



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
MESTRADO EM ODONTOLOGIA

RENATA PATRÍCIA DE FREITAS SOARES

**IDENTIFICAÇÃO DOS EFEITOS ANALGÉSICOS E  
EMBRIOFETOTÓXICOS DO EXTRATO DAS FOLHAS DE *Cissus*  
*sicyoides* L. EM ROEDORES**

RECIFE  
2006

RENATA PATRÍCIA DE FREITAS SOARES

**IDENTIFICAÇÃO DOS EFEITOS ANALGÉSICOS E EMBRIOFETOTÓXICOS DO  
EXTRATO DAS FOLHAS DE *Cissus sicyoides* L. EM ROEDORES**

Dissertação apresentada à Coordenação do Curso de Mestrado em Odontologia, com área de concentração em Clínica Integrada, Departamento de Prótese e Cirurgia Buco-Facial, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do grau de Mestre em Odontologia.

Orientador:

Prof. Dr. Geraldo Bosco Lindoso Couto

Co-orientador:

Profa. Dr. Edvaldo Rodrigues de Almeida

RECIFE  
2006

**Soares, Renata Patrícia de Freitas**  
**Identificação dos efeitos analgésicos e**  
**embriofetotóxicos do extrato das folhas de *Cissus***  
***sicyoides* L. em roedores / Renata Patrícia de Freitas**  
**Soares. – Recife : O Autor, 2006.**  
**90 folhas : il., tab., fig., quadro.**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal**  
**de Pernambuco. CCS. Odontologia, 2006.**

**Inclui bibliografia e anexos.**

**1. Odontologia – Fitoterapia – Toxicologia. 2.**  
**Plantas medicinais – *Cissus sicyoides* L. – Análise**  
**do extrato – Atividade analgésica e**  
**embriofetotóxica. 3. Testes em ratos Wistar – Efeitos**  
**embriofetotóxicos – Camundongos – Efeito**  
**antinoceptivo. I. Título.**

**616.314: 615.322 CDU (2.ed.) UFPE**  
**615.32 CDD (22.ed.) BC2006 – 469**

**Ata da 52ª Defesa de Dissertação do Curso de Mestrado em Odontologia do Departamento de Prótese e Cirurgia Buco- Facial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 15 de março de 2006.**

Às 9:00(nove horas) do dia 15 do mês de março do ano de dois mil e seis , reuniram-se no Auditório do Curso de Odontologia do Departamento de Prótese e Cirurgia Buco-Facial da UFPE, os membros da Banca Examinadora, composta pelos professores: Prof. Dr Cláudio Heliomar Vicente da Silva, atuando como (presidente) ,Profa. Dra. Ivone Antonia de Souza , atuando como primeira examinadora . Profa. Dra. Márcia Maria Vendicino Barbosa Vasconcelos, atuando como segundo examinador, para julgar o trabalho intitulado **“IDENTIFICAÇÃO DOS EFEITOS ANALGÉSICOS E EMBRIOFETOTÓXICOS DO EXTRATO DAS FOLHAS DE *Cissus sicyoides* L. EM ROEDORES** , da CD **RENATA PATRICIA DE FREITAS SOARES**, candidata ao Grau de Mestre em Odontologia, na Área de Concentração em CLINICA INTEGRADA , sob orientação do professor Dr. GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO e Co-orientação do Prof. Dr. EDVALDÓ RODRIGUES DE ALMEIDA. Dando início aos trabalhos o senhor Vice-Coordenador Prof. Dr. CARLOS MENEZES AGUIAR, convidou os senhores membros para compor a Banca Examinadora, em seguida foram entregues aos presentes cópias do Regimento Interno do Curso de Mestrado em Odontologia, que trata dos critérios de avaliação para julgamento da Dissertação de Mestrado. O presidente da mesa após tomar posse dos trabalhos e conferir os membros convidou a mestranda **RENATA PATRICIA DE FREITAS SOARES**, para expor sobre o aludido tema, tendo sido concedido trinta minutos A candidata expôs o trabalho e em seguida colocou-se a disposição dos Examinadores para arguição. Após o término da arguição os Examinadores se reuniram em secreto para deliberações formais. Ao término da discussão, atribuíram a candidata os seguintes conceitos: Profa. Dra. Ivone Antonia de Souza ( **APROVADA**), Profa. Dra. Márcia Maria Vendiciano Barbosa Vasconcelos ( **APROVADA**), Prof. Dr. Cláudio Heliomar Vicente da Silva ( **APROVADA**) a candidata recebeu três conceitos ( **APROVADA**) é considerada ( **APROVADA COM DISTINÇÃO**), devendo a candidata acatar as sugestões da Banca Examinadora de acordo com o Regimento Interno do Curso. Face a aprovação, fica a candidata, apta a receber o Grau de Mestre em Odontologia, cabendo a UFPE através de sua Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação, tomar as providências cabíveis para os



devidos fins. Nada mais havendo a tratar, o Senhor Presidente da Banca Examinadora encerrou a sessão e para constar eu, Oziclere Sena de Araújo Silva, lavrei a presente Ata que vai por mim assinada, pelos demais componentes da Banca Examinadora e pela recém formada mestre pela UFPE, **RENATA PATRICIA DE FREITAS SOARES.**

*Oziclere Sena de Araújo Silva*  
Renata Patrícia de Freitas Soares

Recife, 15 de março de 2006.

*Cláudio Heliomar Vicente da Silva*  
Prof. Dr CLÁUDIO HELIOMAR VICENTE DA SILVA - UFPE  
Presidente,

*Ivone Antonia de Souza*  
Profa. Dra. IVONE ANTONIA DE SOUZA - UFPE

1º Examinador

*Marcia Maria Vendiciano Barbosa Vasconcelos*  
Profa. Dra. MARCIA MARIA VENDICIANO BARBOSA VASCONCELOS - UFPE

2º Examinador

*Cláudio Heliomar Vicente da Silva*  
*Qualificação*



Colher faz a alegria de todo aquele que planta e, para quem semeia, não há momento maior do que ter nas mãos os frutos de seu trabalho”

Airton Freire

**DEDICATÓRIA**

---

À SUELI, que em seu colo de mãe deu-me a promessa de vida, a resposta do amor, a esperança no mundo e, hoje tornou fácil o que é difícil, com sua força e dedicação, incentivou-me e deu-me impulso para realização deste meu importante trabalho, afetosamente **DEDICO**.

**AGRADECIMENTOS**

---

À Deus que com sua infinita bondade e sabedoria, iluminou a nossa existência, fazendo-se sempre presente em todos os momentos da nossa vida e impulsionando-nos à realização dos nossos ideais;

À Universidade Federal de Pernambuco, na pessoa do Magnífico Reitor Prof. Amaro Henrique Pessoa Lins; ao Centro de Ciências da Saúde da UFPE, na pessoa do Diretor Prof. Dr. José Thadeu Pinheiro; ao Departamento de Prótese e Cirurgia Buco-maxilo-facial da UFPE, na pessoa da Chefe Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lúcia Carneiro de Souza Beatrice; ao curso de Mestrado em Clínica Integrada da UFPR, na pessoa do Coordenador Prof. Dr. Jair Carneiro Leão, pela oportunidade a mim concedida para realizar o Curso de Mestrado em Odontologia.

Ao meu Orientador e amigo, Prof. GERALDO BOSCO, que sempre participou ativamente de minha formação profissional, oferecendo-me sua dedicação, entusiasmo, disciplina e compromisso, meu reconhecimento;

Ao Prof. Dr. Edvaldo Rodrigues de Almeida pelo apoio, confiança, amizade e profundos conhecimentos dispensados na orientação deste trabalho;

A todos os meus professores do Mestrado, pela contribuição que deram ao meu crescimento pessoal, acadêmico e profissional durante os dois anos de curso e em especial à professora Márcia Vasconcelos pela sua amizade e companheirismo;

Aos colegas João Ricardo e Flávia pelos ensinamentos e conhecimentos compartilhados durante a realização desta pesquisa;

Às funcionárias da Pós-graduação em Odontologia, Oziclare e Tânia, pela ajuda nos trabalhos e pela amizade demonstrada no dia a dia;

Ao Sr. Manoel, técnico do Departamento de Antibióticos, pela preparação do extrato;

Às amigas do mestrado Bethânia e Kátia pelo companheirismo e incentivo;

À minha família, Sérgio, Bruno, Andréa e Maria Luíza, Ana e Paulo e Theska, berço da vida e do amor, onde o homem nasce e cresce, célula fundamental no processo da felicidade, minha gratidão pela paciente espera;

À vovó Aurora que muito colaborou com seus cuidados, carinho, amor e muita dedicação para concretização dessa longa jornada.

Ao meu esposo, Cleômenes, que com sua paciência, amizade e dedicação sempre me apoiou em todos os momentos;

Ao CNPq pelo apoio financeiro desta pesquisa;

À todos que contribuíram direta e indiretamente na realização do trabalho.

**SUMÁRIO**

---

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>24</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>28</b>
<b>2.1</b>	<b>Dor e analgésicos opióides</b>	<b>30</b>
<b>2.2</b>	<b>Modo de ação da morfina e dos compostos opióides</b>	<b>34</b>
<b>2.3</b>	<b>Uso terapêutico das plantas medicinais</b>	<b>36</b>
<b>2.4</b>	<b>Considerações sobre o <i>Cissus sicyoides</i></b>	<b>38</b>
<b>2.5</b>	<b>Embriofetotoxicidade</b>	<b>41</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>47</b>
<b>3.1</b>	Objetivo geral	48
<b>3.2</b>	Objetivos específicos	48
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>49</b>
<b>4.1</b>	<b>Materiais</b>	<b>50</b>
4.1.1	Material Botânico	50
4.1.2	Preparação do extrato	50
4.1.3	Animais	51
4.1.4	Drogas, substâncias e soluções utilizadas nos experimentos	52
<b>4.2</b>	<b>Métodos</b>	<b>52</b>
4.2.1	Determinação da DL <sub>50</sub>	52
4.2.2	Estudo do efeito teratogênico do extrato hidroalcoólico do <i>Cissus sicyoides</i> em ratas	53
4.2.3	Estudo dos efeitos tóxicos no desenvolvimento da prole	54
4.2.4	Avaliação do efeito antinociceptivo do <i>Cissus sicyoides</i> no teste da	56

placa quente	
4.2.5 Avaliação do efeito antinociceptivo do <i>Cissus sicyoides</i> no teste de imersão da cauda.	57
4.2.6 Verificação do efeito antinoceptivo observado pela administração diária do <i>Cissus sicyoides</i> , em camundongos.	58
4.2.7 Efeito do CS avaliado através do teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.	59
4.2.8 Avaliação da ação antinociceptiva do CS e da morfina	59
4.2.9 Análise estatística	60
<b>4 5 RESULTADOS</b>	<b>61</b>
5 5.1 Avaliação dos efeitos analgésicos	62
6 5.2 Estudo do possível efeito teratogênico	65
7 5.3 Estudo dos possíveis efeitos tóxicos no desenvolvimento da prole	68
<b>5 DISCUSSÃO</b>	<b>71</b>
<b>8 7 CONCLUSÕES</b>	<b>78</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>81</b>
<b>ANEXO</b>	<b>91</b>

**LISTA DE FIGURAS**

---

## 5 LISTA DE FIGURAS

Fig. 1.	Folha do <i>Cissus sicyoides</i> L.	39
Fig. 2	Aparelho de Rota-vapor	51
Fig. 3.	Feto em posição abdominal	56
Fig. 4.	Feto em posição dorsal	56
Fig. 5.	Aparelho artesanal do Teste da placa quente	57
Fig. 6.	Aparelho artesanal do teste de imersão da cauda	58

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

---

## LISTA DE QUADRO E TABELAS

Quadro 1	- Distribuição das ratas prenhes de acordo com o grupo, dosagem, período e nº de animais	54
Tabela 1	- Efeito do CS e da naloxona em ratos avaliados pelo teste da placa quente.	62
Tabela 2	- Efeito do CS em ratos avaliados pelo teste da imersão de cauda.	63
Tabela 3	- Efeito do CS avaliado pelo número de contorções induzidas pelo ácido acético em ratos.	64
Tabela 4	- Efeito do CS e da morfina administrado por 30 dias determinado pelo teste de imersão de cauda em ratos.	64
Tabela 5	- Efeitos do CS no período do 1º ao 6º dia de administração durante a gestação em ratos.	66
Tabela 6	- Efeito do CS no período do 7º ao 12º dia de administração durante a gestação em ratos.	67
Tabela 7	- Efeito do CS sobre a fertilidade de ratas wistar.	68
Tabela 8	- Efeito da exposição materna ao CS sobre o desenvolvimento pós-natal dos fetos	69
Tabela 9	- Efeito da exposição materna ao CS sobre o peso dos filhotes.	70

## LISTA DE SIGLAS E ABREVEATURAS

---

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

cm – centímetro

mm – milímetro

ml – milímetro

g - grama

mg/Kg- miligrama por kilograma

v/v – volume por volume

CS- Cissus sicyoides

i.p.- intraperitoneal

% - porcentagem

SNC – sistema nervoso central

SNA – sistema nervoso autônomo

$\mu$  - receptor um

$\kappa$  - receptor kappa

$\sigma$  - receptor delta

NMDA - N-metil D-aspartato

$\text{Ca}^{+2}$  – íon cálcio

$\text{K}^{+}$  - íon potássio

NaCl – cloreto de sódio

$^{\circ}\text{C}$  – graus Celsius

AMPc – monofosfato de adenosina cíclico

$\text{TNF}\alpha$  - fator de necrose tumoral

CCK - colecistocinina

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

DL<sub>50</sub> – dose letal 50%

min. - minutos

s – segundos

E.P. – erro padrão

E.U.A - Estados Unidos da América

**RESUMO**



## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi determinar a possível ação analgésica central e ação embriofetotóxica do extrato hidroalcoólico das folhas do *Cissus sicyoides* L. (CS) em ratos e camundongos. Para a avaliação da analgesia foram utilizados os testes da placa quente, imersão de cauda, avaliação do efeito do CS através das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,8%, e o da administração diária do CS por 30 dias, em camundongos, pelo método de imersão da cauda para avaliação de sua possível tolerância. Para todos os testes, exceto o de contorções abdominais, também foi realizado o tratamento prévio com a naloxona (2 mg/kg) (i.p.). Todos os testes apresentaram o efeito analgésico central induzido pelo extrato, estatisticamente significativo com  $p < 0,05$ . Nos grupos que receberam tratamento prévio com a naloxona foi observado o bloqueio do efeito analgésico induzido pelo extrato bem como pela droga padrão (morfina). Em relação a sua ação embriofetotóxica foram avaliados os efeitos teratogênicos e de desenvolvimento da prole. Após a análise estatística dos resultados pode-se concluir que o extrato hidroalcoólico das folhas do CS apresentou uma atividade analgésica central caracterizada pelo bloqueio de sua ação pela naloxona e pelo efeito de tolerância. O extrato hidroalcoólico do CS também apresentou toxicidade durante os períodos avaliados sendo desta forma inadequado para uso em fase gestacional. Contudo, análises bioquímicas e hematológicas são necessárias para complementação deste estudo.

