

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISILOGIA

ADARLY KROTH

**EXTRATO AQUOSO DE *Luehea divaricata* Mart. (Malvaceae) ATENUA
NOCICEPÇÃO E REDUZ MARCADORES PRÓ-OXIDANTES EM NERVO
ISQUIÁTICO E MEDULA ESPINAL DE RATOS COM DOR NEUROPÁTICA**

TESE DE DOUTORADO

PORTO ALEGRE

2020

ADARLY KROTH

**EXTRATO AQUOSO DE *Luehea divaricata* Mart. (Malvaceae) ATENUA
NOCICEPÇÃO E REDUZ MARCADORES PRÓ-OXIDANTES EM NERVO
ISQUIÁTICO E MEDULA ESPINAL DE RATOS COM DOR NEUROPÁTICA**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Fisiologia

Orientadora: Prof. Dra. Wania A. Partata

PORTO ALEGRE

2020

ADARLY KROTH

**EXTRATO AQUOSO DE *Luehea divaricata* Mart. (Malvaceae) ATENUA
NOCICEPÇÃO E REDUZ MARCADORES PRÓ-OXIDANTES EM NERVO
ISQUIÁTICO E MEDULA ESPINAL DE RATOS COM DOR NEUROPÁTICA**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Fisiologia

Orientadora: Prof. Dra. Wania A. Partata

BANCA EXAMINADORA:

DR. GEISSON MARCOS NARDI- UFSC

DRA. LILIANE DE FREITAS BAUERMANN - UFSC

DRA. ADRIANE BELLÓ-KLEIN (RELATOR)- UFRGS

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

Kroth, Adarly
EXTRATO AQUOSO DE Luehea divaricata Mart.
(Malvaceae) ATENUA NOCICEPÇÃO E REDUZ MARCADORES
PRÓ-OXIDANTES EM NERVO ISQUIÁTICO E MEDULA ESPINAL DE
RATOS COM DOR NEUROPÁTICA / Adarly Kroth. -- 2020.
191 f.
Orientadora: Wania Aparecida Partata.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Fisiologia, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Dor neuropática. 2. Estresse oxidativo. 3.
Luehea divaricata. I. Partata, Wania Aparecida,
orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

*Aos meus mestres que sempre me inspiraram,
e aos meus familiares e amigos que sempre me apoiaram.*

AGRADECIMENTO

À Deus, por iluminar meus passos e ser a minha base durante todos os momentos de fraqueza.

À Profa. Wania Partata, pela orientação, pela amizade, por estar sempre presente e nos mais diferentes momentos, por me ensinar não somente a ser uma pesquisadora melhor, mas sim uma pessoa melhor. Obrigada pela paciência, incentivo, empenho, pelas ótimas conversas, viagens e, principalmente, pelos momentos que nos proporcionaram ótimas risadas; agradeço ao seu querido marido Marcos pela auxílio sempre que foi necessário, pela amizade.

Aos meus pais, Mário e Ilsi, pelo amor e apoio incondicional. Pelo incentivo e por sempre compreender a minha ausência. Pelo zelo, paciência, por tudo que fazem para que eu realize meus objetivos. Amo muito vocês!

À minha família de Joaçaba, muito obrigada Solange, Pedro, Pedro Paulo, Jaqueline e João pelo carinho, amor e compreensão. Kátia e Nei, muito obrigada por tudo, não existem palavras que possam descrever a minha gratidão.

Aos meus amigos que sempre se fizeram presentes em todos os momentos, me apoiando e incentivando sempre que precisei. Em especial a Patrícia, Geovana, A Máfia, Karina, Noeli, Fernanda e Luziana. Sem amigos não somos *Nada*.

Aos colegas do laboratório de Neurobiologia Comparada, especialmente a Maria, Thaisla, Elza, Clívia, Franciele e Ana Paula, porque sem vocês este trabalho não teria acontecido. Também agradeço à profa Renata Rosat e à profa Denise Zancan, por compartilharem o conhecimento e amizade; Ao Geisson, por me apresentar a *Luehea* e me incentivar na pesquisa.

A UNOESC, pelo apoio e incentivo, aos coordenadores de curso que sempre me auxiliaram no que foi preciso (sempre organizando meus horários da melhor forma), aos meus queridos alunos que sempre compreenderam os meus momentos de cansaço ou de ausência.

Aos técnicos da UFRGS e aos Laboratórios de Metabolismo, Fisiologia Cardiovascular, Fisiologia Celular, Microbiologia, Parasitologia e Imunologia, especialmente Professores Márcia Trapp, Luciano S. de Fraga, Adriane Bello-Klein,

Paulo Ivo Homem de Bittencout, Marilisi Brittes Rott, Roselis Silveira Martins da Silva, Luis Kucharski, e suas equipes, que sempre foram prestativos nos empréstimos de materiais, auxílio em técnicas e por compartilhar o conhecimento. Aos professores do PPG em Fisiologia e de outros programas, os quais colaboraram para realização do projeto.

À profa. Rosangela Bezerra e ao prof. Fernando Simabuco, da Unicamp-Limeira- SP, por todo conhecimento compartilhado e pelo auxílio com os experimentos de ORAC, ABTS e dano ao DNA. Ao prof. Rivaldo Niero, Univali- Itajai-SC, por auxílio com o experimento de HPLC e por estar sempre disposto a me auxiliar no que foi necessário.

À secretaria do PPG Fisiologia, pelo suporte.

Ao CNPq e Capes. À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, pela oportunidade de realizar este curso.

À todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.
Obrigada!

Muito obrigada!

*“Mesmo quando tudo parece desabar,
cabe a mim rir ou chorar,
ir ou ficar,
desistir ou lutar,
porque descobri,
no caminho incerto da vida,
que o mais importante é o **decidir**”.*

Cora Coralina

APRESENTAÇÃO

Esta tese é o resultado da investigação de: 1) atividade antioxidante, composição de macronutrientes, presença de vitexina e capacidade de inibição de dano oxidativo ao DNA do extrato aquoso preparado de folhas de *L. divaricata*; e 2) efeito da administração oral desse extrato, em diferentes doses por 10 e 35 dias, sobre a nocicepção, recuperação funcional do nervo isquiático, e parâmetros de estresse oxidativo em nervo isquiático e medula espinal de ratos com dor neuropática induzida por lesão por constrição crônica no nervo isquiático.

A tese está estruturada em nove capítulos, onde inicialmente se apresenta a introdução ao tema, que está organizada em cinco subitens de revisão bibliográfica que abordam os achados relativos ao tema, provenientes da literatura científica atual. Em seguida, é apresentada a hipótese, seguida do objetivo do estudo, que está dividido em dois subitens, o primeiro mostrando o objetivo geral da tese e o segundo, os objetivos específicos. O quarto capítulo contém os materiais e métodos, onde está descrito em detalhes todos os procedimentos realizados ao longo do estudo. No capítulo cinco estão apresentados os resultados na forma de dois artigos científicos, os quais mostram os materiais e métodos utilizados e os resultados obtidos em cada um dos estudos.

O primeiro artigo apresenta os resultados da avaliação da capacidade antioxidante, composição de macronutrientes, presença de vitexina e capacidade de inibição de dano oxidativo ao DNA do extrato aquoso preparado de folhas de *L. divaricata*. Também apresenta os resultados do efeito temporal da administração oral desse extrato, dado em diferentes doses por 10 e 35 dias, sobre a nocicepção em ratos sem e com dor neuropática induzida por lesão por constrição crônica no nervo isquiático. O artigo mostra ainda os resultados: 1) da comparação do efeito antinociceptivo do extrato com aquele da gabapentina, fármaco considerado como tratamento de primeira linha da dor neuropática na clínica médica; 2) da coadministração de extrato aquoso e gabapentina em dose menor sobre a nocicepção de ratos com lesão no nervo isquiático; e 3) o efeito da administração de extrato aquoso sobre indicadores plasmáticos de função hepática e renal, e atividade de marcadores pró-oxidante e antioxidante em fígado. Este artigo foi publicado na revista *Journal of Ethnopharmacology* em junho de 2020.

O segundo artigo mostra os resultados do efeito da administração oral de: 1) extrato aquoso de folhas de *L. divaricata*, dado em diferentes doses por 10 e 35 dias; e 2) gabapentina e gabapentina+extrato aquoso, dado por 10 dias, sobre a recuperação funcional do nervo isquiático e parâmetros de estresse oxidativo, como valores de hidroperóxidos lipídicos e capacidade antioxidante total em nervo isquiático lesionado, e formação de ânion superóxido, valores de tióis totais, capacidade antioxidante total, e valores de peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos em medula espinal lombossacral, usando para o estudo ratos sem e com dor neuropática induzida por lesão por constrição crônica no nervo isquiático. O manuscrito está em análise na revista *Journal of Ethnopharmacology*.

O capítulo seis compreende a discussão, onde os principais resultados dos dois artigos científicos são discutidos em conjunto, amparados por achados da literatura. No sétimo capítulo são apresentadas as conclusões deste trabalho de doutorado. No capítulo seguinte estão as perspectivas de futuros estudos sobre o tema da tese. No último capítulo encontram-se as referências bibliográficas dos textos científicos consultados apenas para a redação dos capítulos Introdução, Material e Métodos e Discussão. As referências bibliográficas dos artigos científicos são apresentadas ao final de cada artigo.

RESUMO

A dor neuropática (dor devido à lesão no tecido nervoso) é de difícil tratamento, e sabe-se que espécies reativas de oxigênio participam nessa condição dolorosa. A espécie *Luehea divaricata*, uma planta nativa do Brasil, conhecida popularmente como “açoita-cavalo”, é usada por diferentes grupos étnicos para tratar diversas condições patológicas. Porém, desconhece-se seu efeito na dor neuropática. O presente estudo avaliou os efeitos da administração oral do extrato aquoso (EA) preparado de folhas de *L. divaricata* sobre nocicepção (medida pelos testes de von Frey e placa quente), índice funcional do nervo isquiático (IFI), e parâmetros de estresse oxidativo em medula espinal de ratos com dor neuropática induzida por lesão por constrição crônica (CCI) no nervo isquiático, um modelo de dor neuropática. Após aprovação pelo SISBIO (#54348-1) e comitê de ética no uso de animal da UFRGS (#31394), folhas de *L. divaricata* foram usadas para a preparação do EA. Inicialmente se determinou, no extrato, o conteúdo de fenóis totais, a atividade antioxidante, a presença de vitexina, a concentração de açúcares totais, sacarose, glicose, frutose, proteínas e triacilglicerídeos; e capacidade de inibição de dano oxidativo ao DNA *supercoiled*. Após, 72 ratos Wistar machos, adultos, foram divididos nos grupos experimentais controle (ratos sem intervenção cirúrgica), *sham* (ratos que tiveram o nervo isquiático direito exposto) e CCI (ratos que tiveram o nervo isquiático direito exposto e esse recebeu 4 amarraduras em seu tronco comum), os quais receberam, por *gavage*, os tratamentos: água para injeção (veículo) e EA, nas doses de 100, 300, 500 e 1000 mg/kg por 10 ou 35 dias; e gabapentina (50 mg/kg) e EA (500mg/kg)+gabapentina (30 mg/kg), por 10 dias. Os tratamentos tiveram início no dia da cirurgia, após recuperação da anestesia, e seguiu-se diariamente. O EA apresentou vitexina, marcador do gênero *Luehea*; conteúdo elevado de compostos fenólicos; atividade antioxidante e capacidade de inibir dano oxidativo ao DNA altas; predominância de sacarose; e baixa concentração de proteínas e triacilglicerídeos. A administração de EA aumentou significativamente os limiares de resposta aos testes de von Frey e placa quente e o IFI, reduzidos pela CCI. Os efeitos foram comparáveis ao da gabapentina e também encontrados após administração de EA+gabapentina. Em nervo isquiático, o EA preveniu acréscimo significativo nos valores de hidroperóxidos lipídicos, sem alterar significativamente a capacidade antioxidante total (TAC). Na medula espinal, o EA preveniu: aumento significativo na formação de ânion superóxido e nos valores de peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos; queda significativa nos tíóis totais; e acréscimo significativo na TAC, alterações encontradas nos ratos CCI tratados com veículo. O EA não provocou alterações significativas no peso corporal e em valores de indicadores plasmáticos de função hepática (ALT, AST e bilirrubina) e renal (creatinina), e atividade de marcadores pró-oxidante e antioxidante no fígado. Assim, pela primeira vez se mostrou que o uso de EA de folhas de *L. divaricata* poderia ser uma alternativa para tratamento de dor neuropática induzida por CCI, e que alterações em parâmetros de estresse oxidativo são mecanismos pelos quais o extrato atua para induzir efeito antinociceptivo.

Palavras-chave: Capacidade de Absorbância de Radicais de Oxigênio (ORAC). Dor crônica. Plantas medicinais. Nocicepção. Elementos de Resposta Antioxidante. Nutrientes.

ABSTRACT

Neuropathic pain (pain due to nerve tissue injury) is difficult to treat, and it is known that reactive species of oxygen participate in this painful condition. The species *Luehea divaricata*, a plant native to Brazil, popularly known as "açoita-cavalo", is used by different ethnic groups to treat various pathological conditions. However, its effect on neuropathic pain is unknown. This study evaluated the effects of oral administration of the aqueous extract (AE) prepared from *L. divaricata* leaves on nociception (measured by von Frey's and hot plate tests), sciatic nerve functional index (SFI), and oxidative stress parameters in spinal cord of rats with chronic constriction injury (CCI)-induced neuropathic pain of the sciatic nerve, a model of neuropathic pain. After approval by SISBIO (#54348-1) and UFRGS animal ethics committee (#31394), *L. divaricata* leaves were used for the preparation of AE. Initially the content of total phenols, antioxidant activity, presence of vitexin, concentration of total sugars, sucrose, glucose, fructose, proteins and triacylglycerides were determined in the extract; as well as the capacity of inhibition of oxidative damage to the supercoiled DNA. Afterwards, 72 male Wistar rats, adults, were divided into the experimental groups Naive (rats did not undergo surgical manipulation), Sham (rats that had the right sciatic nerve exposed) and CCI (rats in which four ligatures were tied loosely around the right common sciatic nerve), which received, by gavage, the treatments: water for injection (vehicle) and AE, in doses of 100, 300, 500 and 1000 mg/kg for 10 or 35 days; and gabapentin (50 mg/kg) and AE (500 mg/kg)+gabapentin (30 mg/kg) for 10 days. The treatments began on the day of surgery, after recovery from anesthesia, and followed daily. The AE presented vitexin, a marker of the genus *Luehea*; high content of phenolic compounds; high antioxidant activity and high ability to inhibit oxidative damage to the DNA; predominance of sucrose; and low concentration of proteins and triacylglycerides. The administration of AE significantly increased the response thresholds to von Frey's and hot plate tests and the SFI, reduced by CCI. The effects were comparable to that of gabapentin and also found after administration of AE+gabapentin. In sciatic nerve, AE prevented significant increase in lipid hydroperoxide values, without significantly altering the total antioxidant capacity (TAC). In spinal cord, the AE prevented: significant increase in superoxide anion formation and in hydrogen peroxide and lipid hydroperoxide values; significant drop in total thiols; and significant increase in the TAC, alterations found in vehicle-treated CCI rats. The AE did not cause significant changes in body weight and in values of plasma indicators of liver function (ALT, AST, and bilirubin) and renal function (creatinine), and activity of pro-oxidant and antioxidant markers in the liver. Thus, for the first time it was shown that the use of AE from *L. divaricata* leaves could be an alternative for treatment of CCI-induced neuropathic pain, and that changes in oxidative stress parameters are mechanisms by which the extract acts to induce antinociceptive effect.

Keywords: Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC). Chronic pain. Plants, medicinal. Nociception. Antioxidant Response Elements. Nutrients.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema do sistema nervoso de rato, com ênfase na medula espinal lombar, ilustrando a formação do nervo isquiático.....	23
Figura 2: Redução do oxigênio molecular (O_2) até a formação de água (H_2O) pela ação de enzimas NADPH oxidases (NOx) e da fosforilação oxidativa (FOx).....	25
Figura 3: Distribuição geográfica da espécie vegetal <i>Luehea divaricata</i> Mart. no Brasil e fotografias da folha de uma planta jovem e adulta e da árvore.....	31
Figura 4: Esquema geral mostrando o protocolo experimental.....	37
Figura 5: Região de coleta da espécie <i>Luehea divaricata</i> na cidade de Joaçaba-SC, Brasil.	38
Figura 6: Esquema da preparação do extrato de folhas de <i>Luehea divaricata</i>	39
Figura 7: Esquema temporal mostrando os dias das avaliações das sensibilidades mecânica e térmica, e determinação do índice funcional do nervo isquiático.....	48
Figura 8: As fotografias mostram a sequência dos procedimentos para a realização da constrição crônica no nervo isquiático de ratos.....	50
Figura 9: Esquema mostrando o teste de von Frey eletrônico.....	51
Figura 10: Esquema mostrando o aparelho usado no teste da placa quente.....	52
Figura 11: Fotografia do aparato usado no teste de marcação das patas.....	53
Figura 12: Representação esquemática dos parâmetros medidos para calcular o Índice Funcional do Isquiático (IFI).....	54
Figura 13: Esquema mostrando breve resumo dos principais resultados do presente trabalho.....	170

LISTA DE ABREVIATURAS

- AAPH - 2,2'-Azobis (2-amidinopropano) dicloridrato
- ABTS^{•+} – 2,2'-azinobis(3-etilbenzo-tiazolina-6-sulfonato)
- ALT – alanina aminotransferase
- ANOVA – análise de variância
- AST – aspartato aminotransferase
- AT – açúcares totais
- BHT – butil-hidroxitolueno
- CAT – enzima catalase
- CCI – constrição no nervo isquiático (do inglês, *chronic constriction injury*)
- CDNB - 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
- CREAL – centro de reprodução e experimentação de animais de laboratório
- DTNB – ácido 5,5'- ditiobis (2-nitrobenzóico)
- DNA – ácido desoxirribonucleico
- DPPH -2,2-difenil-1-picril-hidrazila
- DRG – gânglio da raiz dorsal
- EA - extrato aquoso
- EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético
- ET transferência de elétrons
- FOx – fosforilação oxidativa
- FRU- frutose
- GABA – ácido gama-aminobutírico
- GLI - glicose
- GPx – glutaciona peroxidase
- GSH – glutaciona na sua forma reduzida
- GST – enzima glutaciona transferase
- HAT - transferência de átomos de hidrogênio
- HPLC- cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, High performance liquid chromatography)
- H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
- H₂SO₄ – ácido sulfúrico
- IASP – *International Association for the Study of Pain*

IFI – índice funcional do isquiático

KCl – cloreto de potássio

KOH – hidróxido de potássio

LOOH – hidroperóxidos lipídicos

MAPK – proteína quinase ativada por mitógeno

MCA - medicina complementar e alternativa

MEOH - metanol absoluto

NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NBT – azul de nitrotetrazol

NO_x – NADPH oxidases

O₂ – oxigênio molecular

O₂^{•-} – ânion superóxido

OH[•] – radical hidroxil

ONOO⁻ – peroxinitrito

ORAC - Capacidade de absorção de radicais de oxigênio (do inglês *oxygen radical absorbance capacity*)

PBS – tampão fosfato-salina

PQ - placa quente

PMSF – fenil-metil-sulfonil fluoreto

ROO[•]- radicais de oxigênio

ROS – espécies reativas de oxigênio (do inglês, *reactive oxygen species*)

SAC – sacarose

SAG – geração de ânion superóxido

SISBIO- Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

SNC – sistema nervoso central

SOD – enzima superóxido dismutase

TAC – capacidade antioxidante total

TNB – ácido 5-mercaptop-2-nitrobenzóico

TPP – trifenilfosfina

T-SH - Tióis totais

VF – von Frey

XO – xilenol laranja

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	Dor e nocicepção	18
1.2	USO DE MODELOS ANIMAIS.....	21
1.3	Espécies reativas de oxigênio e sistemas antioxidantes: participação na dor neuropática	24
1.4	Uso de plantas medicinais na pesquisa por novos compostos com potencial terapêutico na dor neuropática	27
1.5	<i>Luehea divaricata</i>	30
2	HIPÓTESE	34
3	OBJETIVOS	35
3.1	OBJETIVO GERAL.....	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1	Esquema geral do protocolo experimental	37
4.2	Reagentes	38
4.3	Coleta e preparação do extrato aquoso de folhas de <i>Luehea divaricata</i>	38
4.3.1	Coleta do material vegetal	38
4.3.2	Preparação do extrato aquoso.....	39
4.4	Avaliação da atividade antioxidante do extrato.....	40
4.4.1	Quantificação do conteúdo fenólico total.....	40
4.4.2	Atividade sequestradora do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH).....	40
4.4.3	Capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC, do inglês <i>oxygen radical absorbance capacity</i>)	41
4.4.4	Capacidade sequestradora do radical ABTS.....	41
4.5	Determinação por HPLC da presença de vitexina no extrato	42
4.6	Análise da composição de macronutrientes do extrato de <i>Luehea divaricata</i>	42
4.6.1	Açúcares totais.....	42
4.6.2	Sacarose.....	43
4.6.3	Glicose	43
4.6.4	Frutose.....	43
4.6.5	Triacilglicerídeos	43
4.6.6	Proteínas.....	44
4.7	Determinação da inibição de dano oxidativo ao DNA <i>supercoiled</i> pelo extrato	44
4.8	Efeito da administração oral do extrato aquoso de <i>Luehea divaricata</i> sobre parâmetros antinociceptivos em ratos controle, <i>sham</i> e CCI.	44
4.8.1	Animais: procedência e manutenção	44
4.8.2	Delineamento experimental.....	45
4.8.3	Constricção no nervo isquiático (CCI).....	49
4.9	Parâmetros nociceptivos.....	50
4.9.1	Determinação do limiar mecânico	50
4.9.2	Determinação do limiar térmico	51
4.10	Determinação do índice funcional do isquiático	52
4.11	Determinação do efeito da administração do extrato aquoso de folhas de <i>Luehea divaricata</i> sobre parâmetros de estresse oxidativo em nervo isquiático, medula espinal e fígado de ratos Naive, <i>sham</i> e CCI.....	54

4.11.1	Preparação das amostras.....	54
4.11.2	Parâmetros pró-oxidantes e antioxidantes.....	55
4.11.2.7	Glutathiona-S-transferase (GST)	58
4.12	Indicadores de função hepática e renal.....	59
4.13	Determinação do peso corporal	59
4.14	Análise estatística	59
4.15	Disposição final dos resíduos da pesquisa.....	60
4.15.1	Resíduos químicos	60
4.15.2	Resíduos biológicos.....	60
5	RESULTADOS	61
5.1	ARTIGO 1	61
5.2	ARTIGO 2	107
6	DISCUSSÃO	160
7	CONCLUSÃO.....	171
8	PERPECTIVAS.....	172
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	173
	ANEXO 1	190
	ANEXO 2	191

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dor e nocicepção

A dor constitui um dos componentes essenciais do sistema de defesa do organismo. Seu objetivo principal é alertar um indivíduo da presença ou iminência de um estímulo doloroso, o qual poderá provocar dano tecidual (COHEN; MAO, 2014). Desta forma, a capacidade de detectar estímulos nocivos é essencial à sobrevivência e bem estar de um organismo (WOLLER et al., 2017; COHEN; MAO, 2014; BASBAUM et al., 2009).

De acordo com a definição da Associação Internacional do Estudo da Dor (IASP, do inglês *International Association for the Study of Pain*, 2008), a dor é uma experiência sensorial desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial ou descrita em termos que sugere tal dano. Assim, a dor envolve não somente componentes sensoriais, mas também emocionais (LOESER; TREEDE, 2008). A subjetividade da sensação dolorosa se deve ao fato da informação nociceptiva não se destinar apenas às regiões do sistema somatossensorial (sistema que transmite informações táteis, proprioceptivas, nociceptivas, viscerais e térmicas), mas também a regiões que compõem o chamado sistema límbico, o sistema que compreende as várias áreas corticais e subcorticais envolvidas no processamento das emoções (BALIKI AND APKARIAN, 2015; BASBAUM et al., 2009; VANDERAH, 2007; BEYERS E BONICA, 2001; MILLAN, 1999). Para maior complexidade, a dor pode acompanhar uma variedade de condições que, diretamente ou indiretamente, afetam as vias de transmissão e processamento da informação dolorosa (SHEET, 2005).

Ao se estudar dor, se faz necessário distinguir dor de nocicepção. A dor é subjetiva, se relaciona com a percepção de sensações desagradáveis como irritação, ardência, inflamação ou latejar, geralmente sensações que são provenientes de alguma parte do corpo e constituem uma sensação de caráter subjetivo, que pode ser modulada por diferentes fatores cognitivos como distração, atenção, emoções e elementos socioculturais (WIECH, 2016; COHEN; MAO, 2014; LOESER; TREEDE, 2008; MEINELT et al., 2007; PIMENTA, 1998). A nocicepção se refere ao processo neural de codificação e processamento de um estímulo nocivo (LOESER; TREEDE, 2008). Assim, a nocicepção se refere ao processo pelo qual estímulos térmicos, mecânicos ou

químicos de intensidade elevada são detectados por uma subpopulação de fibras nervosas periféricas chamadas nociceptores (receptores sensoriais capazes de transduzir e codificar estímulos nocivos) (BASBAUM e JESSELL, 2000).

Geralmente a dor acompanha a nocicepção (FEIN, 2011). Na nocicepção, o estímulo doloroso é codificado como mensagem nociceptiva que é transmitida e processada em diferentes regiões do sistema nervoso central (SNC) (WOLLER et al., 2017; DEUIS; DVORAKOVA; VETTER, 2017; BASBAUM et al., 200; LOESER; TREEDE, 2008). De modo geral, os eventos que modulam a transmissão nociceptiva ocorrem principalmente no corno dorsal da medula espinal e em núcleos do tronco encefálico, por serem essas as principais regiões de entrada de informações nociceptivas no SNC. Posteriormente, a informação nociceptiva é modulada em centros encefálicos e estruturas corticolímbicas (WOLLER et al., 2017; TOMPKINS; HOBELMANN; COMPTON, 2017; FEIN, 2011; D'MELLO; DICKENSON, 2008).

Existem diferentes tipos de dor, podendo essa ser classificada quanto a sua intensidade (leve, moderada ou severa), duração (aguda ou crônica) ou tipo (nociceptiva, inflamatória ou neuropática) (DAS, 2015). Independentemente da sua classificação, a dor é uma das principais razões de procura pelo sistema de saúde e está entre as principais causas de incapacitação e absenteísmo ao trabalho (LANGLEY; RUIZ-IBAN, 2011; PICALET; SCHOUTEN, 2003), por afetar a qualidade de vida dos indivíduos acometidos por ela (ZILLOX, 2017). No Brasil, estima-se que a dor crônica atinja em torno de 22% a 40% da população adulta (LEOPOLDINO et al., 2016; DEPINTOR et al., 2016; NASCIMENTO; COSTA, 2015; QUEIROZ & SILVA JUNIOR, 2015; DELLAROZA et al., 2013; DIAS et al., 2009). Devido aos propósitos desse trabalho, será dada ênfase a dor neuropática.

A dor neuropática se relaciona a resposta do tecido nervoso a um dano neural (MEDEIROS et al., 2019). De acordo com a IASP (2008), a dor neuropática é aquela originada como consequência direta de lesão ou doença que afeta o sistema somatossensorial, seja em seus componentes periféricos (dor neuropática periférica) ou centrais (dor neuropática central) (BASU & BASU, 2020; UDALL et al., 2019; COLLOCA et al., 2017; NICKEL et al., 2012; COHEN; MAO, 2014; LOESER; TREEDE, 2008; IASP, 2008). Segundo Medeiros et al. (2019), a dor neuropática pode ser provocada por tumores, doenças metabólicas, infecções, químicos neurotóxicos ou traumas mecânicos que levam a alterações fisiopatológicas, tanto ao sistema nervoso periférico como no SNC. Esse tipo de dor ocorre em condições como neuralgia pós-

herpética, neuralgia trigeminal, radiculopatia dolorosa, neuropatia diabética, infecção por HIV, hanseníase, amputação, lesão nervosa periférica e acidente vascular cerebral (UDALL et al., 2019; COLLOCA et al., 2017). É difícil estimar a prevalência de dor neuropática, mas estudos sugerem sua presença em 1,5% a 10% da população mundial (COLLOCA et al., 2017; ZILLIOX, 2017; BARON; BINDER; WASNER, 2010; FINNERUP et al., 2015). No Brasil, um estudo de coorte com 2118 pacientes com dor crônica revalou prevalência de dor neuropática em 14,5% dos pacientes (UDALL et al., 2019). É possível que a dor neuropática se torne ainda mais prevalente devido ao maior tempo de vida da população mundial, ao aumento da incidência de diabetes mellitus, e ao maior índice de sobrevivência após quimioterapias para tratamento de cânceres, uma vez que essas condições levam a quadros de dor neuropática (COLLOCA et al., 2017).

A dor neuropática reduz significativamente a qualidade de vida das pessoas acometidas por ela. Nos Estados Unidos da América, um estudo destacou que cerca de 20 milhões de americanos possuem dor neuropática, e muitos deles convivem com perda acentuada em sua qualidade de vida (DAS, 2015). Geralmente a dor neuropática está associada à ansiedade, depressão e distúrbios de sono (COLLOCA et al., 2017; ZHAO, H. et al., 2017; FINNERUP et al., 2015; DWORKIN et al., 2007). É comum aos pacientes que experienciam dor neuropática alterações sensoriais como alodinia (dor frente a um estímulo inócuo) e hiperalgesia (resposta exacerbada frente a um estímulo nocivo) (DAS, 2015), as quais caracterizam o quadro chamado sensibilização (aumento na responsividade de neurônios à estimulação normal ou recrutamento de uma resposta a estímulos normalmente sublimiares). A sensibilização ocorre na periferia (sensibilização periférica) e no SNC (sensibilização central). A sensibilização central parece ser um fenômeno chave na fisiopatologia da dor neuropática (COLLOCA et al., 2017).

Os mecanismos envolvidos na sensibilização são complexos, multifatoriais, evoluem ao longo do tempo (PASERO, 2004), e envolvem participação de inúmeros mediadores químicos (CHEN et al., 2010), alguns dos quais serão abordadas neste texto. Para maior complexidade, a dor neuropática ainda possui variações interindividuais devido a componentes genéticos, e acompanha comorbidades variadas (COHEN; MAO, 2014; VAN HECKE et al., 2014). Todos esses fatores tornam a dor neuropática de difícil tratamento. O entendimento incompleto da sua fisiopatologia limita as alternativas terapêuticas para seu manejo (GEIS et al., 2017; MEACHAM et al., 2017). A principal abordagem utilizada atualmente no tratamento da dor neuropática

é a farmacológica, onde se destaca os fármacos gabapentina e pregabalina, e opióides e antidepressivos tricíclicos (COLLOCA et al., 2017; FINNERUP et al., 2015). A gabapentina e a pregabalina são consideradas como tratamento de primeira linha para dor neuropática periférica e central (COLLOCA et al., 2017). No entanto, os tratamentos com esses fármacos são inespecíficos, com eficácia limitada e associados a efeitos adversos variados, como sedação, sonolência, taquicardia, náusea, retenção urinária e ganho de peso. Apenas 30 a 50% dos pacientes relatam alívio satisfatório da dor com o uso de um ou mais desses fármacos (COLLOCA et al., 2017; MAGRINELLI; ZANETTE; TAMBURIN, 2013; DWORKIN et al., 2007). Portanto, torna-se necessário ampliar as possibilidades terapêuticas para manejo de dor neuropática, com o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes e com menos efeitos adversos aos pacientes acometidos por esse tipo de dor.

1.2 USO DE MODELOS ANIMAIS

Os estudos de dor em seres humanos permitem abordagem limitada. Os modelos animais, especialmente roedores, são os mais comumente utilizados na busca de avanços no entendimento dos mecanismos patofisiológicos e desenvolvimento de tratamentos mais eficazes para o manejo de dor (DEUIS; DVORAKOVA; VETTER, 2017; JAGGI; JAIN; SINGH, 2011; MOGIL, 2009).

O uso de modelos animais para o estudo de dor teve início no final do século XIX, e tem sido cruciais para a compreensão dos mecanismos patofisiológicos da dor (GREGORY et al., 2013). Desde o início do uso de modelos animais, desenvolveu-se uma variedade desses modelos, cada um com o intuito de simular um quadro específico de dor (BENNETT & XIE, 1988; BERBERICH et al., 1988; HARGREAVES et al., 1988; SCHAIBLE, SCHMIDT, 1985; WOOLF, 1983). Porém, uma das características dos animais é a incapacidade de verbalizar sua percepção do estímulo doloroso. Todavia, os animais exibem respostas motoras similares às dos seres humanos quando expostos a estímulos nociceptivos, e essas respostas motoras permitem inferir a existência de nociceção. Assim, a nociceção é a abordagem mais apropriada em estudos com modelos animais (DUBNER, 1983; KAVALIERS, 1988; SANDKÜHLER, 2009).

Dentre os diversos modelos de dor neuropática, este trabalho destaca o modelo de constrição crônica no nervo isquiático (CCI, do inglês *chronic constriction injury*), por ter sido esse o modelo empregado no presente estudo. Esse modelo foi desenvolvido

por BENNETT & XIE, em 1988. O modelo é um dos mais comumente utilizados nos estudos de dor neuropática por simular situações clínicas comuns aos humanos, como causalgia ou síndrome da dor complexa regional (JAGGI; JAIN; SINGH, 2011). No modelo, quatro amarraduras com fio bioabsorvível são aplicadas, unilateralmente, no tronco comum do nervo isquiático do animal (Figura 1). Isso provoca dor neuropática, que se caracteriza por dor espontânea e dor evocada, e hiperalgesia e alodinia, condições normalmente observadas em humanos com dor neuropática (KUMAR et al., 2018; GREGORY et al., 2013; KLUSÁKOVA; DUBOVÝ, 2009). A hiperalgesia e alodinia podem ser avaliadas por testes simples de sensibilidade dolorosa normalmente aplicados a roedores (KUMAR et al., 2018; GREGORY et al., 2013; KLUSÁKOVA; DUBOVÝ, 2009; DUBNER, 1983; KAVALIERS, 1988).

No modelo de CCI foi observado que a compressão nervosa associada à amarradura leva a um quadro de degeneração Walleriana, edema intraneural, isquemia focal e lesão inflamatória epineural (KUMAR et al., 2018; GREGORY et al., 2013; JAGGI et al., 2011). A cascata neuroinflamatória que se desenvolve se caracteriza por infiltração de leucócitos, ativação de células gliais e liberação de mediadores químicos com ação pró-inflamatória no local da lesão (FERNANDES et al., 2018). Porém, as mudanças não se limitam apenas à periferia, mas também se estendem às regiões do sistema nervoso central envolvidas no processamento de informação dolorosa (FERNANDES et al., 2018; KUMAR et al., 2018; GREGORY et al., 2013; KLUSÁKOVA; DUBOVÝ, 2009). A alodinia e a hiperalgesia, assim como acréscimo em marcadores de inflamação, já são observados na primeira semana após a CCI e persistem por, no mínimo, sete (07) semanas após a cirurgia (JAGGI et al., 2011).

O modelo CCI tem sido muito usado em pesquisas sobre dor espontânea e anormalidades que caracterizam a dor neuropática (JAGGI et al., 2011). Segundo esses autores, o modelo é muito útil para as análises de sintomas sensoriais associados com a síndrome do encarceramento ou da compressão de nervos cutâneos. Por se caracterizar por amarraduras no nervo, o modelo CCI pode apresentar variações nas respostas fisiopatológicas devido ao grau de variação na intensidade da amarradura, o que traz alguma dificuldade na comparação dos resultados de diferentes estudos onde se utiliza o modelo (JAGGI et al., 2011). Segundo esses autores, outros fatores a provocarem variações são tipo de material usado na amarradura e linhagem do animal usado na pesquisa. Porém, os autores salientam que o modelo CCI tem proporcionado abrir novas

linhas de pesquisa sobre os mecanismos envolvidos em todas as formas de dor neuropática e na pesquisa de tratamentos mais eficazes para o manejo de dor neuropática.

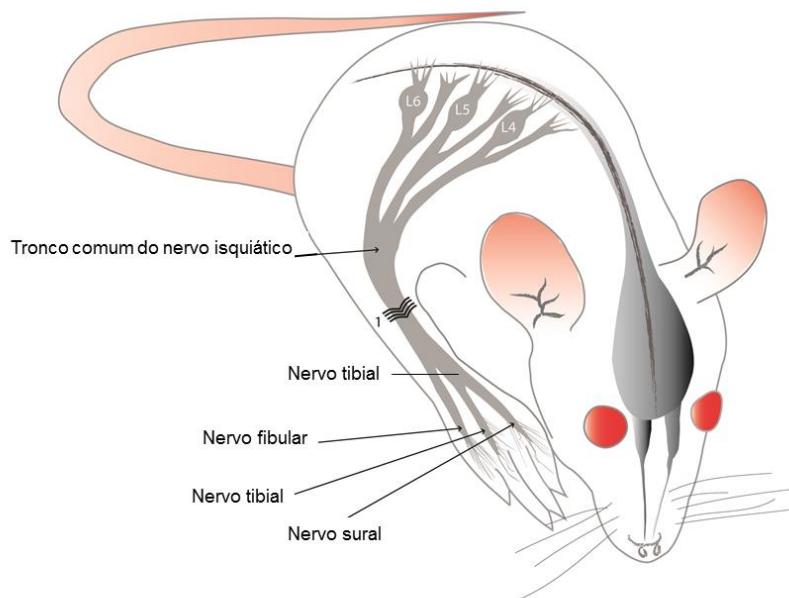


Figura 1: Esquema do sistema nervoso de rato, com ênfase na medula espinal lombar, ilustrando a formação do nervo isquiático. Nas raízes dorsais do nervo isquiático estão mostrados os gânglios das raízes dorsais (L4, L5, L6) desse nervo, o qual é composto por dois nervos, o tibial, que posteriormente se divide também no nervo sural, e o fibular. No tronco comum do nervo isquiático estão mostradas as quatro amarraduras que promovem a constrição nesse nervo (Elaborado pela autora).

Logo após a CCI se observa isquemia local, liberação de mediadores pró-inflamatórios, edema intraneural (WAGNER; MYERS, 1996; MARCHAND; PERRETI; MCMAHON, 2005), e degeneração de fibras mielinizadas e não mielinizadas no nervo lesionado (GABAY; TAL, 2004). A liberação dos mediadores químicos contribui para a sinalização nociceptiva (D'MELLO; DICKENSON 2008; ZHUO, 2018). As alterações periféricas levam a modificações na excitabilidade, as quais se estendem às regiões de entrada da informação dolorosa no SNC, a medula espinal ou o tronco encefálico. Posteriormente, as alterações se estendem a regiões mais superiores do neuroeixo, e as mudanças periféricas e centrais contribuem para a hiperalgesia e a alodinia (BLOM et al.; 2014; SAADÉ; JABBUR, 2008). Uma variedade de mediadores químicos participa no processo de codificação e transmissão da informação dolorosa, incluindo a neuropática (FERNANDES et al., 2018). Porém, para atender os propósitos desse estudo, será destacada apenas a participação das

espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) na dor neuropática.

1.3 Espécies reativas de oxigênio e sistemas antioxidantes: participação na dor neuropática

Algumas fontes endógenas usuais de geração de ROS são processo de fosforilação oxidativa mitocondrial e atividade de enzimas como nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidases (NADPH oxidase) e citocromo P450 (Figura 2) (GRACE et al., 2016, POLJSK; SUPUT, MILISAV, 2013; KIM, et al., 2004).

As ROS podem ser radicalares, como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxil (OH^{\bullet}), ou não radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O $O_2^{\bullet-}$ pode potencialmente reagir com componentes celulares próximos, mas é rapidamente convertido a H_2O_2 , uma molécula mais estável que o $O_2^{\bullet-}$ (Figura 2). O H_2O_2 , por sua vez, pode reagir com metais de transição, como ferro e cobre, presentes na célula, dando origem ao radical OH^{\bullet} (HALLIWELL, 2012; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Este último é extremamente reativo, propagando a formação de ROS como uma reação em cadeia, mediante remoção de elétrons de outras moléculas e transformação destas em novos radicais. O H_2O_2 , por sua vez, tem menor reatividade, mas pode se difundir pelo citoplasma e eventualmente chegar ao núcleo e reagir com o DNA (BECKHAUSER; FRANCIS-OLIVEIRA; PASQUALE, 2016; KIM et al., 2015). Apesar de potencial para reagir com outras moléculas de forma deletéria, atualmente vem se reconhecendo que as ROS são fundamentais para a sinalização e manutenção de um ambiente redox adequado às diferentes funções celulares (LEVONEN, 2014).

As ROS, quando em excesso, podem levar a situações de estresse celular mediado por oxidantes (GRACE et al., 2016; KALLENBORN-GERHARDT et al., 2013; POLJSK et al., 2013; SIES, 1991, 2015). Por outro lado, em baixas concentrações, essas espécies atuam benéficamente em funções fisiológicas como respostas mitogênicas, ativação de fatores de transcrição e regulação de vias de sinalização intracelular (PIZZINO et al., 2017; DROGE, 2002; ADAMS et al., 2015). De acordo com Poljsak et al. (2013), um ambiente levemente pró-oxidativo é necessário para manter os processos de sinalização em condições ideais, o que sugere que as correções nas concentrações de ROS devem ser sutis.

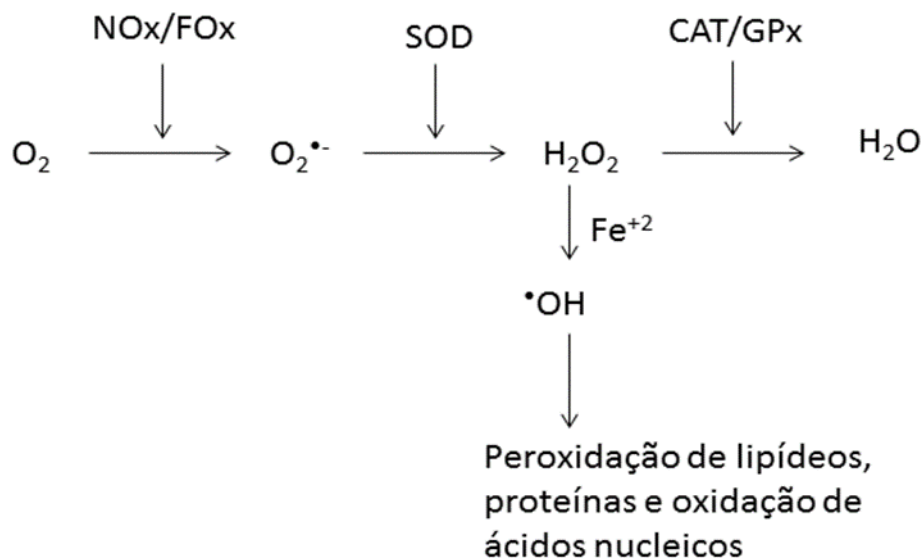


Figura 2: Redução do oxigênio molecular (O_2) até a formação de água (H_2O) pela ação de enzimas NADPH oxidases (NOx) e da fosforilação oxidativa (FOx). No esquema é mostrada a formação de ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e radical hidroxil (OH^{\bullet}), assim como a ação das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx) e catalase (CAT). NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (Adaptado de Grace et al., 2016).

A formação de ROS, em condições normais, é fortemente regulada por sistemas de defesa antioxidante (ZHOU et al., 2018), constituído por componentes enzimáticos e não enzimáticos (POLJSK et al., 2013). Os antioxidantes são moléculas que quando presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável previnem a oxidação do substrato (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Assim, os antioxidantes possuem papel essencial na regulação da produção de ROS e na proteção do meio intracelular aos danos causados pelo excesso nessas espécies (PIZZINO et al., 2017; DROGE, 2002).

Dentre as primeiras linhas de defesas antioxidantes enzimáticas, destaca-se a superóxido dismutase (SOD), que catalisa a conversão de $\text{O}_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 . O H_2O_2 , por sua vez, pode ser eliminado pela catalase (CAT) ou peroxidases. Dentre as peroxidases se destaca a glutatona peroxidase (GPx), que utiliza diversas moléculas redutoras, como o ácido ascórbico, a glutatona (GSH) e a tioredoxina (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; FRIDOVICH, 1998). Entre os antioxidantes não enzimáticos, destaca-se o ácido ascórbico, a GSH e o alfa-tocoferol. A GSH é um tripeptídeo capaz de reduzir e regenerar várias moléculas oxidadas, atuando também como um eficiente *scavenger* (capacidade de neutralizar os radicais livres formando compostos menos reativos) de ROS (HALLIWELL; GUTTENRIDGE, 2007; SALMON et al., 2010;

SCHNEIDER C.D., DE OLIVEIRA, A.R, 2004). Os tióis totais, dentre os quais está a glutathiona, são particularmente sensíveis às reações redox e são considerados sensores redox, os quais interagem com diferentes tipos de oxidantes para formar, em diversas situações, uma modificação covalente reversível que inclui a formação de pontes dissulfídicas, um dos principais mecanismos por meio do qual se pode controlar a função de proteínas (EATON, 2006; DROGE, 2002). Assim, um marcador importante de oxidação de proteínas é o conteúdo de tióis totais (TROMM et al., 2016).

Quando as ROS se sobressaem frente ao sistema antioxidante celular, seja por um aumento em sua geração ou diminuição nas defesas antioxidantes, ocorre o fenômeno de estresse oxidativo, levando a perturbações na sinalização redox e/ou danos às macromoléculas (SIES, 2014; RAY; HUANG; TSUJI, 2012). Inúmeros estudos relatam a participação de ROS no desenvolvimento das mais diversas patologias como, por exemplo, patologias cardiovasculares, metabólicas e neurodegenerativas, devido às ações oxidantes e deletérias das ROS em proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (SHICHIRI, 2014). Entretanto, o envolvimento de ROS na patogênese de doenças não se restringe aos danos oxidativos, pois nos últimos anos se mostrou que estas espécies também interagem e regulam mensageiros intracelulares em vias de sinalização de vários processos, como proliferação, metabolismo e sobrevivência celular (KENNEDY et al., 2012; RAY; HUANG; TSUJI, 2012), além de condições de inflamação e excitotoxicidade (SORG, 2004; NISHIKAWA; HASCHIDA; TAKAKURA, 2009).

Em condições de dor neuropática, diversos estudos mostraram mudanças em antioxidantes e incrementos na formação de ROS, tanto no local da lesão como em regiões do SNC (RIFFEL et al., 2018; SCHEID et al., 2018; KIM, H. Y. et al., 2015; SCHEID et al., 2013; HORST et al., 2014; MUTHURAMAN, 2012; THIAGARAJAN et al., 2013; GUEDES et al., 2008; NAIK et al., 2006; KHALIL, LIU, HELME, 1999). No local da lesão, os estudos mostraram maior peroxidação de lipídeos e alterações em sistemas antioxidantes, como atividade de enzimas antioxidantes e redução na concentração de GSH (NAIK et al., 2006). As alterações pareceram relacionadas à reação inflamatória local e ativação de enzimas como NADPH oxidases, xantina oxidase e óxido nítrico sintases (MITTAL et al., 2014). A NADPH oxidase tipo 4 parece desempenhar papel importante no estresse oxidativo e nas alterações em citocinas que ocorrem no local da lesão nas fases iniciais após a lesão por CCI (GEIS et al., 2017). Segundo Pathak et al. (2014), as modificações em parâmetros de estresse

oxidativo, decorrentes de lesão por CCI, se estendem ao SNC e podem chegar até córtex cerebral. Em medula espinal, um dos componentes do SNC, o envolvimento do $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 no desenvolvimento da sensibilização associada à dor crônica vem sendo bastante destacado (GRACE et al., 2016; KIM, H. Y. et al., 2015; SALVEMINI et al., 2011). O $O_2^{\bullet-}$ parece mediar a potencialização a longo prazo em neurônios excitatórios do trato espinotalâmico (neurônios que retransmitem informações nociceptivas da medula espinal para o cérebro), e a depressão a longo prazo em interneurônios inibitórios GABAérgicos da medula espinal (BITTAR et al., 2017). O H_2O_2 parece aumentar a frequência dos potenciais de ação nos neurônios primários envolvidos na dor neuropática (SÖZBIR; NAZIROGLU, 2016). Quanto às alterações em antioxidantes, foi demonstrada diminuição em tióis totais na medula espinal e nervo isquiático em condições de dor neuropática (BHAT et al., 2016; NAIK et al., 2006).

