

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE- CCBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DO ADULTO-PPGSAD

CAROLINA TROVÃO DOS SANTOS BAIMA

**ATIVIDADE ANALGÉSICA DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO E FRAÇÃO
ACETATO DE ETILA DA ESPÉCIE *Arrabidaea chica* EM MODELO MURINO DE DOR
ONCOLÓGICA**

SÃO LUÍS –MA

2024

CAROLINA TROVÃO DOS SANTOS BAIMA

**ATIVIDADE ANALGÉSICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO E FRAÇÃO
ACETATO DE ETILA DA ESPÉCIE *Arrabidaea chica* EM MODELO MURINO DE DOR
ONCOLÓGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- graduação
em Saúde do Adulto - PPGSAD-UFMA, como requisito
parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde do
Adulto.

Área de concentração: Processos Biológicos em Saúde

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Silva de Azevedo dos
Santos

Co-Orientadora: Profa. Dra. Maria do Socorro de Sousa
Cartágenes

SÃO LUÍS -MA

2024

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Baima, Carolina Trovão dos Santos.

ATIVIDADE ANALGÉSICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO E FRAÇÃO
ACETATO DE ETILA DA ESPÉCIE Arrabidaea chica EM MODELO
MURINO DE DOR ONCOLÓGICA / Carolina Trovão dos Santos
Baima. - 2024.

56 p.

Coorientador(a) 1: Maria do Socorro de Sousa
Cartágenes.

Orientador(a): Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos.
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Saúde do Adulto/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
São Luís, 2024.

1. Analgesia. 2. Arrabidaea chica. 3. Câncer. 4.
Tumor de Ehrlich. I. Cartágenes, Maria do Socorro de
Sousa. II. de Azevedo dos Santos, Ana Paula Silva. III.
Título.

CAROLINA TROVÃO DOS SANTOS BAIMA

**ATIVIDADE ANALGÉSICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO E FRAÇÃO
ACETATO DE ETILA DA ESPÉCIE *Arrabidaea chica* EM MODELO MURINO DE
DOR ONCOLÓGICA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- graduação em
Saúde do Adulto, como requisito parcial para obtenção do
título de mestre em Saúde do Adulto.

Área de concentração: Processos biológicos em saúde

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Silva de Azevedo dos
Santos.

Co-orientadora: Dra. Maria do Socorro de Sousa
Cartágenes.

Aprovada em: _____ de _____ de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos
(Universidade Federal do Maranhão-Presidente)

Profa. Dra. Josélia Alencar Lima-UFMA
1º avaliador

Profa. Dra. Flávia Castello Branco Vidal Cabral-UFMA
2º avaliador

Profa. Dra. Thiare Silva Fortes da Cunha-UFMA
3º avaliador

DEDICATÓRIA

À Deus, pela saúde, sonhos e oportunidades.

Aos meus amados pais, Joaquim Cézar dos Santos (in *memorian*) e Jamile Maria Trovão dos Santos, pela referência que são como professores e educadores e pelo apoio que sempre me deram, como pais amorosos que são.

As minhas amadas filhas, Lorena Trovão dos Santos Baima e Marina Trovão dos Santos Baima por serem minhas inspirações de vida.

Ao meu esposo amado, Ferdinand Baima Ferreira, que está sempre ao meu lado, me incentivando e apoiando e tornando mais leves os desafios da vida.

Aos meus amados irmãos, Thaís Trovão dos Santos Zenkner, Raquel Trovão dos Santos Mendes, Ricardo Cézar dos Santos, por fazerem parte da minha vida desde sempre.

A vocês, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me proporcionar a alegria de ter este trabalho realizado.

À minha orientadora, Dra. Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos, pela amizade, pelo tempo dedicado, pelos ensinamentos, pelas palavras de incentivo, e por tornar este trabalho uma realidade.

À minha co-orientadora, Dra. Maria do Socorro Cartágenes, pelos ensinamentos, pela contribuição, pelo acolhimento e por me permitir fazer parte do universo científico.

Ao programa de Pós -graduação em Saúde do Adulto, ao Dr. Marcelo Souza Andrade, e todos que fazem parte do PPGSAD.

Ao Laboratório Experimental de Estudo da dor-LEED e a todos que fazem parte de sua rotina.

Ao Laboratório de Imunologia Aplicada ao câncer-LIAC e a todos que fazem parte de sua rotina.

Ao Biotério da Universidade Federal do Maranhão e aos animais que fizeram parte desta pesquisa.

À Universidade Federal do Maranhão, pela qualidade do ensino oferecido e pela oportunidade.

Aos meus colegas de mestrado, por compartilharem experiências e palavras de incentivo.

“O sonho é que leva a gente para a frente.
Se a gente for seguir a razão, fica aquietado, acomodado.”

Ariano Suassuna

“Confia no senhor as tuas obras, e os teus planos serão estabelecidos.”

Provérbios 16:3

RESUMO

A dor oncológica é um sintoma associado ao paciente com câncer causando redução na qualidade de vida sendo desafio no cuidado paliativo. Na busca de potenciais fármacos analgésicos, a espécie *Arrabidaea chica* apresenta atividade em modelo de osteoartrite, além de pertencer a lista de plantas medicinais de interesse do Sistema Único de Saúde. O objetivo do trabalho foi avaliar a atividade do extrato hidroalcoólico e da fração acetato de etila das folhas em modelo de dor oncológica com tumor sólido de Ehrlich. Os animais da espécie Swiss foram inoculados com células tumorais no coxim plantar e tratados diariamente por um período de 12 dias, via oral, e separados nos grupos conforme o tratamento: com salina, Pregabalina 15mg/kg, Extrato hidroalcoólico 250mg/kg e Fração Acetato de etila 1mg/kg. O peso corporal dos animais e o volume da pata com tumor foram verificados a cada quatro dias. Nestes intervalos foram feitos os testes de comportamento para avaliação de dor espontânea (escada facial de Grimace) e atividade motora (Campo aberto), bem como, a avaliação de hiperalgesia mecânica e estresse térmico. Ao final do tratamento os animais foram eutanasiados, as patas foram retiradas para análise do peso do tumor e o sangue coletado para dosagem de citocinas séricas. Os resultados mostraram que os tratamentos não afetaram o peso corporal. O tumor aumentou de volume, entretanto não houve diferença do tratamento com extrato e fração com o controle negativo. Por outro lado, o tratamento com extrato foi capaz de reduzir o peso do tumor, comparado ao grupo controle negativo. Na expressão facial e na atividade motora, o extrato e fração não apresentaram efeito analgésico significativo. Para avaliação da atividade motora (teste de von Frey), o tratamento com extrato apresentou um limiar próximo ao normal, mas não houve diferença significativa para o controle negativo. No teste com estímulo nocivo usando o estresse térmico, o extrato apresentou um efeito analgésico semelhante ao controle positivo, apenas no quarto dia de tratamento. A determinação das citocinas evidenciou uma redução das citocinas inflamatórias após o tratamento com extrato e fração, reduzindo significativamente a concentração da proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), comparado com controle negativo. Os resultados evidenciaram que a presença do tumor reduz a tolerância dos animais ao estímulo, causando hiperalgesia, porém o tratamento com extrato e fração da *Arrabidaea chica* melhora a atividade analgésica, principalmente no período inflamatório do desenvolvimento do tumor (4º dia). O tratamento reduziu os mediadores inflamatórios, sugerindo o mecanismo analgésico periférico. Assim, o trabalho demonstra de forma pioneira o potencial efeito analgésico da espécie *Arrabidaea chica* em modelo de dor oncológica.

Palavras-chave: Analgesia; Câncer; *Arrabidaea chica*; Tumor de Ehrlich.

ABSTRACT

Cancer pain is a symptom associated with cancer patients, causing a reduction in quality of life being challenge in palliative care. In the search for potential analgesic drugs, the species *Arrabidaea chica* shows activity in a model of osteoarthritis, as well as belonging to the list of medicinal plants of interest to the Unified Health System. The aim of this study was to evaluate the activity of the hydroalcoholic extract and the ethyl acetate fraction of the leaves in a cancer pain model with a solid Ehrlich tumor. For the in vivo test, the animals Swiss species were inoculated with tumor cells in the plantar cushion and treated daily for a period of 12 days, orally, and separated into groups according to treatment: with saline, Pregabalin 15mg/kg, Hydroalcoholic extract 250mg/kg and Ethyl acetate fraction 1mg/kg. The animals' body weight and the volume of the paw with the tumor were checked every four days. At these intervals, behavioral tests were carried out to assess spontaneous pain using the Grimace facial ladder and motor activity (open field), as well as assessing mechanical hyperalgesia and thermal stress. At the end of the treatment, the animals were euthanized, their paws were removed for tumor weight analysis and blood was collected for serum cytokine dosage. The results showed that the treatments did not affect the animals' body weight. The tumor increased in volume, but there was no difference between treatment with the extract and fraction and the negative control. However, at the end of the experiment, treatment with the extract was able to reduce the weight of the solid tumor, compared to the group treated with saline. In terms of facial expression and motor activity, the extract and fraction had no significant analgesic effect. When assessing motor activity using the von Frey test, treatment with the species showed a threshold close to normal, but there was no significant difference to the negative control. In the noxious stimulus test using heat stress, the extract showed an analgesic effect similar to the positive control only on the fourth day of treatment. The determination of cytokines showed a reduction in inflammatory cytokines with the treatment of the extract and fraction, with a significant decrease in monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), compared to the negative control. The results show that the presence of the tumor reduces the animals' tolerance to the stimulus of hyperalgesia and treatment with *Arrabidaea chica* extract and fraction improves activity, especially in the inflammatory period of tumor development (day 4). The cytokine data show that treatment reduces inflammatory cytokines, suggesting a peripheral analgesic mechanism. The study thus demonstrates the potential analgesic effect of the *Arrabidaea chica* species in a cancer pain model.

Keywords: Analgesia; Cancer; *Arrabidaea chica*; Ehrlich tumor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração da via de sinalização associada a dor.	20
Figura 2 - Imagem aérea da espécie <i>Arrabidaea chica</i> (Fonte: Fitoterapia Brasil).	25
Figura 3 - Imagem das células obtidas do tumor ascítico de Ehrlich para inoculação nos animais.	30
Figura 4 - Desenho experimental do tratamento dos animais para avaliação de dor em modelo murino de tumor sólido de Ehrlich (Fonte: software BioRender).	31
Figura 5 - Análise dos animais quanto ao peso do tumor e desenvolvimento do tumor.	35
Figura 6 - Gráfico com a média de campos invadidos nos diferentes tratamentos durante os doze dias de tratamento.	36
Figura 7 - Limiar mecânico dos animais tratados com extrato e fração de <i>Arrabidaea chica</i>	37

Figura 8 - Tempo de permanência dos animais em contato com o estímulo algésico de estresse térmico durante o tratamento com extrato e fração de <i>Arrabidaea chica</i>	38
---	----

Figura 9 - Perfil de citocinas séricas após o tratamento com extrato e fração de <i>Arrabidaea chica</i>	40
--	----

Figura 10 - Ilustração da proposta de mecanismos do extrato de <i>A. chica</i> na dor oncológica.	44
---	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CCBS	Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
COX	Cicloxigenase
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EAC	Extrato hidroalcoólico
ESI-MS	Cromatografia líquida acoplada com espectrômetro de massa com ionização por eletrospray
GABA	Ácido gama-aminobutírico
IL-6	Interleucina-6
IL 10	Interleucina-10
IL 12p70	Interleucina 12 p70
IFN- γ	Interferon γ
LEED/UFMA	Laboratório de Estudo Experimental da Dor/ Universidade Federal do Maranhão
MIA	Monoiodoacetato de sódio
MCP-1	Proteína Quimiotática de Monócitos -1
OMS	Organização Mundial de Saúde
PG	Prostaglandinas
PPGSAD	Programa de Pós-graduação em Saúde do Adulto
RENISUS	Relação Nacional de plantas medicinais do interesse do Sistema Único de Saúde
SUS	Sistema Único de Saúde
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UFMA	Universidade Federal do Maranhão

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	15
2. REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Câncer: aspectos epidemiológicos e biológicos	17
2.2 Dor oncológica	18
2.2.1 Fisiopatologia da dor	19
2.2.2 Classificação da dor	21
2.2.3 Terapêutica farmacológica	21
2.3 Modelo de dor oncológica	22
2.4 <i>Arrabidaea chica</i> (Humb & Bonpl)	24
3. OBJETIVOS.....	27
3.1 Objetivo geral	27
3.2 Objetivos Específicos	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Extrato de <i>Arrabidaea chica</i> (Humb. & Bonpl.) Verlot (Bignoniaceae).....	28
4.2 Desenho Experimental <i>in vivo</i> de tumor murino de Ehrlich	28
4.3 Avaliação do desenvolvimento tumoral	31
4.4 Avaliação de comportamento de dor espontânea (Grimace Scala) ...	31
4.5 Campo aberto na avaliação da atividade motora	32
4.6 Avaliação da hiperalgesia mecânica	32
4.7 Hiperalgesia térmica	32

4.8 Dosagem de citocinas por <i>cytometric beads array</i> (CBA).	33
4.9 Análise estatística	33
5. RESULTADOS	34
5.1 Avaliação do peso corporal e desenvolvimento do tumor sólido	34
5.2 Análise do comportamento de dor espontânea e atividade motora no Campo aberto.	35
5.3 Avaliação da hiperalgesia mecânica	37
5.4 Determinação da sensibilidade à dor por estresse térmico	37
5.5 Dosagem de citocinas inflamatórias	38
6. DISCUSSÃO	41
7. CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS	46
ANEXOS	54

A - CROMATOGRAMA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Arrabidaea chica*

B- PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

C- ESCALA DE EXPRESSÃO DE GRIMACE

1. INTRODUÇÃO

Na busca de novos agentes terapêuticos, os metabólitos secundários de algumas espécies vegetais tem sido uma fonte promissora para novas drogas e protótipos, trazendo entre outras vantagens, matéria prima abundante, por consequência diminuindo custos, e menor efeitos adversos, melhorando a qualidade de vida do paciente.

Por ser um país de grande extensão territorial, o Brasil, com sua diversidade cultural e influência colonizadora européia, africanos e indígena, além de uma rica flora com imenso potencial propedêutico, destaca-se por apresentar variadas espécies com propriedades terapêuticas comprovadas, entre as quais, a *Arrabidaea chica* (Humb & Bonpl) Verlot (bignomacea) (Ibiapina *et al.*, 2014).

