

O USO DE MODELOS ANIMAIS PARA AVALIAR O POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO DOS PRODUTOS DE ORIGEM NATURAL*

GIANNI GOULART PERAZA**
SANDRO TORMA RODRIGUES***
SUSI HELIENE LAUZ MEDEIROS****
ANA LUIZA MUCCILLO-BAISCH*****

RESUMO

Este artigo foi desenvolvido como requisito para a disciplina de Cirurgia Experimental, do Programa de Pós-Graduação – Mestrado em Ciências da Saúde da FURG. Aborda a utilização dos produtos naturais. Apresenta os testes farmacológicos atualmente mais empregados para a avaliação do potencial antinociceptivo que utilizam animais de experimentação, desenvolvidos no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Ciências Fisiológicas da FURG.

PALAVRAS-CHAVE: produtos naturais; medição da dor;

ABSTRACT

This article was prepared as a requisite of the course of Experimental Surgery in the graduation program in Health Sciences of FURG. It deals with the use of natural products and describes the most currently used pharmacological tests for the evaluation of a potential antinociceptive effect in experimental animals, which are being conducted in the Laboratory of Natural Products at the Department of Physiological Sciences of FURG.

KEY WORDS: biological products; pain measurement;

* Trabalho apresentado na disciplina de Cirurgia Experimental, do Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciências da Saúde, como parte integrante da avaliação.

** Bióloga; laboratorista do Dep. de Ciências Fisiológicas – FURG; doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Animal Comparada – FURG.

*** Biólogo; mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Animal Comparada – FURG.

**** Professora do Dep. de Cirurgia – FURG; doutora em Cirurgia Experimental – UNIFESP.

***** Enfermeira; professora do Dep. de Ciências Fisiológicas – FURG; doutora em Ciências Médicas e Biológicas – Univ. de Bordeaux, França; annabaisch@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

Os produtos naturais exercem importante papel na medicina popular e também na medicina moderna, sendo fontes de compostos com importantes atividades biológicas. A falta de acesso à medicina tradicional e aos medicamentos industrializados leva grande parte da população mundial a utilizar compostos de origem natural, seja para prevenção ou para o tratamento de enfermidades¹. A Organização Mundial da Saúde (OMS) sempre preconizou o uso de terapias alternativas, integrando a medicina ocidental com a popular tradicional. Essa organização, durante a conferência de Alma-Ata, recomendou formalmente que os recursos de medicina tradicional e popular fossem utilizados pelos sistemas nacionais de saúde, recrutando os praticantes dessa medicina como aliados na organização e implementação de medidas para melhorar a saúde da comunidade².

O conhecimento tradicional repassado de geração em geração torna-se interessante para a ciência, a partir do entendimento dos relatos verbais, das observações sistemáticas dos fenômenos biológicos, feitos por pessoas talvez “sem cultura” mas providas de outras qualidades que as tornam tanto ou mais perspicazes que os cientistas³.

Hoje se avalia experimentalmente a veracidade das informações herdadas dos magos e feiticeiras de outrora e repassadas pelos benzedores, curandeiros e xamãs, com base justamente nos conhecimentos que foram adquiridos durante milhares de anos e transmitidos de geração em geração por aqueles que são os ancestrais da ciência moderna⁴.

Os produtos naturais exercem importante papel na medicina moderna, já que são fontes de princípios ativos que muitas vezes são de difícil produção sintética; também são fontes de compostos básicos que, com pequenas modificações, tornam-se de grande interesse comercial; compostos naturais também podem servir de modelos para medicamentos sintéticos que tenham atividade biológica similar à do composto natural⁵. Observa-se crescimento do número de adeptos do uso de produtos naturais para tratar suas enfermidades.

A pesquisa de propriedades farmacológicas de produtos naturais tem proporcionado a descoberta de substâncias farmacologicamente ativas, com importantes aplicações tanto na área experimental como na identificação de princípios ativos de interesse terapêutico. Nos últimos anos, o melhoramento dos métodos de triagem farmacológica⁶ tem proporcionado a descoberta de novas drogas.

Países desenvolvidos, como França e Alemanha, reconhecem

oficialmente a utilização de plantas para fins terapêuticos e possuem farmacopéias especializadas no assunto⁷. No Brasil, a recente aprovação da Política Pública de Plantas Medicinais e Fitoterápicos visa a garantir o acesso seguro e o uso correto de plantas medicinais e fitoterápicos mediante o uso sustentável da biodiversidade e o desenvolvimento da indústria nacional, e estabelece diretrizes para ações direcionadas à melhoria da qualidade de vida da população e do complexo produtivo na área da saúde⁸. As diretrizes estabelecidas pela nova política prevêem para as universidades a atribuição de promover pesquisa e desenvolver técnicas e inovações em produtos naturais e fitoterápicos a partir de modelos e experiências existentes no Brasil e em outros países.