Dado ao papel importante das ROS na dor, inúmeros estudos vem destacando tratamentos com moléculas com ação antioxidante como opção para atenuar ou diminuir a dor neuropática (RIFFEL et al., 2020; KHASABOVA et al., 2019; ZHOU et al., 2018; RIFFEL et al., 2018; SCHEID et al., 2018; HORST et al., 2017a,b; PATHAK et al., 2014; YOWTAK, 2013, SALVEMINI et al., 2011). Nesse contexto, se inclui o uso de produtos naturais, principalmente de plantas medicinais, as quais geralmente são ricas em moléculas com ação antioxidante (QUINTANS et al., 2014). Porém, um número crescente de evidências indicaram a necessidade de se determinar precisamente as condições de estresse oxidativo em um indivíduo antes de prescrever suplementação com antioxidantes (POLJSAK et al., 2013), a fim de se evitar um estresse por excesso de antioxidantes. Neste contexto, torna-se essencial realizar estudos que avaliam condição redox tecidual em indivíduos submetidos a tratamentos com componentes ricos em moléculas com ação antioxidante. Dado ao interesse desse trabalho, a seguir será destacado o potencial de plantas medicinais na dor neuropática.

1.4 Uso de plantas medicinais na pesquisa por novos compostos com potencial terapêutico na dor neuropática

A aplicação de produtos naturais, principalmente de plantas medicinais na prevenção e cura de doenças, é uma das mais antigas práticas humanas (HALBERSTEIN, 2005). A investigação científica sobre o potencial medicinal de plantas permite, por um lado, o reconhecimento da importância desta prática milenar no

tratamento de condições patológicas e, por outro, a obtenção de dados científicos que asseguram o uso do conhecimento tradicional em diferentes patologias (NGO; OKOGUN; FOLK, 2013). Embora o avanço tecnológico possibilite o desenvolvimento de fármacos sintéticos, as plantas medicinais continuam sendo extensamente estudadas por fornecerem produtos de grande diversidade molecular e, conseqüentemente, de mecanismos de ação (NGO; OKOGUN; FOLK, 2013).

Atualmente, os medicamentos populares, principalmente à base de plantas, ocupam posição respeitável dentre as diversas opções de tratamento de diferentes patologias, incluindo dor. Isso ocorre especialmente em países em desenvolvimento, devido à disponibilidade limitada de acesso da população aos serviços de saúde (AGRA et al., 2007). Apesar da medicina moderna se apoiar principalmente na indústria farmacêutica, hoje bem desenvolvida na maior parte do mundo, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimula o desenvolvimento de programas de medicina tradicional e o aprimoramento de políticas para o desenvolvimento e uso de medicina complementar e alternativa (MCA) em seus programas de saúde (OMS, 2002). Entre os diversos procedimentos na MCA, a fitoterapia é o tipo praticado por grande percentagem da população mundial, onde se observa tanto o uso de plantas como de seus derivados (Ministério da Saúde – Brasil, Portaria n. 971, 2006).

As propriedades terapêuticas das plantas medicinais se devem à presença de centenas ou milhares de compostos naturais bioativos, que podem ser classificados como metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários são aqueles compostos básicos que todas as plantas produzem e que estão diretamente envolvidos em seu crescimento e desenvolvimento, como açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, lipídeos e nucleotídeos (GARCÍA e CARRIL, 2009). Segundo esses autores, os compostos primários também compreendem moléculas maiores sintetizadas a partir dos constituintes básicos, como proteínas, polissacarídeos, constituintes de membranas celulares, DNA e RNA. Os metabólitos secundários, por sua vez, são altamente específicos e desempenham papel importante na evolução dos vegetais e na interação dos mesmos com os seres vivos podendo, muitas vezes, estarem acumulados em vários órgãos da planta ou em células especializadas (NAHDI et al., 2018). Os compostos bioativos proporcionam benefícios à saúde de diferentes organismos, tecidos ou células vivas, e compreendem químicos pertencentes a diferentes classes como, por exemplo, vitaminas, carotenóides (licopeno, β -caroteno e xantofilas) e compostos fenólicos (KOMES et al., 2011). Estes compostos estão presentes em uma grande variedade de

alimentos, como frutas e vegetais, e sua ingestão traz benefícios na prevenção e no tratamento de muitas doenças como, por exemplo, ansiedade, insônia, anorexia, tosse e bronquite (KAEFER, 2008). Muitos dos metabólitos secundários exibem atividades biológicas quando estão presentes em extratos vegetais, e constituintes como polifenóis, flavonóides e óleos essenciais possuem efeitos benéficos à saúde e atuam como antioxidantes naturais (NOUMI et al., 2010). De modo geral, os extratos obtidos de folhas se caracterizam por possuírem grandes quantidades de compostos fenólicos (ARANTES et al., 2014; CALIXTO-JÚNIOR et al., 2016).

O interesse pelo uso de plantas como alternativa terapêutica no alívio da dor neuropática também tem crescido (MEHTA; TRIPATHI, 2015; AMIN; HOSSEINZADEH, 2012; MUTHURAMAN, 2012; YUAN et al., 2010). O crescimento se deve à prospecção etnomedicinal, a qual permite direcionar as investigações para aquelas espécies com potencial analgésico, e também por ter as plantas uma grande variedade molecular, que pode se mostrar particularmente útil no manejo deste tipo de dor (SHEID, 2013).

Em uma revisão sistemática sobre plantas medicinais aplicadas em modelos de dor neuropática, os autores destacaram que a maioria dos estudos se realizou na Índia, no Brasil e na China, possivelmente devido a grande biodiversidade nesses países (QUINTANS et al., 2014). Considerando o Brasil, esse país ocupa grande parte da região conhecida como neotropical, onde se encontra um terço de toda biodiversidade do planeta (DESMARCHELIER, 2010). Embora o Brasil não tenha uma medicina tradicional tão desenvolvida quanto a da Índia e China, o uso de recursos naturais já existia entre os povos indígenas pelo menos 2000 anos antes da descoberta do Brasil por Portugal (BRANDÃO et al., 2008). Apesar de essa longa história na medicina tradicional, o Brasil ainda se caracteriza por ter a maior parte dos estudos com plantas desenvolvidos com espécies vegetais exóticas (QUINTANS et al., 2014). Isto contribui para uma perda significativa na cultura do uso tradicional de plantas nativas. Como consequência, se observa subvalorização das potencialidades medicinais de plantas nativas brasileiras. Com o intuito de aprimorar o conhecimento tradicional de plantas do Brasil, e atender às propostas da OMS que visam valorizar o uso de plantas medicinais de uso tradicional, o presente trabalho selecionou a espécie nativa *Luehea divaricata* para determinar seu potencial como uma possível alternativa para tratamento de dor neuropática induzida por CCI.

1.5 *Luehea divaricata*

A espécie *L. divaricata* Mart., pertencente a família Malvaceae, é uma planta arbórea de grande porte, podendo atingir dimensões próximas a 30 m de altura e 100 cm de diâmetro, esse último medido a 1,30 m do solo e na idade adulta. A espécie é conhecida popularmente como açoita-cavala, açoita-cavalo miúdo, ibatingui, ivatingui, pau-de-cana, caiboati e esteiveira (TIRLONI et al., 2019; BIESKI et al., 2012). No Brasil, a açoita-cavalo é encontrada principalmente nas regiões sul, sudeste e centro-oeste (Figura 3) (BIESKI et al., 2012; ALICE et al; 1995; LORENZI, 1988), sendo particularmente comum ao longo de rios, terrenos íngremes, locais onde a mata é mais aberta, e em capoeiras bem desenvolvidas (REITZ et al, 1988). Ela é uma espécie heliófita que habita preferencialmente locais com bastante luz e umidade (Figura 3). No período do inverno, a *L. divaricata* perde totalmente suas folhas. Sua florescência ocorre nos meses de dezembro a fevereiro, estando seus frutos amadurecidos nos meses de maio a junho (LORENZI; 1988).

A espécie *L. divaricata* é amplamente usada por diferentes grupos étnicos nativos do Brasil, como indígenas e populações ribeirinhas da região pantaneira, para tratar diferentes condições patológicas como cicatrização de feridas, antiartrítico, antileucorreico, laringite, bronquite, lesões de pele, entre outras (TIRLONI et al., 2019; TANAKA et al, 2003; ALICE et al., 1995; MAFFEI, 1969; ROIG & MESA, 1945). Atualmente, folhas de *L. divaricata* são encontradas no comércio local de produtos fitoterápicos no Brasil. Segundo Bieski et al. (2012), as populações ribeirinhas da região do pantanal usam *L. divaricata* para tratar patologias como ácido úrico, da coluna vertebral, purificador do sangue, da garganta, gripe, hemorroidas, do intestino, relaxante muscular, dos rins, tosse e tumores, sendo a administração por decocção e xarope. Ainda segundo Bieski et al. (2012), as folhas de *L. divaricata* são usadas como diurético, enquanto seu caule é usado como anti-inflamatório e seus frutos e partes aéreas para cicatrização de feridas na pele, espinhas e lavagens vaginais.

Os índios Mbyá-Guarani possuem o hábito de mascar regularmente as folhas de *L. divaricata* para prevenir afecções bucais (WALKER et al, 2008). Segundo Silveira & Silveira (2002), esse hábito dos indígenas se relaciona à ausência de problemas periodontais nessa população. Foi demonstrado que extrato obtido de folhas de *L. divaricata* possui propriedades antifúngicas (ZACCHINO et al.,1998), genotoxicidade e ação mutagênica em testes com micro-organismos como *Salmonella* (VARGAS et al., 1991).

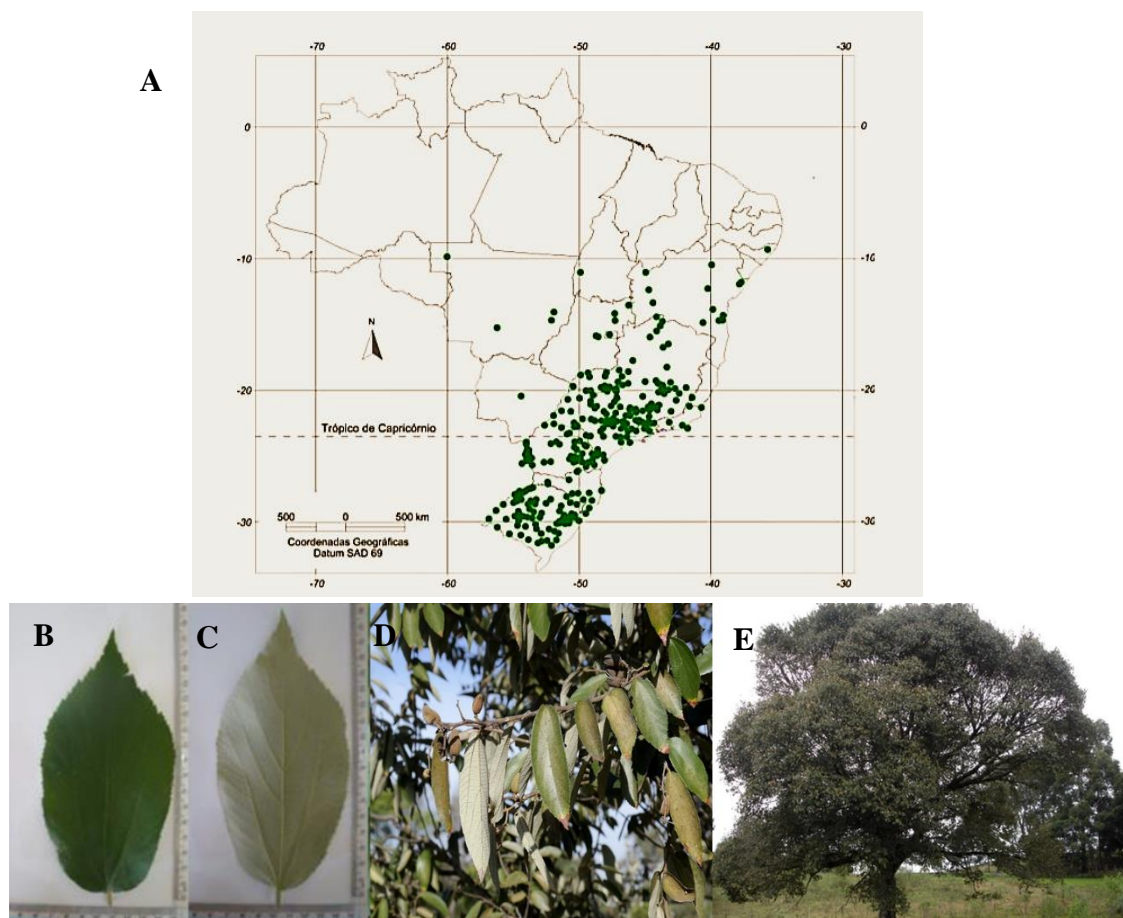


Figura 3: Distribuição geográfica da espécie vegetal *Luehea divaricata* Mart. no Brasil (A), e fotografias da folha de uma planta jovem (B) e adulta (B, C) e da árvore (E) (Fonte: www.infoteca.cnptia.embrapa.br).

Como abordado anteriormente, tanto folhas como cascas, flores e raiz de *L. divaricata* são usadas na medicina tradicional. Diversos estudos mostraram que a decocção preparada com casca de *L. divaricata* é utilizada popularmente para tratar artrite, reumatismo, tumores e feridas decorrentes de gangrenas (BALBACH, 1993; CHIRIANI, 1982; MAFFEI, 1969). O estudo de Carvalho (2006) mostrou a eficácia do extrato hidroalcoólico preparado de cascas de *L. divaricata* no tratamento de úlceras gástricas. Quanto a genotoxicidade, nenhum efeito foi observado em *Drosophila melanogaster* após a administração de extrato preparado de cascas de *L. divaricata* nas doses de 0,10, 0,30 e 0,50 mg/mL (FELÍCIO et al., 2011). A análise fitoquímica desse extrato mostrou a presença de componentes como epicatequina, stigmasterol, lupeol, e α e β -amirina (ROSA et al., 2014; SIQUEIRA, 2006; TANAKA et al., 2005).

Os extratos obtidos de folhas de *L. divaricata* também apresentaram uma grande quantidade de componentes com ação antioxidante, como derivados do ácido

clorogênico, vários flavonóides, incluindo rutina, vicenina, vitexina, isovitexina, quercetina, kaempferol, epicatequina e seus respectivos conjugados glicosilados, e triperpenóides e fitoesteróis (TIRLONI et al., 2017; CALIXTO-JÚNIOR et al., 2016; COURTES et al., 2015; ARANTES et al., 2014; TANAKA et al., 2005). O extrato também apresentou alcaloides, óleos fixos, antocianidinas, carotenóides e polissacarídeos (BORTOLUZZI et al., 2002). No extrato bruto metanólico das folhas de *L. divaricata* foi encontrado ácido 3b-*p*-hidroxibenzoil-tormêntico, ácido maslínico, vitexina e glicopiranosilsterol (TANAKA et al., 2005). Segundo Calixto-Júnior et al. (2016), a vitexina é um marcador taxonômico do gênero *Luehea*.

Quanto aos efeitos fisiológicos de extratos obtidos de partes de *L. divaricata*, Courtes et al. (2015) mostraram efeito neuroprotetor do extrato aquoso obtido de folhas de *L. divaricata* em modelo experimental da Doença de Huntington. Nesse estudo, a administração oral do extrato, por 10 dias, nas doses de 500 e 1000 mg/kg de peso corporal, melhorou o desempenho de ratos em testes comportamentais (testes: campo aberto e rota rod) e, paralelamente, reduziu a peroxidação de lipídios e aumentou a relação entre glutatona reduzida e oxidada em córtex cerebral e estriado dos animais tratados. O estudo mostrou ainda a presença de ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, ácido caféico, epicatequina, vitexina, ácido rosmarínico, rutina, quercetina e luteolina no extrato (COURTES et al. 2015). O extrato aquoso obtido de folhas de *L. Divaricata* também mostrou atividade genotóxica em organismos procarióticos (VARGAS et al., 1991).

O extrato metanólico obtido de folhas de *L. divaricata* apresentou efeito citostático, enquanto aquele obtido de cascas dessa espécie vegetal mostrou atividade antimutagênica (FELÍCIO et al., 2011). Foi demonstrado ainda que camundongos tratados com extrato bruto hidroalcoólico de *L. divaricata*, na dose de 5,0 g/kg de peso corporal, administrado por via oral, não exibiram sinais de toxicidade (LOOMIS, 1974). Os estudos com extratos de folhas de *L. divaricata* ainda mostraram os efeitos que seguem: ação diurética e hipotensiva da fração etanólica desse extrato, a qual pareceu se relacionar à redução em parâmetros de estresse oxidativo e a aumento na biodisponibilidade de óxido nítrico (TIRLONI et al., 2017); ação diurética e hipotensiva sustentada da fração n-butanólica do extrato, efeitos que pareceram se relacionar com liberação de óxido nítrico e prostaglandinas, os quais reduzem tônus arteriolar renal e periférico e levam a aumento na taxa de filtração glomerular e redução na resistência

periférica global (TIRLONI et al., 2018a); e ação vasodilatadora da fração aquosa do extrato (TIRLONI et al., 2018b).

Em situação de dor inflamatória, a dor resultante de lesão tecidual e infiltração de células imune levando à sensibilização (SRIKANTH et al., 2018), a administração por 14 dias de extrato hidroalcoólico preparado de casca de *L. divaricata*, em doses de 10-300 mg/kg de peso corporal, provocou antinocicepção em camundongos (ROSA et al., 2014). Todavia, os mecanismos convergentes e divergentes subjacentes à dor inflamatória versus neuropática indicam que nem sempre existe um delineamento mecanicista claro entre essas duas condições dolorosas, principalmente quando se avalia a progressão de dor aguda para a dor crônica (BURMA et al., 2017). Porém, não havia até o momento estudos avaliando os efeitos da administração de extratos de *L. divaricata* em condições de dor neuropática. Considerando essas questões, e ainda que cada modelo animal para o estudo da dor se baseia em uma metodologia específica para indução do quadro doloroso, e os resultados variam amplamente com pequenas alterações na metodologia de indução da dor, tornando essencial que dados de diferentes modelos animais para o estudo da dor sejam relatados e interpretados no contexto específico do modelo de dor (JAGGI et al., 2011), o presente estudo se propôs a avaliar o efeito da administração de extrato aquoso (EA) de folhas de *L. divaricata* em modelo de dor neuropática induzida por CCI. Assim, primeiramente se avaliou a capacidade antioxidante, a inibição de dano oxidativo ao DNA e a composição de macronutrientes do extrato obtido de folhas de *L. divaricata*, para conhecimento de perfil fitoquímico do extrato. Posteriormente se fez a administração desse extrato aquoso a ratos com CCI e se avaliou, nos animais tratados, a nocicepção, o índice funcional do nervo isquiático (IFI), e parâmetros de estresse oxidativo em nervo isquiático e segmento lombossacral da medula espinal, com o intuito de oferecer subsídios ao entendimento de possíveis mecanismos que contribuem para a ação antinociceptiva do extrato em condição de dor neuropática.

2 HIPÓTESE

Como extrato de folhas de *L. divaricata* mostrou uma grande variedade de compostos com ação antioxidante, e vitexina é considerada um marcador taxonômico da espécie *Luehea*, o extrato preparado de folhas de *L. divaricata* deve exibir boa capacidade antioxidante, ser capaz de inibir dano oxidativo ao DNA, apresentar vitexina e os principais macronutrientes em sua composição.

Ainda, como o tratamento com extrato de *L. divaricata* provocou antinocicepção em ratos com dor inflamatória, a administração oral de EA preparado a partir de folhas de *L. divaricata* deverá reduzir as sensibilidades mecânica e térmica em ratos com CCI, procedimento que sabidamente reduz essas sensibilidades nesses animais. O tratamento também poderá melhorar o IFI, uma medida de recuperação sensório-motora pós-lesão nervosa. Dada à presença de compostos com ação antioxidante em extrato de folhas de *L. divaricata*, a administração de EA de folhas dessa espécie vegetal provocará mudanças em parâmetros oxidativos em nervo isquiático lesionado e segmento lombossacral da medula espinal, e as alterações deverão ser em direção oposta àquelas desencadeadas pela CCI. O efeito antinociceptivo do extrato ocorrerá sem causar toxicidade aos animais.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da administração oral do EA preparado de folhas de *L. divaricata*, dado em diferentes doses e por 10 e 35 dias, sobre nocicepção, recuperação funcional do nervo isquiático, e parâmetros de estresse oxidativo em medula espinal de ratos com dor neuropática induzida por CCI, realizando antes do início do tratamento análise do extrato para determinar atividade antioxidante, composição de macronutrientes e capacidade de inibir dano ao DNA.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1. Avaliar a atividade antioxidante do extrato preparado a partir de folhas de *L. divaricata*, mediante emprego dos ensaios para:

- a) Quantificação do conteúdo fenólico total.
- b) Atividade sequestradora do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DDPH).
- c) Capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC, do inglês *oxygen radical absorbance capacity*).
- d) Capacidade sequestradora do radical ABTS [2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium sal].

3.2.2 Determinação da presença de vitexina no extrato.

3.2.3 Análise da composição de macronutrientes do extrato.

3.2.4 Determinação da capacidade de inibição de dano oxidativo ao DNA.

3.2.5 Determinar o efeito da administração oral do EA, nas doses de 100, 300, 500 e 1000 mg/kg/dia por 10 e 35 dias, e de gabapentina (50 mg/kg/dia) e gabapentina (30 mg/kg/dia)+EA (500 mg/kg/dia) por 10 dias, sobre:

- a) Parâmetros nociceptivos.
- b) Recuperação funcional do nervo isquiático.

- c) Parâmetros de estresse oxidativo em nervo isquiático lesionado.
- d) Parâmetros de estresse oxidativo no segmento lombossacral da medula espinal.

3.2.6 Determinar o efeito da administração oral do EA, nas doses de 100, 300, 500 e 1000 mg/kg/dia por 10 e 35 dias, e de gabapentina (50 mg/kg/dia) e gabapentina (30 mg/kg/dia) + EA (500 mg/kg/dia) por 10 dias, sobre peso corporal, os indicadores plasmáticos de função hepática e renal e parâmetros de estresse oxidativo em fígado, a fim de determinar possível toxicidade do extrato.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Esquema geral do protocolo experimental

As atividades realizadas neste trabalho são apresentadas, de início, de forma agrupada e esquemática (Figura 4), para compreensão global do protocolo experimental. No decorrer da descrição metodológica são apresentadas maiores informações.

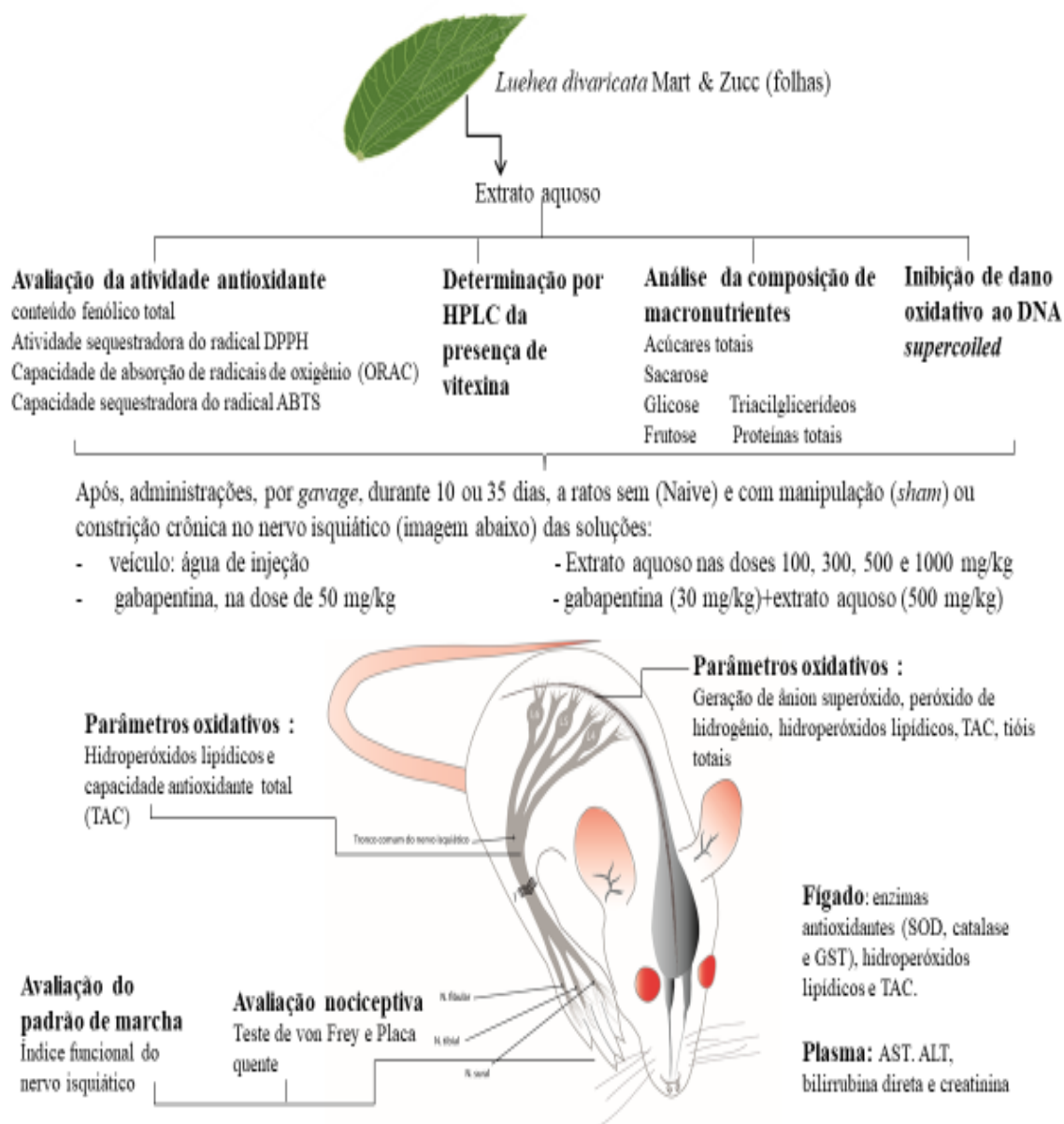


Figura 4: Esquema geral mostrando o protocolo experimental (Elaborado pela autora).

4.2 Reagentes

Os reagentes empregados neste trabalho foram obtidos, em sua maioria, dos fabricantes Sigma-Aldrich (enzimas, padrões antioxidantes), Merck, Nuclear e Synth (solventes orgânicos, ácidos), grau de pureza para análise (P.A). A qualidade da água empregada na limpeza de materiais pode ser descrita como água reagente (destilação simples) e para o preparo de soluções utilizou-se água purificada (destilação e troca iônica) (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

4.3 Coleta e preparação do extrato aquoso de folhas de *Luehea divaricata*.

4.3.1 Coleta do material vegetal

Após autorização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO - 54348-1, ANEXO I), folhas de *Luehea divaricata* foram coletadas na cidade de Joaçaba, Santa Catarina, Brasil (27.0938,6 ° S, 51.31328 ° W) (Figura 5A). O espécime foi identificado com o número de documentação 382.136 da coleção do Museu Botânico Municipal, Curitiba, Paraná, Brasil, onde foi depositado para armazenamento (Figura 5B).

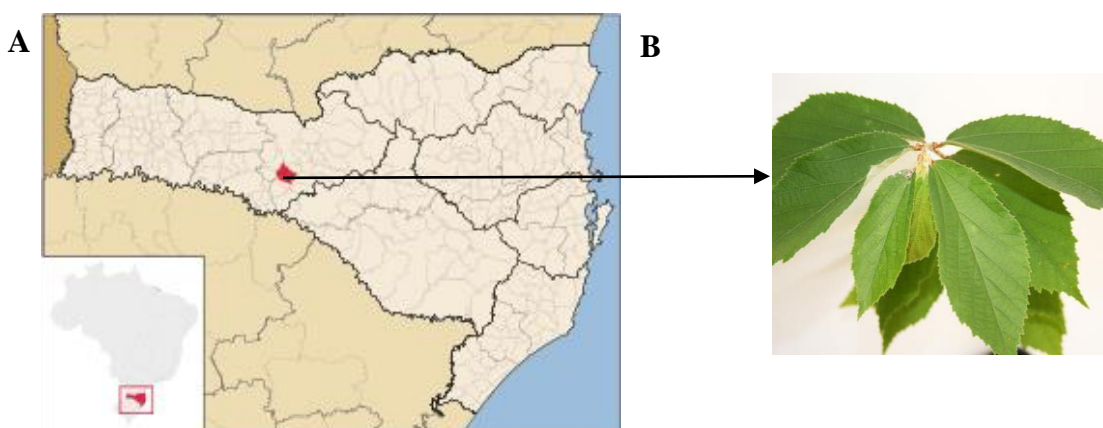


Figura 5: Região de coleta da espécie *Luehea divaricata* na cidade de Joaçaba (ponto na cor vermelha no mapa), que se situa na região sul do Brasil (A). A fotografia indicada pela seta que emerge da região de Joaçaba mostra as folhas da espécie *Luehea divaricata* (B) (Fonte Google).

4.3.2 Preparação do extrato aquoso

As folhas coletadas de *L. divaricata* foram submetidas à secagem em estufa com circulação de ar ($40^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por 168 horas) e, posteriormente, manualmente trituradas. Em seguida, o material triturado foi submetido à infusão com água, na proporção 1L de água fervente para cada 100 g de folhas secas. A infusão teve duração de 10 minutos, conforme técnica descrita por Courtes et al. (2015). Após, a solução obtida foi filtrada e o solvente removido mediante uso de evaporador rotatório, sendo o processo efetuado em banho-maria ($<60^{\circ}\text{C}$). O extrato obtido foi submetido à secagem em estufa ($40 \pm 2^{\circ}\text{C}$) até se obter um pó (Figura 6). O extrato em pó foi armazenado em frasco de vidro âmbar e mantido à temperatura $2-8^{\circ}\text{C}$ até sua utilização nos experimentos.

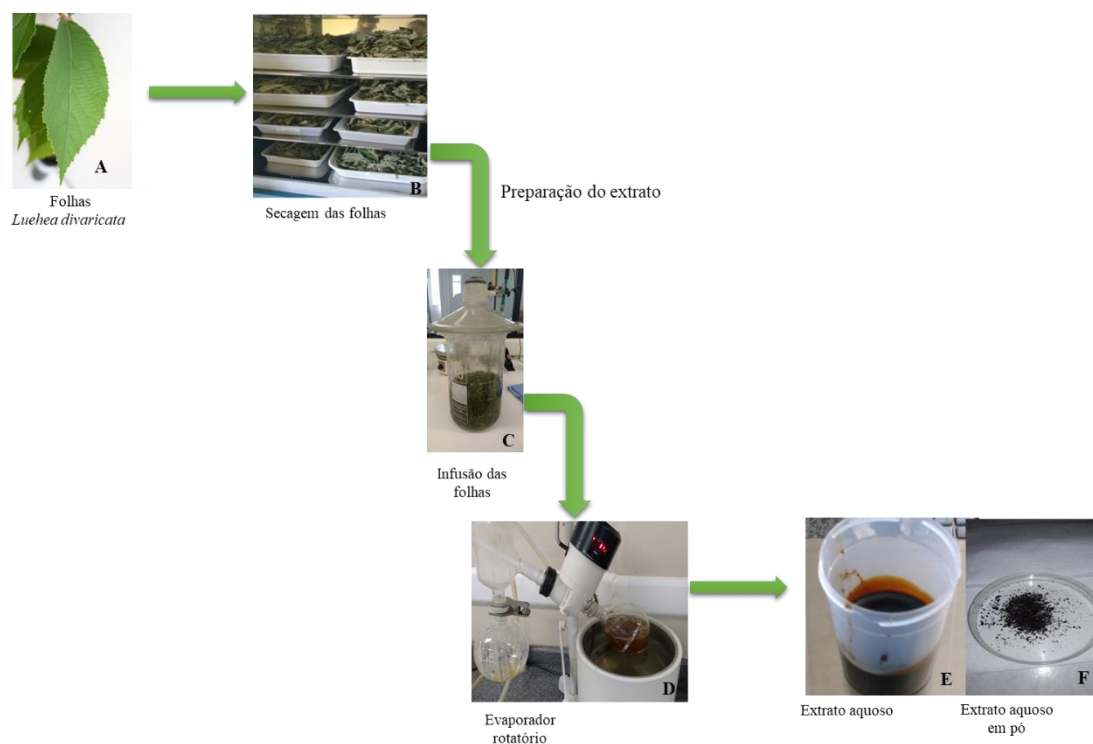


Figura 6: Esquema da preparação do extrato de folhas de *Luehea divaricata*. As folhas (A) foram secas em estufa com ar circulante (B), seguida de infusão das mesmas em água (C) e evaporação do solvente por uso de evaporador rotatório (D), para obtenção do extrato em estado pastoso (E), o qual foi desidratado até se obter o extrato em pó (F) (Elaborado pela autora).

4.4 Avaliação da atividade antioxidante do extrato

4.4.1 Quantificação do conteúdo fenólico total

A quantificação de fenóis totais do extrato foi realizada conforme descrito por Siatka & Kasparová (2010), com pequenas modificações (SCHEID et al., 2018). Para isso, inicialmente misturou-se 0,1 mL de solução do extrato (0,1 mg/mL) a 7,4 mL de água, 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (1,3 N) e 2,0 mL de carbonato de sódio (20%). A mistura foi colocada em banho-maria (28±2 °C), onde permaneceu por 1h30min. Após, a absorbância da solução foi medida a 750 nm. O teor de fenóis totais foi determinado aplicando-se o valor da absorbância do extrato na equação da reta obtida a partir da curva de calibração, construída com diferentes concentrações do padrão fenólico ácido gálico. Os resultados foram expressos em mg EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de extrato (mg EAG/g extrato). A análise foi realizada em triplicata.

4.4.2 Atividade sequestradora do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)

Este ensaio foi realizado conforme descrito por Siatka & Kasparová (2010), com pequenas modificações, a fim de determinar a atividade de moléculas antioxidantes lipossolúveis (SCHEID et al., 2018). O radical DPPH, de coloração púrpura em comprimento de onda 515 nm, quando reduzido por substâncias antioxidantes tem sua coloração modificada, que pode ser medida espectrofotometricamente pela redução em sua absorbância neste mesmo comprimento de onda. O procedimento experimental consistiu em adicionar 0,1 mL da solução aquosa do extrato e do antioxidante conhecido (Butil hidroxi tolueno, BHT), ambos em concentrações entre 25-500 µg/mL, a 0,9 mL de solução metanólica de DPPH (40 mg/mL). Após 30 minutos de reação em temperatura ambiente (22±2 °C), as absorbâncias foram lidas a 515 nm (Espectrofotômetro de UV/Visível Cary® 100, Varian). O experimento foi realizado em triplicata. A inibição percentual da atividade de eliminação de radicais livres de DPPH foi calculada usando a seguinte equação:

$$\text{Porcentagem de inibição do DPPH} = [(A_0 - A_1) / A_0 \times 100]$$

onde A₀ é a absorbância do controle da reação (3 mL de metanol e 1 mL de solução de DPPH, sem amostra do extrato) e A₁ é a absorbância na presença do extrato ou padrão. Os dados percentuais de inibição foram plotados em relação à concentração do extrato e

o valor de IC₅₀ (inibição de 50% da amostra) foi calculado por análise de regressão linear.

4.4.3 Capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC, do inglês *oxygen radical absorbance capacity*)

A capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ROO•) foi medida monitorando o efeito do extrato no decaimento da fluorescência da fluoresceína resultante de sua oxidação induzida por ROO•, a fim de determinar atividade antioxidante hidrossolúvel. Os resultados mostraram a capacidade do extrato em absorver radicais de Oxigênio (OU- HAMPSCH-WOODILL & PRIOR, 2001). Os ROO• foram gerados por termodecomposição do AAPH [2,2'-Azobis (2-amidinopropano) dicloridrato]. O Trolox foi utilizado como padrão. Os resultados foram expressos em valores de ORAC (R² = 0,9935), calculados de acordo com Gomes et al. (2007). Resumidamente, a proteção fornecida pelo extrato ou padrão antioxidante foi calculada usando a diferença entre a área sob a curva de decaimento de fluorescência na presença (AUC antioxidante) e ausência (AUC *blank*) da amostra. As equações de regressão entre AUC e a concentração da amostra foram calculadas para o extrato e o padrão Trolox. Os valores de ORAC foram calculados usando a curva padrão de cada ensaio. Os resultados finais foram expressos em mmol de equivalente Trolox/mg de extrato (CHISTÉ et al., 2011).

4.4.4 Capacidade sequestradora do radical ABTS

Este ensaio, conforme descrito por Re et al. (1999), teve por finalidade também quantificar a capacidade do extrato sequestrar radicais livres, no caso, o sequestro do radical ABTS [2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium sal]. A técnica, que mede a presença de moléculas com ação antioxidante hidrossolúvel, se baseou na redução dos radicais ABTS^{•+} por antioxidantes presentes no extrato e no padrão antioxidante Trolox. O percentual de sequestro do radical ABTS foi transformado em equivalentes de Trolox (TE, do inglês *trolox equivalents*) usando uma curva de calibração (R² = 0,9982) com soluções padrões de Trolox, de concentrações 12,5–200 µg/ml (MOCAN et al., 2014).

4.5 Determinação por HPLC da presença de vitexina no extrato

Com o objetivo de mostrar que o extrato aquoso do presente estudo foi similar àquele usado por Courtes et al. (2015), determinou-se a presença de vitexina no mesmo. A escolha dessa flavona também decorreu de ser a mesma um marcador taxonômico do gênero *Luehea* (CALIXTO-JÚNIOR et al., 2016).

A determinação da presença de vitexina foi feita por HPLC, utilizando o sistema Shimadzu® LC-20AT (Shimadzu, Tóquio, Japão), o qual consistiu em uma bomba quaternária, um detector de matriz de fotodíodo Shimadzu SPD-M20A e um autoamostrador SIL-20AHT, com Software LC Solution para registro de cromatograma. As injeções do extrato (20 µL) foram realizadas em uma coluna Phenomenex® C18 (250 × 4,6 mm) (Torrance, Califórnia, EUA) com partículas superficialmente porosas (core-shell) de 5,0 µm, à temperatura 35 °C e com detecção a 270 nm. O método foi escolhido adaptando a metodologia desenvolvida anteriormente por Bolda-Mariano et al. (2019). A vitexina foi avaliada na concentração de 0,5 mg/mL em metanol. A fração de acetato de etila foi dissolvida (1:1 v/v) em metanol: água, pH 3,5 com ácido fórmico, e diluída para 2,0 mg/mL. Todas as soluções foram filtradas mediante emprego de uma membrana de 0,45 µm. A fase móvel foi o metanol e a água acidificada com ácido fórmico, sendo a taxa de fluxo 0,9 mL/min, de acordo com o seguinte gradiente (A:B v/v): 5:95 (0-3 min); 50:50 (3-6 min mantido até 8 min); 90:10 (8-15 minutos, mantido até 20 minutos); e 10:90 (20-22 min, mantido até 27 min).

4.6 Análise da composição de macronutrientes do extrato de *Luehea divaricata*

Apesar de a composição de macronutrientes do extrato não interferir no manejo de dor neuropática, a determinação de alguns desses componentes foi realizada com o intuito de ampliar o conhecimento da composição do extrato. A seguir, a descrição dos macronutrientes avaliados no estudo, sendo os resultados de todas as avaliações expressos em mg/mL:

4.6.1 Açúcares totais

O teor de açúcares totais foi determinado por espectrofotometria pelo método da antrona, conforme técnica descrita por Sala Júnior et al. (2008). Resumidamente, inicialmente se preparou uma solução de sacarose. A solução foi preparada diluindo 500 mg de sacarose em 200 mL de água deionizada (2.500 µg/mL). A partir desta solução

foram preparados padrões com concentrações variando de 10-100 mg/mL. A seguir, a 100 µL das soluções padrões e da amostra se adicionou 0,3 mL do reagente de antrona. A mistura resultante foi mantida em banho-maria à 40 °C por 15 minutos. As leituras foram feitas em espectrofotômetro (SP-22 BIOSPECTRO) no comprimento de onda 620 nm.

4.6.2 Sacarose

A concentração de sacarose no extrato foi determinada pelo método da antrona após remoção de monossacarídeos por tratamento da mistura de reação com solução de KOH 30% aquecida. Resumidamente, em 100 µL de amostra do extrato foi adicionado 0,1 mL de solução aquosa de KOH 30%. A mistura resultante foi mantida a 100 °C por 15 minutos. Após, a amostra foi resfriada à temperatura ambiente e, em seguida, se adicionou 0,3 mL do reativo de antrona. Após incubação em banho-maria a 40 °C, por 15 minutos, a absorvância foi determinada no comprimento de onda 620 nm (SALA JÚNIOR et al., 2008; KEARNS & INOWYE, 1993).

4.6.3 Glicose

A determinação da concentração de glicose presente no extrato foi feita mediante emprego de kit enzimático (Labest), e se seguiu rigidamente as recomendações do fabricante.

4.6.4 Frutose

A partir dos valores calculados das concentrações de sacarose, glicose e açúcares totais (AT), obteve-se a quantidade de frutose mediante cálculo usando a fórmula a seguir:

$$AT = (SAC + GLI) - FRU$$

onde AT representa açúcares totais; GLI, glicose; SAC, sacarose; e FRU, frutose.

4.6.5 Triacilglicerídeos

A determinação da concentração de triacilglicerídeos presente no extrato foi feita mediante emprego de kit enzimático (Labest), e se seguiu rigidamente as recomendações do fabricante.

4.6.6 Proteínas

A concentração de proteínas totais do extrato foi determinada pelo uso do método colorimétrico descrito por Bradford et al. (1976), em comprimento de onda de 625 nm. O conteúdo de proteínas do extrato foi calculado com base nas absorvâncias deste e de um fator de calibração obtido de uma curva-padrão de albumina.

4.7 Determinação da inibição de dano oxidativo ao DNA *supercoiled* pelo extrato

A capacidade do extrato em inibir danos oxidativos ao DNA foi avaliada mediante observação do desaparecimento da forma nativa superenovelada do DNA plasmidial pcDNA (do inglês *supercoiled*, DNA_{sc}) originando a forma linear, conforme técnica descrita por Shahidi et al. (2007). Inicialmente, o extrato seco foi reidratado nas concentrações de 500 ppm, 50 ppm e 5 ppm. Em seguida, a mistura de reação foi preparada como segue: 4 µL de solução de DNA_{sc} (125 ng/µL, preparado em tampão fosfato 1 M), 2 µL de solução de extrato (nas concentrações finais de 100 ppm, 10 ppm ou 1 ppm) ou água, e 4 µL de solução de AAPH 30 mM ou água (controle sem AAPH). Após incubação por 1 h em ambiente escuro, 2 µL de tampão de carga (6x) foi adicionado ao meio de incubação e a mistura resultante foi carregada em gel de agarose 0,8% (w/v) preparado em tampão de eletroforese (pH 8,3). A eletroforese em gel de agarose foi realizada usando tampão de eletroforese TAE a 80V por 90 min. O gel foi corado com SYBR safe (Thermo Fisher Scientific, USA) a 1:20000. As bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta e as imagens analisadas usando o software ImageJ software (NIH, Bethesda, USA). Os efeitos protetores do extrato foram expressos como bandas relativas de DNA_{sc}.

4.8 Efeito da administração oral do extrato aquoso de *Luehea divaricata* sobre parâmetros antinociceptivos em ratos controle, *sham* e CCI.

4.8.1 Animais: procedência e manutenção

Após aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFRGS (# 31394, Anexo II), foram solicitados ao Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) ratos da linhagem Wistar, machos, com peso corporal 200-300 g. Os animais foram mantidos no ratário do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, acomodados em caixas criadouros forradas com

maravilha (40x30x16cm), com livre acesso à água e alimentação, sob ciclo claro/escuro de 12 horas (das 07h00min às 19h00min) e temperatura ambiente 22 ± 2 °C. A limpeza das caixas foi realizada, no máximo, a cada dois dias. A transferência destes animais para o Laboratório de Neurobiologia Comparada ocorreu nos dias dos testes comportamentais, da cirurgia e/ou morte. A utilização dos animais teve início após 72 horas de aclimatação no ratário.

4.8.2 Delineamento experimental

Os animais foram divididos nos grupos experimentais que seguem:

- Grupo controle (Naive): ratos que não sofreram intervenção cirúrgica;
- Grupo *sham*: ratos que foram submetidos à incisão cutânea e subcutânea longitudinal na pata posterior direita para isolamento e manipulação do nervo isquiático, sem receber qualquer constrição nesse nervo;
- Grupo CCI: ratos que foram submetidos à incisão cutânea e subcutânea longitudinal na pata posterior direita para isolamento do nervo isquiático, e recebeu nesse nervo 4 amarraduras em seu tronco comum.

Os animais destes grupos experimentais receberam um dos tratamentos a seguir:

- Solução veículo: água para injeção administrada por 10 ou 35 dias;
- Extrato aquoso (EA), nas doses de 100, 300, 500 e 1000 mg/kg de peso corporal, administradas por 10 ou 35 dias.
- Gabapentina, na dose de 50 mg/kg de peso corporal, administrada por 10 dias;
- Gabapentina (30 mg/kg de peso corporal) + EA (500mg/kg de peso corporal), administradas por 10 dias.

As soluções foram administradas por *gavage*. A administração foi realizada diariamente, com início no dia da intervenção cirúrgica (dia 0), após a realização desta e passados os efeitos da anestesia, e nos dias seguintes sempre em mesmo horário, ao final da tarde. Nos animais do grupo controle, as administrações seguiram o mesmo protocolo usado nos animais com intervenção cirúrgica.

Para a administração, o extrato em pó e a gabapentina foram dissolvidos em água de injeção, em concentração que permitia que o volume administrado diariamente a cada animal não fosse maior que 0,5 mL. A preparação da solução ocorreu minutos antes da administração.

Ao final dos 10 ou 35 dias de tratamento, os ratos foram eutanasiados por decapitação para a obtenção de um segmento do nervo isquiático direito, do segmento

lombossacral da medula espinal, de amostra do fígado e de plasma. Os grupos experimentais que receberam extrato aquoso na dose de 500 mg/kg, gabapentina e gabapentina+EA foram compostos por seis (06) animais em cada um deles, enquanto os demais tinham quatro (04) ratos em cada grupo. Assim, foram usados 72 ratos no estudo.