A espécie *Arrabidaea chica* é planta arbustiva, de médio porte com o nome vernacular de crajiru, carajiru, parir, parapari e chica, sendo usado empiricamente no tratamento de leucemias, diarreias sanguinolentas, banho de assento e enfermidade da pele (Behrens; Tellis; Chagas, 2012; Jorge *et al.*, 2008). Estudos farmacológicos preliminares evidenciam os efeitos cicatrizantes, antimicrobiano (Barbosa *et al.*, 2008; Cortez de Sá *et al.*, 2015), anti-inflamatório, antiangiogênico e antitumoral desta espécie (de Carvalho Ribeiro, 2012; Gouveia *et al.*, 2019).

É uma espécie nativa e abundante em no Estado do Maranhão, tendo sua distribuição geográfica em grande parte do território, destacando-se no Brasil central, com prevalência desde a Região Amazônica até o rio Grande do Sul, incluindo região de cerrado, mata atlântica e floresta tropical, tornando-se uma alternativa de baixo custo, no tratamento e controle da dor oncológica, inclusive constando na Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse do SUS (RENISUS) do Ministério da Saúde , agregando ainda mais valor a espécie.

No que se refere, ao uso da *Arrabidaea chica*, no controle da dor e tratamento alternativo, podemos citar o trabalho do laboratório de estudo experimental da dor (LEED /UFMA), onde foi investigado o efeito terapêutico da planta na osteoartrite, e avaliado a resposta anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato e frações da planta, com resultados promissores (Vasconcelos *et al.*, 2021).

O controle da dor é um fator importante na qualidade de vida do paciente, de forma particularizada em um paciente oncológico, onde já se sobrepõe ao impacto psicológico e emocional do diagnóstico, além de todo estigma atribuído à doença. O estudo brasileiro (Mendes *et al.*, 2016), que avaliou a dor de forma qualitativa, mostrou que a queixa algica é constante e desconfortável afetando o bem estar dos pacientes oncológicos. Desta forma, a dor é um dos fenômenos mais temidos e uma das queixas mais frequentes entre os pacientes oncológicos, sendo descrita como insuportável, em especial nas fases mais avançadas da doença (Henson *et al.*, 2020; Kleeberg *et al.*, 2005).

Assim, considerando a elevada incidência de câncer no mundo e a dor oncológica ser um aspecto importante na qualidade de vida destes pacientes, o presente trabalho se propôs a estudar a eficácia terapêutica do extrato hidroalcoólico e fração acetato de etila das folhas da espécie *Arrabidaea chica* em modelo pré-clínico de dor oncológica.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Câncer: aspectos epidemiológicos e biológicos

O câncer é uma doença que apresenta um aumento progressivo a cada ano, segundo a OMS (Organização Mundial de Saúde), 1 em cada 5 homens e 1 a cada 11 mulheres morrem da doença no mundo (Singh *et al.*, 2023). No Brasil, nas últimas décadas, estudos apontaram mudanças no perfil do adoecimento da população brasileira, principalmente por doenças não transmissíveis ao que denominamos transição epidemiológica. Sobre o aspecto epidemiológico, é importante identificar e dimensionar essas mudanças para traçar políticas públicas assertivas, subsidiando ações que impactam na diminuição da incidência e prevalência do câncer no Brasil (Mendes; Vasconcellos, 2015).

Considerando a localização primária do tumor e o sexo do indivíduo, no Brasil a maior prevalência no sexo masculino são respectivamente: câncer de próstata (29,2%), câncer de cólon retal/intestino (9,1%), câncer de pulmão (7,9%), câncer de estômago (5,9%) e câncer de cavidade oral (5%). Já nas mulheres a prevalência é respectivamente: câncer de mama (29,7%), câncer de cólon retal/intestino (9,2%), câncer de colo uterino (7,4%), câncer de pulmão (5,6%) e câncer de tireoide (5,4%) (de Oliveira Santos *et al.*, 2023; dos Santos; de Brito, 2022; Mendes; Vasconcellos, 2015).

No Maranhão a estimativa de casos novos de câncer até 2025 é um cenário alarmante. Estima-se que o câncer de próstata deva chegar a 56,47 casos a cada 100.000 homens e o câncer de mama 28,7 casos a cada 100.000 mulheres (Ministério da Saúde, 2023). É importante lembrar que o Maranhão é líder em casos de câncer de pênis no Brasil e no mundo, segundo estudo realizado em três grandes hospitais do Estado, referências em tratamento e complicações do câncer (Coelho *et al.*, 2018).

O câncer tem origem a partir de mutações na sequência de nucleotídeos no DNA que alteram vias cruciais responsáveis por regular a homeostase celular e tecidual (Kirsch-Volders; Aardema; Elhajouji, 2000; Kontomanolis *et al.*, 2020). As alterações genéticas podem surgir de fatores intrínsecos, como mutações hereditárias e erros aleatórios na replicação do DNA. Também podem ser causadas por fatores extrínsecos, incluindo danos provocados por radiação, produtos químicos e infecções por patógenos com potencial oncogênico (Harrington *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2019). Dessa forma,

apenas 5 a 10 % de todos os cânceres são resultantes de defeitos genéticos hereditários, sendo os fatores ambientais os principais promotores e iniciadores do processo neoplásico. Entre eles podemos destacar o tabagismo, alcoolismo, raios ultravioleta, infecções oncogênicas e dieta não saudável (Lewandowska *et al.*, 2018; Tilburt *et al.*, 2011; Wojciechowska *et al.*, 2023).

Existem diversos fatores e fenômenos moleculares e/ou ambientais que levam uma célula normal a se transformar em uma célula neoplásica, sendo os processos englobados e denominados oncogênese ou carcinogênese (Hanahan; Weinberg, 2000). O padrão observado é quase sempre o mesmo: células com capacidade de multiplicação ilimitada, evasão de sinais supressores de crescimento, invasão de tecidos (metástase), resistência à morte celular programada (apoptose), estimulação da formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese), manutenção da sinalização proliferativa, reprogramação do metabolismo energético, evasão da vigilância e destruição imunológica, instabilidade genômica, processo inflamatório não resolutivo, plasticidade fenotípica, reprogramação não mutacional epigenética e microbioma associado polimórfico (Fouad; Aanei, 2017; Hanahan, 2022; Hanahan; Weinberg, 2011).

De modo geral, as células cancerosas, por sofrerem novas mutações, são menos especializadas que as células saudáveis, ou seja, não exerce normalmente sua função original. Com a evolução da doença estas células que sofreram novas mutações, vão substituindo as células normais e desta forma os tecidos invadidos não desempenham adequadamente sua função, levando o paciente à falência do órgão (Fouad; Aanei, 2017; Hanahan, 2022).

2.2 Dor oncológica

O câncer diferencia-se das demais doenças, em virtude de impactar fortemente na vida do indivíduo desde o momento do seu diagnóstico, levando a sentimentos negativos, mutilações e sobretudo dor (Salci; Marcon, 2009). Os diagnósticos precoces e avanços no tratamento do câncer têm proporcionado uma maior possibilidade de cura ao paciente oncológico, muitas vezes com terapias combinadas como cirurgia, radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia e imunoterapias. No entanto, diversos fatores devem ser considerados em seu planejamento, como características individuais do paciente,

estadiamento clínico da doença, tipo e localização do tumor, presença ou não de implantes secundários (Soares; Silva, 2010).

São muito comuns efeitos colaterais ou reações de toxicidade do tratamento do câncer, como por exemplo, efeitos gastrintestinais, hematológicos, cardiotoxicidade, hepatotoxicidade, nefrotóxico, reações dermatológicas e reações alérgicas, e esses efeitos muitas vezes podem ser potencializados com a terapêutica instituída no controle da dor (Celeste; Maia, 2021).

A dor do câncer ou dor oncológica é definida por qualquer dor sentida em estreita relação com a doença. Ela pode estar associada a inúmeros aspectos do adoecimento, tais como o tumor em si e os sintomas advindos do tratamento e da proliferação da doença no organismo por meio das metástases e do surgimento de novos cânceres interligados aos processos de recidivas (Freire *et al.*, 2018). Está presente em cerca de 60% a 80% dos pacientes, acometendo-os em todas as fases do adoecimento, em 20% a 30% dos pacientes em estágio inicial e em 75% dos pacientes em estágio avançado (Costa *et al.*, 2017; Mantyh *et al.*, 2002).

A dor resulta do desequilíbrio entre os sistemas nociceptivos e antinociceptivos e para ocorrer a percepção da dor, estão envolvidos três processos: tradução do estímulo em potencial de ação pelo receptor, transmissão dos dados do sistema nervoso e por fim, interpretação dos dados (Wandner *et al.*, 2012). De acordo com a forma de variação ao longo do tempo, a dor oncológica pode ser progressiva, persistente ou disruptiva, rompendo o controle da dor oferecido pelos analgésicos (Hao *et al.*, 2021; Mercadante, 2014; Voscopoulos; Lema, 2010; Zeppetella, 2011).

2.2.1 Fisiopatologia da dor

Os neurônios do sistema nervoso periférico, chamados de nociceptores, são os responsáveis pela detecção e transmissão de estímulos dolorosos. Revisando a anatomia do neurônio sensitivo sensorial, este possui um corpo celular, localizado nos gânglios das raízes dorsais da medula espinhal. A partir do gânglio medular parte um prolongamento que se bifurca em um prolongamento central que se dirige e termina no corpo dorsal da medula espinhal e um segundo prolongamento chamado de prolongamento periférico que percorre os nervos sensitivos e vai em direção aos diversos órgãos periféricos,

constituindo assim, a fibra sensitiva. Quando ocorre o estímulo doloroso aos neurônios nociceptores, este estímulo percorre todo o eixo neuronal e finaliza na percepção da dor, interpretada pelo córtex cerebral (Figura 1) (Mantyh *et al.*, 2002; Teixeira, 2009).

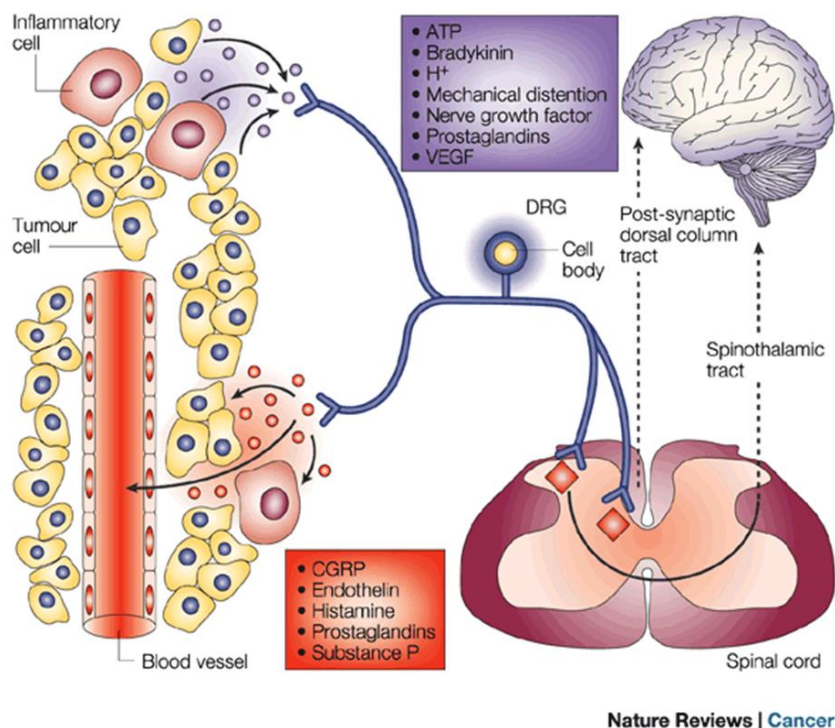


Figura 1: Ilustração da via de sinalização associada a dor. A presença de células tumorais recruta a células imunes para o ambiente tumoral que por sua vez acionam e liberam substâncias pró-inflamatórias. O desenvolvimento do tumor aumenta ainda mais a presença de células do sistema imune, pois a proliferação celular aumenta o metabolismo das células envolvidas no processo inflamatório, sensibilizando o neurônio nociceptivo, percorrendo todo prolongamento neuronal e levando o estímulo doloroso em direção ao gânglio dorsal da medula espinal. ATP: Adenosina Trifosfato; VEGF: Fator de Crescimento do Endotélio Vascular; DRG: Gânglio da Região Dorsal; CGRP Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina. (Fonte: Mantyh *et al.*, 2002).

A partir do gânglio dorsal, parte um prolongamento que se bifurca, em um prolongamento central que se dirige e termina no corpo dorsal da medula espinal e um prolongamento periférico que percorre os nervos sensitivos e vai em direção aos diversos órgãos periféricos, constituindo assim a fibra sensitiva. Assim, quando ocorre o neurônio nociceptivo recebe um estímulo doloroso, este estímulo percorre todo o eixo neuronal e finaliza na percepção da dor, interpretada pelo córtex cerebral concomitante a este processo os neurônios sensibilizados liberam ainda outras substâncias pró-inflamatórias, em um mecanismo de feedback configurando um ambiente de retroalimentação da dor.

2.2.2 Classificação da dor

Quanto a sua duração pode ser classificada como aguda ou crônica. A dor aguda possui um quadro de duração de até 30 dias, é geralmente causada por uma lesão do tecido, de causa geralmente identificada, começa repentinamente e diminui com o tempo e com o processo de cicatrização tecidual. Pode trazer benefícios ao organismo, funcionando como alerta, que algo está em sofrimento e é um sintoma muito importante no diagnóstico de algumas patologias. É tratada com bloqueio das vias nociceptivas durante a cicatrização (Mercadante, 2014; Zeppetella, 2011).

A dor crônica é considerada uma dor com duração igual ou maior a 3-6 meses, podendo persistir além da cura das lesões precipitantes, se mantendo ou se tornando recorrente. A gênese da dor crônica também inclui claramente fatores comportamentais, com ativação de mecanismos como a sensibilização de neurônios, exigindo uma abordagem terapêutica mais complexa (Zeppetella, 2011).

Quanto a patogênese da dor, podemos classificá-la em dois grupos (Mantyh *et al.*, 2002):

- a) Nociceptiva: decorrente devido a estímulos específicos aos receptores da dor, que por sua vez pode ser classificada em dor visceral e dor somática. A dor visceral tem sua origem em órgãos internos e pode ser decorrente de patologias, entre elas, neoplasias ou ainda, representar sofrimento do órgão, como isquemia. E a dor somática pode ser superficial ou profunda proveniente da pele, músculos, ossos e articulações. A dor superficial ocorre a nível da pele ou membranas mucosas e a dor profunda, ao nível dos músculos, ligamentos, tendões ou vasos sanguíneos.
- b) Neuropática: definida como dor causada por lesão ou disfunção do sistema nervoso, tende a responder de forma menos eficiente às drogas padrões e analgésicos usuais.