JUSTIFICATIVA – A EXPERIÊNCIA INSTITUCIONAL

A FURG detém uma tradição no estudo de produtos naturais, através dos trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Ciências Fisiológicas. Nos últimos anos, produtos de origem vegetal e animal foram investigados, a partir de seu uso popular. Com o modelo de doença crônica hipercolesterolêmica experimental, realizado em coelhos e ratos, evidenciou-se um efeito hipocolesterolêmico da *Ilex paraguariensis* (erva-mate) quando administrada sob a forma de extrato aquoso, em substituição à água diária. Além de diminuir os níveis de colesterol e triglicerídeos e aumentar os de HDL⁹, o extrato aquoso da erva-mate foi capaz de relaxar o leito vascular mesentérico isolado¹⁰. A presença de compostos fenólicos, identificada em amostras do vegetal, corrobora esse efeito¹¹.

A avaliação farmacológica da toxicidade do extrato aquoso de flores de *Brugmansia suaveolens* foi realizada por meio de testes de DL₅₀¹², assim como a avaliação da atividade antinociceptiva, comprovando que o referido extrato apresenta baixa toxicidade e induz analgesia em camundongos¹³. Outros produtos de origem animal e vegetal também têm sido testados quanto às suas atividades, destacando-se os extratos obtidos da pele do *Balistes capricus* (peixe-porco), avaliados quanto às atividades antinociceptiva, broncodilatadora, vasodilatadora¹⁴, antimicrobiana e antiinflamatória¹⁵, os extratos da *Usnea sp.* (líquen), testados quanto à toxicidade aguda e crônica, ação antinociceptiva e antiinflamatória¹⁶. Mais recentemente, o extrato da esponja marinha *Aplysina caissara* foi avaliado quanto às atividades antinociceptiva, antiinflamatória, antimicrobiana e antiproliferativa¹⁷. Cabe ainda salientar a cooperação estabelecida com a División de Neurociencias, Lab. de Neurofarmacología, Unidad de Investigación

Biomédica de Occidente, C.M., Instituto Mexicano del Seguro Social, México, que proporcionou o estudo de uma planta mexicana, a *Casimiroa edulis* (zapote blanco), por suas propriedades sedativas e que foi testada quanto a sua capacidade hipotensora no modelo experimental do leito vascular mesentérico isolado de ratos¹⁸.

Nociceção e antinociceção

A dor é reconhecida como um sintoma de alto custo em termos de sobrecarga humana e financeira. O manejo dos sintomas é o foco primário do cuidado. Atualmente sabe-se que a dor é reconhecida como uma das principais conseqüências relacionadas com as mais diversas patologias e suas repercussões são consideradas potencialmente prejudiciais para o organismo¹⁹.

Pesquisas etnofarmacológicas tradicionais no uso de plantas para o alívio da dor são vistas como estratégia produtiva e lógica na procura por novas drogas analgésicas²⁰.

A dor é difícil de ser definida, pois, além de uma sensação, é uma experiência. A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), propôs como definição: “experiência sensorial e emocional desagradável, relacionada com lesão tecidual real ou potencial, ou descrita em termos desse tipo de dano”. É pressuposta a existência de dois componentes: a sensação dolorosa propriamente dita ou nociceção, e a reatividade emocional à dor²¹. A dor também pode ser denominada, segundo o tipo de lesão e/ou os mediadores envolvidos, em: nociceptiva, quando ocorre por estimulação excessiva dos nociceptores; neurogênica, quando ocorre lesão do tecido neuronal; neuropática, quando ocorre a disfunção de um nervo; ou psicogênica, que ocorre por fatores psicológicos²². Os nociceptores são terminações nervosas livres, não-especializadas, que respondem a estímulos nociceptivos, detectando, desse modo, lesão nos tecidos, onde os estímulos desencadeantes podem ser mecânicos, térmicos ou químicos²³. Assim, o potencial antinociceptivo de um composto pode ser medido pelo seu poder de aumentar o limiar de excitação dessas terminações nervosas ao estímulo doloroso, ou então, fazer com que os nociceptores não percebam ou não respondam ao estímulo doloroso.

