



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

RAFAELA ARAUJO VICENTINI LONE

**EXTRATO DE *HYPERICUM PERFORATUM* REDUZ A DOR  
INFLAMATÓRIA EM CAMUNDONGOS:  
EFEITO NA PRODUÇÃO DE IL-1 $\beta$  E ATIVAÇÃO DA VIA  
NO/GMPC/PKG/K<sup>+</sup>ATP**

RAFAELA ARAUJO VICENTINI LONE

**EXTRATO DE *HYPERICUM PERFORATUM* REDUZ A DOR  
INFLAMATÓRIA EM CAMUNDONGOS:  
EFEITO NA PRODUÇÃO DE IL-1 $\beta$  E ATIVAÇÃO DA VIA  
NO/GMPC/PKG/K<sup>+</sup>ATP**

Tese apresentada à banca do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Jr.

Londrina  
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

L847 Lone, Rafaela Araujo Vicentini .  
EXTRATO DE HYPERICUM PERFORATUM REDUZ A DOR INFLAMATÓRIA EM CAMUNDONGOS: EFEITO NA PRODUÇÃO DE IL-1 $\beta$  E ATIVAÇÃO DA VIA NO/GMPC/PKG/K<sup>+</sup>ATP / Rafaela Araujo Vicentini Lone. - Londrina, 2020. 88 f. : il.

Orientador: Waldiceu Aparecido Verri Jr..  
Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2020.  
Inclui bibliografia.

1. DOR INFLAMATÓRIA - Tese. 2. ANALGESIA - Tese. 3. ÓXIDO NITRÍCO - Tese. 4. Hipericum perforatum - Tese. I. Verri Jr., Waldiceu Aparecido . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU 61

RAFAELA ARAUJO VICENTINI LONE

**EXTRATO DE *HYPERICUM PERFORATUM* REDUZ A DOR  
INFLAMATÓRIA EM CAMUNDONGOS:  
EFEITO NA PRODUÇÃO DE IL-1 $\beta$  E ATIVAÇÃO DA VIA  
NO/GMPC/PKG/K<sup>+</sup>ATP**

Tese apresentada à banca do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Jr.  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Sérgio Marques Borghi  
Universidade Norte do Paraná- UNOPAR

---

Prof. Larissa Staurengo Ferrari  
University of California San Francisco-UCSF-USA

---

Dra. Camila Rodrigues Ferraz  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Cássia Calixto Campos  
Faculdade de Apucarana – FAP

Londrina, 14 de setembro de 2020.

## AGRADECIMENTOS

Desejo exprimir os meus agradecimentos a todos aqueles que, de alguma forma, permitiram que esta tese se concretizasse.

Agradeço aos meus pais que não mediram esforços para me educar e proporcionar o melhor para a minha formação, não só acadêmica, mas como pessoa. Em especial à minha mãe, fonte de minha admiração e exemplo de garra, determinação e sucesso, que me ensinou a nunca desanimar e desistir, mesmo frente às adversidades e tropeços da vida.

Ao meu marido Lucas, com amor, pelo permanente incentivo e preocupação com que sempre acompanhou este meu trabalho. Agradeço ainda a paciência e amor demonstrados nos meus momentos menos bons.

Ao Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Júnior, por me aceitar em seu laboratório e proporcionar a satisfação de participar da sua equipe de pesquisa. Agradeço pelos ensinamentos, pela paciência, atenção e compreensão. Mais que um orientador o senhor é um sinônimo de admirável dedicação e inteligência. Muito obrigada!

Guardo um agradecimento especial para o Dr. Peter McNaughton, do King's College London, e toda sua equipe que me receberam e braços abertos e me deram um grande voto de confiança antes mesmo de me conhecerem pessoalmente.

Aos professores do programa de doutorado em Ciências da Saúde, que foram fundamentais para minha formação. E aos colegas pelo companheirismo durante as disciplinas.

Aos meus colegas de laboratório, quero agradecer-lhes os momentos que passámos. Agradeço o bom convívio e as boas discussões.

Aos familiares e amigos de vida, desde a minha infância até hoje, são muitos os queridos que fizeram e fazem toda a diferença para eu ser o que sou por isso não citarei um por um, pois, poderia deixar algum nome de fora e isso seria injusto, tenho em mim um pouco de cada um de vocês, agradeço todos os dias por serem quem são, por fazerem parte da minha existência e me ajudarem a construir a minha história.

Às agências de fomento Capes, CNPq pelo suporte financeiro e incentivo à pesquisa.  
Muitíssimo obrigada todos os dias!!!

*“A dor é uma emoção que mora na alma”  
Platão (370 a.C.)*

LONE, Rafaela Araujo Vicentini. *hypericum perforatum* reduz a dor inflamatória em camundongos: efeito na produção de IL-1 $\beta$  e ativação da via NO/GMPC/PKG/K+ATP. 2020. 86 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

## RESUMO

*Hypericum perforatum* (*Hp*) é o nome científico da erva de São João, amplamente utilizada para fins terapêuticos especialmente no tratamento da depressão moderada. O efeito analgésico do extrato de *H. perforatum* foi demonstrado em condições dolorosas como em modelos de constrição do nervo ciático, neuropatia induzida por diabetes, enxaqueca dentre outros. Porém há pouco conhecimento sobre sua modulação da dor inflamatória. Neste trabalho, avaliamos o efeito analgésico do extrato de *Hp* em vários modelos de dor inflamatória. Os camundongos foram tratados com extrato de *Hp* (30-300 mg/kg, v.o.), indometacina (controle anti-inflamatório, 5 mg/kg, i.p.) ou veículo (5% tween 80 em salina) antes da injeção dos estímulos inflamatórios (carragenina (300  $\mu$ g/pata); formalina (1,5% - 25  $\mu$ l/pata); ácido acético (0,8% i.p); fenil-*p*-benzoquinona (1,890  $\mu$ g/kg i.p.); adjuvante completo de Freund's (10  $\mu$ l/pata)). O pré-tratamento com extrato de *Hp* por via oral inibiu de maneira dose-dependente a hiperalgesia inflamatória induzida pela administração de ácido acético bem como inibiu os comportamentos de dor manifesta induzidos por fenil-*p*-benzoquinona, formalina e Adjuvante completo de Freund's (CFA). O tratamento com extrato de *Hp* também inibiu a hiperalgesia mecânica na inflamação aguda induzida pela carragenina e inflamação prolongada induzida pelo CFA. Quanto aos mecanismos de ação do extrato de *Hp*, envolvem a inibição da produção da citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$ . Além disso, o efeito analgésico do extrato de *Hp* foi inibido pelos pré-tratamentos com L-NAME, ODQ, KT5823 e glibenclamida, demonstrando que o efeito analgésico também é dependente da ativação da via NO/GMPC/PKG/canais de potássio dependentes de ATP, respectivamente. Esses resultados demonstram que o *H. perforatum* apresenta efeito analgésico e que seus mecanismos envolvem a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias e ativação da via NO/GMPC/PKG/K<sup>+</sup>ATP.

**Palavras-chave:** *Hypericum perforatum*. Citocina. Óxido nítrico. Dor Inflamatória. Hiperalgesia.

LONE, Rafaela Araujo Vicentini. **Hypericum perforatum reduces inflammatory pain in mice**: Effect on IL-1 $\beta$  production and involvement of NO-cGMP-PKG-KATP Channel Signaling Pathway. 2020. 86 p. Thesis (Doctoral degree in Health Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

### ABSTRACT

*Hypericum perforatum* (*Hp*) is the scientific name of the popular St. John's wort widely used for therapeutic purposes especially in the treatment of moderate depression. The analgesic effect of the extract of *H. perforatum* has been demonstrated in painful conditions such as sciatic nerve constriction models, diabetes-induced neuropathy, migraine, among others. However, your role in modulation of inflammatory pain is yet unknown. In this work the analgesic effect of *Hp* was evaluated in several models of inflammatory pain. Mice were treated with *Hp* (30-300 mg/kg, p.o.), indomethacin, which was used as anti-inflammatory drug control (5 mg/kg, i.p.), or vehicle (5% tween 80 plus saline) prior to different inflammatory stimulus injection: carrageenin (300  $\mu$ g / paw), formalin (25  $\mu$ l / paw), acetic acid (0.8% i.p.), phenyl-p-benzoquinone (1.890  $\mu$ g / kg i.p.), and Freund's Complete Adjuvant (10  $\mu$ l / paw). Oral pre-treatment with *Hp* dose-dependently inhibited acetic acid administration-induced inflammatory nociception as well as inhibited phenyl-*p*-benzoquinone, formalin and Freund's Complete Adjuvant (CFA)-induced nociceptive behaviour. *Hp* treatment also inhibited mechanical hyperalgesia in carrageenin-induced acute inflammation, and prolonged CFA-induced inflammation. Regarding the mechanisms of action of *Hp*, there was inhibition of the production of pro-inflammatory cytokine IL-1 $\beta$ . In addition, the analgesic effect of *Hp* was inhibited by pre-treatments with L-NAME, ODQ, KT5823 and glibenclamide, demonstrating that the analgesic effect is also dependent on activation of the NO/GMPc/PKG/K<sup>+</sup>ATP respectively. These results demonstrate that *H. perforatum* has analgesic effect and that its mechanisms involve inhibition of cytokine production and activation of the NO/GMPc/PKG/K<sup>+</sup>ATP pathway.

**Keywords:** *Hypericum perforatum*. Cytokine. Nitric oxide. Inflammatory pain. Hyperalgesia.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> -	Mediadores periféricos da inflamação .....	13
<b>Figura 2</b> -	Classificação dos diferentes tipos de fibras aferentes .....	17
<b>Figura 3</b> -	Vias do mecanismo de sinalização dos neurotransmissores associados à dor e seus receptores cognatos envolvidos nos locais pré e pós-sinápticos para a transmissão da dor Via do óxido nítrico/guanosina monofosfato ciclico e seus inibidores .....	19
<b>Figura 4</b> -	Sugestão de vias de sinalização de NO e GMPc durante a sensibilização dolorosa .....	23
<b>Figura 5</b> -	Cinética e efeitos do óxido nítrico produzido pelas isoformas da oxido nítrico sintase e sua participação nos mecanismos inflamatórios .....	24
<b>Figura 6</b> -	Via do óxido nítrico/guanosina monofosfato ciclico e seus inibidores .....	25
<b>Figura 7</b> -	<i>Hypericum perforatum</i> .....	30
<b>Figura 8</b> -	Compostos bioativos detectados em <i>Hypericum perforatum</i> .....	31
<b>Figura 9</b> -	Esquemático experimental teste de contorção abdominal induzidas por PBQ e ácido acético .....	38
<b>Figura 10</b> -	Esquemático experimental teste da formalina .....	39
<b>Figura 11</b> -	Esquemático experimental utilizando CFA .....	39
<b>Figura 12</b> -	Esquemático experimental utilizando carragenina para avaliação da hiperalgesia mecânica .....	40
<b>Figura 13</b> -	Esquemático experimental utilizando CFA para avaliação da hiperalgesia mecânica .....	41
<b>Figura 14</b> -	Efeito da HPE na hiperalgesia mecânica induzida por carragenina; participação da via do NO/cGMP/PKG/K+ATP .....	41
<b>Figura 15</b> -	Esquemático experimental dosagem de citocina IL-1 $\beta$ induzida por carragenina e CFA .....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	Serotonina
AA	Ácido araquidônico
ALT	Alanina aminotransferase
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroides
AMPc	3´5´-adenosina-monofosfato-cíclico
AP-1	proteína ativadora 1
ASICs	Canais iônicos sensíveis ao ácido
ATP	Adenosina trifosfato
Cg	Carragenina
CFA	Adjuvante Completo de Freund (Complete Freund's Adjuvant)
CXCL-1	Receptores ligante de quimiocina 1 (chemokine (C-X-C motif) ligand 1)
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COX	Ciclooxigenase
DAMPS	Padrões moleculares associados a danos
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	ensaio de imunoabsorção enzimática (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
CGs	Guanilil Ciclase solúvel
GGT	Gama-glutamyltransferase
GMPC	Monofosfato cíclico de guanosina
GPCR	Receptores acoplados à proteína G
H. perforatum	Hipericum perforatum
Hp	Hipericum perforatum
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
Il-18	Interleucina 18
IL-33	Interleucina 33
IL1R	IL-1 receptor
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
IP3	Inositol trifosfato
i.p.	Intraperitoneal
i.pl	Intraplantar

IRRS	Inibidor seletivo da recaptação de serotonina
K2P	Canais de K <sup>+</sup> de dois poros
KT5823	Inibidor das proteínas quinases dependente de GMPc/PKG
L-NAME	L-nitro-arginina metil ester;
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteína-quinases ativadas por mitógenos (Mitogen Activated Protein Kinases)
MDA	Malondialdeído
MPP	Metaloproteínase de matriz
MPO	Mieloperoxidase
NO	Óxido nítrico
NO-GC	Complexo óxido nítrico-guanilato ciclase solúvel
NF-κB	Fator nuclear κB
NK	Células Natural Killer
NLRs	Receptores do tipo NOD
NGF	Fator de crescimento Neural
NOS	Óxido nítrico sintase
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one;
PAF	Fator ativador de plaquetas
PAMPs	Padrões moleculares associados ao patógeno (Pathogen-associated molecular pattern)
PBQ	fenil-p-benzoquinona
PG	Prostaglandinas
PKG	Proteína quinase G
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrão
RTK	Receptor de tirosina quinase
SOD	Superóxido dismutase
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
TLRs	Receptor do tipo Toll
Th1	Perfil de resposta imune do tipo Th1
TNF-α	Fator de necrose tumoral-α
TRPV1	Receptor de potencial transitório vaniloíde 1

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1	INFLAMAÇÃO .....	12
1.2	DOR .....	15
1.3	ÓXIDO NÍTRICO.....	20
1.4	MODELOS DE DOR INFLAMATÓRIA .....	25
1.4.1	Testes de Contorção Abdominal .....	26
1.4.2	Carragenina .....	27
1.4.3	Formalina .....	28
1.4.4	Adjuvante Completo de Freund .....	29
1.5	HYPERICUM PERFORATUM.....	29
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	35
2.1	OBJETIVO GERAL .....	35
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	35
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	36
3.1	ANIMAIS.....	36
3.2	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS GERAIS .....	36
3.3	DROGAS UTILIZADAS .....	37
3.4	TESTES DE COMPORTAMENTOS DE DOR EXPLÍCITA: TESTES DE CONTORÇÃO ABDOMINAL.....	37
3.5	TESTES DA FORMALINA.....	38
3.6	TESTE DE CFA .....	39
3.7	HIPERALGESIA MECÂNICA - VON FREY ELETRÔNICO .....	39
3.8	DOSAGEM DE CITOCINAS .....	41
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	42
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO – ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	43
4.1	Artigo: Hypericum Perforatum Reduces Inflammatory Pain in Mice: Effect on Il-1 $\beta$ Production and Involvement of NO-CGMP-PKG-KATP Channel Signaling Pathway.....	43

**5 CONCLUSÃO .....76**

**REFERÊNCIAS .....77**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 INFLAMAÇÃO

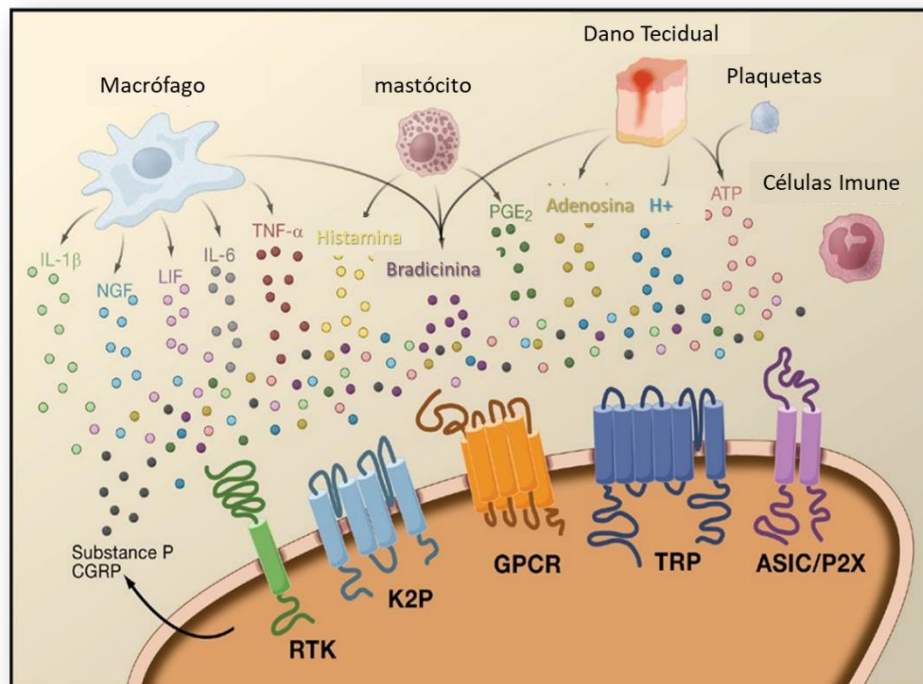
O termo inflamação, cunhado a partir da palavra latim *inflammare*, a qual significa atear fogo, remonta às antigas civilizações egípcias e gregas (Rochae and Silva, 1978). A inflamação é um dos processos centrais de defesa do organismo nos quais as respostas flogísticas provenientes deste processo se destinam a erradicar o agente causador, inativando ou destruindo organismos invasores, removendo irritantes a fim de iniciar o processo de reparação tecidual (Abdulkhaleq et al., 2018). Contudo, durante sua marcha, a inflamação pode passar de aguda para sua forma crônica e sua cronicidade está envolvida em múltiplas patologias como artrite, asma, esclerose múltipla, colite, inflamação, doenças intestinais, aterosclerose dentre outras (Bannenberget al., 2007; Mizokami et al., 2016).

A resposta inflamatória é induzida quando o sistema imune inato reconhece, por meio de receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), estruturas moleculares evolutivamente conservadas encontradas exclusivamente em patógenos, (padrões moleculares associados ao patógeno, PAMPs) ou através do reconhecimento de moléculas endógenas que são produzidas ou liberadas por células danificadas ou mortas (padrões moleculares associados ao perigo, DAMPs). Os PRRs abrangem várias famílias de receptores, dentre estes: os receptores do tipo *toll* (TLRs) e os receptores do tipo NOD (NLRs) que podem ser expressos tanto na superfície celular como no ambiente intracelular. Estes receptores são principalmente expressos por monócitos, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, mas também são expressos por células linfóides, os linfócitos, fibroblastos e células epiteliais (Fukata et al., 2009).

Constituído de eventos celulares e vasculares com secreções humorais, os mecanismos inflamatórios encerram uma cadeia de respostas organizadas e dinâmicas a fim de defender o organismo (Abdulkhaleq et al., 2018). Alterações na vascularização local normalmente aparecem rapidamente após exposição ao estímulo inflamatório resultando em um aumento da permeabilidade local favorecendo o aumento na concentração de células sanguíneas da linhagem branca e de uma gama de proteínas plasmáticas que desempenham papéis distintos na regulação do processo inflamatório (Abdulkhaleq et al., 2018). Os neutrófilos são geralmente os primeiros a serem recrutados pelo estímulo inflamatório e se apresentam ao local da lesão através da corrente sanguínea, seguidos pela liberação de outros mediadores químicos (Rosales, 2018). Dentre os processos inflamatórios primários encontra-se a liberação de uma rede química complexa composta por diversos mediadores e moléculas

de sinalização, como exemplo, moléculas derivadas de lipídios, como eicosanóides ou "fator de ativação de plaquetas" (PAF); interleucina-1; bradicinina; e aminas, como histamina ou 5-HT e radicais livres provenientes de oxigênio e nitrogênio provenientes de tecidos lesionados e células migratórias contribuem para os sinais flogísticos observados durante o processo inflamatório (Guzik *et al.*, 2003).

Diversos mediadores químicos são produzidos durante uma resposta imune; alguns deles são diretamente prejudiciais aos organismos infecciosos, outros desempenham papel regulador promovendo a atividade de tipos celulares específicos, enquanto outros servem para terminar a resposta quando a fonte de estimulação imunológica inicial for eliminada (Buckley *et al.*, 2014). Assim, a liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias desencadeia diversos eventos relacionados a cascata inflamatória (Figura 1).



**Figura 1: Mediadores periféricos da inflamação.** O dano tecidual pode resultar na liberação de mediadores inflamatórios por nociceptores ativados ou células não neurais que residem ou infiltram na área lesionada. Esta "sopa inflamatória" de moléculas de sinalização inclui uma série de mediadores como serotonina, histamina, glutamato, ATP, adenosina, substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), bradicinina, eicosanóides prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, endocanabinóides, fator de crescimento de nervo (NGF), fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), proteases extracelulares e prótons. Esses fatores atuam diretamente no nociceptor através de sua ligação a um ou mais receptores da superfície celular, incluindo receptores acoplados à proteína G (GPCR), canais TRP, canais iônicos sensíveis ao ácido (ASIC), canais de potássio de dois poros (K2P), e receptor de tirosina quinases (RTK), como representado no terminal nociceptor periférico. Adaptado de Basbaum *et al.* (2009).

As citocinas afetam potencialmente todos os processos biológicos, desde o desenvolvimento embrionário, passando pelas respostas á patógenos, mudanças em funções cognitivas e até mesmo a progressão dos processos degenerativos relacionados ao envelhecimento (Dinarello, 2007). Uma conexão entre citocinas e dor foi observada pela primeira vez quando analisada a resposta dos organismos à infecção, associada a febre, fadiga, perda de apetite e hiperalgesia. Desde então, as citocinas são vistas como um importante elo entre o reconhecimento imunológico e os sinais locais ou sistêmicos da inflamação (Dinarello, 2000; Dinarello, 2007).

Secretadas por diversos tipos celulares, as citocinas são polipeptídeos que atuam na sinalização de moléculas e células, estimulando-os para locais de inflamação, infecções, traumas, atuando sobre fatores primários de crescimento de linfócitos e outras funções biológicas. Estas exercem suas atividades a partir de baixas concentrações por meio de receptores de alta afinidade cujas constantes de ligação variam entre  $10^{-12}$  e  $10^{-10}$  M. Em alguns casos, apenas algumas dezenas de receptores precisam ser ativados por célula para provocar seu efeito (Sommer and Kress, 2004).

Dentre suas atividades, são capazes de ativar as células endoteliais, aumentando assim a permeabilidade vascular e facilitando a entrada de células imunes nos tecidos, no local da infecção, mas também podem levar a vazamentos capilares, vasodilatação e hipotensão. Quando liberadas podem atuar no local onde são produzidas (ação autócrina), nas células próximas (ação parácrina) ou nas células distantes (ação endócrina) e em grandes quantidades, podem induzir a produção de proteínas de fase aguda no fígado, ativação plaquetária, febre, fadiga e anorexia (Netea *et al.*, 2017).

Geralmente agem como mediadores intermediários, liberando outras citocinas e mediadores finais. Em alguns casos, no entanto, estas podem atuar estimulando a hiperalgesia e podendo participar no desenvolvimento de danos neuronais, contribuindo para o sintoma descrito como alodinia. Na alodinia (“allo” = diferente), a dor percebida é diferente da esperada pelo tipo de estímulo aplicado (o toque, por exemplo, pode produzir uma intensa dor de picada). Em contraste, na hiperalgesia, a "qualidade" percebida da dor induzida pelo estímulo desencadeante (por exemplo, mecânico ou térmico) pode ser percebida com uma intensidade bem acima do normal (Verri *et al.*, 2007).

A interleucina 1 (IL-1) é um mediador crucial da resposta inflamatória, desempenhando um papel importante nas respostas naturais do organismo e no desenvolvimento de condições patológicas agudas que levam à inflamação crônica e à destruição tecidual (Oliviero *et al.*,

2019). Existem duas formas desta citocina pró-inflamatória prototípica, IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , e, na maioria dos estudos (Capecchi *et al.*, 2018), as suas atividades biológicas são indistinguíveis e desempenham um papel importante na regulação imunitária e processos inflamatórios, induzindo a expressão de muitas proteínas efetoras, citocinas/quimiocinas, óxido nítrico sintetase e metaloproteinases de matriz (MMPs). A atividade excessiva e/ou desregulada desses mediadores está associada à destruição tecidual e, portanto, a síntese, secreção e atividade biológica de citocinas IL-1 foram identificadas como alvos terapêuticos para distúrbios inflamatórios comuns, como artrite reumatoide e periodontite (Felix *et al.*, 2018).

A citocina IL-1 $\beta$  é tida como um dos principais mediadores do processo inflamatório, sendo capaz de ativar a expressão de NF- $\kappa$ B assim como desempenha um papel na síntese de outros mediadores inflamatórios, incluindo iNOS e COX-2, além de hiper-regular sua produção própria. A regulação positiva de COX-2 e iNOS, além de estimular a síntese de NO e PGE<sub>2</sub>, pode, via estimulação com NF $\kappa$ B, aumentar a expressão de citocinas, resultando na ativação de processos de dor periférica e central. Todos esses mediadores inflamatórios parecem estar interligados, cada substância sendo capaz de estimular a expressão de outros mediadores, culminando finalmente em cascata inflamatória (Singh *et al.*, 2019).