2.2.3 Terapêutica farmacológica

No controle e tratamento da dor temos principalmente três grupos de fármacos. Analgésicos não opióides, entre eles os anti-inflamatórios não esteróides (AINES) e analgésicos simples cujo mecanismo de ação não é bem conhecido, mas presumidamente

tem ação central. Os AINEs atuam por inibição da ciclooxigenase (COX), inibindo a síntese de prostaglandinas (PG) envolvidas no processo inflamatório e na dor. Os Analgésicos opióides, que são os analgésicos mais indicados na dor moderada a grave atuam ligando-se aos receptores μ , κ e δ , amplamente distribuídos no sistema nervoso central e periférico, podendo ser classificados de acordo com a sua atividade intrínseca em agonistas, agonista parcial/antagonista, agonista/antagonista. Entre estes encontram-se a morfina, fentanil, oxicodona e tramadol. Os analgésicos adjuvantes são drogas desenvolvidas para outras indicações clínicas, no entanto são utilizados na prática médica com ação analgésica. Entre estes encontram-se os antidepressivos, anticonvulsivantes, corticosteróides e bifosfonatos (INCA; Ministério da Saúde, 2001).

A pregabalina é classificada como analgésico adjuvante e se caracteriza como um composto análogo estruturalmente ao neurotransmissor Ácido gama-aminobutírico (GABA), com propriedades anticonvulsivantes, antihiperálgicas e ansiolíticas (Aydoğan *et al.*, 2014). Segundo as diretrizes farmacológicas para o tratamento da dor neuropática a pregabalina é um dos medicamentos de primeira escolha para o tratamento desse tipo de dor (Finnerup *et al.*, 2015).

A pregabalina, embora tenha relação estrutural com o GABA, não liga-se à este neurotransmissor, seu principal mecanismo de ação consiste na ligação da subunidade alfa-delta dos canais de cálcio voltagem-dependente do sistema nervoso central, bloqueando o influxo do íon e a despolarização do neurônio, bloqueando a liberação de neurotransmissores excitatórios (JaeIn Lee *et al.*, 2020). Além disso, inibe a expressão da enzima ciclo-oxigenase 2 (COX-2) e suprime outros componentes imunes com impacto sobre a neuropatia periférica, como na atividade de células *natural killer* ativadas e na proliferação de linfócitos que acompanham a lesão crônica no nervo (JaeIn Lee *et al.*, 2020; Kremer *et al.*, 2016).

2.3 Modelo de dor oncológica

Os modelos pré-clínicos para o estudo da dor são relevantes para compreender os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pela geração da dor inflamatória crônica e permite identificar e validar numerosos fármacos analgésicos candidatos (Muley; Krustev; McDougall, 2016). Em condições normais, a inflamação aguda é essencial para proteger o nosso organismo dos agentes patogênicos invasores, bem como para promover

a remodelação e a reparação dos tecidos. Pelo contrário, a inflamação crônica, que se prolonga por 6 semanas ou mais, não tem qualquer efeito benéfico e resulta em danos nos tecidos e dor (Su; Sun; Chen, 2014).

Um dos modelos mais estabelecidos para o estudo do câncer é feito através do tumor de Ehrlich. Trata-se de um tumor murino agressivo e de rápido crescimento, facilmente transplantável que apresenta a forma ascítica, quando as células são inoculadas no peritônio, ou a forma sólida quando inoculada por via subcutânea. Na forma ascítica, o processo inflamatório costuma gerar um aumento da permeabilidade vascular, evoluindo para um quadro anêmico, aumento progressivo do tamanho do peritônio, insuficiência cardíaca e morte (Radulski *et al.*, 2023). A administração das células do tumor de Ehrlich pode representar um novo modelo para o estudo da dor oncológica através dos mecanismos de proliferação tumoral, bem como das respostas inflamatórias e oxidativas que formam o microambiente tumoral (Calixto-Campos *et al.*, 2013; Radulski *et al.*, 2023).

O tumor de Ehrlich é um adenocarcinoma mamário murino, transplantável pela inoculação intraperitoneal que desenvolve o tumor na forma ascítica (Ahmed; Chatterjee; Debnath, 1988; Klein; Révész, 1953). A ascite do tumor tem sido usada como modelo experimental para avaliar a influência de drogas com potencial antiproliferativo e a resposta do hospedeiro contra as células tumorais (Kumar *et al.*, 2009). Já a inoculação subcutânea forma um tumor sólido. Este modelo é caracterizado por ser um tumor bem definido, de crescimento rápido, com hiperalgesia mecânica e térmica e evidente comportamento de dor no animal, sendo um modelo adequado para o estudo dos mecanismos na dor oncológica e para testes de novos tratamentos (Calixto-Campos *et al.*, 2013; Lúcia Zaidan Dagli; Luiz Guerra; Hilário Nascimento Saldiva, 1992; Singh *et al.*, 2023).

Mediadores pró-inflamatórios como as prostaglandinas, citocinas, quimiocinas, proteases, neuropeptídeos e fatores de crescimento são liberados nos locais de inflamação e são capazes de sensibilizar os neurônios periféricos que detectam a dor.

Por outro lado, modelos de dor associados a articulação, como modelo de osteoartrite com administração intra-articular de adjuvante completo de Freund (Shuang *et al.*, 2014), degradação de colágeno (Rogart; Barrach; Chichester, 1999) ou Iodoacetato

monossódico (MIA) (Liu *et al.*, 2011) causam hipersensibilidade à aplicação aguda de estímulos nocivos (hiperalgesia) e não nocivos (alodinia).

2.4 *Arrabidaea chica* (Humb & Bonpl)

A espécie *Arrabidaea chica* (Humb & Bonpl) pertence à família Bignoniaceae onde estão compreendidos mais de 100 gêneros e 800 espécies (Behrens; Tellis; Chagas, 2012). Sua classificação taxonômica consiste conforme Cronquist (1981) segue descrita:

Divisão: *Magnoliophyta*

Classe: *Magnoliopsida*

Subclasse: *Asteridae*

Ordem: *Scrophulariales*

Família: *Bignoniaceae*

Gênero: *Arrabidaea*

A espécie apresenta como sinonímia os termos Crajiru, Carajeru, Chica, Cipó Cruz, Cuica, Pariri, Parapari (Barros, 2018; Silva-Silva *et al.*, 2021).

Arrabidaea chica apresenta-se como uma liana lenhosa, arbustiva ou arbórea e também trepadeira (Behrens; Tellis; Chagas, 2012). Possui folhas compostas, bi ou trifolioladas, penaticompostas do tipo imparipenadas, de folíolos glabros, oblongo-lanceolados, com glândulas esparsas e com fitotaxia tipo oposta dística. Sua cutícula é estriada e os estômatos são anisocíticos. As flores são campanuladas róseo-lilacinas dispostas em panículas terminais, medindo entre 18 e 20 cm de comprimento. O fruto tem o aspecto de uma cápsula linear, alongada, aguda em ambos os lados, glabra e castanho-ferrugínea, com uma nervura média saliente nas valvas e sementes ovóides. A fixação ao substrato é feita através de folhas modificadas denominadas gavinhas, consideradas órgãos de suporte do vegetal (Do Nascimento *et al.*, 2022).

O caule apresenta estruturação reticulada de parênquima e esclerênquima junto aos tecidos condutores e aos cristais prismáticos na medula (Puhl *et al.*, 2007). O corte transversal do caule evidencia as porções da casca e cilindro central em estrutura secundária. Ambos se apresentam envoltos por uma periderme que contém algumas lenticelas em sua superfície além de um felogênio bem característico e feloderme. Estão

presentes ainda algumas fibras isoladas e calotas de fibras no parênquima cortical externo, enquanto o parênquima cortical interno apresenta faixas esclerenquimáticas contínuas entre as células do parênquima. O floema secundário apresenta-se estreito, comprimido entre o parênquima cortical interno e o xilema secundário. O câmbio vascular mostra grande diferenciação entre o floema e a camada mais externa de crescimento do xilema. As folhas em corte transversal apresentam pecíolo com formato plano-convexo ou levemente côncavo-convexo em toda a sua extensão, epiderme uniestratificada apresentando tricomas e cutícula delgada. O colênquima angular é observado subjacente à epiderme em toda a extensão do pecíolo. As folhas são hipoestomáticas e dorsiventrais, com mesófilo heterogêneo, formado por dois estratos de parênquima paliçádico abaixo da epiderme adaxial e por seis estratos de parênquima lacunoso abaixo da epiderme abaxial (ALVES, 2008).



Figura 2: Imagem aérea da espécie *Arrabidaea chica* (Fonte: Fitoterapia Brasil).

Na distribuição geográfica, a espécie destaca-se no Brasil central com prevalência desde a região Amazônica até o Rio Grande do Sul, incluindo a região de cerrado e mata atlântica. A parte medicinal da planta são as folhas e podem ser usadas frescas ou secas, podem ser utilizadas na forma de infusões, tinturas ou cápsulas. O seu uso popular são empregadas em cólicas intestinais, diarreias sanguinolentas, anemias e feridas na pele. O gênero *Arrabidaea* contém compostos químicos como flavonóides, particularmente as antocianinas e desoxianticianidinas. Nas espécies também foram encontrados outros fenólicos, atraquinolonas, esteróides, triterpenos e saponinas (Barbosa *et al.*, 2008; Braga;

Schiozer; Barata, 2005; Gemelli *et al.*, 2015). A Figura 2, ilustra imagem aérea da *Arrabidaea chica*, exibindo suas folhas e flores.

Descrito na revisão de Behrens (2012), os primeiros a estudarem as folhas da *Arrabidaea chica*, Chapman e colaboradores (1927), isolando dois pigmentos denominados carajurina e carajurona, cuja estrutura foi elucidada completamente por Zorn e colaboradores (2001). Estes pigmentos são responsáveis pela coloração avermelhada característica dos extratos (Behrens; Tellis; Chagas, 2012). Posteriormente, Takemura e colaboradores isolaram das folhas de *Arrabidaea. chica*, o flavonóide thevetiaflavona e posteriormente carajuflavona e luteolina (Takemura *et al.*, 1995).

As suas propriedades farmacológicas têm ação anti-inflamatória e adstringente, usado também no tratamento de inflamações uterinas, além do controle da pressão arterial. Entre outra propriedade terapêuticas destaca-se a ação anti-hipertensiva e vaso relaxante em testes *in vitro*, sugerindo que este efeito seja mediado por via independente do endotélio, que parece envolver o bloqueio de influxo de cálcio na membrana citoplasmática com atividade dos receptores de rianodina (Cartágenes, 2010; Takemura *et al.*, 1995).

Outros estudos apontam ainda propriedades do extrato e frações da *Arrabidaea chica* com atividade anti fúngica, anti-bacteriana (Mafioleti *et al.*, 2013), anti-leishmania (Cortez de Sá *et al.*, 2015), cicatrizante (Jorge *et al.*, 2008), anti-angiogênica e diurética (Do Amaral *et al.*, 2012; Michel *et al.*, 2015) e anti-tumoral (Ribeiro *et al.*, 2012). No contexto da dor, extrato hidroalcoólico e frações obtidas de *A. chica* mostraram efeito analgésico em modelo de osteoartrite (Vasconcelos *et al.*, 2019, 2021).

Desta forma a presente proposta tem como hipótese que o extrato hidroalcoólico e a fração acetato de etila originados das folhas da espécie *Arrabidaea chica* podem tratar a dor oncológica por mecanismos diretos e indiretos, eliminando as células tumorais e modulando as vias nociceptoras, respectivamente. Para isso, foi aplicado o modelo murino de tumor de Ehrlich, já validado como um ensaio *in vivo* para estudo da dor associada ao câncer.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar da atividade analgésica do extrato hidroalcoólico e fração acetato de etila das folhas *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot (Bignoniaceae) em modelo de dor oncológica de tumor sólido de Ehrlich.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o desenvolvimento do tumor sólido de Ehrlich em animais tratados com extrato e fração de acetato de etila das folhas de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot (Bignoniaceae).
- Determinar o efeito analgésico do extrato e fração acetato de etila das folhas *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot (Bignoniaceae) em modelo murino de dor oncológica com o tumor de Ehrlich.
- Avaliação das citocinas inflamatórias no soro dos animais tratados com extrato e fração de acetato de etila das folhas de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot (Bignoniaceae).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Extrato de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot (Bignoniaceae)

O estudo utilizou o extrato hidroalcoólico padronizado e a fração acetato de etila descrito por Vasconcelos et.al 2019 e 2021, respectivamente, gentilmente cedidos pelo Laboratório Experimental da Dor (LEED). Brevemente, as folhas de *Arrabidaea chica* foram coletadas na área urbana da cidade de São Luís - MA, localizada sob as coordenadas: 2° 33'29" S, 44° 18'30" W, no mês de maio de 2016, entre 5 e 6 horas da tarde. A exsicata da planta foi depositada no Herbário "Atico Seabra" da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), sob registro 1.067. As folhas coletadas foram secas a 40 °C em estufa de circulação de ar e pulverizadas em moinho elétrico para obtenção do pó, que foi macerado em etanol 70% na proporção de 1:4 (m/v), sob agitação manual diária, com três mudanças sucessivas do veículo extrator a cada 72 h, com a renovação do solvente. No final deste processo, os extratos foram reunidos, filtrado em gaze e concentrado em rotaevaporador sob pressão reduzida e a uma temperatura de 40° C. O extrato hidroalcoólico (70% v/v) foi depois dissolvido em metanol/água (80:20 v/v), sob agitação, e a solução extractiva foi depois submetida a uma partição líquido-líquido com acetato de etila. A solução foi filtrada e concentrada em evaporador rotativo a 40 °C sob vácuo para obtenção da fração que foi liofilizada antes do uso. O trabalho é parte de um projeto maior que está cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob o código AAF93D3. Em anexo, o cromatograma do extrato hidroalcoólico utilizado no estudo e gentilmente cedido pelo grupo (Anexo A) descrito por Vasconcelos *et.al* (2021).

4.2 Desenho Experimental *in vivo* de tumor murino de Ehrlich

Foram utilizados 34 camundongos da espécie Swiss adultos (± 45 dias de idade), machos e fêmeas, obtidos do Biotério Central da UFMA (Certificado/CEUA N°29/2022, Processo N°23115.000923/2022-93/UFMA, Anexo B). Estes animais permaneceram no biotério setorial da pós-graduação durante o período experimental, onde foram alimentados com ração padrão e água *ad libitum* e mantidos sob condições controladas de luz e temperatura, respeitando todos os parâmetros éticos do CONCEA.