AValiação Experimental da Dor

Os estudos experimentais são na maioria realizados em ratos e camundongos, sendo sempre observados os preceitos enunciados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal²⁴ e aprovados pelos

comitês de ética em pesquisa das instituições (FURG, por exemplo) e as normas éticas para a investigação da dor experimental em animais conscientes²⁵.

Embora os animais submetidos a um estímulo nociceptivo não tenham capacidade de se comunicar verbalmente quando da ocorrência da dor, são capazes de exibir respostas comportamentais, motoras e fisiológicas semelhantes às observadas em humanos. Por isso, utiliza-se o termo “resposta nociceptiva” em vez de dor²⁶. Essas respostas comportamentais são estudadas e comparadas na presença de drogas potencialmente analgésicas que interferem no processo fisiológico da dor, o que nos permite inferir que um animal de experimentação está experimentando uma resposta álgica.

OS MODELOS EXPERIMENTAIS

Modelo da formalina

Esse modelo, inicialmente descrito por Dubuison e Dennis²⁷, consiste em injetar uma substância irritante no espaço subcutâneo da pata traseira de ratos ou camundongos, determinando o surgimento de alterações comportamentais, traduzidas por respostas motoras características que permitem avaliar a intensidade da resposta nociceptiva ao estímulo químico. A resposta nociceptiva é medida pela observação do tempo que o animal permanece lambendo, agitando ou mordendo a pata injetada²⁸.

Os animais recebem 20µl da solução de formalina (1%), utilizando-se microseringa. Logo após a injeção, os animais são colocados sob campânulas de vidro e observados individualmente. O tempo que o animal passa lambendo, mordendo ou agitando vigorosamente a pata é cronometrado nos primeiros cinco minutos seguintes à injeção e a partir do 20.^o até o 25.^o minuto. Os resultados obtidos a partir dos grupos tratados são comparados com os grupos controles.

Com o modelo da formalina subplantar, podemos evidenciar as duas fases de sensibilidade dolorosa: a primeira fase começa imediatamente após a injeção e perdura por cerca de cinco minutos (1^a fase). Essa fase é seguida por um período de quiescência, de cerca de 5-10 minutos, após o qual se desenvolve a 2^a fase da resposta, que se inicia 20-25 minutos após a injeção. A primeira fase é de caráter neurogênico, sendo sensível a analgésicos opióides e a alguns agonistas das vias descendentes, e a segunda fase é acompanhada de uma resposta inflamatória, relacionada à liberação de mediadores

inflamatórios, sendo sensível a analgésicos antiinflamatórios não-esteroidais²⁸.

Para a avaliação farmacológica, as drogas utilizadas como controles positivos (morfina e analgésicos antiinflamatórios não-esteroidais) são administradas uma hora antes da injeção de formalina. Os extratos de produtos naturais são normalmente administrados 30 (via intraperitoneal) ou 60 minutos (via oral) antes da injeção de formalina.

Modelo das contorções abdominais induzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético

Embora este seja um modelo de nocicepção simples e pouco específico, permite avaliar a atividade antinociceptiva de várias substâncias que atuam tanto em nível central quanto periférico. O teste consiste em administrar ácido acético via intraperitoneal e observar as respostas motoras decorrentes da aplicação do estímulo nociceptivo. Conta-se o número de contorções, traduzidas por contração e rotação do abdômen, seguidas de extensão de uma ou ambas as patas traseiras²⁹.

O ácido acético produz uma resposta que depende da interação de vários neurotransmissores e neuromoduladores que determinam a nocicepção, o que faz esse modelo sensível às substâncias analgésicas de ação central e/ou periférica com os mais variados mecanismos de ação.

A resposta nociceptiva é induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético (0,3-1,8%; 0,1 ml/10g de peso corporal) em camundongos. Uma hora antes da injeção de ácido acético, administram-se as drogas que servirão de controles (salina ou água destilada, morfina, etc.) e o extrato a ser testado. Após a injeção, os animais são colocados sob campânulas de vidro, para a observação individual e o número de contorções é quantificado cumulativamente, durante um período de 25 minutos. O resultado obtido a partir dos grupos tratados é comparado com os grupos controle.

Modelo da placa quente

Como nos modelos anteriores, observa-se o comportamento dos animais de experimentação ao estímulo térmico nociceptivo, caracterizado pela troca rápida do apoio dos pés ("sapateado"), lambar, morder ou levantar uma das patas quando colocados sobre uma superfície aquecida a mais de 50° C (placa quente). Os resultados são avaliados pela medida da latência ou o tempo decorrido desde o

momento em que o animal é colocado sobre a placa até o aparecimento da resposta motora³⁰.