Os sinais cardinais de inflamação incluem: o local da lesão quente, pelo aumento do fluxo sanguíneo em direção à região, vermelhidão e inchaço, pelo aumento da permeabilidade vascular, dor, pela ativação e sensibilização dos nociceptores periféricos e perda da função, temporária ou duradoura.

## 1.2 DOR

A dor é uma resposta protetora do corpo a um estímulo potencialmente nocivo, mas também é um sintoma importante em um grande número de condições patológicas como, por exemplo, doenças inflamatórias, câncer e doenças degenerativas, representando um problema médico muito significativo e com alto custo social (Phillips, 2006).

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP,2020) endossa a definição de dor como: " Uma experiência sensitiva e emocional desagradável associada a, ou semelhante àquela associada a, dano real ou potencial ao tecido" (Raja *et al.*, 2020) . Em condições fisiológicas, o papel protetor da dor, busca limitar e/ou evitar danos teciduais, cumprindo assim uma função defensiva vital essencial (Fornasari, 2014).

Tradicionalmente, a dor pode ser elencada de acordo com seu tipo (nociceptivo, neuropático, idiopático ou neurogênico), sua duração (aguda ou persistente/crônica) e/ou sua severidade (leve, moderada ou grave). Ademais, em alguns pacientes, diferentes tipos de dor com intensidades distintas podem coexistir dificultando assim o diagnóstico e o tratamento (Phillips, 2006).

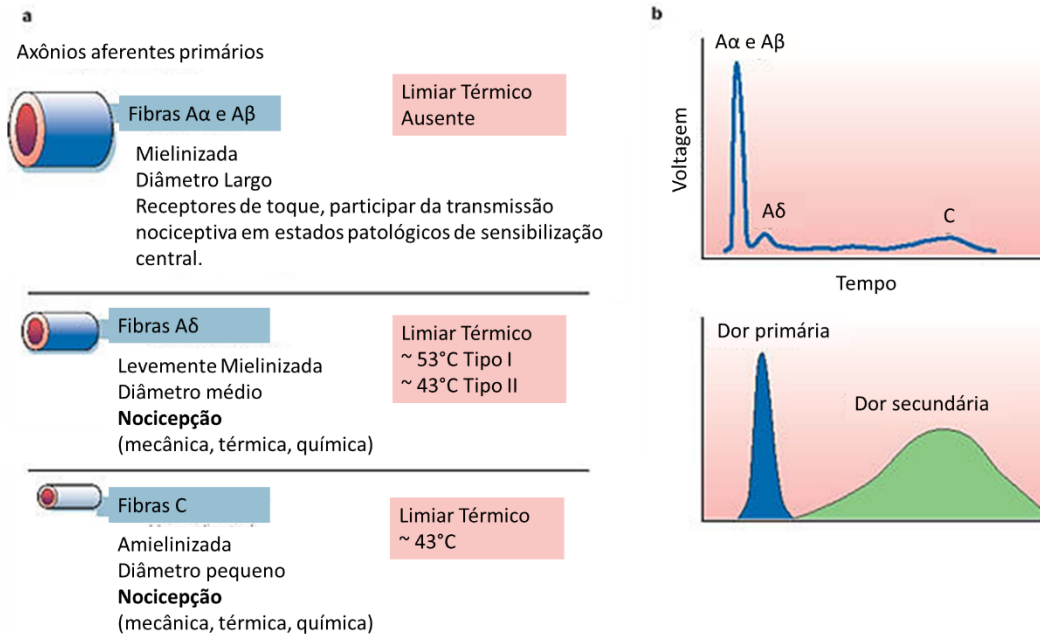
É importante notar que a dor pode apresentar diferentes facetas. No tecido saudável, a dor é provocada por estímulos que danificam ou possuem o potencial de danificar os tecidos (estímulos nocivos) (Schaible *et al.*, 2011).

Essa "dor nociceptiva fisiológica" é uma resposta de alerta tida como absolutamente essencial para a sobrevivência, uma vez que sua função é a de que o organismo evite o estímulo a fim de restaurar a homeostase, como por exemplo a dor causada pelo fogo que estimula o reflexo de retirada. Em contrapartida, há a dor provocada pela inflamação ou lesão de um órgão é denominada "dor nociceptiva fisiopatológica". Essa dor é tipicamente observada mesmo na presença de estímulos que normalmente são inócuos e não dolorosos, fenômeno este conhecido como alodinia (ocorrência de dor por estímulo inócuo). Associada a alodinia dá-se a hiperalgesia (resposta dolorosa exacerbada durante a aplicação de estímulos dolorosos) e/ou a dor em repouso (na ausência de qualquer estímulo intencional). A dor nociceptiva fisiopatológica resulta da sensibilização do sistema doloroso (Schaible *et al.*, 2011).

A dor não pode ser facilmente mensurada, uma vez que é uma experiência subjetiva que carece de consciência, sendo resultado de uma complexa interação entre sistemas de sinalização, modulação dos centros superiores e a percepção única do indivíduo (Steeds, 2016). A nocicepção é o processo fisiológico de ativação das vias neurais - através do trato espinotalâmico, do tálamo e, finalmente, de diferentes áreas do neocórtex - por estímulos que são potenciais ou prejudiciais aos tecidos (Steeds, 2016).

A codificação inicial de estímulos nocivos (químicos, mecânicos e/ou térmicos) é realizada por um grande grupo de neurônios sensoriais primários especializados, os nociceptores, que transmitem informações sobre esses estímulos para a medula espinhal ou tronco cerebral (Cook *et al.*, 2018). Neste processo, estímulos mecânicos, térmicos ou químicos são detectados por subpopulações de fibras nervosas periféricas chamadas de nociceptores (Basbaum *et al.*, 2009). Os nociceptores são, portanto, as terminações nervosas livres das fibras aferentes encontradas em todo o corpo, capazes de detectar estímulos internos e externos. Eles são normalmente eletricamente silenciosos e transmitem potenciais

de ação somente quando estimulados adequadamente (Cook *et al.*, 2018). As fibras sensoriais podem ser divididas em diferentes grupos por meio de sua estrutura anatômica, expressão característica de várias proteínas ou os receptores distintos em seus terminais (Figura 2).



**Figura 2: Classificação dos diferentes tipos de fibras aferentes.** a) Nervos periféricos incluem fibras mielinizadas de diversos diâmetros bem como fibras aferentes amielínicas de pequeno diâmetro. b) o fato de que a velocidade de condução está diretamente relacionada ao diâmetro da fibra é destacada no composto registro do potencial de ação de um nervo periférico. A maioria dos nociceptores são fibras Aδ ou C e suas diferentes velocidades de condução (6–25 e ~ 1,0 m s<sup>-1</sup>, respectivamente) relacionam-se com a primeira (rápida) e com a segunda (lenta) resposta de dor à lesão (Julius and Basbaum, 2001).

Tem-se assumido que nociceptores em fibras Aδ e C medeiam a "primeira" e "segunda" dor, respectivamente, ou seja, a dor rápida, de alerta e aguda, e a dor mais tardia, mais difusa e crônica evocada por estímulos nocivos (Steeds, 2016). Estudos eletrofisiológicos têm subdividido nociceptores Aδ em duas classes principais: os nociceptores do Tipo I e Tipo II. Os nociceptores mecânicos de alto limiar do tipo I, respondem a estímulos mecânicos e químicos, apresentando limiar para o calor relativamente alto (> 50 °C). Contudo, se o estímulo de calor é mantido, estes aferentes respondem a temperaturas mais baixas, por sensibilizarem (ou seja, o limiar térmico e/ou mecânico diminui) em decorrência da lesão. Os nociceptores Tipo II não são sensibilizados pelo calor intenso reagindo apenas a calor moderado (em torno de 43°), mas um patamar muito elevado para estímulos mecânicos. A atividade desses aferentes do tipo I responsáveis é responsável pela "primeira" resposta ao calor nocivo enquanto os nociceptores tipo II medeiam provavelmente a "primeira" dor

provocada por picada de agulha e outros estímulos mecânicos intensos (Julius and Basbaum, 2001; Steeds, 2016; Yong *et al.*, 2017)

As fibras C são heterogêneas sendo a maioria polimodais, isto é, elas incluem uma população sensível a estímulos térmicos e mecânicos sendo provavelmente acionadas quando as propriedades do meio químico se alteram na inflamação (Johanek *et al.*, 2008). A outra população constituinte das fibras C responde ao calor, mas são mecanicamente insensíveis, (os chamados nociceptores silenciosos), estes desenvolvem sensibilidade mecânica apenas na região da lesão, além de serem mais sensíveis a estímulos químicos (capsaicina ou histamina). Subconjuntos destes aferentes também são sensíveis a uma variedade de substâncias pruritogênicas. É interessante notar que nem todas as fibras C são nociceptoras. Alguns respondem ao resfriamento, e uma população particularmente interessante que respondem ao toque na pele, mas não ao calor ou a estimulação química, estas parecem mediar o toque agradável (Basbaum *et al.*, 2009).

Os nociceptores permanecem silenciosos durante a homeostase e são ativados quando existe um potencial de estímulo nocivo. A percepção de uma série de eventos sensoriais é necessária para o cérebro detectar a dor e produzir uma resposta à ameaça. Geralmente, há três estágios principais na percepção da dor: o primeiro é a sensibilidade à dor, seguida pelo segundo, em que os sinais são transmitidos da periferia para o corno dorsal, localizado na medula espinal, através do sistema nervoso periférico (SNP). Por fim, o terceiro estágio compreende a transmissão dos sinais para o cérebro. Existem duas rotas para transmissões de sinal a serem conduzidas: as vias ascendentes e descendentes. O caminho ascendente transporta informações sensoriais do corpo através da medula espinal em direção ao cérebro, enquanto o caminho descendente corresponde aos nervos que vão do cérebro para os órgãos através da medula espinal (Yam *et al.*, 2018).

A dor induzida pelo processo inflamatório é mediada por vias complexas que envolvem uma gama de mediadores inflamatórios, como os produtos da via ciclooxygenase (COX)-2, isto é, as prostaglandinas, além de citocinas inflamatórias, espécies reativas de oxigênio (EROs) e óxido nítrico (NO) (Singh *et al.*, 2019).

Esses mediadores atuam diretamente nos receptores neuronais, desencadeando mecanismos moleculares que facilitam a atividade elétrica da membrana neuronal. Embora existam alguns pontos obscuros a respeito dos mecanismos moleculares que resultam na sensibilização dos nociceptores, existe um consenso geral de que a estimulação do receptor acoplado à proteína G pelos mediadores inflamatórios ativa a enzima adenilato ciclase com



(Headland and Norling, 2015). A dor inflamatória provoca o aumento de descargas aferentes no corno dorsal da medula espinal e leva ao desenvolvimento de sensibilização central. Existem também, alguns mediadores que podem ser produzidos no local do tecido lesionado, que incluem: 5-HT, cininas, histamina, fatores de crescimento de nervo (NGF), adenosina trifosfato (ATP), PG, glutamato, leucotrienos, NO e prótons (Kidd and Urban, 2001) (Figura 3), sendo produzidos a partir dos tecidos necróticos e responsáveis por interagir e ativar os nociceptores na área inflamada (Yam *et al.*, 2018).

O controle farmacológico periférico da hiperalgesia inflamatória é baseado em duas estratégias. A primeira, é a prevenção da sensibilização dos nociceptores, que pode ser alcançada com drogas anti-inflamatórias não esteroidais (AINEs) (tipo aspirina) que inibem a síntese de PG (Ferreira, 1972). A segunda estratégia é o bloqueio direto da sensibilização atual aos nociceptores, o que pode ser alcançado pelo uso de opioides periféricos, analgésicos e doadores de NO (Gilroy, 2005; Rezende *et al.*, 2008; Cunha *et al.*, 2010; Cury *et al.*, 2011). Essas drogas são capazes de inibir a já estabelecida hiperalgesia induzida pela PGE<sub>2</sub> (Gilroy, 2005; Cunha *et al.*, 2010; Cury *et al.*, 2011). Além disso, vários estudos demonstraram que o mecanismo antinociceptivo dessas drogas depende da ativação da via do canal de potássio sensível à ATP-L-arginina/NO/guanosina 3, 5-cíclico monofosfato (cGMP)/proteína quinase G (PKG) (Déciga-Campos and López-Muñoz, 2004; Miclescu and Gordh, 2009; Mizokami *et al.*, 2012; Abd-Elbaset *et al.*, 2015; Mizokami *et al.*, 2016).

No entanto, o controle da dor inflamatória ainda é um grande desafio, devido aos efeitos colaterais deletérios atribuídos ao uso prolongado de AINEs e opioides, sua ineficácia em alguns casos e a diminuição da eficácia resultante do fenômeno de tolerância do organismo a droga utilizada (Staurengo-Ferrari *et al.*, 2013). Por conseguinte, é necessária a descoberta de novos medicamentos com potente atividade anti-inflamatória e efeitos adversos mínimos.

### 1.3 ÓXIDO NÍTRICO

Dentre as moléculas que participam do processo inflamatório, o óxido nítrico (NO) pode desempenhar um papel regulador em praticamente todas as fases do desenvolvimento da inflamação. Sintetizado por um grande número de células, o NO participa da defesa do organismo contra microrganismos infecciosos, regula a atividade funcional, crescimento e morte de diversas células envolvidas no processo imune como mastócitos, células NK, linfócitos, atua na regulação das propriedades pró-inflamação do endotélio e em os estágios

iniciais da transmigração de células inflamatórias para os locais de inflamação (Coleman, 2001; Guzik *et al.*, 2003).

O NO é sintetizado a partir da L-arginina pela ação catalítica das diferentes isoformas das enzimas óxido nítrico sintase (NOS). A atividade catalítica da NOS gera NO e L-citrulina em concentrações equimolares. Existem de três isoformas diméricas da NOS que possuem cerca de 55% de homologia entre elas. Duas destas enzimas são expressas constitutivamente: a isoforma neuronal (nNOS ou Tipo I) e a isoforma endotelial (eNOS ou Tipo III), sendo que a correspondente designação reflete o tipo de célula em que estas enzimas foram originalmente identificadas. A terceira isoforma denominada de iNOS ou Tipo II, foi descrita originalmente em macrófagos e, diferentemente das outras duas, só é expressa após estimulação das células (Guzik *et al.*, 2003).

As enzimas NOS são funcionalmente “bimodais”, visto que combinam as atividades de oxigenase e redutase associadas a domínios estruturais distintos. O domínio da oxigenase contém heme, ao passo que o domínio da redutase liga-se ao cálcio-calmodulina, à FMN, à FAD e ao NADPH. Por analogia com o citocromo P450, acredita-se que as flavinas aceitam elétrons do NADPH e os transferem para o ferro hêmico que se liga ao O<sub>2</sub> e catalisa a oxidação em etapas da L-arginina em NO e citrulina. As formas não acopladas da enzima transferem elétrons para outros substratos, como oxigênio molecular, resultando na síntese de ânion superóxido em vez de NO (Coleman, 2001).

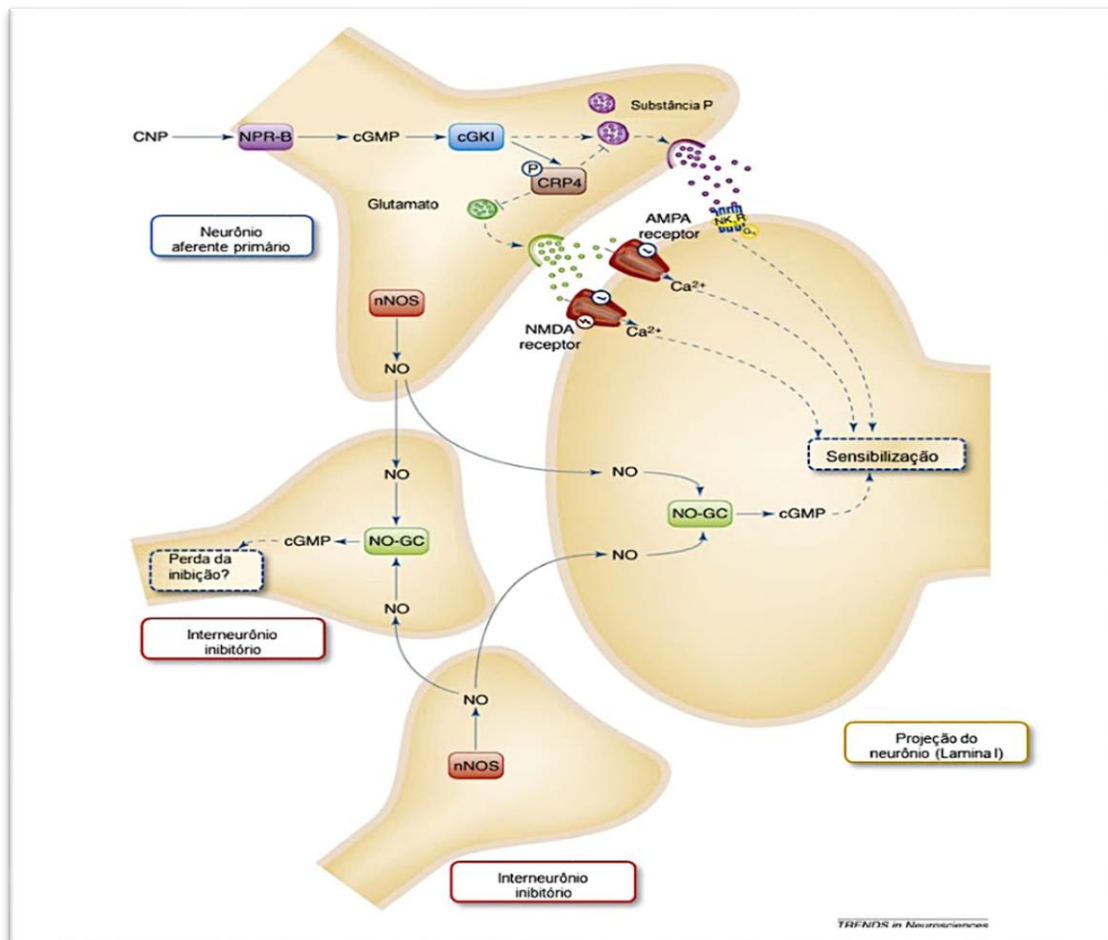
A atividade das isoformas constitutivas da NOS é controlada pelo cálcio-calmodulina intracelular. A isoforma neuronal (nNOS) é a forma predominante de NOS no corno dorsal e tem um papel definido nos circuitos da medula espinhal. A produção de óxido nítrico por nNOS no SNC requer o influxo de Ca<sup>2+</sup> ocasionado pela ativação de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA). O principal receptor intracelular para NO é uma guanilil ciclase solúvel (GCs). A sua ativação pelo NO, resulta na conversão do trifosfato de guanosina no segundo mensageiro GMPc. A via de sinalização NO-GMPc está presente nos neurônios da medula espinhal e tem sido implicada na plasticidade sináptica, como a sensibilização central. A estimulação do GMPc é uma das inúmeras ações biológicas diretas do NO e a atividade dessa molécula de sinalização intracelular modula a atividade de muitos alvos celulares, incluindo proteína quinase dependente de GMPc (PKG), canais iônicos e fosfodiesterases. O NO pode desempenhar um papel nos mecanismos centrais envolvidos no desenvolvimento de fenômenos nociceptivos após inflamação periférica/lesão tecidual além disso, evidências

indiretas implicaram na participação de NO derivado de nNOS nas ações antinociceptivas periféricas de agonistas opioides (Cunha *et al.*, 2010; Cury *et al.*, 2011).

Ao contrário dessas, a atividade da iNOS independe da  $[Ca^{2+}]_i$ . Apesar de conter um sítio de ligação para o cálcio-calmodulina, a afinidade muito elevada desse sítio pelo seu ligante permite que a iNOS seja ativada até mesmo quando há baixos valores de  $[Ca^{2+}]_i$  observados em condições basais. A indução dessa isoforma, ocorre então, por citocinas e/ou endotoxinas em uma variedade de células. Apesar de requerer algumas horas pra ser expressa, esta variante uma vez sintetizada, libera quantidades maiores de NO que as formas constitutivas e a produção deste continua indefinidamente até que a L-arginina ou cofatores necessários para sua síntese sejam depletados ou ocorra morte celular. Existem importantes diferenças na inducibilidade da iNOS entre espécies, verificando-se indução menos rápida nas células humanas do que nas células de camundongos (Coleman, 2001).

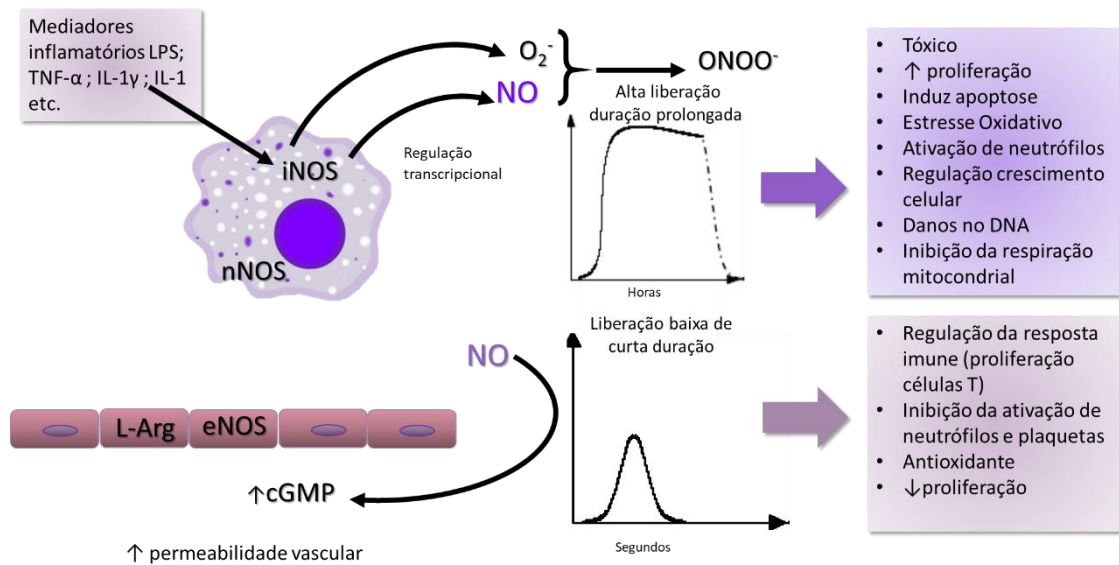
O NO é uma molécula mensageira que possui numerosos alvos moleculares participando de muitos processos fisiológicos. Ademais, apresenta diversas funções, podendo atuar na neurotransmissão, no controle do tônus vascular, na regulação da transcrição e tradução gênica e ainda pode manifestar-se como mediador químico na inflamação (Forstermann e Sessa, 2012). Várias linhas de evidência indicaram que o NO desempenha um papel complexo e diversificado na modulação da dor podendo atuar tanto como um agente nociceptivo como analgésico (Coleman, 2001; Cury *et al.*, 2011; Ding *et al.*, 2017).

O NO apresenta um papel dual no processamento nociceptivo, sendo capaz de atuar tanto como agente algésico como analgésico (Cury *et al.*, 2011). Evidências consideráveis indicam que o NO desempenha um papel importante no processamento da transmissão nociceptiva, podendo contribuir para o desenvolvimento da sensibilização central (Cury *et al.*, 2011; Alves *et al.*, 2013). O aumento na liberação de neurotransmissor excitatório, como o glutamato, na medula espinhal após inflamação periférica e o aumento no influxo de  $Ca^{2+}$ , resulta na produção de óxidos de nitrogênio (NOx) devido à ativação da NO sintase (Figura 4). As espécies nitroxidativas podem aumentar diretamente a excitabilidade dos neurônios nociceptivos, resultar em um aumento da frequência e da amplitude dos potenciais de ação dos neurônios DRG (Grace *et al.*, 2016).