Palavras-chave: *Cissus sicyoides*; analgesia; embriofetotoxicidade, etnofarmacologia.

**ABSTRACT**

---

## 6 ABSTRACT

The objective of the present work was to determine the possible central analgesic and embryofetotoxic action of the hidroalcoholic extract of leaves of *Cissus sicyoides* IL. (CS) in rats and mice. For the evaluation of the effect antinociceptive the tests of the hot plate had been used, immersion of tail, evaluation of the effect of the CS through in the method acetic acid 0,8% induced writhing, and of the daily administration of the CS per 30 days, in mice, for the method of immersion of the tail for evaluation of its possible effect of tolerance. For all the tests, except the one of writhing, also were carried through the previous treatment with naloxone (2 mg/kg, i.p.). All the tests had presented the induced central analgesic effect for the extract, statistics significant with  $p < 5$ . In the groups that had received previous treatment with naloxone was observed the blockade of the induced analgesic effect for the extract as well as for the drug standard. In relation its embryofetotoxic action had been evaluated the teratogenic effect and of development of the offspring. After the analysis statistics of the results can be concluded that the hidroalcoólico extract of leaves of the CS presented a effect antinociceptive central characterized by the blockade of its action for naloxone and for the tolerance effect. The hidroalcoholic extract of the CS also presented toxicity during the evaluated periods being of this inadequate form for use during pregnancy. However, analyses biochemists and haematology are necessary for complementation of this study.

Key-words: *Cissus sicyoides*, analgesic, embryofetotoxic effects, etnofarmacology.



## 1 INTRODUÇÃO

Precisa-se investigar o poder medicinal das plantas para confirmar um efeito orientado popularmente, mas também para esclarecer orientações pouco elucidativas de ordem popular.

As plantas são um verdadeiro laboratório, onde sintetizam-se substâncias que podem ter efeito, tanto benéfico como maléfico, para o organismo humano. A utilização de chás pode ser, a princípio, mais aceita do que a alopatia, mas precisa haver um conhecimento prévio dos componentes desses chás, pois, a presença de inúmeras substâncias, neles contidas, pode produzir efeitos principalmente, quando tomadas ao longo do tempo, embora a maioria dos efeitos seja benéfico (ALMEIDA, 1993).

As substâncias que encerram um preparo popular podem conter uma ação sinérgica e, quando tomadas isoladamente não produzem efeitos, de onde advém a grande vantagem dos chás. Mas essas ações podem produzir ao longo do tempo, efeitos não conhecidos, que assumem natureza tóxica, a exemplo do Confrei (*Symphytum officinale*), que é utilizado, popularmente, para inúmeras enfermidades, parecendo realmente ter um efeito terapêutico, mas quando utilizado com muita frequência, apresenta efeitos tóxicos para o organismo humano e animal, tendo sido constatado câncer de fígado em animais de experimentação (HIRONO; HAGA, 1979).

Em Odontologia, situações onde o problema dor está envolvido são acentuadas. A aplicabilidade dos analgésicos é inegavelmente de grande valia, geralmente atuando como medicação de suporte, visto que o emprego de analgésico constitui-se na chamada terapêutica sintomática (ROCHA et al., 2004).

Existem várias espécies de plantas medicinais usadas na terapia de diversas doenças. Uma delas é o *Cissus sicyoides* L. (CS) da família Vitaceae, também conhecida como cipó-pucá, anil trepador, bejuco ubí, usada no Brasil para diversos males tais como a epilepsia, derrames cerebrais, abscessos e, principalmente, no tratamento da diabetes, uma doença responsável por sérias complicações e que afeta um grande número de pessoas em todo mundo (VIANA et al., 2004; CANO; VOLPATO, 2004).

Para Beltrame et al. (2001), há um amplo consumo da *Cissus sicyoides* pela população brasileira. Este hábito, incentivado pela mídia, dentro da idéia “o que é natural é bom/o que é sintetizado é ruim” tem incentivado a população a empregar essa planta no tratamento do diabetes mellitus, facilitando o desenvolvimento de complicações crônicas (hipertensão arterial, impotência sexual etc.) que ocorrem em proporção direta à ineficácia do tratamento.

Portanto, a pesquisa químico-farmacológica das plantas se faz necessária pelo grande poder terapêutico que elas apresentam e, também, pela necessidade de tornar-se posição independente no campo da indústria farmacêutica. Além

disso, o conhecimento dos componentes dos chás mais utilizados irão tornar a terapêutica nacional mais acessível à população pobre do país (ALMEIDA, 1993).

Dessa forma é de extrema importância a continuação da identificação do perfil farmacológico e toxicológico do *Cissus sicyoides* (CS) como também, de novas informações sobre o uso do extrato dessa planta para que se possa alertar a população de possíveis efeitos colaterais/adversos com relação à toxicidade e à embriofetotoxicidade, garantindo assim, segurança no seu uso durante a fase de gestação, bem como na identificação de uma possível ação analgésica central, proporcionando desta forma o seu futuro como um fitoterápico, para utilização em Ciências da Saúde, incluindo na Odontologia.

**REVISÃO DA LITERATURA**

---

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

Vários estudos farmacológicos têm demonstrado a ação de extratos vegetais em diversas patologias induzidas experimentalmente em animais de laboratório, o que tem aberto perspectivas favoráveis no sentido de se ter nas plantas uma grande fonte de substâncias, que num futuro próximo, poderão ter emprego na terapêutica convencional (alopatia), através do isolamento e identificação de princípios ativos, para os mais variados males que afligem o homem (CASTRO; FERREIRA, 2001).

O uso de plantas como agentes terapêuticos vem sendo muito intenso principalmente devido aos efeitos colaterais de grande parte dos produtos alopáticos existentes. Em geral, as pessoas têm tendência a supervalorizar as plantas com base na citação popular de que “tudo que é natural não faz mal”. No entanto, tal afirmação não reflete a verdade, pois o conhecimento inadequado da dose, da parte empregada, dos compostos existentes no extrato da planta pode acarretar sérios problemas ao indivíduo (ABDULLAH et al., 1990; ALMEIDA, 1993). Além disso, é sabido que chás preparados a partir de plantas de uso popular podem produzir sérios efeitos adversos em animais e em seres humanos (HUXTABLE, 1980; SCHOENTAL, 1982). Esses e outros aspectos motivaram a intensificação de pesquisas com plantas usadas na medicina popular, principalmente visando esclarecer os possíveis efeitos tóxicos, como também utilizá-las *in natura* para as várias patologias inclusive às relacionadas com o Sistema Nervoso Central (SNC), dentre elas a analgesia.

### 3.1 Dor e analgésicos opióides

A história dos analgésicos de ação central teve seu início em 1806 com o isolamento e identificação da morfina, que levou em seguida, a descoberta de outros alcalóides do ópio, como a codeína por Robiquet, em 1832, e a papaverina por Merck, em 1848, promovendo uma revolução no alívio da dor, controlada por mecanismos centrais. Como existe grande dificuldade na síntese da morfina, a droga ainda hoje é obtida do ópio, extraída da papoula, *Papaver somniferum* (PASTERNAK, 1993).

Considerando os diversos problemas que envolvem mecanismos centrais, os inerentes a dor têm merecido uma especial atenção dos estudiosos da área, em razão de ser a dor, em muitos casos, o único e destacado sintoma apresentado em várias patologias de origem inicialmente desconhecida, e o seu alívio podendo ser obtido de forma adequada por meios farmacológicos, com os agentes analgésicos (DUARTE, 2005).

O controle da dor no atendimento odontológico é essencial para que o profissional alcance seus objetivos. A dor é, ao lado do medo um dos principais fatores responsáveis pelo comportamento do paciente frente ao tratamento. As odontalgias embora consideradas somáticas superficiais (localizadas) e melhor suportadas, muitas vezes, apresentam-se como dor profunda, mal localizadas, associadas a náuseas, palidez, sudorese e podem ser referidas a outras áreas e,

nessas condições, além de dificultar o diagnóstico, constituem-se exceção à regra (ROCHA et al., 2004).

A procura de novos opióides tem sido intensa nos últimos anos, devido ao fato de que os atuais representantes desse grupo, embora tendo comprovada eficácia terapêutica apresentam intensos e preocupantes efeitos colaterais nos seus usuários, principalmente a tolerância e a dependência, em decorrência do seu necessário uso contínuo (ALMEIDA, 2002).

A morfina tem a capacidade de promover efeitos depressores e/ou estimulantes que são particularizados por uma série de alterações no organismo, produzidos em decorrência de uma ação direta nos receptores opióides do tipo  $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\sigma$ , e de seus respectivos subtipos, e no trato gastrointestinal, induzindo a uma mistura de efeitos estimulantes e depressores, cuja ação global é a diminuição da atividade neuronal (DUTHIE; NOMO, 1987).

Entre os mais destacados efeitos depressores estão: analgesia ( $\mu_2$ ), sonolência, alerta mental diminuído ( $\mu$  e  $\kappa$ ), depressão respiratória ( $\mu_2$ ), aumento da pressão intracraniana ( $\mu_1$ ), supressão da tosse ( $\mu_2$ ), peristalse intestinal diminuída ( $\mu_2$ ), menor secreção ácida gástrica ( $\mu_2$  e  $\kappa$ ), inibição do centro do vômito ( $\mu_1$ ), diminuição da temperatura corporal ( $\mu_1$ ), diminuição da liberação do hormônio luteinizante e do hormônio foliculoestimulante ( $\mu_1$ ) (SNYDER; CHILDRES, 1979; DUTHIE; NOMO, 1987).

Considerando ser a depressão do SNC a ação predominante dos opióides, às vezes observa-se efeito sobre o Sistema Nervoso Autônomo (SNA) como a contração da pupila (miose), que tem grande importância toxicológica, já que ajuda na identificação clínica de usuários de heroína. Efeito este que é revertido pela aplicação oftálmica de escapolamina (SAWYNOK; SCHLICHTING, 1986).

Um segundo local de ação dos opióides é o trato gastrointestinal, local com predominância dos receptores ( $\mu$  e  $\sigma$ ), os quais tanto resultam em ações consideradas úteis do ponto de vista terapêutico, quando podem produzir efeitos colaterais indesejáveis, especialmente naqueles pacientes que necessitam do uso por um período longo. Assim, pelo fato de produzirem constipação intestinal, eles são eficazes no tratamento sintomático da diarreia, onde não se observa nenhuma ação de tolerância para esse efeito (KOJIMA et al., 1974 ; KROMER 1988).

Quanto aos principais efeitos estimulantes os analgésicos opióides apresentam; euforia ( $\mu_1$ ), aumento da liberação de prolactina ( $\mu_1$ ) e efeito convulsivante ( $\mu_1$ ) em doses altas. Por outro lado, a ação decorrente do uso prolongado desses analgésicos nos receptores  $\mu$  e  $\kappa$  é responsável pelo desenvolvimento dos fenômenos de tolerância e dependência (PAN, 1998; DRUMOND, 2000).

A tolerância e a dependência representam as ações mais indesejáveis que os analgésicos opióides provocam no homem. A tolerância se caracteriza pela redução do efeito da droga devido ao seu uso contínuo, já a dependência é o estado resultante da absorção periódica ou contínua de certas substâncias químicas (analgésicos, alucinógenos, hipnóticos, psicofarmacológicos) no qual o indivíduo tem necessidade de uso contínuo. A dependência pode ocorrer também na forma cruzada, na qual drogas de diferentes classes químicas podem reforçar a dependência ou a abstinência (HURLÉ, GIRIGOLZARRI; VALDIZÁN, 2000).

Estudos “*in vivo*” com animais demonstraram a participação de outros neurotransmissores no desenvolvimento da tolerância a morfina. O bloqueio das ações do glutamato por antagonistas do receptor NMDA (N-metil D- aspartato) e a glicina impede a tolerância e a dependência (TRUJILLO e AKYL, 1991). Já o óxido nítrico também tem participação no efeito da tolerância aos opióides, no entanto, o bloqueio da sintetase do óxido nítrico tem uma ação inibitória sobre o efeito da tolerância produzida pela morfina (KOLESNIKOV et al., 1994). Embora os antagonistas dos receptores NMDA e os inibidores da síntese do óxido nítrico sejam eficazes sobre o efeito de tolerância produzido pela morfina e os agonistas  $\sigma$ , eles apresentam pequeno efeito contra a tolerância promovida pelo receptor  $\kappa$ . Estes efeitos podem ser revertidos parcial ou totalmente com seus respectivos bloqueadores, e o efeito da tolerância e da abstinência estão intimamente relacionados com a participação dos receptores  $\sigma$  e  $\kappa$  respectivamente (CRAIN; SHEN, 1998).