Esse modelo é sensível para drogas que atuam centralmente, como por exemplo, a morfina (20 mg/kg, i.p.). Os animais são colocados sobre uma superfície aquecida (55 ± 1 °C) e verifica-se, por meio da obtenção de dois valores basais (separados por um intervalo de 30 minutos), o tempo de latência antes de qualquer tratamento. O tempo máximo de contato dos animais com a placa aquecida não deve ultrapassar 30 segundos, para evitar danos teciduais nas patas. A resposta (latência) é novamente avaliada em intervalos de 30, 60, 90, 120 e 150 minutos após a administração oral ou intraperitoneal do extrato a ser testado³¹.

Modelo do *tail-flick*

Neste modelo, um estímulo térmico acima de 40 °C aplicado à cauda de ratos ou camundongos desencadeia o reflexo da retirada da mesma por flexão predominantemente em direção rostral³². A avaliação das respostas é feita por meio da medida do lapso de tempo entre a aplicação do estímulo térmico e o momento de afastamento da cauda da fonte de calor³³. Calcula-se o índice do limiar nociceptivo por meio do tempo de latência do reflexo de retirada da cauda.

Esse modelo permite obter informações sobre o mecanismo e o local da atividade antinociceptiva detectada, uma vez que o parâmetro avaliado, ou seja, o reflexo de retirada da cauda, é de integração medular.

Para o teste, utilizam-se equipamentos de medida específicos (analgesímetros), que permitem o controle da intensidade do calor, com a intenção de fornecer latências basais entre 4 -6 segundos. O aparelho permite a colocação da cauda de maneira a interromper a passagem de luz para uma célula fotoelétrica. Ao movimentar a cauda, o animal ativa a célula e o aparelho automaticamente interrompe a aplicação do estímulo térmico, ficando registrado o tempo de latência em centésimos de segundos. Na ausência do analgesímetro, o teste pode ser feito por meio da imersão do terço inferior da cauda dos animais em água aquecida a 55 °C, seguida da anotação do tempo de reação ao estímulo. As medidas da latência são tomadas a cada 30 minutos por um período de duas horas. Os animais controles são tratados, com água (via oral; 0,1ml/10g), morfina (20mg/kg) ou os extratos a serem testados, 30 minutos após a leitura basal.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As técnicas apresentadas, algumas descritas há mais de 50 anos, continuam sendo utilizadas e consideradas pela comunidade científica como eficientes para a avaliação do potencial antinociceptivo em modelos experimentais. Com a utilização desses testes, não é possível chegar ao mecanismo de ação definitivo da substância testada, porém, a vantagem desses modelos é que representam o início para a caracterização farmacológica de novas drogas capazes de interagir com os mediadores da dor e/ou inflamação, fornecendo assim um ponto de partida para a caracterização das vias de efeito antinociceptivo. O aprofundamento da investigação se dá com a utilização de bloqueadores específicos da resposta nociceptiva, na tentativa de se identificar as vias responsáveis pelas respostas observadas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Prof.^a MSc. Eli Sinnott Silva, pela revisão do artigo e sugestões de aprimoramento do texto. Agradecem também à CAPES pelo suporte financeiro ao acadêmico Sandro Torma Rodrigues.

REFERÊNCIAS

1. Akerele, O. Summary of WHO guidelines for the assessment of herbal medicines. *HerbalGram*. 1993; 28: 13-20.
2. Brasil, Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Políticas Públicas de Saúde. Projeto Promoção da Saúde. Declaração de Alma Ata. Conferência Internacional sobre cuidados primários de saúde, 6-12 de setembro de 1978; Alma-Ata; USSR. 2001.
3. Elisabetsky E, Souza GC. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. ed. Porto Alegre: Ed. da Universidade /UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC. 2004. p. 107-122.
4. Di Stasi LC. Arte, ciência e magia. In: Di Stasi LC. *Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar*. Ed. UNESP; 1996. p. 15-21.
5. Robbers JE, Speedie MK, Tyler VE. *Farmacognosia e farmacobiotecnologia*. São Paulo: Ed. Premier; 1997.
6. König GM, Wright AD. Marine natural products research: current directions and future potential. *Planta Medica*. 1995; 62:193-211.
7. Calixto JB. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guideline for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2000; 33:179-189.
8. Brasil. Portaria do MS n.º 971, de 3 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/PNPIC.pdf>