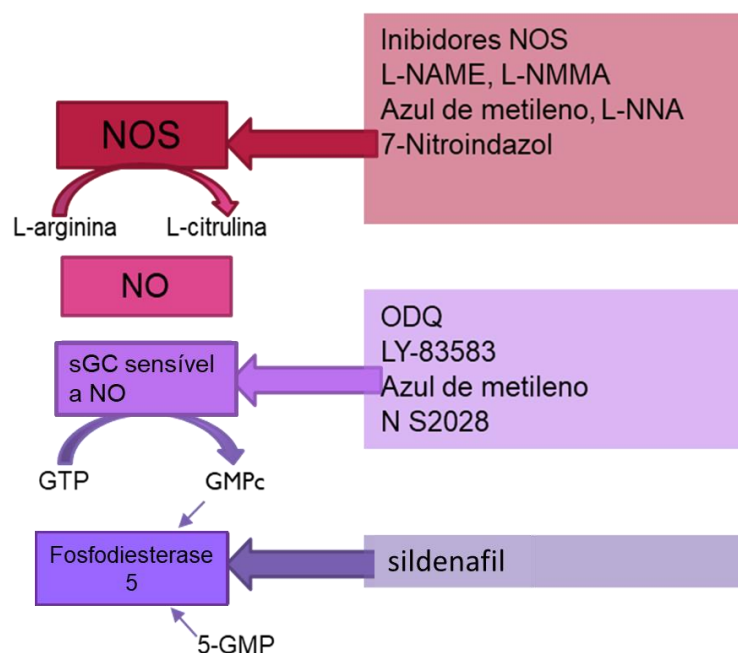
**Figura 4:** Sugestão de vias de sinalização de NO e GMPc durante a sensibilização dolorosa. No corno dorsal da medula espinhal, o NO-GC é localizado em interneurônios inibitórios e em neurônios da lâmina I que expressam o receptor P projetando-se para áreas supra-espinhais do sistema nociceptivo. Durante a dor inflamatória e neuropática, a nNOS é ativada e regulada positivamente em interneurônios inibitórios e nos neurônios aferentes primários, respectivamente. O aumento da produção de NO leva à ativação de NO-GC e subsequente produção de GMPc em NO-GC-expressando neurônios. Em contraste com o NO-GC, a proteína quinase I dependente de GMPc (cGKI, uma isoforma) é expressa principalmente em neurônios aferentes primários. Linhas sólidas e tracejadas indicam interações diretas e indiretas, respectivamente (Schmidtke et al., 2009).

A inflamação estimula a enzima iNOS que é responsável pelo excesso de produção de NO no local da inflamação (Ziskoven *et al.*, 2011). Concomitante a formação de NO, as células inflamatórias infiltrantes também geram EROs e radicais livres, incluindo, ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e oxigênio. O NO combinado com ânion superóxido gera o peroxinitrito, esta substância é tóxica e altamente reativa, sendo capaz de induzem diversos efeitos deletérios celular (Saeidnia and Abdollahi, 2013) (Figura 5). No entanto, estudos em animais sugeriram que outras vias também estão envolvidas na hiperalgesia induzida pelo NO (Mansouri *et al.*, 2018).



**Figura 5: Cinética e efeitos do óxido nítrico produzido pelas diferentes isoformas da óxido nítrico sintase. Importância para a inflamação (Adaptado de Guzik et al., 2003)**

O desenvolvimento de drogas anti-inflamatórias liberadoras de NO destacou os importantes benefícios terapêuticos da modulação das vias do NO (Florentino *et al.*, 2017). A via da L-arginina/NO/GMPc tem sido associada com inúmeras funções, incluindo antinocicepção central e periférica (Duarte *et al.*, 1992; Cury *et al.*, 2011). O mecanismo molecular desse processo começa com a ativação da NOS, que produz o segundo mensageiro NO. Uma vez gerado, o NO ativa a enzima guanilato ciclase, que é diretamente responsável pelo aumento dos níveis intracelulares de GMPc. O aumento do GMPc, pode ativar diferentes tipos de canais de  $K^+$  em diferentes tipos de tecidos, incluindo canais de  $K^+$  sensíveis a ATP ( $K^+$ ATP) (Cury *et al.*, 2011). Evidências experimentais levaram a estabelecer uma ligação entre a via L-Arginina/NO/GMPc e  $K^+$ ATP no modelo antinociceptivo, uma vez que o efeito antinociceptivo periférico de doadores de NO e análogos de GMPc exógenos foi antagonizado por bloqueadores de canais  $K^+$ ATP (Figura 6) (Miclescu and Gordh, 2009). De fato, a via NO/GMPc/ $K^+$ ATP foi implicada no mecanismo molecular de várias drogas antinociceptivas, incluindo morfina (Ferreira *et al.*, 1991), diclofenaco (Alves *et al.*, 2004) e xilazina (Romero and Duarte, 2009; 2013).



**Figura 6: Via do óxido nítrico/guanosina monofosfato cíclico e seus inibidores.** A L-arginina é metabolizada pela óxido nítrico sintase (NOS) resultando na formação de óxido nítrico (NO). NO ativa a guanilil ciclase solúvel (cGMP), que é catalizada pela guanosina trifosfato (GTP). No final da cascata a fosfatidilesterase tipo 5 hidrolase (5'-GMP) cGMP-específica. (Adaptado de Miclescu e Gordh, (2009).

#### 1.4 MODELOS DE DOR INFLAMATÓRIA

A dor é um grande problema de saúde pública que afeta a população em geral e ocasiona transtornos de cunho clínico, social e econômico, incitando gerações de profissionais de saúde em muitos continentes a tentarem proporcionar alívio e redução no sofrimento dos pacientes. O advento dos anestésicos e analgésicos modernos demonstrou que a dor pode ser atenuada, no entanto, nos últimos anos, aproximadamente nove em cada dez pacientes ainda sofrem níveis de dor que são considerados excessivos (Phillips, 2006).

Estudos de dor usando humanos são desafiadores, fundamentalmente (e talvez inescapavelmente) subjetivos, e eticamente auto limitantes, e, portanto, modelos para o estudo da dor utilizando animais de laboratório são amplamente utilizados. A utilização desses modelos apresenta um papel essencial na ciência básica e no desenvolvimento de medicamentos analgésicos uma vez que fornecem maiores informações a nível molecular (Mogil, 2009).

Na análise nociceptiva baseada em padrões de comportamento semelhantes à dor, um estímulo induz um comportamento declarado, tal como sacudida (flinch) ou lambida da pata e contorções abdominais sem outros estímulos externos mecânicos ou térmicos. Esse comportamento ocorre porque os estímulos nociceptivos ativam ou induzem a rápida

produção de mediadores endógenos que ativam os nociceptores periféricos e permitem avaliar os efeitos de potenciais analgésicos na sensação/transmissão de dor em modelos animais (Boyce-Rustay *et al.*, 2010; Pavao-De-Souza *et al.*, 2012).

#### 1.4.1 Testes de Contorção Abdominal

Existem alguns comportamentos estereotipados obtidos através da administração intraperitoneal, em animais, de agentes urentes que irritam as membranas serosas provocando contrações abdominais, movimentos do corpo como um todo (particularmente das patas traseiras), torção dos músculos dorso abdominais e uma redução na atividade motora e incoordenação motora. Esses comportamentos reflexivos são considerados evidências indiretas de dor visceral e são mensuráveis, geralmente avaliando-se o número de ocorrências e/ou duração das mesmas por unidade de tempo após a administração do agente irritante (Bars *et al.*, 2001).

No modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, foi demonstrado que citocinas, como a IL-1 $\beta$  e quimiocinas atuam em sinergia para induzir a resposta de contorções. A co-injeção destes mediadores (IL-1 $\beta$  e quimiocina) foi capaz de induzir as contorções enquanto a inibição de uma destas citocinas diminui a resposta de contorção induzida pelo ácido acético enfatizando a importância dessas citocinas neste processo. Todavia, a magnitude/número de contorções induzidas pela injeção de um pool de citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) e da quimiocina CXCL-1 é muito menor em comparação com a induzida no ácido acético (Ribeiro *et al.*, 2000), sugerindo a participação de outras vias nociceptivas.

Estudos sugerem que metabólitos da ação da ciclooxigenase (Sasaki *et al.*, 2015) bem como os cisteinil-leucotrienos (Noguchi and Okubo, 2011) também contribuem para a nocicepção neste modelo. A resposta de contorções no modelo de ácido acético é reduzida pelo tratamento com opioides, inibidores da COX e uma variedade de produtos naturais (Valerio *et al.*, 2007; Verri *et al.*, 2008).

O modelo de contorções abdominais induzidas pela fenil-p-benzoquinona (PBQ) apresenta perfil farmacológico semelhante a este, embora existam algumas diferenças nos mecanismos. Por exemplo, o modelo de PBQ depende das citocinas IL-18 e interferon (IFN)- $\gamma$ , e da endotelina-1, diferentemente do modelo do ácido acético (Verri *et al.*, 2008). Em contrapartida, os modelos de contorções induzidas por ácido acético e o modelo de contorções abdominais induzidas pela fenil-p-benzoquinona compartilham similaridades nos

mecanismos, incluindo a participação de prostanoídes, IL-33, MAPKs espinais bem como mecanismos específicos como a participação da endotelina1 (Borghi *et al.*, 2013).

#### 1.4.2 Carragenina

A carragenina é um polissacarídeo natural derivado de algas vermelhas comestíveis das espécies *Chondrus crispus* encontradas principalmente na Irlanda e na Inglaterra (Necas and Bartosikova, 2013). A injeção de carragenina na pata traseira de roedores, é um modelo amplamente utilizado para o estudo dos mecanismos inflamatórios e da dor associada a estes (Winter *et al.*, 1962). A carragenina causa edema e hiperalgesia, que é definida como aumento da sensibilidade a estímulos nocivos. A administração intraplantar de diferentes doses de carragenina em ratos induziu uma resposta hiperalgésica típica, manifestada por uma redução no limiar nociceptivo medido pelo teste de pressão (Alves *et al.*, 2013).

Após a injeção de carragenina, ocorreu aumento nos níveis de IL-1 $\beta$  e IL-6, então o nível de PGE<sub>2</sub> aumenta por estimulação de COX seguida de aumento da produção de IL-8, que estimula a liberação de aminas simpáticas. Esses mediadores inflamatórios produzidos após a administração de carragenina causa dor inflamatória e hiperalgesia por ação direta nos receptores presente em terminações periféricas de neurônios (Marius *et al.*, 2018).

A inflamação induzida por carragenina é descrita como um fenômeno bifásico, idade-dependente, na qual vários mediadores operam em sequência para produzir a resposta inflamatória. Vários mediadores estão envolvidos neste processo. Dentro de uma hora após a injeção de carragenina, associado à liberação de histamina, serotonina e bradicinina, dá-se a fase inicial. A segunda fase, ocorre após 1 hora, é atribuída à superprodução de prostaglandina nos tecidos culminando no aumento da permeabilidade vascular. Esta também está associada à liberação de bradicininas, protease, enzimas lisossômicas e migração celular (Necas and Bartosikova, 2013; Singh and Kumar, 2014). O desenvolvimento de hiperalgesia secundária, seguida de alterações centrais, são causadas principalmente pela sensibilização dos nociceptores periféricos após injeção de carragenina. A sensibilização central que ocorre causa o desenvolvimento e manutenção da hiperalgesia (Marius *et al.*, 2018).

A carragenina estimula a formação de NO mediada por células polimorfonucleares e causa a liberação de muitas substâncias, como a bradicinina e a substância P (Déciga-Campos and López-Muñoz, 2004). Portanto, a administração de carragenina imita a inflamação concomitantemente com o aumento da formação de NO, o que contribuiria para lesão

tecidual, edema e hiperalgesia induzida por inflamação (Alves *et al.*, 2013; Necas e Bartosikova, 2013).

#### 1.4.3 Formalina

Quando injetada na superfície dorsal da pata traseira de roedores, uma solução de formalina 0,5 a 15% evoca comportamentos de dor quantificáveis, que incluem: peso reduzido na pata estimulada, elevação da pata, lambedura, mordiscada, tremor ou mordida (Saddia and Abbott, 2000).

Uma característica importante do teste da formalina em roedores é que os animais apresentam duas fases do comportamento nociceptivo que parecem envolver dois mecanismos distintos. A primeira fase inicia-se imediatamente após a injeção da formalina e dura entre 3 a 5 min. Ela ocorre devido à estimulação química direta de nociceptores. Dados experimentais indicam que a formalina age, predominantemente, nas fibras C, e não nas A $\delta$ . Subsequentemente, há um período de 10 a 15 min quando os animais exibem poucos comportamentos relacionados a dor. A segunda fase começa, aproximadamente, entre 15 a 20 minutos após a injeção de formalina e dura de 2 a 20 minutos (Tjolsen *et al.*, 1992).

Com relação aos mecanismos responsáveis pelas fases do teste da formalina, tem sido sugerido que a primeira fase é decorrente da estimulação direta de nociceptores e que a segunda fase poderia ser causada por impulsos aferentes, provocados por inflamação local (Hunskaar and Hole, 1987). Tem sido proposto que a atividade neural gerada em resposta a formalina durante a primeira fase é capaz de gerar modificações no sistema nervoso central, que por conseguinte influencia o processamento do estímulo nociceptivo durante a fase tardia (Coderre and Melzack, 1992).

Os AINEs, como a indometacina, reduzem o comportamento nociceptivo durante a segunda fase, enquanto a primeira fase parece inalterada (Saddia e Abbott, 2000). Esta falta de efeito na fase inicial persistiu mesmo quando uma concentração muito baixa de formalina foi usada, sugerindo que as duas fases são qualitativamente diferentes. Resultados experimentais indicaram que a substância P e a bradicinina participam na fase inicial, enquanto a 5-HT, as PG e a bradicinina estão envolvidas na fase tardia (Wheeler-Aceto *et al.*, 1990). Tem sido proposto que os aminoácidos excitatórios (Fisher and Coderre, 1996), assim como a substância P (Zhang *et al.*, 1994), contribuiriam para o desenvolvimento do processo de sensibilização central e nocicepção persistente em resposta à injeção subcutânea de formalina na pata (Fisher e Coderre, 1996).

#### 1.4.4 Adjuvante Completo de Freund

Os adjuvantes são substâncias distintas dos antígenos, capazes de potencializar a ativação de linfócitos T e promover o acúmulo de células apresentadoras de antígeno em um local onde houver exposição a um antígeno, podendo prolongar a resposta imunológica (Mota *et al.*, 2006).

Constituído por emulsões de água em óleo mineral com adição de micobactérias mortas pelo calor, o adjuvante completo de Freund (CFA), foi descoberto em 1937. Ele é um dos mais potentes adjuvantes, usado extensivamente em procedimentos experimentais com animais de laboratório, sendo um componente insubstituível de inúmeros protocolos de indução de doença autoimune como encefalomielite (EAE), neurite (EAN), uveíte (EAU), tireoidite (EAT) e orquite (Billiau and Matthys, 2001; Mota *et al.*, 2006).

O óleo utilizado na formulação do CFA tem uma importância para a atividade biológica observada. Sua participação é descrita nos mecanismos de ação a seguir: (1) estabelece um depósito de antígenos com liberação lenta; (2) fornece um veículo para o transporte de antígenos por todo o sistema linfático para células efetoras imunológicas; (3) interage com células apresentadoras de antígenos, incluindo fagócitos, macrófagos e células dendríticas (Billiau and Matthys, 2001; Stills, 2005).

Após a administração subcutânea de CFA, uma reação inflamatória forte e duradoura aparece no local da injeção e nos linfonodos de drenagem. Em alguns casos, esta inflamação pode ser excessivamente dolorosa para o animal, dependendo da evolução, do tempo e local da injeção. Muitas vezes as lesões podem evoluir para úlceras (Fehrenbacher *et al.*, 2012).

A indução precoce de citocinas é provavelmente desencadeada, em grande parte, pelo adjuvante. Sabe-se que os componentes micobacterianos são capazes de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias (Billiau e Matthys, 2001). Associada a produção de citocinas, a hiperalgesia mecânica está relacionada com a ativação e aumento da expressão do canal receptor de potencial transitório vaniloíde - TRPV1 em neurônios do DRG observado após a administração de CFA em ratos (Yu *et al.*, 2008).

#### 1.5 *HYPERICUM PERFORATUM*

*Hypericum perforatum* (*H. perforatum*), comumente conhecido como Erva de São João, é uma pequena planta daninha que pode ser encontrada na Europa, Ásia e América (Wise *et al.*, 2018). HP é um membro da Família Guttiferae com cerca de 400 espécies

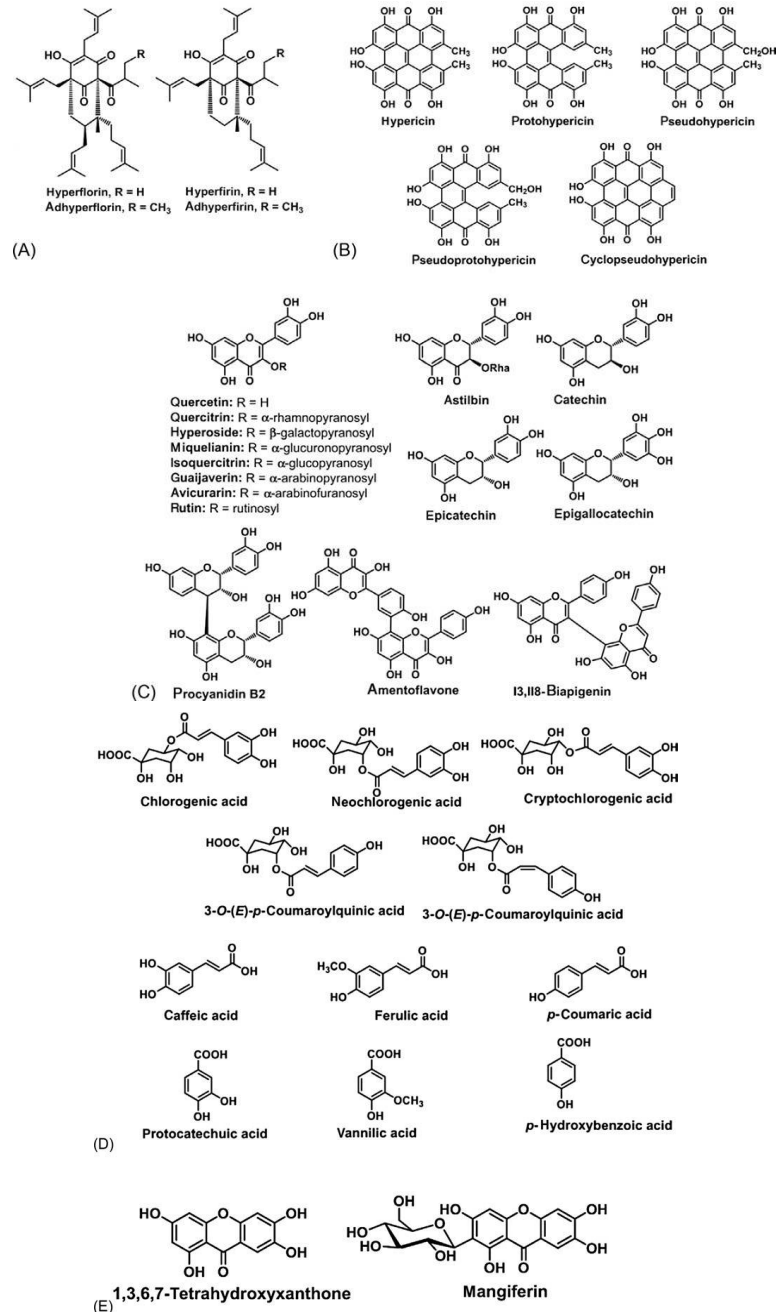
conhecidas de *Hypericum* na Europa e é uma das mais antigas plantas medicinais com uma história de mais de 2000 anos. Ela cresce em locais ensolarados, com solo calcário bem drenado e atinge uma altura de 50 a 100 cm (Raak *et al.*, 2018). O nome “*Hipericum*” foi dado pelos gregos às plantas colocada sobre figuras religiosas a fim de afastar espíritos malignos (“*Hyper*” que significa acima e “*erikum*” que indica imagem (Ernst, 2003). No entanto, há relatos que indicam seu uso pelos gregos antigos para tratar distúrbios mentais que eles acreditavam envolver possessão demoníaca (Belwal *et al.*, 2019). Apresenta flores em forma de estrela amarelas, muitas vezes agrupadas em trio, tem cinco pétalas e as folhas contêm pequenas glândulas de óleo transparentes que se assemelham a perfurações (Raak *et al.*, 2018).



**Figura 7: *Hypericum perforatum*** (Alves *et al.*, 2014.).

As flores de *Hp* (Figura 7) são usadas para produzir óleos que podem ser utilizados para o tratamento de inflamações tópicas (Sosa *et al.*, 2007). Diversos estudos demonstram a existência de atividade anti-inflamatória em extratos de várias espécies de *Hypericum* administradas em modelos animais diversos. Evidências disso foram demonstradas por Menegazzi e colaboradores ao observarem o efeito anti-inflamatório do extrato de *H. perforatum* administrados em camundongos submetidos a injúria pulmonar induzida por carragenina (Menegazzi *et al.*, 2006); diminuição do tempo de inflamação e aumento da síntese de colágeno em modelos de feridas por excisão e incisão em ratos diabéticos e saudáveis (Altıparmak and Eskitascioglu, 2018; Altıparmak *et al.*, 2019); redução da inflamação e estresse oxidativo em camundongos submetidos a lesão hepática induzida por paracetamol (Hohmann *et al.*, 2015); além de efeitos anti-inflamatório observados em linhagem de macrófagos provenientes de camundongo RAW 264,7 (Hammer, 2008), dentre

outros. Estudos demonstram que a pseudo-hipericina apresenta um potencial anti-inflamatório, enquanto a hipericina pode estar associada ao efeito analgésico em camundongos (Huang *et al.*, 2012).



**Figura 8: Compostos bioativos detectados em *Hypericum perforatum* :** (A) derivados de floroglucinol, (B) derivados de naftodiantrona, (C) derivados de flavonóides (D) derivados de fenilpropanóides e outros compostos fenólicos simples e (E) derivados de xantonas (Belwal *et al.*, 2019).

Existem dois mecanismos prováveis de ação anti-inflamatória do *H. perforatum*. Um deles é sua possível capacidade de desregular a expressão de genes pró-inflamatórios, como

ciclo-oxigenase-2, interleucina-6 e óxido nítrico sintase indutível (iNOS), que desempenham papéis importantes na inflamação crônica (Tedeschi *et al.*, 2003). Outro mecanismo possível pode ser a inibição da síntese de prostaglandinas (PG) por compostos como a pseudo-hipericina e hiperforina (Hammer *et al.*, 2007). No entanto, um consenso não foi alcançado nem sobre os mecanismos moleculares nem sobre a rede de alvos moleculares envolvidos na atividade anti-inflamatória (Dellafiora *et al.*, 2018).

O extrato de *H. perforatum* inclui um mix de substâncias fitoquímicas complexas e os componentes farmacologicamente relevantes ainda carecem de um perfil molecular e uma caracterização adequadas (Figura 8) (Alves *et al.*, 2014.).

Diversos metabólitos biologicamente ativos podem ser isolados do extrato de *H. perforatum*, incluindo antraquinonas/naftodiantronas (principalmente hipericina e pseudo-hipericina), derivados de floroglucinol (hiperforina e ad-hiperforina), flavonoides (como rutina, quercetina, quercitrina, isoquercitrina, luteolina miricetina e canferol), biflavonas (I3,II8-biapigenina e amentoflavona), xantonas e óleos voláteis. Além de alguns aminoácidos, vitamina C, cumarinas, taninos e carotenoides (Radun, 2017). Essa composição tão heterogênea possibilita um amplo espectro de bioatividades atribuído ao extrato.

Além do conhecido efeito antidepressivo do extrato de *H. perforatum*, seus componentes têm forte atividade antioxidante *in vitro* (Hammer, 2008) e *in vivo* (Belwal *et al.*, 2019). O HPE contém flavonóides que possuem a atividade de sequestro de radicais livres bem estabelecida, como rutina, quercetina e quercitrina. A atividade antioxidante foi demonstrada em modelo de roedor, a inflamação induzida por injúria do nervo ciático, no qual danos apoptóticos e oxidativos ao músculo, sangue e cérebro foram reduzidos pela administração do extrato de *H. perforatum* (Uslusoy *et al.*, 2019). Singh e colaboradores (2002) demonstraram, em um modelo de camundongo de síndrome de fadiga crônica devido à natação forçada, que o HPE reduziu a peroxidação lipídica e restaurou os níveis diminuídos de GSH (Singh *et al.*, 2002). Além disso, o HPE atua como um agente protetor em neurônios para o estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio *in vitro* (Lu *et al.*, 2004).

A administração de extrato de *H. perforatum* pode amenizar sintomas resultantes da patologia do disco vertebral bem como da dor associada causada por nervo comprimido e irritado (Raak *et al.*, 2018). O efeito analgésico do HPE também pôde ser observado em vários estudos, entre outros, na dor neuropática (Galeotti and Ghelardini, 2013; Uslusoy *et al.*, 2019), após a reconstrução dos ligamentos do joelho (Belwal *et al.*, 2019) ou após a extração dentária (Raak *et al.*, 2018).

Devido à atividade antimicrobiana atribuída à erva de São João, esta é considerada um remédio tradicional bem conhecido contra feridas infectadas e lesões de pele. Avato e colaboradores (2004) demonstraram a atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas (Avato *et al.*, 2004). Por outro lado, na medicina tradicional, extrato de *H. perforatum* é usado no tratamento de gastrite, úlceras, várias doenças de pele, como: lesões dérmicas, queimaduras e tratamentos de escaras, e depressões de tipo moderado (Altıparmak *et al.*, 2019).