A seguir, a descrição dos experimentos na sequência em que foram realizados:

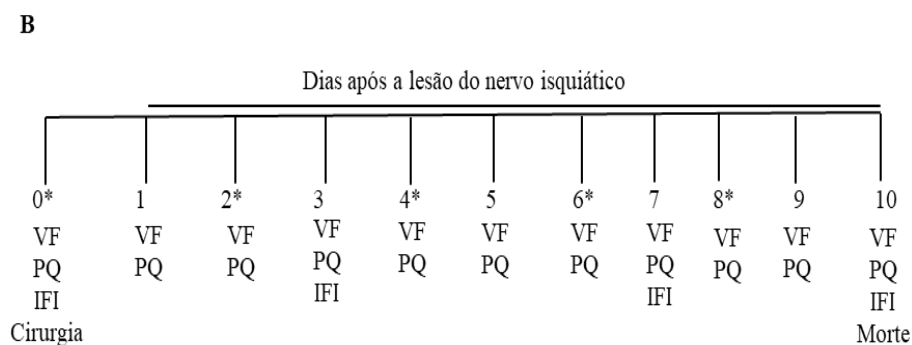
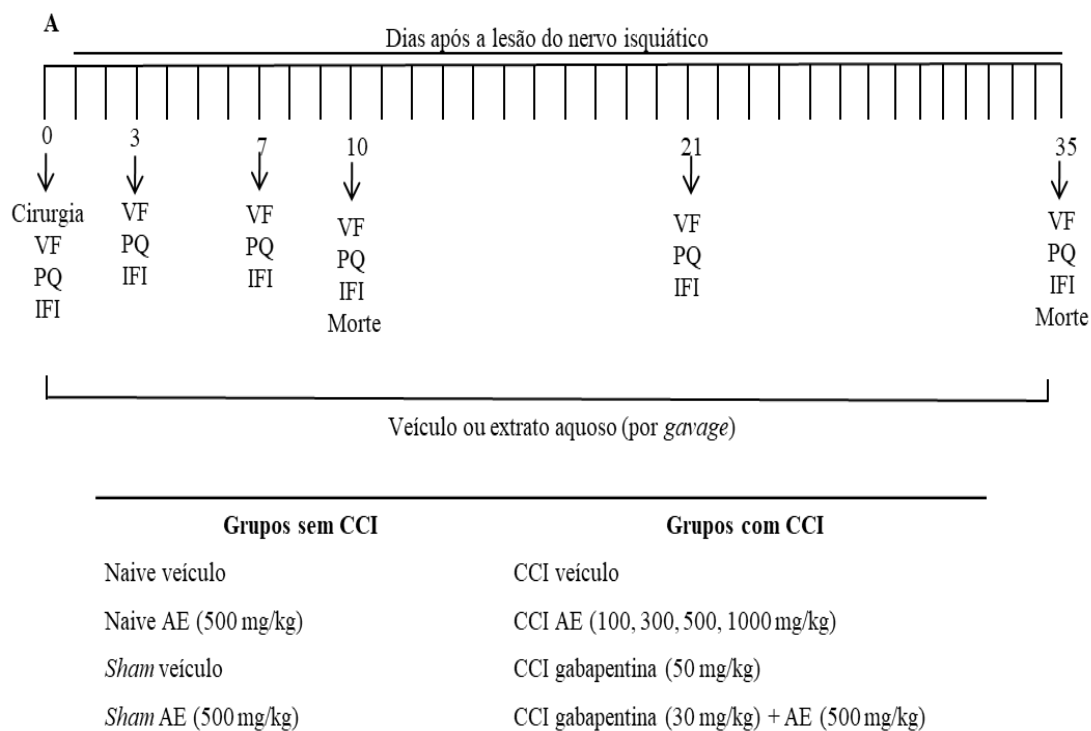
No **experimento 1**, os ratos foram divididos em 9 subgrupos, que foram: Naive tratado com veículo ou EA (500 mg/kg, n=6/grupo experimental), *sham* tratado com veículo ou EA (500 mg/kg, n=6/grupo experimental), CCI tratado com veículo (n=6) ou EA nas doses 100 mg/kg (n=4), 300 mg/kg (n=4), 500 mg/kg (n=6), e 1000 mg/kg (n=4). Os ratos dos diferentes grupos experimentais foram mortos no dia 10. Os ratos foram pesados regularmente para acompanhamento do peso corporal. Também foram submetidos a testes para avaliação da resposta nociceptiva (von Frey eletrônico e placa quente) e padrão de caminhada (IFI). Os testes foram realizados no dia 0 (pré-lesão) e aos 3, 7, e 10 dias após a cirurgia (Figura 7A). Aos 10 dias, foram mortos para obtenção dos tecidos anteriormente discriminados. As amostras de medula espinal foram utilizadas para determinar os seguintes parâmetros pró-oxidante e antioxidante: SAG, quantificação de peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos, conteúdo de tióis totais e TAC. O segmento do nervo isquiático foi usado para determinar os valores de hidroperóxidos lipídicos e da TAC. As amostras de fígado foram utilizadas para avaliar as atividades das enzimas antioxidantes SOD, GST e CAT, e valores de hidroperóxidos lipídicos. O plasma foi usado para se determinar as atividades das enzimas AST e ALT, bilirrubina direta e creatinina, como indicadores de funções hepática e renal.

No **experimento 2** foram usados apenas ratos CCI. Esse experimento foi realizado com o intuito de avaliar o efeito do tratamento com EA (500 mg/kg, n=6) e veículo (n=6) por 35 dias. Os ratos foram submetidos aos mesmos testes funcionais descritos no experimento 1, sendo os testes realizados nos dias 0 (pré-cirurgia) e aos 3, 7, 21 e 35 dias após a cirurgia. Ao final dos 35 dias, os ratos foram mortos por decapitação para a coleta dos tecidos anteriormente discriminados, os quais foram usados para as mesmas determinações relatadas no experimento 1 (Figura 7A).

No **experimento 3** também foram usados apenas ratos CCI. O objetivo desse experimento foi avaliar se o efeito antinociceptivo do EA era similar ao da gabapentina, um fármaco considerado como tratamento de primeira linha para a dor neuropática (FOTIO et al., 2019). Assim, ratos CCI receberam administrações por *gavage* de EA

(500 mg/kg, n=6) e gabapentina (50 mg/kg, n=6), as quais foram realizadas durante 10 dias após a CCI. A dose de gabapentina (50 mg/kg) foi escolhida com base em estudo anterior (NEWTON et al., 2017). Os ratos foram submetidos aos mesmos testes funcionais descritos no experimento 1, os quais foram realizados nos dias 0 (pré-cirurgia) e aos 3, 7 e 10 dias após a CCI. Ao término dos 10 dias, os ratos foram mortos por decapitação para a coleta dos tecidos anteriormente discriminados, os quais foram usados para as mesmas determinações relatadas no experimento 1 (Figura 7A).

No **experimento 4**, onde também foram usados apenas ratos CCI, foi avaliada se a coadministração de EA (500 mg/kg, n=6) e gabapentina em dose menor (30 mg/kg, n=6) poderia provocar efeito antinociceptivo similar àquele da gabapentina em dose maior. A redução da dose de gabapentina é interessante por este fármaco provocar diversos efeitos colaterais quando administrado por um tempo maior (RUEL & STEAGALL, 2019). A escolha da dose de gabapentina se baseou em estudo que mostrou seu efeito antinociceptivo acompanhado de pouco ou nenhum efeito ansiolítico (CHANG-QI et al., 2010). Durante o período de tratamento, os ratos receberam inicialmente gabapentina e, após cerca de 10 minutos, o EA. A administração das soluções teve início no dia da cirurgia, após recuperação da anestesia, tal como feito em todos os outros experimentos. Porém, a partir do segundo dia, a administração foi realizada em dias alternados, e os limiares mecânico e térmico, medidos pelos testes de von Frey eletrônico e placa quente, respectivamente, foram feitos todos os dias. (Figura 7B). Os ratos foram submetidos ao teste de marcação das patas nos dias 0 (pré-cirurgia) e aos 3, 7 e 10 dias após a cirurgia. Ao término dos 10 dias, os ratos foram mortos por decapitação para a coleta dos tecidos anteriormente discriminados, os quais foram usados para as mesmas determinações relatadas no experimento 1.



*Gabapentina 30 mg/kg + extrato 500 mg/kg, por *gavage*.

Figura 7: Esquema temporal mostrando os dias das avaliações das sensibilidades mecânica e térmica, mediante emprego dos testes de von Frey eletrônico (VF) e placa quente (PQ), respectivamente. O esquema mostra ainda os dias dos testes para determinação do índice funcional do nervo isquiático (IFI), da cirurgia e da morte para a coleta dos tecidos dos ratos. Naive, ratos sem manipulação cirúrgica; *Sham*, ratos com manipulação do nervo isquiático; CCI, ratos que receberam quatro amarraduras no nervo isquiático; CCI, lesão por constrição crônica no nervo isquiático (Elaborado pela autora).

4.8.3 Constrição no nervo isquiático (CCI)

O procedimento de constrição no nervo isquiático foi realizado segundo a técnica descrita por Bennett & Xie (1987) com algumas modificações (RIFFEL et al., 2018; SCHEID et al., 2018; HORST et al., 2014). Resumidamente, os ratos foram inicialmente anestesiados com solução de quetamina (90 mg/kg de peso corporal) e xilazina (10 mg/kg de peso corporal). Após anestesia, os ratos foram posicionados em decúbito dorsal para a realização da tricotomia na coxa direita (Figura 8A). A intervenção foi iniciada pela assepsia da pele com álcool 70%, seguida de incisão cutânea e subcutânea longitudinal no membro posterior direito, no terço médio da coxa, para expor o músculo bíceps femoral, o qual foi afastado para permitir a visualização e abordagem do nervo isquiático direito (Figura 8B, C). Nos ratos do grupo sham, o nervo isquiático foi apenas visualizado e manipulado (Figura 8D). Nos ratos CCI, o nervo isquiático recebeu quatro (04) amarraduras leves em seu tronco comum, respeitando a distância de um milímetro entre um nó e outro (Figura 8E, F). Assim, cerca de sete (07) milímetros do nervo recebeu amarraduras. O fio utilizado para a amarração do nervo foi o *catgut* cromado 4.0 tipo c bioabsorvível (Shalon®). As amarraduras foram feitas sempre pelo mesmo pesquisador para evitar variação na força da amarradura.

Após a manipulação ou constrição no nervo isquiático, o local da incisão foi suturado com fio de nylon não absorvível 4.0 (Somerville®) e o antimicrobiano rifamicina (Rifocina Spray® 10 mg/mL, 1 jato) foi aplicado sobre a pele suturada (Figura 8G, H). Os animais do grupo controle não sofreram intervenção cirúrgica.

Ressalta-se que todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados pelo mesmo pesquisador, para garantir o mesmo grau de constrição nos animais CCI e a padronização da manipulação nos ratos do grupo sham. Após a cirurgia, os animais foram acomodados nas caixas com maravalha e mantidos em observação no Laboratório de Neurobiologia até a recuperação anestésica. Antes do encaminhamento dos ratos ao biotério, aqueles que foram submetidos à manipulação cirúrgica receberam 100 mg/kg de peso corporal de aspirina, administrada por *gavage*. Uma vez no biotério do ICBS, e totalmente recuperados da anestesia, procedeu-se à primeira administração do EA, veículo, gabapentina e gabapentina+EA, conforme o grupo experimental ao qual pertencia o rato.

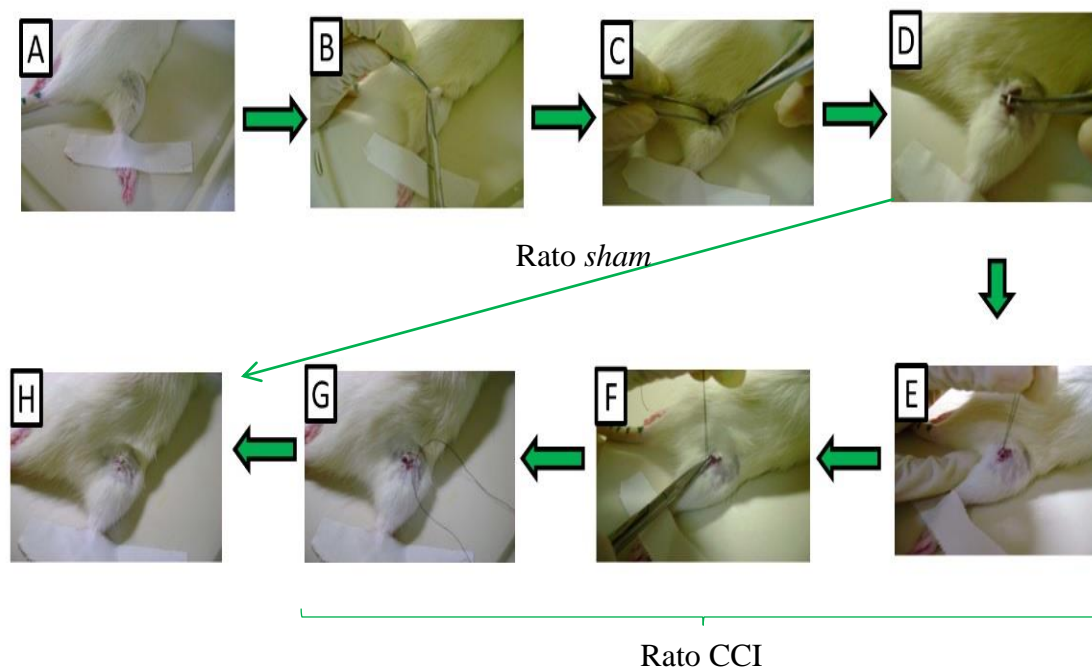


Figura 8: As fotografias mostram a sequência dos procedimentos para a realização da constrição crônica no nervo isquiático de ratos. (A) Pata posterior direita de um rato em posição de decúbito dorsal mostrando a tricotomia na região média da coxa. (B) Início da incisão do tecido cutâneo na região média da coxa direita de um rato. (C) Processo de afastamento dos músculos bíceps femural e semitendinoso na região média da coxa direita de um rato. (D) Exposição do tronco comum do nervo isquiático na região média da coxa direita de um rato. (E) Realização do primeiro nó no tronco comum do nervo isquiático direito. (F) Realização do quarto nó no tronco comum do nervo isquiático direito. (G) Início da sutura do tecido cutâneo na região média da coxa direita de um rato. (H) Pata direita de um rato mostrando a sutura na região média da coxa (Elaborado pela autora).

4.9 Parâmetros nociceptivos

4.9.1 Determinação do limiar mecânico

Para a determinação do limiar mecânico nos ratos CCI, *sham* e Naive, os mesmos foram submetidos ao teste de von Frey eletrônico empregando-se analgesímetro digital (Insight, Brasil). Vinte e quatro horas antes do teste, os animais foram ambientados às caixas de acrílico próprias para o teste, por um período de 5 minutos. Nos dias do teste, os ratos foram colocados individualmente nestas mesmas caixas de acrílico, cujo assoalho era composto por uma malha metálica de 5 mm², o que permitia ao experimentador visualizar e acessar as patas dos ratos. O teste consistiu na aplicação de pressões de intensidades crescentes na superfície plantar da pata posterior direita do animal (ipsilateral à lesão, no caso dos ratos *sham* e CCI), até que se observasse um movimento de retirada do membro (Figura 9). A pressão aplicada foi

instantaneamente convertida em força pelo transdutor do aparelho, e registrada pelo equipamento em gramas. A resposta foi desconsiderada se seguida de caminhada. Neste caso, o teste foi refeito.

Em cada dia de teste, cada rato recebia cinco aplicações de pressão na superfície plantar da pata direita, com intervalo de 10-15 segundos entre cada aplicação. A média das cinco leituras de força representou o limiar mecânico para aquele animal, naquele período. Os testes foram realizados no dia 0 (pré-cirurgia) e aos 3, 7 e 10 dias, no grupo que recebeu tratamento por 10 dias, e aos 3, 7, 10, 21 e 35 dias, no grupo que recebeu tratamento por 35 dias. O teste foi realizado pela manhã, entre sete e oito horas da manhã, em ambiente silencioso, e pelo mesmo experimentador.

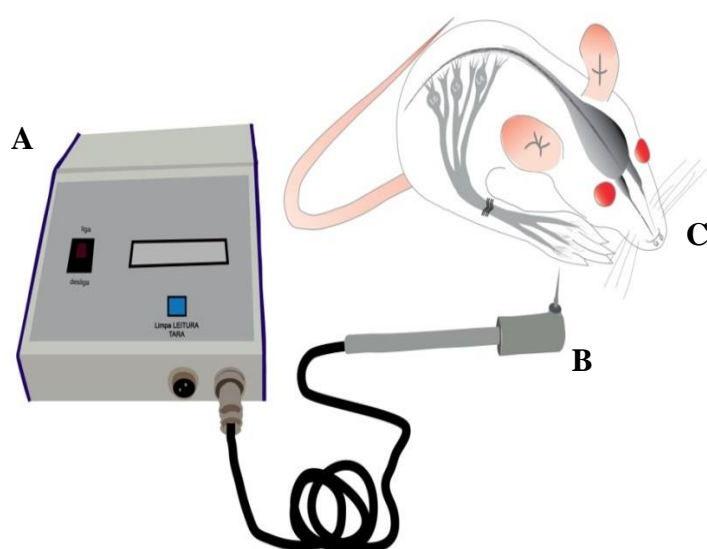


Figura 9: Esquema mostrando o teste de von Frey eletrônico, onde se nota o aparelho de von Frey (A), a ponteira (B) usada para aplicar força à região plantar da pata direita de um rato com CCI (C). Para detalhes da CCI, consultar a Figura 1 (Elaborado pela autora).

4.9.2 Determinação do limiar térmico

Para a determinação do limiar térmico nos ratos CCI, *sham* e Naive, os mesmos foram submetidos ao teste da placa quente. Vinte e quatro horas antes do teste, os animais foram ambientados à placa em temperatura ambiente, por um período de 5 minutos. Nos dias do teste, a placa foi aquecida e mantida a temperatura de 50 °C. Então, cada animal foi colocado sobre esta placa (Figura 10) e o tempo para o reflexo de retirada de uma das patas da placa quente foi determinado e anotado. O rato foi retirado imediatamente do contato com a placa quente logo que manifestava a ação de erguer uma das patas, para não lesionar os tecidos com a alta temperatura. Ainda, logo que se retirava o rato da placa aquecida se observava as patas para ter certeza de que nenhuma

lesão tinha corrido às mesmas. Os testes foram realizados no dia 0 (pré-cirurgia) e aos 3, 7 e 10 dias, no grupo que recebeu tratamento por 10 dias, e aos 3, 7, 10, 21 e 35 dias, no grupo que recebeu tratamento por 35 dias. O teste foi realizado pela manhã, entre oito e nove horas da manhã, em ambiente silencioso, e pelo mesmo experimentador.

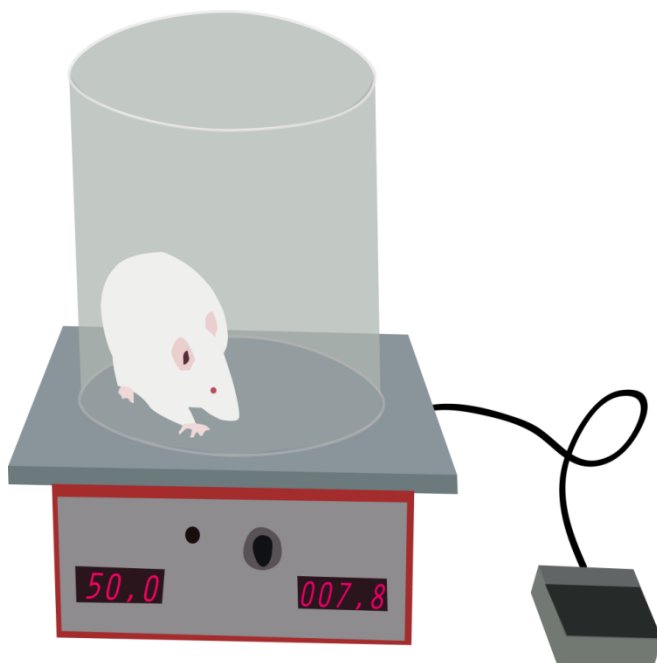


Figura 10: Esquema mostrando o aparelho usado no teste da placa quente. Note o rato sobre a placa quente, dentro do cilindro de contenção do animal. No esquema se pode ainda visualizar os marcadores de temperatura (50,0) e tempo (007,8), e o pedal de controle do aparelho (Elaborado pela autora).

4.10 Determinação do índice funcional do isquiático

A avaliação funcional do nervo isquiático foi realizada pelo teste da marcação das patas (do inglês, *walking track analysis*), descrito por De Medinacelli (1982). Este teste constitui um método de análise funcional de nervo, o qual avalia alterações na marcha decorrentes de lesão nervosa por meio da impressão de pegadas. Este teste é normalmente empregado para avaliar as consequências funcionais de lesão direta no nervo isquiático.

O aparato usado no teste da marcação das patas consistia em um campo aberto iluminado por uma luz (60 W). Esse campo era uma pista de caminhada (8,5 cm de largura, 100 cm de comprimento, e bordas com altura de 18,5 cm) que finalizava na entrada de uma caixa escura de madeira (18x16x18 cm). O assoalho do corredor foi forrado com uma tira de papel branco da mesma medida da pista (Figura 11). No teste, o rato tinha a superfície plantar de suas patas traseiras coloridas em preto devido ao pressionamento das patas em uma almofada de carimbo com tinta preta. O rato com a

superfície plantar das patas pintadas foi solto na pista de caminhada e, uma vez livre, se deslocava para a caixa escura localizada na outra extremidade. Durante seu trajeto, as impressões das pegadas ficavam registradas no papel branco que cobria o assoalho da pista de caminhada. Ao chegar à caixa escura, o rato foi retirado do aparato, a tira de papel branco com as pegadas impressas retirada, e o aparato higienizado e preparado para uso com o próximo rato.



Figura 11: Fotografia do aparato usado no teste de marcação das patas. Note o rato no campo iluminado, cujo assoalho se encontra coberto por tira de papel branco com as mesmas dimensões da pista de caminhada. No final da pista se observa a entrada para a caixa escura.

Em cada teste, o rato deixava impressas várias pegadas. Porém, foram selecionadas para análise as pegadas com qualidade e clareza de impressão, sendo aferidas as medidas das patas operada (direita) e contralateral (esquerda). Foram realizadas as seguintes medidas: da extensão da pegada (PL: distância da extremidade do 3º dedo até o calcâneo), da largura da pegada (TS: distância entre o 1º e 5º dedo), e da distância entre os dedos intermediários (IT: 2º e 4º dedo) das patas traseiras (Figura 12). Os valores obtidos foram usados para determinar o IFI, conforme fórmula a seguir, onde são consideradas as medidas realizadas nas patas direita (R, do inglês *right*) e esquerda (L, do inglês *left*) no cálculo:

$$\text{IFI} = -38.3(\text{LPL} - \text{RPL})/\text{RPL} + 109.5(\text{LTS} - \text{RTS})/\text{RTS} + 13.3(\text{LITS} - \text{RITS})/\text{RITS} - 8.8$$

Os valores obtidos por esta fórmula foram considerados como um índice da condição funcional do nervo isquiático, expresso em déficit funcional. Variações de

0±11 estão nos desvios de normalidade da pegada, enquanto -100 indicou perda total da função. Os valores intermediários corresponderam a déficits parciais de função.

Na análise da pegada foi calculado o valor médio de cada variável para cada rato, individualmente e, então, o valor encontrado foi usado para calcular a média do grupo. Todas as medidas funcionais foram realizadas manualmente por dois pesquisadores, um dos quais era cego aos grupos experimentais.

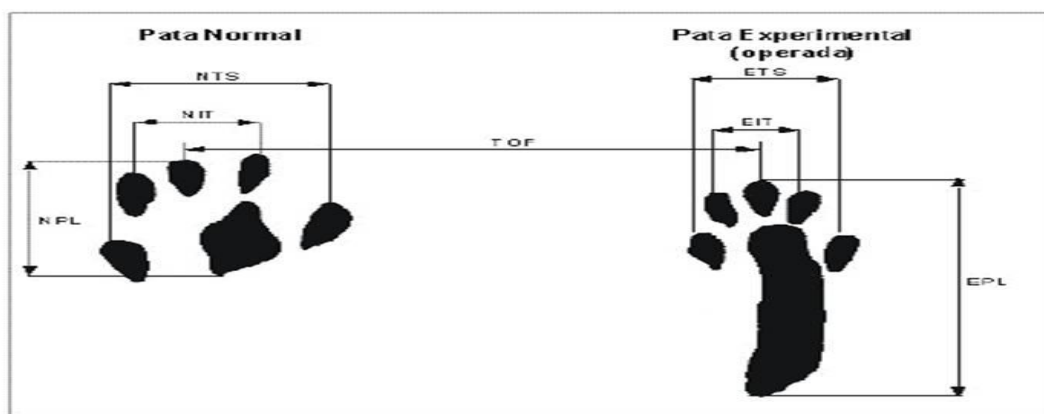


Figura 12: Representação esquemática dos parâmetros medidos para calcular o Índice Funcional do Isquiático (IFI). N: normal; E: experimental (operada); TS: abertura total dos dedos (1° a 5°); IT: abertura dos dedos intermediários (2° ao 4°); PL: comprimento da pegada (Adaptado de Monte-raso et al., 2006).

4.11 Determinação do efeito da administração do extrato aquoso de folhas de *Luehea divaricata* sobre parâmetros de estresse oxidativo em nervo isquiático, medula espinal e fígado de ratos Naive, *sham* e CCI

4.11.1 Preparação das amostras

Após o período experimental, os ratos foram mortos por decapitação, a qual teve início às 8h. Os ratos não foram deixados em jejum antes da morte. Imediatamente após a decapitação foi coletado sangue (2 mL) em tubos *ependorfs* individuais contendo anticoagulante heparina. O sangue foi imediatamente centrifugado, por 20 minutos, a 1000 g, em centrífuga refrigerada (Sorvall RC5B- Rotor SM 24). Após esse procedimento, o plasma foi coletado, aliquoteado e armazenado à temperatura de -80 °C.

De cada rato foi ainda coletado os tecidos que seguem: um segmento ($\pm 1,5$ cm) do nervo isquiático lesionado (nervo direito), localizado acima do sítio de lesão; o segmento lombossacral da medula espinal; e uma amostra de fígado. Todos os tecidos

foram imediatamente pesados. A medula espinal foi dividida em três partes. Uma das partes foi utilizada para a determinação da SAG. A segunda parte foi usada para determinar os valores de H₂O₂. Essas duas partes foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas intactas à temperatura de -80 °C. A terceira parte da medula espinal e o segmento do nervo isquiático lesionado foram homogeneizados e usados para a determinar a TAC e hidroperóxidos lipídicos. O homogeneizado da medula espinal foi também usado para determinar os valores de tióis totais. A mesma parte da medula espinal recebeu sempre o mesmo tratamento.

O fígado foi homogeneizado e usado para avaliar as atividades das enzimas antioxidantes SOD, GST e CAT, e valores de hidroperóxidos lipídicos. A amostra de fígado foi coletada sempre da mesma região.

A homogeneização dos tecidos foi realizada em solução contendo cloreto de potássio (KCl) 1,15% e fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF) 100 mM, seguida de centrifugação a 1000 g, por 20 minutos, à temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C (BUEGE; AUST, 1987).

4.11.2 Parâmetros pró-oxidantes e antioxidantes

4.11.2.1 Formação de ânion Superóxido (O₂^{•-})

A formação de O₂^{•-} (SAG, do inglês *superoxide anion generation*) foi estimada pela redução de azul de nitrotetrazol (NBT), conforme técnica descrita por Wang et al. (1998) com modificações (RIFFEL et al., 2018; HORST et al., 2017). O método consistiu na reação de cortes de medula espinal com NBT, por 90 minutos, para formação de formazan, o indicador da formação do O₂^{•-}. A absorvância do formazan foi determinada espectrofotometricamente a 540 nm (Espectrofotômetro T60, PG Instruments). A quantidade de formazan reduzido pelo O₂^{•-} foi calculada empregando-se a fórmula a seguir:

$$\text{Redução a formazan} = A \times V / (T \times Wt \times \epsilon \times l)$$

onde A representa a absorvância do formazan, V o volume de solução, T o período de incubação das amostras com NBT, Wt o peso do tecido, ϵ o coeficiente de extinção molar (0,72 L.mmol⁻¹.mm⁻¹), e l representa o caminho óptico. Os resultados foram expressos em picomol por minuto por miligrama de peso do tecido.

4.11.2.2 Peróxido de Hidrogênio

O ensaio para mensurar a concentração de peróxido de hidrogênio nos tecidos baseou-se na oxidação do vermelho de fenol por este peróxido, mediado pela peroxidase do rabanete, e foi conduzido conforme técnica descrita por Pick & Keisari (1980), com pequenas modificações (SCHEID et al., 2018; RIFFEL et al., 2018). Para tanto, fatias finas do tecido nervoso foram incubadas em tampão dextrose-fosfato (5 mM; 10 mM, pH = 7,0) por 30 minutos, sob agitação. Após este período, o meio de incubação foi coletado e adicionado à solução contendo vermelho de fenol (0,28 mM) e peroxidase de rabanete (8,5 U/mL). Após 5 minutos de espera, adicionou-se a essa mistura hidróxido de sódio (1,0 M) e realizou-se a leitura da absorbância, em comprimento de onda 610 nm (Espectrofotômetro T60, PG Instruments). Os resultados foram expressos em micromols de peróxido por grama de tecido.

4.11.2.3 Hidroperóxidos lipídicos

O método do xilenol laranja (XO), descrito por JIANG et al. (1991) e adaptado por Sodergren et al. (1998), se baseia na oxidação do Fe^{+2} a Fe^{+3} na presença de lipoperóxidos em pH ácido, formando complexos de Fe^{+3} xilenol laranja. Em solução ácida, o corante mostra pico a 560 nm e a absorbância cresce linearmente com o aumento da concentração do corante.

Para a determinação, as amostras de tecidos foram diluídas, em proporção de 1:10, e separadas em 2 grupos: no primeiro foi acrescentado metanol absoluto (MEOH), e no segundo, trifenilfosfina (TPP) 10 mmol/L. Ambos os grupos foram incubados por 30 minutos, à temperatura ambiente. Após a incubação, foi pipetado, em microplaca, 10 μ l de amostra em quadruplicata (uma duplicata com o metanol, e outra duplicata com o TPP), adicionando-se em seguida 90 μ L do reagente de trabalho (RT-XO). O RX-XO consistiu em uma mistura de 81% de MEOH 90%, XO 2 mmol/L para concentração final de 100 μ M, H_2SO_4 1 mmol/L para concentração final de 25 mmol/L, BHT 40 mmol/L para concentração final de 4 mmol/L e sulfato ferroso amoniacal 10 mmol/L para concentração final de 250 μ mol/L.

A placa foi agitada por 30 minutos, em temperatura ambiente e, em seguida, se realizou a leitura a 570 nm em leitora de placas (Zenyth 200, Biochrom Inc, UK). Para os cálculos, foram descontados os valores de absorbância com TPP dos valores obtidos das duplicatas com MEOH. O resultado foi expresso em μ mol por grama de tecido.

4.11.2.4 Capacidade antioxidante total (TAC)

O método da TAC, adaptado de Erel (2004), consistiu no branqueamento da cor característica do reagente 2,2'-azinobis(3-etilbenzo-tiazolina-6-sulfonato) (ABTS⁺) pelos antioxidantes presentes na amostra. Esta reação foi monitorada espectrofotometricamente a 660 nm e a taxa de branqueamento foi inversamente relacionada à TAC da amostra. A velocidade da reação foi calibrada com Trolox, que é largamente utilizado como um padrão para os ensaios de medição tradicional de capacidade antioxidante. Os resultados foram expressos em equivalentes de micromol de Trolox por litro ($\mu\text{mol Trolox Eq/L}$). O ensaio tem uma excelente precisão, superior a 97%.

4.11.2.5 Tióis Totais

A medida da concentração de tióis totais foi conduzida conforme descrito por Aksenov & Markesbery (2001). Para tanto, 30 μL de amostra foram misturados a 1 mL de tampão PBS/EDTA (pH= 7,5) e a 30 μL de ácido 5,5'- ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB, 10 mM). Após 30 minutos de incubação, à temperatura ambiente, as absorvâncias foram lidas a 412 nm (Espectrofotômetro T60, PG Instruments). A medida de TNB formado foi calculada conforme a fórmula:

$$\text{TNB} = (A_{412} - A_{412 \text{ sem proteína}} - A_{412 \text{ sem DTNB}}) / \Delta_{412\text{TNB}}$$

onde, $\Delta_{412\text{TNB}} = 14.150 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, A_{412} é a absorvância da amostra; $A_{412 \text{ sem proteína}}$ é a absorvância do meio reacional sem amostra; $A_{412 \text{ sem DTNB}}$ é a absorvância do meio sem DTNB. Os resultados foram expressos em micromoles por miligrama de proteína.

4.11.2.6 Superóxido dismutase (SOD)

Para quantificar a atividade da enzima SOD, realizou-se a técnica descrita por Misra & Fridovich (1972), cujo método consiste em avaliar indiretamente a ação desta enzima, que ao neutralizar os radicais superóxido gerados durante a auto-oxidação da adrenalina, reduz a formação de adrenocromo, um subproduto colorido desta auto-oxidação e que pode ser medido em comprimento de onda 480 nm. Inicialmente realizou-se uma leitura temporal das absorvâncias (Espectrofotômetro T60, PG Instruments) da adrenalina (60 mM, pH = 2), em meio contendo tampão glicina (pH =

11,3). Em pH elevado, a auto-oxidação é favorecida e o equipamento registrou a formação de adrenocromo característica. Em seguida, realizou-se a leitura da absorbância das amostras, cada qual nos volumes de 15 e 30 μL em presença de 50 μL de adrenalina. Neste caso, em função da presença de SOD nas amostras, menos adrenocromo foi formado. O ensaio proporciona uma medida indireta da atividade enzimática, e por isso os resultados foram expressos em unidades de SOD por miligrama de proteína, que representa a quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a velocidade de auto-oxidação da adrenalina.

4.11.2.7 Glutathione-S-transferase (GST)

Para determinar a atividade da enzima GST, empregou-se a técnica cujo princípio se baseia na conjugação da glutathione reduzida (GSH) ao 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), pela GST presente na amostra em estudo. O composto resultante, dinitrofenilglutathione, pode então ser detectado espectrofotometricamente, a 340 nm, conforme descrito por Habig, Pabst & Jacoby (1974). No ensaio, em uma cubeta de quartzo, adicionou-se tampão fosfato 0,1 M (pH = 6,5), 30 μL de amostra e 200 μL de GSH. Zerou-se o espectrofotômetro e rapidamente adicionou-se CDNB 20 mM. A reação foi observada por um minuto, e as absorbâncias nos tempos 0 e 60 s foram anotadas, para posterior cálculo da atividade enzimática, expressa em picomoles por minuto por miligrama de tecido.

4.11.2.8 Catalase (CAT)

A atividade da enzima CAT foi quantificada conforme técnica descrita por Aebi (1984). A medida foi realizada em cubeta de quartzo empregando-se 50 μL de amostra do tecido nervoso, 1.950 μL de tampão fosfato 0,1 M (pH = 7,4) e 50 μL de peróxido de hidrogênio (0,88 M), a partir do qual observou-se o gradativo decaimento nas absorbâncias medidas nos tempos 0, 15 s, 30 s, 45 s e 60 s, representando a ação enzimática da CAT das amostras sobre o peróxido de hidrogênio em solução. As leituras foram realizadas em comprimento de onda 240 nm (Espectrofotômetro T60, PG Instruments). Os resultados foram expressos em picomoles por miligrama de proteína.

4.11.2.9 Quantificação de proteínas

A quantificação do conteúdo de proteínas dos tecidos foi realizada pelo método colorimétrico descrito por Lowry et al. (1951), em espectrofotômetro SP-22, BIOSPECTRO, em comprimento de onda 625 nm. O conteúdo de proteínas da amostra foi calculado com base nas absorvâncias desta e de um fator de calibração obtido de uma curva-padrão de albumina.

4.12 Indicadores de função hepática e renal

Para avaliar um possível efeito tóxico do tratamento com EA de folhas de *L. divaricata*, determinou-se, em plasma, as atividades das enzimas ALT (alanina aminotransferase) e AST (aspartato aminotransferase), bilirrubina direta e creatinina. Como controle, fez-se a determinação dessas atividades em plasma de ratos que receberam administração de veículo. As determinações foram realizadas usando *kits* comerciais (LABTEST), e seguiu-se rigidamente as recomendações do fabricante.

4.13 Determinação do peso corporal

Para acompanhamento das alterações no peso corporal dos ratos usados no presente estudo, fez-se a pesagem de todos os animais em diferentes momentos. O peso corporal dos ratos foi avaliado no dia 0, antes da realização da cirurgia, e nos dias 7, 10, 21 e 35 após a CCI. A última pesagem dos ratos ocorreu na manhã da realização da morte.

4.14 Análise estatística

Previamente a realização do estudo se fez o cálculo do “n” (número mínimo de animais) utilizando o software WIN PEPI, versão 9.1. Este cálculo foi baseado na análise da atividade enzimática da GST em animais tratados com vitaminas C e E, utilizando-se os dados mostrados por Kashif et al. (2004), e em resultados de parâmetros nociceptivos (LU et al., 2011). Foi estabelecido um nível de significância de 0,05, poder estatístico de 95%, assumindo uma perda de 10% para esse estudo.

Para as análises estatísticas, os dados foram analisados por dois pesquisadores independentes, um dos quais era cego aos grupos experimentais. Quando houve

inconsistência nos resultados dos dois pesquisadores, um terceiro pesquisador analisou os dados, e o resultado final foi a média dos resultados obtidos pelos três pesquisadores.

As análises estatísticas foram realizadas usando SigmaPlot versão 11.0 (Systat Software Inc., Chicago, IL) ou Prism 5.03 (GraphPad Software, San Diego, CA) para Windows. A distribuição gaussiana normal dos dados foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk, enquanto o teste de Levene foi usado para analisar a homogeneidade da variância. Os resultados da inibição de dano oxidativo ao DNA *supercoiled* foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn. Os resultados dos testes de von Frey, placa quente e IFI foram analisados por ANOVA de medidas repetidas, seguido do pós-teste de Tukey. Os demais resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de duas vias (fatores: lesão e tratamento), seguido de pós-teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando a análise estatística apresentou $P < 0,05$. Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão.

4.15 Disposição final dos resíduos da pesquisa

4.15.1 Resíduos químicos

Os resíduos químicos foram acondicionados em embalagem adequada, previamente identificada, e encaminhados ao Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos da UFRGS para procedimento correto de sua eliminação.

4.15.2 Resíduos biológicos

O lixo biológico, após acondicionamento correto e identificação, foi encaminhado ao CREAL do Instituto de Ciências Básicas da Saúde para sua devida eliminação.

5 RESULTADOS

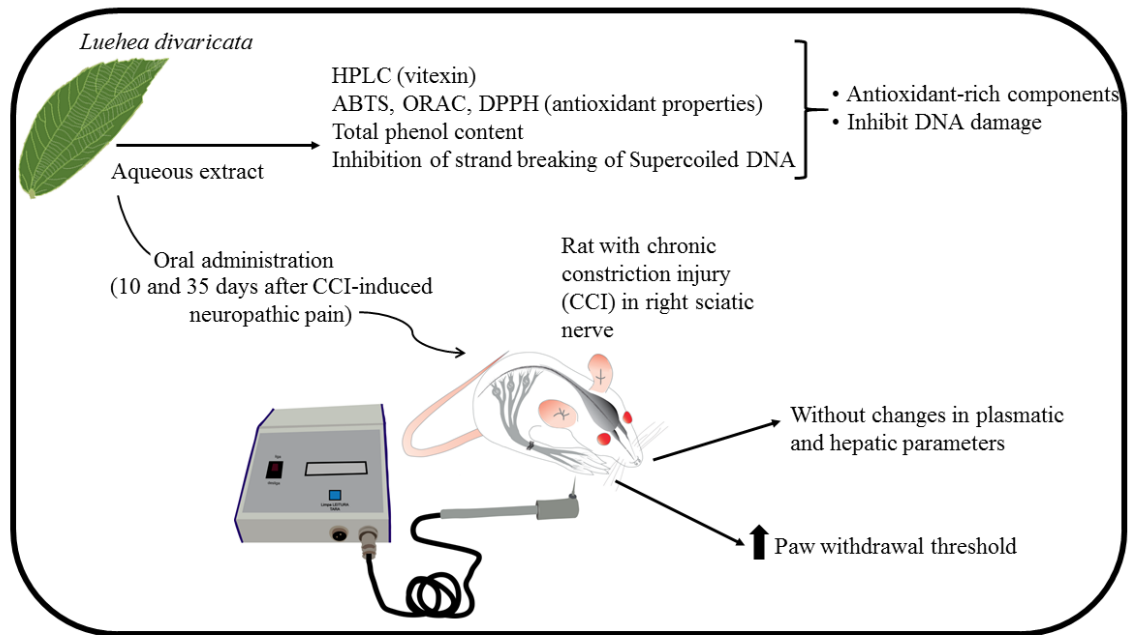
5.1 ARTIGO 1

Este artigo apresenta os resultados da avaliação da capacidade antioxidante, composição de macronutrientes, presença de vitexina e capacidade de inibição de dano oxidativo ao DNA do extrato aquoso preparado de folhas de *L. divaricata*. Também apresenta os resultados do efeito temporal da administração oral desse extrato, dado em diferentes doses por 10 e 35 dias, sobre a nocicepção em ratos sem e com dor neuropática induzida por lesão por constrição crônica no nervo isquiático. O artigo mostra ainda os resultados: 1) da comparação do efeito antinociceptivo do extrato com aquele da gabapentina, fármaco considerado como tratamento de primeira linha da dor neuropática; 2) da coadministração de extrato aquoso e gabapentina em dose menor sobre a nocicepção de ratos com lesão no nervo isquiático; e 3) o efeito da administração de extrato aquoso sobre indicadores plasmáticos de função hepática e renal, e atividade de marcadores pró-oxidante e antioxidante em fígado. Este artigo foi publicado na revista *Journal of Ethnopharmacology* em junho de 2020.

Citação do artigo: Kroth, A. *et al.* Aqueous extract from *Luehea divaricata* Mart. leaves reduces nociception in rats with neuropathic pain. *Journal of Ethnopharmacology*, 2020. v. 256: 112761.

Disponível em: <<http://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112761>>.

Graphical abstract



Aqueous extract from *Luehea divaricata* Mart. leaves reduces nociception in rats with neuropathic pain

Adarly Kroth^a, Maria do Carmo Quevedo Santos^b, Thaisla Cristiane Borella da Silva^b, Elza Maria Santos Silveira^b, Márcia Trapp^b, Rosângela Maria Nunes Bezzerra^c, Fernando Simabuco^c, Rivaldo Niero^d, Wania Aparecida Partata^{b*}

^aÁrea Ciências da Vida e Saúde. Universidade do Oeste de Santa Catarina. Rua Getúlio Vargas, 2125, Bairro Flor da Serra, CEP 89600-000, Joaçaba, SC, Brazil.

^bDepartamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500, Bairro Farroupilha, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil.

^cFaculdade de Ciências Aplicadas. Unicamp Campus 2. Rua Pedro Zaccaria, 1300, CEP 13484-350, Limeira, SP, Brazil.

^dEscola de Ciências da Saúde. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade do Vale do Itajaí, Campus Itajaí. Rua Uruguai, 458, Centro, CEP 88302-901, Itajaí, SC, Brazil.

*Corresponding author:

Departamento de Fisiologia
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Rua Sarmento Leite, Bairro Farroupilha, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil
Tel: 55 51 3308 3305
Fax: 55 51 3308 3166
E-mail: wania.partata@ufrgs.br

Abstract

Ethnopharmacological relevance: *Luehea divaricata*, popularly known in Brazil as “açoita-cavalo”, has been widely explored by different ethnic groups native to Brazil to treat different pathologic conditions, including inflammatory pain. However, no report could be found on the effect that extract of *L. divaricata* has on neuropathic pain. This is an important topic because convergent and divergent mechanisms underlie inflammatory vs. neuropathic pain indicate that there may not always be a clear mechanistic delineation between these two conditions.

Aim of the study: The study aimed to determine antioxidant activity and macronutrient composition of aqueous extract from leaves of *L. divaricata*, and the effect of oral administration on nociception in rats with chronic constriction injury (CCI) of sciatic nerve-induced neuropathic pain, one of the most commonly employed animal models of neuropathic pain.

Materials and Methods: The antioxidant activity of the extract was evaluated by total phenolic content and DPPH, ABTS^{•+} and ORAC methods. Vitexin was determined by HPLC to show that the composition of the extract of the present study is similar to that used in previous studies with this genus. Total sugar and sucrose concentrations were assessed by the anthrone method, while glucose and triacylglycerides were determined using commercially available kits. Fructose concentration was calculated from values for total sugars, glucose and sucrose. Total protein was determined by Bradford assay. The effect on DNA strand breaking was investigated by inhibition of strand breaking of supercoiled DNA by hydroxyl radical. The antinociceptive effects of aqueous extract (100, 300, 500, and 1000 mg/kg, i.g.) were evaluated on a mechanical threshold for neuropathic pain induced by chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve in rats. We also compared the antinociceptive effect of the extract (500 mg/kg, i.g.) with

that induced by gabapentin (50 mg/kg, i.g.), a first-line clinical treatment for neuropathic pain. The effect of co-administration of extract (500 mg/kg, i.g.) and low-dose gabapentin (30 mg/kg, i.g.) was also assessed. In addition, the effect of the extract on body weight, and blood and hepatic parameters were investigated to reveal possible side effects of treatment.

Results: The extract showed high content of total phenol; good reducing capacity for DPPH, ABTS^{•+} and ORAC assays; presence of vitexin; and a high capacity to inhibit strand breaking of supercoiled DNA. The predominant sugar was sucrose, followed by glucose and fructose. Total protein was greater than triacylglycerides, with the latter being present in a trace amount in the extract. The extract increased the mechanical threshold, which was reduced by CCI. The antinociceptive effect was comparable to gabapentin and was also found after co-administration of extract and low-dose gabapentin. No significant change was found in body weight and blood and hepatic indicators after extract treatment.

Conclusions: Aqueous extract from *L. divaricata* leaves was as effective as gabapentin at attenuating CCI-induced neuropathic pain, indicating for first time the therapeutic potential of this species for this type of pain.

Keywords: Mechanical allodynia, Chronic constriction injury, DNA strand breaking, Oxidative parameters

Abbreviations

AAPH [2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride]; ABTS [2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium sal]; AE (Aqueous extract); ALT (Alanine aminotransferase); ANOVA (analysis of variance); AST (Aspartate

aminotransferase); AUC (Area under the ROC curve); A_0 (Absorbance of the control reaction); A_1 (Absorbance in the presence of the extract or standard); BHT (Butylated hydroxy toluene); CAT (Catalase); CCI (Chronic constriction injury); CEUA (Committee for Animal Experimentation); CGA (Chlorogenic acid); DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl); DNA (Deoxyribonucleic acid); TAE (Tris-acetic acid-EDTA); EGA (equivalents of gallic acid); ET (Electron transfer); F (Fructose); G (Glucose); GAP (Gabapentin); GST (Glutathione-S-transferase); HAT (Hydrogen atom transfer); HPLC (High performance liquid chromatography); IC_{50} (Half-maximal inhibitory concentration); KOH (Potassium hydroxide); LOOH (Lipid hydroxyperoxide); MN (Moisture content of material); ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity); ROO^{\bullet} (Radical peroxy); S (Sucrose); SE (standard error); SISBIO (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade); SOD (Superoxide dismutase), t_R (Retention time); TS (Total sugar), TAE (Electrophoresis buffer); TE (Trolox equivalents); WD (Weight of the sample after drying); WF (Wet weight of the sample).

1. Introduction

Neuropathic pain is related to the response of nervous system tissue to neural damage (Medeiros et al., 2019). According to these authors, neuropathic pain can be induced by lesions of the peripheral nervous system caused by tumor invasion, metabolic diseases, infection, neurotoxic chemicals or mechanical trauma leading to pathophysiological changes in either the peripheral nervous system or the central nervous system. Most studies estimate the prevalence of neuropathic pain to be between 1.5% and 8% of the global population (Colloca et al., 2017; Chen et al., 2019). The prevalence of probable neuropathic pain in Brazil was found to be as high as 14.5% (Udall et al., 2019).

Neuropathic pain negatively impacts the quality of life of patients (Colloca et al, 2017). Clinical therapeutic drugs have limited efficacy and many patients must endure long-term side effects of drugs (Chen et al., 2019). The lack of an effective analgesic has impelled a continued search to find novel molecules with beneficial effects for neuropathic pain (Scheid et al., 2018). Natural products appear to be the most promising sources of new drugs (Craag and Newman, 2013). The identification of bioactive compounds from plants that may be used to treat neuropathic pain has been a highly active area of pharmaceutical research (Scheid et al., 2018).

