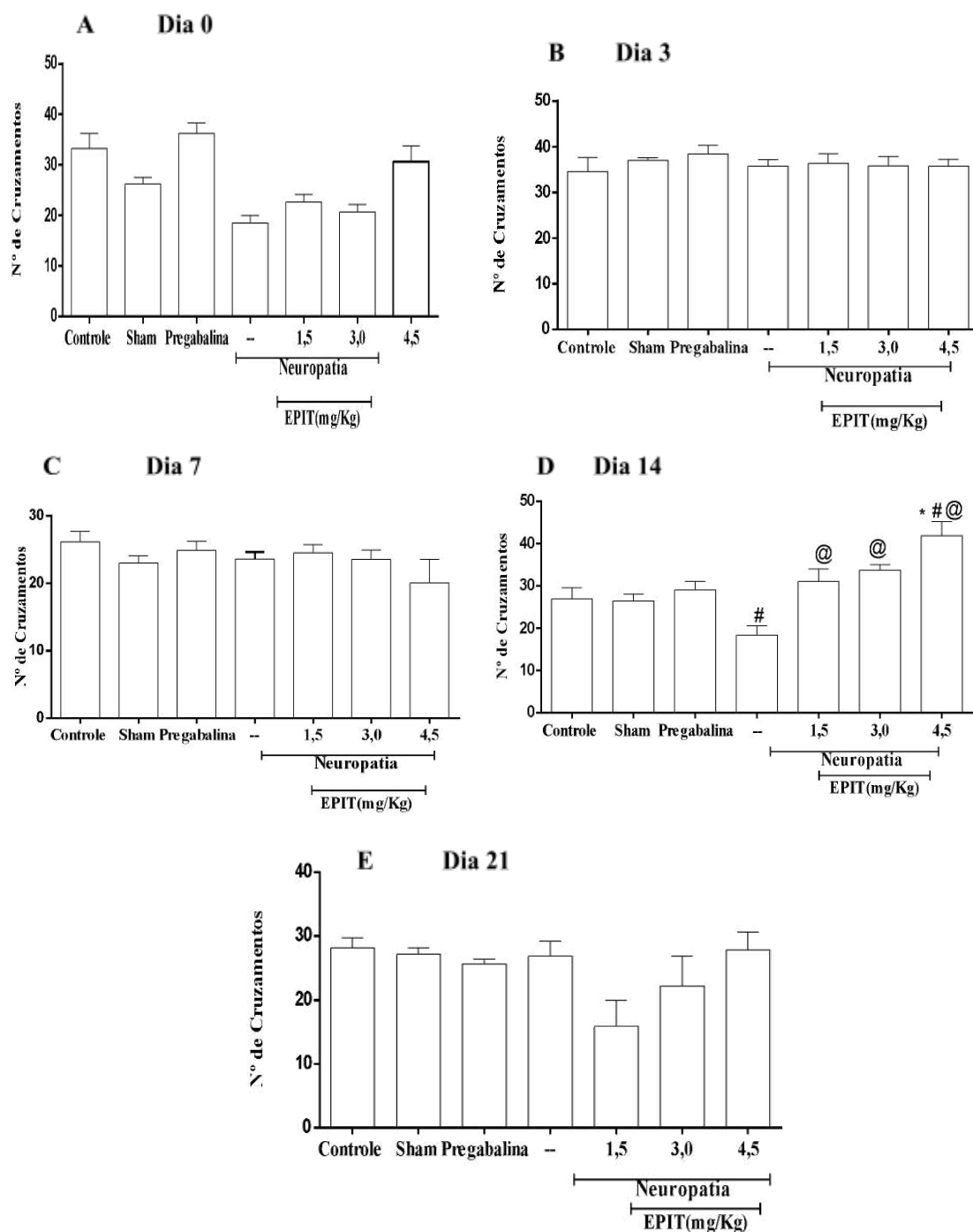
Complementando as análises, na figura 3 está representado o padrão exploratório dos animais no teste do campo aberto, verificado através do número de cruzamentos das divisas marcadas no chão do aparato do experimento. É possível observar que o grupo Neuropatia, no Dia 14, conforme a figura 3, teve redução significativa no número de cruzamentos em relação ao grupo Sham, demonstrando que a neuralgia do nervo safeno foi capaz de reduzir o comportamento exploratório dos animais. No Dia 14, os animais dos grupos EPIT (1,5; 3 e 4,5 mg/kg) tiveram aumento no número de cruzamentos estatisticamente significativo em relação ao grupo Neuropatia. Os grupos tratados com EPIT parecem estimular o comportamento exploratório dos animais, mesmo após terem sido submetidos ao processo doloroso de neuralgia do nervo safeno, indicando portanto redução da dor neuropática. É possível observar também que os gráficos da EPIT (1,5; 3 e 4,5 mg/kg) na figura 3 tiveram efeito semelhante ao grupo Pregabalina.

Já a figura 4 evidencia que a EPIT (1,5; 3 e 4 mg/kg) não alterou de forma estatisticamente significativa o padrão de comportamento exploratório vertical dos animais (*rearing*) durante os 21 dias de experimentação. Por fim, a figura 5 mostra que antes da

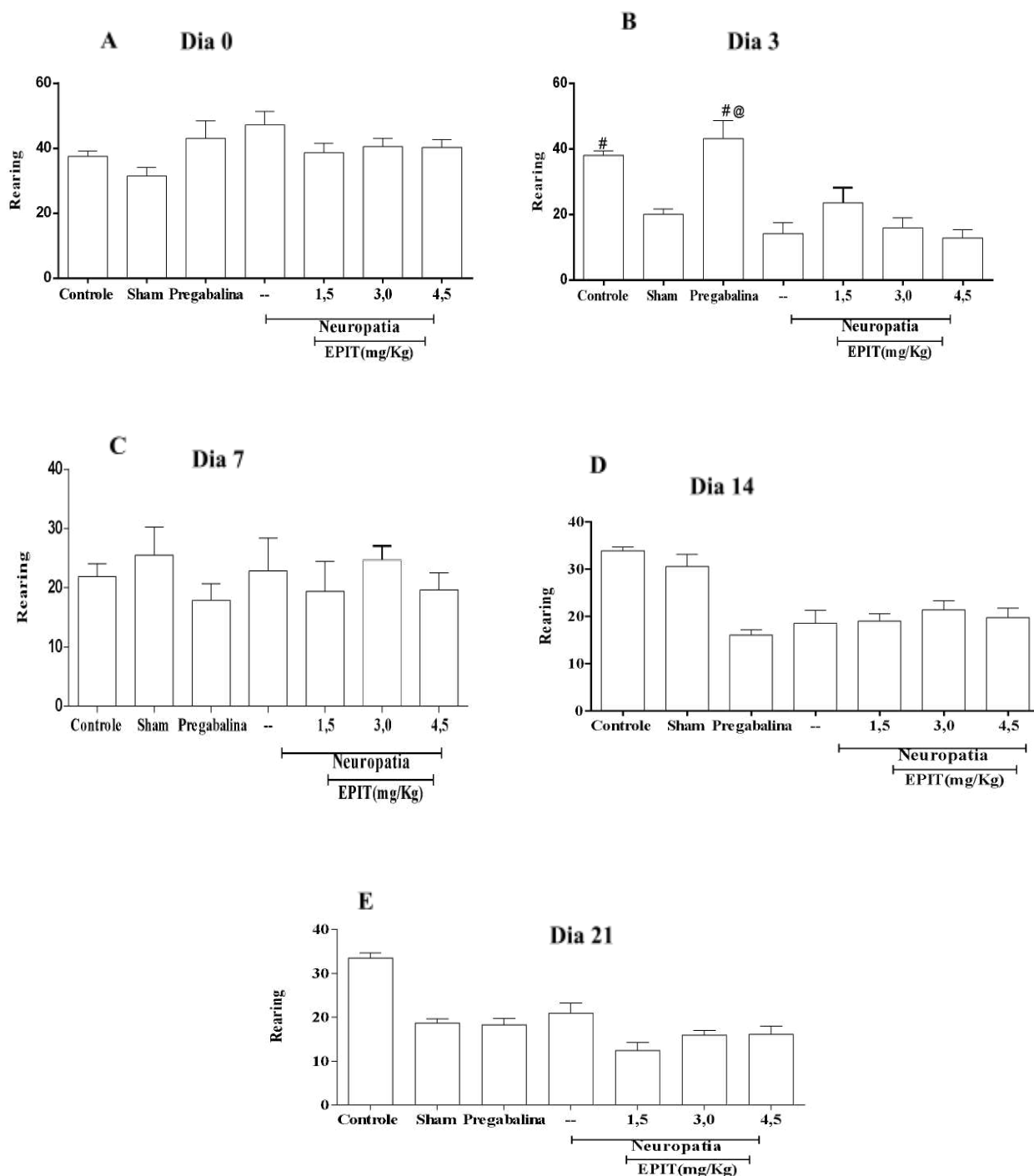
indução da neuralgia do nervo safeno, no Dia 0, todos os grupos apresentaram comportamento semelhante em relação ao *grooming* (comportamento de autolimpeza). A partir do terceiro dia de tratamento, os animais dos grupos EPIT (1,5; 3 e 4 mg/kg) apresentaram aumento significativo de *groomings*, em relação aos animais do grupo Neuropatia.