O extrato de *H. perforatum* possui propriedades anti-inflamatórias em uma variedade de sistemas *in vivo*. As enzimas COX metabolizam o ácido araquidônico em eicosanóides. Os produtos do metabolismo da COX-2 do ácido araquidônico são os prostanóides, dos quais a prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) é importante na mediação da dor, inflamação e edema (Pinho-Ribeiro *et al.*, 2017). Raso e colaboradores demonstraram que 100 mg/kg por gavagem de extrato seco de raiz de *Hp*, duas vezes por dia, inibiu os níveis de proteína COX-2 e reduziu o edema de pata induzido por carragenina em camundongos (Raso *et al.*, 2002). Camundongos alimentados com 50-300 mg/kg de *Hp* por gavagem mostraram uma redução do edema de pata induzido por carragenina de forma dose dependente (Abdel-Salam, 2005). Além disso, o extrato de *Hp* foi capaz de reduzir a infiltração inflamatória e leucocitária estimulada pela carragenina e prostaglandina E1 em ratos Wistar (Hammer *et al.*, 2007).

O extrato de *H. perforatum* (300 mg/kg, i.p.) inibe a letalidade e a hepatotoxicidade induzidas pelo paracetamol. Os mecanismos envolvidos no efeito de HPE incluem a inibição da produção de citocinas, recrutamento de neutrófilos e depleção de GSH e capacidade antioxidante no fígado induzida por paracetamol (Hohmann *et al.*, 2015).

Apesar dos estudos elucidarem as propriedades antioxidantes, analgésicas e anti-inflamatórias, a compreensão dos mecanismos subjacentes de ação ainda é incompleta e mais investigações são necessárias para um projeto mais racional e/ou uso de intervenções farmacológicas à base de *Hp* (Dellafiora *et al.*, 2018).

O estudo e consequente utilização de compostos fitoterápicos no tratamento de diversas doenças é relevante uma vez que problemas como tolerância e toxicidade podem estar presentes ao fazer uso dos medicamentos utilizados pela medicina tradicional. A maioria dos estudos clínicos mostra que o *HP* é relativamente seguro, especialmente em dosagens terapêuticas. No entanto, altas dosagens podem levar à fototoxicidade em indivíduos suscetíveis. Essa fototoxicidade está relacionada a hipericina, que exposta a luz é capaz de induzir a produção de EROs, porém para que este efeito ocorra a dose precisa ser 30x maiores que a recomendada. Além disso, o HPE interage com diversas enzimas relacionadas com a

metabolização e excreção de drogas. Portanto, a toxicidade do HPE geralmente está relacionada com o uso concomitante de outros medicamentos especialmente drogas que afetam a função das enzimas hepáticas e intestinais (Turolla and Nascimento, 2006; Klemow *et al.*, 2011).

Teixeira e colaboradores (2009) a partir da administração oral do extrato de *Hypericum perforatum* nas doses de 300 a 1000mg, observaram que o tratamento não resultou em alteração nos parâmetros de toxicidade hepática (AST e ALT) nos parâmetros de lesão renal (ureia e creatinina) bem como não induziu alterações histopatológicas em ratos após o tratamento por 30 dias (Teixeira *et al.*, 2009).

Estes e os demais estudos apresentados sugerem que a utilização do extrato de *H. perforatum* pode resultar em efeitos benéficos no tratamento de diversas patológicas com efeitos colaterais como toxicidade reduzidos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a atividade analgésica do extrato de *Hypericum*, extraído de *Hypericum perforatum* (L.), em diferentes modelos de dor inflamatória, bem como elucidar seu(s) mecanismo(s) de ação.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.2.1 Avaliar o efeito analgésico de HPE em diferentes modelos de inflamação e dose-dependência;
- 2.2.2 Avaliar o efeito analgésico do pré-tratamento com HPE em modelos experimentais através de diferentes estímulos nociceptivos (ácido acético, PBQ, carragenina, formalina, CFA);
- 2.2.3 Investigar se HPE inibe a hiperalgesia mecânica induzida em modelos de dor inflamatória aguda (carragenina) e prolongada (CFA);
- 2.2.4 Aferir se o possível efeito analgésico de HPE estaria relacionado à inibição da produção da citocina pró-hiperalgésica IL-1 $\beta$ ;
- 2.2.5 Verificar a participação da via NO/GMPc/PKG/K<sup>+</sup>ATPase no efeito analgésico de HPE.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS.

Foram utilizados neste estudo camundongos Swiss machos (25–30 g, n=6), obtidos do biotério central da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil. Os animais foram alojados em gaiolas de acrílico transparente com acesso livre a alimento e água, com um ciclo claro/escuro de 12/12 h, a 21°C. Todos os testes comportamentais foram realizados entre as 9 horas e 17 horas em uma sala com temperatura controlada. Os procedimentos de cuidados e manuseio dos animais estavam de acordo com as diretrizes da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) e aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Londrina (processo número 510/2012). Todos os esforços foram feitos para minimizar o número de animais usados e seu sofrimento.

#### 3.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS GERAIS

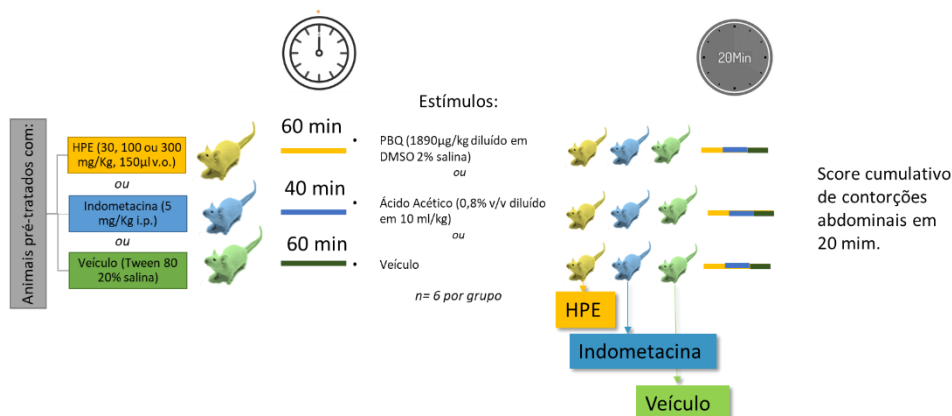
Os animais receberam tratamento oral (30, 100 e 300 mg/kg) com HPE ou indometacina, um inibidor de COX não-seletivo (5 mg/kg, intraperitoneal [i.p.]) ou veículo (Tween 80, 5% em salina) 60 min antes do estímulo inflamatório, como indicado. As doses de estímulos inflamatórios foram determinadas em estudos anteriores em nosso laboratório (Staurengo-Ferrari *et al.*, 2013; Staurengo-Ferrari *et al.*, 2014; Pinho-Ribeiro *et al.*, 2016). A avaliação das contorções abdominais foi realizada durante 20 minutos após administração i.p. de ácido acético (0,8%) ou fenil-*p*-benzoquinona (1,890 µg/kg). O tremor da pata e o tempo de lambida são respostas nociceptivas e foram quantificadas durante 30 minutos após a injeção intraplantar (i.pl.) de formalina 1,5% (25 µl/pata) ou CFA (10 µl/pata). A hiperalgesia mecânica foi avaliada em 1 e 5 horas após a administração da carragenina (300 µg/pata) ou 1 a 7 dias após o estímulo induzido por CFA (10 µl/pata). A produção de IL-1β foi avaliada 3 horas após a injeção de carragenina (300 µg/pata) ou estímulo com CFA. Além disso, para abordar o envolvimento da via do NO–GMPc–PKG/canais de K<sup>+</sup> sensíveis ao ATP, foram utilizados os inibidores farmacológicos L-NAME (inibidor inespecífico da NOS), ODQ (inibidores seletivo da guanilato ciclase), KT5823 (inibidor da proteína cinase dependente de cGMP) e glibenclamida (inibidor seletivo dos canais de K<sup>+</sup> sensível a ATP). As análises foram realizadas às cegas por experimentadores treinados.

### 3.3 DROGAS UTILIZADAS

Os compostos utilizados neste estudo foram: salina (NaCl 0,9 %; Fresenius Kabi Brasil Ltda. Aquiraz, CE, Brasil), dimetilsulfóxido (DMSO), adjuvante completo de Freund (CFA), glibenclamida e fenil-*p*-benzoquinona (PBQ; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), carragenina (Cg; Santa Cruz Biotecnologia, Santa Cruz, CA, EUA), ácido acético (Mallinckrodt Baker, SA, Cidade do México, México), formalina (Merck, Darmstadt, Alemanha), KT5823 (Calbiochem, San Diego, CA, EUA), 1H-(1,2,4)-oxadiazolol-(4,3-a)-quinoxalin-1-um (ODQ) de Tocris Cookson (Baldwin, MO, EUA), L-NAME (Research Biochemicals, Natick, MA, EUA), indometacina da Prodome (Campinas, SP, Brasil) e *Hypericum perforatum* (Iperisan® de Marjan Farma, Santo Amaro, BR). A caracterização do extrato utilizado no presente estudo demonstrou a presença dos compostos bioativos quercetina, rutina, hipericina, pseudo-hipericina e hiperforina e foi descrita em maiores detalhes em trabalho prévio de nosso laboratório (Hohmann *et al.*, 2015).

### 3.4 TESTES DE COMPORTAMENTOS DE DOR EXPLÍCITA: TESTES DE CONTORÇÃO ABDOMINAL.

Os modelos de contorções induzidas por fenil-*p*-benzoquinona (PBQ) e por ácido acético foram realizados como descrito (Collier *et al.*, 1968; Verri *et al.*, 2008; Pavao-De-Souza *et al.*, 2012). Brevemente, a resposta nociceptiva foi induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético (0,8% v/v, diluída em solução salina, 10 ml/kg), PBQ (diluído em DMSO a 2%/soro fisiológico, 1890 µg/kg) ou veículo, injetado nas cavidades peritoneais de camundongos pré-tratados com HPE (30-300 mg/kg, p.o., 60 minutos). Cada animal foi colocado em um grande cilindro de vidro, e a intensidade do comportamento nociceptivo foi quantificada pela contagem do número total de contorções que ocorrem entre 0 e 20 minutos após a injeção do estímulo (Figura 9).

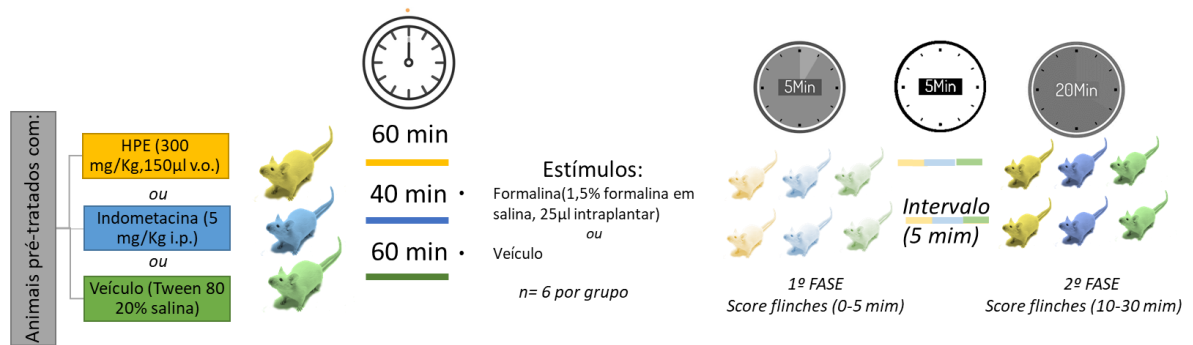


**Figura 9: Esquemático experimental teste de contorção abdominal induzidas por PBQ e ácido acético.** Em amarelo, animais tratados com HPE (30,100 ou 300 mg/kg – 150µl v.o.); em azul, animais tratados com Indometacina (5mg/kg i.p) e em verde, animais aos quais foram administrado o veículo (Tween 80 20% salina). Todos os animais tratados foram divididos em 3 grupos (n=6) aos quais foram administrados os estímulos PBQ, ácido acético ou veículo. O score de contorções abdominais foi avaliado durante 20 minutos após a injeção do estímulo.

### 3.5 TESTES DA FORMALINA

Este é um modelo mais específico do que o teste das contorções abdominais, e permite avaliar dois tipos distintos de dor: a dor de origem neurogênica (estimulação direta dos neurônios nociceptivos) e a de origem inflamatória, relacionada com a liberação de mediadores químicos da inflamação (Hunnskaar and Hole, 1987).

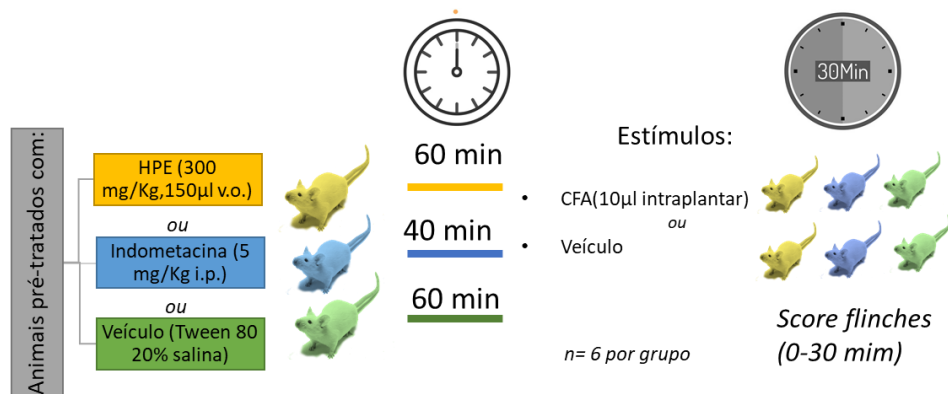
O teste da formalina foi executado conforme descrito anteriormente (Dubuisson and Dennis, 1977). Os animais foram pré-tratados com HPE nas concentrações 300 mg/kg v.o. e, 60 minutos após, receberam 25µL de formalina a 1,5% ou salina na região subplantar das patas posteriores. Após a injeção de formalina, os animais foram colocados, individualmente, sob um funil de vidro o qual foi circundado por espelhos para facilitar a observação do comportamento. O tempo em que o animal permaneceu mordendo ou lambendo a pata injetada com formalina foi cronometrado, sendo este tempo considerado como indicativo de dor. Foi cronometrado inicialmente os primeiros 5 minutos após a injeção de formalina (período correspondente a dor neurogênica), aguardados 5 minutos, reiniciou-se a contagem por 15 minutos consecutivos do tempo de lambidas, que corresponde a dor inflamatória (Figura 10). Os resultados foram obtidos para as primeiras fases (0-5 min) e segunda (10-30 min).



**Figura 10: Esquemático experimental teste da formalina.** Em amarelo, animais tratados com HPE (300 mg/kg – 150µl v.o.); em azul, animais tratados com Indometacina (5mg/kg i.p) e em verde, animais aos quais foram administrado o veículo (Tween 80 20% salina). Todos os animais tratados foram divididos em 3 grupos (n=6) aos quais foram administradas formalina ou veículo. Os scores de flinches foram avaliados durante a fase neurogênica e a fase neuropática.

### 3.6 TESTE DE CFA

A fim de se avaliar o comportamento da dor manifesta induzida por CFA, o número de *flinches* e tempo gasto a lamber a pata estimulada foram imediatamente determinados entre 0 e 30 minutos após a injeção intraplantar de 10 µl de CFA ou veículo. Os resultados foram expressos como o número total de *flinches* e lambidas observados em 30 minutos (Staurengo-Ferrari *et al.*, 2013) (Figura 11).

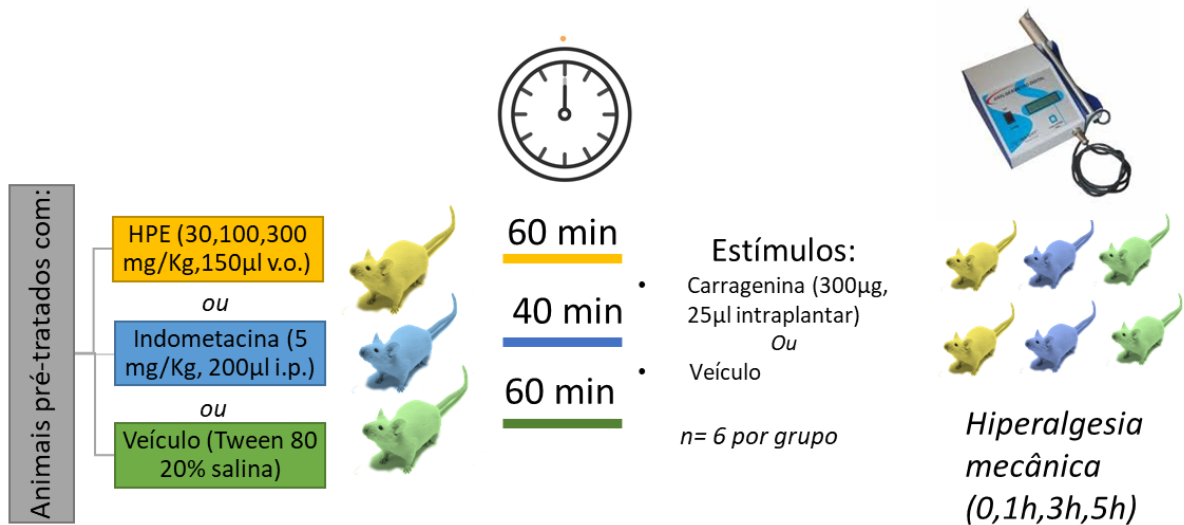


**Figura 11: Esquemático experimental utilizando CFA-** Em amarelo, animais tratados com HPE (300 mg/kg – 150µl v.o.); em azul, animais tratados com Indometacina (5mg/kg i.p) e em verde, correspondente ao tratamento com o veículo (Tween 80 20% salina). Todos os animais tratados foram divididos em 3 grupos (n=6) aos quais foram administrados o estímulo CFA veículo. O score de flinches foi contabilizado durante 30 min após a administração do estímulo.

### 3.7 HIPERALGESIA MECÂNICA - VON FREY ELETRÔNICO

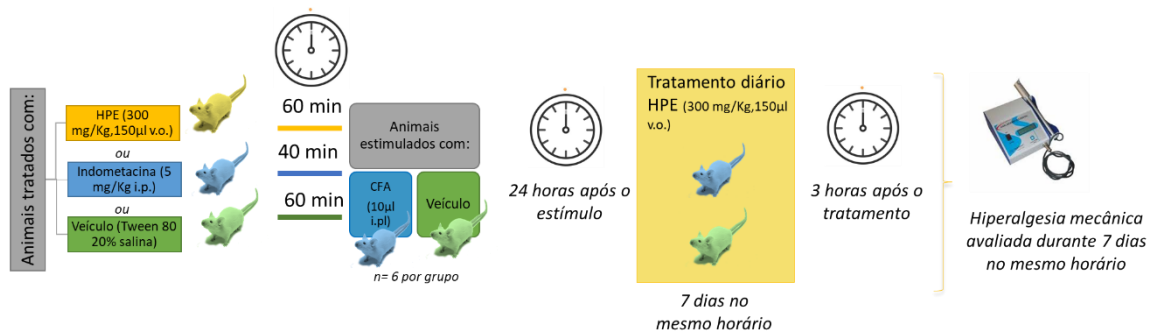
A hiperalgesia mecânica foi avaliada em camundongos, conforme relatado anteriormente (Vivancos *et al.*, 2004). Resumidamente, em sala silenciosa, os animais foram colocados em gaiolas acrílicas (12 × 10 × 17 cm), com piso de grade de arame, 15 a 30 minutos antes do início dos testes. O teste consistiu de evocar um reflexo de flexão da pata

traseira com a aplicação de uma determinada força, utilizando para isso um transdutor de pressão (analgésímetro eletrônico; Insight, Ribeirão Preto, SP, Brasil) adaptado com uma ponta de polipropileno 0,5mm<sup>2</sup>. O investigador foi treinado para aplicar a ponta perpendicularmente à área central da pata traseira com um aumento gradual da pressão. O ponto final foi caracterizado pela remoção da pata seguida por movimentos de *flinching* claros. Após a retirada da pata, a intensidade da pressão foi registrada automaticamente. O valor da resposta foi uma média de três medições.



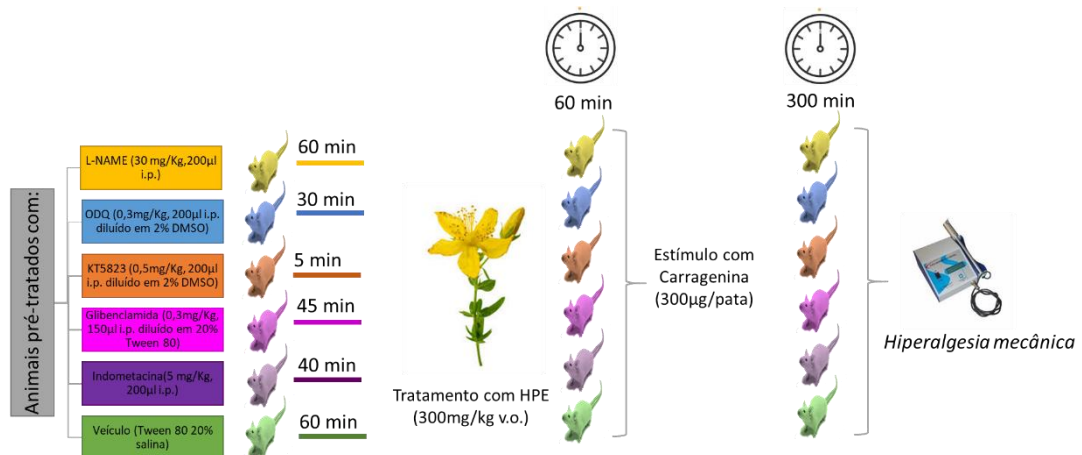
**Figura 12: Esquemático experimental utilizando carragenina para avaliação da hiperalgesia mecânica** - Em amarelo, animais tratados com HPE (30,100 ou 300 mg/kg – 150ul v.o.); em azul, animais tratados com Indometacina (5mg/kg i.p) e em verde, correspondente ao tratamento com o veículo (Tween 80 20% salina). Todos os animais tratados foram divididos em 2 grupos (n=6) aos quais foram administrados a carragenina ou seu veículo. A análise da hiperalgesia mecânica foi observada nos tempos 0,1,3 e 5 horas após o estímulo.

A hiperalgesia mecânica estimulada pela administração de carragenina foi analisada 1, 3 ou 5 horas após a carragenina (300 µg/ pata) (Figura12). Além disso, a hiperalgesia mecânica induzida por CFA foi avaliada diariamente pelo teste von Frey eletrônico após o tratamento com HPE (300 mg/kg) por gavagem, iniciado no primeiro dia após o estímulo e, por 7 dias na mesma hora (Figura 13). Os animais foram submetidos a avaliação da hiperalgesia mecânica antes do pré tratamento e depois dos estímulos nos tempos determinados. Os resultados são expressos pelo delta ( $\Delta$ ) do limiar de retirada (em g) calculado pela subtração das medidas médias do tempo zero das medições médias.



**Figura 13: Esquemático experimental utilizando CFA para avaliação da hiperalgesia mecânica** - Em amarelo, animais tratados com HPE (300 mg/kg – 150µl v.o.); em azul, animais tratados com Indometacina (5mg/kg i.p) e em verde, correspondente ao tratamento com o veículo (Tween 80 20% salina). Após 60 mim foram estimulados com CFA (10µl intraplantar) ou veículo. A avaliação da hiperalgesia mecânica foi realizada no mesmo horário, durante 7 dias, 3 horas após o tratamento diário com HPE.

A fim de avaliar a participação da via do NO/cGMP/PKG/ K<sup>+</sup>ATPase foi realizado pré-tratamento intraperitoneal de animais com L-NAME (30mg/kg i.p), ODQ (0,3 mg/kg i.p), KT5823(0,5,g/kg i.p) ou glibenclamida (0,3 mg/kg i.p) 60, 30, 5 e 45 minutos, respectivamente, antes do tratamento com HPE. A hiperalgesia mecânica foi avaliada 3

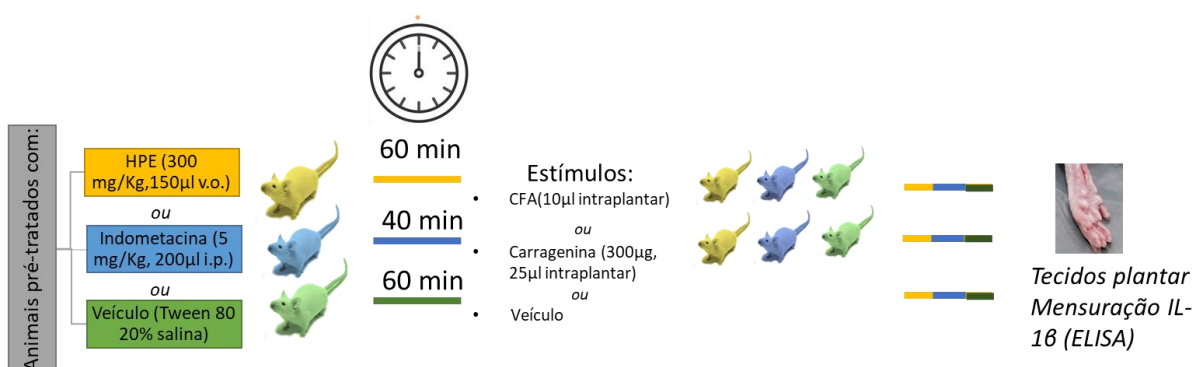


horas após a injeção de estímulo inflamatório (carragenina - 300 µg/pata) (Figura14).