Neste estudo, os animais foram divididos em 5 grupos experimentais, como descrito a seguir: **1) Sham**: Animais inoculados com células inviáveis tratado com salina, (n=6); **2) Controle negativo (CN)**: Animais inoculados com células viáveis e tratado com salina (n=6); **3) Controle positivo (CP)**: Animais inoculados com células viáveis e tratado com pregabalina na concentração de 15mg/kg (n=6); **4) Grupo Extrato (E)**: Animais inoculados com células viáveis e tratado com extrato hidroalcoólico de *Arrabidaea chica* na concentração de 250mg/kg (n=8); e **5) Grupo Fração (F)**: Animais inoculados com células viáveis e tratado com fração acetato de etila de *Arrabidaea chica* na concentração de 1mg/kg (n=8). As doses utilizadas seguiram trabalhos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa conforme descrito por Vasconcelos *et.al* (2021).

Para a indução do tumor sólido de Ehrlich, as células tumorais foram obtidas através coleta e centrifugação da ascite mantida no Laboratório de Imunologia Aplicada ao Câncer. Parte das células foram fixadas em etanol P.A. na concentração de 1×10^6 células/mL para inviabilização, ou seja, os animais inoculados com estas células não desenvolveram o tumor. Este procedimento mantém a integridade da estrutura celular, sem manter a viabilidade. A viabilidade e a contagem das células foram feitas na câmara de Neubauer, utilizando o corante Azul de Tripán 0,04%, onde os animais inoculados com células viáveis desenvolveram o tumor. A inoculação do tumor foi realizada por via subcutânea com 20µL da suspensão de células viáveis (não coradas) ou inviáveis (coradas) na pata direita na concentração $2 \cdot 10^6$ /mL de células em Solução tampão de fosfato (PBS) (Dagli; Guerra; Saldiva, 1992) (Figura 3).

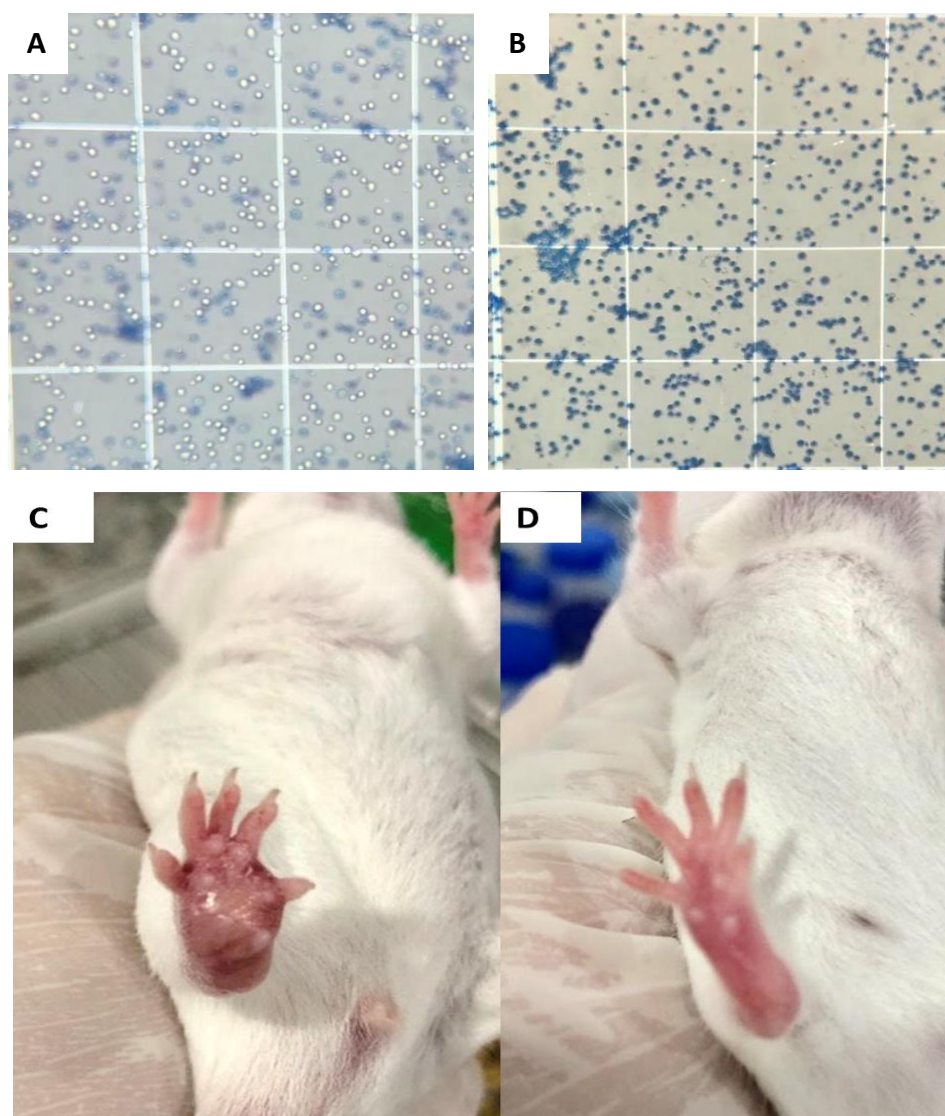


Figura 3: Imagem das células obtidas do tumor ascítico de Ehrlich para inoculação nos animais. (A) Imagem do campo em aumento de 20x para contagem das células viáveis, caracterizadas por não corarem com o Azul de Tripán. (B) Imagem do campo em aumento de 20x para contagem das células inviáveis, após incubação com etanol, caracterizadas por incorporarem o corante. (C) Imagem da pata inoculada com tumor viável, após 12 dias. (D) Imagem do pé inoculada com tumor inviável, após 12 dias.

Após 24h de inoculação, os animais foram tratados diariamente, por via oral (gavagem), conforme o grupo experimental. Após o tratamento foi avaliado o comportamento para análise de dor e realizada a medição das patas por paquimetria, com registro da largura, espessura e comprimento, para acompanhamento do crescimento tumoral. No 13º dia, os animais foram eutanasiados e as patas coletadas para pesagem. O sangue foi obtido por punção cardíaca e adicionado em tubo contendo EDTA a 5%, posteriormente, foi centrifugado por 10 minutos a 1200 rpm, para separação e coleta do plasma. A figura 4 representa o desenho experimental do trabalho.

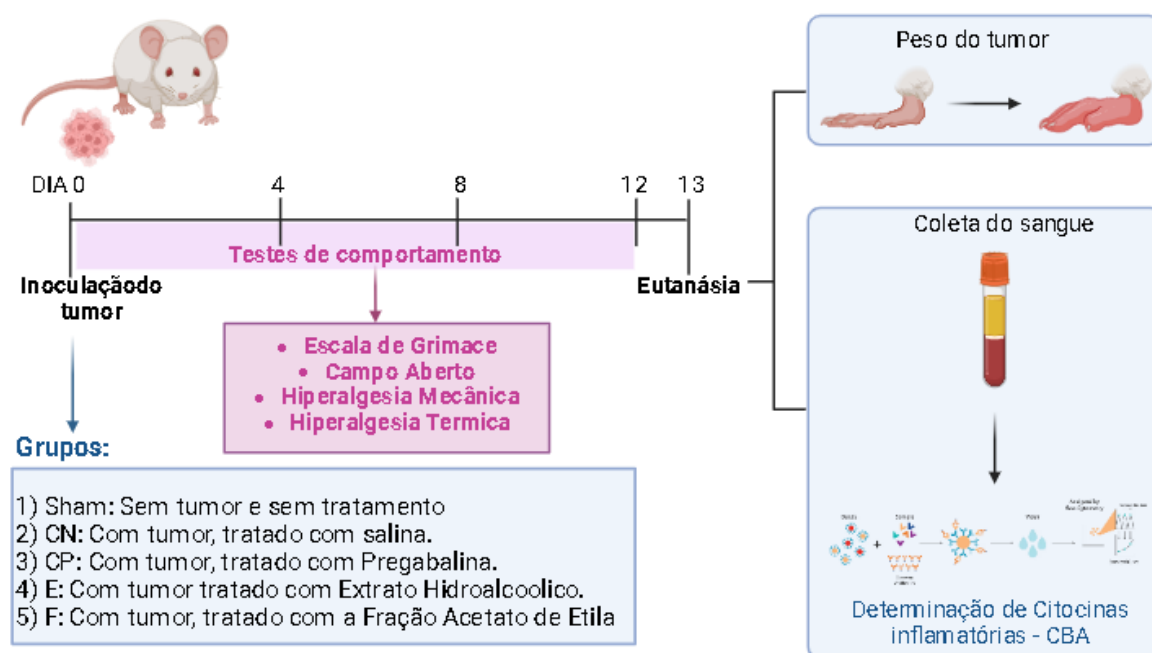


Figura 4: Desenho experimental do tratamento dos animais para avaliação de dor em modelo murino de tumor sólido de Ehrlich (Fonte: software BioRender).

4.3 Avaliação do desenvolvimento tumoral

A avaliação do desenvolvimento tumoral foi determinada com a medida do volume da pata, a cada 4 dias, com o uso de paquímetro digital, mensurando a largura, o comprimento e a espessura da pata imaculada com tumor (direita) e da pata controle (esquerda). Os valores foram expressos em mm^3 pela diferença do volume entre a pata direita e a pata esquerda expressa em gráficos cinéticos durante o período experimental (Tilburt *et al.*, 2011).

4.4 Avaliação de comportamento de dor espontânea (Grimace Scale)

Os animais foram colocados em compartimentos de vidro transparente à temperatura ambiente. Após um período de aclimação de 15 min, os animais foram observados por 10 minutos através da alteração na expressão facial da escala de Grimace: aperto orbital, protuberância do nariz, protuberância da bochecha, posição da orelha e alteração do bigode, adotando o protocolo adaptado por Sotocinal *et al* (Sotocina *et al.*, 2011) (Anexo C). As avaliações foram realizadas de forma independente por dois observadores.

4.5 Campo aberto na avaliação da atividade motora

O teste do campo aberto pode ser avaliado a capacidade motora, associada aos campos percorridos em um tempo definido e a emocionalidade do animal avaliada pelas regiões do campo mais percorridas. Os animais foram avaliados a cada quatro dias, no período da manhã, em local climatizado e silencioso. Os animais eram posicionados na periferia do campo e registrado por vídeo durante um minuto, antes de cada procedimento o campo era higienizado com álcool etílico 70%. Para o teste de atividade motora, foram contabilizados os quadrantes invadidos durante o tempo marcado de um minuto (Gould; Dao; Kovacsics, 2009).

4.6 Avaliação da hiperalgesia mecânica

Para esta avaliação os animais foram colocados em caixas individuais de acrílico transparente sobre plataforma elevadas para permitir acesso à parte inferior. A hiperalgesia mecânica foi realizada em camundongos através do reflexo de flexão da pata traseira com um transdutor de força manual (anestesiômetro eletrônico von Frey: Insight, Ribeirão Preto, SP, Brasil) adaptado com uma ponta de polipropileno com área de contato de 0,5 mm². Foram realizados dois estímulos na pata direita e na pata esquerda para cálculo da média/pata. A pata esquerda, que não foi inoculada, teve o valor considerado normal. Os resultados foram expressos por delta (Δ) limite de retirada (em g), que foi calculado subtraindo o valor médio da pata direita, inoculada com as células inviáveis ou viáveis do tumor de Ehrlich das medidas médias da pata esquerda, de cada animal após o estímulo (Ribeiro *et al.*, 2012).

4.7 Hiperalgesia térmica

A hiperalgesia térmica foi avaliada mediante contenção dos camundongos em um becker de vidro mantido sobre uma placa quente à temperatura de 55 ° C. O tempo de reação foi contado quando o animal manifestava salto, estremecimento e/ou lambedura das patas. Uma latência máxima (ponto de corte) foi definida em 1 minuto para evitar danos aos animais (Ribeiro *et al.*, 2012).

4.8 Dosagem de citocinas por *cytometric beads array* (CBA)

A análise foi realizada conforme as orientações do fabricante, que resumidamente consiste no uso do kit CBA (BD) (*cytometric beads array*) inflamatório para camundongo, quantificando as citocinas IL-12p70, INF γ , TNF, IL-6, MCP-1 e IL-10 em uma mesma amostra. As seis populações de beads com distintas intensidades de fluorescência são conjugadas com um anticorpo de captura específico para cada citocina, misturadas para formar o CBA e lidas no canal FL3 do citômetro de fluxo FACScalibur (BD). O mix de beads foram misturados com alíquota da curva padrão (concentrações de 0-5.000pg/mL) e com as amostras de plasma dos animais, que foram obtidas por punção cardíaca realizada no último dia do experimento. Após, foram adicionadas a curva e as amostras o anticorpo de detecção conjugado com o fluorocromo PE, e incubadas por duas horas, a temperatura ambiente e protegidas da luz. Os resultados foram gerados em gráficos e tabelas utilizando-se o software CellQuest (BD).

4.9 Análise estatística

A comparação das médias de diferentes grupos experimentais foi realizada com teste t de Student ou análise de variância univariada (One-way ANOVA), seguida pelo teste de Tukey. Na avaliação de duas fontes de variabilidade foi utilizada análise de variância bivariada (Two-way ANOVA). O valor de $p < 0,05$ foi considerado como indicativo de significância e os dados obtidos foram analisados através do software “GraphpadInstat® (GraphPad software, San Diego, CA).

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação do peso corporal e desenvolvimento do tumor sólido

Durante os doze dias de experimento, os animais foram pesados e tiveram as patas medidas, a cada quatro dias. Os resultados mostraram que a presença do tumor e o tratamento não alteraram o peso corporal dos animais ao longo do tratamento, não diferindo do grupo controle negativo.

Quanto ao desenvolvimento do tumor, o extrato hidroalcoólico e a fração acetato de etila da espécie *Arrabidaea chica* não apresentou diferença no volume do tumor quando comparado com o controle negativo, ao longo dos 12 dias de tratamento. Mesmo havendo uma tendência na redução da medida do tumor, os grupos tratados com a droga padrão e extrato não apresentam diferença significativa quando comparado ao grupo controle (Figura 5A). Entretanto, ao final do tratamento, os dados mostraram uma redução significativa do peso do tumor nos animais tratados com extrato, de forma semelhante ao controle positivo. Apesar de uma tendência a redução, o tratamento com a fração não apresentou diferença quando comparado com controle negativo (Figura 5B).