Figura 2 - Limiar de nociceção no teste de von Frey

Legenda: Gráficos A,B,C,D,E representam o limiar de Nociceção nos dias 0,3,7,14,21 no modelo de neuralgia do nervo safeno, respectivamente. A Figura F representa avaliação do limiar de nociceção ao longo dos dias. Os dados das figuras A,B,C,D,E foram representados mediana \pm EPM e foram analisados por meio ANOVA seguido pelo teste Kruskal Wallis pós teste de Dunnett's. Onde(*) $p < 0,05$ vs grupo controle, (#) $p < 0,05$ vs grupo Sham(falso operado), (@) $p < 0,05$ vs neuropatia.

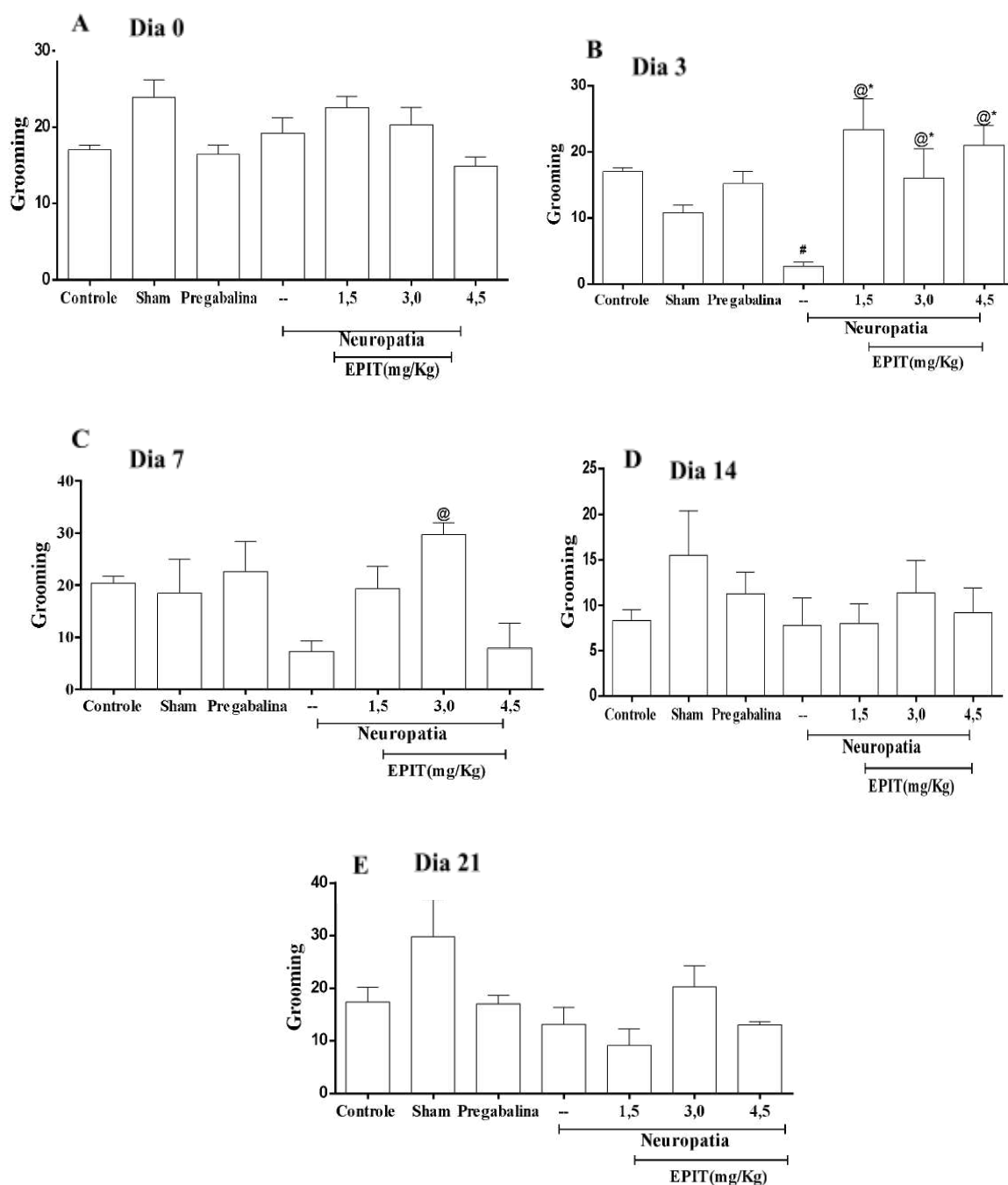
Figura 3 - Número de cruzamentos no teste do campo aberto

Legenda: Gráficos A, B, C, D, E representam a atividade Locomotora (nº de Cruzamentos) nos dias 0,3,7,14,21 no modelo de neuralgia do nervo safeno, respectivamente. Os dados das figuras A, B, C, D, E foram representados mediana \pm EPM e foram analisados por meio ANOVA seguido pelo teste Kruskal Wallis pós teste de Dunnett's. Onde (*) $p < 0,05$ vs grupo controle, (#) $p < 0,05$ vs grupo Sham (falso operado), (@) $p < 0,05$ vs neuropatia.