Uma outra grande utilização clínica dos opióides tem sido seu uso como agente pré-anestésico com a finalidade de produzir analgesia, sedação, redução da ansiedade e ainda potencializar os efeitos dos anestésicos gerais. Os opióides mais usados com esta finalidade são a própria morfina (opiáceo) e o fentanil (hipnoanalgésico sintético) (DEWEY et al., 1997).

A naloxona e a naltrexona, alil derivados da oximorfona, são considerados antagonistas puros e interagem com os três tipos de receptores opióides  $\mu$ ,  $\kappa$ ,  $\sigma$  (GUSTEIN; AKIL, 2001).

### **3.2 Modo de ação da morfina e compostos opióides**

Os opióides são usados em grande escala no tratamento da dor. Esse grupo inclui a morfina (opiáceo), alcalóide natural extraído da *Papaver somniferum*, componente do ópio, os opióides semi-sintéticos, mas também os opióides endógenos, que agem através dos receptores opióides com seus respectivos subtipos  $\mu_1$ ,  $\mu_2$ ,  $\sigma_1$ ,  $\sigma_2$ ,  $\kappa_1$ ,  $\kappa_3$ ,  $\epsilon$  e  $\sigma$  (DHAWAN et al., 1996; SATOH et al., 2000), os dois primeiros são os mais importantes, estão acoplados à proteína ( $G_{i/o}$ ) de ligação ao trifosfato da guanosina, sensível à toxina pertussis, onde produz sua ativação e conseqüentemente redução na atividade da ciclase de adenilil, resultando na queda da produção do monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), além de bloquear a entrada de  $Ca^{+2}$  para o meio intracelular e diminuir a sua saída

da célula, levando conseqüentemente a hiperpolarização celular através da saída do íon K<sup>+</sup> do meio intracelular (MILLAN, 1999; PRADO, 2001).

Segundo Woolf; Mannion (1999), os danos e as lesões aumentariam a sensibilidade dos receptores periféricos, sendo à base da hiperalgesia no local da lesão, produzindo um aumento na excitabilidade do corno dorsal da medula espinhal e produzindo a liberação de neurotransmissores álgicos (DUNNER, 1991). Esse conceito tem importância clínica, pois se a excitabilidade dos tecidos periféricos estiver diminuída parece também que a estabilidade do corno central da medula e, portanto, o limiar da dor estará diminuído (WAAL, 1988).

Os sistemas envolvidos tanto nas vias nociceptivas aferentes quanto antinociceptivas eferentes, apresentam diversos neurotransmissores peptidérgicos, demonstrados até o momento, tais como, taquicinas, substância P, neurocininas (NK-2 e NK3), bombesina, colecistocinina (CCK), somatostatina, galamina, encefalinas e dimorfina A, na região onde os gânglios da raiz dorsal se encontram com os corpos celulares dos neurônios aferentes primários, sintetizando diversas substâncias com a ação neurotransmissoras ou neuromoduladoras durante o processo da dor (MENDELL, 1966).

Dentre esses neurotransmissores destacam-se a substância P, o glutamato, a neurocinina A, o peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGRP), a colecistocinina (CCK), a nociceptina e o peptídeo intestinal vasoativo (VIP). Todas essas substâncias produzidas no gânglio da raiz dorsal são capazes

de estimular as células espinhais nociceptivas. Os peptídeos opióides endógenos (encefalinas e dinorfinas), a somatostatina e a galanina são também produzidos no gânglio da raiz dorsal, no entanto, possuem ação inibitória nas células nociceptivas espinhais, compreendendo principalmente a bombesina, o hormônio liberador da tirosina, o neuropeptídeo Y, a neurotensina A, as neuromedinas B e C, o peptídeo natriurético atrial e cerebral, o peptídeo YY e a proctolina (WOOLF; MANNION, 1999).

Os terminais dos nociceptores primários periféricos (neurônios aferente primários - NAPS) possuem receptores para a bradicinina ( $B_2$ ), prostaglandinas  $I_2$ , e  $E_2$ , e opióides ( $\mu$  e  $\sigma$ ), histamina, serotonina, noradrenalina ( $\beta_2$ ) e acetilcolina, os quais são liberadas durante o processo de lesão tecidual. A liberação do fator de necrose tumoral ( $TNF\alpha$ ), se faz através da substância P e da bradicinina durante o processo de injúria tecidual. Além dos terminais espinhais dos neurônios aferentes periféricos, neurônios intrínsecos gabaérgicos, colinérgicos, encefalinérgicos e liberadores da substância P também foram encontrados na medula espinhal e estão envolvidos na modulação da entrada de estímulos nociceptivos (RANG et al., 1991; WOOLF; MANNION, 1999).

### **3.3 Uso terapêutico das plantas medicinais**

Tem-se no estudo das plantas medicinais através de métodos validados pela literatura internacional, o estabelecimento de uma relação racional entre o

uso das plantas medicinais e a cura das doenças por meio de substâncias bioativas obtidas através das plantas superiores (CASTRO; FERREIRA, 2001).

A interação entre estas duas situações é alcançada quando os pesquisadores, em busca de novos medicamentos, vão até a população e efetuam levantamentos etnofarmacológicos e/ou etnobotânico para realização de seus ensaios e comprovam ou não a eficácia através de testes laboratoriais “*in vitro*” e/ou “*in vivo*”. A medicina popular também se beneficia das técnicas elaboradas pelos pesquisadores, aperfeiçoando o método terapêutico com a adoção de práticas que procuram a melhor utilização das plantas medicinais. As relações entre o conhecimento popular e o científico podem ser enquadradas dentro de uma mesma dialética. O conhecimento popular é fundamentado em bases empíricas e em resultados práticos, que contribuem para a solução de problemas do cotidiano, contrapondo-se ao conhecimento científico, o qual se fundamenta em teorias comprovadas experimentalmente através de métodos validados pela comunidade científica (FARNSWORTH; BINGEL, 1997).

A busca de novos medicamentos obtidos à base de plantas representa a esperança mais concreta para pacientes que sofrem de graves doenças. Nesse sentido a indústria farmacêutica chega a investir em torno de 250 milhões de dólares, de 10 a 20 anos na pesquisa e desenvolvimento de um novo medicamento (FERREIRA et al., 1998; CALIXTO et al., 2000).

Estima-se que o número de espécies de plantas seja superior as que foram descritas até o momento seja de 250.000 a 750.000. Atualmente, apenas 119 substâncias derivadas de plantas foram usadas para fins terapêuticos as quais foram obtidas de cerca de 90 espécies. Destes, 119 compostos químicos, 74% têm o mesmo uso ou parecido com o das plantas empregadas na medicina popular segundo Farnsworth e Bingel (1997). No Brasil, com cerca de 30% das florestas tropicais do planeta, estima-se que existam entre 55.000 a 80.000 espécies vegetais só na Amazônia brasileira, e menos de 2% delas foram estudadas pelos pesquisadores até os dias atuais (FERREIRA et al., 1998).

Embora grande parte da população recorra as plantas medicinais como fonte para obtenção do efeito analgésico que envolva mecanismo central, o potencial que as plantas apresentam em produzir substâncias com esse tipo de ação é quase inexplorado devido à grande diversidade de espécies existentes em todo mundo (ALMEIDA, 2002). Dessa forma diversas pesquisas são realizadas anualmente com este com este fim, utilizando metodologias comportamentais, em roedores, sendo que apenas algumas destas apresentam com possibilidades de evoluir para um estudo clínico (CASTRO; FERREIRA, 2001).

### **3.4 Considerações sobre o *Cissus sicyoides* L.**

O *Cissus sicyoides* L. (CS) é uma planta da família das Vitaceae conhecida popularmente como 'Bejuco caro', 'Bejuco de parra' ou insulina vegetal, Bejuco upí (VIANA et al., 2004; CANO; VOLPATO, 2004). É encontrada na Flórida (EUA), nas

Antilhas e na América tropical, sendo que no Brasil concentra-se especialmente nos Estados da Amazônia, Bahia, Ceará e Rio de Janeiro (ALMEIDA, 1993) e o chá preparado a partir das partes aéreas é utilizado no tratamento de varias patologias, como exemplo a diabetes *mellitus* tipo 2 (MORI et al., 2001).

No Brasil, o CS é utilizado pela medicina popular em diversas doenças, como a epilepsia, derrame cerebral bem como um abscessos e no tratamento de diabetes mellitus do tipo 2. Atividades antiinflamatórias e anti-reumáticas também são atribuídas a planta (; MORI et al., 2001; VIANA et al., 2004).



Figura 1 – Folha do *Cissus sycoides* L.

O chá das partes aéreas do CS, também conhecido como cortina-japonesa, uva brava e anil trepador é utilizado como antiinflamatório, antireumático, antiepiléptico, antihipertensivo, antitérmico e antidiabético (Silva et al., 1996).

No norte do Pará, o CS é conhecido como insulina e o chá das partes aéreas é utilizado como insulina e é utilizado no tratamento do diabetes mellitus tipo 2, cuja prevalência alcança 7% da população acima de 40 anos. O uso popular do CS ocorre concomitantemente ou em substituição ao tratamento médico convencional (BELTRAME et al., 2001).

No entanto, Beltrame et al. (2001, 2002) em seus estudos não encontraram uma atividade antidiabética do CS através da avaliação da determinação do índice de glicogênio em ratos. Já Garcia et al. (1997, 2000) demonstraram atividades vasoconstrictora e antibacteriana. A ação antiinflamatória também foi demonstrada (GARCIA, 2000). Elisabetsky; Brum; Souza (1999) demonstraram a atividade anticonvulsivante do óleo essencial linalool extraído do CS.

Recentes pesquisas mostraram que o extrato aquoso do *Cissus sicyoides* contraiu anéis aórticos de cobaias de modo dose-dependente. Os autores concluíram que o extrato age em nível da membrana, aumentando a entrada de cálcio bem como agindo no depósito interno de cálcio do retículo endoplasmático (GARCIA et al., 1997). Em uma recente pesquisa, o extrato aquoso do *Cissus sicyoides* mostrou um efeito antiinflamatório, determinado em um modelo de carragenina induzindo edema de patas em ratos (modelo para inflamação geral), e em edemas de orelhas de camundongos (modelo para inflamação tópica). Estes autores também observaram uma diminuição no nível de mieloperoxidase em amostras teciduais da área inflamada (GARCIA et al., 2000).

Enquanto Saenz et al., (2000) demonstrou uma atividade citotóxica no *Cissus sicyoides* contra células HEp-2. Porém, Lizama, Martinez; Perez (2000) não detectaram nenhuma atividade antiviral contra o vírus da influenza tipo A, nesta espécie de célula.

Medeiros et al., 2002a; Medeiros et al., 2002b afirmam que o extrato aquoso do *Cissus sicyoides* apresenta uma atividade anti-nociceptiva demonstrado através dos testes de contrações abdominais induzidas pelo ácido acético, formalina e teste de placa quente em camundongos. Ainda segundo os referidos autores o extrato aquoso do *Cissus sicyoides* também apresenta propriedades anticonvulsivantes evidenciados nos modelos de convulsões induzidas pela estriquina.

### **3.5 Embriofetotoxicidade**

Desde as mais remotas civilizações que se tem conhecimento vem sendo registrada uma certa cautela durante a gravidez. Entretanto, até pouco tempo atrás, julgava-se estar o feto em local privilegiado, pouco exposto ao ambiente, as vezes adverso, ao qual estão submetidas as mães. O termo “barreira placentária” foi amplamente utilizado, mas vem a ser uma verdadeira contradição, uma vez que, a maioria das drogas e das substâncias lipossolúveis atravessam a barreira facilmente. (NIEBYL, 1983).

Muitas drogas ou produtos químicos podem ser causadoras de malformações congênitas, sendo chamados então de teratógenos. As drogas variam consideravelmente em sua teratogenicidade. Algumas podem causar malformações severas, se administradas durante o período organogênico, como, por exemplo, a talidomida; outras drogas, de uso social, produzem retardamento mental e do crescimento, quando utilizadas em excesso ao longo do desenvolvimento, como é o caso do álcool (MOORE, 1990).

A indução de embriopatias pela talidomida vem sendo descrita desde que os efeitos da droga foram descobertos em 1961 (MILLER; STROMLAND, 1999). O incidente envolvendo esta droga levou à criação, por parte dos setores normativos, da exigência de se submeter à experimentação animal os agentes terapêuticos, visando detectar os potenciais teratogênicos antes da sua distribuição ampla no mercado. Com os dados fornecidos pelo Projeto Colaborativo Perinatal, tornou-se possível à elaboração do primeiro estudo prospectivo sobre o uso de drogas durante a gestação (NIEBYL, 1983).

O estudo farmacológico necessário para o desenvolvimento de uma nova droga implica em diversas etapas a serem seguidas, envolvendo testes pré-clínicos e clínicos, incluindo aqueles que se referem aos possíveis efeitos fetotóxicos da droga em estudo. Atualmente, no Brasil, o cumprimento legal destas etapas, são baseados nas normas elaboradas pela AVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA, 2000).

A portaria nº 116, de 08 de agosto de 1996 da Secretaria de Vigilância Sanitária (SVS) propôs normas para estudos da toxicidade e da eficácia de produtos fitoterápicos, envolvendo ensaios pré-clínicos e clínicos.

A petição de registro de medicamentos fitoterápicos novos deve atender aos itens concernentes às especificações de qualidade presentes na resolução nº 17, de 24 de fevereiro de 2000 da Agência Nacional de Vigilância – ANVISA, órgão que substitui a SVS.

Entende-se por agente tóxico uma substância química capaz de causar dano a um sistema biológico, alterando seriamente sua função ou levando-o à morte. Esse efeito correlaciona-se com as condições as quais o organismo é exposto como: dose, tempo de tratamento, nível de estresse, etc. Assim, a manifestação do efeito tóxico depende de condições internas do organismo, além das condições ambientais em que o organismo foi submetido (ZANINI; OGA, 1996).

Segundo esta resolução um medicamento fitoterápico é aquele medicamento farmacêutico obtido por processos tecnologicamente adequados, empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade.