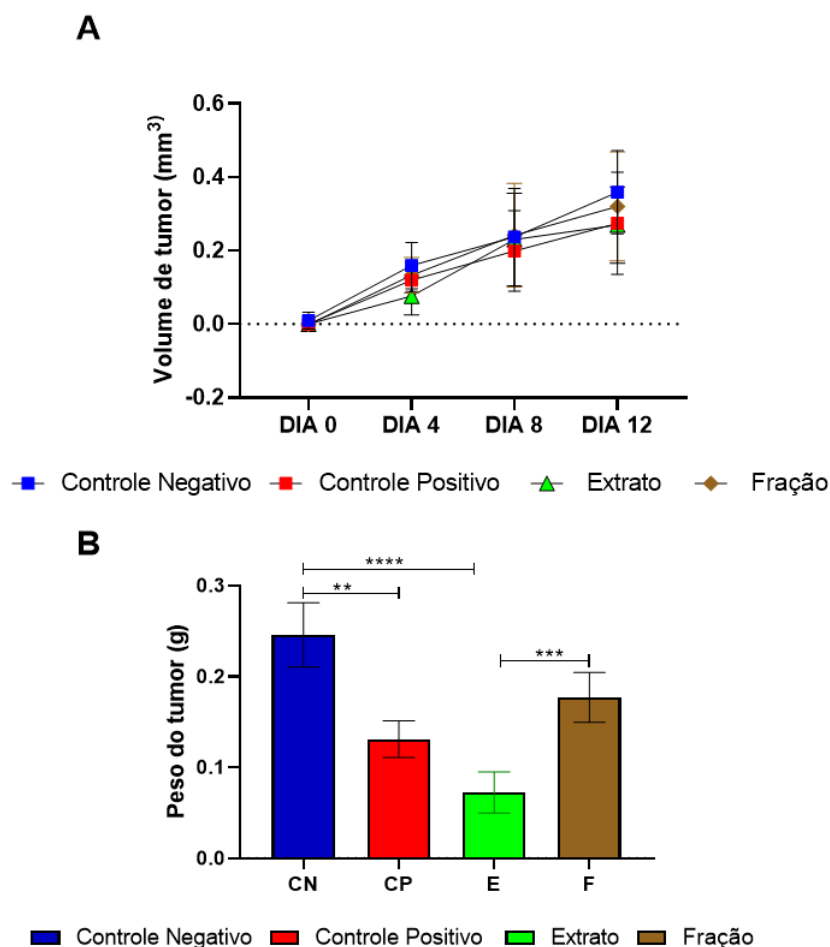


Figura 5: Análise dos animais quanto ao peso do tumor e desenvolvimento do tumor. (A) Gráfico de linha com a evolução cinética do volume médio do tumor durante doze dias. (B) Média do peso do tumor após os doze dias de tratamento. O grupo tratado com salina foi considerado o controle negativo (CN), o grupo tratado com Pregabalina foi identificado como controle positivo (CP), e os grupos experimentais foram tratados com extrato hidroalcoólico (E) ou com a fração acetato de etila (F). Os valores foram analisados usando o teste One-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey com $**p < 0,001$, $***p < 0,0003$ e $****p < 0,0001$.

5.2 Análise do comportamento de dor espontânea e atividade motora no Campo aberto

Os dados obtidos na escala de Grimace permitiram avaliar em uma escala de 0 a 10 expressões que caracterizam presença ou ausência de dor no animal. Ao longo do experimento, os animais foram avaliados a cada quatro dias e observado conforme as expressões da tabela para determinação do escore. Os dados mostram que o tratamento e a presença ou não do tumor não influenciaram as expressões dos animais. Assim, o desenvolvimento do tumor não foi suficiente para determinar dor espontânea, bem como, os tratamentos utilizados não influenciaram o comportamento dos animais. Foram observados escores maiores de 1 e 2 ao final do período experimental no grupo controle positivo (CP) e fração acetato de etila (F), no

entanto não foi estatisticamente significativa, mas pode sugerir maior incômodo dos animais com a manipulação durante todo o experimento.

Na análise da atividade motora pelo teste de campo aberto, os resultados mostraram que o desenvolvimento do tumor na pata dos animais não impediu o deslocamento no campo. Antes da inoculação do tumor, não houve diferença entre os grupos, apresentando valores médios de campos percorridos semelhantes. Após 4 dias, foi observado que o controle que desenvolveu o tumor sólido (Controle negativo) teve menor atividade motora comparado ao animal normal (Sham), ambos tratados com salina. Entretanto, essa diferença não foi observada nos demais grupos tratados com Pregabalina, extrato hidroalcoólico e fração, sugerindo que mesmo desenvolvendo o tumor, os tratamentos melhoraram a atividade motora, sem diferença para o animal normal. No décimo segundo dia, os animais com tumor que receberam salina apresentaram uma menor atividade motora comparados ao grupo Sham. Por outro lado, apenas os animais do grupo controle positivo tiveram aumento significativo da atividade motora, quando comparado ao controle negativo. O tratamento com extrato e fração apresentaram número de campos que não diferiu de ambos os controles (Figura 6).

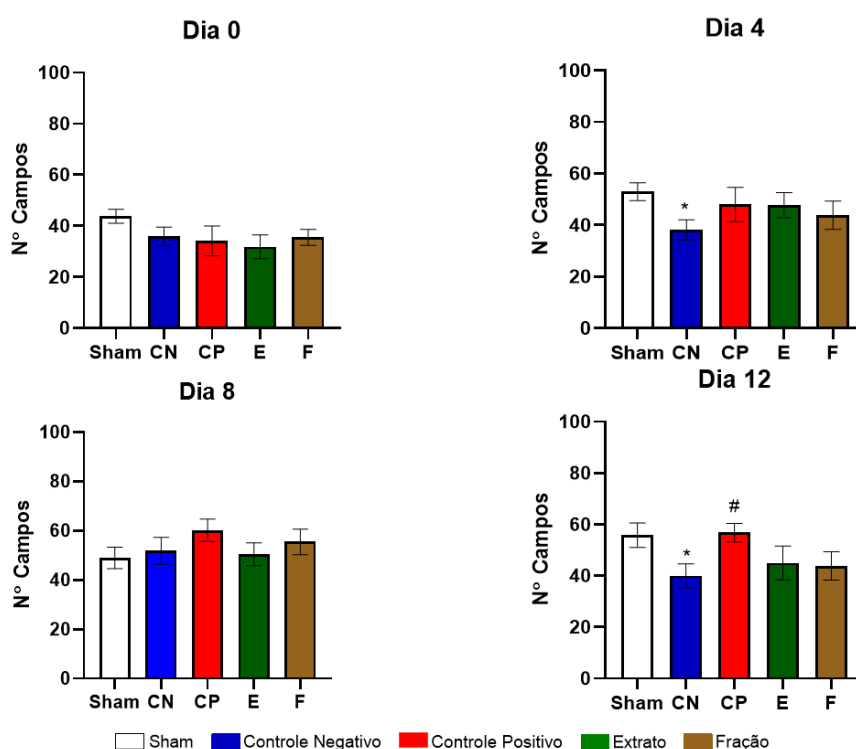


Figura 6: Gráfico com a média de campos invadidos nos diferentes tratamentos durante os doze dias de tratamento. As médias foram analisadas aplicando o teste t student não-pareado e consideradas significantes com * $p < 0.05$ quando comparado com o grupo Sham (sem tumor tratado com salina) e # $p < 0.05$ quando comparado com o grupo Controle negativo (com tumor tratado com salina).

5.3 Avaliação da hiperalgesia mecânica

No teste de Von Frey foi determinada a gramatura (g) do transdutor de força manual, os valores indicam o limiar mecânico frente ao estímulo não doloroso. Ao longo do experimento, foi observada uma redução do limiar mecânico no grupo com tumor tratado com salina, apresentando uma redução significativa no 12º dia, quando comparado com o grupo sem tumor que recebeu salina (Sham). Em presença do tumor, os tratamentos mostraram uma tendência a manter o limiar próximo ao grupo Sham, apenas o grupo controle positivo apresentou aumento do limiar quando comparado com o controle negativo (Figura 7).

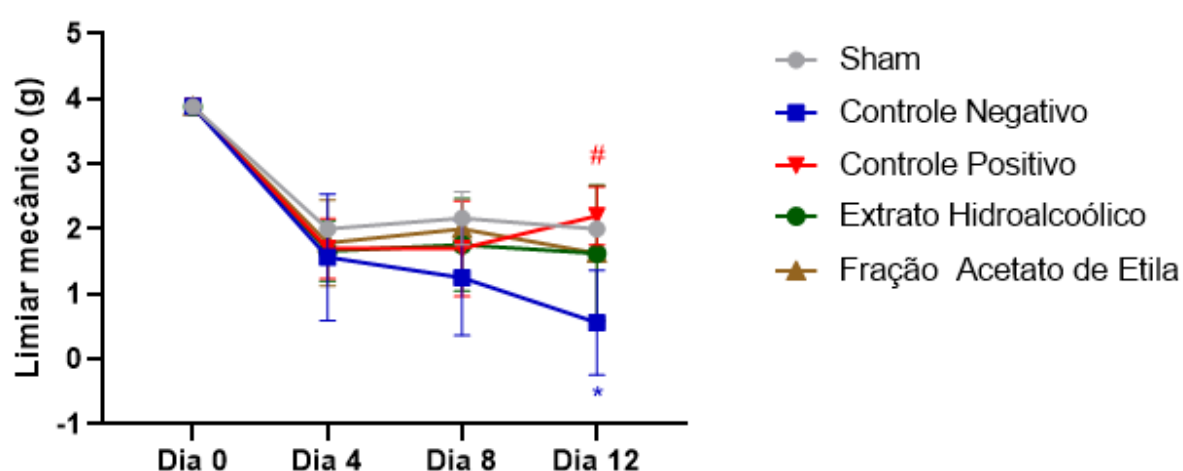


Figura 7: Limiar mecânico dos animais tratados com extrato e fração de *Arrabidaea chica*. As médias foram analisadas aplicando o teste t student não-pareado e consideradas significantes com * $p < 0.05$ quando comparado com o grupo Sham (sem tumor tratado com salina) e # $p < 0.05$ quando comparado com o grupo Controle negativo (com tumor tratado com salina).

5.4 Determinação da sensibilidade à dor por estresse térmico

O teste de hiperalgesia térmica permite avaliar a sensibilidade à dor através do estímulo térmico. No quarto dia, o grupo com tumor tratado com extrato apresentou um aumento da resistência à dor por estresse térmico, quando comparado com controle negativo. Com 8 dias de tratamento, apenas o controle positivo mostrou aumento da tolerância ao estresse térmico, comparado ao controle negativo, que se manteve no décimo segundo dia de tratamento. O grupo com tumor tratado com salina se mostrou mais sensível à dor, quando comparado com o grupo Sham, sugerindo que a presença do tumor neste estágio de desenvolvimento aumenta a sensibilidade à dor (Figura 8).

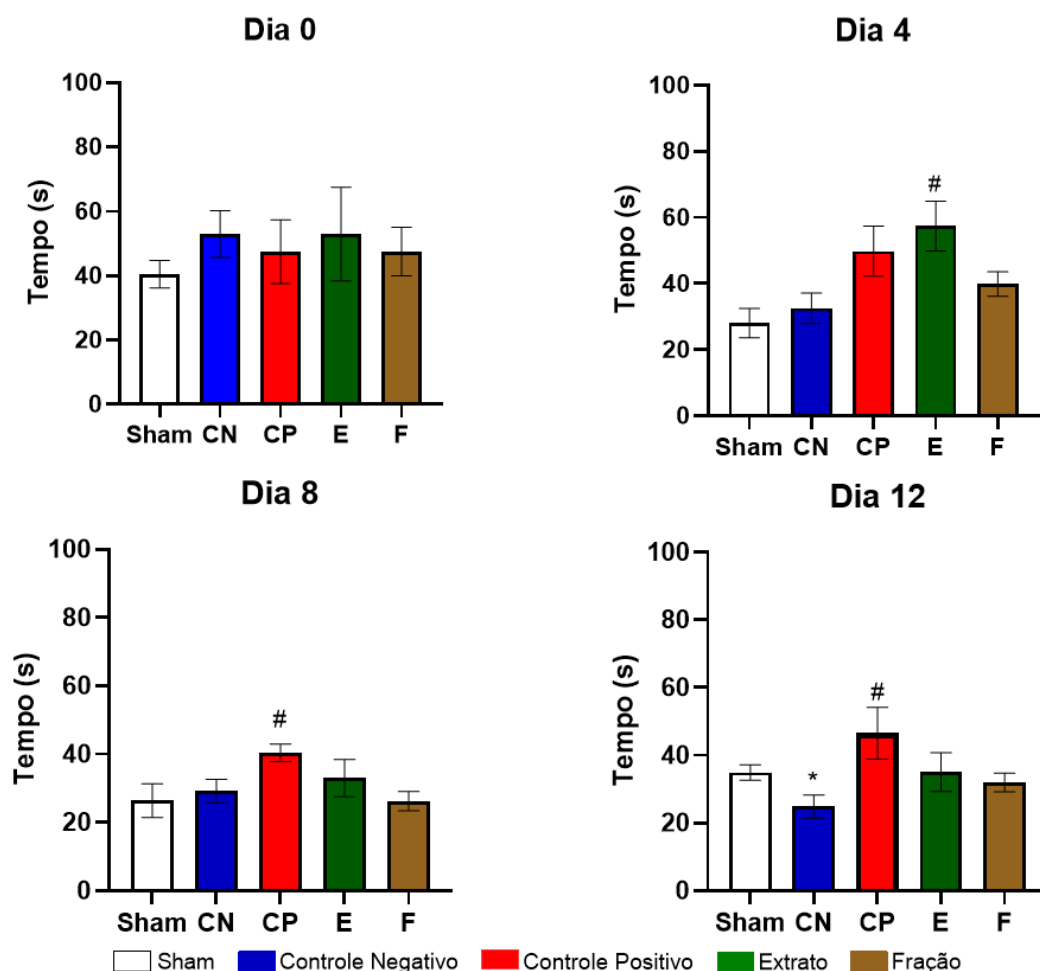


Figura 8: Tempo de permanência dos animais em contato com o estímulo algésico de estresse térmico durante o tratamento com extrato e fração de *Arrabidaea chica*. As médias foram analisadas aplicando o teste t student não-pareado e consideradas significantes com * $p < 0.05$ quando comparado com o grupo Sham (sem tumor tratado com salina) e # $p < 0.05$ quando comparado com o grupo Controle negativo (com tumor tratado com salina).