Figura 4 - Exploração Vertical (*Rearing*) no teste do campo aberto

Legenda: Gráficos A, B, C, D, E representam exploração vertical (*Rearing*) nos dias 0,3,7,14,21 no modelo de neuralgia do nervo safeno, respectivamente. Os dados das figuras A, B, C, D, E foram representados mediana \pm EPM e foram analisados por meio ANOVA seguido pelo teste Kruskal Wallis pós teste de Dunnett's. Onde (*) $p < 0,05$ vs grupo controle, (#) $p < 0,05$ vs grupo Sham(falso operado), (@) $p < 0,05$ vs neuropatia.

Figura 5 - Comportamento de autolimpeza (*Grooming*) no teste do campo aberto

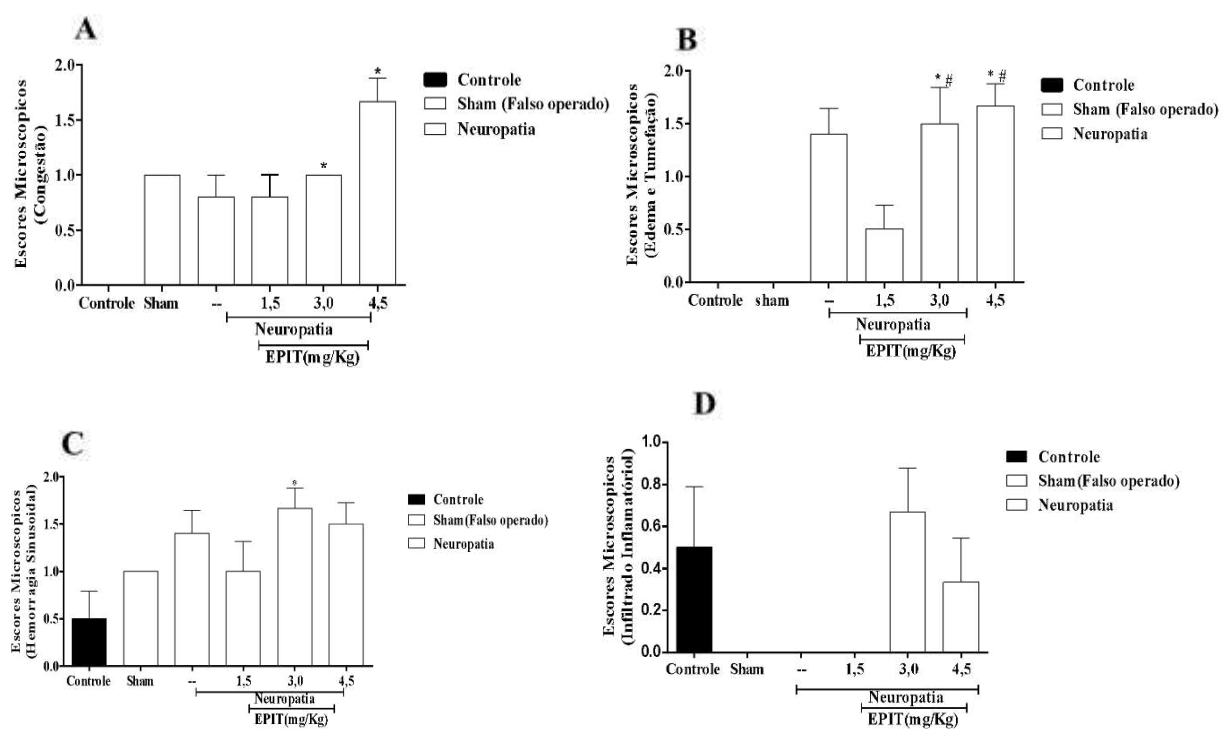


Legenda: Gráficos A, B, C, D, E representam comportamento de autolimpeza (*Grooming*) nos dias 0,3,7,14,21 no modelo de neuralgia do nervo safeno, respectivamente. Os dados das figuras A, B, C, D, E foram representados mediana ± EPM e foram analisados por meio ANOVA seguido pelo teste Kruskal Wallis pós teste de Dunnett's. Onde(*) $p < 0,05$ vs grupo controle, (#) $p < 0,05$ vs grupo Sham(falso operado), (@) $p < 0,05$ vs neuropatia.

5.2 Efeito da administração de EPIT nas doses 1,5; 3 e 4,5 mg/kg no fígado dos animais

Os resultados das análises histopatológicas no tecido hepático dos animais submetidos ao experimento foram representados na figura 6. É possível observar conforme mostrado nos gráficos A, B, C e D da figura 6 que o grupo Neuropatia, em relação aos grupos Sham e Controle, teve alterações histopatológicas consideráveis medidas pelos escores de congestão, edema e tumefação, hemorragia e infiltrado inflamatório, sugerindo provável dano remoto decorrente da ligadura do nervo safeno. Entretanto, no grupo EPIT na dose de 1,5 mg/kg observou-se que estes achados tiveram redução estatisticamente significativa, conforme os gráficos da figura 6.