Seguindo o conceito exposto, a fetotoxicidade e efeito teratogênico são manifestados pela presença de um maior número de reabsorções, malformações esqueléticas e diminuição da massa corpórea fetal, decorrentes dos componentes químicos da droga utilizada (MELLO et al., 2005).

O crescimento e desenvolvimento fetal normal dependem de uma complexa integração genética, endócrina, imunológica, nutricional e vascular e durante esta fase, os órgãos em crescimento necessitam da glicose materna como um dos seus principais nutrientes (CAMPBELL, 1976; CATALANO, 1995; CHANG et al., 2002).

A exposição diária a algum tipo de estresse durante a gestação pode causar reabsorção fetal em ratas e pode prejudicar o desenvolvimento comportamental dos filhotes sobreviventes (FRIDE; WEINSTOCK, 1984). Também estímulos ambientais, durante o período materno, têm duradouros efeitos sobre o comportamento emocional e reação ao estresse em animais adultos (LEVINE, 1962; DENENBERG, 1964)

A avaliação do efeito teratogênico de um composto químico, através de ensaios pré-clínicos, pode ser executada num complexo protocolo envolvendo três fases distintas. Nos estudos da terceira fase avaliam-se os efeitos do composto sobre o desenvolvimento peri e pós-natal. Nesta etapa, são avaliados os desenvolvimentos somático, neuromotor, sensorial e comportamental da prole (LARINI, 1997).

A exposição materna a vários xenobióticos durante a gestação pode causar neurotoxicidade no desenvolvimento e/ou ainda anormalidades no comportamento dos recém-nascidos que podem persistir durante toda a sua vida sendo o sistema nervoso central, durante o seu desenvolvimento, especialmente susceptível (GRAY et al., 1981; CASTRO & PALERMO-NETO, 1988; CASTRO; BERNARDI; PALERMO-NETO , 1989; NELSON, 1990; WINNEKE, 1992; HOLEMANS et al., 2003).

A toxicidade do desenvolvimento compreenderia quatro manifestações de desenvolvimento anormal devido a uma exposição pré-natal: alterações do crescimento (atraso no desenvolvimento, diminuição de massa corpórea fetal), morte, malformações e déficits ou prejuízos funcionais (BRODY et al., 1997).

Para a realização da avaliação do possível efeito teratogênico de uma substância faz-se necessária a análise dos efeitos provocados pela mesma nos diferentes períodos gestacionais, durante o período de gestação pela exposição materna a um agente químico tóxico que pode levar a diversas respostas e essa variação de resposta esta intimamente ligada ao estágio de desenvolvimento atingido pelo concepto. O período de gestação pode ser dividido em três estágios diferentes: o 1° ao 6° dia de gestação em ratos (1° ao 17° dia em humanos) é considerado o período de pré-implantação no qual o embrião se encontra com células indiferenciadas em divisão mitótica onde a redução destas podem promover retardo na formação do blastocisto com o aumento de perdas de pré e

pós implantação esta fase é tida como o período do tudo ou nada e dependendo do número de células atingidas pelo agente teratogêno, pode ocorrer a simples reposição das mesmas por células normais, ou se atingido um grande número de células a embriofetalidade (KVITO, 1986; KOLA, 1986; HOLEMANS et al., 2003).

O próximo período é iniciado no 7º dia de gestação indo até o 12º dia em ratos (2º - 8º semana em humanos) e compreende o período de organogênese, fase mais crítica onde ocorre maior susceptibilidade aos agentes teratogênicos (CASARET; DOULL'S, 1975; BRENT, 1993). A última fase compreende o período fetal, período este de diferenciações histológicas e funcionais e não suscetível aos agentes teratogênicos no que se diz respeito às malformações (ZANINI; OGA, 1996).

**OBJETIVOS**

---

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar a ação analgésica e embriofetotóxica do extrato hidroalcoólico do *Cissus sicyoides* L., em roedores – *Rattus norvegicus albinus wistar* e *Mus musculus albinus swiss*.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- a) estimar o seu possível efeito teratogênico;
- b) verificar possíveis alterações no desenvolvimento da prole;
- c) averiguar a ação analgésica central do *Cissus sicyoides* L.

**MATERIAIS E MÉTODOS**

---

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Materiais**

#### **4.1.1 Material Botânico**

As folhas do CS foram coletadas na área metropolitana da cidade do Recife principalmente nos arredores do Campus universitário da Universidade Federal de Pernambuco, onde, após a identificação do material botânico da espécie, sua exsicata foi depositada no HERBÁRIO GERALDO MARIZ do Departamento de Botânica desta mesma Universidade sob a numeração 29040.

#### **4.1.2 Preparação do extrato**

As folhas do *C. sicyoides* L. foram lavadas e deixadas para secar em estufa a uma temperatura de 45°C; em seguida foram levadas ao moinho para a produção de grãos de espessura inferior a 1 mm; 360 gramas do pó, formado a partir da planta, foi adicionado a 1000 mL de álcool mais água numa proporção de 70:30 por 48 horas em um aparelho de Soxhlet e, a seguir, concentradas, usando-se um rota-vapor, para obtenção do material do extrato seco. O pó seco das folhas rendeu aproximadamente 30% do extrato hidroalcoólico.



Fig. 2. Aparelho de Rota-vapor

#### 4.1.3 Animais

Nos experimentos foram utilizados ratas (*Rattus norvegicus*) da cepa Wistar, nuligestas, pesando em média 150 - 250 g, e camundongos albinos (*Mus musculus*) Swiss, pesando em média 20 - 30 g, perfazendo um total de 204 animais, obtidos do Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.. Os animais estiveram sempre sob o controle da temperatura de  $23 \pm 1^{\circ} \text{C}$ , com um ciclo claro /escuro de 12 horas, iniciando-se a fase clara às 06:00 horas da manhã, com livre acesso à água e comida. Todos os experimentos foram realizados entre 09: 00 e 16:00 horas sendo os animais cuidadosamente monitorados e mantidos de acordo com a recomendação ética do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e do National Institute of Health Guide for Care and use of Laboratory Animals, sendo adotadas como critérios de avaliação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

da UFPE a qual forneceu parecer favorável a realização do experimento no processo sob o nº 006390'2004-85.

Após os experimentos os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e encaminhados para o Departamento de Cirurgia Experimental para incineração.

#### 4.1.4 Drogas, substâncias e soluções utilizadas nos experimentos.

- a) Ácido acético glacial (Merck, Brasil);
- b) Extrato hidroalcoólico das folhas da *Cissus sicyoides* L.;
- c) Hidrocloridrato de naloxona (Research Biochemical Inc, E.U.A.);
- d) Morfina (Merck, E.U.A.);
- e) Solução de cloreto de sódio a 0,9 % (Merck, Brasil).
- f) Tween 80 a 0.025%
- g) solução salina (0,9%; 0,1 mL/100 g).

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Determinação da DL<sub>50</sub>

A toxicidade aguda (DL<sub>50</sub>) foi determinada usando-se o extrato nas doses de 100, 500, 1000, 2000 e 3000 mg/kg (i.p.) em cinco grupos de cinco camundongos cada. Os animais foram observados para sinais e sintomas de toxicidade sendo registrado o número de mortes em cada grupo em 48 horas.

#### 4.2.2 Estudo do efeito teratogênico do extrato hidroalcoólico do *Cissus sicyoides* em ratas.

Foi feito um acompanhamento diário do ciclo estral através do esfregaço vaginal para determinação do período fértil (estro), no qual a rata foi colocada em contato com machos de fertilidade previamente comprovada onde a confirmação da prenhez foi indicada pela presença de espermatozoides em lâminas de esfregaço vaginal, sendo tal dia considerado o 1º da prenhez. As ratas prenhas foram distribuídas, aleatoriamente, em 3 grupos: Controle (C), Tratado 1 (T1) e Tratado 2 (T2) ambos subdivididos em 6 animais, descritos no quadro 1. Os animais do grupo controle receberam solução salina (0,9%; 0,1 mL/100 g) e os do grupo testes (T1 e T2) receberam 300, 600, 1000 mg/kg do extrato hidroalcoólico do CS, ambas as doses foram administradas por via oral e ao 19º dia foi realizada a laparotomia para remoção dos cornos uterinos com o intuito de realizar uma avaliação teratogênica e abortiva através dos seguintes parâmetros: peso materno, número, tamanho, peso de fetos viáveis, presença / ausência de malformações macroscópicas, número de corpos lúteo e índice de reabsorções (ALMEIDA et al., 1988; ALMEIDA; MELO; XAVIER, 2000).

<b>Grupo</b>	<b>Dosagem</b>	<b>Período</b>	<b>N° de animais</b>	
<b>C</b>	Solução salina (0,9% ; 0,1 ml/100 g)	1° ao 12°	6	
<b>T 1</b>	<b>GI</b>	300 mg/kg do extrato	1° ao 6°	6
	<b>GII</b>	600 mg/kg do extrato	1° ao 6°	6
	<b>GIII</b>	1000 mg/kg do extrato	1° ao 6°	6
<b>T 2</b>	<b>GIV</b>	300 mg/kg do extrato	7° ao 12°	6
	<b>GV</b>	600 mg/kg do extrato	7° ao 12°	6
	<b>GVI</b>	1000 mg/kg do extrato	7° ao 12°	6

Quadro 1 – Distribuição das ratas prenhes de acordo com o grupo, dosagem, período e n° de animais.

#### 4.2.3 Estudo dos efeitos tóxicos no desenvolvimento da prole

Foi realizado um acompanhamento diário do ciclo estral através do esfregaço vaginal para determinação do período fértil (estro), no qual o animal foi colocado para acasalar com machos de fertilidade previamente comprovada e, por onde, a confirmação da prenhez foi indicada pela presença de espermatozóides em lâminas de esfregaço vaginal, sendo tal dia considerado o 1° dia gestacional (ALMEIDA et al., 1988; ALMEIDA et al., 2000). As fêmeas prenhes então foram distribuídas, aleatoriamente, em grupos controle e experimentais, contendo, em cada grupo, um total de seis animais. Os animais controle receberam solução

salina (0,9%; 0,1 ml/100 g) e os do grupo experimental receberam 300, 600, 1000 mg/kg do extrato hidroalcoólico do CS, ambas as doses administradas por via oral.

Ao 19° dia da prenhez as ratas foram separadas e colocadas em caixas individuais, para o aguardo da parição dos filhotes. Foi determinado um padrão para cada ninhada: seis filhotes, sendo três machos e três fêmeas.

No acompanhar do desenvolvimento da prole foram observados os seguintes parâmetros:

- Peso dos filhotes no 1°, 7°, 14° e 21° dias após o nascimento;
- Reflexo postural de cada filhote, medido em segundos no 1°, 3° e 7° dia pós-nascimento, através da colocação dos mesmos em decúbito dorsal sobre uma superfície plana até seu endireitamento;
- Dia de abertura dos olhos, sendo considerada a abertura, o deslocamento parcial da fissura palpebral em pelo menos um olho;
- Dia de andar adulto, no qual o filhote não arrastava as patas traseiras e/ou encostava o ventre no chão;
- Ocorrência de malformações ao nascimento e durante o desenvolvimento, visíveis a simples inspeção (FORMIGONI et al., 1986; TUFIK et al., 1994; MAIOR et al., 2003; IEZHITSA et al., 2001; SCHWARTZ et al., 2003).



Fig. 3 – Feto em posição abdominal



Fig. 4 – Feto em posição dorsal

#### 4.2.4 Avaliação do efeito antinociceptivo do *Cissus sicyoides* no teste da placa quente

Para o teste da placa quente em camundongos foram utilizados 4 grupos de 6 animais cada, de acordo com a técnica de Yeh; Mitchel (1971), Almeida et al. (2003). Os grupos teste receberam doses de 300, 600, 1000 mg/kg. No grupo controle foi administrado salina 0,1mL/10 g (i.p.), e no grupo padrão morfina 3 mg/kg (i.p.) 30 minutos antes da avaliação do teste. A avaliação foi realizada em um aparelho de placa-quente, pertencente ao Departamento de Antibióticos/UFPE, com a temperatura aproximada de 55 °C.

A medida referente ao tempo de reação do animal ao estímulo nócico foi realizada aos 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração dos respectivos tratamentos. Através de um cronômetro era medido, a partir da colocação do animal sob a placa quente, o tempo em que o animal começava a lamber as

patas, indicando a percepção do estímulo físico. Nesta metodologia a resposta dos animais ao estímulo nódico se deu através da estimulação em nível supramedular (ALMEIDA, 2002).



Figura 5 – Aparelho artesanal do Teste da placa quente

#### 4.2.5 Avaliação do efeito antinociceptivo do *Cissus sicyoides* no teste de imersão da cauda.

Para a avaliação do efeito antinociceptivo do CS no teste de imersão de cauda, foram utilizados 24 camundongos divididos em 4 grupos de 6 animais cada. O CS foi administrado por via i.p. nos respectivos grupos experimentais, enquanto que a morfina de 3 mg/kg (i.p.) e salina 0.1 mL/10 g (i.p.) foi administrada nos grupos padrão (morfina) e controle (veículo) respectivamente. As leituras foram realizadas imediatamente após a administração (leitura basal) e

aos 30, 60, 90 e 120 minutos, de acordo com Grotto e Sulman (1967); Almeida et al (2003). A resposta reflexa do animal, medida através de um cronômetro, foi induzida através da estimulação da temperatura da água em contato direto com a cauda do camundongo, utilizando um banho-maria a 52 °C. Essa resposta reflexa de retirada da cauda ocorre através da estimulação de componentes em nível medular.



Figura 6 - Aparelho artesanal do teste de imersão da cauda

#### 4.2.6 Verificação do efeito antinocepcivo observado pela administração diária do CS por 30 dias, em camundongos

No experimento do efeito antinocicepcivo observado foram utilizados 3 grupos de 6 camundongos que receberam os seguintes tratamentos diários por 30 dias: CS 600 mg/kg (i.p.), morfina 3 mg/kg (i.p.) e salina 0,1mL/10g (i.p.), correspondentes aos respectivos grupos experimental, padrão e controle. Nesta

metodologia foi analisado o efeito antinociceptivo através do teste de imersão de cauda. As medidas foram realizadas antes de iniciar-se o tratamento e também no 7°, 14°, 21° e 30° dia (JANSSEN; NIEMEGEERS; DONY, 1963; ALMEIDA et al., 2003).