9. Paganini Stein FL, Schmidt B, Souza Soares LA, Flores Soares MC, Cezar-Vaz MR, Badiale-Furlong E, Muccillo-Baisch AL. Vascular responses to extractable fractions of *Ilex paraguariensis* in rats fed standard and high-cholesterol diets. *Biological Research of Nursing*. 2005; 7(2): 45-60.
10. Muccillo-Baisch AL, Johnston KB, Paganini-Stein F. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* on mesenteric arterial bed of rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 1998; 60:133-39.
11. Furlong EB, Colla E, Bortolato DS, Muccillo-Baisch AL, Souza-Soares LA. Avaliação do potencial de compostos fenólicos em tecidos vegetais. *Vetor*. 2003; 13:105-114.
12. Sinnott-Silva E, Abreu SM, Argoud JJB, Silva FA, Almeida TB. Alterações comportamentais em ratos administrados com preparações da *Datura suaveolens*. *Vitalle*. 1995; 7:33-47.
13. Parker AG, Peraza GG, Sena J, Sinnott-Silva E, Flores-Soares MC, Cesar-Vaz MR, Furlong EB, Muccillo-Baisch AL. Antinociceptive effects of the aqueous extract of *Brugmansia suaveolens* flowers in mice. *Biological Research for Nursing*. 2007; 8 (3): 1-6.
14. Cavalli LS, Possette P L, Schmidt B, Krueel C, Grando M, Furlong EB, Cezar-Vaz MR, Barros DM, Muccillo-Baisch AL. Fish *Balistes capriscus* skin extract-induced relaxation in mesenteric arterial bed of rat. *Journal of Ethnopharmacology*. 2003; 88, 215-220.
15. Murcia NP. Espécie marinha utilizada na medicina popular da Região Sul do Rio Grande do Sul: investigação das propriedades antimicrobianas e antiinflamatórias de extratos da pele do peixe *Balistes capriscus* Gmelin, 1789 (Tetradontiforme, Balistidae) [tese]. Rio Grande: FURG; 2006.
16. Peraza GG. Avaliação biológica dos efeitos do extrato de *Usnea sp* Dill.: ex. Adanson (Lichen; Ascomicotyna) [tese]. Rio Grande: FURG; 2005.
17. Azevedo L. Avaliação farmacológica, citotóxica e antimicrobiana do extrato bruto da esponja marinha *Aplysina caissara* [tese]. Rio Grande: FURG; 2005. .
18. Muccillo-Baisch AL, Urban U, Ruiz AN. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of aqueous extracts of lyophilized seeds of *Casimiroa edulis* (AECe) on rat mesenteric arterial bed. *Journal of Ethnopharmacology*. 2003; 92:163-167
19. McCaffery M, Pasero C. Appropriate pain control. [letter]. *American Journal of Nursing*. 2001; 101 (11):13.
20. Elisabetsky E, Amador TA, Albuquerque RR, Nunes DS, Carvalho ACT. Analgesic activity of *Psychotria colorata* (Willd. ex R. & S.) Muell. Arg. alkaloids. *Journal of Ethnopharmacology*. 1995; 48:77-83.
21. Wannmacher L, Ferreira MBC. Princípios gerais no tratamento da dor. In: Fuchs FD, Wannmacher L, Ferreira MBC. *Farmacologia clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 2004. p. 153-156.
22. Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Progress in Neurobiology*. 1999; 57: 1-164.
23. Millan MJ. Descending control of pain. *Progress in Neurobiology*. 2002; 569:1-120.
24. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA. Os princípios éticos da experimentação animal. São Paulo, 1991. Disponível em: <http://www.cobea.org.br/etica.htm#3>
25. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*. 1983; 16:109-110.
26. Lapa AJ, Souccar C, Lima-Landman MTR, Castro MSA, Lima TCM. Métodos de

avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais. Porto Alegre. 2003.

27. Dubuison D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*. 1997; 4:161-174.

28. Hunkstaar S, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*. 1987; 30:103-114.

29. Koster R, Anderson M, De Beer EJ. Acetic acid for analgesic screening. *Federation Proceedings*. 1959; 18:412.

30. Woolfe G, MacDonald AD. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (demerol). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1944; 80(3):300-307.

31. Turner RA. Analgesics. In: Turner RA (Ed.). *Screening methods in pharmacology*. London. Academic Press. 1965. p. 100.

32. Cartens E, Wilson C. Rat tail flick reflex: magnitude measurement of stimulus-response function, suppression by morphine and habituation. *Journal of Neuropharmacology*. 1993; 70:630-639.

33. D'Amour FE, Smith DL. A method for determining loss of pain sensation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic*. 1941; 72:74-79.

Recebido: 9/4/07

Aceito: 18/6/07