Medicinal plants have therapeutic properties due to the presence of hundreds or thousands of bioactive natural compounds, called secondary metabolites, accumulated in various plant organs and sometimes in specialized cells (Nahdi et al., 2018). Many of these secondary metabolites have biological activities when present in plant extracts, and their components, such as polyphenols, flavonoids and essential oils, have beneficial effects on health and a role as natural antioxidants (Noumi et al., 2010). Chemically, extracts obtained from leaves are characterized by large amounts of phenolic compounds (Arantes et al., 2014; Calixto-Júnior et al., 2016).

Luehea divaricata Mart. (Malvaceae) is a native plant of South America and widely distributed in Brazil, where it is popularly known as “açoita-cavalo”, “caiboti”, or “pau-de-canga” (Bieski et al., 2012; Tirloni et al., 2019). The species has been widely explored by different ethnic groups native to Brazil, including indigenous and riverside populations of the Pantanal region, to treat different pathologic conditions, such as dysentery, leukorrhea, rheumatism, tumors, bronchitis and skin lesions, among others (Tirloni et al., 2019). In addition, leaves from *L. divaricata* are currently found in local commerce of natural products in Brazil.

Extracts from *L. divaricata* leaves were recently shown to contain a lot of antioxidant compounds (Courtes et al., 2015; Tirloni et al., 2018; Tirloni et al., 2019). In addition, extracts from this plant showed no signal of mutagenic potential or acute toxicity in an experimental model (Tirloni et al., 2019). In pain conditions, the administration of hydroalcoholic extract from *L. divaricata* bark was found to attenuate inflammatory pain in mice (Rosa et al., 2014). Nevertheless, the convergent and divergent mechanisms that underlie inflammatory vs. neuropathic pain indicate that there may not always be a clear mechanistic delineation between these two conditions, especially when applied to the progression from acute to chronic pain (Burma et al., 2017). However, no report could be found on the effect that extract of *L. divaricate* has on neuropathic pain. Since antioxidant agents appear to be good candidates to treat neuropathic pain (Riffel et al., 2018; Scheid et al., 2018), we postulated that aqueous extract from leaves of *L. divaricata* would have an antinociceptive effect on a neuropathic pain model. Thus, we aimed to study the effect of oral administration of aqueous extract from leaves of *L. divaricata* on nociception in rats with neuropathic pain induced by chronic constriction injury of the sciatic nerve. Chronic constriction injury (CCI) is the most commonly employed animal model of peripheral neuropathic pain; CCI simulates the symptoms of chronic nerve compression that correspond to causalgia or complex regional pain syndrome in human patients (Kumar et al., 2018). We also compared the antinociceptive effect of the extract with that induced by gabapentin, a first-line clinical treatment for neuropathic pain (Fotio et al., 2019). Blood and hepatic parameters, and the body weight of all rats after treatment, were also assessed to reveal possible side effects of treatment. These findings open perspectives for the use of aqueous extract from leaves of *L. divaricate* in situations of neuropathic

pain because the results with the model will help to translate ongoing research into clinically effective therapeutic approaches (Kumar et al., 2018).

2. Material and Methods

2.1. General

All reagents and chemicals used in experiments were analytical grade and purchased from Sigma. The commercial kits were purchased from Labtest (Belo Horizonte, Brazil). The electronic von Frey and hot plate apparatuses were purchased from Insight (Brazil).

2.2. Plant material and extract preparation

After authorization by Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO - 54348-1), leaves of *Luehea divaricata* were collected in the city of Joaçaba, Santa Catarina, Brazil (27.0938,6°S, 51.31328°W). The specimen was identified with the collection documenting number 382.136 at the Municipal Botanical Museum, Curitiba, Paraná, Brazil, where it was deposited for storage. The leaves were collected during the flowering period, which occurs in December. The leaves were dried for seven days in a kiln at the controlled temperature of 40°C. The dried leaves were then used to prepare the aqueous extract (1 liter of boiling water to each 100 g of dried leaves) as described by Courtes et al. (2015). Different doses of the extract were used because literature data were not conclusive regarding the therapeutic dose of *L. divaricata* extract to use in animal experiments (Courtes et al., 2015).

2.3. Antioxidant properties of extract

Since antioxidant agents appear to be good candidates to treat neuropathic pain (Riffel et al., 2018; Scheid et al., 2018), we assessed antioxidant activity in extract as follow:

Determination of total phenolic content: Total phenolic content was determined as described by Siatka and Kasparová (2010), with slight modifications according to Scheid et al. (2018). Samples were read at 750 nm and the results were expressed as milligram-equivalents of gallic acid per gram of extract (EGA mg/g). All analyses were carried out in triplicate.

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity: The free-radical scavenging activity of the extract and antioxidant standard butylated hydroxytoluene (BHT) in different concentrations (25–500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were measured as described by Siatka and Kasparová (2010) with slight modifications according to Scheid et al. (2018). All experiments were repeated three times independently. Percentage inhibition of DPPH free-radical scavenging activity was calculated using the following equation: $\text{DPPH inhibition \%} = [(A_0 - A_1)/A_0 \times 100]$, where A_0 is the absorbance of the control reaction (3mL of methanol and 1mL of DPPH solution, without a sample of extract) and A_1 is the absorbance in the presence of the extract or standard. Percentage inhibition data were then plotted versus extract concentration, and the IC₅₀ (half-maximal inhibitory concentration) value was calculated by linear regression analysis.

ABTS radical scavenging activity: The free radical scavenging capacity of the extract was studied using the ABTS radical cation decolorization assay (Re et al., 1999), which is based on the reduction of ABTS^{•+} radicals by antioxidants of the plant extract and the antioxidant standard Trolox. Percentage ABTS consumption was transformed into Trolox equivalents (TE) using a calibration curve ($R^2 = 0.9982$) with Trolox standard solutions of 12.5–200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Mocan et al. 2014).

Assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC): ROO• scavenging capacity was measured by monitoring the effect of extract on fluorescence decay resulting from ROO• -induced oxidation of fluorescein and expressed as the ORAC. ROO• was generated by thermodecomposition of AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride). Trolox was used as standard control and the results expressed as ORAC values ($R^2= 0.9935$) (Gomes et al., 2007). Final results were expressed in mmol Trolox equivalents/mg extract (Chisté et al., 2011).

2.4. Determination of vitexin by HPLC

To show that the composition of the extract of the present study was similar to that used by Courtes et al. (2015), the presence of vitexin was determined because it was found in the extract used in that study. In addition, this flavone has been suggested as a taxonomic marker of the genus *Luehea* (Calixto-Júnior et al., 2016). The presence of vitexin was determined by HPLC-analysis using a Shimadzu® LC-20AT system (Shimadzu, Tokyo, Japan). Injections (20 µL) were carried out in a Phenomenex® C₁₈ column (250× 4.6 mm) (Torrance, California, USA) with 5.0-µm core-shell particles at a temperature of 35°C with detection at 270 nm. The method was chosen by adapting the previously developed methodology of Bolda Mariano et al. (2019). Vitexin was evaluated at concentrations of 2.0, 0.5 and 0.5 mg/ml in methanol. The ethyl acetate fraction was dissolved in 1:1 v/v of methanol:water pH 3.5 with formic acid and diluted to 2.5 mg/mL. The most mobile phase was methanol and water acidified with formic acid at a flow rate of 0.9 mL/min, according to the following gradient (A:B v/v): 5:95 (0-3 min); 50:50 (3-6 min maintaining until 8 min); 90:10 (8-15 min, maintaining until 20 min); and 10:90 (20-22 min, maintaining until 27 min).

2.5. Macronutrient composition of extract

Although macronutrient composition of extract appear not interfere in management of neuropathic pain, we think to be important known this composition. Thus, macronutrient composition of extract was determined through analysis of soluble sugar, protein and triacylglyceride contents. Total sugar (TS) content was determined by colorimetric analysis using the anthrone method (Sala Junior et al., 2008). Individual concentrations of the main sugars of the extract (glucose, fructose and sucrose) were determined through colorimetric analysis. Glucose (G) concentration was determined by colorimetric-enzymatic method using a commercial Kit. Sucrose (S) was assessed by the anthrone method after removal of monosaccharides by treatment with hot 30% aqueous KOH. Fructose (F) concentration was calculated using total sugars, glucose and sucrose values as follows: $F=TS-(G+S)$ (Sala Junior et al., 2008). The total protein analysis was performed by the Bradford assay (Bradford, 1977) using bovine serum albumin as the standard. Triacylglyceride content was determined using commercially available kits.

2.6. Inhibition of strand breaking of supercoiled DNA

Since oxidant damage of DNA results in strand breakage and sister chromatid exchange, DNA-DNA and DNA-protein cross linking, and base modification (Shahidi et al., 2007), we assessed the capacity of the extract to inhibit DNA scission. Briefly, dried extract was rehydrated at concentrations of 500 ppm, 50 ppm, and 5 ppm. The reaction mixture was then prepared [4 μ L of a solution of supercoiled plasmid pcDNA (125 ng/ μ L) in phosphate buffer solution, 2 μ L of extract solution (at final concentration of 100 ppm, 10 ppm or 1 ppm) or water, and 4 μ L of a solution of 30 mM AAPH or water (control without AAPH)]. After incubation for 1h in dark, 2 μ L of loading buffer (6x)

was added and the entire mixture was loaded on a 0.8% (w/v) agarose gel prepared in TAE electrophoresis buffer (pH 8.3). Agarose gel electrophoresis was then performed using TAE electrophoresis buffer at 80V for 90 min. The gel was stained by SYBR safe (Thermo Fisher Scientific, USA) at 1:20000. Bands were visualized under ultraviolet light and analyzed using ImageJ software (NIH, Bethesda, USA). The protective effect of the aqueous extract was expressed as relative bands of DNA supercoiled and linear.

2.7. Animals and treatments

All animal procedures were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA-UFRGS #31394). All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used. Adult male Wistar rats, weighing 200–250 g, were randomly and blindly divided into three experimental groups (Naive, Sham and CCI), each of which was further divided into two subgroups (n=6 rats/subgroup), which received aqueous extract or vehicle per *gavage*. The aqueous extract was freshly prepared in water, and water was used as the vehicle. Administration started on the day of surgery (after recovery from anesthesia) and was performed daily at 5:00 pm by the same researcher (Riffel et al., 2018; Scheid et al., 2018).

The experiments are described separately below, in the sequence in which they were performed.

Experiment 1: CCI rats received vehicle or aqueous extract in doses of 100 (n=4 rats/group), 300 (n=4 rats/group), 500 (n=6 rats/group) and 1000 mg/kg/day (n=4 rats/group), per *gavage*, for 10 days. The mechanical and thermal thresholds were assessed prior to the surgical procedure (pre-lesion) and 3, 7 and 10 days after the injury. Plasma and hepatic parameters were assessed at day 10 to reveal possible side

effects of treatment. The results were compared with those of naive and sham rats that received vehicle or aqueous extract at a dose of 500 mg/kg to limit the use of control rats.

Experiment 2: CCI rats received vehicle or aqueous extract at a dose of 500 mg/kg/day, per *gavage*, for 35 days (n=6 rats/group). The mechanical and thermal thresholds were assessed before the surgical procedure (pre-lesion) and 3, 7, 21, and 35 days after the injury. Plasma and hepatic parameters were assessed in all groups at day 35 to reveal the effect of long-term repeated treatment with extract.

Experiment 3: CCI rats received aqueous extract (500 mg/kg/day) or gabapentin (50 mg/kg/day), per *gavage*, for 10 days (n=6 rats/group). The mechanical and thermal thresholds were assessed as in experiment 1. This experiment compared the effect of aqueous extract with that of gabapentin, a first-line clinical treatment for neuropathic pain (Fotio et al., 2019). The gabapentin dose was chosen based on previous study (Newton et al., 2017). The aqueous extract dose was chosen because has shown neuroprotective effect (Courtes et al., 2015).

Experiment 4: CCI rats received gabapentin (30 mg/kg/day)+aqueous extract (500 mg/kg/day), per *gavage*, for 10 days, starting with gabapentin followed by aqueous extract (n=6 rats/group). The first administration started on the day of surgery (after recovery from anesthesia) and was performed in alternate days during 10 days. The mechanical and thermal thresholds were assessed before the surgical procedure (pre-lesion) and daily throughout the experimental period. The gabapentin dose was chosen based on a previous study that showed its antinociceptive effect and only marginal anxiolytic effects after treatment (Chang-Qi et al., 2010). This experiment investigated whether the co-administration of aqueous extract and low-dose gabapentin would induce antinociception similar to that found with high-dose gabapentin.

2.8. Induction of chronic constriction injury (CCI)

Chronic constriction injury was performed based on the procedure described by Bennett and Xie (1988), with slight modifications according to Riffel et al. (2018). Rats were anaesthetized (90 mg/kg ketamine and 10 mg/kg xylazine) and the right common sciatic nerve exposed. Then, four ligatures (4.0 chromic catgut, Shalon Fios Cirúrgicos Ltda., Brazil) were tied loosely around it, with a 1.0–1.5 mm interval between each ligature. After, the muscle and skin layer was immediately sutured with thread and a topical antibiotic applied. In sham rats, all surgical procedures involved in CCI were used except ligature.

2.9. Assessment of mechanical and thermal thresholds

To assess aqueous extract-induced antinociception in CCI rats the von Frey and hot plate tests, which assesses mechanical and thermal thresholds, respectively, were used. To measure the mechanical threshold, the responses of the injured hindpaw to an electronic von Frey apparatus were measured, with increasing pressure applied against the plantar surface. A positive response was indicated by an abrupt withdrawal of the paw, with pressure intensity being automatically recorded (in grams). A single trial consisted of five applications of the plastic tip, once every 5-10 s. The mean of the five readings was taken as the threshold for a particular timing trial. Thermal threshold was measured by placing the rats on a hot plate maintained at 50°C. Withdrawal latency was considered when the animal jumped or licked a hind paw, independently of the side. A cutoff time of 30 s was employed to prevent tissue injury.

The tests were always conducted at the same time of day (7:00 am) and by the same researcher.

2.10. Sample preparation

Body weight was evaluated in all rats before the start of injections (pre-lesion) and at the end of treatment periods. At the end of experiments, rats were killed by decapitation and blood and liver were promptly collected. The blood was centrifuged for 20 min at 1000 *g* and the plasma used to determine aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), direct bilirubin and creatinine using commercially available kits.

The liver was homogenized in 1.15% KCl diluted to 1:5 (w/v) and containing 1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride. Homogenates were centrifuged at 1000 *g* for 20 min at 4°C and the supernatant fraction obtained was frozen at -70°C. These samples were used to assess the activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione-S-transferase (GST) and the levels of lipid hydroperoxides, the latter as a pro-oxidant biomarker.

2.11. Determination of the activity of antioxidant enzymes and lipid hydroperoxide levels

The activity of SOD was measured based on its action to neutralize superoxide radicals to prevent oxidation of adrenalin to adrenochrome, a colorful byproduct that can be measured at 480 nm. The reaction medium contained glycine buffer (50 mM, pH 11.3) and adrenalin (60 mM, pH 2.0) and the results were expressed as units per milligram of protein (Misra and Fridovich, 1972).

The activity of CAT was determined at 240 nm in a reaction medium containing phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) and H₂O₂ (0.88 M), and the results were expressed as pmol of H₂O₂ reduced per minute per milligram of protein (Aebi, 1984).

The activity of GST, expressed as pmol per milligram of protein, was measured by the rate of formation of dinitrophenyl-S-glutathione at 340 nm (Habig et al., 1974).

Lipid hydroperoxides were measured by oxidation of Fe^{2+} by LOOH in an acid medium containing xylenol orange dye, which forms a complex with Fe^{3+} , as described by Jiang et al. (1991). Results are reported as nmol/g tissue.

2.12. Protein measurement in liver

Protein was measured by the method of Lowry et al. (1951), using bovine serum albumin as the standard.

2.13. Statistical analysis

Data were analyzed by two independent researchers; one was blind to treatment. Statistical analyses were performed using SigmaPlot version 11.0 (Systat Software Inc., Chicago, IL) for Windows. Normal Gaussian distribution of the data was analyzed by the Shapiro-Wilk test, while Levene's test was used to analyze homogeneity of variance. To analyze the effect of the inhibition of strand breaking of supercoiled DNA, data were analyzed by Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test. Data from the von Frey and hot plate tests were compared by repeated-measures ANOVA, while other results were analyzed using two-way ANOVA (factors: lesion and treatment); these tests were followed by the post-hoc Tukey test. Differences were considered statistically significant when P was <0.05.

3. Results

3.1. Chemical properties of extract.

The content of total phenols was high at about 63.2 mg EGA/g extract. The extract showed excellent scavenging activity in the DPPH assay, 249 times superior to the

antioxidant standard used (BHT). The extract also revealed potential for scavenging the ABTS^{•+} radical, with inhibition of 2.4 mM Eq Trolox/mg extract. The aqueous extract also showed a high capacity for scavenging oxygen radicals, with an ORAC value of 3.2 mM Eq Trolox/mg extract (Table 1).

Courtes et al. (2015) found vitexin in aqueous extract prepared from *L. divaricata* leaves. In accordance with this study, HPLC fingerprinting of the aqueous extract of the present study also revealed the presence of vitexin ($t_R=14.866$; peak 1) (Figure 1).

The amount of total soluble sugars was found to be low (0.73 mg/mL), with a predominance of sucrose (0.37 mg/mL), while glucose and fructose were 0.24 mg/mL and 0.11 mg/ml, respectively. Protein was 0.11 mg/mL, while triacylglycerides were present in a trace amount (0.08 mg/mL) (Table 1).

The extract showed a high capacity for inhibiting strand breaking of supercoiled DNA at a concentration of 10 ppm. This effect was similar to that found for chlorogenic acid at the same concentration (Figure 2). As with chlorogenic acid, the aqueous extract did not induce significant inhibition of DNA-single-strand breaks at a concentration of 0.45 ppm (data not shown for extract).

3.2. Mechanical and thermal thresholds.

After CCI, no rat displayed gross deficits in motor behavior that might have influenced the assessment of mechanical and thermal thresholds. These thresholds did not change significantly in naive and sham rats (Figures 3A,B; 4A,B). Repeated-measures ANOVA revealed a significant difference between group (Mechanical threshold: $F_{(2,53)} = 20.673$, $p < 0.001$; Thermal threshold: $F_{(2,53)} = 4.437$, $p < 0.001$). While *post hoc* test revealed significant decrease in mechanical threshold of CCI rats at days 3, 7, 10, 21 and 35, thermal threshold significantly decreased in these rats at days 3, 7 and 10 compared to

pre-nerve lesion level. However, aqueous extract-treated CCI rats exhibited improvement in mechanical and thermal thresholds in all doses tested (Figures 3C,D; 4C,D).

In accordance with other studies (Corona-Ramos et al., 2016; Newton et al., 2017), the administration of gabapentin induced antinociception which was observed at days 3, 7 and 10 after surgery (Figures 5A, 6A). Repeated-measures ANOVA revealed a significant effect between treatment (von Frey test: $F_{(3,68)} = 17.925$, $p < 0.001$; hot plate test: $F_{(3,68)} = 8.550$, $p < 0.001$). While the decline in mechanical and thermal thresholds were approximately 48% in vehicle-treated CCI rats for days 3, 7 and 10, the decline was around of 11% in gabapentin-treated CCI rats compared to pre-nerve lesion levels. A similar effect was induced by the aqueous extract.

Subsequent experiments were performed to assess if co-administration of extract and low-dose gabapentin result in an antinociceptive effect similar to that found with high-dose gabapentin. Repeated-measures ANOVA revealed a significant effect between treatment (von Frey test: $F_{(4,35)} = 16.067$, $p < 0.001$; hot plate test: $F_{(4,35)} = 5.402$, $p < 0.001$). *Post hoc* test revealed that the decrease in mechanical and thermal thresholds of aqueous extract+low-dose gabapentin-treated CCI rats were similar to that found in CCI rats that received extract or high-dose gabapentin (Figures 5B, 6B). While mechanical and thermal thresholds decreased around of 18% in CCI rats that received co-administration of low-dose gabapentin+aqueous extract, the thresholds reduced approximately 48% in CCI rats that received the vehicle. Antinociception was sustained for 24 hours after the first administration, suggesting that the effect was long enough to be carried overnight to the following day. The antinociceptive effect was then assessed after treatment with co-administration of extract and low-dose gabapentin administrated in alternate days. The thresholds were measured daily to assess if this treatment

prolonged the antinociceptive effect; in fact, the mechanical and thermal thresholds remained elevated until day 10 in spite of alternate treatment (Figures 5B, 6B).

3.3. Effect on blood and hepatic parameters and body weight

Plasmatic AST, ALT, direct bilirubin and creatinine levels showed no significant changes with administration of aqueous extract in doses of 100, 300, 500 and 1000 mg/kg for 10 days and 500 mg/kg for 35 days, compared to naive and sham rats (Table 2). The extract did not induce significant change in lipid hydroperoxide levels and activity of the enzymes SOD, catalase and GST (Table 3). The extract also did not induce significant changes in body weight. The rats that received aqueous extract in doses of 100, 300, 500 and 1000 mg/ kg for 10 days, and 500 mg/kg for 35 days, continued to grow and gain weight similar to naive rats (Figure 7).

4. Discussion

The present study determined antioxidant activity and macronutrient composition (soluble sugars, triglycerides, and proteins) of the extract of *L. divaricata* leaves. The hypothesis that this aqueous extract could attenuate CCI-induced neuropathic pain in rats was also tested.

In accordance with previous studies (Courtes et al., 2015; Calixto-Júnior et al., 2016; Tirloni et al., 2019), the present extract exhibited the presence of vitexin. Since vitexin has been suggested as a possible taxonomic marker of the genus *Luehea* (Calixto-Júnior et al., 2016), the studied extract exhibited a characteristic molecule of this genus. Courtes et al. (2015) also found vitexin in aqueous extract prepared from *L. divaricata* leaves.

Our extract exhibited a high content of phenol and good antioxidant activity, which are characteristics also found in previous studies using aqueous extract from *L. divaricata* leaves (Courtes et al., 2015; Tirloni et al., 2018; Tirloni et al., 2019). Thus, the studied extract exhibited characteristics commonly found in aqueous extract prepared from *L. divaricata* leaves.

Antioxidant activity can vary significantly depending on the assay used because different assays measure different chemical reactions/activity (Roy et al., 2010). According to these authors, mechanisms of antioxidant reactions in most *in vitro* antioxidant assays are defined as either hydrogen atom transfer (HAT) or electron transfer (ET) (Roy et al., 2010). The ABTS assay is based on a strict HAT mechanism, whereas for DPPH, in addition to this HAT mechanism, there is also evidence of antioxidant action through an ET mechanism (Kabra et al., 2019). The ORAC assay represents a typical HAT-based method (Roy et al., 2010). Thus, it may be suggested that our aqueous extract has antioxidant compounds acting through both HAT and ET mechanisms.

The present study also determined, for the first time, the macronutrient composition of aqueous extract from *L. divaricata* leaves. This extract had more soluble sugars than proteins and triacylglycerides, which is similar to what has been found for leaves of other plant species (Ovuakporie-Uvo et al., 2019; Mzoughi et al., 2019). Interestingly, sucrose was the predominant sugar in the studied extract, which may be related to developmental stage of the leaves. It has been demonstrated that sucrose, fructose and glucose are the major sugars present through developmental stages of leaves of *Hevea brasiliensis*; however, sucrose increased continuously throughout leaf development and was the predominant sugar in mature leaves (Zhu et al., 2018). The present study used mainly mature leaves of *L. divaricata*. Nonetheless, another effect needs to be

considered. Sucrose was the predominant sugar in leaves of *Salvinia minima* in the summer (Rosa et al., 2017). The leaves used in the present study were collected in December, which is summer in Brazil. Thus, a seasonal factor may also be contributing to the predominance of sucrose in extract from *L. divaricata* leaves.

Protein concentration was greater than that of triacylglycerides. A higher concentration of protein than lipid was also found by a study using leaves of other plant species (Mzoughi et al., 2019). The present study, however, only assessed triacylglycerides. Plants usually store lipids as droplets of triacylglycerides (Narayanan et al., 2016); however, leaves are often rich in other lipids, such as sterols and oleic and α -linolenic acids (Mzoughi et al., 2019). Thus, further research is needed to better characterize the lipid compounds present in the extract of *L. divaricata* leaves.

We demonstrated here, for the first time, that the administration of aqueous extract from *L. divaricata* leaves attenuates the decrease in mechanical and thermal thresholds of rats with CCI-induced neuropathic pain. Von Frey testing measures cutaneous hyperalgesia or allodynia and it is thus most useful for mimicking clinical conditions with enhanced cutaneous sensitivity such as neuropathic pain (Gregory et al., 2013). According to these authors, the hot plate test involves recording the latency for either withdrawing the paw from the hot-plate or licking the paw. The act of choosing which paw to lift to avoid hot plate is believed to require supraspinal structures indicating that the hot plate test goes beyond nocifensive reflexes and requires integration in higher structures (Gregory et al., 2013). Since CCI rat is the most commonly employed animal model of peripheral neuropathic pain (Kumar et al., 2018), our results suggested that all doses of aqueous extract obtained from leaves of *L. divaricata* were effective at attenuating the peripheral neuropathic pain condition used. Thus, the aqueous extract appears to be a good option in management of this type of pain.

The extract revealed high phenolic compound content and good antioxidant activity. Antioxidant agents are good candidates for treating neuropathic pain (Riffel et al., 2018; Scheid et al., 2018). Thus, it is possible that the antioxidant compounds are contributing to antinociceptive effect of the aqueous extract. However, only vitexin was assessed in our extract. Since this flavone was able to significantly relieve hyperalgesia in a mouse model of postoperative pain (Zhu et al., 2016), we cannot exclude vitexin from contributing to antinociception, although studied extract exhibited other chromatographic peaks as well (Figure 1). Thus, it is possible that the antinociceptive effect observed in the present study is related to vitexin and/or other compounds found in the aqueous extract. Further studies are needed to better characterize the compounds present in the extract of the present study.

Interestingly, all doses of extract demonstrated to be safe in rats. Animals under toxic effects tend to exhibit behavioral changes, including reduced feed and water consumption, and as a consequence experience weight loss (Tolouei et al., 2019). In our study, aqueous extract did not induce any signs of behavioral change during the entire observation period. In addition, no deaths occurred and no significant change was found in body weight gain and the measured plasmatic and hepatic parameters. In addition, the aqueous extract had a high capacity to inhibit strand breaking of supercoiled DNA. Taken together, our results not only reinforce the lack of mutagenic potential of extract prepared from *L. divaricata* leaves, as previously suggested by other authors (Felicio et al., 2011; Tirloni et al., 2019), but they highlight the safety profile of the extract.

As expected, gabapentin was highly effective in attenuating the decrease in mechanical threshold associated with CCI (Corona- Ramos et al., 2016; Riffel et al., 2016; Fotio et al., 2019). The aqueous extract relieved mechanical and thermal threshold changes with comparable efficacy to gabapentin. Thus, this result not only reinforces the

antinociceptive effect of the aqueous extract, but also showed for the first time that the effect is comparable to a clinic drug used to treated neuropathic pain. This result is interesting because classical pharmacological treatments for chronic neuropathic pain are effective in <50% of patients and may be associated with adverse effects that limit their clinical utility (Colloca et al., 2017).

Based on the comparable efficacy of aqueous extract and gabapentin, we hypothesized that the co-administration of aqueous extract and low-dose gabapentin would induce antinociception similar to that found with higher-dose gabapentin. Reducing gabapentin dose appears interesting due to adverse effects of this drug, which include sedation, fatigue and dizziness in humans, and sedation and ataxia in companion animals (Ruel and Steagall, 2019). As we expected, the antinociceptive effect with extract+low-dose gabapentin was similar to that found in CCI rats that received higher-dose gabapentin or aqueous extract at a dose of 500 mg. Since two or more drugs may be administrated in combination primarily to increase efficacy and reduce individual dosages and possible side effects of each (Basting et al., 2019), the co-administration of aqueous extract and gabapentin was effective at reducing the individual dose of gabapentin without any change in antinociceptive effect in CCI rats. Interestingly, the antinociception was long enough to be carried overnight to the following day after surgery. Since aqueous extract administration was made on alternate days after the first treatment, and mechanical and thermal thresholds remained increased, it can be suggested that antinociception remained sustained until the end of the experimental in spite of the alternate administration. These results suggest that co-administration of aqueous extract+low-dose gabapentin need not be daily. In this context, co-administration may be an option to reduce the possibility of further side effects with daily treatment with gabapentin for long periods. Unfortunately, the exact mechanism subserving the positive effect of the

combination between gabapentin and aqueous extract is, at present, unknown. However, gabapentin appears to alleviate pain by two pathways: α -2 δ Ca²⁺ channels and interleukin-10-Heme Oxygenase-1 signaling pathway (Stoicea et al., 2015); and decrease in excitatory amino acid transporter 3 (Gil et al., 2015). Aqueous extract showed high phenol content and good antioxidant activity. All these mechanisms should be working to attenuate and prolong antinociception in rats with CCI. Nevertheless, further studies need to examine the mechanisms involved in longer antinociception following co-administration of aqueous extract and low-dose gabapentin.

However, our study used a non-human animal model, and the results need to be confirmed in human subjects. Previous research showed that liver microsomes from rat, Rhesus monkey, and human exhibited many similarities in biotransformation characteristics of protoberberine alkaloids, which are major components in many medicinal plants (Li et al., 2017). In this context, our results are interesting because they raise the possibility of clinical use of aqueous extract from *L. divaricata* leaves as an adjuvant to treat neuropathic pain. Future works should preferably focus on this question.

5. Conclusion

The present study showed, for the first time, that oral administration of aqueous extract prepared from *Luehea divaricata* leaves induced antinociception comparable to that of gabapentin, a drug recommended as first-line treatment for neuropathic pain. Another innovative result was longer antinociception following co-administration of aqueous extract and low-dose gabapentin, which opens perspectives for use of the extract as an option to decrease the dosage of gabapentin used to treat neuropathic pain, and thus, can lead to less side effects from this drug in patients suffering from neuropathic pain.

Taken together, the aqueous extract from *L. divaricata* leaves appears to have promising therapeutic potential for the management of neuropathic pain.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest

Author contributions

A.K. and W.A.P. were responsible for the study concept and design and they prepared and wrote the manuscript; A.K., M.C.Q.S, T.C.B.S., E.M.S.S. conducted most of experiments under the supervision of W.A.P.; A.K., F.S. and R.M.N.B. were responsible for the measures of ORAC and inhibition of strand breaking of supercoiled DNA; R.N. was responsible for HPLC analysis.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Reference

- Aebi, H., 1984. Catalase *in vitro*. Method. Enzymol. 125:121-126.
- Arantes, L., Colle, D., Machado, M., Zamberlan, D., Tassi, C., da Cruz, R., Manfron, M., Athayde, M., Soares, F., 2014. *Luehea divaricata* Mart. anticholinesterase and antioxidant activity in a *Caenorhabditis elegans* model system. Ind. Crops Prod. 62, 265-271.

- Basting, R.T., Spindola, H.M., Sousa, I. M.O., Queiroz, N.C.A., Trigo, J.R., de Carvalho, J.E., Foglio, M.A., 2019. *Pterodonpubescens* and *Cordia verbenacea* association promotes a synergistic response in antinociceptive model and improves the anti-inflammatory results in animal models. *Biomed.Pharmacother.* 112:108693.
- Bennett, G.J., Xie, Y.K. 1988. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33: 87–107.
- Bieski, I.G.C., Rios Santos, F., de Oliveira, R.M., Espinosa, M.M., Macedo, M., Albuquerque, U.P., de Oliveira Martins, D.T., 2012. Ethnopharmacology of medicinal plants of the pantanal region (Mato Grosso, Brazil). *Evid. Based. Complement. Altern. Med.* 1-36.
- Bolda Mariano, L.N., Boeing, T., da Silva, R.C.M.V.A.F., Cechinel-Filho, V., Niero, R., Mota da Silva, L., de Souza, P., Faloni de Andrade, S., 2019. 1,3,5,6-Tetrahydroxyxanthone, a natural xanthone, induces diuresis and saluresis in normotensive and hypertensive rats. *Chem. Biol. Interact.* 311:108778.
- Bradford, M.M., 1977. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72: 248254.
- Burma, N.E., Leduc-Pessah, H., Fran, C.Y., Trang, T., 2017. Animal models of chronic pain: Advances and challenges for clinical translation. *J.Neurosci. Res.* 95: 1242-1256.
- Calixto-Júnior, J.T., Morais, S.M., Colares, A.V., Coutinho, H.D.M., 2016. The Genus *Luehea* (Malvaceae-Tiliaceae): Review about Chemical and Pharmacological Aspects. *J. Pharm.* 2016: 1368971.

- Chang-Qi, L., Zhang, J.W., Dai, R.P., Wang, J., Luo, X.G., Zhou, X.F., 2010. Surgical incision induces anxiety -like behavior and amygdala sensitization: effects of morphine and gabapentin. *Pain Res. Treat.* 2010:705874.
- Chen, Q.Y., Tan, C.Y., Wang, Y., Ma, K.T., Li, L., Si, J.Q., 2019. Mechanism of persistent hyperalgesia in neuropathic pain caused by chronic constriction injury. *Neural Regen. Res.* 14:1091-1098.
- Chisté, R.C., Mercadante, A.Z., Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J.L., Bragagnolo, N., 2011. In vitro scavenging of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. *Food Chem.* 15;127(2):419-26.
- Colloca, L., Ludman, T., Bouhassira, D., Baron, R., Dickenson, A.H., Yarnitsky, D., Greeman, R., Truini, A., Attal, N., Finnerup, N.B., Eccleston, C., Kalso, E., Bennett, D.L., Dworkin, R.H., Raja, S.N., 2017. Neuropathic pain. *Nat. Rev. Dis. Primers* 3:17002.
- Corona- Ramos, J.N., De la O-Arciniega, M., Déciga- Campos, M., Medina-López, J.R., Domínguez-Ramírez, A.M., Jaramillo-Morales, O.A., Espinosa-Juárez, J.V., López-Munoz, F.J., 2016. The antinociceptive effects of Tramadol and/or gabapentin on rat neuropathic pain induced by a chronic constriction injury. *Drug Dev. Res.* 77:217-226.
- Courtes, A.A., Arantes, L.P., Barcelos, R.P., da Silva, I.K., Boligon, A.A., Athayde, M.L., Puntel, R.L., Soares, F.A.A., 2015. Protective effects of aqueous extract of *Luehea divaricata* against behavioral and oxidative changes induced by 3-nitropropionic acid in rats. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2015: 723431.
- Cragg, G.M., Newman, D.J., 2013. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim. Biophys. Acta* 1830: 3670-3695.

- Felício, L., Silva, E., Ribeiro, V., Miranda, C., Vieira, I., Passos, D., Ferreira, A., Vale, C., Lima, D., Carvalho, S., 2011. Mutagenic potential and modulatory effects of the medicinal plant *Luehea divaricata* (Malvaceae) in somatic cells of *Drosophila melanogaster*: SMART/wing. *Genet. Mol. Res.* 10(1), 16-24.
- Fotio, Y., Aboufares El Alaoui, A., Borruto, A. M., Acciarini, S., Giordano, A., Ciccocioppo, R., 2019. Efficacy of a Combination of N-Palmitoylethanolamide, Beta-Caryophyllene, Carnosic Acid, and Myrrh Extract on Chronic Neuropathic Pain: A Preclinical Study. *Front. Pharmacol.* 10: 711.
- Gil, Y.S., Kim, J.H., Kim, C.H., Ham, J.I., Zuo, Z., Baik, H.J., 2015. Gabapentin inhibits the activity of the rat excitatory glutamate transporter 3 expressed in *Xenopus* oocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 762:112-117.
- Gomes, A., Fernandes, E., Silva, A. M. S., Santos, C. M. M., Pinto, D. C. G. A., Cavaleiro, J. A. S., Lima, J.L., 2007. 2-Styrylchromones: Novel strong scavengers of reactive oxygen and nitrogen species. *Bioorg. Med. Chem.*, 15: 6027–6036.
- Gregory, N.S., Harris, A.L., Robinson, C.R., Dougherty, P.M., Fuchs, P.N., Sluka, K.A., 2013. An overview of animal models of pain: disease models and outcome measures. *J. Pain* 14:1255-1269.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., Jacoby, W.B., 1974. Glutathione s-transferases. The first enzymatic in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249: 7130-7139.
- Jiang, Z. Y., Woollard, A. C. S., Wolff, S. P., 1991. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe⁺² in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* 26: 853-856.
- Kabra, A., Sharma, R., Hano, C., Kabra, R., Martins, N., Baghel, U.S., 2019. Phytochemical Composition, Antioxidant, and Antimicrobial Attributes of

- Different Solvent Extracts from *Myrica esculenta* Buch.-Ham.ex. D. Don Leaves. *Biomolecules* 9pii: E357.
- Kumar, A., Kaur, H., Singh, A., 2018. Neuropathic pain models caused by damage to central or peripheral nervous system. *Pharmacol.Rep.* 70: 206-216.
- Li, Y., Zhou, Y., Si N., Han, L., Ren, W., Xin, S., Wang, H., Zuo, R., Wei, X., Yang, J., Zhao, H., Bian, B., 2017. Comparative metabolismo study of five protoberberine alkaloids in liver microsomes from rat, Rhesus, Monkey, and human. *Planta Med.* 83:1281-1288.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N.J., Farr, A. R., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol.Chem* 193: 265-275.
- Medeiros, P., Negrini-Ferrari, S.E.,Palazzo, E.,Maione, S., Ferreira , S.H., de Freitas, R.L., Coimbra, N.C., 2019. N-methyl-D-aspartate Receptors in the Prelimbic Cortex are Critical for the Maintenance of Neuropathic Pain. *Neurochem. Res.* 44: 2068-2080.
- Misra, H. P., Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247: 3170-3175.
- Mocan, A., Vlase, L., Vodnar, D.C., Bischin, C., Hanganu, D., Gheldiu, A.M., Oprean, R., Silaghi-Dumitrescu, R., Crişan, G., 2014. Polyphenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of *Lycium barbarum L.* and *Lycium chinense Mill.* leaves. *Molecules.*10;19(7):10056-73.
- Mzoughi, Z., Chahdoura, H., Chakroun, Y., Cámara, M., Fernández-Ruiz, V., Morales, P., Mosbah, H., Flamini, G., Snoussi, M., Majdoub, H., 2019. Wild edible Swiss chard leaves (*Beta vulgaris L. var. cicla*): Nutritional, phytochemical composition and biological activities. *Food Res. Int.* 119: 612-621.

- Nahdi, A., Hammami, I., Ali, R.B., Kallech-Ziri, O., El May, A., El May, M.V., 2018. Effect of *Hypericum humifusum* aqueous and methanolic leaf extracts on biochemical and histological parameters in adult rats. *Biomed.Pharmacother.* 108:144-152.
- Narayanan, S., Tamura, P.J., Roth, M.R., Prasad, P.V., Welti, R., 2016. Wheat leaf lipids during heat stress: I. High day and night temperatures result in major lipid alterations. *Plant Cell Environ.* 39:787-803.
- Noumi, E., Snoussi, M., Hajlaoui, H., Valentin, E., Bakhrouf, A., 2010. Antifungal properties of *Salvadora persica* and *Juglans regia L.* extracts against oral *Candida* strains. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis.* 29: 81-8.
- Newton, V.L., Guck, J.D., Cotter, M.A., Cameron, N.E., Gardiner, N.J., 2017. Neutrophils the spinal cord Parenchyma of Rats with experimental Diabetic Neuropathic. *J. Diabetes Res.* 2017: 4729284.
- Ovuakporie-Uvo, O., Idu, M., Omoregie, E.S., 2019. Nutrients and chemical composition of *Desplatsia dewevrei*. *Food Sci.Nutr.* 7:1768-1777.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26:1231-1237.
- Riffel, A.P., de Souza, J.A., Santos, M. C. Q., Horst, A., Scheid, T., Kolberg, C., Belló-Klein, A., Partata, W.A., 2016. Systemic administration of vitamins C and E attenuates nociception induced by chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. *Brain Res. Bull.* 121: 169–77.
- Riffel, A.P., Santos, M. C. Q., de Souza, J.A., Scheid, T., Horst, A., Kolberg, C., Belló-Klein, A., Partata, W.A., 2018. Treatment with ascorbic acid and α -tocopherol

- modulates oxidative-stress markers in the spinal cord of rats with neuropathic pain. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 51: e7097.
- Rosa, R. L., Nardi, G. M., Januário, A. G. D. F., Boçois, R., Bagatini, K. P., Bonatto, S. J. R., Iagher, F., 2014. Anti-inflammatory, analgesic, and immunostimulatory effects of *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (Malvaceae) bark. *Braz. J. Pharm.Sci.* 50: 599-610.
- Rosa, M., Prado, C., Chocobar-Ponce, S., Pagano, E., Prado, F., 2017. Effect of seasonality and Cr(VI) on starch- sucrose partitioning and related enzymes in floating leaves of *Salvinia minima*. *Plant Physiol. Biochem.* 118: 1-10.
- Roy, M.K., Koide, M., Rao, T.P., Okudo, T., Ogasawara, Y., Juneja, L.R., 2010. ORAC and DPPH assay comparison to assess antioxidant capacity of tea infusions: relationship between total polyphenol and individual catechin content. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 61:109-24.
- Ruel, H.L.M., Steagall, P.V., 2019. Adjuvant analgesics in acute pain management. *Vet.Clin.North Am.Small Anim.Pract.* 49: 1127-1141.
- Sala-Junior, V., Celloto, V. R., Vieira, L. G. E., Gonçalves, J. E., Gonçalves, R. A. C., de Oliveira, A. J. B., 2008. Floral nectar chemical composition of floral nectar in conventional and transgenic sweet orange, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, expressing an antibacterial peptide. *Pl.Syst.Evol.* 275: 1-7.
- Scheid, T., Bosco, L.D., Guedes, R.P., Pavanato, M.A., Belló-Klein, A., Partata, W.A., 2018. Sciatic nerve transection modulates oxidative parameters in spinal and supraspinal regions. *Neurochem. Res.* 38: 935-942.
- Siatka, T., Kašparová, M., 2010. Seasonal variation in total phenolic and flavonoid contents and DPPH scavenging activity of *Bellis perennis* L. flowers. *Molecules* 15: 9450– 9461.

- Shahidi, F., Alasalvar, C., Liyana-Pathirana C.M., 2007. Antioxidant phytochemicals in hazelnut kernel (*Corylus avellana* L.) and hazelnut byproducts. *J. Agric. Food Chem.* 55:1212-1220.
- Stoicea, N., Russel, I.D., Weidner, G., Durda, M., Joseph, N.C., Yu, J., Bergese, S.D., 2015. Opioid -induced hypoalgesia in chronic pain patients and the mitigating effects of gabapentin. *Front.Pharmacol.*6:104.
- Tirloni, C.A.S., Palozzi, R.A., Tomazetto, T.A., Vasconcellos, P.S.P., Souza, R.I.C., Santos, A.C., Almeida, V.P, Budel, J.M., Souza, L.M., Gasparotto Junior, A., 2018. Ethnopharmacological approaches to kidney disease-prospecting an indigenous species from Brazilian Pantanal. *J. Ethnopharmacol.* 211: 47-57.
- Tirloni, C.A.S., Palozzi, R.A, Schaedler, M.I., Guarnier, L.P., Silva, A.O., Marques, M.A, Gasparotto, F.M., Lourenço, E.L.B., de Souza, M., Gasparotto Junior., A., 2019. Influence of *Luehea divaricata* Mart. extracts on peripheral vascular resistance and the role of nitric oxide and both Ca⁺²-sensitive and Kir6.1 ATP-sensitive K⁺ channels in the vasodilatory effects of isovitexin on isolated perfused mesenteric beds. [Phytomedicine](#)56:74-82.
- Tolouei, S.E.L., Palozi, R.A.C., Tirloni, C.A.S., Marques, A.A.M., Schaedler, M.I., Guarnier, L.P., Silva, A.O., de Almeida, V.P., Manfron Budel, J., Souza, R.I.C., Dos Santos, A.C., Silva, D.B., Lourenço, E.L.B., Dalsenter, P.R., Gasparotto Junior, A., 2019. Ethnopharmacological approaches to *Talinumpaniculatum* (Jacq.) Gaerth.- Exploring cardiorenal effects from the Brazilian Cerrado. *J.Ethopharmacol.* 238:111873.
- Zhu, Q., Mao L.N., Liu, C.P., Sun, Y.H., Jiang, B., Zhang, W., Li, J.X., 2016. Antinociceptive effects of vitexin in a mouse model of postoperative pain. *Sci. Rep.* 6:19266.

Zhu, J., Qi, J., Fang, Y., Xiao, X., Li, J., Lan, J., Tang, C., 2018. Characterization of sugar contents and sucrose metabolizing enzymes in developing leaves of *Hevea brasiliensis*. *Front. Plant Sci.* 9:58.

Udall, M., Kudel, I., Cappellero, J.C., Sadosky, A., King-Concialdi, K., Parsons, B., Hlavacek, P., Hopps, M., Salomon, P.A., DiBonaventura, M.D., Clark, P., Garcia, J.B.S., 2019. Epidemiology of physician-diagnosed neuropathic pain in Brazil. *J. Pain Res.* 12: 243-253.

Figure Legends

Figure 1. Chromatographic profile of aqueous extract (a) obtained from *Luehea divaricata* leaves and vitexin standard (b). Retention time: 14.866, peak 1.

Figure 2. Protection of supercoiled DNA strand breaking by aqueous extract (AE) obtained from *Luehea divaricata* leaves. *P<0.05 compared to supercoiled DNA. CGA, chlorogenic acid; AAPH, 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride); ppm, parts per million.

Figure 3. Assessment of mechanical threshold in rats with chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve that received daily per *gavage* aqueous extract (AE) obtained from *Luehea divaricata* leaves or vehicle (water) for 10 (A-C) and 35 (D) days after CCI (n=6/group). The aqueous extract was administrated in different doses (C) and mechanical threshold assessed at days 3, 7, 10, 21 and 35 days after CCI (n=4-6/group). Data are reported as means±SE. #P<0.05 compared to pre-lesion of the same experimental group. **P<0.05 compared to extract-treated CCI rats in all doses.

^{##}P<0.05 compared to extract (500 mg)-treated CCI rats (repeated-measures ANOVA followed by Tukey *post hoc* test). In Sham rats, all surgical procedures involved in the CCI were used except the ligature.

Figure 4. Assessment of thermal threshold in rats with chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve that received daily per *gavage* aqueous extract (AE) obtained from *Luehea divaricata* leaves or vehicle (water) for 10 (A-C) and 35 (D) days after CCI (n=6/group). The aqueous extract was administrated in different doses (C) and mechanical threshold assessed at days 3, 7, 10, 21 and 35 days after CCI (n=4-6/group). Data are reported as means±SE. [#]P<0.05 compared to pre-lesion of the same experimental group. ^{**}P<0.05 compared to extract-treated CCI rats in all doses (repeated-measures ANOVA followed by Tukey *post hoc* test). In Sham rats, all surgical procedures involved in the CCI were used except the ligature.

Figure 5. Assessment of mechanical threshold in rats with chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve that received per *gavage* aqueous extract (AE) obtained from *Luehea divaricata* leaves, vehicle (water) and gabapentin (GAP) for 10 days. The aqueous extract and gabapentin were administrated in doses 500 and 50 mg/kg/day (A) and 500+30 mg/kg/day (B), respectively. In (B) the administrations were on alternate days (arrows indicate the days of treatment) and mechanical threshold was assessed daily (1-10 indicates days of this assessment). Data are reported as means±SE (n=6/group). [#]P<0.05 compared to pre-lesion of the same experimental group. ^{##}P<0.05 compared to extract (500 mg)-treated CCI rats. ^{***}P<0.05 compared to GAP-treated CCI rats; ^{###}P<0.05 compared to extract+GAP-treated CCI rats (repeated-measures ANOVA followed by Tukey *post hoc* test).