#### 4.2.7 Efeito do CS avaliado através do teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.

Para o efeito do CS avaliado através do teste foram utilizados 4 grupos de 6 camundongos. Os grupos experimentais foram tratados com CS nas doses de 300, 600 e 1000 mg/kg (i.p.). Os animais foram colocados no interior de uma caixa de polipropileno de 40 cm de comprimento por 15cm de largura e 10 cm de altura. No grupo controle foi administrado ácido acético a 0,8% (v/v) e no grupo padrão morfina 3 mg/kg (i.p.), a leitura inicial foi realizada imediatamente após a administração da solução álgica, onde o número de contorções abdominais apresentado por cada animal foi contado, durante um período de 15 minutos (ALMEIDA et al., 2003; SHADAB ZAFI; AHMAD; TARIQ, 2002).

#### 4.2.8 Avaliação da ação antinociceptiva do CS e da morfina

No experimento para avaliar a ação antinociceptiva do CS foram utilizados 4 grupos de 6 animais . Os grupos testes receberam as doses de 300, 600 e 1000 mg/kg (i.p.) e 15 minutos antes todos os animais receberam naloxona 2 mg/kg (i.p.). O grupo controle recebeu salina 0,1mL/10 g (i.p.). As avaliações foram

conduzidas aos 30, 60, 90 e 120 min de acordo com método proposto por YEH; MICHEL (1971); ALMEIDA et al. (2003).

#### 4.2.9 Análise estatística.

Os dados obtidos nos vários experimentos dos animais tratados foram comparados com os respectivos controles usando a análise de variância ANOVA de uma via seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett's através do programa Graph Pad Prism versão 3,02 que considerou a diferença significativa quando  $p < 0.05$ .

**RESULTADOS**



## 5 RESULTADOS

### 5.1 Avaliação dos efeitos analgésicos

Depois da observação dos animais por 48 horas a DL50 foi determinada em  $2.229 \pm 258$  mg/kg (i.p.). Os animais demonstraram sinais de depressão do SNC como diminuição da atividade motora, demonstrando grunhidos, contorções e abdução das patas traseiras.

Como mostrado na tabela 1 o extrato hidroalcoólico do CS, administrado intraperitonealmente na dose de 1000 mg/Kg, produziu uma significativa ação antinociceptiva quando comparado ao grupo controle e um efeito similar quando comparado ao da morfina a 3mg (i.p.). Esta ação do CS foi confirmada pelo efeito bloqueador da naloxona.

Tabela 1  
Efeito do CS e da naloxona em ratos avaliados pelo teste de placa quente

Tratamento mg/kg (i.p.)	Tempo de reação (s), média $\pm$ E.P				
	Basal	30 min	60 min	90 min	120 min
Salina (-)	5.8 $\pm$ 0.9	5.1 $\pm$ 1.1	7.1 $\pm$ 0.7	5.9 $\pm$ 1.2	6.4 $\pm$ 1.5
CS (300)	6.8 $\pm$ 1.4	9.3 $\pm$ 0.6*	20.7 $\pm$ 1.2*	26.4 $\pm$ 2.2*	41.4 $\pm$ 1.3*
CS (600)	6.5 $\pm$ 1.5	16.4 $\pm$ 1.5*	18.1 $\pm$ 1.4 *	21.7 $\pm$ 1.0*	21.0 $\pm$ 1.0*
CS (1000)	7.2 $\pm$ 1.5	20.9 $\pm$ 1.6*	19.2 $\pm$ 0.9*	19.6 $\pm$ 1.3*	24.2 $\pm$ 1.8*
CS (300) +Naloxona	6.2 $\pm$ 0.8	5.9 $\pm$ 0.3	7.1 $\pm$ 0.4	7.1 $\pm$ 0.7	7.3 $\pm$ 0.8
CS (600) + Naloxona	6.8 $\pm$ 1.4	6.7 $\pm$ 0.5	7.1 $\pm$ 0.5	7.0 $\pm$ 0.6	7.6 $\pm$ 0.6
CS (1000) +Naloxona	6.9 $\pm$ 1.4	7.3 $\pm$ 0.5	7.3 $\pm$ 0.7	7.7 $\pm$ 0.5	7.2 $\pm$ 0.6
Morfina +Naloxona	6.7 $\pm$ 1.4	7.5 $\pm$ 0.4	7.5 $\pm$ 0.7	7.5 $\pm$ 0.5	7.3 $\pm$ 0.9

n=6. \*p<0.01 comparado com os valores do grupo controle.

O CS (Tabela 2) administrado intraperitonealmente nas doses acima de 1000 mg/Kg produziu uma significativa ação antinociceptiva quando comparado com o grupo controle e uma ação similar a da morfina (3 mg/kg, i.p.). Esta ação foi bloqueada pelo uso do naloxona.

Tabela 2  
Efeito do CS em ratos avaliados pelo teste da imersão de cauda

Tratamento mg/kg (i.p.)	Tempo de reação (s), média ± E.P.				
	Basal	30 min	60 min	90 min	120 min
Salina (-)	5.5±0.7	5.1±1.1	6.1±0.7	6.1±0.7	6.4±1.5
CS (300)	6.3±0.3	7.1±0.9	8.2±0.4*	12.7±0.9**	8.8±0.6*
CS (600)	6.1±0.4	8.5 ±1.5	13.8±0.8**	13.5±0.7**	8.4±0.6*
CS (1000)	7.3±0.4	20.9±1.6	40.4±0.3**	42.1±0.3**	8.2±0.9*
CS (300) +naloxone	7.1±0.9	5.9±0.3	7.1±0.4	7.1±0.7	7.3±0.8
CS (600) + naloxone	6.5±0.6	6.7±0.5	7.1±0.5	7.0±0.6	7.6±0.6
CS (1000) +naloxone	6.9±1.0	7.3±0.5	7.3±0.7	7.7±0.5	7.2±0.6
Morfina + naloxone	6.7±1.4	7.1±0.9	6.4±0.6	6.0±0.7	6.2±0.7

n=6. \*p<0.05 comparado aos valores do grupo salina.

\*\*p<0.01 comparado aos valores do grupo salina.

O CS produziu uma inibição máxima das contorções de forma similar àquela observada no grupo da morfina (Tabela 3).

Tabela 3

Efeito do CS avaliado pelo número de contorções induzidas pelo ácido acético em ratos.

Tratamento (mg/kg,i.p.)	Contorções (média ± E.P)
Salina (controle)	42.1±4.8
CS (300)	15.8±5.9*
CS (600)	6.1±1.4*
CS (1000)	8.3±1.3*
Morfina	5.7±0.4*

n=6. \*p&lt;0.01 comparado aos valores do grupo controle.

Tabela 4

Efeito do CS e da morfina administrado por 30 dias determinado pelo teste de imersão de cauda em ratos

Tratamento mg/kg (i.p.)	Tempo de reação (s), média ± E.P				
	Basal	7º dia	14º dia	21º dia	30º dia
Salina (-)	5.8±0.9	5.1±1.1	5.1±0.7	5.9±1.2	6.4±1.5
CS (600)	6.5±1.5	16.4±1.5*	6.7±1.4	5.7±1.0	5.1±1.0
Morfina	6.7±1.4	17.5±1.4*	7.1±2.7	7.5±0.5	5.9±0.9

n=6. \*p&lt;0.05, comparado aos valores do grupo controle.

## 5.2 Estudo do possível efeito teratogênico

A avaliação da variação do peso médio corporal materno (calculado pela diferença do peso entre o 1° e o 19° dia de gestação), peso fetal, peso placentário, índice de reabsorções, presença/ausência de malformações macroscópicas, número de corpos lúteo e n° de fetos viáveis após a administração das três dosagens do extrato (300mg/kg, 600mg/kg e 1000mg/kg) durante os períodos de pré-implantação (1° ao 6° dia de gestação) e no período de organogênese (7° ao 12° dia de gestação), pode ser observado nas tabelas 5 e 6.

Os dados observados no período de pré-implantação, no qual a aplicação do extrato foi executada (tabela 5), revelou que não houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) no peso dos fetos que receberam o *C. sicyoides* L., assim como das placentas nos tratamentos de 300 mg/kg e 1000 mg/kg, em relação ao grupo controle. Entretanto, no que se refere ao peso das placentas do tratamento de 600 mg/kg foi detectado uma diferença significativa ( $P < 0,05$ ), no valor de  $0,477 \pm 0,02$  com relação ao controle, bem como dos índices de reabsorção entre os grupos tratados de 300mg/kg, 600mg/kg e 1000mg/kg (GI, GII e GIII) nos respectivos valores: 0% controle, 3,17% GI, 9,09% GII e 4,87% GIII.

A variação do peso médio corporal materno revelou não ser representativo ao nível de significância  $P < 0,05$ , quando comparado ao controle, bem como o n°

de corpos lúteo e nº de fetos viáveis. Já com relação ao número de malformações, foi observado apenas um caso dentro do tratamento de 600 mg/kg.

Tabela 5 – Efeitos do CS no período do 1º ao 6º dia de administração durante a gestação.

Parâmetro	Controle	T1		
		GI (300 mg/kg)	GII (600mg/kg)	GIII (1000 mg/kg)
<b>Varição do peso médio corporal materno</b>	73 ± 2,42	72,83 ± 3,61	75,83 ± 5,58	71,33 ± 2,94
<b>Peso fetal</b>	1,59 ± 0,01	1,485 ± 0,04	1,614 ± 0,13	1,474 ± 0,02
<b>Peso placentário</b>	0,41 ± 0,009	0,371 ± 0,005	0,477 ± 0,02*	0,428 ± 0,01
<b>(I.R.)</b>	0 %	3,17%	9,09%	4,87%
<b>Malformações</b>	0	0	1	0
<b>Nº corpos lúteo</b>	9 ± 0,81	9,5 ± 0,99	8 ± 1,21	8,16 ± 0,79
<b>Nº fetos viáveis</b>	60	63	44	41

(I.R.) Índice de reabsorções =  $\frac{\text{N}^\circ \text{ reabsorções}}{\text{N}^\circ \text{ nascidos}} \times 100\%$

Valores são expressos em média ± E.P. (n = 6); \*p < 0,05; vs. controle; ANOVA de uma via seguido do teste de múltipla comparação de Dunnett's.

O tratamento estabelecido no período de organogênese (tabela 6), revelou que não houve diferença estatisticamente significativa (p < 0,05) no peso dos fetos que receberam o *C. sicyoides* L., assim como de suas placentas, em relação ao grupo controle. Entretanto, no que se refere ao índice de reabsorções, foi detectado uma diferença entre os grupos controle e tratados 300mg/kg, 600mg/kg

e 1000mg/kg (GIV, GV e GVI) nos respectivos valores: 0% controle, 4,35% GIV, 3,33% GV e 1,85% GVI.

A variação do peso médio corporal materno revelou não ser significativa, quando comparado os grupos ao controle; e com relação ao número de malformações, n° de corpos lúteo e n° de fetos viáveis os valores recolhidos também não foram representativos ao nível de significância  $p < 0,05$ .

Tabela 6 – Efeitos do CS no período do 7° ao 12° dia de administração durante a gestação.

Parâmetro	Controle	T2		
		GIV (300 mg/kg)	GV (600mg/kg)	GVI (1000 mg/kg)
<b>Varição do peso médio corporal materno</b>	73 ± 2,42	73,5 ± 3,11	77,83 ± 10,44	73,5 ± 2,7
<b>Peso fetal</b>	1,59 ± 0,01	1,493 ± 0,06	1,468 ± 0,04	1,578 ± 0,07
<b>Peso placentário</b>	0,41 ± 0,009	0,369 ± 0,02	0,40 ± 0,03	0,352 ± 0,02
<b>(I.R.)</b>	0 %	4,35%	3,33%	1,85%
<b>Malformações</b>	0	0	0	0
<b>N° corpos lúteo</b>	9 ± 0,81	9 ± 0,93	9,16 ± 0,87	7,66 ± 0,55
<b>N° fetos viáveis</b>	60	46	60	54

(I.R.) Índice de reabsorções =  $\frac{\text{N}^\circ \text{ reabsorções}}{\text{N}^\circ \text{ nascidos}} \times 100\%$

Valores são expressos em média ± E.P. (n = 6); \* $p < 0,05$ ; vs. controle; ANOVA de uma via seguido do de múltipla comparação de Dunnett's.

### 5.3 Estudo dos possíveis efeitos tóxicos no desenvolvimento da prole

A observação dos dados de ganho de peso materno, duração da gestação e número de fetos por ninhada durante o período de 19 dias em que as ratas estiveram expostas à aplicação do extrato hidroalcoólico do *C. sicyoides* L., mostrado na Tabela 7, não apresentou valores estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ) quando confrontados os valores obtidos no grupo controle, o que pode indicar que a ação do extrato não exerça alguma interferência que prejudique a fertilidade materna.

Tabela 7 – Efeito do CS sobre a fertilidade de ratas wistar.

Parâmetro avaliado	Grupo			
	Controle	300 mg/kg	600 mg/kg	1000 mg/kg
Duração da gestação (dias)	22,5 ± 0,223	22,5 ± 0,223	22,66 ± 0,333	23 ± 0,258
Ganho de peso materno (g)	79,83 ± 6,311	67,33 ± 4,12	65,66 ± 5,239	60,66 ± 1,838
Nº de fetos por rata	9,83 ± 0,872	8,16 ± 0,6	9,5 ± 1,285	8,33 ± 0,494

Valores são expressos em média ± E.P. (n = 6); \* $p < 0,05$ ; vs. controle; ANOVA de uma via seguido do teste de múltipla comparação de Dunnett's.