5.5 Dosagem de citocinas inflamatórias

A análise sérica de citocinas inflamatórias mostrou a presença da citocina IL12p70 em concentração significativamente maior nos animais inoculados com tumor sem tratamento, quando comparado com o grupo Sham. Os animais tratados com extrato e fração acetato de etila apresentaram uma redução na concentração, junto com o grupo controle positivo, entretanto sem significância. A presença de TNF foi menor no grupo tratado com a fração acetato de etila quando comparado ao controle negativo, com valores semelhantes ao grupo Sham. Outra citocina inflamatória relevante foi a MCP-1 que, de forma semelhante, apresentou um aumento com a presença do tumor no grupo controle negativo. Entretanto, neste caso, o tratamento com extrato e fração acetato de etila mostrou uma redução significativa na

concentração desta citocina quando comparado ao grupo controle negativo. A presença de IFN- γ não mostrou diferença significativa, mas os grupos tratados com extrato e fração mostraram uma tendência de redução dos valores. Na análise das concentrações de IL-10 os animais inoculados com tumor apresentaram concentrações superiores ao grupo Sham, mas sem diferença estatística. Não foi detectada a presença de IL-6 nas amostras (Figura 9).

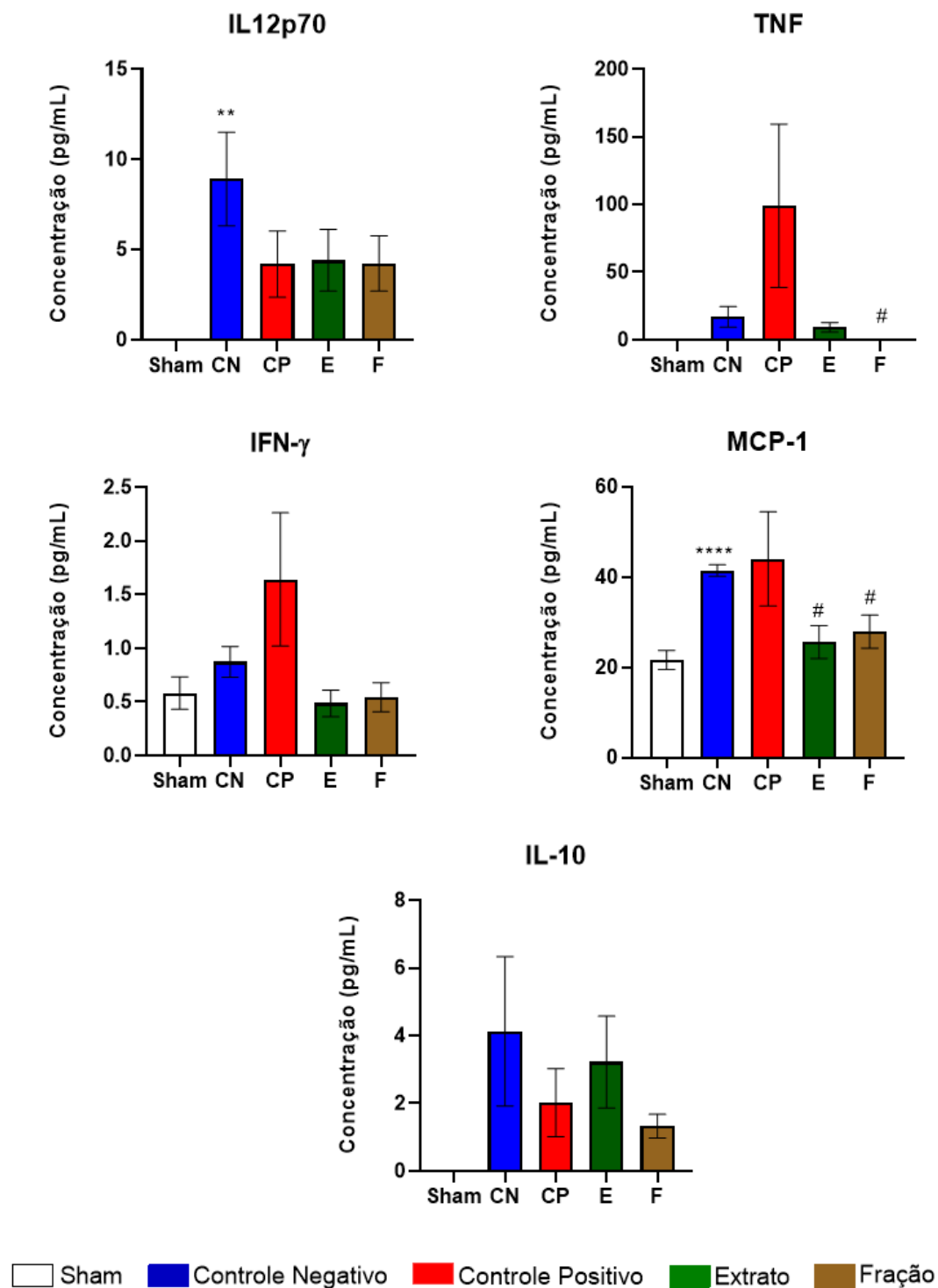


Figura 9: Perfil de citocinas séricas após o tratamento com extrato e fração de *Arrabidaea chica*. As médias foram analisadas aplicando o teste t student não-pareado e consideradas significantes com ** $p=0,0064$ e $p<0,0001$ quando comparado com o grupo Sham (sem tumor tratado com salina) e # $p<0.05$ quando comparado com o grupo Controle negativo (com tumor tratado com salina).

6. DISCUSSÃO

O câncer é uma doença com impacto mundial e a evolução no tratamento tem aumentado a expectativa de vida dos pacientes, nesse contexto, a dor surge como um sintoma que define a presença e evolução da doença, já que 30-50% dos pacientes oncológicos têm experiência de dor moderada a severa e 75-95% dos pacientes com metástase relatam dor (Mantyh *et al.*, 2002). Por outro lado, na busca de novos fármacos, a espécie *Arrabidaea chica* tem mostrado um potencial anti-inflamatório, analgésico e antitumoral (Michel *et al.*, 2015; Ribeiro *et al.*, 2012). Assim, o presente estudo buscou avaliar o potencial do extrato hidroalcoólico e da fração acetato de etila de *Arrabidaea chica* no modelo de dor oncológica.

Inicialmente, o trabalho evidenciou que não houve alteração no peso corporal e no desenvolvimento do tumor, por outro lado, o tratamento reduziu o peso do tumor. A atividade antitumoral da espécie *Arrabidaea chica* foi previamente descrita em modelo de tumor sólido de Ehrlich com tratamento de extrato aquoso e hidroalcoólico, na dose de 30 mg/kg (Ribeiro *et al.*, 2012). Considerando que existe um grande potencial para o desenvolvimento de medicamentos antitumorais partindo de espécies vegetais, como descrito por Tarik *et al.* (2017) e Khan *et al.* (2019), o presente estudo ratifica o potencial antitumoral da espécie *Arrabidaea chica*. Além disso, a composição química encontrada no extrato estudado e já descrita na literatura, os flavonoides podem ser metabólitos secundários relevantes. Os flavonóides apresentam uma atividade como antioxidantes em condições normais e são potentes pró-oxidantes nas células cancerosas, desencadeando as vias apoptóticas e desregulando as vias de sinalização pró-inflamatórias (Kopustinskiene *et al.*, 2020).

Mesmo existindo evidências sobre o potencial antitumoral do extrato de *Arrabidaea chica*, não existem dados sobre seu potencial no estudo da dor oncológica. Nesta perspectiva, o trabalho avaliou através dos testes de comportamentos sinais de dor sem estímulo (Escala de Grimace e Campo aberto), com estímulo não doloroso (Alodinia mecânica) e com estímulo doloroso (Estresse térmico).

A escala de Grimace é um método usado para mensurar a dor através de escalas de nocicepção por expressão facial e comportamento dos animais (Sotocina *et al.*, 2011). Os animais foram observados nos doze dias de experimento e não foi observada mudança significativa na expressão ou comportamento. Os valores de escores foram baixos mesmo quando o tumor estava bem desenvolvido, sugerindo que neste modelo a expressão facial não foi capaz de medir sinais de dor. As expressões faciais como leitura da neurobiologia da dor

surgiu das escalas de codificação facial humana (LeResche, 1982, 1982) e aplicação da escala de Grimace se baseia no reconhecimento de um número limitado de sinais por diferentes avaliadores, que podem estar sujeitos a um certo grau de variabilidade relacionado com diferenças de percepção, experiência clínica e conhecimento do comportamento da espécie (Weary *et al.*, 2006). Assim, aspectos relacionados à experiência subjetiva da dor e sua adaptação (Langford *et al.*, 2010) podem ser fatores que influenciam a percepção dos sinais na análise e no tempo do experimento.

Outro aspecto do comportamento que está associado à dor é a atividade motora, alguns estudos recentes começaram a empregar a utilização de movimentos voluntários como forma de quantificar o comportamento da dor (Gould; Dao; Kovacsics, 2009; Smeester; Lee; Beitz, 2017). Na análise do campo aberto foi observado que os animais com tumor tendem a se locomover menos que os animais sem tumor, havendo diferenças significativas entre o grupo controle negativo, comparado com o Sham. Todos os grupos tratados apresentaram melhora na movimentação no campo aberto no 4º e 12º dia. Em estudo com o campo aberto em modelo de dor associada à osteoartrite com adjuvante de Freund, Matson e colaboradores mostraram que a redução da atividade espontânea estava associada à dor inflamatória nas articulações do joelho (Matson *et al.*, 2007). A inflamação periférica reduz a corrida voluntária sobre rodas ou os movimentos voluntários em camundongos ou ratos (Cobos *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2012). Essas análises colaboram para o entendimento do efeito no 4º dia, pois neste período, o tumor de Ehrlich tem um aspecto inflamatório (Fecchio *et al.*, 1990; Dagli; Guerra; Saldiva, 1992).

Para avaliar a resposta reflexa dos animais evocados por estímulos não nocivos ou nocivos foram usados o teste de von Frey e do estresse térmico, respectivamente. No teste de von Frey os animais do grupo controle positivo mostraram uma maior sensibilidade ao limiar mecânico. Estudos mostram que o tumor de Ehrlich induz inflamação que colabora com a imunomodulação gerando um microambiente favorável ao tumor (Fecchio *et al.*, 1990; Feitosa *et al.*, 2021; Fernandes *et al.*, 2015). Os animais tratados com extrato e fração de *Arrabidaea chica* apresentaram uma tendência a aumento do limiar mecânico apresentando valores próximos aos grupos Sham e controle positivo, que apresentou um limiar estatisticamente maior que o grupo controle negativo. O teste de von Frey tem relevância no estudo da atividade motora, isto é, a dor que ocorre como resposta a um estímulo que, normalmente, não provocaria dor, sendo associado ao mecanismo de dor neuropática (Deuis; Dvorakova; Vetter, 2017).

A experiência da dor humana engloba múltiplas modalidades de estímulo, mecanismos moleculares distintos e componentes sensoriais, motores, vegetativos, emocionais e motivacionais que implica na sua complexidade e tratamento. No presente trabalho, foi feita também a análise da dor sob estímulo doloroso aplicando o teste de estresse térmico. Os resultados mostraram que o extrato e a fração proporcionaram maior tolerância ao estímulo doloroso, principalmente no 4º dia de tratamento, com valores significantes comparado com o controle negativo. Devido à natureza do teste que aplicam estímulos térmicos às patas traseiras, o teste integra vias supra-espinhais, uma vez que os ratos com transecção espinhal não retiram os membros traseiros no teste da placa quente (Deuis; Dvorakova; Vetter, 2017). Esses dados sugerem o mecanismo da ação alvo do extrato, nas vias de condução do sinal doloroso.

Considerando que mediadores inflamatórios são responsáveis pela sensibilização dos neurônios periféricos na percepção da dor, as citocinas séricas foram dosadas. Os resultados mostraram que as citocinas inflamatórias apresentam concentrações menores quando realizado o tratamento com extrato e fração das folhas de *Arrabidaea chica*, destacando a citocina MCP-1, que teve uma redução significativa.

A MCP-1 participa da inflamação por ser uma quimiocina responsável em recrutar monócitos, células T e células dendríticas para os locais lesionados (Singh; Anshita; Ravichandiran, 2021). Além disso, no contexto da dor, a presença expressão de MCP-1 na coluna vertebral está envolvida no desenvolvimento de alodinia mecânica, Hu *et al.* (2012) mostraram que a administração intratecal de um anticorpo neutralizante anti-MCP-1 atenuou a alodinia mecânica estabelecida em ratos em modelo de dor óssea induzida por câncer. A MCP-1 atua na ativação dos neurônios espinais e das células gliais, sendo um mecanismos envolvido na dor neuropática, devido o aumento da expressão de cicloxigenases (COX-2) na região da lesão, na medula espinal (COX2 e COX1) e no tálamo (Hu *et al.*, 2012).

Desta forma a figura 10 ilustra um resumo gráfico do mecanismo sugerido neste trabalho, no qual os metabólitos secundários presentes no extrato e na fração acetato de etila obtido das folhas da espécie *Arrabidaea chica* podem regular negativamente as vias de condução da dor, através da redução de citocinas inflamatórias, bem como, na expressão de MCP-1 pelas células gânglio da raiz dorsal (GRD). Desta forma, o processo de sensibilidade do neurônios nociceptores seriam reduzidos determinado efeito analgésico em modelo de dor oncológica.