Figure 6. Assessment of thermal threshold in rats with chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve that received per *gavage* aqueous extract (AE) obtained from *Luehea divaricata* leaves, vehicle (water) and gabapentin (GAP) for 10 days. The aqueous extract and gabapentin were administrated in doses 500 and 50 mg/kg/day (A) and 500+30 mg/kg/day (B), respectively. In (B) the administrations were on alternate days (arrows indicate the days of treatment) and mechanical threshold was assessed daily (1-10 indicates days of this assessment). Data are reported as means±SE (n=6/group). #P<0.05 compared to pre-lesion of the same experimental group. ***P<0.05 compared to GAP-treated CCI rats; ####P<0.05 compared to extract+GAP-treated CCI rats (repeated-measures ANOVA followed by Tukey *post hoc* test).

Figure 7. Body weight gain of rats with chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve that received per *gavage* aqueous extract (AE) obtained from *Luehea divaricata* leaves, vehicle (water) and gabapentin (GAP) for 10 and 35 days. Data are reported as means±SE (n=6/group). *P<0.05 compared to initial body weight (repeated-measures ANOVA followed by Tukey *post hoc* test).

Figure 1

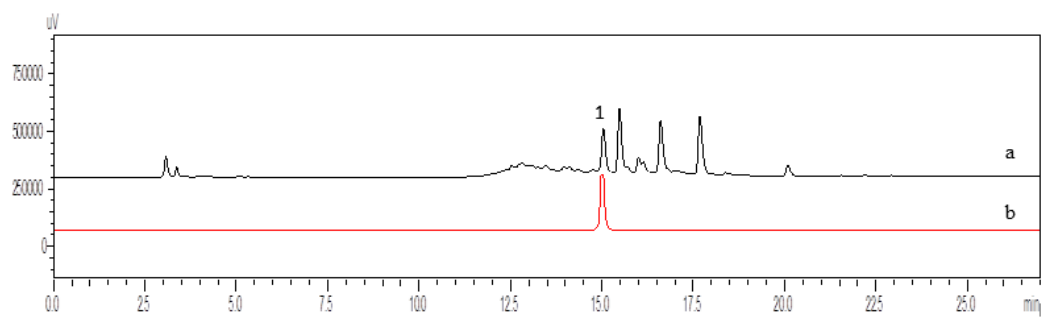


Figure 2

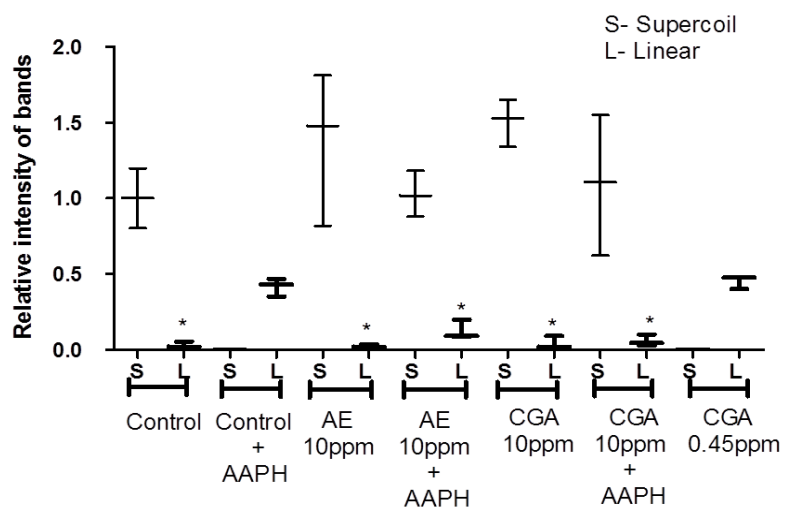
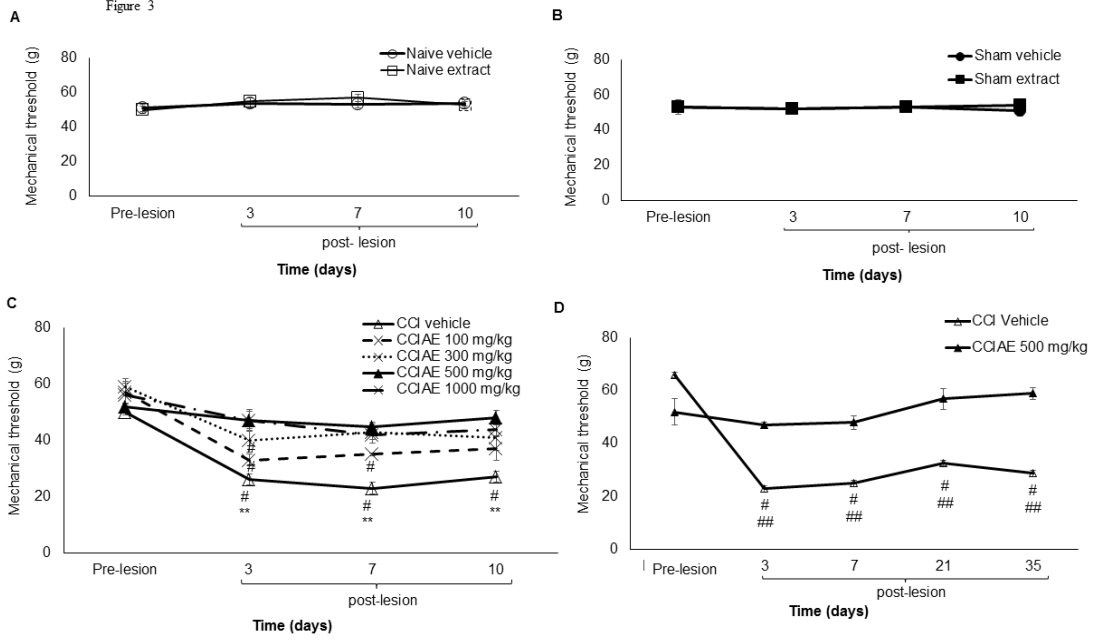


Figure 3



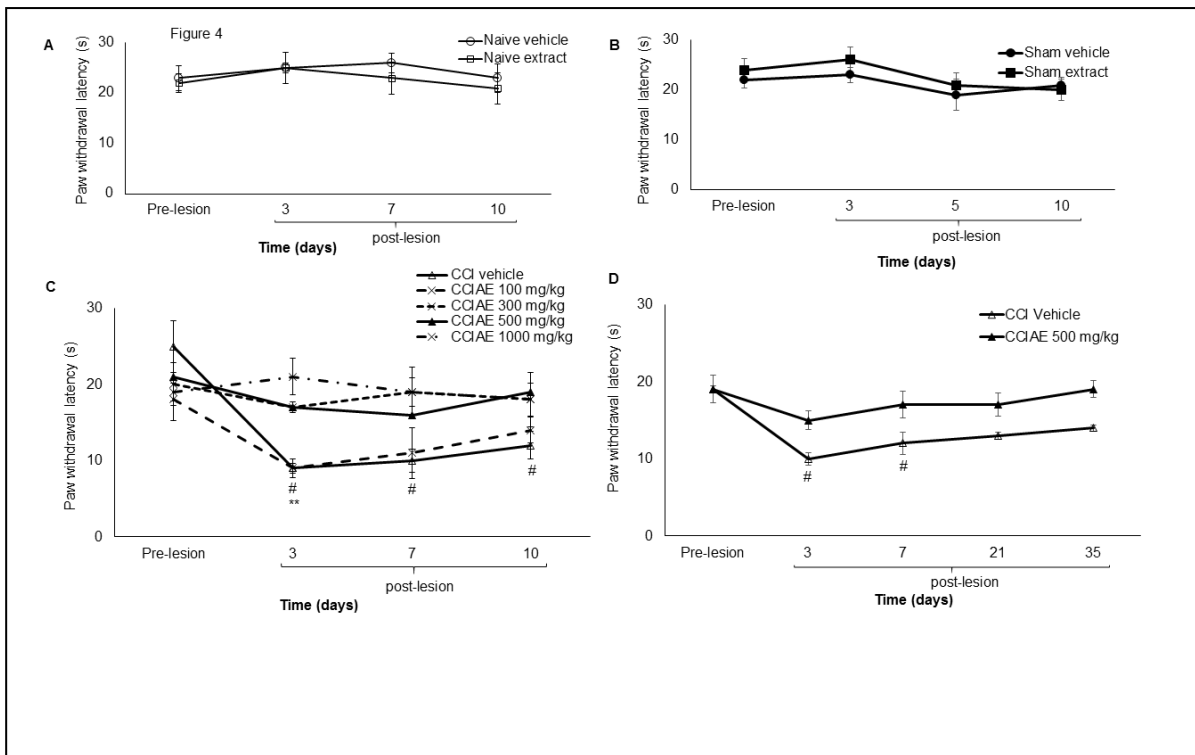


Figure 5

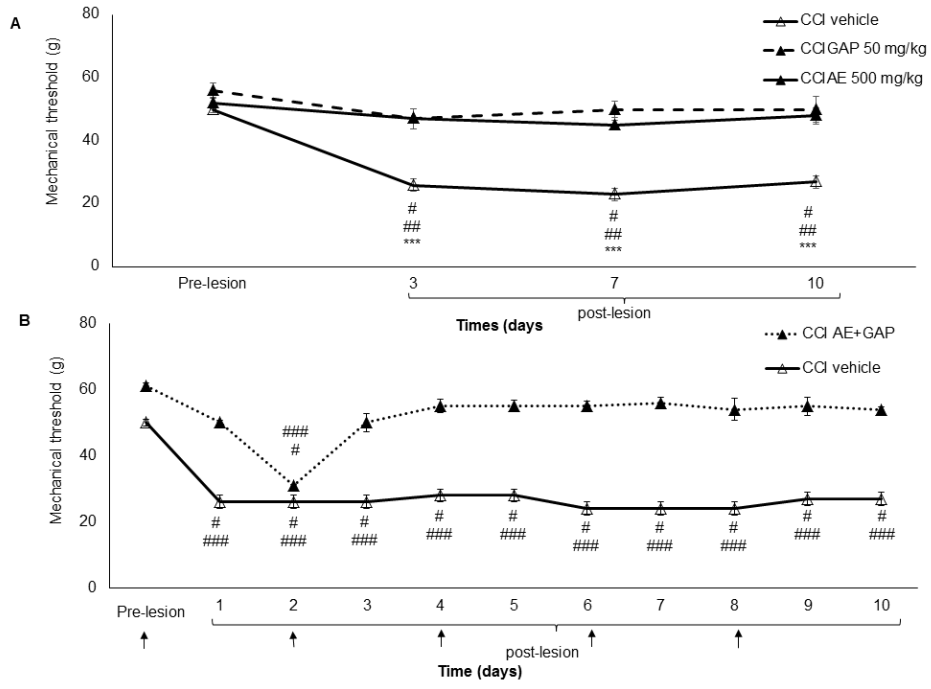
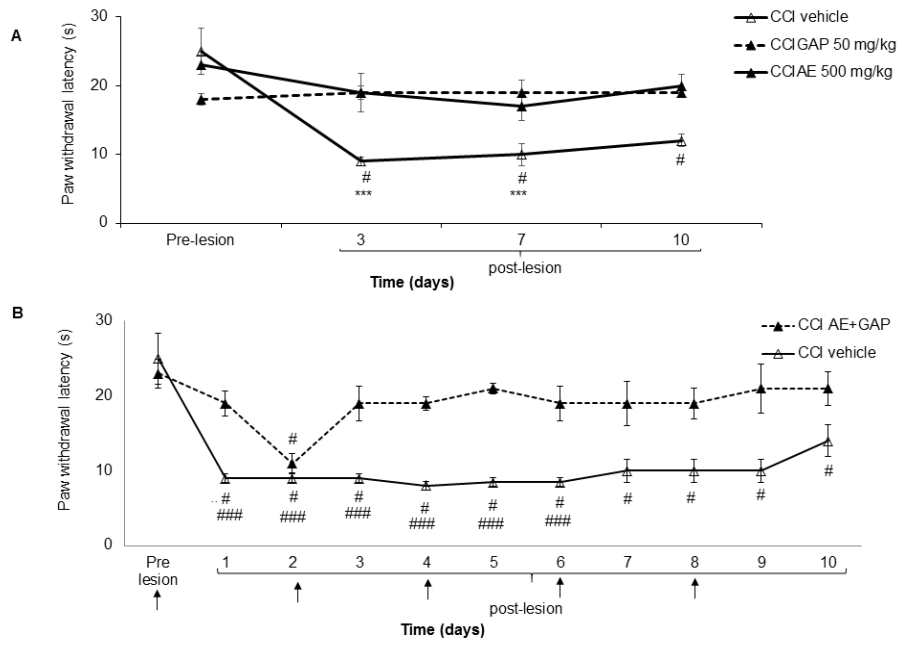


Figure 6



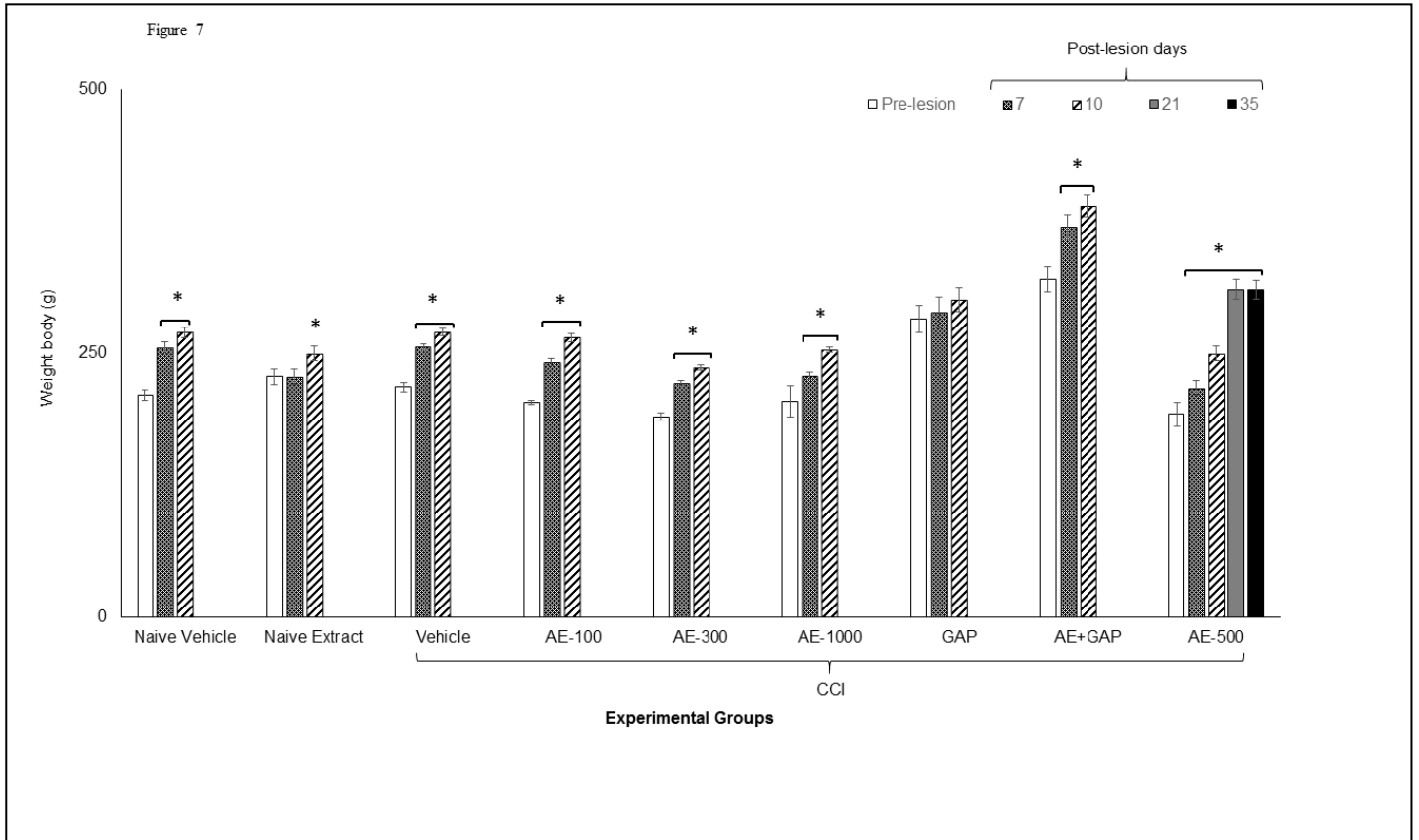


Table 1: Antioxidant properties and chemical compounds of the aqueous extract from *Luehea divaricata* leaves.

	Aqueous extract (AE)	Antioxidant Standard (BHT)
Scavenging activity against DPPH radical in IC₅₀	120.09 ± 0.12	37.40 ± 0.2
Total phenol content	63.20 ± 7.35	ND
ABTS	2.45 ± 0.02	ND
ORAC	3.20 ± 0.05	ND
Vitexina	+	ND
Total sugar	0.73 ± 0.009	ND
Glucose	0.24 ± 0.005	ND
Sucrose	0.37 ± 0.012	ND
Fructose	0.11 ± 0.001	ND
Triacylglycerides	0.08 ± 0.002	ND
Total proteins	0.11 ± 0.004	ND

Values are expressed as mean ± S.E. (+) present. N.D (not detected). The units are expressed as: DPPH (µg/mL); Total phenol content (mg EGA/g fraction); ABTS (mM Eq Trolox/mg extract); ORAC (mM Eq Trolox/mg extract); Total sugar, Glucose, Sucrose, Fructose, Triglycerides, Total cholesterol, Total proteins (mg/ml).

Table 2: Effect of the aqueous extract (AE) from *Luehea divaricata* leaves, in different doses, for 10 days (10d), and in dose of 500 mg/kg weight body for 35 days (35d), on blood parameters of hepatic and renal function in naive rats and rats with chronic constriction injury of sciatic nerve (CCI).

Experimental groups	AST (U/L)	ALT (U/L)	Direct bilirrubina (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
Naive vehicle-10d	181 ± 16	21 ± 1.1	0.6 ± 0.1	1.1 ± 0.1
Naive extract-10d	165 ± 39	22 ± 2.6	0.6 ± 0.1	1.2 ± 0.1
Sham vehicle-10d	164 ± 26	22 ± 3.3	0.5 ± 0.1	1.3 ± 0.2
Sham extract-10d	146 ± 27	22 ± 1.5	0.5 ± 0.3	1.3 ± 0.1
CCI-vehicle-10d	149 ± 17	26 ± 2.3	0.5 ± 0.1	1.0 ± 0.1
CCIAE-100 mg/kg-10d	160 ± 10	23 ± 2.7	0.7 ± 0.1	1.3 ± 0.1
CCIAE-300 mg/kg-10d	168 ± 14	26 ± 1.1	0.7 ± 0.1	1.0 ± 0.1
CCIAE-500 mg/kg-10d	143 ± 11	26 ± 2.4	0.5 ± 0.1	1.0 ± 0.1
CCIAE-1000 mg/kg-10d	176 ± 13	26 ± 1.2	0.6 ± 0.1	1.0 ± 0.1
CCIAE-500 mg/kg-35d	187 ± 24	20 ± 1.6	4.6 ± 0.2	1.1 ± 0.1

Data represent mean±S.E. n=6 rats/group. AST = aspartate aminotransferase, ALT = alanine aminotransferase, Sham = rats in which all surgical procedures involved in CCI were used except the ligature.

Table 3: Effect of the aqueous extract (AE) from *Luehea divaricata* leaves, in different doses, for 10 days (10d), and in dose of 500 mg/kg body weight for 35 days (35d), on superoxide dismutase (SOD), glutathione-S-transferase (GST), and catalase (CAT) activities and lipid hydroperoxide levels in liver of naive rats and rats with chronic constriction injury of sciatic nerve (CCI).

Experimental Groups	SOD (USOD/mg protein)	GST (pmol/min/mg tissue)	CAT (pmol/min/mg protein)	Lipid hydroperoxide (nmol/g tissue)
Naive vehicle-10d	2.7 ± 0.6	0.9 ± 0.1	4.1 ± 0.5	232 ± 26
Naive extract-10d	2.5 ± 0.6	0.9 ± 0.1	4.2 ± 0.7	216 ± 20
Sham vehicle-10d	2.3 ± 0.5	0.9 ± 0.1	4.1 ± 0.3	198 ± 12
Sham extract-10d	2.8 ± 0.6	1.0 ± 0.1	4.5 ± 0.3	190 ± 10
CCI-vehicle-10d	2.9 ± 0.5	1.1 ± 0.1	4.4 ± 0.6	174 ± 15
CCIAE-100 mg/kg-10d	2.5 ± 0.6	1.0 ± 0.2	4.5 ± 0.8	232 ± 19
CCIAE-300 mg/kg-10d	2.2 ± 0.3	1.0 ± 0.1	5.2 ± 0.7	187 ± 07
CCIAE-500 mg/kg-10d	2.9 ± 0.5	1.2 ± 0.1	4.6 ± 0.5	222 ± 18
CCIAE-1000 mg/kg-10d	2.2 ± 0.6	0.9 ± 0.1	4.3 ± 0.3	187 ± 07
CCIAE-500 mg/kg-35d	2.5 ± 0.3	1.0 ± 0.1	4.6 ± 0.2	204 ± 15

Data represent mean±S.E. n=6 rats/group. Sham = rats in which all surgical procedures involved in CCI were used except the ligature.

5.2 ARTIGO 2

Este manuscrito mostra os resultados do efeito da administração oral de: 1) EA de folhas de *L. divaricata*, dado em diferentes doses por 10 e 35 dias; e 2) gabapentina e gabapentina+EA, dado por 10 dias, sobre a recuperação funcional do nervo do nervo isquiático e parâmetros de estresse oxidativo, como valores de hidroperóxidos lipídicos e capacidade antioxidante total em nervo isquiático lesionado, e formação de ânion superóxido, valores de tióis totais, capacidade antioxidante total, e valores de peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos em medula espinal lombossacral, usando para o estudo ratos sem e com dor neuropática induzida por lesão por constrição crônica no nervo isquiático. Este manuscrito está em análise na revista *Journal of Ethnopharmacology*.

Journal of Ethnopharmacology

Aqueous leaf extract from *Luehea divaricata* Mart. modulates oxidative stress markers in the spinal cord of rats with neuropathic pain

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Paper
Keywords:	Chronic constriction injury; Lipid hydroperoxides; Total antioxidant capacity; Superoxide anion generation; Hydrogen peroxide; Total thiol content
Corresponding Author:	Wania Aparecida Partata Partata WA Porto Alegre, Rio Grande do Sul BRAZIL
First Author:	Adarly Kroth
Order of Authors:	Adarly Kroth Maria do Carmo Quevedo Santos Thaisla Cristiane Borella da Silva Elza Maria Santos Silveira Wania Aparecida Partata
Abstract:	<p>Ethnopharmacological relevance</p> <p>Reactive oxygen species (ROS) play an important role in neuropathic pain (i.e., pain caused by lesion or disease of the somatosensory system). We showed previously that the aqueous extract prepared from <i>Luehea divaricata</i> leaves, a plant explored by different native ethnic groups of Brazil to treat different pathologic conditions, exhibits good antioxidant activity and induces analgesia in rats with neuropathic pain. This effect was comparable to that of gabapentin, a drug recommended as first-line treatment for neuropathic pain. However, increasing evidence has indicated the need to accurately determine the oxidative stress level of an individual before prescribing supplemental antioxidants.</p> <p>Aim of the study</p> <p>This study assessed the effects of the oral administration of aqueous extract from leaves of <i>L. divaricata</i> on the sciatic functional index (SFI) and spinal-cord pro-oxidant and antioxidant markers of rats with neuropathic pain.</p> <p>Materials and Methods</p> <p>Placement of four loose chromic thread ligatures around the sciatic nerve produced chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve, a commonly employed animal model to study neuropathic pain. Aqueous extract from leaves of <i>L. divaricata</i> (100, 300, 500 and 1000 mg/kg), gabapentin (50 mg/kg) and aqueous extract (500 mg/kg) + gabapentin (30 mg/kg) were administrated per gavage daily for 10 or 35 days post-CCI. Antinociception was assessed using the von Frey test while SFI showed functional recovery post-nerve lesion throughout the experimental period. At days 10 and 35 post-surgery, the lumbosacral spinal cord and a segment of the injured sciatic nerve were dissected out and used to determine lipid hydroperoxide levels and total antioxidant capacity (TAC). The spinal cord was also used to determine superoxide anion generation (SAG), hydrogen peroxide (H_2O_2) levels and total thiol content.</p> <p>Results</p> <p>As expected, the extract, gabapentin and extract + gabapentin induced antinociception in CCI rats. While no significant functional recovery was found at 10 days post-CCI, a significant recovery was found in SFI of extract-treated CCI rats at 21 and 35 days post-CCI. A significant functional recovery was found already at day 10 post-CCI in</p>

gabapentin and gabapentin + extract-treated CCI rats. The extract treatment prevented increases in lipid hydroperoxides levels and TAC in injured sciatic nerve, which were found in this tissue of vehicle-treated rats at 10 days post-CCI. Extract also prevented an increase in SAG, H₂O₂ and lipid hydroperoxides levels in the spinal cord, which were elevated in this tissue of vehicle-treated rats at 10 and 35 days post-CCI. Extract also prevented a decrease in total thiol content and an increase in TAC in the spinal cord of CCI rats in these same time periods.

Conclusions

Aqueous extract from *L. divaricata* leaves was demonstrated, for the first time, to improve SFI and modulate oxidative stress markers in injured sciatic nerve and spinal cord of CCI rats. Since these effects occurred in parallel with antinociception, they may be related and should be considered in future studies on the mechanisms involved in the analgesic effect of this aqueous extract.



Porto Alegre, 08/05/2020

Editor-in-Chief
Journal of Ethnopharmacology

Dear Editor:

We are hereby submitting for your consideration the manuscript entitled “**Aqueous leaf extract from *Luehea divaricata* Mart. modulates oxidative stress markers in the spinal cord of rats with neuropathic pain**” by Adarly Kroth, Maria do Carmo Quevedo Santos, Thaisla Cristiane Borella da Silva, Elza Maria Santos Silveira, and Wania Aparecida Partata to be published in Journal of Ethnopharmacology. This manuscript is a sequel to the article by Kroth et al. (2020), also published in Journal of Ethnopharmacology (doi: 10.1016/j.jep.2020.112761).

I certify that none of the material in this manuscript has been published previously in any form, that none of this material is currently under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Sincerely Yours,



Dra. Wania A. Partata
Depto Fisiologia, ICBS, UFRGS
Rua Sarmento Leite, 500
90050-170 Porto Alegre, RS - Brasil

Checklist



JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY CHECKLIST

- Have you consulted the [author-pack](#) and verified that your submission adheres to the "Rules of 5"?
- Have you provided a list of all authors which clearly states the contribution of each co-author to the article?
- Is the corresponding author's postal address, telephone numbers and e-mail address provided in full?
- Have you included a list of all authors' email addresses?
- Do you declare that all the listed authors have read and approved the submitted manuscript?
- Do you declare that this manuscript/data, or parts thereof, has not been submitted for possible publication to another journal or that the work has previously been published elsewhere?
- Is the title precise, clear and specific (do not use uncommon acronyms)?
- Have you provided a clear and easily verifiable scientific reference to the traditional or clinical use of the herbal medicine under investigation (inserted directly next to the related traditional use)?
- Do you declare that the present study was performed according to international, national and institutional rules considering animal experiments, clinical studies and biodiversity rights?
- Does the activity studied clearly relate to the traditional use?
- Have you provided full botanical plant names (refer to www.thepantlist.org), including authorities of all plants? (This applies to all plant species mentioned in the manuscript)
- In case of organisms other than plants, are the full scientific names with authorities provided?
- Have you provided details of the voucher specimen number for each plant species studied, and the name of the recognized herbarium where they are stored?
- Have you provided a proper chemical profile (e.g. TLC, HPLC, GC, MS or NMR) for future reference, particularly where there no voucher specimens were retained?
- In case of mixtures, are all the ingredients listed by their full scientific names with authorities?
- In case of single compound study, have you provide a direct comparison of the activity of the plant extract and the pure compound?
- In case of industrial products, are full details of the batch number, contents, method of extraction and preparation of the final formulation, including quality control data provided?
- Surveys – have you provided absolute/primary quantitative data on the frequency of plant use as mentioned in the interviews? And is there a critical assessment of the traditional uses considering regional and global uses and known scientific information on the chemistry and biological effects?
- Antimicrobial activity – did you provide an in depth analysis of the antimicrobial activity including proper MIC values, and information on whether the activity is at a reasonable dose, and whether it is just inhibitory or microbicidal?
- Quality control – is your study on quality control clearly linked to the claimed activity of the herbal medicine?
- Is the abstract in the required structured format? (Ethnopharmacological relevance, Materials and methods, Results, Conclusion)
- Have you provided a graphical abstract according to the authors guidelines? (no explicit animal or organ photographs are allowed)
- Did you use the correct format for the references? (numerical referencing is not allowed)
- Have you provided a list of abbreviations?
- Have you provided a list of compounds studied?

For Reviews

- Are the conclusions critical and specific defining the current state of the art? YES NO
- Does the MS provide a comprehensive review of the current literature going beyond an overviews of articles indexed in common databases? YES No NA
- If pharmacological or clinical studies are reviewed, have you assessed the quality of the studies under review? YES NO NA
- For reviews of individual species: Have you included a detailed review of local and traditional uses based on primary sources? YES NO NA

Highlights

Luehea divaricata induce recovery in sciatic functional index in rats with CCI.

Luehea divaricata revert superoxide anion generation increased by CCI in spinal cord.

Luehea divaricata revert hydrogen peroxide levels increased by CCI in spinal cord.

Extract from leaves of *L. divaricata* affects oxidant biomarkers in spinal cord.

Abstract

Abstract

Ethnopharmacological relevance: Reactive oxygen species (ROS) play an important role in neuropathic pain (i.e., pain caused by lesion or disease of the somatosensory system). We showed previously that the aqueous extract prepared from *Luehea divaricata* leaves, a plant explored by different native ethnic groups of Brazil to treat different pathologic conditions, exhibits good antioxidant activity and induces analgesia in rats with neuropathic pain. This effect was comparable to that of gabapentin, a drug recommended as first-line treatment for neuropathic pain. However, increasing evidence has indicated the need to accurately determine the oxidative stress level of an individual before prescribing supplemental antioxidants.

Aim of the study: This study assessed the effects of the oral administration of aqueous extract from leaves of *L. divaricata* on the sciatic functional index (SFI) and spinal-cord pro-oxidant and antioxidant markers of rats with neuropathic pain.

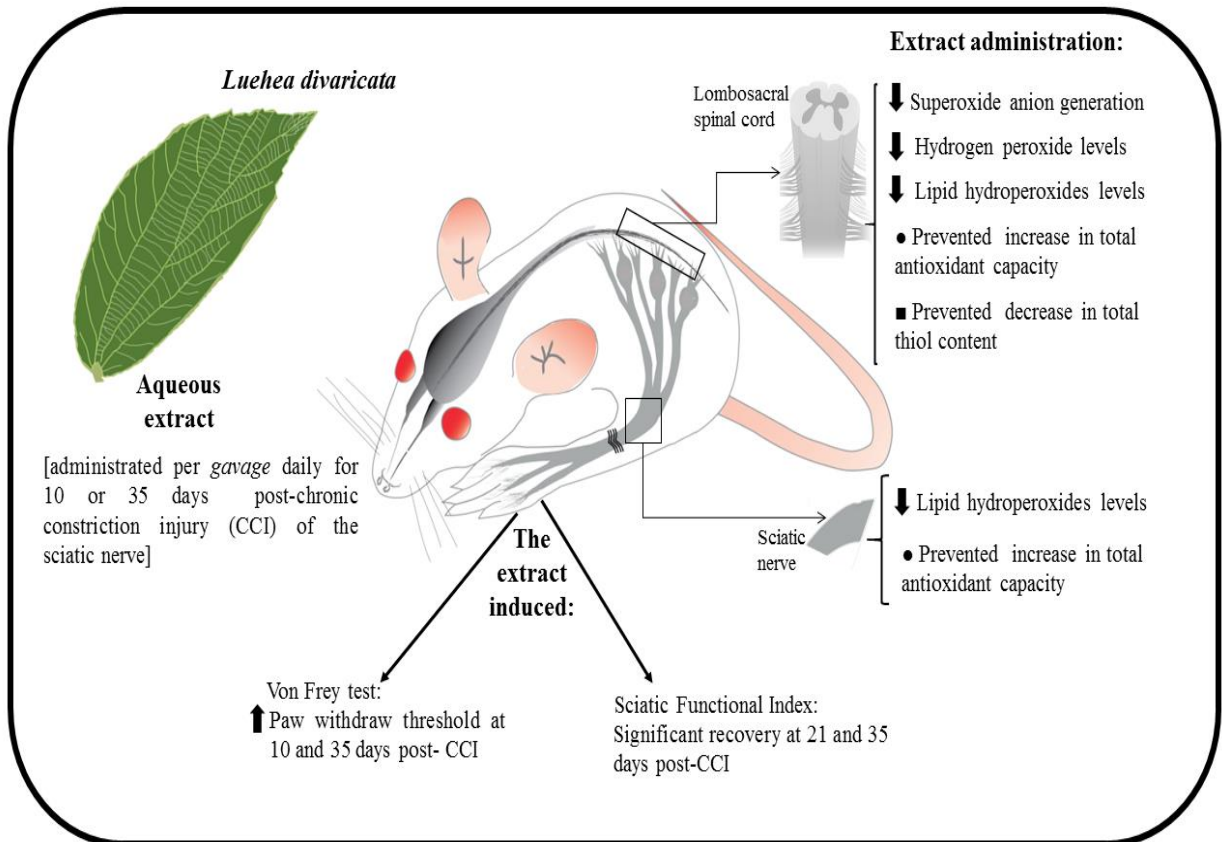
Materials and Methods: Placement of four loose chromic thread ligatures around the sciatic nerve produced chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve, a commonly employed animal model to study neuropathic pain. Aqueous extract from leaves of *L. divaricata* (100, 300, 500 and 1000 mg/kg), gabapentin (50 mg/kg) and aqueous extract (500 mg/kg) + gabapentin (30 mg/kg) were administrated per *gavage* daily for 10 or 35 days post-CCI. Antinociception was assessed using the von Frey test while SFI showed functional recovery post-nerve lesion throughout the experimental period. At days 10 and 35 post-surgery, the lumbosacral spinal cord and a segment of the injured sciatic nerve were dissected out and used to determine lipid hydroperoxide levels and total antioxidant capacity (TAC). The spinal cord was also used to determine

superoxide anion generation (SAG), hydrogen peroxide (H₂O₂) levels and total thiol content.

Results: As expected, the extract, gabapentin and extract + gabapentin induced antinociception in CCI rats. While no significant functional recovery was found at 10 days post-CCI, a significant recovery was found in SFI of extract-treated CCI rats at 21 and 35 days post-CCI. A significant functional recovery was found already at day 10 post-CCI in gabapentin and gabapentin + extract-treated CCI rats. The extract treatment prevented increases in lipid hydroperoxides levels and TAC in injured sciatic nerve, which were found in this tissue of vehicle-treated rats at 10 days post-CCI. Extract also prevented an increase in SAG, H₂O₂ and lipid hydroperoxides levels in the spinal cord, which were elevated in this tissue of vehicle-treated rats at 10 and 35 days post-CCI. Extract also prevented a decrease in total thiol content and an increase in TAC in the spinal cord of CCI rats in these same time periods.

Conclusions: Aqueous extract from *L. divaricata* leaves was demonstrated, for the first time, to improve SFI and modulate oxidative stress markers in injured sciatic nerve and spinal cord of CCI rats. Since these effects occurred in parallel with antinociception, they may be related and should be considered in future studies on the mechanisms involved in the analgesic effect of this aqueous extract.

Graphical abstract



Manuscript File

Aqueous leaf extract from *Luehea divaricata* Mart. modulates oxidative stress markers in the spinal cord of rats with neuropathic pain

Adarly Kroth^a, Maria do Carmo Quevedo Santos^b, Thaisla Cristiane Borella da Silva^b, Elza Maria Santos Silveira^b, Wania Aparecida Partata^{b*}

^aÁrea Ciências da Vida e Saúde. Universidade do Oeste de Santa Catarina. Rua Getúlio Vargas, 2125, Bairro Flor da Serra, CEP 89600-000, Joaçaba, SC, Brazil.

^bDepartamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500, Bairro Farroupilha, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil.

*Corresponding author:

Departamento de Fisiologia

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Sarmento Leite, Bairro Farroupilha, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

Tel: 55 51 3308 3305

Fax: 55 51 3308 3166

E-mail: wania.partata@ufrgs.br

Abstract

Ethnopharmacological relevance: Reactive oxygen species (ROS) play an important role in neuropathic pain (i.e., pain caused by lesion or disease of the somatosensory system). We showed previously that the aqueous extract prepared from *Luehea divaricata* leaves, a plant explored by native ethnic groups of Brazil to treat different pathologic conditions, exhibits good antioxidant activity and induces analgesia in rats with neuropathic pain. This effect was comparable to that of gabapentin, a drug recommended as first-line treatment for neuropathic pain. However, increasing evidence has indicated the need to accurately determine the oxidative stress level of an individual before prescribing supplemental antioxidants.

Aim of the study: This study assessed the effects of the oral administration of aqueous extract from leaves of *L. divaricata* on the sciatic functional index (SFI) and spinal-cord pro-oxidant and antioxidant markers of rats with neuropathic pain.

Materials and Methods: Placement of four loose chromic thread ligatures around the sciatic nerve produced chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve, a commonly employed animal model to study neuropathic pain. Aqueous extract from leaves of *L. divaricata* (100, 300, 500 and 1000 mg/kg), gabapentin (50 mg/kg) and aqueous extract (500 mg/kg) + gabapentin (30 mg/kg) were administered per *gavage* daily for 10 or 35 days post-CCI. Antinociception was assessed using the von Frey test while SFI showed functional recovery post-nerve lesion throughout the experimental period. At days 10 and 35 post-surgery, the lumbosacral spinal cord and a segment of the injured sciatic nerve were dissected out and used to determine lipid hydroperoxide levels and total antioxidant capacity (TAC). The spinal cord was also used to determine

superoxide anion generation (SAG), hydrogen peroxide (H₂O₂) levels and total thiol content.

Results: As expected, the extract, gabapentin and extract + gabapentin induced antinociception in CCI rats. While no significant functional recovery was found at 10 days post-CCI, a significant recovery was found in SFI of extract-treated CCI rats at 21 and 35 days post-CCI. A significant functional recovery was found already at day 10 post-CCI in gabapentin and gabapentin + extract-treated CCI rats. The extract treatment prevented increases in lipid hydroperoxides levels and TAC in injured sciatic nerve, which were found in this tissue of vehicle-treated rats at 10 days post-CCI. Extract also prevented an increase in SAG, H₂O₂ and lipid hydroperoxides levels in the spinal cord, which were elevated in this tissue of vehicle-treated rats at 10 and 35 days post-CCI. Extract also prevented a decrease in total thiol content and an increase in TAC in the spinal cord of CCI rats in these same time periods.

Conclusions: Aqueous extract from *L. divaricata* leaves was demonstrated, for the first time, to improve SFI and modulate oxidative stress markers in injured sciatic nerve and spinal cord of CCI rats. Since these effects occurred in parallel with antinociception, they may be related and should be considered in future studies on the mechanisms involved in the analgesic effect of this aqueous extract.

Keywords: Chronic constriction injury, Lipid hydroperoxides, Total antioxidant capacity, Superoxide anion generation, Hydrogen peroxide, Total thiol content

Abbreviations

A (absorbance of blue formazan); AE (Aqueous extract); ANOVA (analysis of variance); CCI (Chronic constriction injury); CEUA (Committee for Animal

Experimentation); DTNB (5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoic) acid); ϵ (extinction coefficient); EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid); eq (equivalent); H₂O₂ (hydrogen peroxide); HRPO (horseradish peroxidase); ITS (intermediate toe spread); KCl (potassium chloride); L (left paw); LITS (left intermediate toe spread); LPL (left print length); LTS (left toe spread); PL (print length); NaCl (sodium chloride); NaOH (sodium hydroxide); NBT (nitroblue tetrazolium); r (Pearson correlation coefficient); R (right paw); RITS (right intermediate toe spread); RPL (right print length); ROS (reactive oxygen species); RTS (right toe spread); SAG (superoxide anion generation); SE (standard error); SFI (sciatic functional index); SISBIO (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade); T (time period); TAC (total antioxidant capacity); TS (toe spread); V (volume of the solution); W_t (blotted wet weight).

1. Introduction

Neuropathic pain is defined as “pain caused by lesion or disease of the somatosensory system” (Basu and Basu, 2020; Udall et al., 2019; Colloca et al., 2017). It is a common symptom that results from conditions such as postherpetic neuralgia, trigeminal neuralgia, painful radiculopathy, diabetic neuropathy, HIV infection, leprosy, amputation, peripheral nerve injury pain and stroke (Udall et al., 2019; Colloca et al., 2017). Exactly how common neuropathic pain is can be difficult to quantify because of problems with how to define and assess it, but its prevalence in the general population is estimated to be between 7% and 10% (Zilliox, 2017). The lack of effective analgesics has impelled a continuing search to find novel molecules that have beneficial effects in the management of neuropathic pain (Scheid et al., 2018).

Emerging evidence suggests an important role of reactive oxygen species (ROS), such as superoxide radicals and hydrogen peroxide (H₂O₂), in mechanisms involved in pain,

including neuropathic pain (Zhou et al., 2018; Bittar et al., 2017; Sözbir and Naziroglu, 2016; Grace et al., 2016; Kim et al., 2015; Salvemini et al., 2011). In neuropathic pain, superoxide radicals appear to mediate long-term potentiation in excitatory neurons of the spinothalamic pathway (neurons that relaying nociceptive information from spinal cord to the brain) and long-term depression in inhibitory GABAergic interneurons of the spinal cord (Bittar et al., 2017). Hydrogen peroxide appears to enhance the frequency of action potentials in primary neurons involved in neuropathic pain (Sözbir and Naziroglu, 2016).

It is best known that the production of ROS is tightly regulated by antioxidant defense systems (Zhou et al., 2018). A moiety sensitive to redox reactions is thiol. This moiety is a redox sensor that interacts with a variety of oxidants to form in many cases a reversible covalent modification that includes disulfide bond formation, a major mechanism by which protein function can be controlled (Eaton, 2006). Studies have been demonstrated that glutathione, the most abundant thiol in mammals, is reduced in nerves and spinal cord (Riffel et al., 2018; Bhat et al., 2016; Naik et al., 2006), and treatments that blocked the increase in ROS and increased the expression of antioxidant enzymes reduced hyperalgesia in models of neuropathic pain (Khasabova et al., 2019; Zhou et al., 2018).

Luehea divaricata Mart. is a native tree of the Brazilian Cerrado belonging to the Malvaceae family which is traditionally known for its medicinal use (Bieski et al., 2012). This plant is popularly known as “açoita-cavalo”, “caiboti”, or “pau-de-canga” (Kroth et al., 2020; Tirloni et al., 2019; Bieski et al., 2012). *L. divaricata* is used by riverside populations of the Pantanal region to treat different conditions such as uric acid, column, blood cleanser, throat, flu, hemorrhoids, intestine, pneumonia, muscular relaxative, kidneys, cough, and tumors (Bieski et al., 2012). According to these authors,

leaves from *L. divaricata* are used as diuretic, stems as anti-inflammatory and bark and aerial parts for healing skin wounds, pimples, and vaginal washes. The preparation (administration) of *L. divaricata* is by decoction and syrup (Bieski et al., 2012).

Recent study showed that aqueous extract prepared from *L. divaricata* leaves showed good antioxidant activity (Kroth et al., 2020; Courtes et al., 2015). The oral administration of this extract also induced analgesia in a model of neuropathic pain, and the effect was comparable to that of gabapentin, a drug recommended as first-line treatment for neuropathic pain (Kroth et al., 2020). Thus, we postulated that the analgesic effect of the aqueous extract from *L. divaricata* leaves would involve modulation of oxidative stress markers in the spinal cord of rats with neuropathic pain. To offer insights into this question, the current study assessed the relationship between aqueous extract-induced antinociception and alterations in spinal-cord pro-oxidative and antioxidant markers of rats with neuropathic pain. The sciatic functional index (SFI) was also assessed because compounds with antioxidant activities are known to improve functional recovery of the sciatic nerve (Caillaud et al., 2018). We think that these findings will help broaden perspectives for the use of *L. divaricata* leaves as an option for the management of neuropathic pain because increasing evidence has indicated the need to accurately determine the oxidative stress levels of an individual before prescribing supplemental antioxidants (Poljsak et al., 2013).

2. Material and Methods

2.1. General

All reagents and chemicals used in experiments were analytical grade and purchased from Sigma. The electronic von Frey apparatus was purchased from Insight (Brazil). The apparatus used to assess SFI was manufactured by the authors themselves.

2.2. Plant material and extract preparation

Extract was prepared as described by Kroth et al. (2020). After authorization by Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO - 54348-1), leaves of *L. divaricata* were collected in the city of Joaçaba, Santa Catarina, Brazil (27.0938,6°S, 51.31328°W) and identified with accession number 382.136 at the Municipal Botanical Museum, Curitiba, Paraná, Brazil, where they were deposited. The collected leaves were weighed and dried (40° C) for seven days. Then, dried leaves were used to prepare the aqueous extract (1 liter of boiling water to each 100 g of dried leaves). The leaves were collected in December because previous studies used leaves collected in this month (Kroth et al., 2020; Courtes et al., 2015).

2.3. Experimental animals and treatments

Adult male Wistar rats (200–300 g) were housed in room with 12-hour light-and-dark cycles, temperature at 22±2°C, and free access to food and water. All experimental protocols were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA-UFRGS #31394).

Rats were divided into groups Naive (rats that did not undergo surgical manipulation), Sham (rats in which all surgical procedures involved in sciatic nerve injury were used except the ligature), and CCI (rats in which four ligatures were tied loosely around the right common sciatic nerve). Each group was further divided into four treatments, which received aqueous extract in doses of 100 (n=4 rats/subgroup), 300 (n=4 rats/subgroup), 500 (n=6 rats/subgroup) and 1000 mg/kg/day (n=4 rats/subgroup), gabapentin (50 mg/kg/day, n=6 rats/subgroup), aqueous extract (500 mg/kg/day) + gabapentin (30 mg/kg/day, n=6 rats/subgroup), or vehicle (n=6 rats/subgroup). The

solutions were administrated per *gavage* for 10 or 35 days. The aqueous extract was prepared in water and its administration started on the day of surgery (after recovery from anesthesia) and was performed daily at 5:00 pm by the same researcher, as previously described (Kroth et al., 2020). The timeline of the experiment is provided in Figure 1.

2.4. Induction of neuropathic pain

Neuropathic pain was induced by chronic constriction injury (CCI) of sciatic nerve, a model of neuropathic pain which simulates the symptoms of chronic nerve compression that correspond to causalgia or complex regional pain syndrome in human patients (Kumar et al., 2018).

CCI was performed based on the procedure described by Bennett and Xie (1988) with slight modifications (Kroth et al., 2020). After anesthesia (90 mg/kg ketamine and 10 mg/kg xylazine), rats had the right common sciatic nerve exposed and four ligatures (4.0 chromic catgut, Shalon Fios Cirúrgicos Ltda., Brazil) tied loosely around it, with a 1.0–1.5 mm interval between each ligature. Then, the muscle and the incision were sutured and a topical antibiotic applied. In sham rats, all surgical procedures involved in CCI were used except ligature.

2.5. Assessment of mechanical threshold

Since it was previously demonstrated that aqueous extract prepared from *L. divaricata* leaves induced analgesia in CCI rats (Kroth et al., 2020), the assessment of mechanical threshold was used to indicate the efficiency of the surgery and to demonstrate the antinociceptive effect of the extract on CCI rats. The threshold was measured using an electronic von Frey apparatus as previously described by Kroth et al. (2020). Testing

involved applying increasing pressure against the plantar surface of the injured hindpaw using the plastic tip of the electronic von Frey apparatus. Abrupt withdrawal of the paw indicated a positive response. In this moment, the pressure intensity was automatically recorded (in grams). A single trial consisted of five applications, one every 5–10 s, of the plastic tip with the mean of the five readings being taken as the threshold for a particular timing trial.