Figura 6 - Efeito das doses de EPIT (1,5; 3 e 4 mg/kg) no fígado dos animais

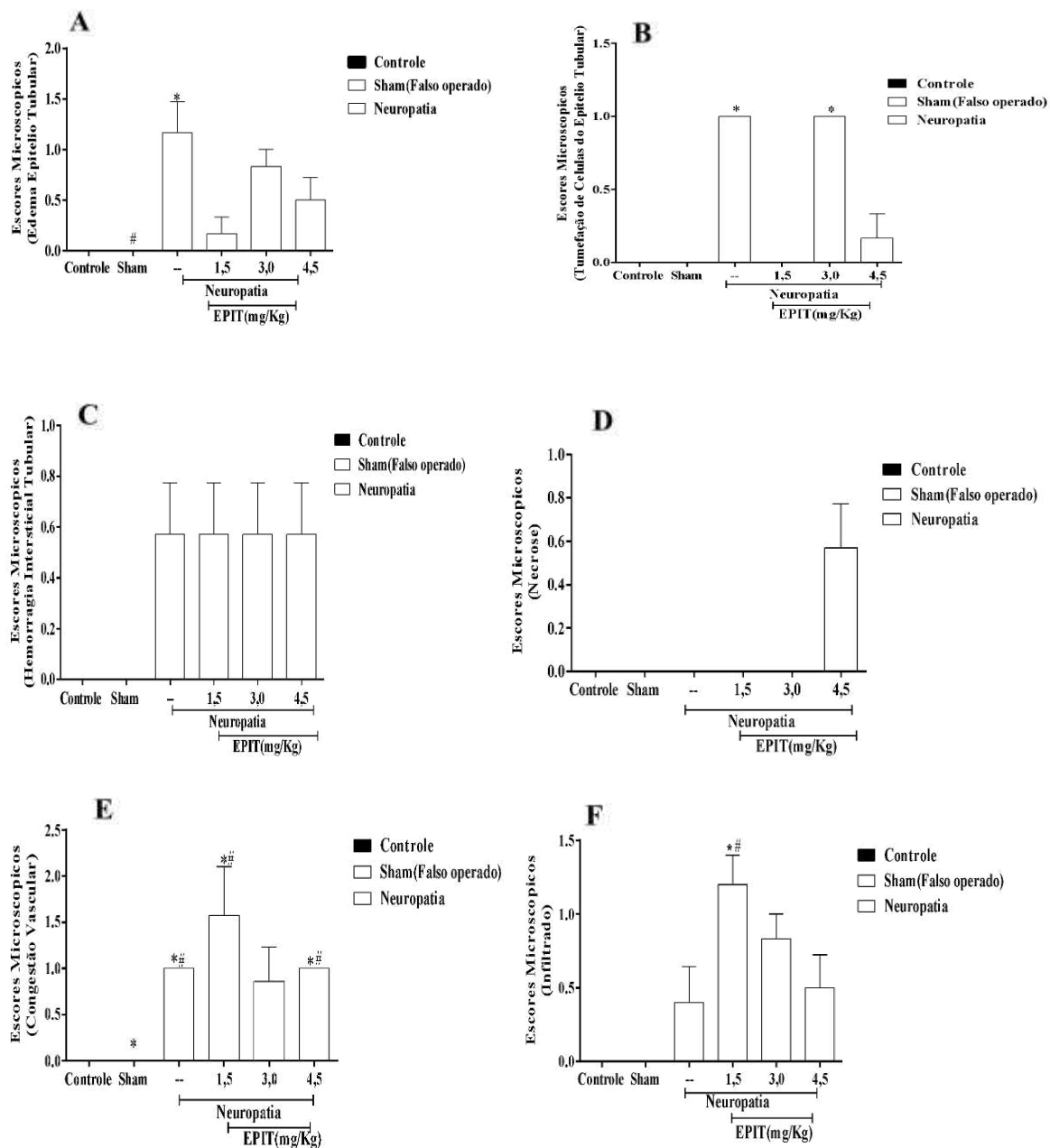


Legenda: Gráficos A, B, C, D, representam os escores microscópicos encontrados no fígado no modelo de neuralgia do nervo safeno, respectivamente. Os dados das figuras A,B,C,D foram representados na mediana ± EPM e foram analisados por meio ANOVA seguido pelo teste Kruskal Wallis pós teste de Dunnett's. Onde(*) $p < 0,05$ vs grupo controle, (#) $p < 0,05$ vs grupo Sham(falso operado).

5.3 Efeito da administração de EPIT nas doses 1,5; 3 e 4,5 mg/kg no rim dos animais

Na figura 7 estão demonstrados os efeitos da EPIT (1,5; 3 e 4 mg/kg) no rim dos animais tratados com a substância. Considerando o escore de congestão vascular, o gráfico E mostra que a EPIT nas concentrações de 1,5 e 4,5 mg/kg causou congestão vascular renal de forma significativa em relação aos grupos Sham e Controle. Entretanto, o grupo Neuropatia também apresentou congestão vascular estatisticamente significativa. Foi visto também que a EPIT nas concentrações 1,5; 3 e 4,5 mg/kg não foi capaz de causar edema no epitélio tubular (gráfico A), hemorragia intersticial tubular (gráfico C) e necrose renal (gráfico D) de forma estatisticamente significativa.

Figura 7 - Efeito das doses de EPIT (1,5; 3 e 4 mg/kg) no rim dos animais



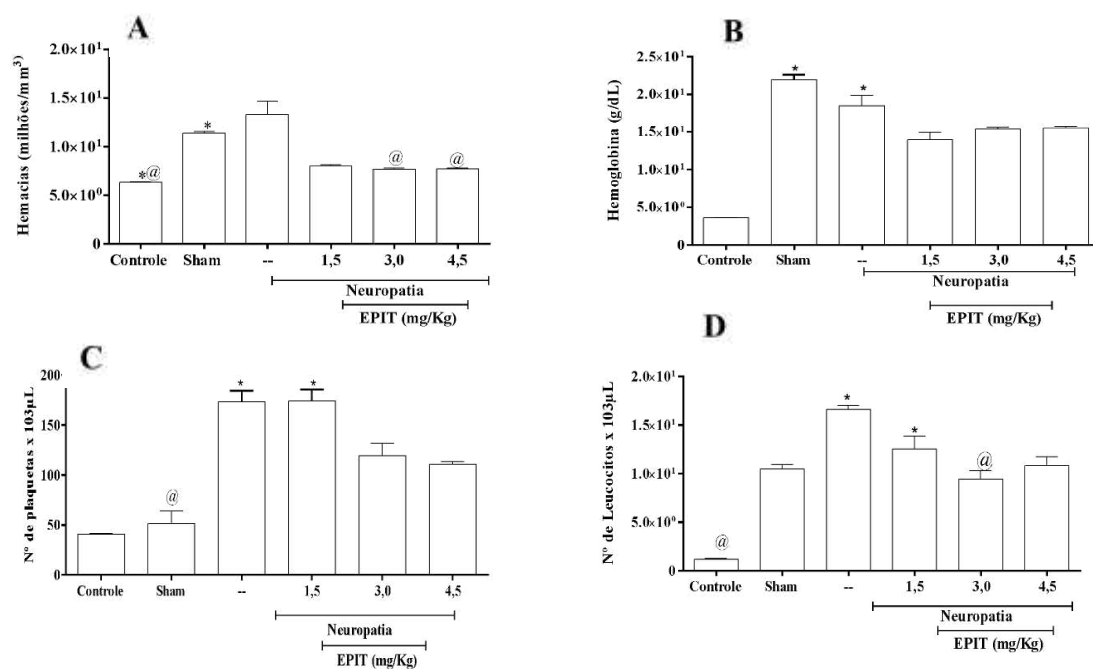
Legenda: Gráficos A, B, C, D, representam os escores microscópicos encontrados nos Rins no modelo de neuralgia do nervo safeno, respectivamente. Os dados das figuras A,B,C,D foram representados na mediana \pm EPM e foram analisados por meio ANOVA seguido pelo teste Kruskal Wallis pós teste de Dunnett's. Onde(*) $p < 0,05$ vs grupo controle, (#) $p < 0,05$ vs grupo Sham(falso operado).

5.4 Efeito da administração de EPIT nas doses 1,5; 3 e 4,5 mg/kg no número de hemácias, hemoglobina e plaquetas

O tecido sanguíneo é o principal meio de transporte das substâncias xenobióticas para todos os outros órgãos e tecidos do corpo, sendo importante avaliar se a EPIT (1,5; 3 e 4,5 mg/kg) é capaz de causar alterações hematológicas.

Na figura 8 é possível observar no gráfico A que a EPIT nas concentrações de 3 e 4,5 mg/kg causou redução significativa na contagem de hemácias, quando comparado ao grupo Neuropatia, sugerindo que possivelmente pode ter ocorrido processo de hemólise do material coletado já que foi observado redução também no grupo Controle. No gráfico B, a EPIT (1,5; 3 e 4,5 mg/kg) não causou alteração significativa na quantificação de hemoglobina em relação ao grupo Neuropatia. A EPIT na concentração de 1,5 mg/kg de acordo com o gráfico C, provocou aumento na contagem de plaquetas quando comparado ao grupo Controle, mas foi observado também no grupo Neuropatia o aumento na contagem de plaquetas, indicando que provavelmente não foi uma alteração induzida pela EPIT. Por fim, a EPIT nas concentrações de 1,5, 3 e 4,5 mg/kg levou a diminuição na contagem de leucócitos de forma estatisticamente significativa, conforme o gráfico D.