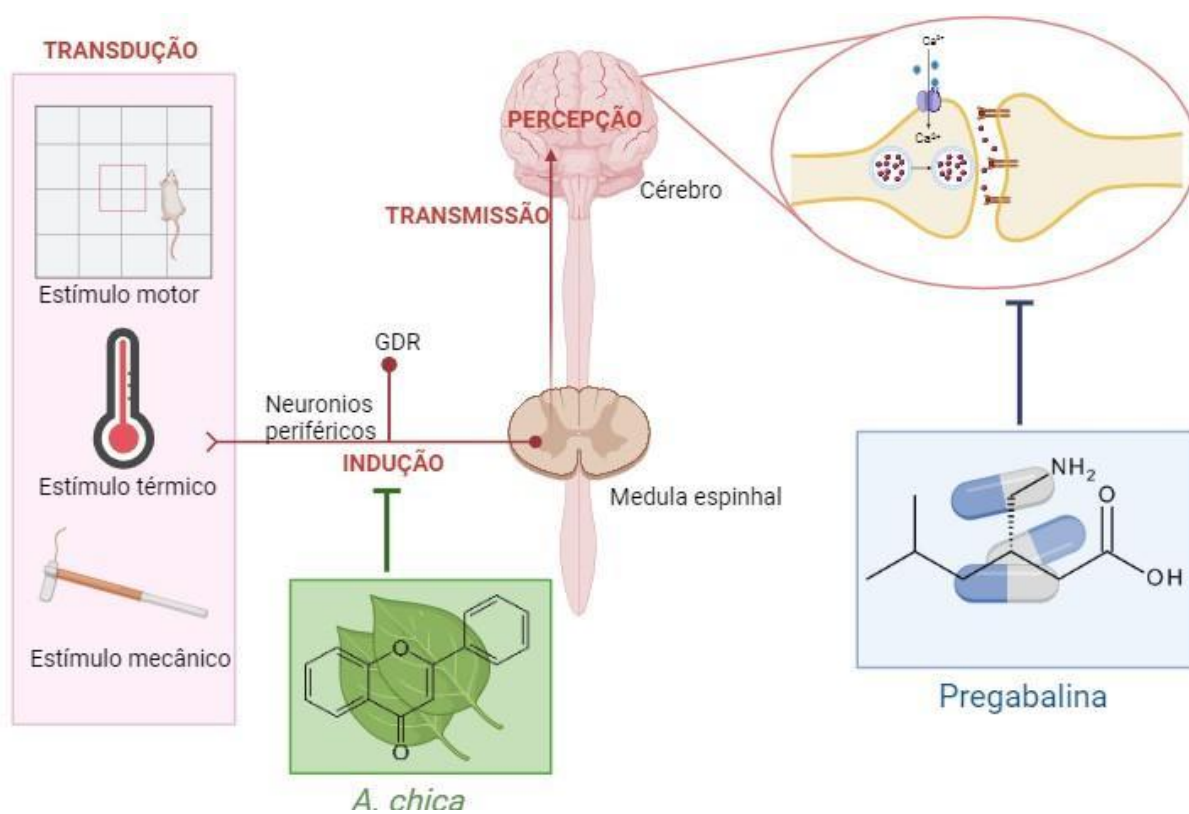


Figura 10: Ilustração da proposta de mecanismos do extrato de *A. chica* na dor oncológica.

7. CONCLUSÃO

Os dados mostraram que o extrato hidroalcoólico da espécie *Arrabidaea chica* apresentou efeito analgésico em modelo de alodínia e de estímulo doloroso, bem como, reduziu a produção de citocinas inflamatórias, principalmente MCP-1, sugerindo um possível mecanismo no controle da dor neuropática induzida no modelo de dor oncológica.

REFERÊNCIAS

AHMED, H.; CHATTERJEE, B. P.; DEBNATH, A. K. Interaction and in vivo growth inhibition of Ehrlich ascites tumor cells by jacalin. **Journal of Biosciences**, [s. l.], v. 13, p. 419–424, 1988.

ALVES, Mauro Sérgio Marques. Caracterização farmacognóstica, química, físico-química e estudos preliminares de pré-formulação da *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlt. [s. l.], 2008.

AYDOĞAN, Harun *et al.* Adding 75 mg pregabalin to analgesic regimen reduces pain scores and opioid consumption in adults following percutaneous nephrolithotomy. **Revista brasileira de anestesiologia**, [s. l.], v. 64, p. 335–342, 2014.

BAAMONDE, Ana; MENÉNDEZ, Luis. Experiences and reflections about behavioral pain assays in laboratory animals. **Journal of Neuroscience Methods**, [s. l.], v. 386, p. 109783, 2023.

BANKS, William A. Characteristics of compounds that cross the blood-brain barrier. **BMC neurology**, [s. l.], v. 9, n. Suppl 1, p. S3, 2009.

BARBOSA, Wagner Luiz Ramos *et al.* *Arrabidaea chica* (HBK) Verlot: phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 18, p. 544–548, 2008.

BARROS, Aurení Sebastiana Mendes. Investigação científica da atividade medicinal da espécie *Arrabidaea chica* (Pariri). [s. l.], 2018.

BEHRENS, Maria das Dores Dutra; TELLIS, Carla Junqueira Moragas; CHAGAS, Maria do Socorro. *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlot (Bignoniaceae). [s. l.], 2012.

BRAGA, Alice Murteira Pinheiro; SCHIOZER, Adriana; BARATA, L. Padronização de extratos de Carajiru (*Arrabidaea chica*). In: , 2005. **XIII Congresso Interno de Iniciação Científica da INICAMP. Instituto de Química–IQ, UNICAMP**. [S. l.: s. n.], 2005.

BRITO, Adriana Uchôa *et al.* Produção de biomassa aérea, teor e rendimento de extrato das folhas de carajiru [*Arrabidaea chica* (Bonpl.) B. Verlt.] em função de adubação orgânica em Manaus, estado do Amazonas, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, [s. l.], v. 17, p. 444–453, 2015.

CALIXTO-CAMPOS, Cassia *et al.* Quercetin reduces Ehrlich tumor-induced cancer pain in mice. **Analytical cellular pathology**, [s. l.], v. 2015, 2015.

CALIXTO-CAMPOS, Cassia *et al.* The Ehrlich tumor induces pain-like behavior in mice: a novel model of cancer pain for pathophysiological studies and pharmacological screening. **BioMed research international**, [s. l.], v. 2013, 2013.

CARTÁGENES, Maria do Socorro de Sousa. **Investigação dos efeitos tóxicos e anti-hipertensivo de *Arrabidaea chica* Verlot (Bignoniaceae)**. 2010a. 148 f. -

- Universidade Federal da Paraíba, [s. l.], 2010. Disponível em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/tede/6828>. Acesso em: 14 mar. 2023.
- CARTÁGENES, Maria do Socorro de Sousa. **Investigação dos efeitos tóxicos e anti-hipertensivo de Arrabidaea chica Verlot (Bignoniaceae)**. [S. l.], 2010b. Disponível em: <https://repositorio.ufpb.br>. Acesso em: 14 mar. 2024.
- CELESTE, Lorena Esmeralda Nascimento; MAIA, Maiara Rodrigues. Cuidados de enfermagem relacionados à cardiotoxicidade envolvendo drogas como a antraciclinas e anticorpo monoclonais no tratamento oncológico. **Rev PubSaúde**, [s. l.], v. 5, p. 905, 2021.
- COBOS, Enrique J. *et al.* Inflammation-induced decrease in voluntary wheel running in mice: a nonreflexive test for evaluating inflammatory pain and analgesia. **PAIN®**, [s. l.], v. 153, n. 4, p. 876–884, 2012.
- COELHO, Ronald Wagner Pereira *et al.* Penile cancer in Maranhão, Northeast Brazil: the highest incidence globally?. **BMC urology**, [s. l.], v. 18, p. 1–7, 2018.
- CORTEZ DE SÁ, Joicy *et al.* Leishmanicidal, cytotoxicity and wound healing potential of Arrabidaea chica Verlot. **BMC Complementary and alternative medicine**, [s. l.], v. 16, p. 1–11, 2015.
- COSTA, Weruska Alcoforado *et al.* Pain and quality of life in breast cancer patients. **Clinics**, [s. l.], v. 72, p. 758–763, 2017.
- CRONQUIST, Arthur. **An integrated system of classification of flowering plants**. [S. l.]: Columbia university press, 1981.
- DE CARVALHO RIBEIRO, Ana Flavia. **Avaliação das atividades antiinflamatória, antiangiogênica e antitumoral de extratos da Arrabidaea chica (Humb. & Bonpl.) B. Verlot**. [s. l.], 2012.
- DE OLIVEIRA SANTOS, Marcell *et al.* Estimativa de incidência de câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, [s. l.], v. 69, n. 1, 2023.
- DEUIS, Jennifer R.; DVORAKOVA, Lucie S.; VETTER, Irina. Methods used to evaluate pain behaviors in rodents. **Frontiers in molecular neuroscience**, [s. l.], v. 10, p. 284, 2017.
- DO AMARAL, Raquel R. *et al.* Biological activities of Arrabidaea chica (Bonpl.) B. Verl. leaves. **Lat. Am. J. Pharm**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 451–5, 2012.
- DO NASCIMENTO, Jessyane Rodrigues *et al.* A Review of the Phytochemistry and Pharmacological Properties of the Genus Arrabidaea. **Pharmaceuticals**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 658, 2022.
- DOS SANTOS, Marcos Nascimento; DE BRITO, Renan Guedes. Qualidade de vida em pacientes com diagnóstico de câncer no Brasil: uma revisão sistemática. **Research, Society and Development**, [s. l.], v. 11, n. 8, p. e28511830635–e28511830635, 2022.

FECCHIO, Denise *et al.* Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. **Inflammation**, [s. l.], v. 14, p. 125–132, 1990.

FEITOSA, Ivan Brito *et al.* What are the immune responses during the growth of Ehrlich's tumor in ascitic and solid form? **Life Sciences**, [s. l.], v. 264, p. 118578, 2021.

FERNANDES, Patrícia Dias *et al.* Characterization of the inflammatory response during Ehrlich ascitic tumor development. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, [s. l.], v. 71, p. 83–89, 2015.

FINNERUP, Nanna B. *et al.* Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Neurology**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 162–173, 2015.

FOUAD, Yousef Ahmed; AANEI, Carmen. Revisiting the hallmarks of cancer. **American journal of cancer research**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. 1016, 2017.

FREIRE, Maria Eliane Moreira *et al.* Qualidade de vida relacionada à saúde de pacientes com câncer em cuidados paliativos. **Texto & Contexto-Enfermagem**, [s. l.], v. 27, p. e5420016, 2018.

GEMELLI, Tiago Farret *et al.* Evaluation of safety of *Arrabidaea chica* verlot (Bignoniaceae), a plant with healing properties. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, [s. l.], v. 78, n. 18, p. 1170–1180, 2015.

GOULD, Todd D.; DAO, D. T.; KOVACSICS, C. E. **Mood and anxiety related phenotypes in mice: characterization using behavioral tests**. [S. l.]: Springer, 2009. v. 42

GOUVEIA, Daniele Nascimento *et al.* Natural products as a perspective for cancer pain management: A systematic review. **Phytomedicine**, [s. l.], v. 58, p. 152766, 2019.

HANAHAN, Douglas. Hallmarks of cancer: new dimensions. **Cancer discovery**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 31–46, 2022.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. **cell**, [s. l.], v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. The hallmarks of cancer. **cell**, [s. l.], v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000.

HAO, David *et al.* Interventional therapies for pain in cancer patients: a narrative review. **Current pain and headache reports**, [s. l.], v. 25, n. 7, p. 44, 2021.

HARRINGTON, Lea *et al.* Introduction to cancer biology. **The Basic Science of Oncology**, [s. l.], v. 4, p. 1–3, 2005.

HELMS, Jennifer E.; BARONE, Claudia P. Physiology and treatment of pain. **Critical care nurse**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 38–49, 2008.

HENSON, Lesley A. *et al.* Palliative care and the management of common distressing symptoms in advanced cancer: pain, breathlessness, nausea and vomiting, and fatigue. **Journal of clinical oncology**, [s. l.], v. 38, n. 9, p. 905, 2020.

HU, Ji-Hua *et al.* Involvement of spinal monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in cancer-induced bone pain in rats. **Neuroscience letters**, [s. l.], v. 517, n. 1, p. 60–63, 2012.

IBIAPINA, Waléria Viana *et al.* INSERÇÃO DA FITOTERAPIA NA ATENÇÃO PRIMÁRIA AOS USUÁRIOS DO SUS. **Revista de Ciências da Saúde Nova Esperança**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 60–70, 2014.

INCA, Instituto Nacional do Câncer; MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Cuidados paliativos oncológicos: controle da dor**. [S. l.]: Inca Rio de Janeiro, 2001.

JAEIN LEE *et al.* **Efficacy of pregabalin for the treatment of chronic pruritus of unknown origin, assessed based on electric current perception threshold | Scientific Reports**. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-57629-z>. Acesso em: 14 mar. 2024.

JORGE, Michelle Pedroza *et al.* Evaluation of wound healing properties of *Arrabidaea chica* Verlot extract. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 118, n. 3, p. 361–366, 2008.

KHAN, Tariq *et al.* Anticancer plants: A review of the active phytochemicals, applications in animal models, and regulatory aspects. **Biomolecules**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 47, 2019.

KIRSCH-VOLDERS, Micheline; AARDEMA, Marilyn; ELHAJOUJI, Azeddine. Concepts of threshold in mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, [s. l.], v. 464, n. 1, p. 3–11, 2000.

KLEEBERG, Ulrich R. *et al.* Patient satisfaction and quality of life in cancer outpatients: results of the PASQOC* study. **Supportive care in cancer**, [s. l.], v. 13, p. 303–310, 2005.

KLEIN, George; RÉVÉSZ, László. Quantitative studies on the multiplication of neoplastic cells in vivo. I. Growth curves of the Ehrlich and MCIM ascites tumors. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 229–277, 1953.

KONTOMANOLIS, Emmanuel N. *et al.* Role of oncogenes and tumor-suppressor genes in carcinogenesis: a review. **Anticancer research**, [s. l.], v. 40, n. 11, p. 6009–6015, 2020.

KOPUSTINSKIENE, Dalia M. *et al.* Flavonoids as anticancer agents. **Nutrients**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 457, 2020.

KREMER, Mélanie *et al.* The antiallodynic action of pregabalin in neuropathic pain is independent from the opioid system. **Molecular Pain**, [s. l.], v. 12, p. 1744806916633477, 2016.