The mechanical threshold was measured in all rats at days 10 and 35 post-CCI. The test was conducted at the same time of day (7:00 am) and by the same researcher.

2.6. Assessment of the Sciatic Functional Index (SFI)

SFI was assessed as a proof of functional recovery post-nerve lesion (Horst et al., 2017a). Testing involved monitoring the recovery of right hind limb locomotor activity by analysis of free walking patterns, according to de Medinacelli et al. (1982) with some modifications (Silveira et al., 2019; Horst et al., 2017a; Riffel et al., 2016). Testing involved pressing the hindpaws on a black inkpad to dye them and then allowing the animal to walk across a sheet of paper in the illuminated open field leading to the dark box (for description of the apparatus, see Silveira et al., 2019). Rat footprints were used to determine distance from heel to the third toe (print length, PL), distance from the first to the fifth toe (toe spread, TS), and distance from the second to the fourth toe (intermediate toe spread, ITS). These measurements were obtained from the left (L) and right (R) paws. The SFI was calculated as follow:

$$\text{SFI} = -38.3 (\text{LPL} - \text{RPL}) / \text{RPL} + 109.5(\text{LTS} - \text{RTS}) / \text{RTS} + 13.3(\text{LITS} - \text{RITS}) / \text{RITS} - 8.8$$

where zero (± 11) represented normal function and about -100 represented the loss of function. All functional measurements were measured manually by two researchers, one

of which was blinded to experimental groups. Since the current study is the first to measure SFI for *L. divaricata* aqueous extract-treated CCI rats, the index was assessed in all groups prior to the surgical procedure (pre-lesion) and at 3, 7, 10, 21 and 35 days post-CCI. These tests were conducted at the same time of day (8:00 am) by the same researcher.

2.7. Sample preparation

Non-anesthetized rats were killed by decapitation. Lumbosacral spinal cord and a segment (± 7 mm) of the sciatic nerve located above the injury site were promptly collected. The spinal cord was divided transversely into three parts, two of which were cooled in liquid nitrogen and processed to determine superoxide anion generation (SAG) and H_2O_2 levels. The third part of the spinal-cord and the sciatic-nerve segment were homogenized in 1.15% KCl diluted 1:5 (w/v) containing 1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride and centrifuged at 1000g for 20 min at 4°C, the supernatant of which was used for assays of lipid hydroperoxides levels and total antioxidant capacity (TAC). The spinal cord supernatant was also used to assess total thiol content. The same portion of spinal cord always received the same preparation.

2.8. Pro-oxidant markers

2.8.1. Estimation of superoxide anion generation (SAG)

The levels of SAG were estimated using sections of fresh tissue from spinal cord. The sections reacted with nitroblue tetrazolium (NBT) to form formazan as an index of SAG, as described by Wang et al. (1998) with slight modifications (Silveira et al., 2019; Riffel et al., 2018). The absorbance of formazan was determined spectrophotometrically at 540 nm.

SAG was determined as follows: $SAG = A \times V / (T \times Wt \times \epsilon \times l)$, where A is the absorbance of blue formazan at 540 nm, V is the volume of the solution, T is the time period (90 min) during which the sections were incubated with NBT, Wt is the blotted wet weight of the spinal cord portion, ϵ is the extinction coefficient of blue formazan (i.e., 0.72 L/mmol/mm), and l is the length of the light path. Results are reported as reduced NBT mM/min/mg tissue.

2.8.2. Determination of H₂O₂

The H₂O₂ assay used sections of fresh spinal cord tissue which were incubated for 30 min at 37°C in 10 mM phosphate buffer (140 mM NaCl and 5 mM dextrose). The supernatants were transferred to tubes containing 0.28 mM phenol red and 8.5 U/mL horseradish peroxidase (HRPO). After incubation for 5 min, 1 M/L NaOH was added to each tube and the absorbance read at 610 nm as described by Pick and Keisari (1980) with slight modifications (Silveira et al., 2019; Riffel et al., 2018). The results are reported as $\mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{g tissue}$.

2.8.3. Determination of lipid hydroperoxides levels

Lipid hydroperoxides levels were measured as described by Jiang et al. (1991) with slight modifications (Silveira et al., 2019; Riffel et al., 2018; Horst et al., 2017b). Briefly, the method is based on oxidation of Fe²⁺ to Fe³⁺ in the presence of lipid hydroperoxides in an acid medium containing xylenol orange dye, which forms a complex with Fe³⁺. Absorbance was read at 560 nm. Results are reported as nM/g tissue.

2.9. Antioxidant markers

2.9.1. Determination of TAC

TAC was measured as described by Erel (2004) with slight modifications (Silveira et al., 2019; Riffel et al., 2018; Horst et al., 2017b). The assay determined TAC with 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation, which in an acid medium is decolorized by antioxidants, according to their concentration and antioxidant capacity. Absorbance was read at 660 nm. Results are reported in μM eq trolox/g tissue.

2.9.2. Determination of total thiol content

Total thiol content was determined as described by Aksenov and Markesbery (2001) with slight modifications (Silveira et al., 2019; Riffel et al., 2018). Briefly, a sample was mixed with phosphate/EDTA buffer, pH 7.5, and 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoic) acid (DTNB, 10 mM). Control samples, which did not include DTNB, were run simultaneously. Absorbance was read at 412 nm. Results are reported as mM/mg tissue.

2.10. Statistical analysis

Data were analyzed by two independent researchers, one of which was blind to treatment. All data are reported as means \pm SE. Data for SFI were analyzed by repeated-measures ANOVA. Data for mechanical threshold and oxidative markers were analyzed using two-way ANOVA (factors: lesion and treatment). All tests were followed by Tukey *post hoc* test. Pearson correlation coefficients showed correlations between the von Frey test and SAG and H₂O₂ levels at day 10. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$. Statistical analyses were carried out with SigmaPlot version 11.0 software (Systat Software Inc., Chicago, IL) for Windows.

3. Results

3.1. Mechanical threshold

Mechanical threshold differed significantly among groups ($F_{2,53}= 25.262$, $p<0.001$) and treatments ($F_{2,53}= 6.465$, $p<0.001$), with no significant interaction. *Tukey post hoc* test revealed that vehicle-treated CCI rats had lower mechanical threshold at day 10 and at day 35 than did naive and sham rats. The extract treatment improved the mechanical threshold of CCI rats. There was no significant difference in mechanical threshold between extract-treated CCI rats and naive and sham rats at days 10 and 35 post-surgery (Figure 2), for all extract doses. Despite improvement in mechanical threshold of extract-treated CCI rats, the increase was not significant compared to vehicle-treated CCI rats. Gabapentin and gabapentin + extract-treated CCI rats had a significantly higher mechanical threshold at 10 days post-CCI than did vehicle-treated CCI rats. No significant difference was found in mechanical threshold between naive and sham rats.

3.2. Sciatic Functional Index (SFI)

Repeated-measures ANOVA indicated an effect of CCI on SFI ($F_{2,53}= 367.052$, $p<0.001$). The index was near zero in naive and sham rats at all time-points, indicating normal sciatic nerve function. However, SFI was significantly lower at days 3, 7 and 10 for CCI rats than it was for naive and sham rats on those days and pre-nerve lesion values. At these time points, SFI was closer to -100 for all CCI rats, indicating loss of sciatic nerve function. Some functional recovery was observed in SFI of extract-treated CCI rats. Although not significant, SFI recovered by around 25%, 27.5% and 30% in extract-treated CCI rats at 3, 7 and 10 days, respectively, compared to vehicle-treated CCI rats (Figure 3A). This effect was found at all extract doses. A significant recovery

of SFI was found for extract-treated CCI rats at 21 and 35 days post-CCI (Figure 3B), which reached around 60% with values closest to zero. Gabapentin and gabapentin + extract also improved SFI of CCI rats and the effect was significant compared to values of vehicle-treated CCI rats (Figure 3C). Sample walking tracks for all experimental groups can be seen in Figure 4.

3.3. Oxidative markers in injured sciatic nerve

Lipid hydroperoxides levels differed significantly among groups ($F_{(2,53)}= 5.012$, $p=0.013$) and treatments ($F_{(2,53)}= 3.363$, $p=0.011$), with no significant interaction. Tukey *post hoc* test revealed significantly higher lipid hydroperoxides levels of the sciatic nerve at 10 days for vehicle-treated CCI rats compared to naive and sham rats. Extract administration prevented an increase in lipid hydroperoxides in the sciatic nerve of CCI rats since the levels of lipid hydroperoxides in these rats did not differ significantly from those found for the sciatic nerve of naive and sham rats. This preventive effect was found for all extract doses tested (Figure 5A). Gabapentin and gabapentin + extract also prevented an increase in lipid hydroperoxides levels in the sciatic nerve of CCI rats since hydroperoxides levels of these rats did not differ significantly from those of naive and sham rats. No significant difference was found for lipid hydroperoxides levels at day 35 in injured sciatic nerve of extract and vehicle-treated CCI rats compared to naive and sham rats.

TAC differed significantly among groups ($F_{(2,53)}= 25.563$, $p<0.001$) but not treatments ($F_{(2,53)}= 1.165$, $p=0.350$), with no significant interaction. Tukey *post hoc* test revealed significantly higher TAC at 10 days for sciatic nerve of vehicle-treated CCI rats compared to naive and sham rats (Figure 5B). At this time point no significant difference was found between sciatic nerve TAC of extract, gabapentin and gabapentin

+ extract-treated CCI rats and that of naive and sham rats. Despite this effect, no significant difference was found for sciatic nerve TAC of extract, gabapentin and gabapentin + extract-treated CCI rats and vehicle-treated CCI rats. Similar responses were found for all extract doses. No significant difference was found between extract- and vehicle-treated CCI rats for sciatic nerve TAC at day 35. However, sciatic nerve TAC was 15% higher for vehicle-treated CCI rats than for extract-treated CCI rats. No significant changes were found in sciatic nerve oxidative markers of naive and sham rats.

3.4. Oxidative markers in lumbosacral spinal cord

SAG differed significantly among groups ($F_{(2,53)}=9.568$, $p<0.001$) and treatments ($F_{(2,53)}=6.984$, $p<0.001$), with no significant interaction. Tukey *post hoc* test revealed a significant increase in SAG in spinal cord of vehicle-treated CCI rats at 10 days compared to naive and sham rats and extract, gabapentin and gabapentin + extract-treated CCI rats. The treatment with extract in all doses, gabapentin and gabapentin + extract prevented an increase in SAG in spinal cord of CCI rats (Figure 6A). At day 35 post-surgery, SAG was significantly increased in the spinal cord of vehicle-treated CCI rats compared to extract-treated CCI rats. In this last group, the levels of SAG remained similar to that found in the spinal cord of naive and sham rats.

At day 10 post-surgery, there was no significant correlation between SAG and mechanical threshold. However, while there was a negative Pearson correlation coefficient for vehicle and extract (100 mg/kg)-treated CCI rats, the coefficient was positive for other doses of the extract [vehicle-treated CCI rats: $r= -0.555$, $P= 0.445$; aqueous extract-treated CCI rats in dose of 100 ($r= -0.130$, $P= 0.870$), 300 ($r= 0.222$, $P= 0.778$), 500 ($r= 0.584$, $P= 0.416$), and 1000 mg/kg ($r= 0.318$, $P= 0.682$)].

H₂O₂ levels differed significantly among groups ($F_{(2,53)}=364.435$, $p<0.001$) and treatments ($F_{(2,53)}=36.183$, $p<0.001$), with a significant interaction ($F_{(2,53)}=129.651$, $p<0.001$). Tukey *post hoc* test revealed a significant increase in H₂O₂ levels in the spinal cord of vehicle-treated CCI rats at 10 days compared to naive and sham rats and extract-treated CCI rats. Extract administration prevented an increase in H₂O₂ levels in the spinal cord of CCI rats (Figure 6B). While H₂O₂ levels remained significantly increased in the spinal cord of vehicle-treated CCI rats for 35 days compared to extract-treated CCI rats, this last group exhibited H₂O₂ levels similar to that found in the spinal cord of naive and sham rats.

At day 10 post-surgery, there was no significant correlation between H₂O₂ levels and mechanical threshold. However, there was a negative Pearson correlation coefficient for vehicle-treated CCI rats, but a positive coefficient for extract-treated CCI rats (vehicle-treated CCI rats: $r = -0.607$, $P = 0.393$; aqueous extract (500 mg/kg)-treated CCI rats: $r = 0.741$, $P = 0.259$).

Lipid hydroperoxides levels differed significantly among groups ($F_{(2,53)}=7.234$, $p=0.003$) and treatments ($F_{(2,53)}=3.775$, $p=0.009$), with no significant interaction. Tukey *post hoc* test revealed a significant increase in lipid hydroperoxides levels in the spinal cord of vehicle-treated CCI rats for 10 days compared to naive and sham rats and extract, gabapentin and gabapentin + extract-treated CCI rats. The treatment with extract in all doses, gabapentin and gabapentin + extract prevented an increase in lipid hydroperoxides levels at day 10. At this time point there was no significant change in lipid hydroperoxides levels in the spinal cord of extract and/or gabapentin-treated CCI rats (Figure 6C). At day 35 post-surgery, no significant change was found in lipid hydroperoxides levels in the spinal cord of vehicle- and extract-treated CCI rats.

No significant changes were found in the spinal-cord oxidative markers of naive and sham rats.

3.5. Antioxidant markers in spinal cord

TAC differed significantly among groups ($F_{(2,53)}=4.345$, $p=0.021$) and treatments ($F_{(2,53)}=6.291$, $p<0.001$), with no significant interaction. Tukey *post hoc* test revealed a significant increase in TAC in the spinal cord of vehicle-treated CCI rats at 10 days compared to naive and sham rats and extract, gabapentin and gabapentin + extract-treated CCI rats. No significant changes were found in TAC of the spinal cord of extract, gabapentin and gabapentin + extract-treated CCI rats. In these rats, TAC was similar to that found in naive and sham rats (Figure 7A). While TAC remained significantly increased in the spinal cord of vehicle-treated CCI rats, the increase was not found in the spinal cord of extract-treated CCI rats at 35 days.

Total thiol content differed significantly among groups ($F_{(2,53)}=18.168$, $p<0.001$) and treatments ($F_{(2,53)}=8.660$, $p<0.001$), with no significant interaction. Tukey *post hoc* test revealed a significant decrease in total thiol content in the spinal cord of vehicle-treated CCI rats at 10 days compared to naive and sham rats. The decrease was not found in the spinal cord of extract, gabapentin and gabapentin + extract-treated CCI rats (Figure 7B). The preventive effect was observed with all extract doses. No significant changes were found in total thiol content in the spinal cord of vehicle and extract-treated CCI rats at day 35 post-CCI.

No significant changes were found in spinal-cord antioxidant markers of naive and sham rats.

4. Discussion

Peripheral nerve injury, such as CCI, is an experimental model usually used to induce neuropathic pain (Kumar et al., 2018). This model is frequently used to screen potential therapeutic agents against neuropathic pain in rodents (El Gabbas et al., 2019). The present study used the CCI model to show, for first time, the relationship between mechanical threshold, SFI and spinal-cord oxidative markers in aqueous *L. divaricata* leaf extract-treated CCI rats.

In accordance with previous studies (Riffel et al., 2020; Riffel et al., 2018; Scheid et al., 2018; Horst et al., 2017a; b), CCI induced a decrease in mechanical threshold. The extract treatment prevented this decrease, indicating antinociceptive effect. In addition, the antinociceptive effect was similar for both extract-treated CCI rats and gabapentin-treated CCI rats. Similar results were found in a previous study using oral administration of aqueous extract from *L. divaricata* leaves to CCI rats (Kroth et al., 2020). Thus, the present results for mechanical threshold not only demonstrate the efficiency of the surgery to induce CCI, but also reinforce the antinociceptive effect of the extract.

The effect of the administration of aqueous *L. divaricata* leaf extract to CCI rats on the functional recovery of the sciatic nerve was assessed here through SFI. The decrease found for SFI of vehicle-treated CCI rats is in line with previous studies (Horst et al., 2017a; Ozbek et al., 2017; Riffel et al., 2016). Thus, it can be suggested that the CCI rats of the present study exhibited functional loss commonly found after this surgery. The administration of aqueous extract improved SFI, but the effect was significant only after 21 and 35 days of treatment. This result suggests that a longer time of extract treatment is necessary to induce a significant ameliorative effect on SFI of CCI rats.

The impairment of SFI appears to be related to loss of myelinated fibers, which disturbs gait stability in CCI rats (Komirishetty et al., 2017). The recovery of SFI suggests a

protective effect of aqueous *L. divaricata* leaf extract against neurodegeneration of nerve fibers. Although our study did not aim to evaluate this question, a previous study found the same aqueous extract to be neuroprotective in a Huntington's disease experimental model (Courtes et al., 2015). Thus, it can be suggested that the improvements in SFI values observed in the present study are related to extract-induced neuroprotection. Compounds with neuroprotective effect have been previously found to produce significant improvements in SFI after peripheral nerve injury (El Gabbas et al., 2019; Horasanli et al., 2017). In addition, rats with better nerve recovery have been found to have fewer and less toe contractures (Siemionow et al., 2002).

Improved SFI was found for the same CCI rats that exhibited an increased mechanical threshold. However, von Frey testing measures cutaneous hyperalgesia or allodynia and, thus, is most useful for mimicking clinical conditions with enhanced cutaneous sensitivity such as neuropathic pain (Gregory et al., 2013). CCI-induced foot deformities are most likely attributable to spontaneous ongoing pain rather than to mechanical allodynia (Nakazato-Imasato and Kurebayashi, 2009). Thus, it can be suggested that aqueous extract from *L. divaricata* leaves decreases ongoing-pain behavior and allodynia in CCI rats. However, our study did not assess behaviors such as spontaneous burrowing and nocturnal wheel running, which can measure ongoing-pain-like behaviors in rat models of chronic pain (Griffiths et al., 2018). Since ongoing-pain-like behaviors occurred in parallel with maximal mechanical/cold hypersensitivity in a rat model of paclitaxel-induced peripheral neuropathy (Griffiths et al., 2018), we cannot exclude the possibility that aqueous extract obtained from *L. divaricata* leaves improves ongoing-pain and allodynia in CCI rats.

Interestingly, the improvement in SFI was similar between extract-treated CCI rats and gabapentin-treated CCI rats, independent of the extract dose. The recovery of SFI in

gabapentin-treated CCI rats is in line with previous research (Ozbek et al., 2017). This similar functional recovery suggests that the extract is as effective as gabapentin in improving SFI of CCI rats. Since co-administration of low dose of gabapentin and extract induced similar SFI recovery for CCI rats, the combination appears to be valid for reducing gabapentin dose without any change in functional recovery of the sciatic nerve. As previously suggested (Kroth et al., 2020), reducing gabapentin dose appears interesting due to adverse effects of this drug.

The present study also focused on ROS because CCI-induced oxidative/nitrosative stress plays a crucial role in the pathogenesis of neuropathy, and the functional, behavioral and biochemical deficits are due to oxidant-induced damage, neuroinflammation and bioenergetic failure (Komirishetty et al., 2017). In accordance with previous studies (De Logu et al., 2019; Riffel et al., 2018; Horst et al., 2017b; Trevisan et al., 2016), SAG and H₂O₂ levels increased in the spinal cord of vehicle-treated CCI rats; however, the administration of aqueous extract prevented this change. This preventive effect may be due to the presence of compounds with antioxidant activities in the aqueous extract. Our previous study showed high contents of phenolic compounds and good antioxidant activity in extract obtained from *L. divaricata* leaves (Kroth et al., 2020). According to Kroth et al. (2020), the chromatographic profile of the extract revealed the presence of vitexin. This molecule has antioxidant activity (He et al., 2016) and its superoxide radicals and H₂O₂ scavenging activity is dose-dependent (Ugusman et al., 2012; Kim et al., 2005). These activities might be related to a preventive effect of the extract on SAG and H₂O₂ in the spinal cord of extract-treated CCI rats. Since a preventive effect of the extract on SAG and H₂O₂ was found at 10 and 35 days post-CCI, it may be that this preventive effect starts early and lasts as long as treatment remains. Further research is needed to clarify this question.

Since aqueous extract decreased SAG and H₂O₂ levels in the spinal cord of the same CCI rats that exhibited improvement in mechanical threshold and SFI, a relationship between these results cannot be discarded. It has been demonstrated that superoxide anion appears to mediate long-term potentiation in excitatory spinothalamic tract neurons (neurons that relaying nociceptive information from spinal cord to the brain) and long-term depression in inhibitory GABAergic interneurons of the spinal cord (Bittar et al., 2017). H₂O₂ appears to enhance the frequency of action potentials in primary neurons involved in neuropathic pain (Sözbir and Naziroglu, 2016). Thus, it may be that increased SAG and H₂O₂ in the spinal cord are related to decreased mechanical threshold and SFI values in vehicle-treated CCI rats. As extract prevented an increase in SAG and H₂O₂, this effect may be related to improvement in the mechanical threshold and SFI of extract-treated CCI rats and to the positive Pearson correlation coefficient found for extract-treated CCI rats. However, it is impossible to address direct or indirect relationships among SAG, H₂O₂, mechanical threshold and SFI without further studies.

The presence of antioxidant compounds may also be related to a lack of increase in lipid hydroperoxides levels in injured sciatic nerve and spinal cord of CCI rats. The administration of compounds with antioxidant activity was found to prevent an increase in lipid peroxidation in the central nervous system of mice with neuropathic pain (Birmann et al., 2019). In addition, occlusion-induced elevated levels of lipid peroxidation in the middle cerebral artery were found to be reduced by vitexin (Jiang et al., 2018). Increased lipid peroxidation in injured sciatic nerve and spinal cord of vehicle-treated CCI rats is in line with previous studies (Riffel et al., 2018; Horst et al., 2017b; Naik et al., 2006).

The extract treatment also prevented a decrease in total thiol content in the spinal cord of CCI rats, which was found in this tissue of vehicle-treated CCI rats. The decrease in total thiol content in this last group is in line with previous studies (Riffel et al., 2018; Bhat et al., 2016). It is possible that this decrease is related to increased ROS formation, especially H₂O₂. Thiol oxidation occurs by a two-electron mechanism, most commonly involving H₂O₂ (Winterbourn, 2015). Since extract from *L. divaricata* leaves prevented an increase in H₂O₂ levels, this may be contributing to the maintenance of total thiol content in the spinal cord of extract-treated CCI rats.

Interestingly, while total thiol content decreased, TAC increased in the spinal cord of vehicle-treated CCI rats. This result may be related to changes in other components of antioxidant systems because TAC is the embodiment of overall antioxidant level (Zhang et al., 2019). Studies have demonstrated that sciatic nerve decreases glutathione and increases superoxide dismutase activity without significant changes in catalase activity (Naik et al., 2006), while spinal cord decreases glutathione and activities of glutathione peroxidase and glutathione transferase, superoxide dismutase activity increases without significant change in catalase activity after CCI (Scheid et al., 2018).

The lack of an increase in TAC in injured sciatic nerve and spinal cord of extract-treated CCI rats indicates that aqueous extract from *L. divaricata* leaves does not disrupt the well-integrated antioxidant defense networks of these tissues. Despite the need for further studies to better address this question, our results are important because they are the first to raise this problem and to show that extract treatment appears not to disrupt antioxidant defense networks in spite of the elevated antioxidant activity exhibited by this extract. Thus, the aqueous extract from *L. divaricata* leaves increasingly shows itself as a good option to treat neuropathic pain.

5. Conclusion

The present study reinforced the antinociceptive effect of aqueous extract prepared from *Luehea divaricata* leaves and, for first time, showed that this extract improves SFI in CCI rats. In parallel, the extract treatment modulated oxidative stress markers in injured sciatic nerve and spinal cord of these rats. Furthermore, the extract treatment did not induce changes in TAC in injured sciatic nerve and spinal cord, suggesting no disruption to the well-integrated antioxidant defense networks of these tissues. Thus, the present findings propose that, in the CCI-induced neuropathic pain model, the antinociceptive effect of the aqueous extract from *L. divaricata* leaves involves in its actions the modulation of oxidative stress markers in injured sciatic nerve and spinal cord, and that these effects need be considered in further studies on mechanisms involved in the analgesic effect of the aqueous extract.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest

Author contributions

A.K. and W.A.P. were responsible for the study concept and design and they prepared and wrote the manuscript; A.K., M.C.Q.S, T.C.B.S., E.M.S.S. conducted most of experiments under the supervision of W.A.P.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Reference

- Aksenov, M.Y., Markesbery, W.R. 2001. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 302: 141-145.
- Basu, P., Basu, A. 2020. *In vitro* and *in vivo* effects of flavonoids on peripheral neuropathic pain. *Molecules* 25: pii: E1171.
- Bennett, G.J., Xie, Y.K. 1988. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33: 87–107.
- Bhat, R.A., Lingaraju, M.C., Pathak, N.N., Kalra, J., Kumar, D., Tandan, S.K. 2016. Effect of ursolic acid in attenuating chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. *Fundam Clin Pharmacol* 6: 517–528.
- Bieski, I.G.C., Rios Santos, F., de Oliveira, R.M., Espinosa, M.M., Macedo, M., Albuquerque, U.P., de Oliveira Martins, D.T., 2012. Ethnopharmacology of medicinal plants of the pantanal region (Mato Grosso, Brazil). *Evid. Based. Complement. Altern. Med.* 1-36.
- Birmann, P.T., Sousa, F. S.S., Domingues, M., Brüning, C. A., Viera, B. M., Lenardão, E., Savegnago, L. 2019. 3-(4-chlorophenylselanyl)-1-methyl-1H-índole promotes recovery of neuropathic pain and depressive-like behavior induced by partial constriction of the sciatic nerve in mice. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 54: 126-133.
- Bittar, A., Jun, J., La, J.H., Wang, J., Leem, J.W., Chung, J.M. 2017. Reactive oxygen species affect spinal cell type-specific synaptic plasticity in a model of neuropathic pain. *Pain* 158: 2137-2137.
- Caillaud, M., Chantemarque, B., Richard, L., Vignaud, L., Favreau, F., Faye, P.-A., Vignoles, P., Sturtz, F., Trouillas, P., Vallat, J.-M., Desmoulière, A., Billet, F. 2018. Local low dose curcumin treatment improves functional recovery and remyelination

- in a rat model of sciatic nerve crush through inhibition of oxidative stress. *Neuropharmacology* doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.07.001.
- Colloca, L., Ludman, T., Bouhassira, D., Baron, R., Dickenson, A.H., Yarnitsky, D., Greeman, R., Truini, A., Attal, N., Finnerup, N.B., Eccleston, C., Kalso, E., Bennett, D.L., Dworkin, R.H., Raja, S.N., 2017. Neuropathic pain. *Nat.Rev.Dis.Primer*3:17002.
- Courtes, A.A., Arantes, L.P., Barcelos, R.P., da Silva, I.K., Boligon, A.A., Athayde, M.L., Puntel, R.L., Soares, F.A.A., 2015. Protective effects of aqueous extract of *Luehea divaricata* against behavioral and oxidative changes induced by 3-nitropropionic acid in rats. *Evid.Based Complement.Altern. Med.* 2015: 723431.
- De Logu, F., Puma, S.L., Landini, L., Portelli, F., Innocenti, A., Araujo, D.S.M., Janal, M.N., Patacchini, R., Bunnett, N.W., Geppetti, P., Nassini, R., 2019. Schwann cells expressing nociceptive channel TRPA1 orchestrate ethanol-evoked neuropathic pain in mice. *J Clin Invest* 129: 5424-5441.
- De Medinaceli, L., Freed, W.J., Wyatt, R.J., 1982. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp. Neurol.* 77, 634-643.
- Eaton, P. 2006. Protein thiol oxidation in health and disease: Techniques for measuring disulfides and related modifications in complex protein mixtures. *Free Radic Res* 40:1889-1899.
- El Gabbas, Z., Bezza, K., Laadraoui, J., Laaradia, M.A., Kebbou, A., Oufguir, S., Boukhira, A., Aboufatima, R., Chait, A. 2019. *Salvia officinalis*, rosmatinic and caffeic acids attenuate neuropathic pain and improve function recovery after sciatic nerve chronic constriction in mice. *Evid Based Complement Alternat Med* 2019: 1702378.

- Erel O. 2004. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 37: 277-285.
- Grace, P.M., Gaudet, A.D., Staikopoulos, V., Maier, S.F., Hutchinson, M.R., Salvemini, D., Watkins, L.R. 2016. Nitroxidative signaling mechanisms in pathological pain. *Trends Neurosci* 39: 862–879.
- Gregory, N.S., Harris, A.L., Robinson, C.R., Dougherty, P.M., Fuchs, P.N., Sluka, K.A., 2013. An overview of animal models of pain: disease models and outcome measures. *J. Pain* 14:1255-1269.
- Griffiths, L.A., Duggett, N.A., Pitcher, A.L., Flatters, S.J.L. 2018. Evoked and ongoing pain-like behaviours in a rat model of paclitaxel-induced peripheral neuropathy. *Pain res Manag* 2018:8217613.
- He, M., Min, J.W., Kong, W.L., He, X.H., Li, J.X., Peng, B.W. 2016. A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin. *Fitoterapia* 115:74-85.
- Horasanli, B., Hasturk, A.E., Arikan, M., Togral, G., Helyacioglu, F., Dagdeviren, A., Mut, S., Harman, F., Argun, G. 2017. Comparative evaluation of the electrophysiological, functional and ultrastructural effects of alpha lipoic acid and cyanocobalamin administration in a rat model of sciatic nerve injury. *J Back Musculoskelet Rehabil* 30: 967-974.
- Horst, A., de Souza, J.A., Santos, M.C.Q., Riffel, A.P., Kolberg, C., Ribeiro, M.F., de Fraga, L.S., Partata, W.A. 2017a.. N-acetylcysteine downregulates phosphorylated p-38 expression but does not reverse the increased superoxide anion levels in the spinal cord of rats with neuropathic pain. *Braz J Med Biol Res* 50: e5801.

- Horst, A., de Souza, J.A., Santos, M.C.Q., Riffel, A.P.K., Kolberg, C., Partata, W.A. 2017b. Effects of N-acetylcysteine on spinal cord oxidative stress biomarkers in rats with neuropathic pain. *Braz J Med Biol Res* 50: e6533.
- Jiang, J., Dai, J., Cui, H. 2018. Vitexin reverses the autophagy dysfunction to attenuate MCAO- induced cerebral ischemic stroke via mTOR/ULK1 pathway. *Biomed Pharmacother.* 99: 583-590.
- Jiang, Z. Y., Woollard, A. C. S., Wolff, S. P., 1991. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe⁺² in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* 26: 853-856.
- Khasabova, I.A., Khasabov, S.G., Olson, J.K., Uhelski, M.L., Kim, A.H., Albino-Ramírez, A.M., Wagner, C., Seybold, V.S., Simone, D.A. 2019. Pioglitazone, a PPAR γ agonist, reduces cisplatin-evoked neuropathic pain by protecting against oxidative stress. *Pain* 160: 688-701.
- Kim, H.Y., Lee, I., Chun, S.W., Kim, H.K. 2015. Reactive oxygen species donors increase the responsiveness of dorsal horn neurons and induce mechanical hyperalgesia in rats. *Neural Plast* 2015.
- Kim, J.H., Lee, B.C., Kim, J.H., Sim, G.S., Lee, D.H., Lee, K.E., Yun, Y.P., Pyo, H. B. 2005. The isolation and antioxidative effects of vitexin from *Acer palmatum*. *Arch Pharm Res.* 28:195-202.
- Komirishetty, P., Areti, A., Gogoi, R., Sistla, R., Kumar, A. 2017. Combination strategy of PARP inhibitor with antioxidant prevent bioenergetic deficits and inflammatory changes in CCI- induced neuropathy. *J. Neuropharmacology* 113: 137-147.
- Kroth, A., Santos, M.C.Q., da Silva, T.C.B., Silveira, E.M.S., Trapp, M., Bezerra, R.M.N., Simabuco, F., Niero, R., Partata, W.A. 2020. Aqueous extract from *Luehea*

- divaricata* Mart. Leaves reduces nociception in rats with neuropathic pain. J. Ethnopharmacol 11:112761.
- Kumar, A., Kaur, H., Singh, A., 2018. Neuropathic pain models caused by damage to central or peripheral nervous system. Pharmacol.Rep. 70: 206-216.
- Naik, A.K., Tandan, S.K., Dudhgaonka, S.P., Jadhav, S.H., Kataria, M., Prakash, V.R., Kumar D. 2006. Role of oxidative stress in pathophysiology of peripheral neuropathy and modulation by N-acetyl-l-cysteine in rats. Eur J Pain 10: 573–579.
- Nakazato-Imasato, E., Kurebayashi, Y. 2009. Pharmacological characteristics of the hind paw weight bearing difference induced by chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. Life Sci 84, 622-626.
- Ozbek, Z., Aydin, H.E., Kocman, A.E., Ozkara, E., Sahin, E., Bektur, E., Vural, M., Kose, A., Arslantas, A., Baycy, C. 2017. Neuroprotective effect of genistein in peripheral nerve injury. Turk Neurosurg 27: 816-822.
- Pick, E., Keisari, Y. 1980. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. J Immunol Methods 38: 161-170.
- Poljsak, B., Suput, D., Milisav, I. 2013. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when use the synthetic antioxidants. Oxid Med Cell Longev 2013: 1-11.
- Riffel, A.P.K., de Souza, J.A., Santos, M.C.Q., Kroth, A., Silveira, E.M.S., Scheid, T., Dexheimer, G.M., Horst, A., Kolberg, C., Ribeiro, M.F.M., de Fraga, L.S., Partata, W.A. 2020. Co-administration of ascorbic acid and α -tocopherol modifies ascorbic acid and attenuates p38, Akt, and TNF- α expression in spinal cord of rats with neuropathic pain. Nutrire 2020, 45:9.
- Riffel, A.P., Santos, M. C. Q., de Souza, J.A., Scheid, T., Horst, A., Kolberg, C., Belló-Klein, A., Partata, W.A., 2018. Treatment with ascorbic acid and α -tocopherol

- modulates oxidative-stress markers in the spinal cord of rats with neuropathic pain. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 51: e7097.
- Riffel, A.P., de Souza, J.A., Santos, M. C. Q., Horst, A., Scheid, T., Kolberg, C., Belló-Klein, A., Partata, W.A., 2016. Systemic administration of vitamins C and E attenuates nociception induced by chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. *Brain Res. Bull.* 121: 169–77.
- Salvemini, D., Little, J.W., Doyle, T., Neumann, W.L. 2011. Roles of reactive oxygen and nitrogen species in pain. *Free Radic Biol Med* 51: 951–966.
- Scheid, T., Bosco, L.D., Guedes, R.P., Pavanato, M.A., Belló-Klein, A., Partata, W.A., 2018. Sciatic nerve transection modulates oxidative parameters in spinal and supraspinal regions. *Neurochem. Res.* 38: 935-942.
- Siemionow, M., Tetik, C., Ozer, K., Ayhan, S., Siemionow, K., Browne, E. 2002. Epineural sleeve neurorrhaphy: Surgical technique and functional results. A preliminary report. *Ann Plast Surg.* 48:281–285.
- Silveira, E.M.S., Kroth, A., Santos, M.C.Q., Silva, T.C.B., Silveira, D., Riffel, A.P.K., Scheid, T., Trapp, M., Partata, W.A. 2019. Age-related changes and effects of regular low-intensity exercise on gait, and balance, and oxidative biomarkers in the spinal cord of Wistar rats. *Braz J Med Biol Res* 52:e8429.
- Sözbir, E., Naziroglu, M. 2016. Diabetes enhances oxidative stress-induced TRPM2 channel activity and its control by N-acetylcysteine in rat dorsal root ganglion and brain. *Metab Brain Dis* 31: 385-393.
- Tirloni, C.A.S., Palozzi, R.A, Schaedler, M.I., Guarnier, L.P., Silva, A.O., Marques, M.A., Gasparotto, F.M., Lourenço, E.L.B., de Souza, M., Gasparotto Junior., A., 2019. Influence of *Luehea divaricata* Mart. extracts on peripheral vascular resistance and the role of nitric oxide and both Ca⁺²-sensitive and Kir6.1 ATP-

sensitive K⁺ channels in the vasodilatory effects of isovitexin on isolated perfused mesenteric beds. *Phytomedicine* 56:74-82.

Trevisan, G., Benemei, S., Materazzi, S., De Logu, F., De Siena, G., Fusi, C., Rossato, M.F., Coppi, E., Marone, L.M., Ferreira, J., Geppetti, P., Nassini, R. 2016. TRPA1 mediates trigeminal neuropathic pain in mice downstream of monocytes/macrophages and oxidative stress. *Brain* 139: 1361-1377.

Udall, M., Kudel, I., Cappellero, J.C., Sadosky, A., King-Concialdi, K., Parsons, B., Hlavacek, P., Hopps, M., Salomon, P.A., DiBonaventura, M.D., Clark, P., Garcia, J.B.S., 2019. Epidemiology of physician-diagnosed neuropathic pain in Brazil. *J. Pain Res.* 12: 243-253.

Ugusman, A., Zakaria, Z., Hui, C.K., Nordin, N.A.M.M., Mahdy, Z. A.2012. Flavonoids of Piper Sargentosum and its cytoprotective effects against oxidative stress. *EXCLI Journal*. 11: 705-714.

Zhang, G., Liu, N., Zhu, C., Ma, L., Yang, J., Du, J., Zhang, W., Sun, T., Niu, J., Yu, J. 2019. Antinociceptive effect of isoorientin against neuropathic pain induced by the chronic constriction injury of the sciatic nerve in mice. *Int Immunopharmacol* 75: 105753.

Zhou, Y.Q., Liu, D.Q., Chen, S.P., Sun, J., Zhou, X.R., Rittner, H., Mei, W., Tian, Y.K., Zhang, H.X., Chen, F., Ye, D.W. 2018. Reactive oxygen species scavengers ameliorate mechanical allodynia in a rat model of cancer-induced bone pain. *Redox Biol* 14: 391-397.

Zilliox LA. 2017. Neuropathic pain. *Continuum* 23: 512-532.

Wang, H.D., Pagano, P.J., Du, Y., Cayatte, A.J., Quinn, M.T., Brecher, P., Cohen, R.A. 1998. Superoxide anion from the adventitia of the rat thoracic aorta inactivates nitric oxide. *Circ Res* 82:810-818.

Winterbourn, C.C. 2015. Are free radicals involved in thiol-based redox signaling? *Free Radic Biol Med* 80: 164-170.

Figure Legends

Figure 1. Timeline with days of treatment, behavior tests and death of rats. MT, mechanical threshold; SFI, sciatic functional index; CCI, chronic constriction injury of sciatic nerve; AE, aqueous extract.

Figure 2. Assessment of mechanical threshold in rats with chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve that received daily per *gavage* aqueous extract (AE) obtained from *Luehea divaricata* leaves or vehicle (water) for 10 (A) or 35 days (B) after CCI. Also shown are the mechanical thresholds for CCI rats treated with gabapentin (50 mg/kg, n=6) or gabapentin (30 mg/kg) + extract (500 mg/kg, n=6) for 10 days post-CCI (C). The aqueous extract was administrated in doses of 100 (n=4), 300 (n=4), 500 (n=6) and 1000 mg/kg (n=4), while gabapentin (n=6) and gabapentin+AE (n=6) were administrated in doses of 50 mg/kg (n=6) and 30 mg/kg+500 mg/kg, respectively. Data are reported as means±SE. *P<0.05 compared to naive and sham rats. ***P<0.05 compared to gabapentin and gabapentin+extract-treated CCI rats (two-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* test). All surgical procedures involved in CCI were used in sham rats except for ligature.

Figure 3. Functional recovery assessed by the Sciatic Functional Index (SFI) in rats with chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve that received daily per *gavage* aqueous extract (AE) obtained from *Luehea divaricata* leaves or vehicle (water) for 10 (A) or 35 days (B) after CCI. Also shown are the SFIs for CCI rats treated with gabapentin (50 mg/kg, n=6) or gabapentin (30 mg/kg) + extract (500 mg/kg, n=6) for 10 days post-surgery (C). The aqueous extract was administrated in doses of 100 (n=4),

300 (n=4), 500 (n=6) and 1000 mg/kg (n=4), while gabapentin (n=6) and gabapentin+AE (n=6) were administrated in doses of 50 mg/kg (n=6) and 30 mg/kg+500 mg/kg, respectively. SFI was assessed at 3, 7, 10, 21 and 35 days post-CCI. Data are reported as means±SE. *P<0.05 compared to naive and sham rats. **P<0.05 compared to pre-nerve lesion of the same experimental group. ##P<0.05 compared to CCI rats treated with extract for 21 and 35 days post-CCI. ***P<0.05 compared to gabapentin and gabapentin+extract-treated CCI rats (two-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* test). All surgical procedures involved in CCI were used in sham rats except for ligature.

Figure 4. Sample walking tracks for rats with chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve that received daily per *gavage* aqueous extract (AE) obtained from *Luehea divaricata* leaves or vehicle (water) for 10 (A) or 35 days (B) post-CCI. Also shown are sample walking tracks for rats with CCI that received daily per *gavage* gabapentin (GAP, 50 mg/kg, n=6) or gabapentin (30 mg/kg) + extract (500 mg/kg, n=6) for 10 days post-CCI (C). All surgical procedures involved in CCI were used in sham rats except for ligature.

Figure 5. Lipid hydroperoxides levels (A) and total antioxidant capacity (TAC) (B) in injured sciatic nerve of rats with chronic constriction injury (CCI) that received daily per *gavage* aqueous extract (AE) obtained from *Luehea divaricata* leaves or vehicle (water) for 10 or 35 days post-CCI. These measures are also shown for injured sciatic nerve of CCI rats treated with gabapentin (50 mg/kg, n=6) or gabapentin (30 mg/kg) + extract (500 mg/kg, n=6) for 10 days post-CCI. The aqueous extract was administrated in doses of 100 (n=4), 300 (n=4), 500 (n=6) and 1000 mg/kg (n=4). Data are reported as

means \pm SE. *P<0.05 compared to naive and sham rats. #P<0.05 compared to CCI rats treated with extract and/or gabapentin-treated for 10 days post-CCI (two-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* test). All surgical procedures involved in CCI were used in sham rats except for ligature.

Figure 6. Superoxide anion generation (SAG) (A), hydrogen peroxide (H₂O₂) (B) and lipid hydroperoxides (C) levels in the spinal cord of rats with chronic constriction injury (CCI) that received daily per *gavage* aqueous extract (AE) obtained from *Luehea divaricata* leaves or vehicle (water) for 10 or 35 days post-CCI. These measures are also shown for the spinal cord of CCI rats treated with gabapentin (50 mg/kg, n=6) or gabapentin (30 mg/kg) + extract (500 mg/kg, n=6) for 10 days post-CCI. The aqueous extract was administrated in doses of 100 (n=4), 300 (n=4), 500 (n=6) and 1000 mg/kg (n=4). Data are reported as means \pm SE. *P<0.05 compared to naive and sham rats. #P<0.05 compared to CCI rats treated with extract and/or gabapentin for 10 days post-CCI (two-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* test). All surgical procedures involved in CCI were used in sham rats except for ligature.

Figure 7. Total antioxidant capacity (TAC) (A) and total thiol content (B) in the spinal cord of rats with chronic constriction injury (CCI) that received daily per *gavage* aqueous extract (AE) obtained from *Luehea divaricata* leaves or vehicle (water) for 10 or 35 days post-CCI. These measures are also shown for spinal cord of CCI rats treated with gabapentin (50 mg/kg, n=6) or gabapentin (30 mg/kg) + extract (500 mg/kg, n=6) for 10 days post-CCI. The aqueous extract was administrated in doses of 100 (n=4), 300 (n=4), 500 (n=6) and 1000 mg/kg (n=4). Data are reported as means \pm SE. *P<0.05 compared to naive and sham rats. #P<0.05 compared to CCI rats treated with extract

and/or gabapentin for 10 days post-CCI (two-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* test). All surgical procedures involved in CCI were used in sham rats except for ligature.