Quando avaliado o efeito do extrato sobre o desenvolvimento pós-natal, pode ser observado que aparentemente não ocorreu algum atraso que comprometesse a maturação física, ao observar os parâmetros de abertura dos olhos como também dia do andar adulto.

Contudo alterações significativas ( $p < 0,05$ ) levaram a um aumento no tempo de recuperação postural na dosagem de 300mg/kg durante o 1° e 7° dias de avaliação nos valores respectivos de  $28,81 \pm 6,318$  e  $1,32 \pm 0,218$ , como também resultou em valores altamente significativos ( $p < 0,01$ ) nas dosagens de 600 e 1000 mg /kg tanto no primeiro ( $35,26 \pm 5,151$  para a dosagem de 600mg/kg e  $38,66 \pm 2,421$  para a dose de 1000mg/kg) como no último dia de avaliação ( $1,37 \pm 0,099$  para a dosagem de 600mg/kg e  $1,40 \pm 0,139$  para a dose de 1000mg/kg) (Tabela 8).

Tabela 8 – Efeito da exposição materna ao CS sobre o desenvolvimento pós-natal dos fetos.

Parâmetro avaliado	Grupo			
	Controle	300 mg/kg	600 mg/kg	1000 mg/kg
<b>Reflexo Postural (segundos)</b>				
1° dia	$10,42 \pm 1,106$	$28,81 \pm 6,318^*$	$35,26 \pm 5,151^{**}$	$38,66 \pm 2,421^{**}$
3° dia	$10,44 \pm 3,749$	$20,5 \pm 4,408$	$21,69 \pm 6,154$	$10,92 \pm 1,72$
7° dia	$0,67 \pm 0,096$	$1,32 \pm 0,218^*$	$1,37 \pm 0,099^{**}$	$1,40 \pm 0,139^{**}$
<b>Abertura dos olhos (dias)</b>	$14,97 \pm 0,208$	$14,71 \pm 0,147$	$15,16 \pm 0,115$	$14,56 \pm 0,178$
<b>Andar adulto (dias)</b>	$14,74 \pm 0,057$	$14,74 \pm 0,093$	$14,65 \pm 0,142$	$14,84 \pm 0,187$

Valores são expressos em média  $\pm$  E.P. (n = 36); \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ; vs. controle; ANOVA de uma via seguido do teste de múltipla comparação de Dunnett's.

O efeito da exposição materna ao extrato hidroalcoólico do *C. sicyoides* L., mostrou ser responsável pela diminuição altamente significativa ( $p < 0,01$ ) do peso

dos filhotes que receberam as dosagens de 600 mg /kg e 1000 mg /kg ao 7° dia de avaliação com valores respectivos de  $9,76 \pm 0,606$  e  $10,55 \pm 0,591$ , contudo tais resultados parecem não ter interferido no desenvolvimento desses animais uma vez que não se repetiram nas subseqüentes avaliações empregadas durante os 14° e 21° dias, no qual ocorreu um aumento progressivo dos seus pesos (Tabela 9).

Tabela 9 - Efeito da exposição materna ao extrato hidroalcoólico do *C. sicyoides* L. sobre o peso dos filhotes.

Parâmetro avaliado	Grupo			
	Controle	300 mg/kg	600 mg/kg	1000 mg/kg
<b>Ganho de peso fetal (g)</b>				
1° dia	$5,44 \pm 0,162$	$5,65 \pm 0,140$	$5,25 \pm 0,112$	$5,73 \pm 0,156$
7° dia	$14,10 \pm 0,734$	$12,07 \pm 0,588$	$9,76 \pm 0,606^{**}$	$10,55 \pm 0,591^{**}$
14° dia	$21,49 \pm 0,872$	$21,31 \pm 0,858$	$20,95 \pm 2,8$	$19,08 \pm 1,123$
21° dia	$32,2 \pm 1,066$	$34,60 \pm 1,259$	$34,34 \pm 4,162$	$32,37 \pm 1,556$

Valores são expressos em média  $\pm$  D.P. (n = 36);  $^{**}p < 0,01$ ; vs. controle; ANOVA de uma via seguido do teste de múltipla comparação de Dunnett's.

**DISCUSSÃO**



## 6 DISCUSSÃO

No intuito de encontrar-se um produto de origem natural com ação analgésica central, principalmente com baixa toxicidade e reduzido efeito colateral/adverso, os laboratórios de pesquisa estão numa busca constante de novos fármacos com estas características. O movimento de “volta às raízes” também decorre de compreensão de que a biotecnologia, ainda hoje, não está em condições de competir com a natureza na formulação de moléculas com atividade terapêutica com características ditas acima (ALMEIDA, 1993; FARNSWORTH; BINGEL, 1997; FERREIRA et al., 1998).

As plantas medicinais são utilizadas extensamente no Brasil, e tem sido uma fonte substancial da informação etnofarmacológica para a identificação de substâncias fitoquímicas com potencial terapêutico (FERREIRA et al., 1998; ALMEIDA, 2002; CASTRO; FERREIRA, 2001) como nas folhas dos *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae), conhecido como ‘Bejuco caro’, Bejuco de parra’, cipópucá, anil trepador, cortina japonesa, uva brava (CANO; VOLPATO, 2004; VIANA et al., 2004).

O CS é usado pela medicina popular como diurético, antiinflamatório, antihipertensivo, antitérmico, anticonvulsivante, agente antiinfluenza e antidiabético (CARBAJAL et al., 1983; SILVA et al., 1996; GARCIA et al., 2000; BELTRAME et al., 2001; PEPATO et al., 2003). Também possui atividade

antibacteriana e citotóxica (SÁENZ et al., 2000;VICENTINI; CAMPAROTO; OLIVEIRA, 2001).

No terceiro milênio, os conhecimentos já adquiridos de farmacologia clínica permitam selecionar o opióide a ser administrado, nos casos em que essa droga é indicada, buscando obter o máximo de analgesia com o mínimo de efeitos colaterais. Essa relação custo-benefício se tornará ainda mais efetiva quando as pesquisas conduzirem à síntese de novos opióides com ação mais seletiva ou mesmo específica (DUARTE, 2005).

Os analgésicos opióides, e em especial a morfina (opiáceo), desenvolvem suas ações agindo diretamente nas vias de condução e em áreas específicas do cérebro ricas em receptores opióides, e no trato gastrointestinal, induzindo a uma mistura de efeitos estimulantes e depressores, cuja ação global é a diminuição da atividade neuronal (KOJIMA et al., 1974; SNYDER; SHILDRES, 1979; SAWYNOK; SCHILICHITING, 1986; DUTHIE; NOMO, 1987; KROWER, 1988, PAN, 1998; DRUMOND, 2000).

A analgesia conferida pelos opióides ocorre quando existe a interação destes com seus receptores endógenos. Os principais receptores opióides são classificados em:  $\mu$  (mu),  $\sigma$  (delta),  $k$  (kappa). O principal antagonista puro dos opióides é a naloxona, que possui duração de ação mais curta que a da maioria

dos opióides que ele vai antagonizar (DHAWAN et al., 1996; SATOH et al., 2000; GUSTEIN; AKIL, 2001).

A ação analgésica apresentada por CS envolve os componentes supraespinhais e espinhais, respectivamente, como demonstrados pelo teste da placa quente e da imersão de cauda (NAPIER, 1952; MAYER; LIEBESKIND, 1974; SALT; HILL, 1983; RANG et al., 1991; QUOCK et al., 1999; WOOLF; MANNION, 1999). Os resultados sugerem que o CS tem um efeito analgésico central evidenciado, pelo aumento no tempo de reação a dor nos testes da placa quente e da imersão cauda corroborando com os estudos de Medeiros et al., (2002b) no qual demonstraram em seus estudos o potencial antinociceptivo do extrato aquoso do *Cissus sicyoides*.

Neste trabalho, a ação analgésica central foi confirmada pelo efeito bloqueador do naloxona, um antagonista morfinomimético específico do receptor opióide (BELVISI et al., 1998; QUOCK et al., 1999; MUNDEY, 2000) e mostrou o efeito clássico da tolerância, característico da morfina e de outras substâncias opióides (PAN, 1998; DRUMMOND, 2000; HURLÉ; GIRIGOLZARRI; VALDIZÁN, 2000). Este efeito antinociceptivo do CS pode ser relacionado à redução no influxo de  $Ca^{+2}$  no terminal do axônio do nervo aferente que induz uma diminuição em atividades do ciclo do adenilil o qual resulta em níveis diminuídos do amp cíclico e no efluxo de íons de  $K^{+}$ . Os últimos conduzem a hiperpolarização do nervo e finalmente a um efeito antinociceptivo aparente (DICKINSON; FLEETWOOD-WALKER, 1998; YAKSH, 1999; GRUBB, 1998; MILLAN, 1999; PRADO, 2001).

De acordo com a portaria nº 116/96 da SVS, dentre os testes toxicológicos complementares, deverá ser feita a determinação de efeitos adversos sobre a mãe e o produto, durante os últimos estágios da prenhez, parto e desenvolvimento pós-natal, por drogas administradas durante este período, em uma espécie de mamífero (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2000).

Para a realização da avaliação do possível efeito teratogênico foram estabelecidos dois períodos: 1- O 1° ao 6° dia gestacional que é considerado o período de pré-implantação e no qual o embrião se encontra com células indiferenciadas em divisão mitótica onde a redução destas podem promover retardo na formação do blastocisto como aumento de perdas de pré e pós-implantação (KVITKO, 1986; KOLA, 1986; HOLEMANS et al., 2003) e 2- 7° ao 12° dia de gestação que é o período de organogênese, fase crítica onde ocorre maior susceptibilidade aos agentes teratogênicos (CASARETT; DOULL'S, 1975; BRENT, 1993).

Existem poucos estudos sobre a toxicidade do CS em tratamentos à longo prazo. A administração do extrato hidroalcoólico na dosagem de 600 mg/Kg por via oral demonstrou alteração anatômica nos fetos (ZANINI; OGA, 1996; MELLO et al., 2005). Também foram observados incidência da ação blastocistotóxica-antizigótica e poucos casos de atividade abortiva. Esta observação indica que o extrato do *Cissus sicyoides* age no início da divisão embrionária e também da sua implantação, estando de acordo com CASARETT; DOULL'S, 1975; KVITO, 1986;

KOLA, 1986; BRENT, 1993; ZANINI; OGA, 1996; HOLEMANS, 2003. O mecanismo fisiopatológico deste efeito serão objetivo de estudos futuros.

A interação do extrato hidroalcoólico do *Cissus sicyoides* L., nas doses utilizadas, com o organismo resultou em um aumento significativo no índice de reabsorções, quando comparado o grupo controle aos grupos em tratamento, o que se encontra dentro do esperado como efeito fetotóxico (LEVINI, 1962; DENENBERG, 1964; FRIDE; WEINSTAK, 1984; MELLO, 2005). Fato que também pôde ser observado na avaliação prévia do potencial embriofetotóxico do extrato etanólico do *Cissus sicyoides* L. (OLIVEIRA et al., 2004).

A ação hipoglicêmica do *Cissus sicyoides* L. (Garcia et al., 2000; Mori et al., 2001; Beltrame et al., 2001; Abreu et al., 2003; Pepato et al., 2003; Viana et al., 2004) e a diminuição do peso placentário no grupo de 600 mg/kg durante a pré-implantação pode ter relação, visto que a placenta possui apenas de 2 a 3 % da glicose necessária para o seu desenvolvimento e manutenção, o que cria uma dependência do suprimento de glicose materna (CAMPBELL, 1976; CATALANO et al., 1995; CHANG, 2002). Sendo desta forma a possível explicação para o baixo peso placentário apresentado na dose citada.

Pode ser observado que o ganho de massa corpórea materna como também duração da gestação e número de fetos por ninhada, não mostraram significantes alterações, evidenciando de certo modo que o extrato não promoveu mudanças morfofuncionais e ao nível de fertilidade (CASTRO; PALERMO-NETO,

1988; CASTRO;BERNARDI; PALERMO-NETO, 1989; NELSON, 1990; LARINI, 1997; HOLLEMANS, 2003).

Apesar de não ocorrida uma diminuição na massa corporal materna, o que apontaria como sinal de toxicidade decorrente da aplicação do extrato (SCHWARZ et al., 2003), pode ser observado uma diminuição altamente significativa no peso dos filhotes avaliados no 7º dia, o que se encontra de pleno acordo, pois o termo toxicidade do desenvolvimento foi proposto como uma categoria mais abrangente para envolver todos esses possíveis desenlaces (GRAY et al., 1981; WINNEKE, 1992; BRODY et al., 1997).

No presente estudo pode também ser observado que a exposição indireta dos filhotes ao extrato não interferiu na abertura dos olhos e na atividade locomotora, especificamente no andar adulto. Já com relação ao reflexo de endireitamento ocorreram interferências em todas as dosagens aplicadas, na qual as mais elevadas apresentaram valores altamente significativos, podendo desta forma inferir que o extrato hidroalcoólico do *Cissus sicyoides* L. promoveu uma interferência na maturação das estruturas envolvidas, até o sétimo dia, com a função motora do reflexo medular de endireitamento que é um dentre os vários reflexos relativamente complexos que estão associados à postura, os quais são parcialmente integrados na medula onde a substância cinzenta é uma zona de integração para os reflexos medulares e outras funções motoras (FRIDE; WEINSTOCK, 1984; LARINI, 1997; GUYTON, 1997; HOLEMANS, 2003).

**CONCLUSÕES**

---

## 7 CONCLUSÕES

- Todos os testes utilizados para a avaliação da existência ou não da atividade analgésica central do CS, apresentaram o efeito analgésico, induzido pelo extrato, estatisticamente significativo, observando-se para os mesmos o resultado ( $p < 0,05$ ).
- O extrato hidroacoólico das folhas do CS apresentou uma atividade analgésica central, caracterizada pelo bloqueio da ação analgésica pela naloxona, apresentando assim uma ação semelhante às drogas morfinomiméticas, já que a ação do extrato promoveu um efeito de tolerância quando administrado diariamente por 30 dias.
- O extrato hidroalcoólico do *Cissus sicyoides* L. apresenta toxicidade durante os períodos de pré-implantação e organogênese, sendo, desta forma, inadequado para uso em período gestacional. Contudo análises bioquímicas e hematológicas serão necessárias para complementação deste estudo no intuito de avaliar o real efeito do extrato no organismo animal.
- Por outro lado, não ocorreram alterações no tempo de gestação, variação ponderal do peso materno e número de filhotes por ninhada, sendo desta forma possível sugerir que o extrato hidroalcoólico do *Cissus sicyoides* L. não exerce efeito significativo sobre a fertilidade materna.