**Figura 14: Efeito da HPE na hiperalgesia mecânica induzida por carragenina; participação da via do NO/cGMP/PKG/K<sup>+</sup>ATPase** - Os animais (n=6) foram estimulados pré tratados com inibidor inespecífico da NOS(L-NAME), inibidores seletivo da guanilato ciclase (ODQ e KT5823) , inibidor seletivo dos canais de K<sup>+</sup> sensível a ATP (glibenclamida) e indometacina. Uma hora após o tratamento com HPE os animais foram estimulados com carragenina. A avaliação da hiperalgesia mecânica foi realizada após 3 horas a partir do estímulo.

### 3.8 DOSAGEM DE CITOCINAS

Os camundongos foram tratados com veículo ou indometacina (5 mg/kg, i.p.) ou HPE (300 µg/kg, via oral [v.o.]) 30 minutos antes do estímulo da carragenina (300 µg/pata). Três horas após a injeção de carragenina ou CFA, os animais foram eutanasiados e os tecidos da pele foram removidos das patas injetada e de controle (veículo e *naive*). As amostras foram homogeneizadas em 500 µl de tampão contendo inibidores de protease, e o nível de IL-1β foi determinado como descrito previamente (Verri *et al.*, 2010) por um ensaio imunoenzimático (ELISA). Os resultados foram expressos como picogramas (pg) de IL-1β/mg de tecido da pata. Como controle, as concentrações desta citocina foram determinadas em animais



injetados com solução salina (Figura 15).

**Figura 15: Esquemático experimental dosagem de citocina IL-1β induzida por carragenina e CFA.** Em amarelo, animais tratados com HPE (300 mg/kg – 150µl v.o.); em azul, animais tratados com Indometacina (5mg/kg i.p) e em verde, animais aos quais foram administrado o veículo (Tween 80 20% salina). Todos os animais tratados foram divididos em 3 grupos (n=6) aos quais foram administrados os estímulos CFA, carragenina ou veículo. Amostras do tecido plantar foram coletadas 3 horas após estímulo e níveis de IL-1β foram avaliados por ELISA.

### 3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como médias ± SEM de medições realizadas em seis animais em cada grupo experimental e são representativos de dois experimentos separados. Análise de variância de duas vias (ANOVA) foi usada para comparar os grupos e doses em todos os momentos (curvas) quando as respostas hiperalgésicas foram medidas em diferentes momentos após a administração ou aplicação dos estímulos. Os fatores analisados foram tratamento, tempo e interação tempo versus tratamento. Quando houve diferença em um dos pontos, ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey foi realizada. Por outro lado, quando as respostas hiperalgésicas foram mensuradas uma vez após a administração ou imposição dos estímulos, as diferenças entre as respostas foram avaliadas por ANOVA unidirecional seguida do teste de Tukey. Além disso, a análise estatística comparativa entre dois grupos foi realizada usando o teste t. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO – ARTIGO CIENTÍFICO

4.1 ARTIGO: *HYPERICUM PERFORATUM* REDUCES INFLAMMATORY PAIN IN MICE: EFFECT ON IL-1B PRODUCTION AND INVOLVEMENT OF NO-CGMP-PKG-KATP CHANNEL SIGNALING PATHWAY.

Rafaela A. V. Lone<sup>1</sup>, Larissa Staurengo-Ferrari<sup>1</sup>, Ana C. Rossaneis<sup>1</sup>, Victor Fattori<sup>1</sup>, Sandra S. Mizokami<sup>1</sup>, Stephanie Badaro-Garcia<sup>1</sup>, Bárbara B. Colombo<sup>1</sup>, Fernanda S. Rasquel-Oliveira, Nilton S. Arakawa<sup>2</sup>, Rubia Casagrande<sup>2</sup>, Waldiceu A. Verri Jr <sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> *Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rod. Celso Garcia Cid KM480 PR445, CEP 86057-970, Cx Postal 10.011, Londrina, Paraná, Brazil.*

<sup>2</sup> *Departamento de Ciências Farmacêuticas - Centro de Ciências de Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil,*

\*Address reprint requests to Waldiceu A. Verri Jr.

Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rod. Celso Garcia Cid KM480 PR445, CEP 86057-970, Londrina, Paraná, Brazil. Tel: +55 43 33714979.

E-mail address: [waldiceujr@yahoo.com.br](mailto:waldiceujr@yahoo.com.br); waverri@uel.br

**ABSTRACT**

*Hypericum perforatum* (HP) is the scientific name of the popular St. John's wort used especially in the treatment of moderate depression. Recently, the effect of HP has been demonstrated in painful conditions. Herein, we tested the analgesic effect of HP in several models of inflammatory pain. Mice received treatment with HP (30-300 mg/kg, po), or control anti-inflammatory drug indomethacin (5 mg/kg, i.p.) or vehicle (20% tween 80 plus saline) prior the inflammatory stimuli injection. For acute spontaneous pain behavior, we used acetic acid- and PBQ-induced visceral pain (abdominal writhings), and formalin, and CFA-induced paw flinching and licking. By using an electronic version of von Frey filaments, we also investigated the effects of HP on mechanical hyperalgesia after carrageenin or CFA intraplantar injection. HP (300 mg/kg, per oral) inhibited acute pain behaviors induced by all tested stimuli, including both phases of formalin test, suggesting a direct nociceptor modulatory effect of HP besides its anti-inflammatory properties. In agreement, HP also reduced the increased sensitivity to mechanical stimulus induced by carrageenin. The daily post treatment with HP over 7 days also reduced CFA-induced mechanical hyperalgesia. Mechanistically, the effects of HP involve the reduction of IL-1 $\beta$  production. HP also activated the analgesic cyclic GMP-PKG-ATP sensitive K<sup>+</sup> channel signaling pathway to inhibit carrageenin-induced mechanical hyperalgesia. These results demonstrate the efficacy of HP as a new analgesic.

**Key words:** *Hypericum perforatum*; inflammatory pain; IL-1 $\beta$ ; NO pathway

## INTRODUCTION

Inflammatory pain is a common clinical symptom of inflammatory diseases characterized by hyperalgesia due to nociceptor activation and sensitization by inflammatory mediators, contributing, respectively, to spontaneous pain and localized pain hypersensitivity [1, 2]. It is well established that the factors (e.g. prostanoids and cytokines) released into the inflammatory site are responsible for the direct sensitization of nociceptors. It is also accepted that the release of directing-acting hyperalgesic mediators such as prostaglandins is preceded by release of a cascade of cytokines such as IL-1 $\beta$  [3-5]. Hence, the control of IL-1 $\beta$  production/release could play an important role in the treatment of inflammatory pain in varied diseases [6-10].

Experimentally, the peripheral pharmacological control of inflammatory pain is relied on two main strategies. The first is the prevention of nociceptor sensitization, which can be achieved with non-steroidal anti-inflammatory drugs (aspirin and aspirin-like drugs) that inhibit prostaglandin synthesis and consequently, prevents nociceptor sensitization [11]. The second strategy is exemplified by some analgesic drugs, like opioids, NO donors, HNO donors and dipyrrone, which are able to directly blockade of the current nociceptor sensitization [12-14]. Several studies support the hypothesis that their antinociceptive activities are due to activation of L-arginine/NO/guanosine 3,5-cyclicmonophosphate (cGMP)/protein -kinase G (PKG)/ATP-sensitive potassium channel pathway [12,15,18]. Notwithstanding, the control of inflammatory pain is still a challenge because the available drugs exert a wide range of side effects or even addition [16-17], therefore, the search for novel analgesic compounds to serve as therapeutic alternative is important.

Natural compounds greatly provide new alternatives to improve the treatment of painful conditions due to their powerful activity in modulating neuronal activity. Notably, a considerable number of natural compounds are commercially available, and they are attractive

sources for developing analgesic agents, such as *Hypericum perforatum* (HP). HP is the scientific name of the popular St. John's wort (SJW), an herbaceous plant with yellow flowers, used especially in the treatment of moderate depression [26]. However, the properties of this plant are not restricted to their antidepressant activity, since numerous other effects have been described in the literature. HP can produce anxiolytic [20,21], antiviral [22] and antibacterial [23, 24] activities and when topically applied, improves wound healing [25]. Furthermore, in a model of carrageenin-induced lung inflammation in mice, the treatment with HP extract attenuates the lung neutrophils infiltration, the expression of TNF- $\alpha$  and ICAM-1, and NF- $\kappa$ B and STAT3 activation [26]. In agreement, in vitro experiments with human leukemia cell shows that the HP oil macerated inhibits NF- $\kappa$ B activity [27]. The effect of HP against acute thermal and chemical pain and the capability to relieve neuropathic pain in different animal models were described [28]. This analgesic activity appeared after oral administration of HP and it was related to the presence of hypericin, an active constituent of HP endowed with PCK blocking properties and antioxidants effects [29].

Despite its well-known anti-inflammatory activity, the benefits of using HP to reduce inflammatory pain remain to be understood. In this study, we investigated the effects of HP treatment in different models of inflammatory pain and addressed its relationship with the production of inflammatory hyperalgesic mediator, IL-1 $\beta$ . Our results suggest that HPE is a promising safe compound in the treatment of inflammatory pain and provide evidence that its mechanism of action include inhibition of IL-1 $\beta$  production and activation of NO/cGMP/PKG/ATP-sensitive potassium channels signaling pathway.

## **2. Material and Methods:**

**2.1 General Experimental Procedures.** Mice received oral (30, 100, and 300 mg/kg) treatment with HP or a control drug indomethacin, a non-selective COX inhibitor (5 mg/kg,

i.p.) or vehicle (Tween 80 20% plus saline) 60 min before inflammatory stimulus as indicated. The doses of inflammatory stimuli were determined in previous studies in our laboratory [14, 18, 30]. The writhing response was evaluated for 20 min after intraperitoneal (ip) injection of acetic acid (0.8%) or phenyl-p-benzoquinone (1890 µg/ kg). The paw flinching and licking nociceptive responses were quantified for 30 min after formalin 1.5% (25 µl/paw) or CFA (10 µl/paw) intraplantar (ipl) injection. Mechanical hyperalgesia was evaluated 1–5 h after carrageenin (300 µg/paw) or 1-7 days after CFA (10 µl/ paw) stimulus. All inflammatory stimuli induced mechanical and thermal hyperalgesia only in the paw in which the stimulus was injected. IL-1 $\beta$  production was evaluated 3 h after carrageenin (300 µg/paw) or CFA injection. Furthermore, to address the involvement of NOS/GMPc/PGK/ATP-sensitive K<sup>+</sup>-channel pathway, the specific pharmacological inhibitors L-NAME, ODQ, KT5823 and ATP-sensitive K<sup>+</sup>-channel pathway were used. Experiments were blinded.

**2.2 Drugs.** The compounds used in this study were saline (NaCl 0.9%; Fresenius Kabi Brasil Ltd.a. Aquiraz, CE, Brazil), dimethyl sulfoxide (DMSO), complete Freund's adjuvant, glibenclamide and phenyl-p-benzoquinone (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), carrageenin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), acetic acid (Mallinckrodt Baker, S.A., Mexico City, Mexico), phenyl-p-benzoquinone (Sigma, St. Louis, MO), formalin (Merck, Darmstadt, Germany), KT5823 (Calbiochem, San Diego, CA, USA), 1H-(1,2,4)-oxadiazolol-(4,3-a)- quinoxalin-1-one (ODQ) from Tocris Cookson (Baldwin, MO, USA), L-NAME (Research Biochemicals, Natick, MA, USA), *Hypericum perforatum* (Iperisan® from Marjan Farma, Santo Amaro, BR) and indomethacin from Prodome (Campinas, SP, Brazil).

**2.3 Characterization of *Hypericum perforatum* (HP).** As we previously demonstrated [58], the extract used in the present study is a standardized commercial extract (Iperisan®, Marjan

Farm, Santo Amaro-SP, Brazil), which we analyzed by High Performance Liquid Chromatography (Shimadzu) equipped with a photodiode Array detector (SPD-M10Avp), multisolvent delivery system (LC-10Avp), oven control system (CTO-10ASvp) and controlled software Class VP 6.14 software. In the analyzed ethanol extract it was possible to identify reference compounds rutin, quercetin, hypericin, pseudo-hypericin and hyperforin.

**2.4 Animals.** Male Swiss mice (25–30 g), from the Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil, were used in this study. Mice were housed in standard clear plastic cages with free access to food and water, with a light/dark cycle of 12:12 h, at 21 °C. All behavioral testing was performed between 9 A.M. and 5 P.M. in a temperature-controlled room. Animal care and handling procedures were in accordance with the International Association for Study of Pain (IASP) guidelines and approved by the Ethics Committee of the Universidade Estadual de Londrina (process number 510/2012). All the efforts have been made to minimize the number of animals used and their suffering.

**2.5 Overt pain-line behaviors tests: Writhing Response Tests.** The phenyl-p-benzoquinone (PBQ) and acetic acid-induced writhing models were performed as previously described [31-33]. In brief, PBQ (diluted in DMSO 2%/saline, 1890 µg/ kg), acetic acid (0.8% v/v, diluted in saline, 10 ml/ kg), or vehicle was injected into the peritoneal cavities of mice pre-treated with HP (30-300 mg/ kg, po, 60 min). Each animal was placed in a large glass cylinder, and the intensity of nociceptive behaviour was quantified by counting the total number of writhes occurring between 0 and 20 min after stimulus injection. The writhing response consisted of a contraction of the abdominal muscle together with a stretching of hind limbs. The intensity of the writhing response was expressed as the cumulative writhing score over 20 min. Different

individuals administered each test, prepared solutions to be injected, and performed the injections.

**2.6 Formalin Test.** The number of paw flinches and time spent licking the paw were determined between 0 and 30 min after intraplantar injection of 25  $\mu$ l of formalin 0.1% or vehicle, as previously described [34]. The period was divided in intervals of 5 min and clearly demonstrated the presence of the first and second phases, which are characteristic of the method [34]. The results were obtained for both the first (0-5 min) and second (10-30 min) phases.

**2.7 Complete Freund's adjuvant Test.** To evaluate the CFA-induced overt pain-like behaviour, the number of paw flinches and time spent licking of the stimulated paw were immediately determined between 0 and 30 min after intraplantar injection of 10  $\mu$ l of CFA or vehicle. Results were expressed as the total number of flinches and licks performed in 30 min [14]. In addition, the CFA-induced mechanical hyperalgesia was daily evaluated by electronic pressure meter test after the treatment with HP, starting in the first day after stimulus and then for 7 days in the same hour.

**2.8 Electronic Pressure-Meter Test.** Mechanical hyperalgesia was tested in mice, as previously reported [35]. Briefly, in a quiet room, the animals were placed in acrylic cages (12  $\times$  10  $\times$  17 cm) with wire grid floors, 15 - 30 min before the start of testing. The test consisted of evoking a hindpaw flexion reflex with a hand-held force transducer (electronic analgesimeter; Insight, Ribeirão Preto, SP, Brazil) adapted with a 0.5 mm<sup>2</sup> polypropylene tip. The investigator was trained to apply the tip perpendicularly to the central area of the hindpaw with a gradual increase in pressure. The end point was characterized by the removal of the

paw followed by clear flinching movements. After the paw withdrawal, the intensity of the pressure was recorded automatically. The value for the response was an average of three measurements. The animals were tested before and after treatment. The results are expressed by delta ( $\Delta$ ) withdrawal threshold (in g) calculated by subtracting the zero-time mean measurements from the mean measurements 1, 3, or 5 h after carrageenin (300  $\mu$ g/ paw) or daily for seven days after CFA and HP treatment (10  $\mu$ l/ paw). Another protocol involved the intraperitoneal pre-treatment of animals with L-NAME, ODQ, KT5823 or glibenclamide 60, 30, 5 and 45 minutes respectively, before treatment with HP. The mechanical hyperalgesia was assessed 3 hours after the injection of the inflammatory stimulus (carrageenin - 300  $\mu$ g/ paw).

**2.9 Cytokine Measurement.** Mice were treated with vehicle or indomethacin (5 mg/kg, i.p.) or HP (30-300 mg/kg, p.o.) 60 min before carrageenin (300  $\mu$ g/paw) stimulus. Three hours after the injection of carrageenin or CFA, mice were terminally anesthetized, and the skin tissues were removed from the injected and control paws (vehicle and naive). The samples were homogenized in 500  $\mu$ l of buffer containing protease inhibitors, and IL-1 $\beta$  level was determined as described previously [36] by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results are expressed as picograms (pg.) of IL-1 $\beta$ /mg of paw tissue. As a control, the concentrations of this cytokine were determined in animals injected with saline.

**2.10 Statistical Analysis.** Results are presented as means  $\pm$  SEM of measurements made on six mice in each group per experiment and are representative of two separate experiments. Two-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare the groups and doses at all times (curves) when the hyperalgesic responses were measured at different times after the administration or enforcement of the stimuli. The factors analyzed were treatment, time, and

time versus treatment interaction. When there was a significant time versus treatment interaction, one-way ANOVA followed by Tukey's test was performed on each occasion. On the other hand, when the hyperalgesic responses were measured once after the administration or enforcement of the stimuli, the differences between responses were evaluated by one-way ANOVA followed by Tukey's test. Statistical differences were considered to be significant at  $p < 0.05$ .

### 3. Results

**3.1 *Hypericum perforatum* (HP) reduces phenyl-p-benzoquinone (PBQ) and acetic acid-induced writhing response.** In the first section of the study, mice were treated with HP (30-300 mg/kg, p.o.) or vehicle 60 minutes before PBQ (1890 µg/kg, Fig 1A) or acetic acid (0.8%, Fig 1B) intraperitoneal injection and the writhing scores were recorded for 20 minutes. Indomethacin (5 mg/kg, i.p.), was used as an anti-inflammatory control. The increase of writhing score induced by PBQ injection was significantly inhibited by all doses of HP. No significant difference between doses was noted. On the other hand, in animals stimulated with acetic acid, the increase of writhing response was significantly inhibited only by 300 mg/kg of HP, but not by the lower doses. Thus, the 300 mg/kg dose was utilized in the next set of experiments of overt pain-like behaviour. As a positive control, indomethacin was able to decrease writing response in both models (Figure 1A and B).

**3.2 HP reduces formalin and CFA-induced overt-pain like behaviour.** Mice were treated with HP (300 mg/kg, p.o.) 60 minutes before i.pl. formalin (1.5% in saline, Fig 3A-B), CFA (10 µl, Fig 3C-D), indomethacin (5 mg/kg, i.p.) or saline and the number of flinches and time spent licking were evaluated for 30 minutes. The oral HP (300 mg/kg) treatment significantly inhibits the number of flinches and the time of spent licking, in the first or neurogenic phase

(0-5 min) and in the second or inflammatory phase (10 – 30 min) of formalin test. In contrast, indomethacin treatment was able to inhibit these responses in the second phase only as previously reported [30]. The time of spent licking induced by formalin and CFA-overt pain like behaviour were also inhibited by HP and indomethacin treatment.

**3.3 HP reduces carrageenin-and CFA-induced mechanical hyperalgesia.** The response to mechanical stimulation was assessed prior and 1, 3 and 5h after intraplantar injection of carrageenin. As expected, the carrageenin induced significant hyperalgesia up to 5 hours. The doses of 30 and 100 mg/kg (p.o.) of HP significantly inhibited the mechanical hyperalgesia only at 1 and 3 hours after carrageenin injection. On the other hand, the dose of 300 mg/kg (p.o.) of HP inhibited the mechanical hyperalgesia in all the intervals evaluated. The effect of 300 mg/kg of HP was significant when compared to the lower doses of HP (Fig. 4A). Therefore, 300 mg/kg was selected for the chronic inflammatory pain model induced by CFA (Fig 4B). After 24h of intraplantar CFA stimulation, the animals were daily treated with 300 mg/kg and the mechanical hyperalgesia was assessed 3h after each treatment for 7 days. The treatment with 300 mg/kg of HP was effective in all evaluated days (Fig. 4B). The control drug, indomethacin, reduced carrageenin and CFA-induced hyperalgesia in all time-points (Fig. 4A and B).

**3.4 HP decreases IL-1 $\beta$  production in paw skin.** The production of the inflammatory cytokine IL-1 $\beta$  was evaluated in paw skin after intraplantar injection of carrageenin (Figure 5A) or CFA (Fig 5B). Both stimuli significantly increased the IL-1 $\beta$  levels in the paw compared to the control. The pre-treatment with 300 mg/kg of HP or the control drug indomethacin (5 mg/kg) significantly decreased the IL-1 $\beta$  levels in the paw as compared to the untreated control.

**3.5 The effect of HP on mechanical hyperalgesia induced by carrageenin is dependent on the activation of the NO/cGMP/PKG/ATP-sensitive potassium channel pathway.** Mice were treated with L-NAME (L-nitroarginine methyl ester, nonselective NOS inhibitor, 30 mg/kg, 60 min; Fig. 6A), ODQ (a soluble guanylate cyclase inhibitor, 0.3 mg/kg, 30 min; Fig. 6B), KT5823 (an inhibitor of PKG, 0.5  $\mu$ g/kg, 5 min; Fig. 6C), Glybenclamide (an inhibitor of ATP-sensitive potassium channels, 0.3 mg/kg, 45 min; Fig. 6D) before HP (300 mg/kg, p.o.) treatment followed by 60 min interval until carrageenin (300  $\mu$ g/paw) stimulus. A control group received indomethacin (5 mg/kg, i.p., Fig. 6A-D). Considering the peak of hyperalgesia after carrageenin injection is at 3h, the effect of pharmacological inhibitors was evaluated at this time point. All inhibitors significantly prevented the HP analgesic effect on carrageenin-induced hyperalgesia (Fig. 6). In addition, the control drug indomethacin was able to reduce carrageenin-induced hyperalgesia. Thus, HP activated the analgesic NO-cyclic GMP-PKG-ATP sensitive K (+) channel signaling pathway to inhibit carrageenin-induced mechanical hyperalgesia.

#### **4. Discussion**

*Hypericum perforatum* (HP) is a plant widely used for therapeutic purposes. It is an important therapeutic approach for the relief of temporary mental exhaustion, weak to medium depression and anxiety [40]. Although the antidepressant effect is the most studied activity of HP until now, HP exerts additional activities such as its ability to improve wound healing when used topically [25] or alleviating neuropathic pain or migraine [41-44]. However, considering that there is little knowledge about its modulation of inflammatory pain by HP and its mechanisms, this study evaluated the effect of treatment with HP on different classic animal models of inflammatory pain and its possible mechanisms.

The chemical composition of HP can be varied according to environmental and genetic factors of the plant [40], thus, the first step was to examine the compounds in the commercial extract used in the study, which is available in the Brazilian drug market. Quercetin and rutin are present in HP extract. These flavonoids are antioxidant and this activity explains their analgesic effect [45-50], which suggests that at least in part, to the observed effects of treatment with HP can be explainable by the presence of such molecules. Additionally, the presence of hyperforin and hypericin in HP may also contribute to the reduction of inflammatory pain, since many beneficial effects reported in the literature are related to these components [43]. Thus, the therapeutic effects of HP extract might occur through multiple molecules in its composition.

The overt pain-like behaviour models induced by PBQ or acetic acid are initial tests to determine analgesic activity of potentially therapeutic compounds. The characteristic painful response observed in animals as abdominal writhing is mediated by the release of inflammatory mediators such as TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , spinal activation of mitogen-activated protein (MAP) kinases and PI(3)K (phosphatidylinositol 3-kinase) [51] and, particularly in the PBQ model, IFN- $\gamma$ , endothelin-1 and IL-18 [32]. The oral HP treatment also inhibited the number of paw flinches and time spent licking the paw both in the neurogenic phase (0 -5 min), in which there is direct activation of nociceptors, and inflammatory phase (10 – 30 min), triggered by the release of inflammatory mediators, of formalin response [52]. In line with our data, a previous report showed that administration of HP crude extract or HP extract in nanosized particles, also inhibited both phases of formalin test confirming the applicability of HP as an attractive analgesic drug [53].