Figure 1

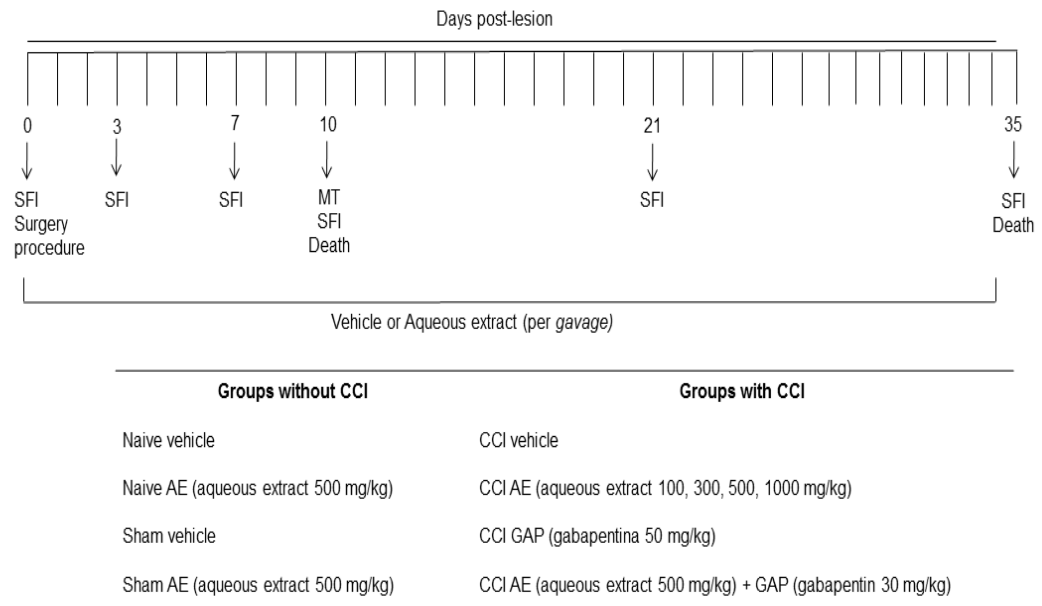


Figure 2

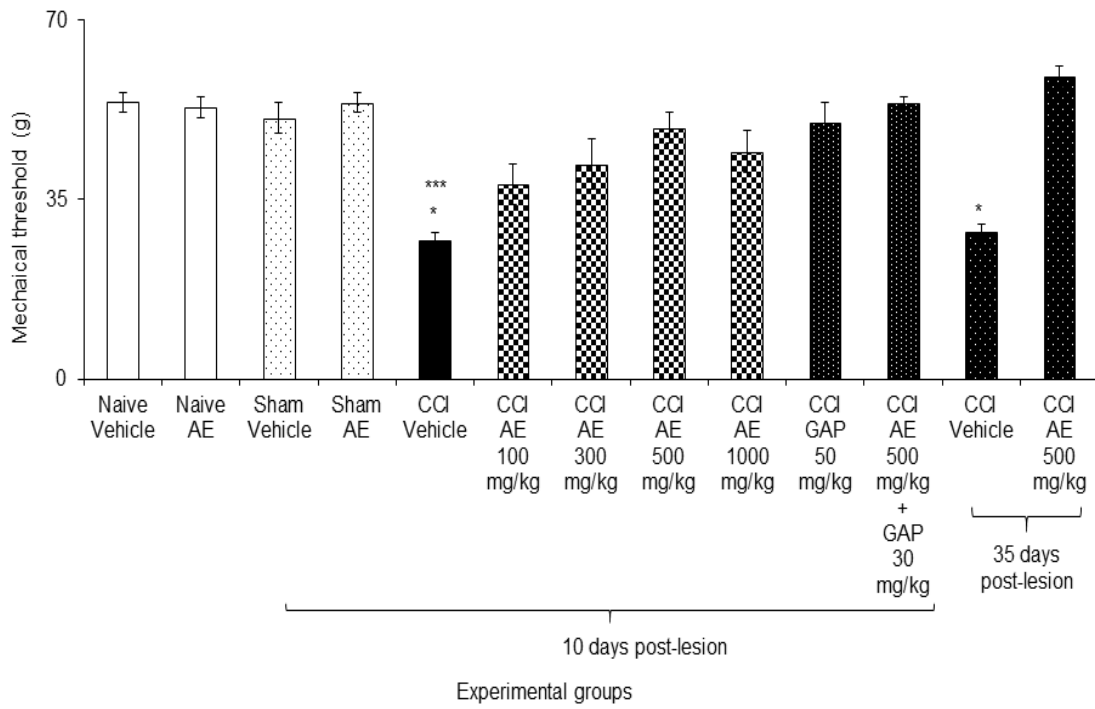
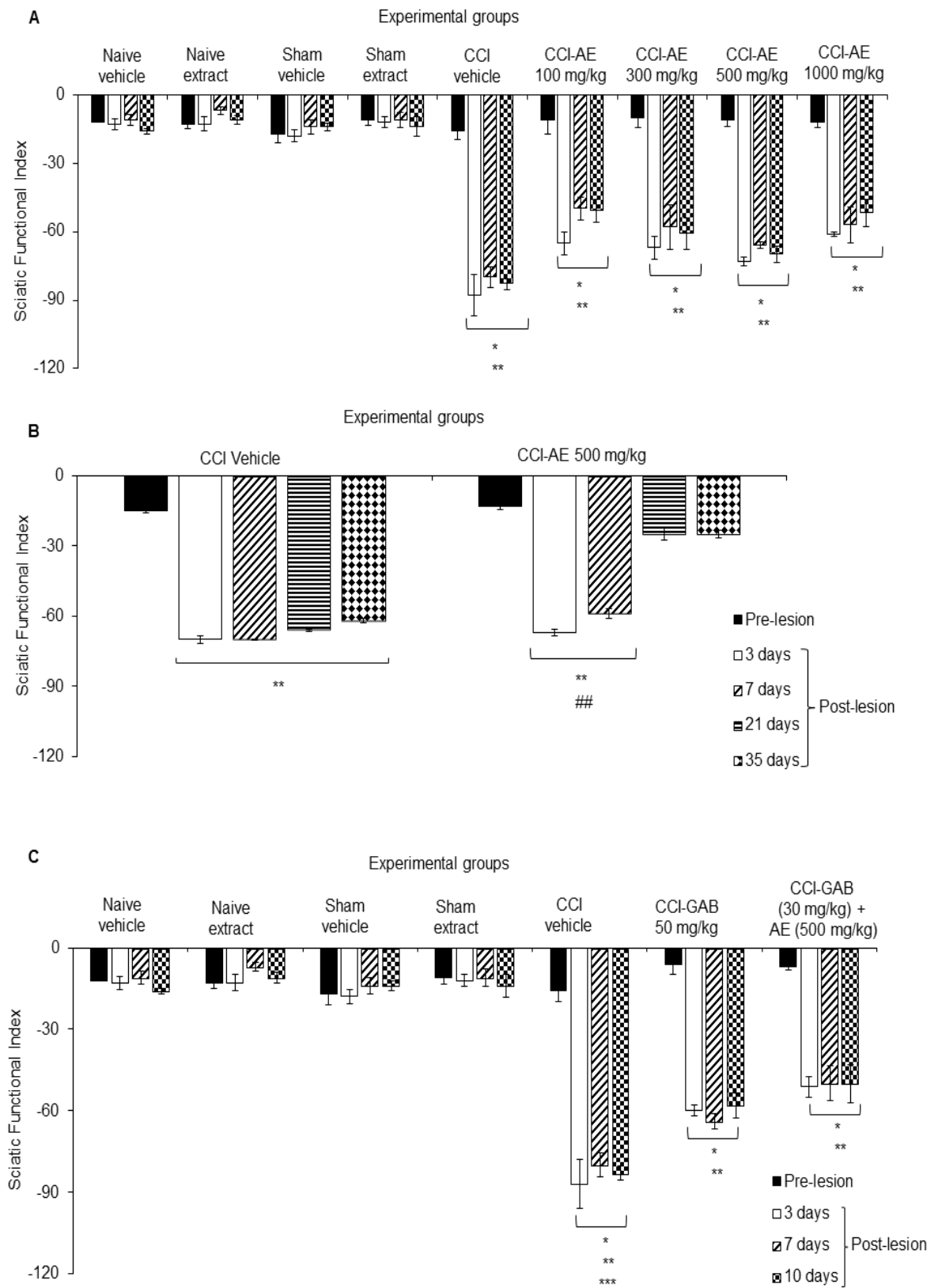


Figure 3



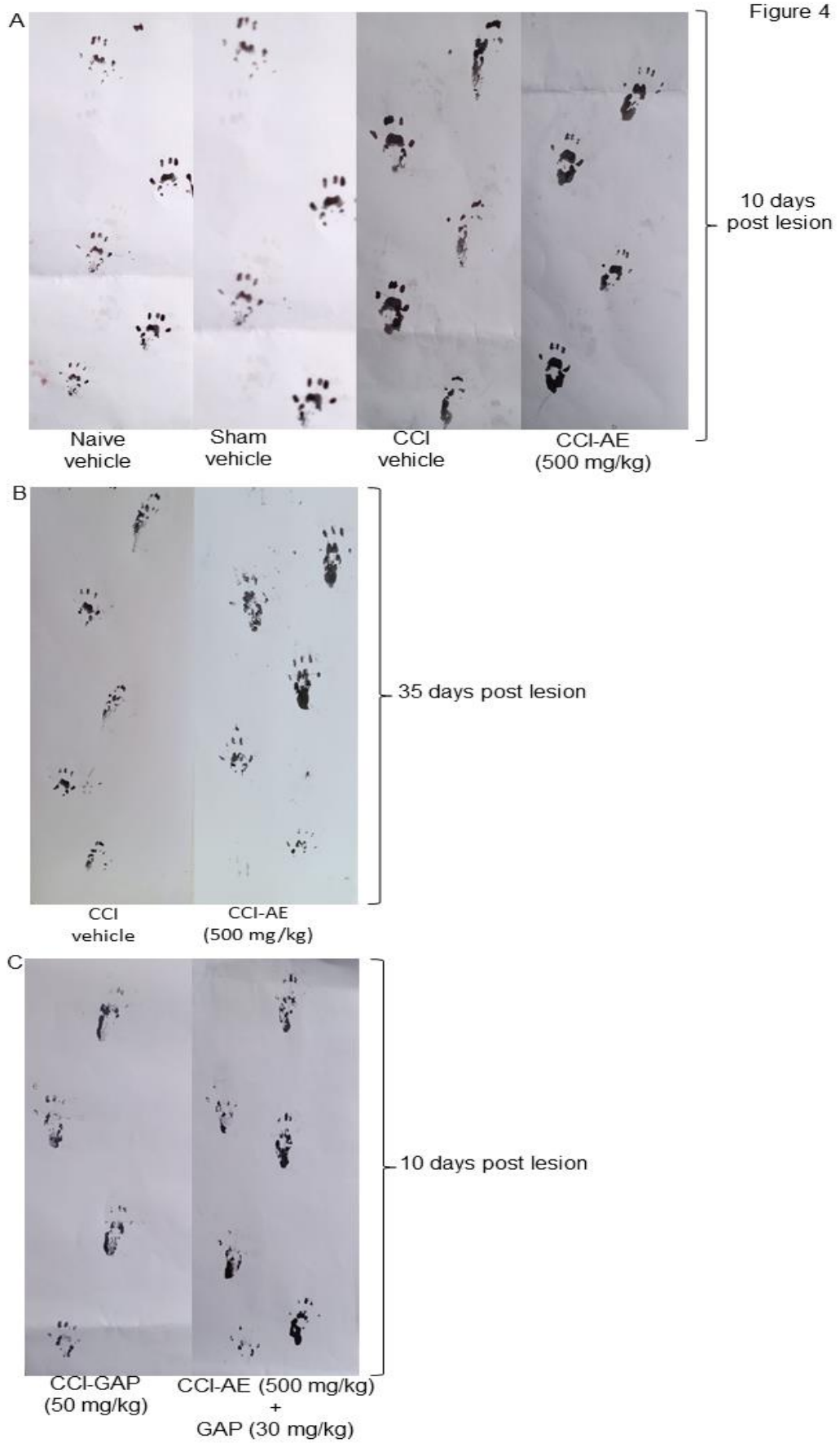


Figure 5

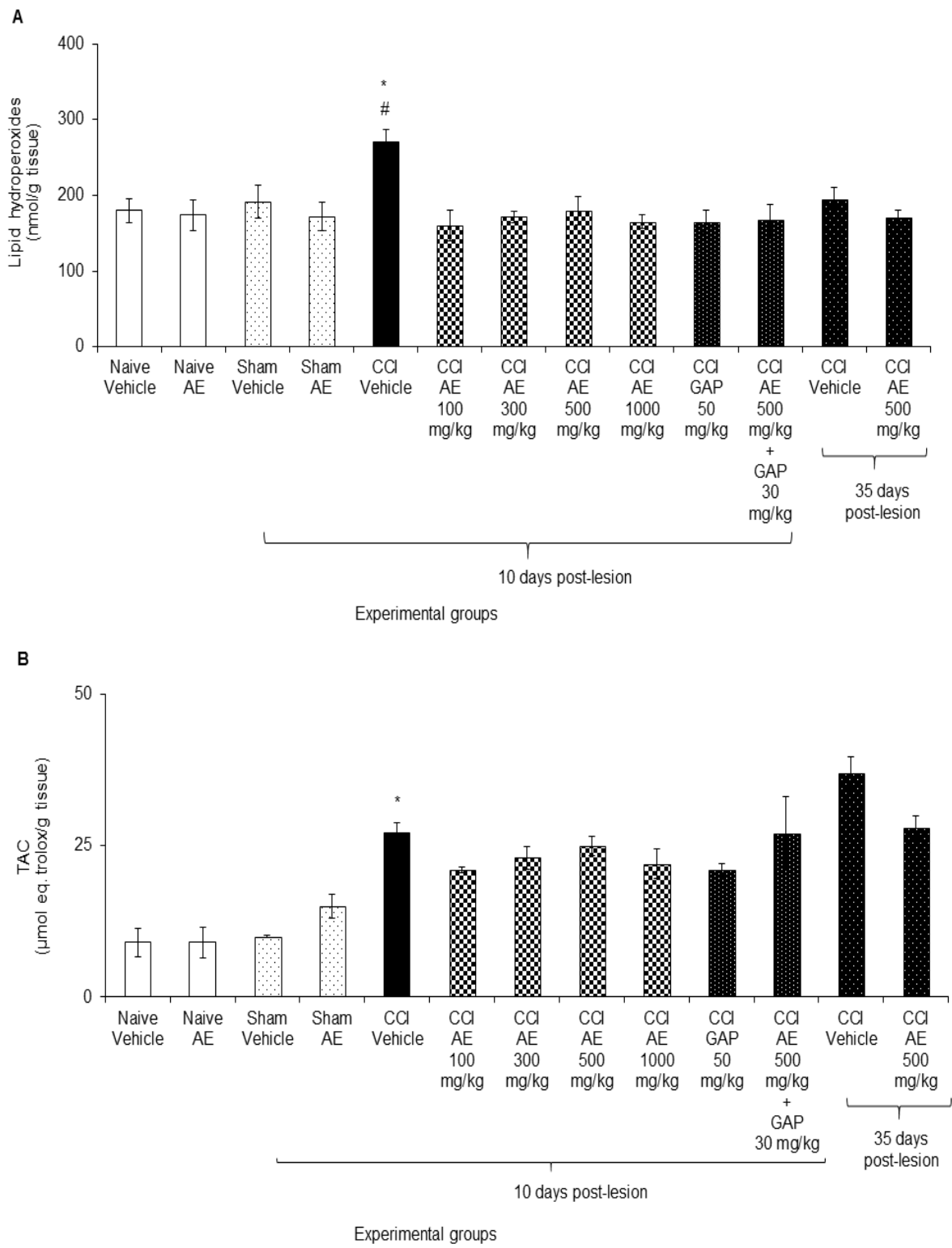


Figure 6

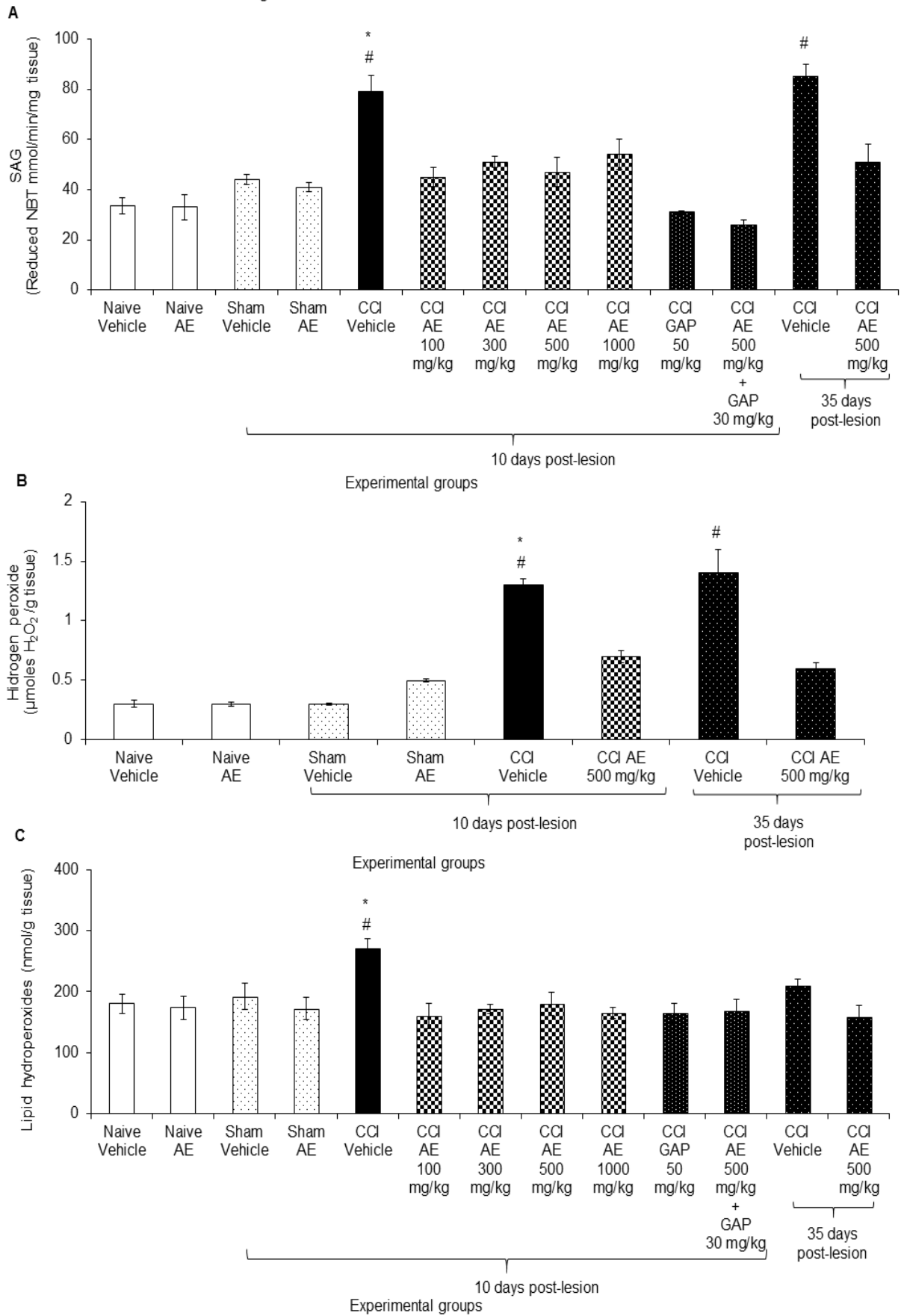
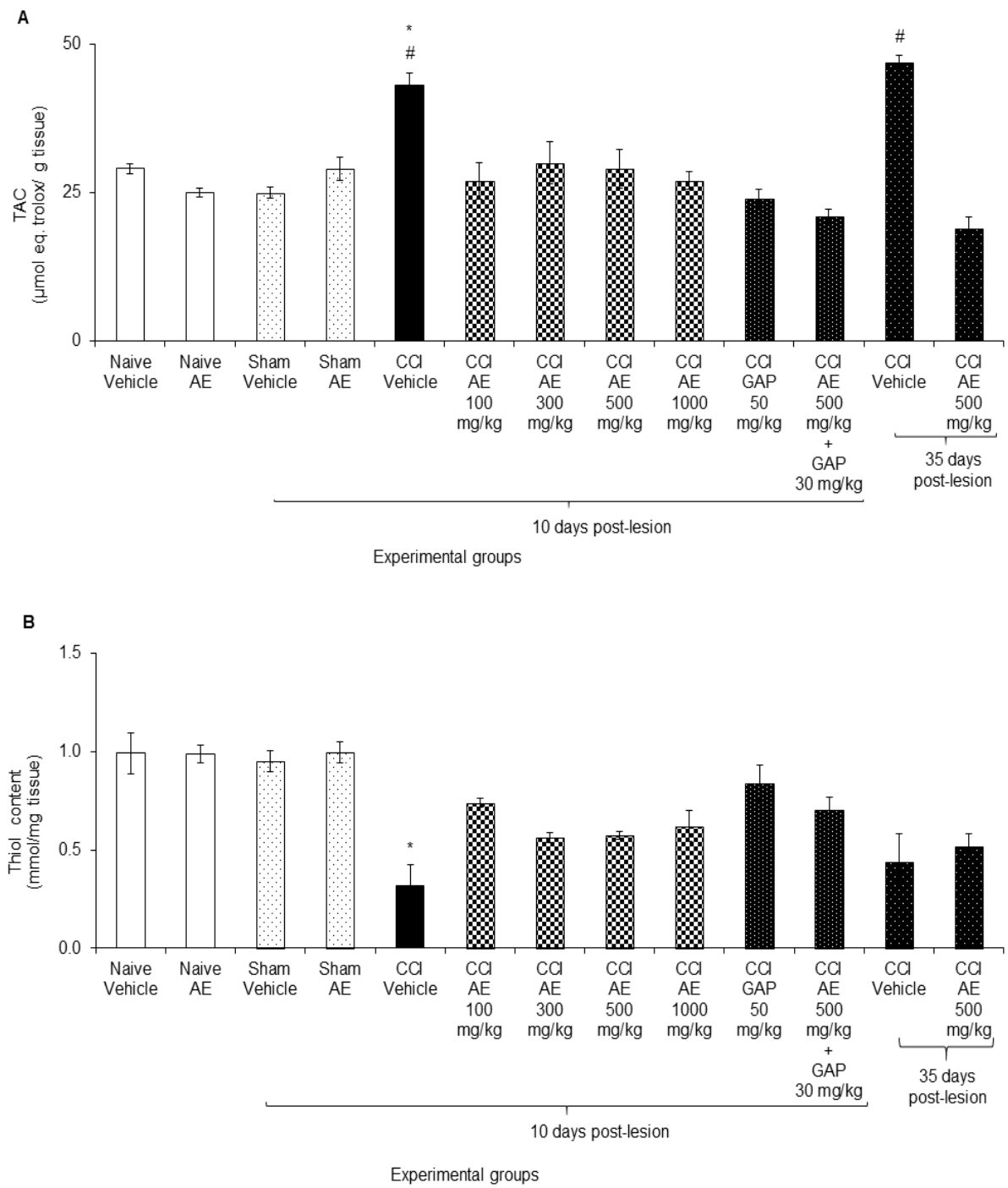


Figure 7

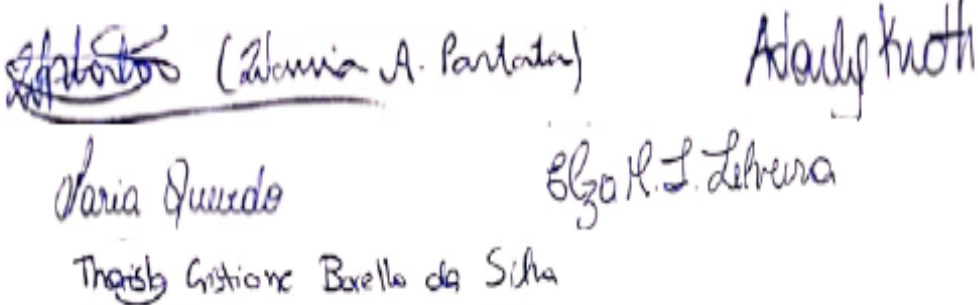


Author Agreement

Declaration of interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests:


A rectangular box containing five handwritten signatures in blue ink. The signatures are arranged in three rows. The first row contains two signatures: a stylized signature on the left and 'Aduly Kuthi' on the right. The second row contains 'Maria Quezdo' on the left and 'Ego R. I. Lebrera' on the right. The third row contains 'Thais Gistiane Borella da Silva' centered below the other two rows.

6 DISCUSSÃO

O modelo de dor neuropática por CCI é frequentemente empregado para se avaliar o potencial terapêutico de diferentes compostos no manejo deste tipo de dor (EL GABBAS et al., 2019). Uma fonte de produtos de grande diversidade molecular e consequentes mecanismos de ação são as plantas medicinais, que vem sendo extensamente estudadas como alternativas no tratamento de dor neuropática (MEHTA; TRIPATHI, 2015; AMIN; HOSSEINZADEH, 2012; MUTHURAMAN, 2012; YUAN et al, 2010). O extrato obtido de *L. divaricata*, uma planta medicinal de ocorrência no Brasil, mostrou efeito benéfico em condições de dor inflamatória (ROSA et al., 2014). O EA de folhas dessa espécie vegetal exibiu efeito neuroprotetor, mostrou possuir em sua composição moléculas com ação antioxidante, e não provocou toxicidade ao animal tratado (COURTES et al., 2015). Por exibir essas características, o presente estudo avaliou a atividade antioxidante, a composição de macronutrientes, a presença de vitexina, e a capacidade de inibição de dano oxidativo ao DNA *supercoiled* do EA preparado de folhas de *L. divaricata*. Após, o presente estudo avaliou o efeito da administração oral desse extrato, em diferentes doses (100, 300, 500 e 1000 mg/kg/dia) e dado por 10 e 35 dias, sobre as sensibilidades mecânica e térmica (como indicadores de efeito antinociceptivo), IFI (como indicador de recuperação funcional após lesão nesse nervo), e parâmetros de estresse oxidativo em nervo isquiático lesionado e medula espinal lombossacral, uma vez que ROS desempenham papel importante na dor neuropática (GRACE et al., 2016). Todos esses parâmetros foram também avaliados em ratos que receberam, por 10 dias, administração oral de gabapentina (50 mg/kg) paralelamente a de EA (500 mg/kg), a fim de comparar se o efeito antinociceptivo do extrato era similar ao da gabapentina, fármaco considerado como tratamento de primeira linha na dor neuropática (FOTIO et al., 2019). O estudo avaliou ainda se a coadministração oral de EA (500 mg/kg)+gabapentina em dose menor (30 mg/kg), por 10 dias, poderia resultar em efeito antinociceptivo similar ao da gabapentina em dose maior. Foi também avaliado se a administração do EA poderia induzir toxicidade ou dano ao organismo, mediante acompanhamento de ganho de peso corporal dos ratos usados no estudo, e avaliação de indicadores de função hepática e renal, tais como atividades da ALT, AST, bilirrubina direta e creatinina em plasma, e valores de hidroperóxidos lipídicos e atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GST em

fígado. Um breve resumo dos principais achados no presente estudo é mostrado na Figura 13, que se encontra ao final deste capítulo.

Em concordância com resultados de pesquisas anteriores (CALIXTO JÚNIOR et al., 2016; COURTES et al., 2015), o EA do presente estudo exibiu vitexina em sua composição. Essa flavona é sugerida como marcador taxonômico do gênero *Luehea* (CALIXTO JÚNIOR et al., 2016). Dada à sua presença no EA, pode-se sugerir que esse extrato, preparado a partir de folhas de *L. divaricata*, exibiu em sua composição uma molécula característica do gênero *Luehea*.

O EA do presente estudo também mostrou possuir conteúdo elevado de compostos fenólicos e boa atividade antioxidante, características que também foram observadas em estudos anteriores realizados com extrato de folhas de *L. divaricata* (TIRLONI et al., 2019; 2018; COURTES et al., 2015). Assim, pode-se sugerir que o EA do presente estudo exibiu características comumente encontradas em extratos preparado a partir de folhas de *L. divaricata*.

Foi sugerido que a atividade antioxidante varia significativamente dependendo do ensaio usado na determinação, pois diferentes técnicas mensuram reações/atividades diferentes (ROY et al., 2010). Segundo esses pesquisadores, os mecanismos de reações antioxidantes na maior parte dos ensaios *in vitro* ocorrem de duas formas: por transferência de átomos de hidrogênio (HAT, do inglês *hydrogen atom transfer*) ou por transferência de elétrons (ET, do inglês *electron transfer*). O ensaio do ABTS se baseia no mecanismo de HAT. Porém, o ensaio do DPPH parece se basear nos mecanismos de HAT e ET (KABRA et al., 2019). O ORAC, por sua vez, representa um ensaio típico de utilização do mecanismo de HAT (ROY et al., 2010). Desde que o EA do presente estudo revelou boa atividade antioxidante quando a mesma foi avaliada nos ensaios ABTS, DPPH e ORAC, pode-se sugerir que o extrato possui componentes com ação antioxidante que agem tanto por mecanismos de HAT como de ET.

O presente estudo também mostrou, pela primeira vez, a composição de macronutrientes do EA preparado a partir de folhas de *L. divaricata*. Os resultados mostraram conteúdo de açúcares solúveis maior do que o de proteínas e triacilglicerídeos. Um resultado similar foi encontrada em folhas de outras espécies vegetais (OVUAKPORIE-UVO et al., 2019; MZOUGHFI et al., 2019). Porna se interessante, a sacarose foi o açúcar predominante no EA do presente estudo. É possível que esse resultado se relacione com o estágio de desenvolvimento da folha. Foi demonstrado que sacarose, frutose e glicose constituem os principais açúcares presentes

nos diferentes estágios do desenvolvimento das folhas de *Hevea brasiliensis*, mas o conteúdo de sacarose aumentou continuamente ao longo do desenvolvimento e se tornou o tipo predominante nas folhas adultas (ZHU et al., 2018). No presente estudo, as folhas de *L. divaricata* usadas para o preparo do extrato foram principalmente adultas. Porém, outros efeitos devem também ser considerados ao se avaliar o conteúdo maior de sacarose do extrato. Em folhas de *Salvinia mínima* coletadas no verão, a sacarose foi o açúcar predominante nessa parte da planta (ROSA et al., 2017). No presente estudo, as folhas foram coletadas no mês de dezembro, período de verão no Brasil. Desta forma, o fator sazonal também deve ser considerado como um possível contribuinte para o teor mais elevado de sacarose no extrato.

Ainda quanto à composição de macronutrientes, outro achado do presente estudo foi a concentração maior de proteínas do que triacilglicerídeos no EA. Um resultado similar foi descrito em pesquisa que usou outra espécie vegetal (MZOUGHJI et al., 2019). Porém, o presente estudo avaliou apenas a concentração de triacilglicerídeos. É sabido que plantas normalmente estocam lipídeos como gotículas de triacilglicerídeos (NARAYANAN et al., 2016), mas as folhas comumente são ricas em outros tipos de lipídeos, como esteróis e ácidos oleico e α -linoleico (MZOUGHJI et al., 2019). Assim, para melhor caracterizar os componentes lipídicos presentes no EA se torna necessária a realização de pesquisas complementares sobre essa questão.

Quanto a efeitos fisiológicos do extrato, o presente estudo mostrou, pela primeira vez, que a administração oral do EA de folhas de *L. divaricata* atenuou a diminuição nos limiares mecânico e térmico, a qual foi induzida pela CCI. É sabido que o teste de von Frey, que avalia a sensibilidade mecânica, mensura a hiperalgesia cutânea ou alodinia e, assim, é de grande valia em situações com sensibilidade cutânea aumentada, tal como ocorre na dor neuropática (GREGORY et al., 2013). Segundo esses autores, o teste da placa quente, que avalia sensibilidade térmica, mensura a latência para retirar ou lambe uma das patas em contato com a placa quente. É sugerido que a escolha de qual pata erguer para evitar o contato com a placa quente requer participação de regiões do SNC localizadas acima da medula espinal (GREGORY et al., 2013). Assim, o teste da placa quente não constitui um simples reflexo nocifensivo, mas requer uma integração em regiões superiores do neuroeixo (KUMAR et al., 2018; GREGORY et al., 2013). Considerando que ratos com CCI é um dos modelos animais comumente usado no estudo de dor neuropática periférica (KUMAR et al., 2018), e que a administração do EA em todas as doses testadas no presente estudo provocou

atenuação na nocicepção em ratos com CCI, pode-se sugerir que o EA de folhas de *L. divaricata* é efetivo em atenuar dor neuropática induzida por CCI. Assim, o EA de folhas de *L. divaricata* pode ser uma boa opção no manejo de dor neuropática.

Embora seja cedo especular os mecanismos envolvidos na antinocicepção induzida pelo EA, é possível que esse efeito tenha relação com o elevado teor de compostos fenólicos e a alta atividade antioxidante encontrada no extrato. Diferentes estudos apontaram compostos com ação antioxidante como bons candidatos para tratar dor neuropática (RIFFEL et al., 2018; SCHEID et al., 2018). Entretanto, o presente estudo avaliou apenas a presença de vitexina na composição do extrato. Pesquisa prévia mostrou que a administração de vitexina provocou melhora significativa no quadro hiperalgésico em camundongo submetido a um modelo de dor pós-operatória (ZHU et al., 2016). Assim, a vitexina pode também estar contribuindo para a antinocicepção induzida pelo EA. Porém, cabe ser destacado que vários picos ocorreram no perfil cromatográfico do EA, os quais não foram identificados no presente estudo. Desta forma, é preciso considerar que estas outras moléculas também podem estar contribuindo para o efeito antinociceptivo induzido pelo EA. Para melhor esclarecer essa questão, torna-se necessária a realização de estudos que possibilitem melhor caracterização dos compostos presentes no EA de folhas de *L. divaricata*, como foi previamente sugerido neste texto.

Paralelo ao efeito antinociceptivo, o presente estudo mostrou acréscimo no IFI em ratos CCI que receberam administrações de EA. A diminuição no IFI em ratos com CCI que receberam administrações de veículo está de acordo com dados da literatura (HORST et al., 2017a; OZBEK et al., 2017; RIFFEL et al., 2016). Assim, pode-se sugerir que os ratos CCI exibiram perdas funcionais que normalmente são observadas após este tipo de lesão nervosa periférica. Como o EA atenuou a diminuição nesse índice, mas a recuperação só foi estatisticamente significativa após 21 e 35 dias de tratamento, pode-se sugerir que um tempo de tratamento maior é necessário para a obtenção de melhora significativa na funcionalidade do nervo isquiático lesionado.

O prejuízo funcional no IFI pode estar relacionado à perda de fibras mielinizadas, o que se sabe provocar déficits na estabilidade do passo em ratos CCI (KOMIRISHETTY et al., 2017). Como o EA provocou aumento no IFI de ratos CCI que receberam esse tratamento, a melhora pode ser interpretada como consequência de um efeito neuroprotetor do extrato. Apesar de o presente estudo não ter avaliado regeneração nervosa, o EA de folhas de *L. divaricata* mostrou efeito neuroprotetor em

modelo experimental de doença de Huntington (COURTES et al., 2015). Assim, pode-se sugerir que a recuperação no IFI se relacione com a neuroproteção provocada pelo EA. Diversos estudos mostraram que compostos com efeitos neuroprotetores provocaram melhora significativa no IFI após lesão nervosa periférica (EL GABBAS et al., 2019; HORASANLI et al., 2017). Além disso, foi observado que ratos com melhor recuperação nervosa exibiram poucas, e cada vez menos, contraturas nos dedos de suas patas (SIEMIONOW et al., 2002).

Interessantemente, a melhora no IFI foi observada nos mesmos ratos que exibiram acréscimos nos limiares mecânico e térmico. Assim, parece plausível se pensar em alguma relação entre esses eventos. Todavia, as deformidades na passada induzidas pela CCI parecem mais relacionadas à dor espontânea em curso do que a alodinia mecânica (NAKAZATO-IMASATO & KUREBAYASHI, 2009). Como o presente estudo mostrou acréscimo nos valores do IFI e do limiar mecânico em ratos CCI tratados com EA, pode-se sugerir que esse extrato reduz dor espontânea e alodinia em ratos CCI. Porém, é preciso considerar que o presente estudo não avaliou comportamentos de dor espontânea, como o enterrar-se e andar em rodas espontaneamente. A avaliação desses comportamentos foi sugerida para se mensurar dor espontânea em curso em roedores submetidos a modelos de dor crônica (GRIFFITHS et al., 2018). Contudo, comportamentos de dor espontânea ocorreram em paralelo à hipersensibilidade mecânica/frio máxima observada em rato submetido à neuropatia periférica induzida por paclitaxel (GRIFFITHS et al., 2018). Deste modo, não se pode descartar a possibilidade do EA de folhas de *L. divaricata* atenuar dor espontânea e alodinia em ratos CCI.

Como esperado, a gabapentina atenuou a diminuição no limiar mecânico induzida pela CCI (FOTIO et al., 2019; CORONA- RAMOS et al., 2016; RIFFEL et al., 2016). Esse fármaco também promoveu melhora no IFI de ratos CCI, assim como descrito em outro estudo (OZBEK et al., 2017). O interessante é que a atenuação nos limiares mecânico e térmico e IFI induzidas pelo tratamento com o EA foram similares às induzidas pela gabapentina. Estes resultados não apenas reforçaram o efeito antinociceptivo do EA e sua capacidade de induzir melhora no IFI, mas mostraram, pela primeira vez, que esses efeitos são comparáveis ao de um fármaco considerado como tratamento de primeira linha para a dor neuropática na clínica médica. Estes resultados são interessantes visto que tratamentos farmacológicos clássicos para dor crônica são

efetivos em menos de 50% dos pacientes, e geralmente estão associados a efeitos adversos que limitam sua utilidade na clínica médica (COLLOCA et al., 2017).

Como o efeito antinociceptivo do EA foi similar ao da gabapentina, procedeu-se à coadministração de EA e gabapentina a ratos com CCI, sendo a gabapentina administrada em uma dose menor. A redução da dose de gabapentina pareceu interessante por este fármaco provocar efeitos adversos como sedação, fadiga e vertigem em humanos, e sedação e ataxia em animais de companhia (RUEL & STEAGALL, 2019). Como mostra os resultados deste estudo, o efeito antinociceptivo induzido por EA+gabapentina em dose menor foi similar ao da gabapentina em dose maior ou EA sozinho na dose de 500 mg/kg. Como dois ou mais fármacos podem ser administrados em combinação primariamente para aumentar a eficácia e reduzir dosagens individuais e possíveis efeitos colaterais de cada um deles (BASTING et al., 2019), a coadministração de EA e gabapentina foi efetiva em reduzir a dose individual de gabapentina sem qualquer alteração no efeito antinociceptivo em ratos CCI. Ainda, a antinocicepção foi longa, durando toda a noite e se estendendo até o dia seguinte após a cirurgia. Como as administrações foram feitas em dias alternados após o primeiro tratamento, e os limiares mecânico e térmico permaneceram aumentados durante todo o período, parece válido sugerir que o efeito antinociceptivo permaneceu sustentado até o final do experimento, embora a administração tenha sido realizada em dias alternados. Esse resultado sugere que a coadministração de EA+gabapentina em dose menor não necessita ser diária. Assim, a coadministração pode ser uma opção para se reduzir a possibilidade de efeitos adversos com tratamento diário e por longo tempo com gabapentina. Infelizmente, não foi possível no presente estudo avaliar o mecanismo exato envolvido no efeito benéfico da combinação de gabapentina com EA. Porém, é sabido que dois mecanismos estão envolvidos no efeito benéfico da gabapentina na dor: suas ações em subunidade α -2 δ de canais de Ca^{2+} e em via de sinalização interleucina-10-Heme Oxigenase-1 (STOICEA et al., 2015), e diminuição do transportador de aminoácido excitatório do tipo 3 (GIL et al., 2015). O EA mostrou elevado conteúdo de compostos fenólicos e boa atividade antioxidante. Todos esses mecanismos devem estar atuando para reduzir a dor e prolongar a antinocicepção em ratos com CCI. Porém, é claro, há necessidade de estudos complementares para melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na antinocicepção mais duradoura após administração de EA+gabapentina em dose menor.

O presente estudo também avaliou ROS em nervo isquiático lesionado e segmento lombossacral da medula espinal, pois estresse oxidativo/nitrosativo desempenha papel importante na patogênese de neuropatias, e danos induzidos por oxidantes, neuroinflamação e falha bioenergética contribuem para os déficits funcionais, comportamentais e bioquímicos em condições de dor (KOMIRISHETTY et al., 2017).

Em concordância com resultados de pesquisas anteriores (DE LOGU et al., 2019; RIFFEL et al., 2018; HORST et al., 2017b; TREVISAN et al., 2016), o presente estudo mostrou que a SAG e os valores de H_2O_2 aumentaram na medula espinal de ratos CCI que receberam administrações de veículo. Porém, esses acréscimos não foram observados nesse tecido em ratos CCI tratados com EA. Dado ao teor elevado de compostos com ação antioxidante no EA, como foi previamente discutido no primeiro artigo dessa tese (KROTH et al., 2020), é possível que essa característica do extrato esteja contribuindo para a falta de aumentos significativos na SAG e valores de H_2O_2 nos ratos CCI que receberam administrações desse extrato. Segundo Kroth et al. (2020), o perfil cromatográfico do extrato usado no presente estudo revelou presença de vitexina. De acordo com a literatura, a vitexina possui ação antioxidante (HE et al., 2016) e sua atividade *scavenger* de radicais superóxidos e H_2O_2 é dose-dependente (UGUSMAN et al., 2012; KIM et al., 2005). Assim, parece plausível sugerir que essas atividades da vitexina estão relacionadas ao efeito do extrato de prevenir acréscimos na SAG e valores de H_2O_2 na medula espinal de ratos CCI que receberam EA de folhas de *L. divaricata*. Como esse efeito preventivo foi observado aos 10 e 35 dias após a CCI, parece que o tratamento promove esse resultado logo após seu início, e o mesmo parece permanecer enquanto durar as administrações. Todavia, o esclarecimento dessa sugestão exige a realização de estudos complementares sobre a mesma.

Assim como já foi discutido para os resultados de limiar mecânico e IFI, cabe aqui também destacar que o efeito preventivo do EA sobre a SAG e valores de H_2O_2 na medula espinal foi encontrado nos mesmos ratos CCI que exibiram atenuação no limiar mecânico e IFI. Deste modo, não se pode excluir a possibilidade de relação entre esses resultados. Segundo Bittar et al. (2017), o ânion superóxido media potenciação de longa duração em neurônios excitatórios do trato espinotalâmico (neurônios que transmitem informação nociceptiva da medula espinal para o encéfalo) e depressão de longa duração em interneurônios inibitórios na medula espinal. O H_2O_2 parece aumentar a frequência de potenciais de ação em neurônios primários envolvidos na dor neuropática (SÖZBIR & NAZIROGLU, 2016). Com base nesses conhecimentos prévios, pode-se

sugerir que o aumento na SAG e H_2O_2 na medula espinal tenha alguma relação com a queda no limiar mecânico e valores do IFI em ratos CCI que receberam administrações de veículo. Nesse contexto, pode-se pensar que o efeito preventivo do EA sobre essas espécies contribuiu para a atenuação no limiar mecânico e valores do IFI em ratos CCI tratados com EA. Ao promover a melhora nas respostas aos testes funcionais, isso explica os valores positivos do coeficiente de correlação de Pearson quando se calculou a correlação entre limiar mecânico e valores de SAG e H_2O_2 para ratos CCI tratados por 7 dias com EA. Infelizmente não é possível estabelecer uma relação direta ou indireta entre SAG, H_2O_2 , limiar mecânico e IFI sem a realização de pesquisas complementares sobre essa questão.

A presença de compostos com ação antioxidante no EA pode também estar contribuindo para a falta de aumento nos valores de hidroperóxidos lipídicos em nervo isquiático lesionado e segmento lombossacral da medula espinal de ratos CCI que receberam esse tratamento. Um estudo prévio mostrou que a administração de compostos com ação antioxidante preveniu acréscimos na peroxidação de lipídeos no SNC de camundongos com dor neuropática (BIRMANN et al., 2019). Foi também relatado que a vitexina reduziu os valores de peroxidação de lipídeos, os quais foram aumentados após a oclusão da artéria cerebral média (JIANG et al., 2018). Similar ao observado em outras pesquisas (RIFFEL et al., 2018; HORST et al., 2017b; NAIK et al., 2006), os valores de peroxidação de lipídeos aumentaram em nervo isquiático e medula espinal de ratos CCI que receberam administrações de veículo.

O tratamento com extrato também preveniu diminuição no conteúdo de tióis totais na medula espinal de ratos CCI, a qual foi encontrada neste tecido de ratos CCI tratados com veículo. A diminuição do conteúdo de tióis totais neste último grupo está de acordo com resultados de pesquisas anteriores (RIFFEL et al., 2018; BHAT et al., 2016). É possível que a diminuição em tióis totais na medula espinal de ratos CCI tratados com veículo se relaciona com o aumento na formação de ROS, principalmente H_2O_2 . A oxidação de tióis ocorre por um mecanismo envolvendo dois-elétrons, comumente com envolvimento de H_2O_2 (WINTERBOURN, 2015). Segundo esse autor, o superóxido reage com tiol, porém, essa reação é lenta, no mínimo para moléculas pequenas, e a reação não é uma transferência direta de elétrons, mas ela gera radical tiiil, o qual regenera superóxido e forma dissulfeto como principal produto. Esta é uma reação em cadeia, mas a mesma é breve, possivelmente pelo motivo do superóxido reagir com intermediários e, assim, não é provável uma competição entre tióis e SOD

(WINTERBOURN, 2015). Como o EA das folhas de *L. divaricata* preveniu o aumento em H₂O₂ na medula espinal, isso pode estar contribuindo para a manutenção do conteúdo de tióis totais nesse tecido de ratos CCI tratados com extrato.

Apesar de decréscimo no conteúdo de tióis totais, a TAC aumentou na medula espinhal de ratos CCI tratados com veículo. Os tióis parecem constituir o principal determinante da TAC em homogeneizado de tecidos (BALCERCZYK et al., 2003). Porém, a TAC representa o estado geral dos antioxidantes do tecido (ZHANG et al., 2019). Segundo Balcerczyk (2003), a adaptação ao estresse oxidativo pode envolver mobilização de outros mecanismos do que aumento no conteúdo de tióis. Foi mostrado em pesquisas anteriores que a CCI provoca, em nervo isquiático, diminuição em glutatona e aumento na atividade da SOD sem mudanças significativas na atividade da CAT (NAIK et al., 2006). Porém, em medula espinal, a CCI provocou queda na GSH e nas atividades da GPx e GST, mas aumentou a atividade da SOD sem alterar significativamente a atividade da CAT (SCHEID et al., 2018). Assim, as alterações complexas nos sistemas antioxidantes após a CCI podem estar contribuindo para o aumento da TAC frente à queda no conteúdo de tióis totais na medula espinal de ratos CCI tratados com veículo. A falta, ou menor alteração em parâmetros antioxidantes pode ser a causa da ausência de mudanças na TAC no tecido nervoso dos ratos CCI que receberam administrações de EA.

A falta de aumento na TAC no nervo isquiático lesionado e segmento lombossacral da medula espinal de ratos CCI que receberam administrações de EA de folhas de *L. divaricata* sugere que, esse extrato, não perturba as redes bem integradas de defesa antioxidante nesses tecidos. Porém, deve-se considerar que ainda é necessária a realização de estudos complementares para comprovação dessa sugestão. Apesar dessa limitação, os resultados do presente estudo são importantes por serem os primeiros a levantar essa problemática e mostrar que o tratamento com esse extrato parece não alterar as redes endógenas de defesa antioxidante, embora o mesmo tenha atividade antioxidante elevada. Assim, pode-se sugerir que o EA de folhas de *L. divaricata* parece constituir, novamente, uma boa opção para o tratamento de dor neuropática.

Outro achado interessante do presente estudo foi que o EA, em todas as doses testadas, mostrou ser seguro em ratos. Segundo Tolouei (2019), animais intoxicados tendem a exibir alterações comportamentais como redução no consumo de água e alimentos e, como consequência, diminuição em seu peso corporal. No presente estudo não se observou, durante todo o período experimental, qualquer sinal de alteração

comportamental nos ratos que receberam EA. Nenhuma morte ocorreu entre os animais do estudo e não se observou diminuição no peso corporal dos ratos. Ainda, não foram encontradas alterações significativas nos parâmetros de função hepática e renal, avaliados em plasma, e pró-oxidante e antioxidante, analisados em fígado. Além disso, a capacidade do EA em inibir dano oxidativo ao DNA superenovelado (*supercoiled*) foi elevada. Considerados em conjunto, esses resultados reforçaram a falta de potencial mutagênico do extrato, como mostrado em outras pesquisas (TIRLONI et al., 2019; FELÍCIO et al., 2011), e destacaram o perfil de segurança do EA do presente estudo. Assim, os resultados reforçam a possibilidade de uso do EA de folhas de *L. divaricata* no manejo de dor neuropática induzida por CCI.

No entanto, deve-se considerar que o presente estudo usou um modelo animal não humano. Por este motivo, os resultados precisam ser validados em seres humanos. Porém, foi mostrado que microsomo de fígado de rato, macaco *Rhesus* e humanos exibiram similaridades em suas características de biotransformação do alcalóide protoberberina, componente principal em muitas plantas medicinais (LI et al., 2017). Assim, não se pode descartar a possibilidade que o uso do EA de folhas de *L. divaricata* pode vir a ser um adjuvante no tratamento da dor neuropática em humanos. Neste contexto, os resultados do presente estudo (para revisão, ver Figura 13) não apenas levantam a possibilidade de uso clínico do EA de folhas de *L. divaricata* no manejo de dor neuropática, mas também mostra que alterações em parâmetros pró-oxidantes e antioxidantes são mecanismos pelos quais esse extrato atua para induzir seu efeito antinociceptivo. Portanto, as pesquisas futuras que buscarem entender os mecanismos envolvidos na ação antinociceptiva do EA de folhas de *L. divaricata* devem levar em consideração os resultados do presente estudo.