- Foi observado ainda que durante a fase de crescimento dos filhotes o peso esteve reduzido em um intervalo de avaliação, porém não repetido nos demais, e que o reflexo postural esteve comprometido em todas as dosagens, nos intervalos de avaliação do primeiro e sétimo dia, o que inspira maior preocupação apesar de tais resultados não interferirem no parâmetro fisiológico de abertura dos olhos como também na deambulação que representa a fase marcante do desenvolvimento físico dos animais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

## REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução – RDC n°. 17, de 24 de fevereiro de 2000. disponível em : [http://anvisa.gov.br/legis/resol/2000/17\\_00rdc.htm](http://anvisa.gov.br/legis/resol/2000/17_00rdc.htm) - topo> Acesso em: 29 fev 2005.

ABDULLAH, M., AL-BEKAIRI, ARIF, H.; SHOEB QURESHI. Effect of *Allium sativum* on epididymal spermatozoa, estradiol- treated mice and general toxicity. **Journal of Ethnopharmacology**, Leiden, v..29, p. 117-125, 1990.

ABREU I.N. et al., - Avaliação de diferentes concentrações de auxinas e tipos de explantes na indução e crescimento de calos de *Cissus sicyoides* L., uma planta medicinal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 5, n. 2, p. 83-89, 2003.

ALMEIDA, E. R. **Estudo da atividade antinociceptiva central do extrato hidroalcoólico das sementes de *Dioclea grandiflora* Mart ex. Benth (Fabaceae) e dois de seus constituintes químicos: Dioclenol e Dioflorina**. 2002. Tese (Doutorado)- Universidade Federal da Paraíba Paraíba, João Pessoa, 2002.

ALMEIDA, E.R. **Plantas medicinais brasileiras: conhecimentos populares e científicos**. São Paulo: **Ed. Hemus**, 1993. 342p.

ALMEIDA, E.R.; ALMEIDA, R.N.; NAVARRO, D.S.; BHATTACHARYYA, J.; SILVA, B.A.; BIRNBAUM, J.S.P. Central Antinociceptive effect of a hydroalcoholic extract of *Dioclea grandiflora* seeds in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, Leiden, v.88, p. 1-4, 2003.

ALMEIDA, E.R.; CESÁRIO DE MELLO, A.; SANTANA, C.F.; SILVA FILHO, A.A.; SANTOS, E.R. The action of lapachol in pregnant rats. **Revista Portuguesa de Farmácia**, Porto, v.38, n.3, p. 21-23, 1988

ALMEIDA, E. R.; MELO, A.M.; XAVIER, H. Toxicological evaluation of the hydroalcoholic extract of the dry leaves of *Peumus boldus*. **Phytotherapy Research**, London, v. 14, p. 99-102, 2000.

BELTRAME, F.L.; PESSINE, G.L.; DORO, D.L.; FILHO, B.P.D.; BAZOTTE, R.B.; CORTEZ, D.A.G. Evaluation of antidiabetic and antibacterial activity of *Cissus sicyoides*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, São Paulo, v. 45, n. 1, p. 21-25, Mar. 2002.

BELTRAME, F.L., SARTORETTO, J.L., BAZOTTE, R.B., CUMAN, R.N., CORTEZ, D.A.G.- Estudo Fitoquímico e avaliação antidiabética do *Cissus sicyoides*. **Química Nova**, São Paulo. v. 24, n. 6, p. 783 – 785, 2001.

BRENT R.L. et al., – Reproductive and teratologic effects of electromagnetic fields. **Reproductive Toxicology**, v. 7, p. 535-580, 1993.

BRODY, T.M.; LARNER, J.; MINNEMAN, K.P.; NEU, H.C. – **Farmacologia humana- da molecular à clínica**. 2ª edição. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1997. 833P. 753-754p.

CALIXTO, J. B; BEIRITH, A; FERREIRA, J; SANTOS, A. R. S; CECHINEL-FILHO; YUNES, R. Reviews: Naturally occurring antinoceptive substances from plants. **Phytotherapy Research**, London, v.14, n.401 – 418, 2000.

CAMPBELL S. – Fetal Physiology and Medicine. W. B. Saunders Company Ltd, London, 1976, p. 271-301.

CANO, J.H.; VOLPATO, G. Herbal mixtures in the tradicional medicine of eastern Cuba. **Journal of Ethnopharmacology**, Leiden, v. 90, n.2, p.293-316, 2004.

CARBAJAL D. et al., – Pharmacological screening of plant detections commoly used in cuban folk medicine. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 33, p. 21-24, 1991.

CASTRO, V.L.; BERNARDI, M.M.; PALERMO-NETO, J. – Evaluation of prenatal aldrin intoxication in rats. **Archives of Toxicology**. v. 66, p. 149-152, 1989.

CASTRO, H. G; FERREIRA, F. A. A Dialética do conhecimento no uso das Plantas Mediciniais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, São Paulo, v.3, n.2, p.19 – 21, 2001.

CASTRO, V.L. & PALERMO-NETO, J. – Alterations in the behavior of Young and adult rats exposed to aldrin during lactation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 21, p. 987-990, 1988.

CASARETT L.J.; DOULL J. Toxicology: The Basic Science of Poisons. New York: Macmillan 2 ed. 1975, p 158 – 173.

CATALANO P.M.; DRAGO N.M.; AMINI S.B. - Maternal Carbohydrate metabolism and its relationship to fetal growth and body composition. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 172. p. 1464-1470. 1995.

CHANG C.V. et al., - Fetal toxicity of *Solanum lycocarpum* ( Solanaceae) in Rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.81, p. 265-269, 2002.

CRAIN, S.M.; SHEN, KE-FEI. Modulation of opioid analgesia, tolerance and dependence by Gs-coupled, GM1 ganglioside-regulated opiod receptor functions. **Trends in Pharmacological Science**. v. 19, p.358 –365, 1998.

DENENBERG, V.H. - Critical periods, stimulus input, and emotional reactivity: a theory of infantile stimulation. **Psychological Review**. v. 71, p 335-351, 1964.

DEWEY, W.L.; OSCARSON, M.E.; BREWER, C.F. thermodynamics of binding of core trimannoside of asparagines-linked carbohydrates and deoxy analogs to *Dioclea Grandiflora* lectin. In: BRODY, T.M.; LARNER, J.; MINNETH, K.P.; NEU, H.C. Farmacologia humana. 2° Ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, p. 329-343, 1997.

DHAWAN, B.N.; CESSSELIN, F.; RAGHUBIR, R.; REISINE, T.; BRADLEY, P.B.; PORTOGHESE, P.S.; HAMON, M. International union of pharmacology, XII. Classification of opioid receptors. **Pharmacological Reviews**. V.48, p. 567-591, 1996.

DICKINSON, T.; FLEETWOOD-WALKER, S.M. Neuropeptides and nociception: recent advances and therapeutic implications. **Trends in Pharmacology Sciences**. v. 19, p. 346-348, 1998.

DRUMMOND, J.P. **Dor aguda: fisiologia, clínica e terapêutica**. São Paulo. Ed. Atheneu, 2000. 262 p.

Duarte, D.F. Uma breve história do ópio e dos opióides. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. v.55, n.1, p.135-146, 2005.

DUNNER, R. Neuronal plasticity and pain following peripheral tissue inflammation or nerve injury. In: BOND, M.; CHARLTON, E.; WOOLFS, C.F. Proceedings of the VIth World Congress on pain. **Pain Research and clinical Management**, v.5, p.263-276, 1991.

DUTHIE, D.J.R.; NOMO, N.S. Adverse effects of opioids analgesic drugs. **British Journal of Anesthesiology**, London, v. 59, p. 61-77, 1987.

ELISABETSKY, E.; BRUM, R.F.; SOUZA, D.O. Anticonvulsant propertis of linalool in glutamate-related seizuri model. **Phytomedicine**, Chicago, v. 6, n. 2, p. 107 – 113, 1999.

FARNSWORTH, N.R.; BINGEL, A.S. **New natural products and plat drug with pharmacological, biological or therapeutical activity**. New York: Springer, New York , 1997. 73p.

FEHRI B., et al., - Effets toxiques eugendrés par une administration réitérée d' Allium sativum L.. **Journal of Pharmacology Belg.**, v.46,p. 363-374, 1991.

FERREIRA, S.H; BARATA,L.E.S;SALLES, S.L.M; QUEIROZ,S.R.R;HELUY NETO, N.E; CORAZZA, R; FARIAS, R. **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1998.128 p.

FONSECA, N.M.; SELL, S.B.; CARLINI, E.A. – Differential behavioral responses of male and female adult rats treated with five psychotropic drugs in the neonatal stage. **Psychopharmacologia**. v. **46**, p 263-268, 1976.

FORMIGONI, M.L.O.S. et al., - Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citrates* stapf). II. Effects of daily two month administration in male and female rats and in offspring exposed “in utero”. **Journal of Ethnopharmacology**, v.17, p. 65-74, 1986.

FORTH. W.; BEYER, A., PETER, K. - Alívio da Dor, 1ª Ed, São Paulo, Hoechst, 1995. p. 62-66.

GARCÍA, M.D.; QUILEZ, A.M.; SAENZ, M.T.; MARTINEZ-DOMINGUES, M.E.; DE LA PUERTA, R. Anti-Inflammatory activity of *Agave intermixta* and *Cissus sicyoides*., species used in the Caribbean tradicional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, Leiden, v. 71, n. 3, p. 395 – 400, 2000.

GARCÍA, X.; CARTAS-HEREDIA, L.; LORENZA-JIMENES, M.; GIJÓN, E.Vasoconstrictor effect of *Cissus sicyoides* on Guinea-Pig Aortic Rings. **General Pharmacology**, Augusta, v. 29 n. 3, p. 457 – 462, 1997.

GARCÍA, X.; Saenz, M.T; Puerta, R.; Quilez, A.; Fernandez, M.A. Antibacterial activity of *Agave intermixta* and *Cissus sicyoides*. **Fitoterapia**, v. 70, p. 71 –73, 1999.

GRAY JR, L. et al., - Perinatal toxicity of endrin in rodents. III: alterations of behavioral ontogeny. **Toxicology**. v. 21, p 187-202, 1981.

GRUBB, B. B. Peripheral and central machanisms of pain. **British Journal of Anesthesiology**. v. 81, p.8-11, 1998.

GUTSTEIN, H.B; AKIL, H. Opioid analgesica. In: HARDMAN, J.G; LIMBIRD, L.L. GOODMAN; GILMAN'S. pharmacological basis of therapeutics, 10ª ed. New York: Mc Graw Hill. p.569-619, 2001.

GUYTON, A. C. – **Tratado de Fisiologia Médica**. 7ª ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 1997. p. 621-629.

GROTT, M; SULMAN, F. G. 1967. - Modified receptacle method for animal analgesimetry. **Archives Internationales de Pharmacodynamic et de Thérapie**, v.65, p.152 - 159, 1967

HURLÉ, M.A, GIRIGOLZARRI, I.; VALDIZÁN, E. M. Involment of de cycle AMP system in the switch from tolerance into supersensitivity to the antinociceptive effect of the opioid sufentanil. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 130, p. 174-180, 2000.

HIRONO, I.; HAGA, M. et al. Induction of HEPATIC Tumors in Rats by “*Senkirkine and Symphytine*”. **Journal of the Nacional Cancer Institute**, Oxford, v.49, p.469, 1979.

HOLEMANS K. et al., - Fetal growth restriction and consequences for the offspring in animal models. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 10, p. 392-399. 2003.

HUXTABLE, R.J. Herbal teas and toxins: novel aspects of pyrrolizidine poisoning in the United States. **Perspectives in Biology and Medicine**, Chicago, v. 24, p.1 – 13, 1980.

IEZHITSA I.N. et al., - Effects of bromantan on offspring maturation and development of reflexes, **Neurotoxicology and Teratology**, v. 23, p. 213-222, 2001.

JANSSEN, P.A.G.; NIEMEGEREERS, C.J.; DONY, J.G.H. The inhibitory effect of fentanyl and other morphine-like analgesics on the warm water induced withdrawal reflex in rats. **Arzneimittelforsch. Drug Research**, Zurich, v. 6, p. 502-507, 1963.

KOJIMA, Y.; TAKAHASHI, T.; FUJINA, M.; OWYANG, C. Inhibition of cholinergic transmission by opiates in ileal myenteric plexus is mediated by Kappa receptor. Involvement of regulatory inhibition G protein and calcium N-channels. **Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v.268, n.2, p. 965-970, 1974

KOLA I.; FOLB P. - Chlorpromazine inhibits the mitotic index, cell number, and the formation of blastocyst, and delays implantation of CBA mouse embryos. **Journal of Reproductive Fertility**. v. 76, p. 527-536, 1986.

KOLESNIKOV, Y.A.; MACCEHINI, H.L.; PASTERNAK, G.W. 1-Aminocyclopropane carboxylic acid (ACPC) prevents mu and delta opioid tolerance. **Life science**. v.55, p. 1393 – 1398, 1994.

KROMER, W. Endogenous and exogenous opioids in the control of gastrointestinal motility and secretion. **Pharmaceutical reviews**. v.40, p. 121-162, 1988.

KVITKO K.; GIMMLER M.C. – Effects of intergerrimine on the implantation and intrauterine development of mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 29, p. 223-227, 1986.

LARINI, L.- **Toxicologia**. 3ª edição. São Paulo, Editora Manole. 1997. 301P. 53-54p.