Figura 8 - Efeito das doses de EPIT (1,5; 3 e 4 mg/kg) no número de hemácias, hemoglobina e plaquetas

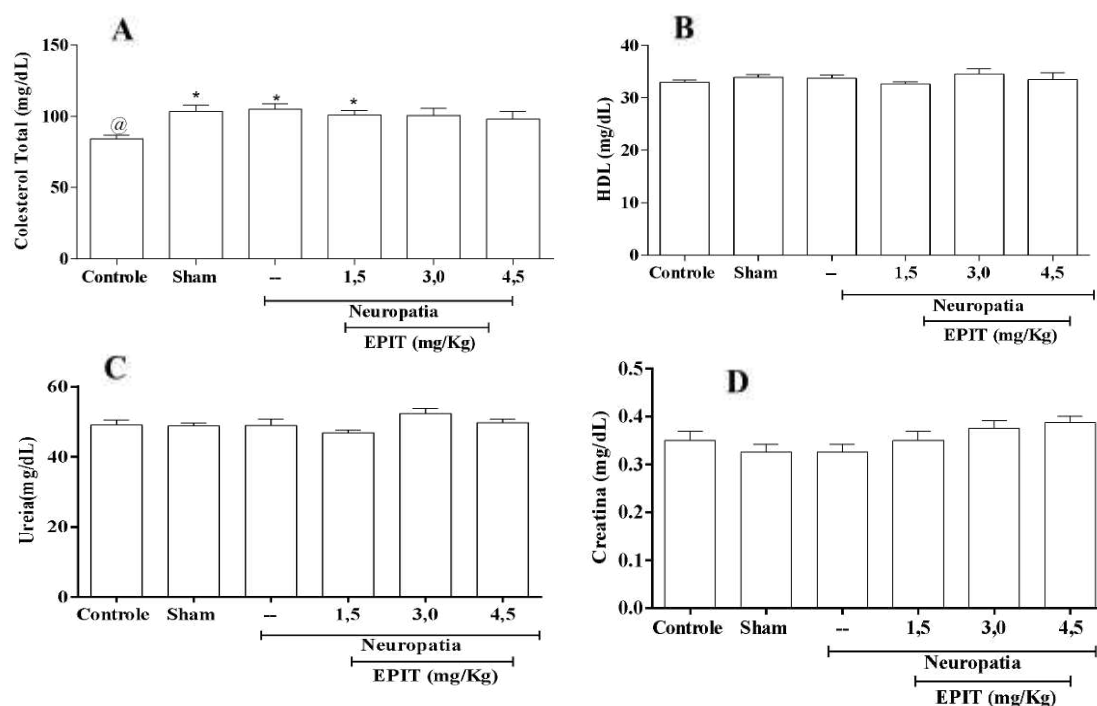


Legenda: Gráficos A, B, C, D, representam o N° de hemácias, hemoglobina, plaquetas e Leucócitos encontrados no modelo de neuralgia do nervo safeno, respectivamente. Os dados das figuras A, B, C, D foram representados na mediana ± EPM e foram analisados por meio ANOVA seguido pelo teste Kruskal Wallis pós teste de Dunnett's. Onde (*) p<0,05 vs grupo controle, (#) p<0,05 vs grupo Sham (falso operado), (@) p<0,05 vs neuropatia.

5.5 Efeito da administração de EPIT nas doses 1,5; 3 e 4,5 mg/kg nos níveis bioquímicos de Colesterol total, HDL, Ureia e Creatinina

Na figura 9, nos gráficos A e B estão representados os efeitos da EPIT (1,5; 3 e 4,5 mg/kg) no metabolismo lipídico através da dosagem de colesterol total e HDL, respectivamente. É possível observar que a EPIT não causou alteração na quantificação de Colesterol Total e HDL no soro dos animais tratados com as dosagens de 1,5; 3 e 4,5 mg/kg, demonstrando que a substância não prejudica o metabolismo lipídico in vivo no modelo experimental utilizado. Os gráficos C e D da figura 9 mostram também que a EPIT (1,5; 3 e 4,5 mg/kg) não alterou os níveis de uréia e creatinina, indicando que possivelmente a EPIT, nestas concentrações, não causa alterações bioquímicas nos níveis destes dois marcadores de função renal.

Figura 9 - Efeito das doses de EPIT (1,5; 3 e 4 mg/kg) nos níveis bioquímicos de colesterol total, HDL, ureia e creatinina.

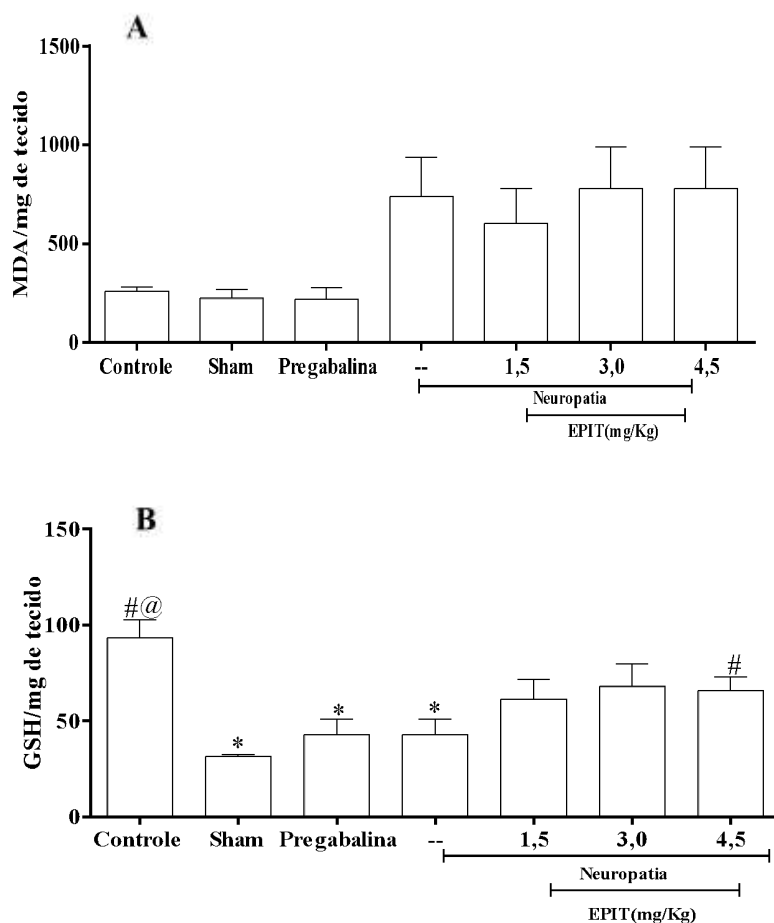


Legenda: gráficos A, B, C, D, representam nos níveis de Colesterol Total, HDL, Ureia e Creatinina encontrados no modelo de neuralgia do nervo safeno, respectivamente. Os dados das figuras A, B, C, D foram representados na mediana \pm EPM e foram analisados por meio ANOVA seguido pelo teste Kruskal Wallis pós teste de Dunnett's. Onde (*) $p < 0,05$ vs grupo controle, (#) $p < 0,05$ vs grupo Sham (falso operado), (@) $p < 0,05$ vs neuropatia.