We also addressed the analgesic HP effects in pain behaviour induced by CFA injection, a persistent model of inflammatory pain. We found that in a daily post-treatment protocol, HP consistently inhibited mechanical hyperalgia induced by injection of CFA. Since the

hyperalgesia induced by CFA depends on activation of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) [54, 55], this receptor can be considered one of the possible targets of HP to produce analgesia. Alongside with this, works have shown that antidepressant molecules such selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) class, produce pain relieving properties in inflammatory pain by affecting calcium flux as well as reducing the PGE<sub>2</sub> release [56, 57]. In line with this, studies have proposed that HP shares mechanisms with SSRIs, suggesting mechanisms that can account for the analgesic activity of HP include TRPV1/calcium channels/PGE<sub>2</sub> and, importantly, without the adverse events associated the classic antidepressants.

It is probable that the HP exerts analgesic effect through different mechanisms. In fact, the inhibition of IL-1 $\beta$  production seems to be one of the mechanisms involved in the analgesic effect of HP, since the oral treatment with 300 mg/kg HP was capable to decrease IL-1 $\beta$  levels in the paw tissue after stimulation with carrageenin or CFA. These results are in agreement with previous findings [26,58]. In model of paracetamol-induced hepatotoxicity in mice, HP inhibited the increased production of IL-1 $\beta$  in the liver [58]. The HP extract (300 mg/ kg, p.o) reduced the production of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and adhesion molecules on carrageenin-induced lung injury [26]. Among the peripheral hyperalgesic cytokines, IL-1 $\beta$  is the one of the most prominent [59]. IL-1 $\beta$  is a cytokine produced by macrophages, monocytes and glial cells, and key component in the modulation of inflammatory pain, since it stimulates the expression of cyclooxygenase (COX) -2 and consequently prostaglandin production, contributing to hyperalgesia [1]. In this context, IL-1  $\beta$  is an interesting target to control inflammatory pain. In a dominant form, NLRC4/ASC/caspase-1 inflammasome assembly is responsible for the production of the mature form of IL-1  $\beta$  that accounted for the genesis inflammatory hyperalgesia [60], the specific target of HP in IL-1  $\beta$  inflammasome pathway is still unknown.

Finally, the antinociceptive effect of HP was dependent on the activation of NO/ cGMP /PKG /ATP-sensitive potassium channels since the analgesic effect of HP was inhibited by pre-treatment with L-NAME, ODQ, KT5823 or glibenclamide, which are inhibitors of this intracellular signaling pathway, respectively. The activation of NO/ cGMP /PKG /ATP-sensitive potassium channels pathway attenuates the transmission of nociceptive information and is one of the mechanisms involved in the effect of varied analgesics [61-63], including morphine [64].

Indomethacin treatment was able to reduce all hyperalgesic parameters in carrageenin-, CFA-, PBQ- and acetic acid-induced inflammatory pain. It is a widely used anti-inflammatory and analgesic drug, which displays an important role in inflammatory pain by reducing prostaglandin release and activation NO-cGMP pathway [65]. However, it presents several side effects, including gastric mucosal injury [66]. In fact, a problem faced with traditional therapy with pain drugs is related to efficacy, tolerance and toxicity [68]. Conversely, the same pattern was not observed with HP treatment, which presents protective effects in gastric [67] and liver lesions [58] and the administration of high doses of HP didn't change toxicity parameters as ALT, AST, urea and creatinine serum levels, and did not induce histopathological damage [69].

In view of these results demonstrating that HP presents analgesic and anti-inflammatory activity modulating varied mechanisms, it is plausible that its use in the clinic should be considered in the future.

## **5. Conclusion**

These results demonstrate that HP presents analgesic activity upon a variety of inflammatory stimuli by a mechanism dependent on inhibition of cytokine production and NO signaling

pathway. Considering its safety and clinical use for anti-depressive conditions, it is possible to consider HP as a new perspective in inflammatory pain therapy.

### **Declaration of interest**

The authors declare no competing financial interests.

### **Acknowledgments**

This study was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; Finance Code 001), and Programa de Pesquisa para o SUS (PPSUS) grant supported by Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), Secretaria da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (SETI), Decit/SCTIE/MS through CNPq with the support of Fundação Araucária and Secretaria da Saúde do Estado do Paraná (SESA-PR), and Parana State Government (Brazil). LSF received Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brazil) Post-Doc fellowship. ACR received CNPq Post-Doc fellowship.

### **References**

- [1] W.A. Verri, Jr., T.M. Cunha, C.A. Parada, S. Poole, F.Q. Cunha, S.H. Ferreira, Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development?, *Pharmacology & therapeutics* 112(1) (2006) 116-38.
- [2] N. Ghasemlou, I.M. Chiu, J.-P. Julien, C.J. Woolf, CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> myeloid cells mediate mechanical inflammatory pain hypersensitivity, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112(49) (2015) E6808-E6817.
- [3] S. Ferreira, B. Lorenzetti, A. Bristow, S. Poole, Interleukin-1 $\beta$  as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue, *Nature* 334(6184) (1988) 698.

- [4] T.M. Cunha, W. Verri, J.S.d. Silva, S. Poole, F.d.Q. Cunha, S.H. Ferreira, A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(5) (2005) 1755-1760.
- [5] A.H. Lopes, J. Talbot, R.L. Silva, J.B. Lima, R.O. França, W.A. Verri Jr, D.P. Mascarenhas, B. Ryffel, F.Q. Cunha, D.S. Zamboni, Peripheral NLR4 inflammasome participates in the genesis of acute inflammatory pain, *Pain* 156(3) (2015) 451-459.
- [6] H. Tilg, A.R. Moschen, G. Szabo, Interleukin-1 and inflammasomes in alcoholic liver disease/acute alcoholic hepatitis and nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis, *Hepatology* 64(3) (2016) 955-65.
- [7] G. Spohn, N. Arenas-Ramirez, G. Bouchaud, O. Boyman, Endogenous polyclonal anti-IL-1 antibody responses potentiate IL-1 activity during pathogenic inflammation, *J Allergy Clin Immunol* 139(6) (2017) 1957-1965 e3.
- [8] K. Yokose, S. Sato, T. Asano, M. Yashiro, H. Kobayashi, H. Watanabe, E. Suzuki, C. Sato, H. Kozuru, H. Yatsunami, K. Migita, TNF-alpha potentiates uric acid-induced interleukin-1beta (IL-1beta) secretion in human neutrophils, *Mod Rheumatol* 28(3) (2018) 513-517.
- [9] I. Galvao, A.C. Dias, L.D. Tavares, I.P. Rodrigues, C.M. Queiroz-Junior, V.V. Costa, A.C. Reis, R.D. Ribeiro Oliveira, P. Louzada-Junior, D.G. Souza, L. Leng, R. Bucala, L.P. Sousa, M.T. Bozza, M.M. Teixeira, F.A. Amaral, Macrophage migration inhibitory factor drives neutrophil accumulation by facilitating IL-1beta production in a murine model of acute gout, *J Leukoc Biol* 99(6) (2016) 1035-43.
- [10] A. Mantovani, C.A. Dinarello, M. Molgora, C. Garlanda, Interleukin-1 and Related Cytokines in the Regulation of Inflammation and Immunity, *Immunity* 50(4) (2019) 778-795.
- [11] S.H. Ferreira, S. Moncada, J.R. Vane, Prostaglandins and the mechanism of analgesia produced by aspirin-like drugs, *British journal of pharmacology* 49(1) (1973) 86-97.

- [12] T.M. Cunha, D. Roman-Campos, C.M. Lotufo, H.L. Duarte, G.R. Souza, W.A. Verri, Jr., M.I. Funez, Q.M. Dias, I.R. Schivo, A.C. Domingues, D. Sachs, S. Chiavegatto, M.M. Teixeira, J.S. Hothersall, J.S. Cruz, F.Q. Cunha, S.H. Ferreira, Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3Kgamma/AKT/nNOS/NO/KATP signaling pathway, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(9) (2010) 4442-7.
- [13] Y. Cury, G. Picolo, V.P. Gutierrez, S.H. Ferreira, Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system, *Nitric oxide : biology and chemistry* 25(3) (2011) 243-54.
- [14] L. Staurengo-Ferrari, S.S. Mizokami, J.J. Silva, F.O. da Silva, E.H. Sousa, L.G. da Franca, M.L. Matuoka, S.R. Georgetti, M.M. Baracat, R. Casagrande, W.R. Pavanelli, W.A. Verri, Jr., The ruthenium NO donor, [Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO)SO<sub>3</sub>](PF<sub>6</sub>), inhibits inflammatory pain: involvement of TRPV1 and cGMP/PKG/ATP-sensitive potassium channel signaling pathway, *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 105 (2013) 157-65.
- [15] S.H. Ferreira, I.D. Duarte, B.B. Lorenzetti, The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release, *European journal of pharmacology* 201(1) (1991) 121-2.
- [16] A.T. Borchers, Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Intoxications, in: K.H. Kenneth J. Drobatz, Elizabeth Rozanski and Deborah C. Silverstein (Ed.) *Textbook of Small Animal Emergency Medicine*, John Wiley & Sons (2018) 856-61.
- [17] H. Suleyman, B. Demircan, Y. Karagoz. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. *Pharmacol Rep* 59 (2007) 247-58.
- [18] L. Staurengo-Ferrari, A.C. Zarpelon, D.T. Longhi-Balbinot, M. Marchesi, T.M. Cunha, J.C. Alves-Filho, F.Q. Cunha, S.H. Ferreira, R. Casagrande, K.M. Miranda, W.A. Verri, Jr.,

Nitroxyl inhibits overt pain-like behavior in mice: role of cGMP/PKG/ATP-sensitive potassium channel signaling pathway, *Pharmacological reports* : PR 66(4) (2014) 691-8.

[19] E.A. Apaydin, A.R. Maher, R. Shanman, M.S. Booth, J.N. Miles, M.E. Sorbero, S. Hempel, A systematic review of St. John's wort for major depressive disorder, *Systematic reviews* 5(1) (2016) 148.

[20] O.A. Flausino, Jr., H. Zangrossi, Jr., J.V. Salgado, M.B. Viana, Effects of acute and chronic treatment with *Hypericum perforatum* L. (LI 160) on different anxiety-related responses in rats, *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 71(1-2) (2002) 251-7.

[21] A. Vandenberghe, P. Zanoli, G. Puia, C. Truzzi, A. Kamuhabwa, P. De Witte, W. Merlevede, M. Baraldi, Evidence that total extract of *Hypericum perforatum* affects exploratory behavior and exerts anxiolytic effects in rats, *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 65(4) (2000) 627-33.

[22] P. Xiuying, L. Jianping, S. Ruofeng, Z. Liye, W. Xuehong, L. Yan, Therapeutic efficacy of *Hypericum perforatum* L. extract for mice infected with an influenza A virus, *Canadian journal of physiology and pharmacology* 90(2) (2012) 123-30.

[23] Z. Saddiqe, I. Naeem, A. Maimoona, A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L, *Journal of ethnopharmacology* 131(3) (2010) 511-21.

[24] P. Avato, F. Raffo, G. Guglielmi, C. Vitali, A. Rosato, Extracts from St John's Wort and their antimicrobial activity, *Phytotherapy research* : PTR 18(3) (2004) 230-2.

[25] S. Samadi, T. Khadivzadeh, A. Emami, N.S. Moosavi, M. Tafaghodi, H.R. Behnam, The effect of *Hypericum perforatum* on the wound healing and scar of cesarean, *Journal of alternative and complementary medicine* 16(1) (2010) 113-7.

[26] M. Menegazzi, R. Di Paola, E. Mazzon, C. Muia, T. Genovese, C. Crisafulli, H. Suzuki, S. Cuzzocrea, *Hypericum perforatum* attenuates the development of carrageenin-induced lung injury in mice, *Free radical biology & medicine* 40(5) (2006) 740-53.

- [27] I.E. Orhan, M. Kartal, A.R. Gulpinar, G. Yetkin, B. Orlikova, M. Diederich, D. Tasdemir, Inhibitory effect of St. Johns Wort oil macerates on TNF $\alpha$ -induced NF-kappaB activation and their fatty acid composition, *Journal of ethnopharmacology* 155(2) (2014) 1086-92.
- [28] N. Galeotti, E. Vivoli, A.R. Bilia, F.F. Vincieri, C. Ghelardini, St. John's Wort reduces neuropathic pain through a hypericin-mediated inhibition of the protein kinase C $\gamma$  and epsilon activity, *Biochemical pharmacology* 79(9) (2010) 1327-36.
- [29] M. Naziroglu, B. Cig, C. Ozgul, Modulation of oxidative stress and Ca(2+) mobilization through TRPM2 channels in rat dorsal root ganglion neuron by *Hypericum perforatum*, *Neuroscience* 263 (2014) 27-35.
- [30] F.A. Pinho-Ribeiro, A.C. Zarpelon, V. Fattori, M.F. Manchope, S.S. Mizokami, R. Casagrande, W.A. Verri, Jr., Naringenin reduces inflammatory pain in mice, *Neuropharmacology* 105 (2016) 508-519.
- [31] J.F. Emele, J. Shanaman, M.R. Warren, The analgesic activity of phenelzine and other compounds, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 134 (1961) 206-9.
- [32] W.A. Verri, Jr., T.M. Cunha, D.A. Magro, A.C. Domingues, S.M. Vieira, G.R. Souza, F.Y. Liew, S.H. Ferreira, F.Q. Cunha, Role of IL-18 in overt pain-like behaviour in mice, *European journal of pharmacology* 588(2-3) (2008) 207-12.
- [33] H.O. Collier, L.C. Dinneen, C.A. Johnson, C. Schneider, The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse, *British journal of pharmacology and chemotherapy* 32(2) (1968) 295-310.
- [34] D. Dubuisson, S.G. Dennis, The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats, *Pain* 4(2) (1977) 161-74.

- [35] G.G. Vivancos, W.A. Verri, Jr., T.M. Cunha, I.R. Schivo, C.A. Parada, F.Q. Cunha, S.H. Ferreira, An electronic pressure-meter nociception paw test for rats, *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas* 37(3) (2004) 391-9.
- [36] W.A. Verri, Jr., F.O. Souto, S.M. Vieira, S.C. Almeida, S.Y. Fukada, D. Xu, J.C. Alves-Filho, T.M. Cunha, A.T. Guerrero, R.B. Mattos-Guimaraes, F.R. Oliveira, M.M. Teixeira, J.S. Silva, I.B. McInnes, S.H. Ferreira, P. Louzada-Junior, F.Y. Liew, F.Q. Cunha, IL-33 induces neutrophil migration in rheumatoid arthritis and is a target of anti-TNF therapy, *Annals of the rheumatic diseases* 69(9) (2010) 1697-703.
- [37] K.D. Hammer, M.L. Hillwig, A.K. Solco, P.M. Dixon, K. Delate, P.A. Murphy, E.S. Wurtele, D.F. Birt, Inhibition of prostaglandin E(2) production by anti-inflammatory *Hypericum perforatum* extracts and constituents in RAW264.7 Mouse Macrophage Cells, *Journal of agricultural and food chemistry* 55(18) (2007) 7323-31.
- [38] K.D. Hammer, M.L. Hillwig, J.D. Neighbors, Y.J. Sim, M.L. Kohut, D.F. Wiemer, E.S. Wurtele, D.F. Birt, Pseudohypericin is necessary for the light-activated inhibition of prostaglandin E2 pathways by a 4 component system mimicking an *Hypericum perforatum* fraction, *Phytochemistry* 69(12) (2008) 2354-62.
- [39] A. Koeberle, A. Rossi, J. Bauer, F. Dehm, L. Verotta, H. Northoff, L. Sautebin, O. Werz, Hyperforin, an Anti-Inflammatory Constituent from St. John's Wort, Inhibits Microsomal Prostaglandin E(2) Synthase-1 and Suppresses Prostaglandin E(2) Formation in vivo, *Frontiers in pharmacology* 2 (2011) 7.
- [40] A.I. Oliveira, C. Pinho, B. Sarmiento, A.C. Dias, Neuroprotective Activity of *Hypericum perforatum* and Its Major Components, *Frontiers in plant science* 7 (2016) 1004.

- [41] N. Galeotti, A. Maidecchi, L. Mattoli, M. Burico, C. Ghelardini, St. John's Wort seed and feverfew flower extracts relieve painful diabetic neuropathy in a rat model of diabetes, *Fitoterapia* 92 (2014) 23-33.
- [42] N. Galeotti, C. Ghelardini, St. John's wort relieves pain in an animal model of migraine, *European journal of pain* 17(3) (2013) 369-81.
- [43] N. Galeotti, *Hypericum perforatum* (St John's wort) beyond depression: A therapeutic perspective for pain conditions, *Journal of ethnopharmacology* 200 (2017) 136-146.
- [44] N. Galeotti, C. Ghelardini, St. John's wort reversal of meningeal nociception: a natural therapeutic perspective for migraine pain, *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 20(10) (2013) 930-8.
- [45] M.I. Azevedo, A.F. Pereira, R.B. Nogueira, F.E. Rolim, G.A. Brito, D.V. Wong, R.C. Lima-Junior, R. de Albuquerque Ribeiro, M.L. Vale, The antioxidant effects of the flavonoids rutin and quercetin inhibit oxaliplatin-induced chronic painful peripheral neuropathy, *Molecular pain* 9 (2013) 53.
- [46] C. Calixto-Campos, M.P. Correa, T.T. Carvalho, A.C. Zarpelon, M.S. Hohmann, A.C. Rossaneis, L. Coelho-Silva, W.R. Pavanelli, P. Pinge-Filho, J. Crespigio, C.C. Bernardy, R. Casagrande, W.A. Verri, Jr., Quercetin reduces Ehrlich tumor-induced cancer pain in mice, *Analytical cellular pathology* 2015 (2015) 285708.
- [47] S.M. Borghi, F.A. Pinho-Ribeiro, V. Fattori, A.J. Bussmann, J.A. Vignoli, D. Camilios-Neto, R. Casagrande, W.A. Verri, Jr., Quercetin Inhibits Peripheral and Spinal Cord Nociceptive Mechanisms to Reduce Intense Acute Swimming-Induced Muscle Pain in Mice, *PloS one* 11(9) (2016) e0162267.
- [48] W. Gao, Y. Zan, Z.J. Wang, X.Y. Hu, F. Huang, Quercetin ameliorates paclitaxel-induced neuropathic pain by stabilizing mast cells, and subsequently blocking PKCepsilon-dependent activation of TRPV1, *Acta pharmacologica Sinica* 37(9) (2016) 1166-77.

- [49] R. Lapa Fda, V.M. Gadotti, F.C. Missau, M.G. Pizzolatti, M.C. Marques, A.L. Dafre, M. Farina, A.L. Rodrigues, A.R. Santos, Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract and the flavonoid rutin obtained from *Polygala paniculata* L. in mice, *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 104(4) (2009) 306-15.
- [50] A. Hernandez-Leon, A. Fernandez-Guasti, M.E. Gonzalez-Trujano, Rutin antinociception involves opioidergic mechanism and descending modulation of ventrolateral periaqueductal grey matter in rats, *European journal of pain* 20(2) (2016) 274-83.
- [51] G.F. Pavao-de-Souza, A.C. Zarpelon, G.C. Tedeschi, S.S. Mizokami, J.S. Sanson, T.M. Cunha, S.H. Ferreira, F.Q. Cunha, R. Casagrande, W.A. Verri, Jr., Acetic acid- and phenyl-p-benzoquinone-induced overt pain-like behavior depends on spinal activation of MAP kinases, PI(3)K and microglia in mice, *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 101(3) (2012) 320-8.
- [52] S. Hunskar, K. Hole, The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain, *Pain* 30(1) (1987) 103-14.
- [53] J. Hatanaka, Y. Shinme, K. Kuriyama, A. Uchida, K. Kou, S. Uchida, S. Yamada, S. Onoue, In vitro and in vivo characterization of new formulations of St. John's Wort extract with improved pharmacokinetics and anti-nociceptive effect, *Drug metabolism and pharmacokinetics* 26(6) (2011) 551-8.
- [54] A. Szabo, Z. Helyes, K. Sandor, A. Bite, E. Pinter, J. Nemeth, A. Banvolgyi, K. Bolcskei, K. Elekes, J. Szolcsanyi, Role of transient receptor potential vanilloid 1 receptors in adjuvant-induced chronic arthritis: in vivo study using gene-deficient mice, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 314(1) (2005) 111-9.
- [55] L. Yu, F. Yang, H. Luo, F.Y. Liu, J.S. Han, G.G. Xing, Y. Wan, The role of TRPV1 in different subtypes of dorsal root ganglion neurons in rat chronic inflammatory nociception induced by complete Freund's adjuvant, *Molecular pain* 4 (2008) 61.

- [56] M. Zammataro, S. Merlo, M. Barresi, C. Parenti, H. Hu, M.A. Sortino, S. Chiechio, Chronic Treatment with Fluoxetine Induces Sex-Dependent Analgesic Effects and Modulates HDAC2 and mGlu2 Expression in Female Mice, *Frontiers in pharmacology* 8 (2017) 743.
- [57] P. Dharmshaktu, V. Tayal, B.S. Kalra, Efficacy of antidepressants as analgesics: a review, *Journal of clinical pharmacology* 52(1) (2012) 6-17.
- [58] M.S. Hohmann, R.D. Cardoso, V. Fattori, N.S. Arakawa, J.C. Tomaz, N.P. Lopes, R. Casagrande, W.A. Verri, Jr., *Hypericum perforatum* Reduces Paracetamol-Induced Hepatotoxicity and Lethality in Mice by Modulating Inflammation and Oxidative Stress, *Phytotherapy research : PTR* 29(7) (2015) 1097-101.
- [59] S.H. Ferreira, B.B. Lorenzetti, A.F. Bristow, S. Poole, Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue, *Nature* 334(6184) (1988) 698-700.
- [60] A.H. Lopes, J. Talbot, R.L. Silva, J.B. Lima, R.O. Franca, W.A. Verri, Jr., D.P. Mascarenhas, B. Ryffel, F.Q. Cunha, D.S. Zamboni, T.M. Cunha, Peripheral NLRP4 inflammasome participates in the genesis of acute inflammatory pain, *Pain* 156(3) (2015) 451-9.
- [61] I.D. Duarte, I.R. dos Santos, B.B. Lorenzetti, S.H. Ferreira, Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway, *European journal of pharmacology* 217(2-3) (1992) 225-7.
- [62] A.R. Rodrigues, M.S. Castro, J.N. Francischi, A.C. Perez, I.D. Duarte, Participation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the peripheral antinociceptive effect of fentanyl in rats, *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas* 38(1) (2005) 91-7.
- [63] T.R. Romero, I.D. Duarte, Involvement of ATP-sensitive K<sup>(+)</sup> channels in the peripheral antinociceptive effect induced by ketamine, *Veterinary anaesthesia and analgesia* 40(4) (2013) 419-24.

- [64] F.O. Lima, G.R. Souza, W.A. Verri, Jr., C.A. Parada, S.H. Ferreira, F.Q. Cunha, T.M. Cunha, Direct blockade of inflammatory hypernociception by peripheral A1 adenosine receptors: involvement of the NO/cGMP/PKG/KATP signaling pathway, *Pain* 151(2) (2010) 506-15.
- [65] R. Ventura-Martinez, M. Deciga-Campos, M.I. Diaz-Reval, M.E. Gonzalez-Trujano, F.J. Lopez-Munoz, Peripheral involvement of the nitric oxide-cGMP pathway in the indomethacin-induced antinociception in rat, *European journal of pharmacology* 503(1-3) (2004) 43-8.
- [66] P.J. Seo, N. Kim, J.H. Kim, B.H. Lee, R.H. Nam, H.S. Lee, J.H. Park, M.K. Lee, H. Chang, H.C. Jung, I.S. Song, Comparison of Indomethacin, Diclofenac and Aspirin-Induced Gastric Damage according to Age in Rats, *Gut and liver* 6(2) (2012) 210-7.
- [67] A. Russo, C. Costagliola, L. Delcassi, F. Parmeggiani, M.R. Romano, R. Dell'Omo, F. Semeraro, Topical nonsteroidal anti-inflammatory drugs for macular edema, *Mediators of inflammation* 2013 (2013).
- [68] Simoes, R. R., Kraus, S. I.Coelho, I. S. Dal-Secco, D. Siebert, D. A. Micke, G. A. Alberton, M. D. Santos, A. R. S. Eugenia brasiliensis leaves extract attenuates visceral and somatic inflammatory pain in mice. **J Ethnopharmacol**, 217 (2018) 178-186.
- [69] Teixeira, L. T. D. A., Junior, L.S.S., Queiroz, F.M., Oliveira, C.N., Schwarz, A. Avaliação de efeitos toxicológicos e comportamentais da *Hypericum perforatum* e da *Piper methysticum* em ratos. **Revista Brasileira de Toxicologia**, 22 (2009) 42-49.