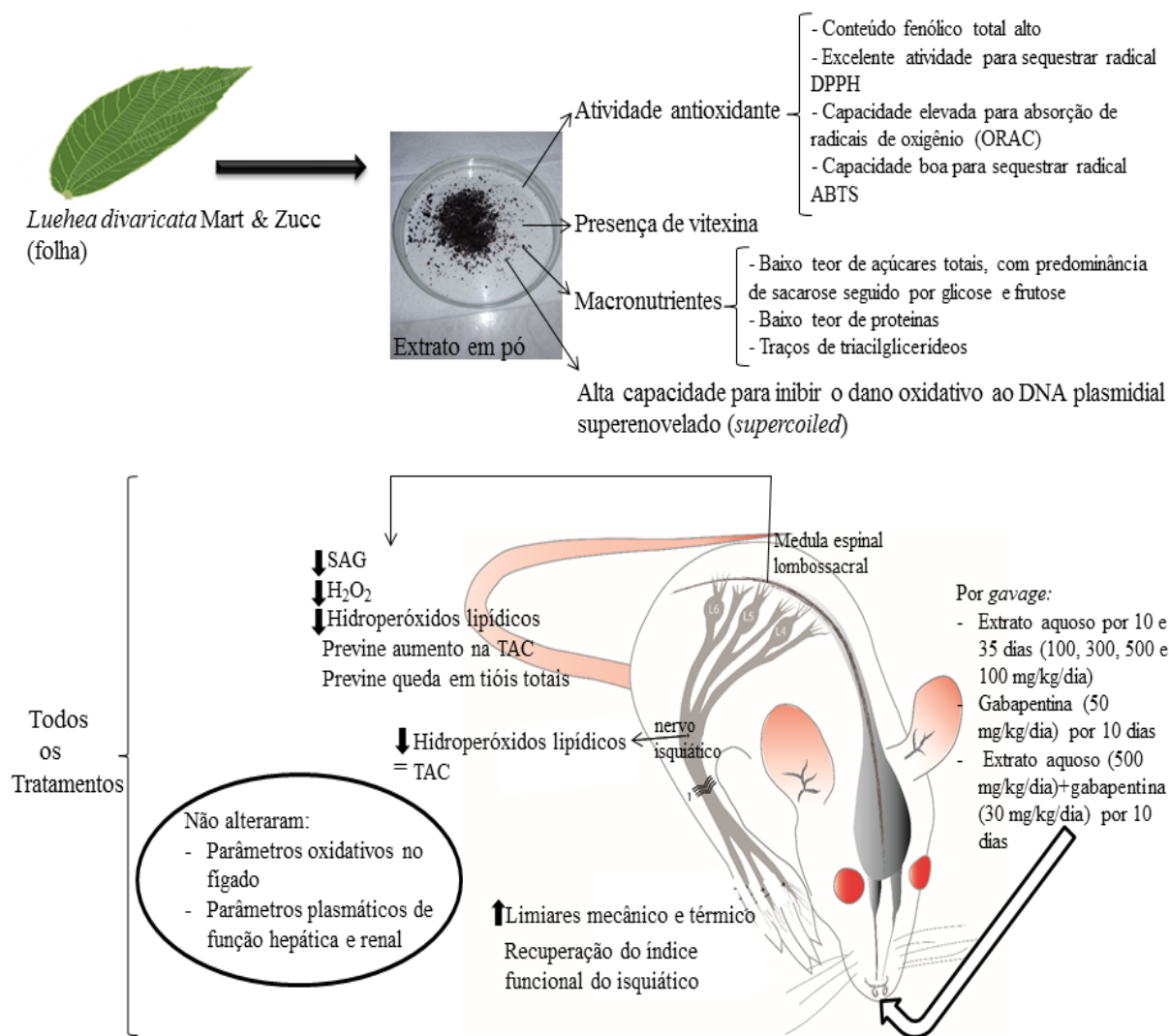


Figura 13: Esquema mostrando breve resumo dos principais resultados do presente trabalho quando se administrou extrato aquoso de folhas de *L. divaricata* a ratos com dor neuropática por lesão por constrição crônica no nervo isquiático (linhas transversais de cor preta no nervo representado na cor cinza). Para descrição das abreviaturas, consulte a lista de abreviaturas na página 13 dessa tese (Elaborado pela autora).

7 CONCLUSÃO

Este estudo mostrou que o EA preparado de folhas de *L. divaricata* possui conteúdo elevado de compostos fenólicos e atividade antioxidante alta quando avaliada nos ensaios de ABTS, DPPH e ORAC. O extrato também apresentou vitexina em sua composição e capacidade elevada para inibir dano oxidativo ao DNA superenovelado. O extrato mostrou ainda teor mais elevado de sacarose do que glicose e frutose, e baixa concentração de proteínas e triacilglicerídeos.

O estudo também mostrou, pela primeira vez, que a administração de EA, em diferentes doses por 10 e 35 dias, atenuou a nocicepção e provocou acréscimo no IFI em ratos com dor neuropática induzida por lesão por CCI, e o efeito foi similar ao da gabapentina, fármaco considerado como tratamento de primeira linha para a dor neuropática na clínica médica. Ainda, a administração de EA concomitante com a gabapentina em dose menor provocou antinocicepção e elevação nos valores do IFI, e o efeito foi similar ao da gabapentina em dose maior.

Paralelamente, observou-se que a administração de EA, gabapentina e EA+gabapentina alterou parâmetros de estresse oxidativo em nervo isquiático lesionado e segmento lombossacral da medula espinal de ratos com CCI. No nervo isquiático, os tratamentos preveniram acréscimo nos valores de hidroperóxidos lipídicos sem modificar significativamente a TAC. Na medula espinal, os tratamentos reduziram a SAG e os valores de H₂O₂ e hidroperóxidos lipídicos, além de prevenirem acréscimo na TAC e redução no conteúdo de tióis totais. Ainda, a administração de EA não modificou a atividade de indicadores plasmáticos de função hepática e renal, de parâmetros pró-oxidante e antioxidante em fígado, e ganho de peso corporal dos ratos.

Em conjunto, os resultados ampliam o conhecimento sobre presença de compostos com ação antioxidante no EA de folhas de *L. divaricata* e a falta de toxicidade do mesmo em ratos. O estudo ainda sugere, pela primeira vez, que o uso desse extrato poderia ser uma alternativa para tratamento de dor neuropática, podendo ser o mesmo um coadjuvante para redução da dosagem de gabapentina, e que alterações em parâmetros pró-oxidantes e antioxidantes são mecanismos pelos quais o extrato atua para induzir efeito antinociceptivo. Porém, é necessária a realização de estudos complementares em humanos, dada às diferenças nas respostas à dor em ratos e humanos.

8 PERSPECTIVAS

Como perspectivas, propõe-se complementar a caracterização do perfil cromatográfico do EA de folha de *L. divaricata*, para melhor conhecimento dos compostos presentes nesse extrato.

Com o intuito de ampliar o conhecimento dos mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo do EA, propõe-se avaliar a expressão de moléculas de sinalização como, por exemplo, NF- κ B e proteínas Bax e Bcl-2 no tecido nervoso de ratos com CCI, pois as mesmas desempenham papel importante na dor neuropática. Sugere-se ainda avaliar a expressão de TNF- α e IL-10 e Heme Oxigenase-1 em medula espinal lombossacral de ratos com CCI tratados com EA, por terem essas citocinas função pró-inflamatória e anti-inflamatória, respectivamente, e estarem alteradas em condições de dor. Propõe-se também avaliar a expressão de enzimas óxido nítrico sintases (NOS, do inglês *nitric oxide synthase*) e a reatividade a enzima NADPH-diaforase, que é um marcador de atividade da NOS, em medula espinal lombossacral de ratos com CCI tratados com EA, pois o estresse nitrosativo desempenha papel importante na patogênese de neuropatias.

Como se sabe que os efeitos da dor neuropática se estendem a regiões mais superiores do neuroeixo, propõe-se avaliar parâmetros de estresse oxidativo e nitrosativo, e moléculas de sinalização, em córtex e tronco encefálico de ratos com CCI tratados com EA.

Sugere-se ainda avaliar parâmetros metabólicos e histológicos nos tecidos de gordura branca e marrom, a fim de ampliar o conhecimento sobre os efeitos fisiológicos do tratamento com EA. Quanto a essa sugestão, cabe ser destacado que já foram realizadas coletas desses tecidos nos ratos usados no presente estudo.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, L.; FRANCO M. C.; ESTEVEZ, A.G. Reactive nitrogen species in cellular signaling. **Experimental Biology and Medicine**. v. 240, p.711–717. 2015.
- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Method. Enzymol.** V.125, p.121-126. 1984.
- AKSENOV, M.Y., MARKESBERY, W.R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neurosci Lett**. v. 302, p. 141-145. 2001.
- AGRA, Maria de Fátima; FREITAS, Patrícia França de; BARBOSA-FILHO, José Maria. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.
- ALICE, C. B. et al. Plantas medicinais de uso popular. **Atlas Farmacognóstico**. Canoas: Editora da ULBRA/RS, 1995.
- AMIN, B.; HOSSEINZADEH, H. Evaluation of aqueous and ethanolic extracts of saffron, *Crocus sativus* L., and its constituents, safranal and crocin in allodynia and hyperalgesia induced by chronic constriction injury model of neuropathic pain in rats. **Fitoterapia**, v. 83, p. 888-895, 2012.
- ARANTES, L. et al. Luehea divaricata Mart. anticholinesterase and antioxidant activity in a Caenorhabditis elegans model system. **Ind. Crops Prod**. v.62, p. 265-271. 2014.
- BALBACH A. As Plantas Curam. **Editora Missionária**, Itaquaquecetuba 1993.
- BALCERCZYK, A. et al. Thiols as major determinants of the total antioxidant capacity. **Biofactors**. v.17, p. 75-82. 2003.
- BALIKI, M.N.; APKARIAN, V. Nociception, Pain, Negative Moods, and Behavior Selection. **Neuro**. V.87 (3) 474-91. 2015.
- BARON, R.; BINDER, A.; WASNER, G. Neuropathic pain: Diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. **The Lancet Neurology**. v. 9, n. 8, p. 807–819. 2010.
- BASBAUM, AI.; JESSELL, T. The Perception of Pain. In: Kandel, ER.; Schwartz, J.; Jessell, T., editors. **Principles of Neuroscience**. New York: Appleton and Lange. p. 472-491. 2000.
- BASBAUM, A. I. *et al.* Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267–284. 2009.
- BASTING, R.T. et al. *Pterodonpubescens* and *Cordia verbenacea* association promotes a synergistic response in antinociceptive model and improves the anti-inflammatory results in animal models. **Biomed.Pharmacother**. 112:108693. 2019.

BASU, P., BASU, A. *In vitro* and *in vivo* effects of flavonoids on peripheral neuropathic pain. **Molecules** 25: pii: E1171. 2020.

BECKHAUSER, T. F.; FRANCIS-OLIVEIRA, J.; PASQUALE, R. DE. Reactive oxygen species: Physiological and physiopathological effects on synaptic plasticity. **Journal of Experimental Neuroscience**. v. 2016, p. 23–48. 2016.

BENNETT, G.J., XIE, Y.K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain** 33: 87–107. 1988.

BERBERICH, P.; HOHEISEL, U.; MENSE, S. Effects of a carrageenan-induced myositis on the discharge properties of group III and IV muscle receptors in the cat. **Journal of neurophysiology**, v. 59, n. 5, p. 1395-1409, 1988.

BHAT, R.A. et al. Effect of ursolic acid in attenuating chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. **Fundam Clin Pharmacol** v.6, p.517–528. 2016.

BIESKI, I.G.C. et al. Ethnopharmacology of medicinal plants of the pantanal region (Mato Grosso, Brazil). **Evid. Based. Complement. Altern. Med.** p. 1-36. 2012.

BIRMANN, P.T. et al. 2019. 3-(4-chlorophenylselanyl)-1-methyl-1H-índole promotes recovery of neuropathic pain and depressive-like behavior induced by partial constriction of the sciatic nerve in mice. **J. Trace Elem. Med. Biol.** v. 54, p.126-133. 2019.

BITTAR, A. et al. Reactive oxygen species affect spinal cell type-specific synaptic plasticity in a model of neuropathic pain. **Pain**. v.158, p. 2137-2137. 2017.

BLOM, S. M et al. Nerve injury-induced causes neuropathic pain desinhibition of the anterior cingulate cortex. **The Journal of Neuroscience**, v. 34, p. 5754-5764, 2014.

BOLDA MARIANO, L.N. et al. 1,3,5,6-Tetrahydroxyxanthone, a natural xanthone, induces diuresis and saluresis in normotensive and hypertensive rats. **Chem. Biol. Interact.** 311:108778. 2019.

BORTOLUZZI, R.C. et al. Análise Química Qualitativa e Morfo-histológica de *Luehea divaricata* Mart. **XVIII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Anais**, Cuiabá/MT, 2002.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal.Biochem.** 72: 248254. 1977.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 971, 3 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. Brasília, 2006.

- BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation, **Methods in Enzymology**. p.302-310. 1987.
- BURMA, N.E., LEDUC-PESSAH, H., FRAN, C.Y., TRANG, T. Animal models of chronic pain: Advances and challenges for clinical translation. **J.Neurosci. Res.** v. 95, p.1242-1256. 2017.
- BEYERS M.R, BONICA JJ. Periphral pain mechanisms and nociceptor plasticity. In: Loeser JD, Buther SH, Chapman R, Turk DC (eds). **Bonicas management pain. Lippincott Willians e Wilkins**. 26-72. 2001.
- CAILLAUD, M. et al. Local low dose curcumin treatment improves functional recovery and remyelination in a rat model of sciatic nerve crush through inhibition of oxidative stress. **Neuropharmacology**. 2018.
- CALIXTO-JÚNIOR, J.T. et al. The Genus *Luehea* (Malvaceae-Tiliaceae): Review about Chemical and Pharmacological Aspects. **J. Pharm.** 2016: 1368971. 2016.
- CARVALHO, J.E. Atividade antiulcerogênica e anticâncer de produtos naturais e de síntese. **Multiciência**. v. 7, p. 1-18. 2006.
- CEZAROTTO, V.S. et al. Influence of Harvest Season and cultivar on the Variation of Phenolic Compounds Composition and Antioxidant Properties in *Vaccinium ashei* Leaves. **Molecules** 22pii: 1603. 2017.
- CHANG-QI, L. et al. Surgical incision induces anxiety -like behavior and amygdala sensitization: effects of morphine and gabapentin. **Pain Res. Treat.** 705874. 2010.
- CHEN, Q.Y. et al. Mechanism of persistent hyperalgesia in neuropathic pain caused by chronic constriction injury. **Neural Regen. Res.** 14:1091-1098. 2019.
- CHEN, Z. *et al.* NMDA-receptor activation and nitroxidative regulation of the glutamatergic pathway during nociceptive processing. **Pain**. v. 149, n. 1, p. 100–106. 2010.
- CHISTÉ, R.C. et al. In vitro scavenging os annatto seed extracts againts reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chem.** 15;127(2):419-26. 2011.
- CHIRIANI, C. H. B. La Vuelta a los Vegetales—Tratado Moderno de Fitoterapia, **Hachette**, 1982.
- COHEN, S. P.; MAO, J. Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. **Bmj** v. 348, n. feb05 6, p.7656–f7656. 2014.
- COLLOCA, L. et al. Neuropathic pain. **Nat. Ver. Dis. Primers** 3:17002. 2017.
- CORONA- RAMOS, J.N. et al. The antinociceptive effects of Tramadol and/or gabapentin on rat neuropathic pain induced by a chronic constriction injury. **Drug Dev. Res.** v. 77, p. 217-226. 2016.

COURTES, A.A. et al. Protective effects of aqueous extract of *Luehea divaricata* against behavioral and oxidative changes induced by 3-nitropropionic acid in rats. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2015: 723431. 2015.

CRAGG, G.M., NEWMAN, D.J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim. Biophys. Acta* v.1830, p. 3670-3695. 2013.

DAS, Vaskar. An introduction to pain pathways and pain “targets”. In: **Progress in molecular biology and translational science**. Academic Press, p. 1-30. 2015.

DEUIS, Jennifer R.; DVORAKOVA, Lucie S.; VETTER, Irina. Methods used to evaluate pain behaviors in rodents. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 10, p. 284, 2017.

DELLAROZA, M. S. G. *et al.* Dor crônica em idosos residentes em São Paulo, Brasil: prevalência, características e associação com capacidade funcional e mobilidade (Estudo SABE). **Cadernos de Saúde Pública**. v. 29, n. 2, p. 325–334. 2013.

DEPINTOR, J. D. P. *et al.* Prevalence of chronic spinal pain and identification of associated factors in a sample of the population of São Paulo, Brazil: cross-sectional study. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 134, n. 5, p. 375–384. 2016.

DESMARCHELIER, Cristian. Neotropics and natural ingredients for pharmaceuticals: why isn't South American biodiversity on the crest of the wave?. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 6, p. 791-799, 2010.

DIAS, J. J. et al. The working space of the hand in rheumatoid arthritis: its impact on disability. **Journal of Hand Surgery (European Volume)**, v. 34, n. 4, p. 465-470, 2009.

DROGE, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. **Physiological Review**. v. 82, p. 47–95. 2002.

DUBNER, R. Pain research in animals. **Annual New York Academic Science**. v. 75, p. 128–132. 1983.

DWORKIN, R. H. *et al.* Pharmacologic management of neuropathic pain: Evidence-based recommendations. **Pain**. v. 132, n. 3, p. 237–251. 2007.

DE MEDINACELI, L., FREED, W.J., WYATT, R.J. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. **Exp. Neurol**. v. 77, p. 634-643. 1982.

DE LOGU, F. et al. Schwann cells expressing nociceptive channel TRPA1 orchestrate ethanol-evoked neuropathic pain in mice. **J Clin Invest**. v. 129, p. 5424-5441. 2019.

D'MELLO, Robert; DICKENSON, Anthony H. Spinal cord mechanisms of pain. **British journal of anaesthesia**, v. 101, n. 1, p. 8-16, 2008.

EATON, P. Protein thiol oxidation in health and disease: Techniques for measuring

disulfides and related modifications in complex protein mixtures. *Free Radic Res* 40:1889-1899. 2006.

EL GABBAS, Z. et al. *Salvia officinalis*, rosmatinic and caffeic acids attenuate neuropathic pain and improve function recovery after sciatic nerve chronic constriction in mice. **Evid Based Complement Alternat Med.** 1702378. 2019.

EREL, Ozcan. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. **Clinical biochemistry**, v. 37, n. 4, p. 277-285, 2004.

FARMACOPÉIA brasileira. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010.

FEIN, Daniel M. et al. The heart of the matter: an atypical presentation of Takayasu arteritis in the pediatric emergency department. **Pediatric emergency care**, v. 27, n. 9, p. 857-859, 2011.

FELÍCIO, L. P. et al. Mutagenic potential and modulatory effects of the medicinal plant *Luehea divaricata* (Malvaceae) in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. SMART/wing. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 1, p. 16-24, 2011.

FERNANDES, Valencia et al. Cellular and molecular mechanisms driving neuropathic pain: recent advancements and challenges. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 22, n. 2, p. 131-142, 2018.

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

FOTIO, Y. et al. Efficacy of a combination of N-Palmitoylethanolamide, Beta-caryophyllene, Carnosic acid and myrrh extract on chronic neuropathic pain: A preclinical study. **Frontiers in pharmacology**, v. 10, p. 711, 2019.

FRIDOVICH, Irwin. Oxygen toxicity: a radical explanation. **Journal of Experimental Biology**, v. 201, n. 8, p. 1203-1209, 1998.

GABAY, Eran; TAL, Michael. Pain behavior and nerve electrophysiology in the CCI model of neuropathic pain. **Pain**, v. 110, n. 1-2, p. 354-360, 2004.

GARCÍA, Adolfo Ávalos; CARRIL, Elena Pérez-Urria. Metabolismo secundario de plantas. **Reduca (biologia)**, v. 2, n. 3, 2009.

GEIS, Christian et al. NOX4 is an early initiator of neuropathic pain. **Experimental neurology**, v. 288, p. 94-103, 2017.

GIL, Yang Sook et al. Gabapentin inhibits the activity of the rat excitatory glutamate transporter 3 expressed in *Xenopus* oocytes. **European Journal of Pharmacology**, v. 762, p. 112-117, 2015.

GOMES, Ana et al. 2-Styrylchromones: novel strong scavengers of reactive oxygen and

- nitrogen species. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 15, n. 18, p. 6027-6036, 2007.
- GREGORY, Nicholas S. et al. An overview of animal models of pain: disease models and outcome measures. **The Journal of Pain**, v. 14, n. 11, p. 1255-1269, 2013.
- GRACE, Peter M. et al. Nitroxidative signaling mechanisms in pathological pain. **Trends in neurosciences**, v. 39, n. 12, p. 862-879, 2016.
- GRIFFITHS, Lisa A. et al. Evoked and ongoing pain-like behaviours in a rat model of paclitaxel-induced peripheral neuropathy. **Pain Research and Management**, v. 2018, 2018.
- GUEDES, Renata P. et al. Increase in reactive oxygen species and activation of Akt signaling pathway in neuropathic pain. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 28, n. 8, p. 1049-1056, 2008.
- HABIG, William H.; PABST, Michael J.; JAKOBY, William B. Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of biological Chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, 1974.
- HALBERSTEIN, Robert A. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. **Annals of epidemiology**, v. 15, n. 9, p. 686-699, 2005.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. Free Radicals in Biology and Medicine. 4. ed. **New York: Oxford University Press**, 2007.
- HALLIWELL, Barry. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutrition reviews**, v. 70, n. 5, p. 257-265, 2012.
- HARGREAVES, K. et al. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. **Pain**, v. 32, n. 1, p. 77-88, 1988.
- HE, Miao et al. A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin. **Fitoterapia**, v. 115, p. 74-85, 2016.
- HORASANLI, Bahriye et al. Comparative evaluation of the electrophysiological, functional and ultrastructural effects of alpha lipoic acid and cyanocobalamin administration in a rat model of sciatic nerve injury. **Journal of Back and Musculoskeletal Rehabilitation**, v. 30, n. 5, p. 967-974, 2017.
- HORST, A. et al. Effects of N-acetylcysteine on spinal cord oxidative stress biomarkers in rats with neuropathic pain. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 50, n. 12, 2017a.
- HORST, A. et al. N-acetylcysteine downregulates phosphorylated p-38 expression but does not reverse the increased superoxide anion levels in the spinal cord of rats with neuropathic pain. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 50, n. 2, 2017b.

HORST, Andréa et al. Effect of N-acetylcysteine on the spinal-cord glutathione system and nitric-oxide metabolites in rats with neuropathic pain. **Neuroscience letters**, v. 569, p. 163-168, 2014.

HOSSEINZADEH, H. et al. Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of cyanocobalamin (vitamin B12) against acute and chronic pain and inflammation in mice. **Arzneimittelforschung**, v. 62, n. 07, p. 324-329, 2012.

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN (IASP). Subcommittee on taxonomy. Classification of chronic pain. Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. **Pain**, Suppl. 3, p. S1-S226, 2008.

JIANG, Jin; DAI, Jingcun; CUI, Hong. Vitexin reverses the autophagy dysfunction to attenuate MCAO-induced cerebral ischemic stroke via mTOR/ULK1 pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 99, p. 583-590, 2018.

JAGGI, Amteshwar Singh; JAIN, Vivek; SINGH, Nirmal. Animal models of neuropathic pain. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 25, n. 1, p. 1-28, 2011.

JIANG, Zhen-Yue; WOOLLARD, Alison CS; WOLFF, Simon P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**, v. 26, n. 10, p. 853-856, 1991.

KABRA, Atul et al. Phytochemical composition, antioxidant, and antimicrobial attributes of different solvent extracts from myrica esculenta buch.-Ham. ex. D. Don Leaves. **Biomolecules**, v. 9, n. 8, p. 357, 2019.

KAEFER, Christine M.; MILNER, John A. The role of herbs and spices in cancer prevention. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 19, n. 6, p. 347-361, 2008.

KALLENBORN-GERHARDT, Wiebke et al. NOXious signaling in pain processing. **Pharmacology & therapeutics**, v. 137, n. 3, p. 309-317, 2013.

KASHIF, S.M.; ZAIDI, R.; BANU, N. Antioxidant potential of vitamins A, E and C in modulating oxidative stress in rat brain. **Clinica Chimica Acta**. v.340, n.2292004.-233. 2004.

KAVALIERS, Martin. Evolutionary and comparative aspects of nociception. **Brain Research Bulletin**. v. 21, p. 923–931. 1988.

KAUR, Satbir; MUTHURAMAN, Arunachalam. Ameliorative effect of gallic acid in paclitaxel-induced neuropathic pain in mice. **Toxicology reports**, v. 6, p. 505-513, 2019.

KENNEDY, Karen AM et al. Reactive oxygen species and the neuronal fate. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, n. 2, p. 215-221, 2012.

KIM, Hee Young et al. Reactive oxygen species donors increase the responsiveness of dorsal horn neurons and induce mechanical hyperalgesia in rats. **Neural plasticity**, v. 2015, 2015.

KIM, Jin Hwa et al. The isolation and antioxidative effects of vitexin from *Acer palmatum*. **Archives of pharmacal research**, v. 28, n. 2, p. 195, 2005.

KIM, Hee Kee et al. Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. **Pain**, v. 111, n. 1-2, p. 116-124, 2004.

KHASABOVA, Iryna A. et al. Pioglitazone, a PPAR γ agonist, reduces cisplatin-evoked neuropathic pain by protecting against oxidative stress. **Pain**, v. 160, n. 3, p. 688-701, 2019.

KLUSÁKOVA, I.; DUBOVÝ, P. Experimental models of peripheral neuropathic pain based on traumatic nerve injuries – an anatomical perspective. **Annals of Anatomy**, v. 191, p. 248-259, 2009.

KOMES, Draženka et al. Phenolic composition and antioxidant properties of some traditionally used medicinal plants affected by the extraction time and hydrolysis. **Phytochemical analysis**, v. 22, n. 2, p. 172-180, 2011.

KOMIRISHETTY, Prashanth et al. Combination strategy of PARP inhibitor with antioxidant prevent bioenergetic deficits and inflammatory changes in CCI-induced neuropathy. **Neuropharmacology**, v. 113, p. 137-147, 2017.

KROTH, Adarly et al. Aqueous extract from *Luehea divaricata* Mart. leaves reduces nociception in rats with neuropathic pain. **Journal of Ethnopharmacology**, p. 112761, 2020.

KUMAR, Anil; KAUR, Harshpreet; SINGH, Arti. Neuropathic pain models caused by damage to central or peripheral nervous system. **Pharmacological Reports**, v. 70, n. 2, p. 206-216, 2018.

LANGLEY, Paul C. et al. The association of pain with labor force participation, absenteeism, and presenteeism in Spain. **Journal of Medical Economics**, v. 14, n. 6, p. 835-845, 2011.

LEOPOLDINO, Amanda Aparecida Oliveira et al. Prevalence of low back pain in older Brazilians: a systematic review with meta-analysis. **Revista Brasileira de Reumatologia (English Edition)**, v. 56, n. 3, p. 258-269, 2016.

LEVONEN, Anna-Liisa et al. Redox regulation of antioxidants, autophagy, and the response to stress: implications for electrophile therapeutics. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 71, p. 196-207, 2014.

LI, Yan et al. Comparative metabolism study of five protoberberine alkaloids in liver microsomes from rat, rhesus monkey, and human. **Planta medica**, v. 83, n. 16, p. 1281-1288, 2017.

LOESER, John D.; TREEDE, Rolf-Detlef. The Kyoto protocol of IASP basic pain Terminology☆. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 473-477, 2008.

LOOMIS, A. Fundamentos de toxicologia. Zaragoza, Espanha: **Acribia**, 1974.

LOPES, Catarina L. et al. Phenolic composition and bioactivity of *Lavandula pedunculata* (Mill.) Cav. samples from different geographical origin. **Molecules**, v. 23, n. 5, p. 1037, 2018.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. **Plantarum**: Nova Odessa, 1988.

LOWRY, Oliver H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of biological chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LU, Ruirui et al. Additive antinociceptive effects of a combination of vitamin C and vitamin E after peripheral nerve injury. **Plos one**, v. 6, n. 12, p. e29240, 2011.

MAFFEI, B. R. A Plantas medicinales. Montevideo: **Nuestra Tierra. Editora Universidade/UFRGS**, Porto Alegre, 1969.

MAGRINELLI, F.; ZANETTE, G.; TAMBURIN, S. Neuropathic pain: diagnosis and treatment. **Practical Neurology**. v. 13, n. 5, p. 292–307. 2013.

MARCHAND, Fabien; PERRETTI, Mauro; MCMAHON, Stephen B. Role of the immune system in chronic pain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, n. 7, p. 521-532, 2005.

MEACHAM, K. *et al.* Neuropathic Pain: Central vs. Peripheral Mechanisms. **Current Pain and Headache Reports**. v. 21, n. 6. 2017.

MEDEIROS, Priscila et al. N-methyl-d-aspartate receptors in the prelimbic cortex are critical for the maintenance of neuropathic pain. **Neurochemical research**, v. 44, n. 9, p. 2068-2080, 2019.

MEHTA, Ashish K.; TRIPATHI, Chakra D. Commiphora mukul attenuates peripheral neuropathic pain induced by chronic constriction injury of sciatic nerve in rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 18, n. 3, p. 97-102, 2015.

MEINELT, T. *et al.* Reduction in vegetative growth of the water mold *Saprolegnia parasitica* (Coker) by humic substance of different qualities. **Aquatic Toxicology**. v. 83, n. 2, p. 93–103. 2007.

MILLAN, Mark J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in neurobiology**, v. 57, n. 1, p. 1-164, 1999.

MITTAL, Manish et al. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. **Antioxidants & redox signaling**, v. 20, n. 7, p. 1126-1167, 2014.

MISRA, Hara P.; FRIDOVICH, Irwin. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological chemistry**, v. 247, n. 10, p. 3170-3175, 1972.

MOCAN, Andrei et al. Polyphenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of

Lycium barbarum L. and Lycium chinense Mill. leaves. **Molecules**, v. 19, n. 7, p. 10056-10073, 2014.

MOGIL, Jeffrey S. Animal models of pain: progress and challenges. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 4, p. 283-294, 2009.

MZOUGH, Zeineb et al. Wild edible Swiss chard leaves (*Beta vulgaris* L. var. *cicla*): Nutritional, phytochemical composition and biological activities. **Food Research International**, v. 119, p. 612-621, 2019.

MUTHURAMAN, Arunachalam; SINGH, Nirmal. Neuroprotective effect of saponin rich extract of *Acorus calamus* L. in rat model of chronic constriction injury (CCI) of sciatic nerve-induced neuropathic pain. **Journal of ethnopharmacology**, v. 142, n. 3, p. 723-731, 2012.

DE MEDINACELI, Luis; FREED, William J.; WYATT, Richard Jed. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. **Experimental neurology**, v. 77, n. 3, p. 634-643, 1982.

NAHDI, Afef et al. Effect of *Hypericum humifusum* aqueous and methanolic leaf extracts on biochemical and histological parameters in adult rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, p. 144-152, 2018.

NAIK, Ajit K. et al. Role of oxidative stress in pathophysiology of peripheral neuropathy and modulation by N-acetyl-L-cysteine in rats. **European Journal of Pain**, v. 10, n. 7, p. 573-579, 2006.

NAKAZATO-IMASATO, Etsuko; KUREBAYASHI, Yoichi. Pharmacological characteristics of the hind paw weight bearing difference induced by chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. **Life sciences**, v. 84, n. 17-18, p. 622-626, 2009.

NARAYANAN, Sruthi et al. Wheat leaf lipids during heat stress: I. High day and night temperatures result in major lipid alterations. **Plant, cell & environment**, v. 39, n. 4, p. 787-803, 2016.

NASCIMENTO, Paulo Roberto Carvalho do; COSTA, Leonardo Oliveira Pena. Prevalência da dor lombar no Brasil: uma revisão sistemática. **Cadernos de saúde pública**, v. 31, p. 1141-1156, 2015.

NEWTON, Victoria L. et al. Neutrophils infiltrate the spinal cord parenchyma of rats with experimental diabetic neuropathy. **Journal of Diabetes**, 2017.

NGO, Linh T.; OKOGUN, Joseph I.; FOLK, William R. 21st century natural product research and drug development and traditional medicines. **Natural product reports**, v. 30, n. 4, p. 584-592, 2013.

NICKEL, Florian T. et al. Mechanisms of neuropathic pain. **European Neuropsychopharmacology**, v. 22, n. 2, p. 81-91, 2012.

NISHIKAWA, Makiya; HASHIDA, Mitsuru; TAKAKURA, Yoshinobu. Catalase

delivery for inhibiting ROS-mediated tissue injury and tumor metastasis. **Advanced drug delivery reviews**, v. 61, n. 4, p. 319-326, 2009.

NOUMI, E. et al. Antifungal properties of *Salvadora persica* and *Juglans regia* L. extracts against oral *Candida* strains. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 29, n. 1, p. 81, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Estratégia da OMS sobre medicina tradicional 2002–2005, OMS, Geneva, Switzerland, 2002.

OU, Boxin; HAMPSCH-WOODILL, Maureen; PRIOR, Ronald L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4619-4626, 2001.

OVUAKPORIE-UVO, Oghale; IDU, MacDonald; OMOREGIE, Ehimwenma Sheena. Nutrients and chemical composition of *Desplatsia dewevrei*. **Food Science & Nutrition**, v. 7, n. 5, p. 1768-1777, 2019.

OZBEK, Zuhtu et al. Neuroprotective effect of genistein in peripheral nerve injury. **Turk Neurosurg**, v. 27, n. 5, p. 816-822, 2017.

PASERO, C. Pathophysiology of neuropathic pain. **Pain Management Nursing**, v. 5, n. SUPPL., p. 3–8. 2004.

PATHAK, Chandramani et al. Evaluation of benzothioephene carboxamides as analgesics and anti-inflammatory agents. **IUBMB life**, v. 66, n. 3, p. 201-211, 2014.

PICAVET, H.; SCHOUTEN, J. Musculoskeletal pain in the Netherlands: prevalences, consequences and risk groups, the DMC (3)-study. **Pain**, v. 102, n. 1–2, p. 167–178. 2003.

PICK, Edgar; KEISARI, Yona. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **Journal of immunological methods**, v. 38, n. 1-2, p. 161-170, 1980.

PIMENTA, C. Conceitos culturais e a experiência dolorosa. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 32, n. 2. 1998.

PIZZINO, G. *et al.* Review Article Oxidative Stress : Harms and Benefits for Human Health. 2017. v. 2017.

POLJSAK, Borut; ŠUPUT, Dušan; MILISAV, Irina. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2013, 2013.

QUEIROZ, Luiz P.; SILVA JUNIOR, Ariovaldo A. The Prevalence and Impact of Headache in Brazil. **Headache: The Journal of Head and Face Pain**, v. 55, p. 32-38, 2015.

QUINTANS, Jullyana SS et al. Natural products evaluated in neuropathic pain models-a systematic review. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 114, n. 6, p. 442-450, 2014.

KHALIL, Zeinab; LIU, Tao; HELME, Robert D. Free radicals contribute to the reduction in peripheral vascular responses and the maintenance of thermal hyperalgesia in rats with chronic constriction injury. **Pain**, v. 79, n. 1, p. 31-37, 1999.

RAHBARDAR, Mahboobeh Ghasemzadeh et al. Rosmarinic acid attenuates development and existing pain in a rat model of neuropathic pain: an evidence of anti-oxidative and anti-inflammatory effects. **Phytomedicine**, v. 40, p. 59-67, 2018.

RAY, Paul D.; HUANG, Bo-Wen; TSUJI, Yoshiaki. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cellular signalling**, v. 24, n. 5, p. 981-990, 2012.

RE, Roberta et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology and medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. Projeto Madeira do Rio Grande do Sul, 1988.

RIFFEL, Ana Paula Konzen et al. Co-administration of ascorbic acid and α -tocopherol modifies ascorbic acid and attenuates p38, Akt, and TNF- α expression in spinal cord of rats with neuropathic pain. **Nutrire**, v. 45, n. 1, p. 1-10, 2020.

RIFFEL, Ana Paula Konzen et al. Treatment with ascorbic acid and α -tocopherol modulates oxidative-stress markers in the spinal cord of rats with neuropathic pain. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 51, n. 4, 2018.

RIFFEL, Ana Paula K. et al. Systemic administration of vitamins C and E attenuates nociception induced by chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. **Brain Research Bulletin**, v. 121, p. 169-177, 2016.

ROSA, Mariana et al. Effect of seasonality and Cr (VI) on starch-sucrose partitioning and related enzymes in floating leaves of *Salvinia minima*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 118, p. 1-10, 2017.

ROSA, Roseane Leandra da et al. Anti-inflammatory, analgesic, and immunostimulatory effects of *Luehea divaricata* Mart. & Zucc.(Malvaceae) bark. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 3, p. 599-610, 2014.

ROY, Molay K. et al. ORAC and DPPH assay comparison to assess antioxidant capacity of tea infusions: relationship between total polyphenol and individual catechin content. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 61, n. 2, p. 109-124, 2010.

ROIG, Y. & MESA, J. T. Plantas medicinales aromáticas o venenosas de Cuba. Havana: **Cultural**, 1945.

RUEL, Hélène LM; STEAGALL, Paulo V. Adjuvant analgesics in acute pain management. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 49, n. 6, p. 1127-1141, 2019.

SAADÉ, Nayef E.; JABBUR, Suhayl J. Nociceptive behavior in animal models for peripheral neuropathy: spinal and supraspinal mechanisms. **Progress in neurobiology**, v. 86, n. 1, p. 22-47, 2008.

SALA-JUNIOR, V. et al. Floral nectar chemical composition of floral nectar in conventional and transgenic sweet orange, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, expressing an antibacterial peptide. **Plant systematics and evolution**, v. 275, n. 1-2, p. 1, 2008.

SALMON, Adam B.; RICHARDSON, Arlan; PÉREZ, Viviana I. Update on the oxidative stress theory of aging: does oxidative stress play a role in aging or healthy aging?. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, n. 5, p. 642-655, 2010.

SALVEMINI, Daniela et al. Roles of reactive oxygen and nitrogen species in pain. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 5, p. 951-966, 2011.

SANDKUHLER, Jurgen. Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. **Physiological reviews**, v. 89, n. 2, p. 707-758, 2009.

SCHAIBLE, HANS-GEORG; SCHMIDT, ROBERT F. Effects of an experimental arthritis on the sensory properties of fine articular afferent units. **Journal of Neurophysiology**, v. 54, n. 5, p. 1109-1122, 1985.

SCHEID, Taína et al. Effects of methanol fraction from leaves of *Schinus terebinthifolius* raddi on nociception and spinal-cord oxidative biomarkers in rats with neuropathic pain. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, 2018.

SCHEID, Taína et al. Sciatic nerve transection modulates oxidative parameters in spinal and supraspinal regions. **Neurochemical research**, v. 38, n. 5, p. 935-942, 2013.

SHEET PNF. National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS). 2005.

SHAHIDI, Fereidoon; ALASALVAR, Cesarettin; LIYANA-PATHIRANA, Chandrika M. Antioxidant phytochemicals in hazelnut kernel (*Corylus avellana* L.) and hazelnut byproducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 1212-1220, 2007.

SHICHIRI, Mototada. The role of lipid peroxidation in neurological disorders. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**, p. 14-10, 2014.

SIATKA, Tomáš; KAŠPAROVÁ, Marie. Seasonal variation in total phenolic and flavonoid contents and DPPH scavenging activity of *Bellis perennis* L. flowers. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 9450-9461, 2010.

SIES, Helmut. Role of metabolic H₂O₂ generation redox signaling and oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 13, p. 8735-8741, 2014.

SIES, H. Role of reactive oxygen species in biological processes. **Klinische Wochenschrift**, v. 69, n. 21-23, p. 965-968, 1991.

SIEMIONOW, Maria et al. Epineural sleeve neuroorrhaphy: surgical technique and functional results—a preliminary report. **Annals of plastic surgery**, v. 48, n. 3, p. 281-285, 2002.

SILVEIRA, Elza Maria Santos da et al. Age-related changes and effects of regular low-intensity exercise on gait, balance, and oxidative biomarkers in the spinal cord of Wistar rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 52, n. 7, 2019.

SILVEIRA, Y. L. & SILVEIRA, E. Plantas da medicina tradicional indígena Mbyá - Guarani utilizadas para patologias bucais. **XXII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. Resumos**. Cuiabá, 19 a 22 de novembro de 2002.

SIQUEIRA MG. Atividade Antiulcerogênica do Extrato Bruto Hidroalcoólico da *Luehea divaricata* Martus et Zuccarini. 100 f. **Master's thesis**, UNICAMP, Campinas. 2006.

SORG, Olivier. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality?. **Comptes rendus biologies**, v. 327, n. 7, p. 649-662, 2004.

SRIKANTH, Malavika et al. Lysophosphatidic acid and its receptor LPA1 mediate carrageenan induced inflammatory pain in mice. **European journal of pharmacology**, v. 841, p. 49-56, 2018.

STOICEA, Nicoleta et al. Opioid-induced hyperalgesia in chronic pain patients and the mitigating effects of gabapentin. **Frontiers in pharmacology**, v. 6, p. 104, 2015.

SÖDERGREN, E.; NOUROOZ-ZADEH, J.; BERGLUND, L.; VESSBY, B. Re-evaluation of the ferrous oxidation in xylenol orange assay for the measurement of plasma lipid hydroperoxides. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v.37, p.137-146, 1998.

SÖZBIR, Ercan; NAZIROĞLU, Mustafa. Diabetes enhances oxidative stress-induced TRPM2 channel activity and its control by N-acetylcysteine in rat dorsal root ganglion and brain. **Metabolic brain disease**, v. 31, n. 2, p. 385-393, 2016.

TANAKA, Júlio Cesar Akio et al. Constituintes químicos de *Luehea divaricata* Mart. (TILIACEAE). **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 834-837, 2005.

TANAKA, J.C.A.; Vidotti, G.J.; Silva, C.C. A New Tormentic Acid Derivative from *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). **J. Braz. Chem. Soc.**, v.14, p.475-478, 2003.

TIRLONI, Cleide Adriane Signor et al. Influence of *Luehea divaricata* Mart. extracts on peripheral vascular resistance and the role of nitric oxide and both Ca²⁺-sensitive and Kir6.1 ATP-sensitive K⁺ channels in the vasodilatory effects of isovitexin on isolated perfused mesenteric beds. **Phytomedicine**, v. 56, p. 74-82, 2019.

TIRLONI, Cleide Adriane Signor et al. Ethnopharmacological approaches to kidney disease-prospecting an indigenous species from Brazilian Pantanal. **Journal of**

ethnopharmacology, v. 211, p. 47-57, 2018a.

TIRLONI, Cleide Adriane Signor et al. Biomonitoring the cardiorenal effects of *Luehea divaricata* Mart.: An ethnoguided approach. **Journal of ethnopharmacology**, v. 225, p. 53-63, 2018b.

TIRLONI, Cleide Adriane Signor et al. Ethnopharmacological investigations of the cardio-renal properties of a native species from the region of Pantanal, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 206, p. 125-134, 2017.

THIAGARAJAN, Venkata Rathina Kumar et al. Antinociceptive effect of *Butea monosperma* on vincristine-induced neuropathic pain model in rats. **Toxicology and Industrial Health**, v. 29, n. 1, p. 3-13, 2013.

TOLOUEI, Sara Emilia Lima et al. Ethnopharmacological approaches to *Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn.-Exploring cardiorenal effects from the Brazilian Cerrado. **Journal of ethnopharmacology**, v. 238, p. 111873, 2019.

TOMPKINS, D. A.; HOBELMANN, J. G.; COMPTON, P. Providing chronic pain management in the “Fifth Vital Sign” Era: Historical and treatment perspectives on a modern-day medical dilemma. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 173, p. S11–S21. 2017.

TREVISAN, Gabriela et al. TRPA1 mediates trigeminal neuropathic pain in mice downstream of monocytes/macrophages and oxidative stress. **Brain**, v. 139, n. 5, p. 1361-1377, 2016.

TROMM, Camila Baumer et al. Effect of different frequencies weekly training on parameters of oxidative stress. **Revista Brasileira de Cineantropometria & Desempenho Humano**, v. 14, n. 1, p. 52-60, 2012.

UDALL, Margarita et al. Epidemiology of physician-diagnosed neuropathic pain in Brazil. **Journal of pain research**, v. 12, p. 243, 2019.

UGUSMAN, Azizah et al. Flavonoids of *Piper sarmentosum* and its cytoprotective effects against oxidative stress. **EXCLI journal**, v. 11, p. 705, 2012.

VARGAS, Vera MF; GUIDOBONO, Régis R.; HENRIQUES, João AP. Genotoxicity of plant extracts. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 67-70, 1991.

VAN HECKE, O. *et al.* Neuropathic pain in the general population: A systematic review of epidemiological studies. **Pain**, v. 155, n. 4, p. 654–662. 2014.

VANDERAH, Todd W. Pathophysiology of pain. **Medical Clinics**, v. 91, n. 1, p. 1-12, 2007.

ZACCHINO, S. et al. In vitro antifungal evaluation and studies on mode of action of eight selected species from the Argentine flora. **Phytomedicine**, v. 5, n. 5, p. 389-395, 1998.

ZILLIOX LA. Neuropathic pain. **Continuum**, v.23, p. 512-532. 2017.

ZHANG, Guoxin et al. Antinociceptive effect of isoorientin against neuropathic pain induced by the chronic constriction injury of the sciatic nerve in mice. **International immunopharmacology**, v. 75, p. 105753, 2019.

ZHAO, H. *et al.* The role of microglia in the pathobiology of neuropathic pain development: What do we know? **British Journal of Anaesthesia**, v. 118, n. 4, p. 504–516. 2017.

ZHAO, Y. *et al.* ROS signaling under metabolic stress: cross-talk between AMPK and AKT pathway. **Molecular Cancer**, v. 16, n. 1, p. 79. 2017.

ZHOU, Ya-Qun et al. Reactive oxygen species scavengers ameliorate mechanical allodynia in a rat model of cancer-induced bone pain. **Redox Biology**, v. 14, p. 391-397, 2018.

ZHU, Jinheng et al. Characterization of sugar contents and sucrose metabolizing enzymes in developing leaves of hevea brasiliensis. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 58, 2018.

ZHU, Qing et al. Antinociceptive effects of vitexin in a mouse model of postoperative pain. **Scientific reports**, v. 6, p. 19266, 2016.

WAGNER, R.; MYERS, R. R. Schwann cells produce tumor necrosis factor alpha: expression in injured and non-injured nerves. **Neuroscience**, v. 73, n. 3, p. 625-629, 1996.

WALKER, Cristiani IB et al. Morfoanatomia e Histoquímica das folhas de *Luehea divaricata* Mart. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 2, p. 203, 2008.

WANG, Hui et al. Superoxide anion from the adventitia of the rat thoracic aorta inactivates nitric oxide. **Circulation Research**, v. 82, n. 7, p. 810-818, 1998.

WIECH, Katja. Deconstructing the sensation of pain: The influence of cognitive processes on pain perception. **Science**, v. 354, n. 6312, p. 584-587, 2016.

WINTERBOURN, Christine C. Are free radicals involved in thiol-based redox signaling?. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 80, p. 164-170, 2015.

WOLLER, Sarah A. et al. An overview of pathways encoding nociception. **Clinical and experimental rheumatology**, v. 35, n. Suppl 107, p. 40, 2017.

WOOLF, Clifford J. Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. **Nature**, v. 306, n. 5944, p. 686-688, 1983.

YOWTAK, June et al. Effect of antioxidant treatment on spinal GABA neurons in a neuropathic pain model in the mouse. **PAIN®**, v. 154, n. 11, p. 2469-2476, 2013.

YUAN, Ying et al. The protective effects of *Achyranthes bidentata* polypeptides in an experimental model of mouse sciatic nerve crush injury. **Brain Research Bulletin**, v. 81,

n. 1, p. 25-32, 2010.

ANEXO 1



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico

Número: 54348-1	Data da Emissão: 24/05/2016 10:20
-----------------	-----------------------------------

Dados do titular

Nome: Wania Aparecida Partata	CPF: 539.304.446-15
-------------------------------	---------------------

SISBIO

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
3	O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	É necessário a obtenção de anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como de consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
5	Este documento não abrange a coleta de vegetais hidróbios, tendo em vista que o Decreto-Lei nº 221/1967 e o Art. 36 da Lei nº 9.605/1998 estabelecem a necessidade de obtenção de autorização para coleta de vegetais hidróbios para fins científicos.
6	Este documento não é válido para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e c) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Esse documento não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; II) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; III) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; IV) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; V) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outra.

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	ESPÉCIE	Luehea divaricata

ANEXO 2



UFRGS

UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais

**CARTA DE APROVAÇÃO**

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 31394

Título: EFEITO DO EXTRATO DE *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (Malvaceae) SOBRE NOCICEPÇÃO E PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM NERVO ÍSQUIÁTICO E MEDULA ESPINAL DE RATOS COM DOR NEUROPÁTICA

Vigência: 01/08/2016 à 30/12/2020

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

WANIA APARECIDA PARTATA - coordenador desde 01/08/2016
ADARLY KROTH - Aluno de Doutorado desde 01/08/2016

Equipe Externa:

Geisson Marcos Nardi - pesquisador desde 01/08/2016
Rivaldo Niero - pesquisador desde 01/08/2016

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 29/08/2016 - SALA 330 DO ANEXO I DO PRÉDIO DA REITORIA - CAMPUS CENTRO - UFRGS- AV. PAULO DA GAMA, 110 BAIRRO FARROUPILHA, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 150 ratos Wistar adultos, machos, com peso entre 200 -300 gramas, oriundos do CREAL/UFRGS; de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Sexta-Feira, 9 de Setembro de 2016

MARCELO MELLER ALIEVI
Coordenador da comissão de ética