5.6 Efeito da administração de EPIT nas doses 1,5; 3 e 4,5 mg/kg nos níveis de Malondialdeído (MDA) e Glutathione reduzida (GSH)

O malondialdeído (MDA) é um aldeído insaturado gerado durante o processo de peroxidação lipídica do ácido araquidônico e outros ácidos graxos poliinsaturados da membrana plasmática por espécies reativas de oxigênio (EROs), sendo um marcador de estresse oxidativo in vivo (TSIKAS, 2016). No gráfico A da figura 10 é possível concluir que a EPIT (1,5; 3 e 4,5 mg/kg) não causou elevação estatisticamente significativa em relação ao grupo Neuropatia nos níveis de MDA no tecido hepático. De forma semelhante, o gráfico B da figura 10, evidencia que a EPIT nas concentrações de 1,5, 3 e 4,5 mg/kg, apresentou uma tendência de aumento nos níveis de glutathione reduzida (GSH) quando comparado ao grupo Neuropatia, demonstrando que a substância pode ter um efeito protetor contra o estresse oxidativo e na manutenção dos níveis adequados de GSH.

Figura 10 - Efeito das doses de EPIT (1,5; 3 e 4 mg/kg) nos níveis de malondialdeído (MDA) e glutathiona reduzida (GSH)



Legenda: Gráficos A e B representam nos níveis de MDA e GSH encontrados no modelo de neuralgia do nervo safeno, respectivamente. Os dados das figuras A e B foram representados na mediana \pm EPM e foram analisados por meio ANOVA seguido pelo teste Kruskal Wallis pós teste de Dunnett's . Onde (*) $p < 0,05$ vs grupo controle não operado, (#) $p < 0,05$ vs grupo Sham (falso operado), (@) $p < 0,05$ vs neuropatia (grupo controle).

6 DISCUSSÃO

Através dos resultados obtidos durante o desenvolvimento desta pesquisa, o alcalóide imidazólico Epiisopiloturina foi promissor no tratamento da dor neuropática in vivo no modelo experimental de ligadura do nervo safeno em *Rattus norvegicus*. Por meio do teste de von Frey foi possível concluir que a EPIT (1,5; 3 e 4,5 mg/kg) aumentou o limiar de dor dos animais submetidos a ligadura do nervo safeno, diminuindo a alodinia mecânica que é característica da dor neuropática. Também foi visto que o grupo tratado com a Pregabalina, fármaco de escolha no tratamento da dor neuropática, teve um perfil de aumento do limiar da dor semelhante aos grupos EPIT (1,5; 3 e 4,5 mg/kg). Com relação aos resultados do teste do campo aberto, observou-se que a EPIT (1,5; 3 e 4,5 mg/kg) aumentou o comportamento exploratório dos animais por meio do aumento do número de cruzamentos e *grooming*, denotando que a EPIT foi capaz de estimulá-los a explorar o ambiente, o que não seria possível se os animais estivessem sentindo dor ou ansiedade decorrentes da lesão nervosa. Dessa forma, a EPIT nas concentrações (1,5; 3 e 4,5 mg/kg) sugere que a substância pode ter efeito sobre a redução da dor e consequentemente no comportamento locomotor dos animais, demonstrando que os animais tratados com EPIT apresentaram comportamento que denota bem-estar geral e melhor saúde (PRUT; BELZUNG, 2003; KRAEUTER; GUEST; SARNYIA, 2019; TREIT; ENGIN, 2009; DEUIS; DVORAKOVA; VETTER, 2017).

Prosseguindo com os achados histopatológicos, foi avaliado o efeito da EPIT (1,5; 3 e 4,5 mg/kg) no tecido hepático dos animais após a eutanásia dos animais no 21º dia de tratamento. O fígado é o principal órgão de metabolização de xenobióticos, incluindo fármacos e toxinas, mas também pode sofrer com o efeito tóxico de determinadas substâncias que podem causar alterações na sua função metabólica. A EPIT nas concentrações utilizadas no estudo, causaram principalmente manifestações histopatológicas através da congestão hepática, edema e tumefação nas concentrações de 3 e 4,5 mg/kg. Dessa forma, a dose de 1,5 mg/kg parece ser a dose mais segura para evitar danos hepáticos, já que não foram observadas alterações estatisticamente significativas no grupo tratado com essa dosagem de EPIT, além de ser observado redução nos escores de dano hepático utilizados na análise histopatológica. Já em relação ao dano renal, a EPIT pode ter causado manifestação patológica evidenciada pela congestão vascular renal nas concentrações 1,5 e 4,5 mg/kg, mas que esteve presente também no grupo Neuropatia, não sendo possível associar a EPIT ao dano renal. Também foi observado ocorrência estatisticamente significativa de infiltrado inflamatório renal nos animais tratados com 1,5 mg/kg e tendência de ocorrer infiltração inflamatória nos grupos 3 e

4,5 mg/kg, mas essa tendência também foi observada no grupo Neuropatia, não sendo possível associar a administração de EPIT. Esses achados demonstram uma possível associação entre a administração de EPIT nas concentrações 1,5; 3 e 4,5 mg/kg associado a um grau leve de dano renal. Entretanto, ao analisar os parâmetros bioquímicos de creatinina e ureia no soro dos animais tratados com EPIT, não foram observadas alterações nesses marcadores de função renal, indicando que a EPIT (1,5; 3 e 4,5 mg/kg) não foi afetou negativamente o funcionamento renal a (KHEIRIPOUR *et al.*, 2008; RAHDAR *et al.*, 2021; MALAYAPPAN *et al.*, 2021; GUNADI *et al.*, 2020).

Ainda em relação aos parâmetros bioquímicos, a EPIT (1,5; 3 e 4,5 mg/kg) não causou alterações nos níveis de colesterol total e HDL nos grupos tratados com a substância. Dessa forma, a EPIT parece não causar alteração no perfil lipídico (KHEIRIPOUR *et al.*, 2008; RAHDAR *et al.*, 2021; MALAYAPPAN *et al.*, 2021; SAMARGHANDIAN *et al.*, 2015).

Para complementar a avaliação da toxicidade sistêmica da EPIT nos animais, foram avaliados os parâmetros hematológicos, pois o sangue é o principal tecido de transporte de xenobióticos pelo corpo. Em nossos estudos, foram observadas diminuição na contagem de hemácias em relação ao grupo EPIT nas concentrações (3 e 4,5 mg/kg) e no grupo Neuropatia, mas essa diminuição não ocorreu de forma significativa quando comparada ao grupo Controle. A contagem de plaquetas teve aumento induzido pela EPIT na concentração de 1,5 mg/kg em relação ao grupo controle, mas também essa alteração foi observada no grupo Neuropatia. Portanto, não podemos associar o uso da EPIT ao aumento na contagem de plaquetas. O mesmo aumento pode ser observado na contagem de leucócitos, em que o grupo EPIT 1,5 mg/kg apresentou elevação significativa em relação ao grupo Controle, e o grupo EPIT 3 mg/kg teve diminuição significativa em relação ao grupo Neuropatia. Dessa forma, pode-se sugerir que a EPIT não seja a causa da alteração do número de hemácias e plaquetas, além de sugerir que a EPIT 3 mg/kg foi capaz de reduzir a contagem total de leucócitos, mostrando um possível efeito na redução das células de defesa (KHEIRIPOUR *et al.*, 2008; RAHDAR *et al.*, 2021; MALAYAPPAN *et al.*, 2021)