**FIGURE LEGENDS**

**FIGURE 1. *H. perforatum* inhibits overt pain-like behavior induced by acetic acid and Phenyl-p-benzoquinone (PBQ).** Mice received oral treatment with *H. perforatum* (30-300 mg/kg, 150  $\mu$ l, p.o., 60 min), vehicle (Tween 80 5% plus saline, 60 min), or indomethacin (5 mg/kg, i.p., 40 min) before PBQ (1890  $\mu$ g/kg, 200  $\mu$ l; panel A) or acetic acid (0.8%, 200  $\mu$ l; panel B) intraperitoneal stimulus. The PBQ was diluted in 2% DMSO in saline and the vehicle for acetic acid was saline. The cumulative number of abdominal contortions was evaluated over 20 min and presented at 2 min interval for PBQ acetic acid. Results are presented as means  $\pm$  SEM of six mice per group per experiment and are representative of two separate experiments. \* $p < 0.05$  compared with the saline group; # $p < 0.05$  compared with the acid acetic or PBQ group. One-way ANOVA followed by Tukey's test.

**FIGURE 2. *H. perforatum* inhibits overt pain-like behavior induced by formalin and CFA.** Mice were treated with *H. perforatum* (300 mg/kg, 150  $\mu$ l, p.o., 60 min), vehicle (Tween 80 5% plus saline, 60 min) or indomethacin (5 mg/kg, i.p., 40 min) before the injection of formalin (1.5% formalin in saline, 25  $\mu$ l, i.pl.; panels A and B) or CFA (10  $\mu$ l, i.pl., panels C and D). The total number of flinches (panels A and C), and the time spent licking the paw (panels B and D) were evaluated for 30 min. Results are expressed as means  $\pm$  SEM of six mice per group per experiment and are representative of two separate experiments. \* $P < 0.05$  compared to saline group; # $P < 0.05$  compare to formalin plus vehicle group. One-way ANOVA followed by Tukey's test.

**FIGURE 3. *H. perforatum* inhibits carrageenin and CFA-induced mechanical hyperalgesia.** Mice were treated with *H. perforatum* (30 - 300 mg/kg, 150  $\mu$ l, p.o., 60 min),

vehicle (Tween 80 20% plus saline, 60 min) or indomethacin (5 mg/kg, 200  $\mu$ l, i.p., 40 min) before carrageenin (300  $\mu$ g, 25  $\mu$ l, i.pl., panel A) or CFA (10  $\mu$ l/paw, panel B) injection. The intensity of mechanical hyperalgesia was measured 1-5h after carrageenin injection (panel A) or 1-7 days after CFA injection (panel B). Results are expressed as means  $\pm$  SEM, of six mice per group per experiment and are representative of two separate experiments. \*P < 0.05 compared to saline group; #P < 0.05 compared to carrageenin plus vehicle, and \*\*P < 0.05 compared to the minor doses of *H. perforatum*. Two-way ANOVA followed by Tukey's test.

**Fig 4. *H. perforatum* inhibits carrageenin and CFA-induced IL-1 $\beta$  production.** Mice were treated with *H. perforatum* (300 mg/kg, 150  $\mu$ l, p.o., 60 min), vehicle (Tween 80 50% and saline, 60 min) or indomethacin (5 mg/kg, i.p., 40 min) before carrageenin (300  $\mu$ g, 25  $\mu$ l; i.pl., panel A) or CFA (25  $\mu$ l, i.pl., panel B) injection. Samples from the plantar tissue were collected 3 h after stimulus. IL-1 $\beta$  levels were determined by ELISA. Results are expressed as means  $\pm$  SEM of six mice per group per experiment and are representative of two separate experiments. \*P < 0.05 compared to saline group; #P < 0.05 compare to formalin plus vehicle group. One-way ANOVA followed by Tukey's test.

**Fig 5. *H. perforatum* inhibits the carrageenin-induced mechanical hyperalgesia by activating the NO/cyclic GMP–protein kinase G/ATP-sensitive potassium channel signaling pathway.** Mice were treated with L-NAME (NOS inhibitor; 30 mg /kg, 200  $\mu$ l, i.p., 60 min, panel A), ODQ (soluble cGMP inhibitor; 0.3 mg/kg, 200  $\mu$ l, i.p., diluted in 2% DMSO in saline; panel B), KT5823 (PKG inhibitor; 0.5  $\mu$ g /mice, 200  $\mu$ l, i.p., diluted in 2% DMSO in saline, 5 min; panel C), glybenclamide (ATP-sensitive potassium channel blocker; 0.3 mg/kg, 150  $\mu$ l, p.o., diluted in 5% Tween 80 in saline, 45 min; panel D), indomethacin (5 mg/kg, 200  $\mu$ l, i.p., 40 min) or the respective vehicle before *H. perforatum* (300 mg/kg, p.o.).

After an additional 60 min, mice received an injection of carrageenin (300 µg/paw, i.pl.). Mechanical hyperalgesia was measured 5h after stimulus injection. Results are expressed as means ± SEM of six mice per group per experiment and are representative of two separate experiments. \*P < 0.05 compared to saline group; #P < 0.05 compare to carrageenin plus vehicle group; \*\*P < 0.05 compare to carrageenin plus *H. perforatum* 300 mg/kg group. One-way ANOVA followed by Tukey's test.

FIGURE 1.

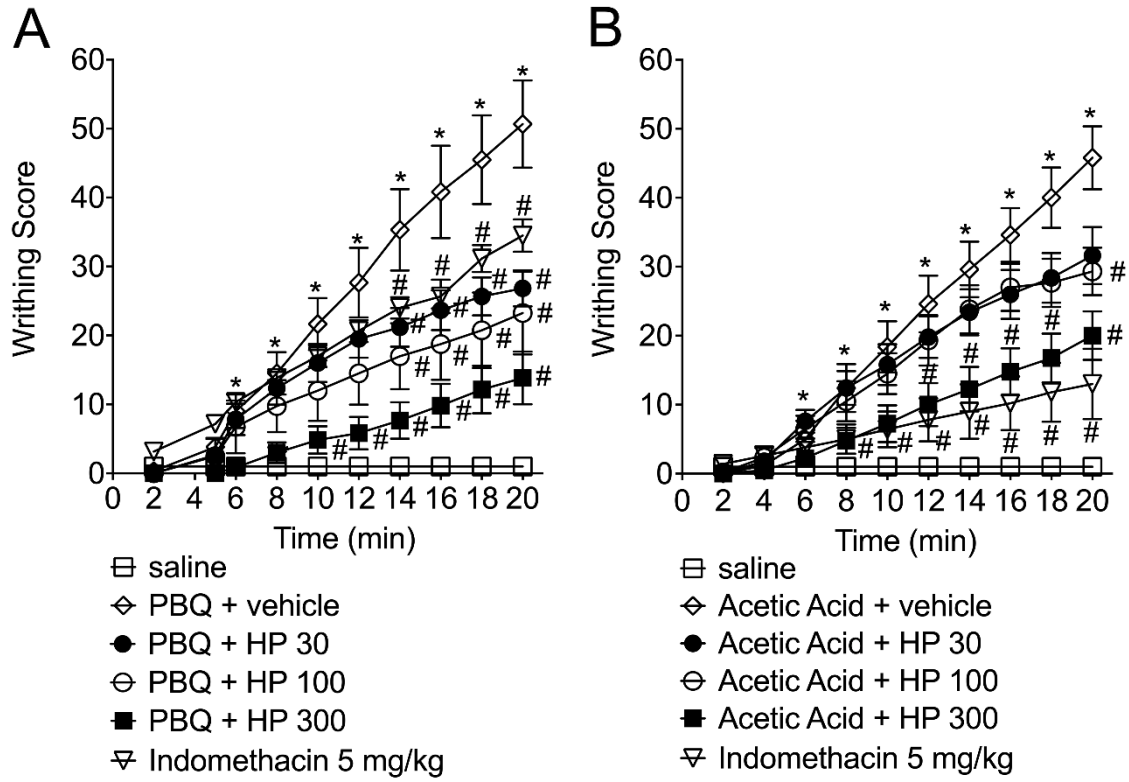


FIGURE 2.

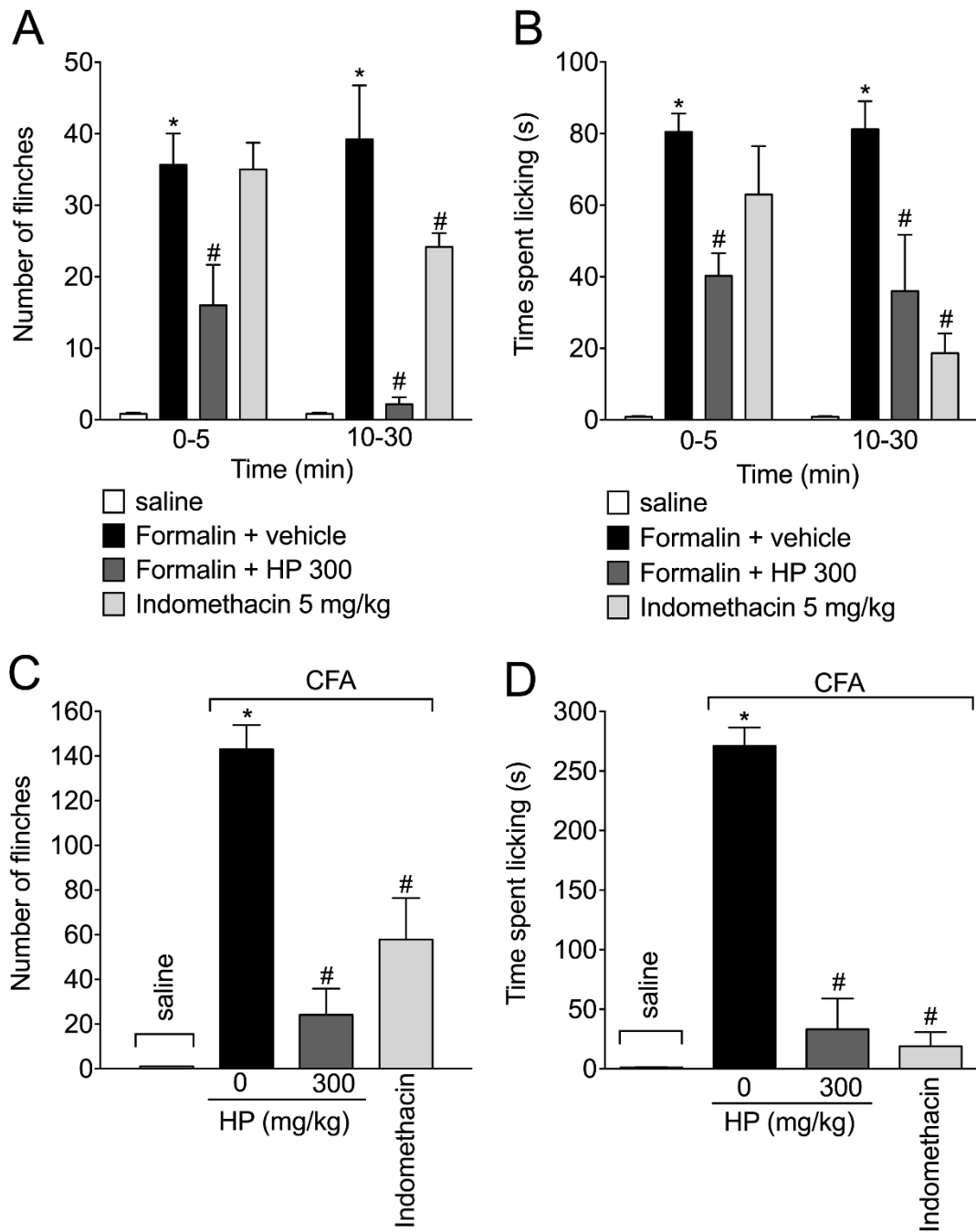


Figure 3

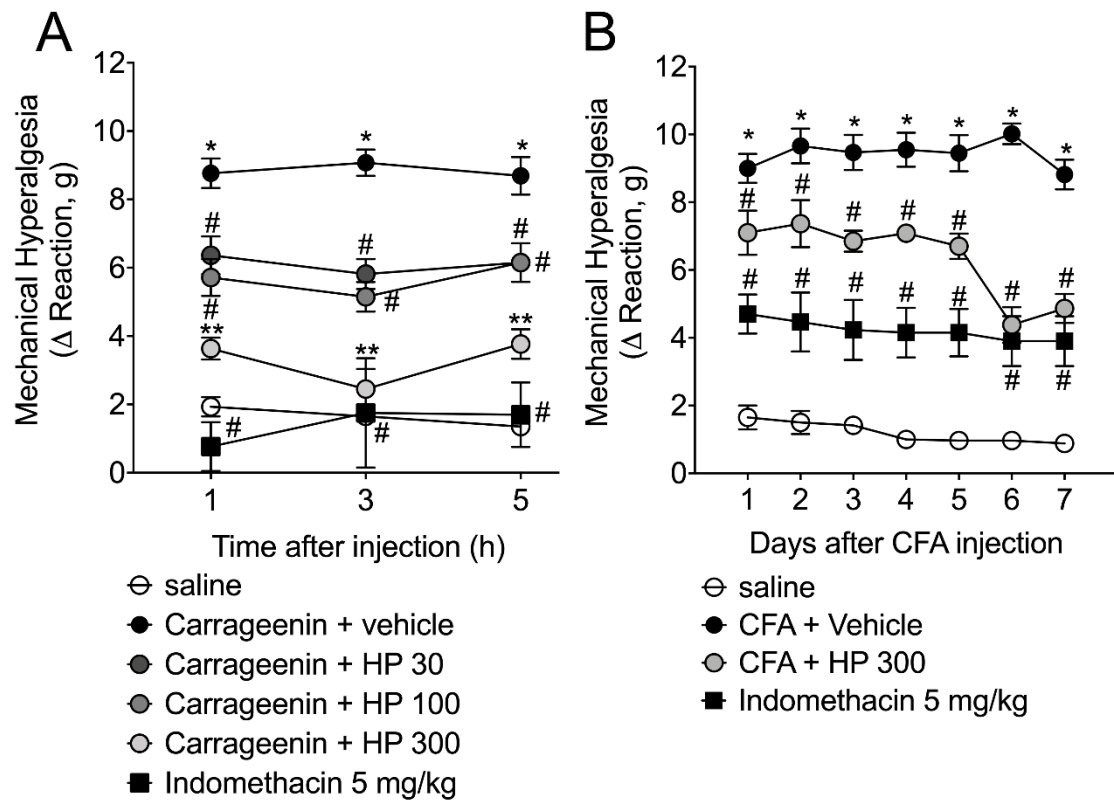


Figure 4

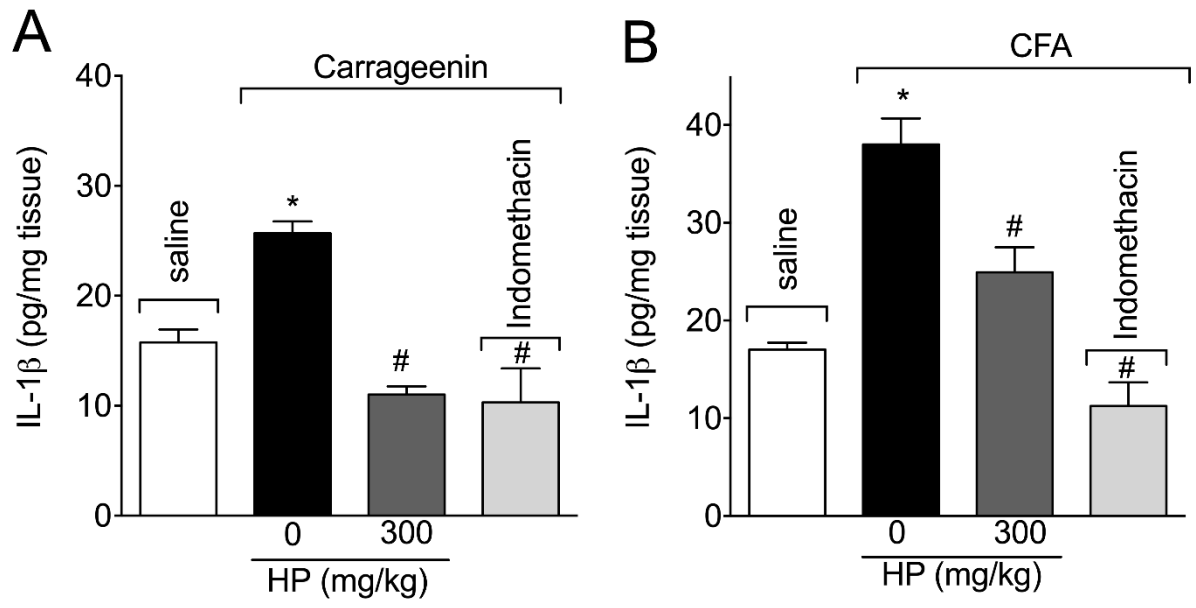
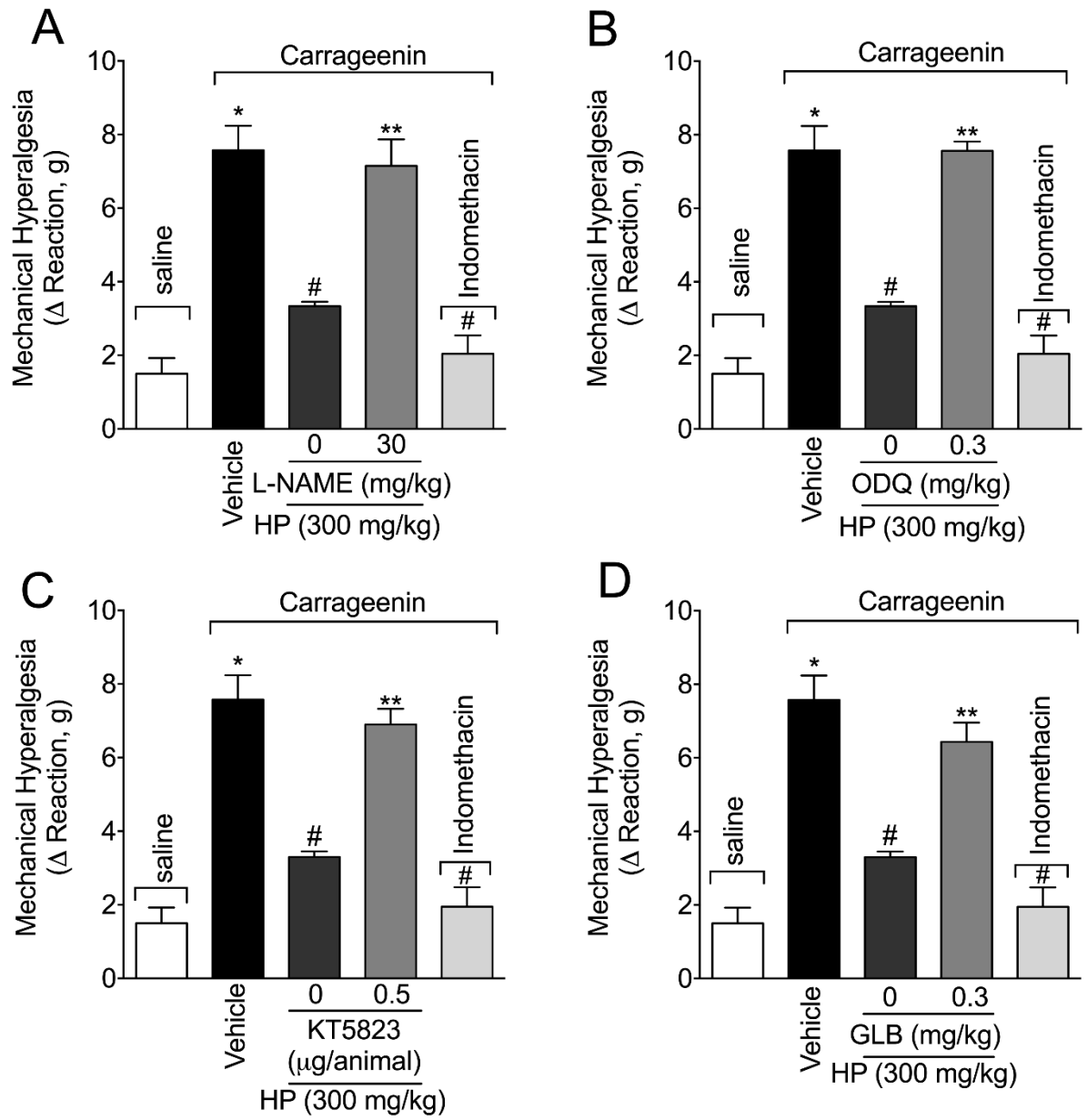
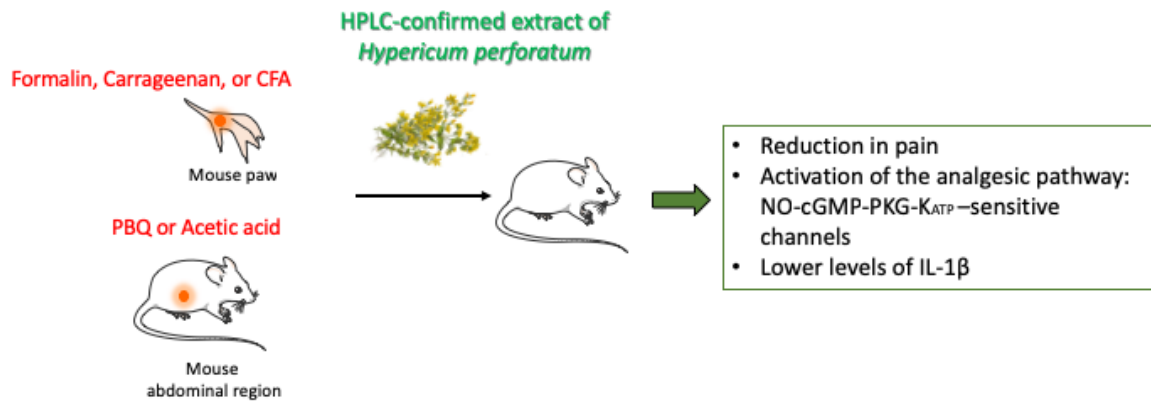


Figure 5



## Graphic Abstract



## 5. CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, podemos observar que extrato de *Hypericum perforatum* (*Hp*) apresenta atividade analgésica sobre diferentes modelos clássicos de dor inflamatória em animais.

O pré-tratamento com *H. perforatum* foi capaz de inibir os comportamentos de dor manifesta induzida por diferentes estímulos agudos, sugerindo a existência de um possível efeito analgésico protetor. Além disso, em um modelo persistente de dor inflamatória, o tratamento diário realizado com extrato de *Hp* resultou em uma consistentemente inibição da hiperalgesia mecânica bem como levou a uma diminuição dos níveis de uma citocina pró-inflamatória. Estes resultados sugerem um possível envolvimento do *Hp* na modulação de citocinas e quimiocinas hiperalgésicas.

Finalmente, o efeito antinociceptivo do *H. perforatum* foi dependente da via de ativação do NO / GMPc / PKG / K<sup>+</sup>ATP, atenuando a transmissão de informação nociceptiva, uma vez que o efeito analgésico no limiar mecânico observado, após o tratamento com *Hp* foi inibido pelo pré-tratamento com os inibidores desta via de sinalização intracelular.

Considerando a segurança e uso clínico do *H. perforatum* para transtorno depressivo e diante desses resultados, que evidenciam sua atividade analgésica e anti-inflamatória por modular diferentes mecanismos, este pode ser apontado como uma nova perspectiva na terapia da dor inflamatória.

## REFERÊNCIAS

ABD-ELBASET, M. et al. Quercetin modulates iNOS, eNOS and NOSTRIN expressions and attenuates oxidative stress in warm hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 4, n. 3, p. 246-255, 2015. ISSN 23148535.

ABDEL-SALAM, O. M. Anti-inflammatory, antinociceptive, and gastric effects of *Hypericum perforatum* in rats. **ScientificWorldJournal**, v. 5, p. 586-95, Aug 8 2005. ISSN 1537-744X (Electronic)  
1537-744X (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16088341> >.

ABDULKHALEQ, L. A. et al. The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. **Vet World**, v. 11, n. 5, p. 627-635, May 2018. ISSN 0972-8988 (Print)  
0972-8988 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29915501> >.

ALTIPARMAK, M.; ESKITASCIOGLU, T. Comparison of Systemic and Topical *Hypericum Perforatum* on Diabetic Surgical Wounds. **J Invest Surg**, v. 31, n. 1, p. 29-37, Feb 2018. ISSN 1521-0553 (Electronic)  
0894-1939 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28107097> >.

ALTIPARMAK, M. et al. Skin wound healing properties of *Hypericum perforatum*, *Liquidambar orientalis*, and propolis mixtures. **European Journal of Plastic Surgery**, 2019. ISSN 0930-343X  
1435-0130.

ALVES, A. C. S. et al. Aspectos botânicos, químicos, farmacológicos e terapêuticos do *Hypericum perforatum* L. **Rev. Bras. Pl. Med., Campinas**, v. 16, n. 3, p. 593-606, 2014.