LIZAMA, R.S.; MARTINEZ, M.M.; PÉREZ, O.C. Contribución al estudio de *Cissus sicyoides* L. (bêjucoubi). **Revista Cubana de Farmacología**. v. 34, p.120-124, 2000

MAIOR, F.N.S. et al., - Desenvolvimento pós-natal da prole exposta ao extrato hidroalcoólico da *Cissampelos sympodialis* Eichl., durante o período gestacional de ratas. **Acta farmacêutica bonaerense**, v. 22, n. 4, p. 321-325, 2003.

MAYER, D.J; LIEBESKIND, J.C. Pain reduction by focal electrical stimulation of the brain and anatomical and behavioral analysis. **Brain Research**. v. 68, p. 73-93, 1974.

MEDEIROS, A.C.C.; LACERDA, A.M.R.; SILVA, L.A.C.T.; VIANA, G.S.B.; VALE, T.G. Efeito anticonvulsivante do extrato aquoso (EA) de *Cissus sicyoides* [Abstract]. **XXXIV Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental**, Águas de Lindóia SP, Brasil. 2002a.

MEDEIROS, A.C.C.; LACERDA, A.M.R.; VALE, T.G.; VIANA, G.S.B. Efeitos analgésicos do extrato aquoso de *Cissus sicyoides* L. [Abstract]. **XVII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, Cuiabá. 2002b.

MELLO F.B. et al., - Effects of *Lantana camara* (Verbenaceae) on general reproductive performance and teratology in rats. **Toxicol**. v. 45, p. 459-466, 2005.

MENDELL, L.L. Physiological properties of unmyelinated fiber protection to the spinal cord. *Experimental Neurophysiology*. V.16, p. 316-332, 1966.

MIDDAUGH, L.D.; SIMPSON, L.W.; THOMAS, T.N.; ZEMP, J.W. – Prenatal maternal phenobarbital increases reactivity and retards habituation of mature offspring to environmental stimuli. **Psychopharmacology**. v. 74, p 349-362, 1981.

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

MILLER, M.T.; STROMLAND, K. Teratogen update: Thalidomide: A review, with a focus on ocular findings and new potential uses. **Teratology**. v.60, p.306-321, 1999.

MORI, T.; NISHIKAWA, Y.; TAKATA, Y.; KASHIUCHI, N.; ISHIHARA, N. Effect of Insulina leaf extract on development of diabetes- Compararison between normal, Streptozotocin-induced diabetic rats and hereditary diabetic mice. **Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science**, Toquio, v. 54, p. 197 - 203, 2001.

MOORE, K.L. **Embriologia clínica**. 4º edição. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1990. p. 105-117.

MUNDEY, M.Y.; ALI, A.; MASON, R.; WILSON, V.G. Pharmacological examination of contractile responses of the guinea-pig isolated ileum produced by mu-opioid

receptor antagonists in the presence of, and following exposure to, morphine. *British journal of Pharmacology*. V. 131, p. 893-902, 2000.

NAPIER, J.R. The return of sensibility in full thickness skin grafts. *Brain*. V. 75, p. 147-166, 1952,

NELSON, B.K. – Origin of behavioral teratology and distinctions between research on pharmaceutical agents and environmental/industrial chemical. **Neurotoxicology and Teratology**. v. 12, p 301-305, 1990.

NIEBYL, J.R. **O uso de drogas na gravidez**. São Paulo: livraria Roca, p. 186-203. 1983.

OLIVEIRA J.R.G. et al., - Avaliação preliminar do potencial embriofetotóxico do extrato etanólico do *Cissus sicyoides* L. em ratas. In: **V Congresso de Ensino Pesquisa e Extensão da UFPE (V CEPE)**. Recife, Pernambuco, Departamento de Antibióticos, CCB, **2004**. acervo Cd-rom.

PAN, Z.Z. mu-opposing actions of the kappa-opioid analgesic. *Clinical Neuropharmacology*. V.16, p.1-18, 1993.

PASTERNAK, G.W. Pharmacological mechanisms of opioid analgesic. **Clinical Neuropharmacology**, Chicago, v. 16, p. 1-18, 1993.

PEPATO M.T.; BAVIERA, A.M.; VENDRAMINI, R.C.; PEREZ, M.P.; KETTELHUTID, C.; BRUNETTI, I.L. *Cissus sicyoides* (princesa vine) in the long-term treatment of streptozotocin-diabetic rats. **Biotechnology Apply Biochemical**. v. 37 (Pt 1), p. 15-20, 2003.

PRADO, W.A. Involvement of calcium in pain and antinociception. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.34, p.449-461, 2001.

QUOCK, R.M.; BURRKEY, T.H.; VARGA, E.; HOSOHATA, Y.; HOSOHATA, K.; COWELL, S.M.; SLATE, C.A.; EHLERT, F.J.; ROEKE, W.R.; YAMAMURA, H.I. The delta-opioid receptor: molecular pharmacology, signal transduction, and determination of drug. Efficacy. **Pharmacological Reviews**. v.51, p. 503-507, 1999.

RANG, H.P.; BEVAN, S.; DRAY, A. Chemical activation of nociceptive peripheral neurons. **British Medical Bulletin**. v. 47, p. 534-548, 1991.

ROCHA, R.G.; TORTAMANO, N.; ADDE, C.A.; SIMONE, J.L.; PEREZ, F.E.G. O controle da dor em odontologia através da terapêutica medicamentosa. In: CONCLAVE ODONTOLÓGICO INTERNACIONAL, 15., Campinas. **Anais...** Disponível em : <<http://www.acdc.com.br>>. Acesso em: 27 jun. 2004.

SÁENZ M.T. et al., - Cytotoxic activity of *Agave intermixta* L. (Agavaceae) and *Cissus sicyoides* L. Vitaceae). **Phytherapy Research**. v. 14, n. 7, p. 552-554, 2000.

SALT, T.; HILL, R.G. Pharmacological differentiation between responses of rat medullary dorsal horn neurons to noxious mechanical and noxious thermal cutaneous stimuli. **Brain Research**. v. 263, p. 167-171, 1983.

SATOH, M.; SEKI, T.; MINAMI, M. OPIOIDS RECEPTORS. Tanpakushit Sukakusan Koso. v. 45, n. 6, p. 900-985, 2000.

SAWYNOK, M.M.; SCHILICHTING, D.A. The therapeutic use of heroine: a review of the pharmacologic literature. **Canadian Journal Physiology and Pharmacology**. v.64, p.1-6, 1986.

SCHOENTAL R. - Health hazards of pyrrolizidine alkaloids: a short review. **Toxicology Letters**, v. 10, p.323 – 326, 1982.

SCHWARTZ, A. et al., Effects of *Ipomoea carnea* aqueous fraction intake by dams during pregnancy on the physical and neurobehavioral development of rat offspring, **Neurotoxicology and Teratology**, v. 25, p. 615-626, 2003.

SCHOENTAL, R. Health hazards of pyrrolizidine alkaloids: a short review. **Toxicology Letters**, Austin, v. 10, p.323 – 326, 1982.

SHADAB, Z.; AHMAD, M. A.; TARIQ A. S. Effect of roots aqueous extract of *Delphinium denudatum* on morphine-induced tolerance in mice. **Fitoterapia**, Milan, v. 73, p. 553-556, 2002.

SILVA, G.A.; MURADIN, L.B.A.; AKISUE, G.; FERRO, V;O. Padronização dos extratos de *cissus sicyoides* L. (insulina vegetal) e identificação de carotenos **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.5,n.1, p.96-112, 1996.

SNYDER, S.H.; CHILDRES, S.R. Opiate receptors and opiod peptides. **Annual Review Neurosciences**, v.2,p.35, 1979.

TRUJILLO, K.H.; AKIL, H. Innibition of morfine tolerance and dependence by the NMDA receptor antagonist MK801. **Science**. v. 251, p. 85-87, 1991.

TUFIK S. et al., - Effect of prolonged administration of valepotriates in rats on the mothers and their offspring. **Journal of Ethnopharmacology**, v.41, p. 39-44, 1994.

VIANA, G.S.B.; MEDEIROS,A.C.C.; LACERDA,A.M.R.; LEAL,L.K.A.M.; VALE,T.G.; MATOS,F.J.A. Hipoglycemic and anti-lipemic effects of the aquos extract from *Cissus sicyoides*. **Biomed Central Pharmacology**. Disponível em: <[www.biomedcentral.com](http://www.biomedcentral.com)>. Acesso em:27 jun. 2004.

VICENTINI, V.E.P.; CAMPAROTO, M.L.; OLIVEIRA, T.R. **Acta Scientarium** 2001; 23(2): 593-598.

WAAL, P.D. The prevention of postoperative pain. *Pain*. V.33, p.289-290, 1988.

WINNEKE, G. – Cross species extrapolations in neurotoxicology: Neurophysiological and neurobehavioral aspects. **Neurotoxicology**. v. 13, p 15-25, 1992.

WOOLF, C.; MANNION, R.J. Neurophatic pain: Aetiology, symptomn, mechanisms, and management. **Lancet**. v. 353, p. 1959-1964, 1999.

YAKSH, T.L. Spinal systems and pain processing: development of novel analgesic drugs with mechanistically defined models. **Trends in Pharmacological Science**. v. 20, p. 329-336, 1999.

YEH, S. Y ; MITCHELL, C. L. Analgesic activity and toxicity of oripavine and Ø-dihydrothebaine in the mouse and rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Bethesda, v 179, 642-65, 1971.

ZANINI, A.C.; OGA, S. - *Farmacologia Aplicada*. São Paulo: Atheneu, 1996.

**ANEXOS**



## ANEXO A

Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n  
50670-420 / Recife - PE - Brasil  
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351  
fax: (55 81) 2126 8350  
www.ccb.ufpe.br



Ofício nº 136/2004

Recife, 07 de julho de 2004.

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE  
Para: Prof. Edvaldo Rodrigues de Almeida  
Departamento de Antibióticos CCB/UFPE

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram a resposta de V. Sa. referente ao primeiro parecer da CEEA sobre o projeto de pesquisa intitulado "Identificação dos Possíveis Efeitos analgésicos, Toxicológicos e Embriofetotóxico do extrato das folhas de *Cissus sicyoides*", processo nº 006390/2004-85

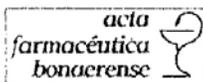
Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEA-UFPE.

De acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos. Diante do exposto, emitimos um parecer favorável aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,

  
Profª Silene Carneiro do Nascimento  
Presidente da CEEA/UFPE

## ANEXO B



A Scientific Journal of the College of Pharmacists of the Province of Buenos Aires, Argentina  
Publicación científica del Colegio de Farmacéuticos de la Provincia de Buenos Aires, Argentina  
Calle 5 N° 966, La Plata 1900, Argentina. Tel. (54 221) 429 0900  
<http://www.actafarmbonaerense.com.ar>

La Plata, 28 de diciembre de 2005

Dr. Edvaldo Rodrigues de ALMEIDA.  
Universidade Federal de Pernambuco,  
Departamento de Antibióticos  
Campus da UFPE. CEP 50670-901 Recife – Pernambuco  
Brasil  
E-mail: [ealmeida@ufpe.br](mailto:ealmeida@ufpe.br)

Ref.: AFB 1037-05

Estimado Dr. Almeida:

Tengo el agrado de dirigirme a usted con el objeto de poner en su conocimiento el informe del árbitro que analizó la nueva versión de su trabajo "The action of extract of the dry leaves of *Cissus sicyoides* in pregnant rats", de Edvaldo Rodrigues de ALMEIDA\*, João Ricardo Gonçalves de OLIVEIRA, Flávia F. Raquel LUCENA, Renata Patricia de Freitas SOARES & Geraldo Bosco Lindoso COUTO. Adjunto el informe del árbitro, quien de todos modos considera que el trabajo es aceptable para su publicación en AFB. Oportunamente le enviaremos la prueba de impresión por correo electrónico y le haremos conocer el número en el que será incluido el trabajo.

Al tiempo de agradecer su colaboración, hago propicia la oportunidad para saludar a usted con las expresiones de mi mayor consideración.

Dr. Néstor O. Caffini, Editor  
E-mail: [caffini@biol.unlp.edu.ar](mailto:caffini@biol.unlp.edu.ar)

## ANEXO C

### Edvaldo Almeida

---

**De:** <lewandowski.c@att.net>  
**Para:** "Edvaldo Almeida" <eralmeida@oi.com.br>  
**Enviada em:** sexta-feira, 10 de março de 2006 00:27  
**Anexar:** Re\_ Corrections to PB 5.386.eml  
**Assunto:** Re: Corrections to PB 5.386

Dear Dr. Almeida,

The corrected manuscript has been received. It will be processed for typesetting and is tentatively scheduled to appear in *Pharmaceutical Biology* vol. 44, issue 4, 2006, which closes March 15. You should receive the page proofs about 6-8 weeks after that date.

Sincerely,

Carol Lewandowski

Managing Editor

----- Original message from "Edvaldo Almeida" <eralmeida@oi.com.br>: -----

Dear Dr<sup>a</sup>.  
Carol Lewandowski  
Managing Editor  
The corrections to PB 5.386 was made.

Sincerely,

Edvaldo Almeida  
eralmeida@oi.com.br

----- Original Message -----

**From:** lewandowski.c@att.net  
**To:** eralmeida@oi.com.br  
**Sent:** Wednesday, March 01, 2006 4:50 PM  
**Subject:** Corrections to PB 5.386

Dear Dr. Almeida,

The review of PB MS 5.386 has been completed. The paper has been accepted, however there are some corrections that must be made before the paper can be processed for publication. Specifically:

1. If all the authors are at the same address, then the "1" after each name can be eliminated.
2. On page 2, and throughout the text, 3-0-rhamnoside should be 3-O-rhamnoside.
3. On page 8, the reference for Munday et al. (2000) contains in the title "... ileum produced by u-opioid receptor..." What is "u-opioid"? If this is a typo, please correct it.
4. On page 8, the reference for Yeh & Mitchel (1971) contains in the title "...oripavine