Por fim, foi avaliado também a influência da (1,5; 3 e 4,5 mg/kg) com relação ao estresse oxidativo, sendo utilizados como marcadores os níveis de malondialdeído (MDA) e glutathiona reduzida (GSH) no tecido hepático. Foi observado que a EPIT (1,5; 3 e 4,5 mg/kg) não causou elevação significativa no aumento dos níveis de MDA no tecido hepático dos animais tratados com a substância. De forma semelhante, na dosagem de GSH, a EPIT causou aumento nos níveis, sendo portanto promissora como agente antioxidante no modelo

experimental proposto.. Esses dados corroboram que a EPIT não é tóxica para o fígado, segundo nossas análises, além de auxiliar na proteção contra o estresse oxidativo (AYALA; MUÑOZ; ARGUELLES, 2014; TSIKAS, 2016; DRAPER; HADLEY, 1990; OWEN; BUTTERFIELD, 2010).

7 CONCLUSÃO

O estudo determinou de maneira inédita o efeito antinociceptivo da epiisopiloturina em modelo de dor neuropática em ratos. Esse efeito parece não estar associado à toxicidade deste alcaloide, que não induziu alterações bioquímicas no sangue e apresentou resultados promissores nos testes comportamentais e avaliação do limiar de dor após tratamento com a EPIT.

A neuropatia induziu na maioria dos parâmetros investigados alterações histológicas (rim e fígado), que não foi alterada ou alterada significativamente pela EPIT segundo a dose investigada. Associando às análises histológicas às bioquímicas, incluindo parâmetros do estresse oxidativo, os dados sugerem a ausência de toxicidade importante nesses órgãos. Contudo, estudos adicionais estão na agenda científica.

REFERÊNCIAS

AKYUZ, G.; KENIS, O. . Physical Therapy Modalities and Rehabilitation Techniques in the Management of Neuropathic Pain. **American Journal Of Physical Medicine & Rehabilitation**, v.93, n.3, p.253-259, 2014.

ALLES, S.; SMITH, P. Etiology and Pharmacology of Neuropathic Pain. **Pharmacological Reviews**, v.70, n.2, p.315-347, 2018.

AMIRKIA, V.; HEINRICH, M. Alkaloids as drug leads – A predictive structural and biodiversity-based analysis. **Phytochemistry Letters**, v.10, p.48-53, 2014.

AYALA, A.; MUÑOZ, M.; ARGUELLES, S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, v.2014, p.1-31, 2014.

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

BRANDÃO, M. *et al.* Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopoeia. **Journal Of Ethnopharmacology**, v.120, n.2, p.141-148, 2008.

CARVALHO, L. *et al.* Epiisopiloturine, an imidazole alkaloid, reverses inflammation and lipid peroxidation parameters in the Crohn disease model induced by trinitrobenzenesulfonic acid in Wistar rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.102, p.278-285, 2018.

CAVALLI, E. *et al.* The neuropathic pain: An overview of the current treatment and future therapeutic approaches. **International Journal Of Immunopathology And Pharmacology**, v.33, 2019.

COHEN, S.; VASE, L.; HOOTEN, W. Chronic pain: an update on burden, best practices, and new advances. **The Lancet**, v.397, n.10289, p.2082-2097, 2021.

DALLAZAN, J. *et al.* Local effects of natural alkylamides from *Acmella oleracea* and synthetic isobutylalkyl amide on neuropathic and postoperative pain models in mice. **Fitoterapia**, v.160, 2022.

DELLAROZA, M.; PIMENTA, C.; MATSUO, T. Prevalence and characterization of chronic pain among the elderly living in the community. **Cad. Saúde Pública**, v.23, n.5, p. 1151-1160, 2007.

DERRY, S. *et al.* Pregabalin for neuropathic pain in adults. **Cochrane Database Syst Rev**, v.1, 2019.

DEUIS, J.; DVORAKOVA, L.; VETTER, I. Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v.10, 2017.

DRAPER, H.; HADLEY, M. A review of recent studies on the metabolism of exogenous and endogenous malondialdehyde. **Xenobiotica**, v.20, n.9, p.901-907, 1990.

FINNERUP, N.; KUNER, R.; JENSEN, T. Neuropathic Pain: From Mechanisms to Treatment. **Physiological Reviews**, v.101, n.1, p.259-301, 2021.

FINNERUP, N. *et al.* Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Neurology**, v.14, n.2, p.162-173, 2015.

GARCIA, J. B. S. **Dor neuropática**. [S.l.: SBED, 2010?]. n. 2. Disponível em: https://sbed.org.br/wp-content/uploads/2019/01/fasc_dor_neuropatica.pdf. Acesso em: 19 maio 2022.

GIBSON-CORLEY, K.; OLIVER, A.; MEYERHOLZ, D. Principles for Valid Histopathologic Scoring in Research. **Veterinary Pathology**, v.50, n.6, p.1007-1015, 2013.

GIL-MONTOYA, J. *et al.* Treatment of xerostomia and hyposalivation in the elderly: a systematic review. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal**, p.355-366, 2016.

GILRON, I.; BARON, R.; JENSEN, T. Neuropathic Pain: principles of diagnosis and treatment. **Mayo Clinic Proceedings**, v.90, n.4, p.532-545, 2015.

GUNADI, J. *et al.* Different training intensities induced autophagy and histopathology appearances potentially associated with lipid metabolism in wistar rat liver. **Heliyon**, v.6, n.5, 2020.

HARVEY, A.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.14, n.2, p.111-129, 2015.

HEINRICH, M.; MAH, J.; AMIRKIA, V. Alkaloids Used as Medicines: Structural Phytochemistry Meets Biodiversity-An Update and Forward Look. **Molecules**, v.26, n.7, p.1836, 2021.

KATZ, L.; BALTZ, R. Natural product discovery: past, present, and future. **Journal Of Industrial Microbiology And Biotechnology**, v.43, n.2-3, p.155-176, 2016.

KHEIRIPOUR, N. *et al.* Evaluation of the hepatoprotective effects of curcumin and nanocurcumin against paraquat-induced liver injury in rats: modulation of oxidative stress and nrf2 pathway. **Journal Of Biochemical And Molecular Toxicology**, v.35, n.5, 2021.

KRAEUTER, A.; GUEST, P.; SARNYIA, Z. The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. **Methods In Molecular Biology**, p.999-103, 2018.

LEE, G.; NEUMEISTER, M. Pain: Pathways and Physiology. **Clinics In Plastic Surgery**, v.47, n.2, p.173-180, 2020.

LIMA, D. *et al.* Seasonal change in main alkaloids of jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth), an economically important species from the Brazilian flora. **Plos One**, v.12, n.2, 2017.

MALAYAPPAN, M. *et al.* Acute and subacute toxicity assessment of Madhulai Manappagu (Siddha herbal syrup formulation) in animal model. **Journal Of Complementary And Integrative Medicine**, v.19, n.1, p.9-18, 2021.

MEACHAM, K. *et al.* Neuropathic Pain: Central vs. Peripheral Mechanisms. **Curr Pain Headache Rep**, v.6, 2017.