ALVES, D. P. et al. NO/cGMP production is important for the endogenous peripheral control of hyperalgesia during inflammation. **Nitric Oxide**, v. 28, p. 8-13, Jan 15 2013. ISSN 1089-8611 (Electronic)  
1089-8603 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22995857> >.

ALVES, D. P. et al. Additive antinociceptive effect of the combination of diazoxide, an activator of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels, and sodium nitroprusside and dibutyryl-cGMP. **Eur J Pharmacol**, v. 489, n. 1-2, p. 59-65, Apr 5 2004. ISSN 0014-2999 (Print)  
0014-2999 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15063156> >.

AVATO, P. et al. Extracts from St John's Wort and their antimicrobial activity. **Phytother Res**, v. 18, n. 3, p. 230-2, Mar 2004. ISSN 0951-418X (Print)  
0951-418X (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15103670> >.

BANNENBERG, G.; ARITA, M.; SERHAN, C. N. Endogenous receptor agonists: resolving inflammation. **ScientificWorldJournal**, v. 7, p. 1440-62, Sep 1 2007. ISSN 1537-744X (Electronic)  
1537-744X (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17767360> >.

BARS, D. L.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal Models of Nociception. **Pharmacol Rev** v. 53, p. 597–652, 2001.

BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-84, Oct 16 2009. ISSN 1097-4172 (Electronic) 0092-8674 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19837031> >.

BELWAL, T. et al. St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). In: (Ed.). **Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements**, 2019. p.415-432. ISBN 9780128124918.

BILLIAU, A.; MATTHYS, P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. **J. Leukoc. Biol.** , v. 70, p. 849–860, 2001.

BORGHI, S. M. et al. Vitexin inhibits inflammatory pain in mice by targeting TRPV1, oxidative stress, and cytokines. **J Nat Prod**, v. 76, n. 6, p. 1141-9, Jun 28 2013. ISSN 1520-6025 (Electronic) 0163-3864 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23742617> >.

BOYCE-RUSTAY, J. M.; HONORE, P.; JARVIS, M. F. Animal models of acute and chronic inflammatory and nociceptive pain. **Methods Mol Biol**, v. 617, p. 41-55, 2010. ISSN 1940-6029 (Electronic) 1064-3745 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20336412> >.

BUCKLEY, C. D.; GILROY, D. W.; SERHAN, C. N. Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. **Immunity**, v. 40, n. 3, p. 315-27, Mar 20 2014. ISSN 1097-4180 (Electronic) 1074-7613 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24656045> >.

CAPECCHI, R. et al. IL-1 family cytokines and receptors in IgG4-related disease. **Cytokine**, v. 102, p. 145-148, Feb 2018. ISSN 1096-0023 (Electronic) 1043-4666 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28823915> >.

CODERRE, T.; MELZACK, R. The contribution of excitatory amino acids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury. **The journal of neuroscience**, v. 12, n. 9, p. 3655-3670, 1992.

COLEMAN, J. W. Nitric oxide in immunity and inflammation. **International Immunopharmacology** v. 1, p. 1397–1406 2001.

COLLIER, H. O. et al. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British journal of pharmacology and chemotherapy**, v. 32, n. 2, p. 295-310, 1968.

COOK, A. D. et al. Immune Cytokines and Their Receptors in Inflammatory Pain. **Trends Immunol**, v. 39, n. 3, p. 240-255, Mar 2018. ISSN 1471-4981 (Electronic) 1471-4906 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29338939> >.

CUNHA, T. M. et al. Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3Kgamma/AKT/nNOS/NO/KATP signaling pathway. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 9, p. 4442-7, Mar 2 2010. ISSN 1091-6490 (Electronic)

0027-8424 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20147620> >.

CURY, Y. et al. Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. **Nitric Oxide**, v. 25, n. 3, p. 243-54, Oct 30 2011. ISSN 1089-8611 (Electronic) 1089-8603 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21723953> >.

DÉCIGA-CAMPOS, M.; LÓPEZ-MUÑOZ, F. J. Participation of the l-arginine–nitric oxide–cyclic GMP–ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel cascade in the antinociceptive effect of rofecoxib. **European Journal of Pharmacology**, v. 484, n. 2-3, p. 193-199, 2004. ISSN 00142999.

DELLAFIORA, L. et al. On the Mechanism of Action of Anti-Inflammatory Activity of Hypericin: An In Silico Study Pointing to the Relevance of Janus Kinases Inhibition. **Molecules**, v. 23, n. 12, Nov 22 2018. ISSN 1420-3049 (Electronic) 1420-3049 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30467287> >.

DINARELLO, C. A. Proinflammatory Cytokines. **Chest**, v. 118, n. 2, p. 503-508, 2000. ISSN 00123692.

DINARELLO, C. A. Historical insights into cytokines. **Eur J Immunol**, v. 37 Suppl 1, p. S34-45, Nov 2007. ISSN 0014-2980 (Print) 0014-2980 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17972343> >.

DING, Y. et al. The NO-cGMP-PKG signal transduction pathway is involved in the analgesic effect of early hyperbaric oxygen treatment of neuropathic pain. **J Headache Pain**, v. 18, n. 1, p. 51, Dec 2017. ISSN 1129-2377 (Electronic) 1129-2369 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28470432> >.

DUARTE, I. D. G. et al. Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. **European Journal of Pharmacology**, v. 217, p. 225-227, 1992.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. THE FORMALIN TEST: A QUANTITATIVE STUDY OF THE ANALGESIC EFFECTS OF MORPHINE, MEPERIDINE, AND BRAIN STEM STIMULATION IN RATS AND CATS. **Pain**, v. 4, p. 161-174, 1977.

ERNST, E. **Hypericum: the genus Hypericum**. ERNST, E. London: CRC Press Inc. 1: 284 p. 2003.

FEHRENBACHER, J. C.; VASKO, M. R.; DUARTE, D. B. Models of inflammation: Carrageenan- or complete Freund's Adjuvant (CFA)-induced edema and hypersensitivity in the rat. **Curr Protoc Pharmacol**, v. Chapter 5, p. Unit5 4, Mar 2012. ISSN 1934-8290 (Electronic) 1934-8282 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22382999> >.

FELIX, C. E.; EHIGIATOR, I. F.; CHINEDUM, C. F. Pro-Inflammatory Cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ) in Nigerian Women with Breast Cancer. **Open Journal of Immunology**, v. 08, n. 02, p. 13-28, 2018. ISSN 2162-450X 2162-4526.

FERREIRA, S. H. Prostaglandins, Aspirin-like Drugs and Analgesia. **Nature New Biology**, v. 240, n. 102, p. 200-203, 1972.

FERREIRA, S. H.; DUARTE, I. D.; LORENZETTI, B. B. The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release, . **European journal of pharmacology**, v. 201, n. 1, p. 121-122, 1991.

FISHER, K.; CODERRE, T. J. The contribution of metabotropic glutamate receptors(mGluRs) to formalin-induced nociception. **Pain**, v. 68, p. 255–263, 1996.

FLORENTINO, I. F. et al. Potential anti-inflammatory effect of LQFM-021 in carrageenan-induced inflammation: The role of nitric oxide. **Nitric Oxide**, v. 69, p. 35-44, Sep 30 2017. ISSN 1089-8611 (Electronic) 1089-8603 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28412475> >.

FORNASARI, D. Pain pharmacology- focus on opioids. **Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism** v. 11, p. 165-168, 2014.

FUKATA, M.; VAMADEVAN, A. S.; ABREU, M. T. Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders. **Semin Immunol**, v. 21, n. 4, p. 242-53, Aug 2009. ISSN 1096-3618 (Electronic) 1044-5323 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19748439> >.

GALEOTTI, N.; GHELARDINI, C. St. John's wort reversal of meningeal nociception: a natural therapeutic perspective for migraine pain. **Phytomedicine**, v. 20, n. 10, p. 930-8, Jul 15 2013. ISSN 1618-095X (Electronic) 0944-7113 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23578992> >.

GILROY, D. W. New insights into the anti-inflammatory actions of aspirin- induction of nitric oxide through the generation of epi-lipoxins. . **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 49-54, 2005.

GRACE, P. M. et al. Nitroxidative Signaling Mechanisms in Pathological Pain. **Trends Neurosci**, v. 39, n. 12, p. 862-879, Dec 2016. ISSN 1878-108X (Electronic) 0166-2236 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27842920> >.

GUZIK, T. J.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. . **JOURNAL OF PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY**, v. 54, n. 4, p. 469–487, 2003.

HAMMER, K. D. et al. Inhibition of prostaglandin E(2) production by anti-inflammatory hypericum perforatum extracts and constituents in RAW264.7 Mouse Macrophage Cells. **Journal of agricultural and food chemistry** v. 55, n. 18, p. 7323-7331, 2007.

HAMMER, K. D. P. **Elucidation of anti-inflammatory constituents in Hypericum perforatum extracts and delineation of mechanisms of anti-inflammatory activity in RAW 264.7 mouse macrophages**. 2008. (DOCTOR OF PHILOSOPHY). Genetics, Iowa State University, Ames, Iowa.

HEADLAND, S. E.; NORLING, L. V. The resolution of inflammation: Principles and challenges. **Semin Immunol**, v. 27, n. 3, p. 149-60, May 2015. ISSN 1096-3618 (Electronic) 1044-5323 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25911383> >.

HOHMANN, M. S. et al. Hypericum perforatum Reduces Paracetamol-Induced Hepatotoxicity and Lethality in Mice by Modulating Inflammation and Oxidative Stress. **Phytother Res**, v. 29, n. 7, p. 1097-101, Jul 2015. ISSN 1099-1573 (Electronic) 0951-418X (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25851311> >.

HUANG, N. et al. The inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage inflammation by 4 compounds in Hypericum perforatum extract is partially dependent on the activation of SOCS3. **Phytochemistry**, v. 76, p. 106-16, Apr 2012. ISSN 1873-3700 (Electronic) 0031-9422 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22245632> >.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, p. 103-114, 1987.

JOHANEK, L. M. et al. A role for polymodal C-fiber afferents in nonhistaminergic itch. **J Neurosci**, v. 28, n. 30, p. 7659-69, Jul 23 2008. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18650342> >.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-210, 2001. ISSN 0028-0836 1476-4687.

KIDD, B. L.; URBAN, L. A. Mechanisms of inflammatory pain. **Br J Anaesth**, v. 87, 2001.

KLEMOW, K.; BARTLOW, A.; CRAWFORD, J. **Medical Attributes of St. John's Wort (Hypericum perforatum) Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects**. BENZIE IFF e WACHTEL-GALOR S: CRC Press/Taylor & Francis 2011.

LU, Y.-H. et al. Neuroprotective Effects of Hypericum perforatum on Trauma Induced by Hydrogen Peroxide in PC12 Cells. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 32, n. 3, p. 397-405, 2004.

MANSOURI, M. T. et al. Venlafaxine prevents morphine antinociceptive tolerance: The role of neuroinflammation and the l-arginine-nitric oxide pathway. **Exp Neurol**, v. 303, p. 134-141, May 2018. ISSN 1090-2430 (Electronic) 0014-4886 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29453978> >.

MARIUS, M. et al. NO-cGMP-K channel-dependent anti-nociceptive activities of methanol stem bark extract of Piptadeniastrum africanum (Mimosaceae) on rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 8, n. 3, 2018. ISSN 2221-1691.

MENEGAZZI, M. et al. Hypericum perforatum attenuates the development of carrageenan-induced lung injury in mice. **Free Radic Biol Med**, v. 40, n. 5, p. 740-53, Mar 1 2006. ISSN 0891-5849 (Print) 0891-5849 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16520227> >.

MICLESCU, A.; GORDH, T. Nitric oxide and pain: 'Something old, something new'. **Acta Anaesthesiol Scand**, v. 53, n. 9, p. 1107-20, Oct 2009. ISSN 1399-6576 (Electronic) 0001-5172 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19702699> >.

MIZOKAMI, S. S. et al. Kaurenoic acid from *Sphagneticola trilobata* Inhibits Inflammatory Pain: effect on cytokine production and activation of the NO-cyclic GMP-protein kinase G-ATP-sensitive potassium channel signaling pathway. **J Nat Prod**, v. 75, n. 5, p. 896-904, May 25 2012. ISSN 1520-6025 (Electronic) 0163-3864 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22574649> >.

MIZOKAMI, S. S. et al. Pimaradienoic Acid Inhibits Carrageenan-Induced Inflammatory Leukocyte Recruitment and Edema in Mice: Inhibition of Oxidative Stress, Nitric Oxide and Cytokine Production. **PLoS One**, v. 11, n. 2, p. e0149656, 2016. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26895409> >.

MOGIL, J. S. Animal models of pain: progress and challenges. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, n. 4, p. 283-94, Apr 2009. ISSN 1471-0048 (Electronic) 1471-003X (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19259101> >.

MOTA, E. F.; LIMA, M. D. G. S.; MELO, D. F. D. ADJUVANTES IMUNOLÓGICOS: AVANÇOS E PERSPECTIVAS. **Ciência Animal**, v. 16, n. 2, p. 79-88, 2006.

NECAS, J.; BARTOSIKOVA, L. Carrageenan: a review. **Veterinarni Medicina** v. 58, p. 187–205, 2013.

NETEA, M. G. et al. A guiding map for inflammation. **Nat Immunol**, v. 18, n. 8, p. 826-831, Jul 19 2017. ISSN 1529-2916 (Electronic) 1529-2908 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28722720> >.

NOGUCHI, K.; OKUBO, M. Leukotrienes in Nociceptive Pathway and Neuropathic/Inflammatory Pain. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 34, n. 8, p. 1163—1169, 2011.

OLIVIERO, F. et al. Editorial: IL-1 Inhibition. **Front Pharmacol**, v. 10, p. 87, 2019. ISSN 1663-9812 (Print) 1663-9812 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30809148> >.

PAVAO-DE-SOUZA, G. F. et al. Acetic acid- and phenyl-p-benzoquinone-induced overt pain-like behavior depends on spinal activation of MAP kinases, PI(3)K and microglia in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 101, n. 3, p. 320-8, May 2012. ISSN 1873-5177 (Electronic) 0091-3057 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22306747> >.

PHILLIPS, C. J. Economic burden of chronic pain. **Expert Rev. Pharmacoeconomics Outcomes Res.**, v. 6, n. 5, p. 591-601, 2006.

PINHO-RIBEIRO, F. A.; VERRI, W. A., JR.; CHIU, I. M. Nociceptor Sensory Neuron-Immune Interactions in Pain and Inflammation. **Trends Immunol**, v. 38, n. 1, p. 5-19, Jan 2017. ISSN 1471-4981 (Electronic) 1471-4906 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27793571> >.

PINHO-RIBEIRO, F. A. et al. Naringenin reduces inflammatory pain in mice. **Neuropharmacology**, v. 105, p. 508-519, Jun 2016. ISSN 1873-7064 (Electronic) 0028-3908 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26907804> >.

RAAK, C. et al. Hypericum perforatum to improve post-operative Pain Outcome after monosegmental Spinal microdiscectomy (HYPOS): a study protocol for a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **Trials**, v. 19, n. 1, p. 253, Apr 25 2018. ISSN 1745-6215 (Electronic) 1745-6215 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29695262> >.

RADUN, M. **Conservation and utilisation of St. John's wort (Hypericum perforatum L.) in Herzegovina**. 2017. International Master Programme at the Swedish Biodiversity Centre,

RAJA, S. N. et al. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. **Pain**, May 23 2020. ISSN 1872-6623 (Electronic) 0304-3959 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32694387> >.

RASO, G. M. et al. In-vivo and in-vitro anti-inflammatory effect of Echinacea purpurea and Hypericum perforatum. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 54, p. 1379–1383, 2002.

REZENDE, R. M. et al. Different mechanisms underlie the analgesic actions of paracetamol and dipyron in a rat model of inflammatory pain. **Br J Pharmacol**, v. 153, n. 4, p. 760-8, Feb 2008. ISSN 0007-1188 (Print) 0007-1188 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18157167> >.

RIBEIRO, R. A. et al. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **European Journal of Pharmacology** v. 387 p. 111–118, 2000.

ROCHAE, E.; SILVA, M. **A Brief History of Inflammation**. . Inflammation. Handbook of Experimental Pharmacology. VANE J.R., F. S. H. Berlin, Heidelberg: Springer 50 1978.

ROMERO, T. R.; DUARTE, I. D. alpha(2)-Adrenoceptor agonist xylazine induces peripheral antinociceptive effect by activation of the L-arginine/nitric oxide/cyclic GMP pathway in rat. **Eur J Pharmacol**, v. 613, n. 1-3, p. 64-7, Jun 24 2009. ISSN 1879-0712 (Electronic) 0014-2999 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19389395> >.

\_\_\_\_\_. Involvement of ATP-sensitive K(+) channels in the peripheral antinociceptive effect induced by ketamine. **Vet Anaesth Analg**, v. 40, n. 4, p. 419-24, Jul 2013. ISSN 1467-2995 (Electronic) 1467-2987 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23490455> >.

ROSALES, C. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? **Front Physiol**, v. 9, p. 113, 2018. ISSN 1664-042X (Print) 1664-042X (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29515456> >.

SADDIA, G.-M.; ABBOTT, F. V. The formalin test in the mouse: a parametric analysis of scoring properties. **Pain** **89**, v. 89, p. 53±63, 2000.

SAEIDNIA, S.; ABDOLLAHI, M. Toxicological and pharmacological concerns on oxidative stress and related diseases. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 273, n. 3, p. 442-55, Dec 15 2013. ISSN 1096-0333 (Electronic) 0041-008X (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24121054> >.

SASAKI, Y. et al. Genetic-deletion of Cyclooxygenase-2 Downstream Prostacyclin Synthase Suppresses Inflammatory Reactions but Facilitates Carcinogenesis, unlike Deletion of Microsomal Prostaglandin E Synthase-1. **Sci Rep**, v. 5, p. 17376, Nov 27 2015. ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26611322> >.

SCHAIBLE, H.-G.; EBERSBERGER, A.; NATURA, G. Update on peripheral mechanisms of pain-beyond prostaglandins and cytokines. **Arthritis Research & Therapy** v. 13, p. 210-218, 2011.

SCHMIDTKO, A.; TEGEDER, I.; GEISLINGER, G. No NO, no pain? The role of nitric oxide and cGMP in spinal pain processing. **Trends Neurosci**, v. 32, n. 6, p. 339-46, Jun 2009. ISSN 1878-108X (Electronic) 0166-2236 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19414201> >.

SINGH, A.; KUMAR, B. Pharmacological Evaluation of Anti-Inflammatory and Anti-Ulcer Potential of Heartwood of Santalum Album in Rats. **Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research** v. 4, n. 1, p. 140-154, 2014.

SINGH, A. et al. Effect of Natural and Synthetic Antioxidants in a Mouse Model of Chronic Fatigue Syndrome. **JOURNAL OF MEDICINAL FOOD**, v. 5, n. 4, p. 211-224, 2002.

SINGH, G. et al. Anti-nociceptive and anti-inflammatory effect of imperatorin: evidences for involvement of COX-2, iNOS, NFkappaB and inflammatory cytokines. **Int J Neurosci**, p. 1-10, Oct 2 2019. ISSN 1563-5279 (Electronic) 0020-7454 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31524564> >.

SOMMER, C.; KRESS, M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. **Neurosci Lett**, v. 361, n. 1-3, p. 184-7, May 6 2004. ISSN 0304-3940 (Print) 0304-3940 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15135924> >.

SOSA, S. et al. Topical anti-inflammatory activity of extracts and compounds from *Hypericum perforatum* L. **J Pharm Pharmacol**, v. 59, n. 5, p. 703-9, May 2007. ISSN 0022-3573 (Print) 0022-3573 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17524236> >.

STAURENGO-FERRARI, L. et al. The ruthenium NO donor, [Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO)SO<sub>3</sub>](PF<sub>6</sub>), inhibits inflammatory pain: involvement of TRPV1 and cGMP/PKG/ATP-sensitive potassium channel signaling pathway. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 105, p. 157-65, Apr 2013. ISSN 1873-5177 (Electronic) 0091-3057 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23470198> >.

STAURENGO-FERRARI, L. et al. Nitroxyl inhibits overt pain-like behavior in mice: role of cGMP/PKG/ATP-sensitive potassium channel signaling pathway. **Pharmacol Rep**, v. 66, n. 4, p. 691-8, Aug 2014. ISSN 1734-1140 (Print) 1734-1140 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24948073> >.

STEEDS, C. E. The anatomy and physiology of pain. **Surgery (Oxford)**, v. 34, n. 2, p. 55-59, 2016. ISSN 02639319.

STILLS, H. F. Adjuvants and Antibody Production: Dispelling the Myths Associated with Freund's Complete and Other Adjuvants. **ILAR Journal**, v. 46, n. 3, p. 280-293, 2005.

TEDESCHI, E. et al. Anti-inflammatory actions of St. John's wort: inhibition of human inducible nitric-oxide synthase expression by down-regulating signal transducer and activator of transcription-1alpha (STAT-1alpha) activation. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 307, n. 1, p. 254-61, Oct 2003. ISSN 0022-3565 (Print) 0022-3565 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12954801> >.

TEIXEIRA, L. T. D. A. et al. Avaliação de efeitos toxicológicos e comportamentais da *Hypericum perforatum* e da *Piper methysticum* em ratos. **Revista Brasileira de Toxicologia** v. 22, p. 42-49, 2009.

TJOLSEN, A. et al. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, p. 5-17, 1992.

TUROLLA, M. S. D. R.; NASCIMENTO, E. D. S. Informacoes toxicologicas de alguns fitoterapicos utilizados no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 42, 2006.

USLUSOY, F. et al. *Hypericum perforatum* L. supplementation protects sciatic nerve injury-induced apoptotic, inflammatory and oxidative damage to muscle, blood and brain in rats. **J Pharm Pharmacol**, v. 71, n. 1, p. 83-92, Jan 2019. ISSN 2042-7158 (Electronic) 0022-3573 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28508406> >.

VALERIO, D. A. et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of the sesquiterpene lactone budlein A in mice: inhibition of cytokine production-dependent mechanism. **Eur J Pharmacol**, v. 562, n. 1-2, p. 155-63, May 7 2007. ISSN 0014-2999 (Print) 0014-2999 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17320857> >.

VERRI, W. A. et al. Role of IL-18 in overt pain-like behaviour in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 588, n. 2-3, p. 207-12, Jul 7 2008. ISSN 0014-2999 (Print) 0014-2999 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18511039> >.

VERRI, W. A. et al. Cytokine Inhibitors and Pain Control. **rev bras reumatol**, v. 47, n. 5, p. 341-35, 2007.

VERRI, W. A. et al. IL-33 induces neutrophil migration in rheumatoid arthritis and is a target of anti-TNF therapy. **Ann Rheum Dis**, v. 69, n. 9, p. 1697-703, Sep 2010. ISSN 1468-2060 (Electronic) 0003-4967 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20472598> >.

VIVANCOS, G. G. et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, n. 3, p. 391-9, Mar 2004. ISSN 0100-879X (Print) 0100-879X (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15060709> >.

WHEELER-ACETO, H.; PORRECA, F.; COWAN, A. The rat paw formalin test: comparison of noxious agents. **Pain**, v. 40, p. 229-238, 1990.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Antiinflammatory Drugs. **Experimental Biology and Medicine** v. 111, n. 3, p. 544-547, 1962.

WISE, K. et al. Pharmacokinetic properties of phytochemicals in *Hypericum perforatum* influence efficacy of regulating oxidative stress. **Phytomedicine**, v. 59, p. 152763, Nov 19 2018. ISSN 1618-095X (Electronic) 0944-7113 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31004882> >.

YAM, M. F. et al. General Pathways of Pain Sensation and the Major Neurotransmitters Involved in Pain Regulation. **Int J Mol Sci**, v. 19, n. 8, Jul 24 2018. ISSN 1422-0067 (Electronic) 1422-0067 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30042373> >.

YONG, R. J. et al. **Pain Medicine - An Essential Review**: Springer 2017.

YU, L. et al. The role of TRPV1 in different subtypes of dorsal root ganglion neurons in rat chronic inflammatory nociception induced by complete Freund's adjuvant. **Mol Pain**, v. 4, p. 61, Dec 4 2008. ISSN 1744-8069 (Electronic) 1744-8069 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19055783> >.

ZHANG, R.-X.; MI, Z.-P.; QIAO, J.-T. Changes of spinal substance P, calcitonin gene-related peptide, somatostatin, Met-enkephalin and neurotensin in rats in response to formalin-induced pain. **Regulatory Peptides**, **51 (1994) 25-32**, v. 51, p. 25-32, 1994.

ZISKOVEN, C. et al. Physiology and pathophysiology of nitrosative and oxidative stress in osteoarthritic joint destruction. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 89, n. 7, p. 455-66, Jul 2011. ISSN 1205-7541 (Electronic) 0008-4212 (Linking). Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21793696> >.