- KUMAR, Akhilesh *et al.* Antiangiogenic and antiproliferative effects of substituted-1, 3, 4-oxadiazole derivatives is mediated by down regulation of VEGF and inhibition of translocation of HIF-1 α in Ehrlich ascites tumor cells. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, [s. l.], v. 64, p. 1221–1233, 2009.
- LANGFORD, Dale J. *et al.* Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. **Nature methods**, [s. l.], v. 7, n. 6, p. 447–449, 2010.
- LE BARS, Daniel; GOZARIU, Manuela; CADDEN, Samuel W. Animal models of nociception. **Pharmacological reviews**, [s. l.], v. 53, n. 4, p. 597–652, 2001.
- LERESCHE, Linda. Facial expression in pain: A study of candid photographs. **Journal of Nonverbal Behavior**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 46–56, 1982.
- LEWANDOWSKA, Anna Maria *et al.* Environmental risk factors for cancer-review paper. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 1–7, 2018.
- LIU, Ping *et al.* Ongoing pain in the MIA model of osteoarthritis. **Neuroscience letters**, [s. l.], v. 493, n. 3, p. 72–75, 2011.
- LÚCIA ZAIDAN DAGLI, Maria; LUIZ GUERRA, José; HILÁRIO NASCIMENTO SALDIVA, Paulo. An experimental study on the lymphatic dissemination of the solid Ehrlich tvjnor in mice. **Braz. j. vet. res. anim. sci**, [s. l.], p. 97–103, 1992.
- MAFIOLETI, Luciano *et al.* Evaluation of the toxicity and antimicrobial activity of hydroethanolic extract of Arrabidaea chica (Humb. & Bonpl.) B. Verl. **Journal of ethnopharmacology**, [s. l.], v. 150, n. 2, p. 576–582, 2013.
- MANTYH, Patrick W. *et al.* Molecular mechanisms of cancer pain. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 201–209, 2002.
- MATSON, David J. *et al.* Inflammation-induced reduction of spontaneous activity by adjuvant: a novel model to study the effect of analgesics in rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [s. l.], v. 320, n. 1, p. 194–201, 2007.
- MENDES, Priscila Martins *et al.* Aplicação da escala de McGill para avaliação da dor em pacientes oncológicos. **Rev. enferm. UFPE on line**, [s. l.], p. 4051–4057, 2016.
- MENDES, Ernani Costa; VASCONCELLOS, Luiz Carlos Fadel de. Cuidados paliativos no câncer e os princípios doutrinários do SUS. **Saúde em Debate**, [s. l.], v. 39, p. 881–892, 2015.
- MERCADANTE, Sebastiano. Managing difficult pain conditions in the cancer patient. **Current pain and headache reports**, [s. l.], v. 18, p. 1–7, 2014.
- MICHEL, Ana Flávia Ribeiro Machado *et al.* Evaluation of anti-inflammatory, antiangiogenic and antiproliferative activities of Arrabidaea chica crude extracts. **Journal of ethnopharmacology**, [s. l.], v. 165, p. 29–38, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Mais de 36 mil novos casos de câncer no Maranhão até 2025**. [s. l.], 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias-para-os-estados/maranhao/2023/fevereiro/mais-de-36-mil-novos-casos-de-cancer-no-maranhao-ate-2025>. Acesso em: 14 mar. 2024.

MULEY, Milind M.; KRUSTEV, Eugene; MCDUGALL, Jason J. Preclinical assessment of inflammatory pain. **CNS neuroscience & therapeutics**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 88–101, 2016.

PANCHE, Archana N.; DIWAN, Arvind D.; CHANDRA, Sadanandavalli R. Flavonoids: an overview. **Journal of nutritional science**, [s. l.], v. 5, p. e47, 2016.

PUHL, MCMN *et al.* Morfoanatomia das folhas e dos caules jovens de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verl.(Bignoniaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 224, 2007.

RADULSKI, Débora Rasec *et al.* Features and applications of Ehrlich tumor model in cancer studies: a literature review. **Trans Breast Cancer Res**, [s. l.], v. 4, n. 22, p. 10.21037, 2023.

RIBEIRO, Ana Flávia C. *et al.* Effect of *Arrabidaea chica* extracts on the Ehrlich solid tumor development. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 22, p. 364–373, 2012.

ROGART, J. N.; BARRACH, H.-J.; CHICHESTER, C. O. Articular collagen degradation in the Hulth-Telhag model of osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, [s. l.], v. 7, n. 6, p. 539–547, 1999.

SALCI, Maria Aparecida; MARCON, Sonia Silva. Itinerário percorrido pelas mulheres na descoberta do câncer. **Escola Anna Nery**, [s. l.], v. 13, p. 558–566, 2009.

SHUANG, Feng *et al.* Establishment of a rat model of adjuvant-induced osteoarthritis of the lumbar facet joint. **Cell biochemistry and biophysics**, [s. l.], v. 70, p. 1545–1551, 2014.

SILVA-SILVA, Joao Victor *et al.* Carajurin: A anthocyanidin from *Arrabidaea chica* as a potential biological marker of antileishmanial activity. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 141, p. 111910, 2021.

SINGH, Deependra *et al.* Global estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2020: a baseline analysis of the WHO Global Cervical Cancer Elimination Initiative. **The lancet global health**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. e197–e206, 2023.

SINGH, Nitin *et al.* Inflammation and cancer. **Annals of African medicine**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 121–126, 2019.

SINGH, Sanjiv; ANSHITA, D.; RAVICHANDIRAN, V. MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease. **International immunopharmacology**, [s. l.], v. 101, p. 107598, 2021.

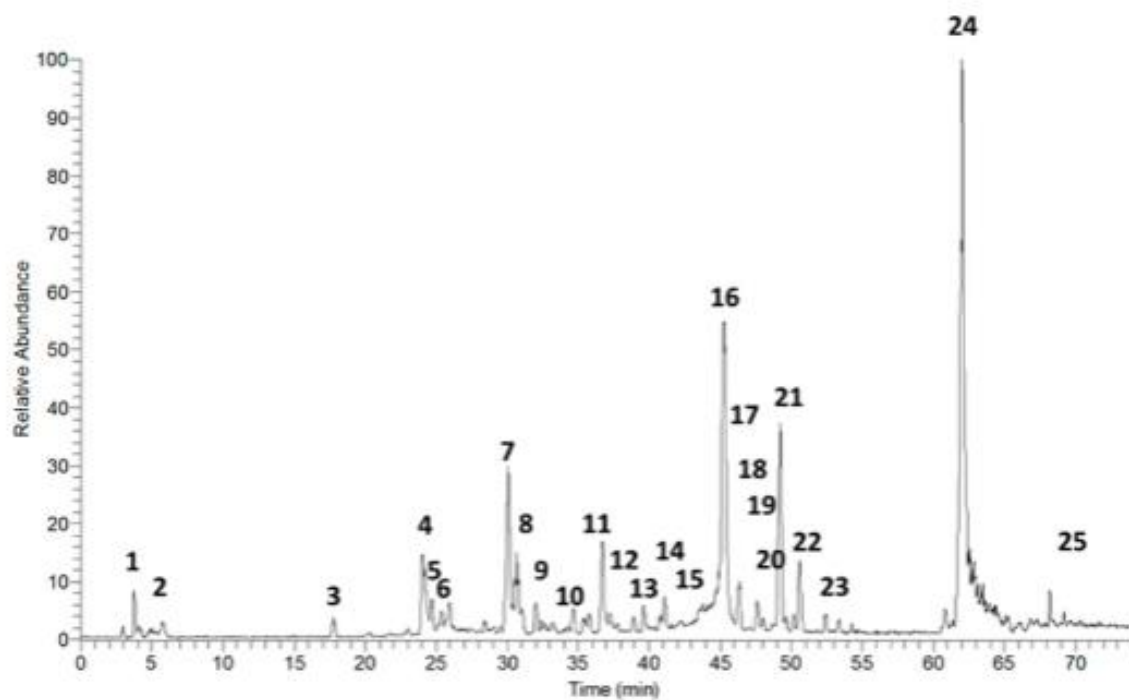
- SMEESTER, Branden A.; LEE, Jang-Hern; BEITZ, Alvin J. Influence of social interaction on nociceptive-induced changes in locomotor activity in a mouse model of acute inflammatory pain: Use of novel thermal assays. **Brain research bulletin**, [s. l.], v. 134, p. 47–54, 2017.
- SOARES, Elisângela Maria; SILVA, Sueli Riul da. Perfil de pacientes com câncer ginecológico em tratamento quimioterápico. **Revista Brasileira de Enfermagem**, [s. l.], v. 63, p. 517–522, 2010.
- SOTOCINA, Susana G. *et al.* The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. **Molecular pain**, [s. l.], v. 7, p. 1744-8069-7–55, 2011.
- SU, Yeu-Shiuan; SUN, Wei-Hsin; CHEN, Chih-Cheng. Molecular mechanism of inflammatory pain. **World Journal of Anesthesiology**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 71–81, 2014.
- TAKEMURA, Orlando S. *et al.* A flavone from leaves of *Arrabidaea chica* f. *cuprea*. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 38, n. 5, p. 1299–1300, 1995.
- TARIQ, Akash *et al.* A systematic review on ethnomedicines of anti-cancer plants. **Phytotherapy Research**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 202–264, 2017.
- TEIXEIRA, Manoel Jacobsen. Fisiopatologia da dor. **Alves Neto O, Costa CMC, Siqueira JTT, Teixeira MJ, organizadores. Fisiopatologia da dor. Porto Alegre: Artmed**, [s. l.], p. 145–75p, 2009.
- TILBURT, Jon C. *et al.* Factors influencing cancer risk perception in high risk populations: a systematic review. **Hereditary cancer in clinical practice**, [s. l.], v. 9, p. 1–15, 2011.
- VASCONCELOS, Cleydlenne Costa *et al.* *Arrabidaea chica* Verlot fractions reduce MIA-induced osteoarthritis progression in rat knees. **Inflammopharmacology**, [s. l.], v. 29, p. 735–752, 2021.
- VASCONCELOS, Cleydlenne Costa *et al.* Effects of extract of *Arrabidaea chica verlot* on an experimental model of osteoarthritis. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 20, n. 19, p. 4717, 2019.
- VOSCOPOULOS, C.; LEMA, M. When does acute pain become chronic?. **British journal of anaesthesia**, [s. l.], v. 105, n. suppl_1, p. i69–i85, 2010.
- WANDNER, Laura D. *et al.* The perception of pain in others: how gender, race, and age influence pain expectations. **The Journal of Pain**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 220–227, 2012.
- WEARY, Daniel M. *et al.* Identifying and preventing pain in animals. **Applied animal behaviour science**, [s. l.], v. 100, n. 1–2, p. 64–76, 2006.
- WOJCIECHOWSKA, Urszula *et al.* Cancer incidence and mortality in Poland in 2020. **Biuletyn Polskiego Towarzystwa Onkologicznego Nowotwory**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 167–183, 2023.

ZEPPETELLA, G. Breakthrough pain in cancer patients. **Clinical Oncology**, [s. l.], v. 23, n. 6, p. 393–398, 2011.

ZHU, C. Z. *et al.* Assessing carrageenan-induced locomotor activity impairment in rats: Comparison with evoked endpoint of acute inflammatory pain. **European Journal of Pain**, [s. l.], v. 16, n. 6, p. 816–826, 2012.

ANEXOS

A- CROMATOGRAMA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Arrabidaea chica*



Cromatograma (HPLC-PDA-ESI-IT-MS/MS) do extrato hidroalcoólico das folhas de *Arrabidaea chica*

B - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CIAEP: 02.0341.2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO



CERTIFICADO (29/2022)

Certificamos que a proposta intitulada: **"Efeito das frações de *Arrabidaea chica* no controle de dor oncológica em modelo murino"** Processo n. 23115.000923/2022-93, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Maria do Socorro de Sousa Cartágenes** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi considerado **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMA) da Universidade Federal do Maranhão, na reunião realizada em 30 de março de 2022.

We certify that the proposal: **"Effect of *Arrabidaea chica* fractions on cancer pain control in a murine model"**, Process n. 23115.000923/2022-93, under the responsibility of **Prof. Dr. Maria do Socorro de Sousa Cartágenes**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, sub phylum Vertebrata (except humans beings) for scientific research purposes (or teaching) - is in accordance with Law No. 11,794, of October 8, 2008, Decree No. 6.899, of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethics Committee on Animals Use of the Federal University of Maranhão (CEUA - UFMA), in meeting of March 30, 2022.

PROPOSTA

Finalidade: Pesquisa **Área:** Ciências da Saúde

Vigência: 30/11/2022 a 01/03/2024

ANIMAIS

Origem: Biotério Central da UFMA

Espécie: *Mus musculus* var. Swiss **Sexo:** Machos **Idade:** 45 dias **Peso:** 20-30g

AMOSTRA
53

Local do experimento: Biotério Setorial da Pós-Graduação CCBS

São Luís, 30 de novembro de 2022

Bruno Araújo Serra Pinto

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFMA



Documento assinado digitalmente

BRUNO ARAUJO SERRA PINTO

Data: 30/11/2022 10:58:27-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

C - ESCALA DE EXPRESSÃO DE GRIMACE



National Centre
for the Replacement
Refinement & Reduction
of Animals in Research

Escala de Expressão Facial em Camundongo

Respostas têm demonstrado que alterações na expressão facial é um meio para a avaliação da dor em camundongos.

A Escala de Expressão Facial em Camundongo foi elaborada utilizando unidades de ação específicas faciais mostradas abaixo. Essas unidades de ação aumentam na intensidade em resposta à dor pós-procedimento e podem ser usadas como parte da avaliação clínica.

As unidades de ação devem ser usadas apenas em animais acordados. Cada animal deve ser observado por um período curto de tempo para evitar pontuar alterações temporárias na expressão facial que não estejam relacionadas à dor.

	Unidades de ação		
	Ausente "0"	Moderadamente presente "1"	Obviamente presente "2"
Estreitamento orbital - Fechamento palpebral (constrição da área orbital) - Uma ruga pode ser visível ao redor do olho			
Protuberância nasal - Protuberância nasal saliente - Rugas verticais na lateral do nariz			
Protuberância da bochecha Bochechas salientes			
Posicionamento das orelhas - Orelhas rotacionadas para fora e/ou para trás, afastando-se da face - Orelhas podem se dobrar e apresentar uma forma "pontaguda" - Espaçamento maior entre as orelhas			
Alteração na vibrissa - Vibrissas estão voltadas para trás contra a bochecha, ou para frente "em pé" - Vibrissas perdem sua curvatura natural "para baixo" ou se aglomeram			

Por favor, consulte o artigo original para detalhes: Langford DJ, Bailey AL, Chendle ML, Clarke SJ, Drummond TE, Eccles S, Glick S, Ingram J, Leason-Ross T, LeCroz-Francis ML, Matsuura L, Sorge RE, Szocinal SG, Tabaka JM, Wang D, van den Meuleberg AMJM, Ferrari MD, Cheng KD, Mogil JS. 2010. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nature Methods* 7(6): 447-448. doi: 10.1038/nmeth.1450

Para informação sobre o uso da Escala de Expressão Facial em Camundongo, procure artigos que apresentem técnicas, e para escalas de expressão facial em outras espécies, visite www.nc3rs.org.uk/grimacescales.

Para solicitar cópias deste póster, envie um e-mail: enquiries@nc3rs.org.uk. O NC3Rs fornece uma variedade de recursos dos 3Rs em www.nc3rs.org.uk/resources.

Imagens cedidas gentilmente pelo Dr. Jeffrey Mogil, McGill University. Tradução para o português por Dra Karen Maciel de Oliveira, Universidade Federal de São Paulo, e Dr Douglas Lopes, University College London.