MOKHTARI, T. *et al.* Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation in Relieving Neuropathic Pain: Basic Mechanisms and Clinical Applications. **Curr Pain Headache Rep**, 2020.

MOISSET, X. *et al.* Pharmacological and non-pharmacological treatments for neuropathic pain: Systematic review and French recommendations. **Revue Neurologique**, v.176, n.5, p.325-352, 2020.

MORAES, J. Natural products with antischistosomal activity. **Future Medicinal Chemistry**, v.7, n.6, p.801-820, 2015.

NICOLAU, L. *et al.* Epiisopiloturine hydrochloride, an imidazole alkaloid isolated from *Pilocarpus microphyllus* leaves, protects against naproxen-induced gastrointestinal damage in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.87, p.188-195, 2017.

O'CONNOR, A.; DWORKIN, R. Treatment of Neuropathic Pain: An Overview of Recent Guidelines. **The American Journal of Medicine**, p.22-32, 2009.

OBATTA, H. Analgesic Mechanisms of Antidepressants for Neuropathic Pain. **International Journal Of Molecular Sciences**, v.18, n.11, p.2483, 2017.

ONAKPOYA, I. *et al.* Benefits and harms of pregabalin in the management of neuropathic pain: a rapid review and meta-analysis of randomised clinical trials. **BMJ Open**, v.9, 2019.

OXMAN, M. A Vaccine to Prevent Herpes Zoster and Postherpetic Neuralgia in Older Adults. **New England Journal Of Medicine**, v.352, n.22, p.2271-2284, 2005.

OWEN, J.; BUTTERFIELD, D. Measurement of Oxidized/Reduced Glutathione Ratio. **Methods In Molecular Biology**, p.269-277, 2010.

PEDROSO, R.; ANDRADE, G.; PIRES, R. Plantas medicinais: uma abordagem sobre o uso seguro e racional. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v.31, n.2, 2021.

PINHEIRO, C. Extrativismo, cultivo e privatização do jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Holm.; Rutaceae) no Maranhão, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.16, n.2, p.1441-1500, 2002.

PIRANI, J.R. & GROPPPO, M. **Rutaceae**. Disponível em:
<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB212>>. Acesso em: 10 ago. 2022.

POSSO, I.; PALMEIRA, C.; VIEIRA, E. Epidemiology of neuropathic pain. **Revista Dor**, v.17, 2016.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal Of Pharmacology**, v.463, n.1-3, p.3-33, 2003.

QUINTANS, J. *et al.* Produtos naturais avaliados em modelos de dor neuropática - uma revisão sistemática. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.114, n.6, p.442-450, 2013.

RANG, Rang *et al.* **Rang & Dale Farmacologia**. Elsevier Brasil, 2015.

RAHDAR, A. *et al.* Biochemical, Ameliorative and Cytotoxic Effects of Newly Synthesized Curcumin Microemulsions: evidence from in vitro and in vivo studies. **Nanomaterials**, v.11, n.3, p.817, 2021.

ROCHA, J. *et al.* Anthelmintic, Antibacterial and Cytotoxicity Activity of Imidazole Alkaloids from *Pilocarpus microphyllus* Leaves. **Phytotherapy Research**, v.31, n.4, p.624-630, 2017.

ROCHA, T. *et al.* Imidazole alkaloids inhibit the pro-inflammatory mechanisms of human neutrophil and exhibit anti-inflammatory properties in vivo. **Journal Of Pharmacy And Pharmacology**, v.71, n.5, p.849-859, 2019.

ROCHA, Talita Magalhaes; LEAL, Luzia Kalyne Almeida Moreira; LIMA, David Fernandes; LEITE, José Roberto; VIANA, Glaucete Socorro Barros; ROPKE, Cristina Dislich. Biological evaluation of biomaterials, alkaloids from *Pilocarpus microphyllus*, in human neutrophils: toxicity and anti-inflammatory activity. In: WORLD BIOMATERIALS CONGRESS, 10., 2016, Montréal, Canada. **Conference Abstract**. [S.L.] Montréal: The Society For Biomaterials, 2016. v. 1, p. 1-3. Disponível em: https://www.frontiersin.org/10.3389/conf.FBIOE.2016.01.00155/2893/10th_World_Biomaterials_Congress/all_events/event_abstract. Acesso em: 27 out. 2022.

ROCHA, Talita Magalhães *et al.* Efeito anti-inflamatório e antinociceptivo de alcaloides imidazólicos de *Pilocarpus microphyllus*: estudo in vitro, in vivo e in silico. 2017. 96 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

SAMARGHANDIAN, S. *et al.* Effect of chronic exposure to cadmium on serum lipid, lipoprotein and oxidative stress indices in male rats. **Interdisciplinary Toxicology**, v.8, n.3, p.151-154, 2015.

SANTOS, A.; MORENO, P. *Pilocarpus* spp.: a survey of its chemical constituents and biological activities. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.40, n.2, p.116-137, 2004.

SILVA, V. *et al.* Anti-inflammatory and Antinociceptive Activity of Epiisopiloturine, an Imidazole Alkaloid Isolated from *Pilocarpus microphyllus*. **Journal Of Natural Products**, v.76, n.6, p.1071-1077, 2013.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v.25, p.192-205, 1968.

SERPELONI, J. et al. In vivo assessment of DNA damage and protective effects of extracts from Miconia species using the comet assay and micronucleus test. **Mutagenesis**, v.23, n.6, p.501-507, 2008.

SILVA-CARDOSO, G. et al. Cannabidiol effectively reverses mechanical and thermal allodynia, hyperalgesia, and anxious behaviors in a neuropathic pain model: possible role of cb1 and trpv1 receptors. **Neuropharmacology**, v.197, 2021.

SOUSA, João Antonio Costa. **Epiisopiloturina de *Pilocarpus microphyllus* inibe a resposta inflamatória de células microgлияis induzida por LPS interferindo na via de sinalização TLR4/NF-B-MAPKs**. Orientadora: Luzia Kalyne Moreira Almeida Leal. 2022. 96 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de pós-graduação em Farmacologia, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2022.

STURMAN, O.; GERMAIN, P.; BOHACEK, J. Exploratory rearing: a context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test. **Stress**, v.21, n.5, p.443-452, 2018.

TEDESCHI, E. *et al.* The Isolation of Pure Pilosine and Epi-Isopilosine from Leaves of *Pilocarpus Jaborandi*. **Israel Journal Of Chemistry**, v.11, n.5, p.731-733, 1973.

THIEMI, H.; RENIERI, G.; SCHUART, C. Allgemeine Substanzklassen und Pharmakologie bei Glaukom. **Ophthalmologe**, v.110, p.1149-1154, 2013.

TREIT, D.; ENGIN, E. Animal Models of Anxiety and Anxiolytic Drug Action. **Behavioral Neurobiology Of Anxiety And Its Treatment**, p.121-160, 2009.

VERAS, L. *et al.* Activity of epiisopiloturine against *Schistosoma mansoni*. **Current Medicinal Chemistry**, v.19, n.13, p.2051-2058, 2012.

TANG, H. *et al.* Liver toxicity assessments in rats following sub-chronic oral exposure to copper nanoparticles. **Environ Sci Eur**, v.31, 2019.