



**CENTRO UNIVERSITÁRIO UFRJ-MACAÉ
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**



IGOR FREDERICO DE OLIVEIRA RAMOS

**AVALIAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLCICO E
FRAÇÕES DE *Vitex polygama* EM MODELO DE DOR
NEUROPÁTICA INDUZIDA POR VINCRISTINA EM
CAMUNDONGOS**

MACAÉ, 2021

IGOR FREDERICO DE OLIVEIRA RAMOS

**AVALIAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO E
FRAÇÕES DE *Vitex polygama* EM MODELO DE DOR
NEUROPÁTICA INDUZIDA POR VINCRISTINA EM
CAMUNDONGOS**

Trabalho de conclusão de curso (TCC)
apresentado ao curso de Farmácia da
Universidade Federal do Rio de Janeiro –
CM – UFRJ Macaé, como requisito para
obtenção do título de farmacêutico.

Orientador: Prof. Dr. André Gustavo Calvano Bonavita

MACAÉ, 2021

Verso da folha de rosto

CIP – Catalogação na Publicação (biblioteca@macae.ufrj.br)

CIP - Catalogação na Publicação

FI24a Frederico de Oliveira Ramos, Igor
AVALIAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLCICO E FRAÇÕES DE
Vitex polygama EM MODELO DE DOR NEUROPÁTICA
INDUZIDA POR VINCRISTINA EM CAMUNDONGOS / Igor
Frederico de Oliveira Ramos. -- Rio de Janeiro,
2022.
54 f.

Orientador: André Calvano Gustavo Bonavita.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus
Macaé Professor Aloísio Teixeira, Bacharel em
Farmácia, 2022.

1. dor neuropatica. 2. vincristina. 3. vitex. 4.
vitex polygama. I. Calvano Gustavo Bonavita, André,
orient. II. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente queria agradecer a Zambi, Xangô e todos os orixás e guias que me acompanham desde que comecei minha caminhada nessa encarnação, me guiando e trazendo forças nos momentos mais difíceis dessa trajetória.

A minha mãe Márcia Alves de Oliveira, que foi responsável para que esse sonho se tornasse realidade, sem ela nada disso poderia chegar perto de acontecer, foi o meu alicerce nessa jornada.

Ao meu pai Olavo João Frederico Ramos que teve um papel fundamental para a minha formação profissional.

Ao meu irmão Olavo, que sempre foi meu ombro amigo desde sempre, me ajudando a crescer em todos os sentidos da vida e também presente na minha formação acadêmica.

A minha avó Margarida, que sempre teve o sonho de ver seu neto se formar, esse momento chegou e é só o começo, obrigado por tudo que a senhora fez e faz na minha vida.

A minha grande amiga Isabela Durães, que somou em todos os sentidos da minha vida e foi essencial para que seguisse firme independente dos problemas vividos.

Aos meus amigos da faculdade, que sempre me ajudaram e fizeram desses anos muito mais fáceis do que o normal, trazendo alegria e aprendizados que levarei para minha vida.

Ao meu amigo João, que me acompanhou desde o começo do curso, mas que infelizmente não pode dar continuidade à graduação, porém foi um verdadeiro irmão em todo esse trajeto.

As minhas companheiras de laboratório Isabela e Evelynn, sem a ajuda de vocês seria muito mais difícil a rotina laboratorial, além da troca de conhecimento que foi muito importante para mim.

Ao meu orientador André Bonavita, que me acolheu como orientando desde o começo da faculdade e confiou no meu potencial, me ajudando e me guiando em

todas as dificuldades acadêmicas que tive. Ele é um dos grandes responsáveis pela minha paixão e dedicação pela pesquisa.

A minha orientadora de mestrado Michelle Frazão Muzitano que sempre se mostrou disposta a ajudar e abraçou nosso projeto de pesquisa, confiando no nosso trabalho e agregando na minha experiência no ramo da pesquisa.

A Prof.^a Paula do Carmo que divide o laboratório conosco, agregando com seu conhecimento e colaborando para o crescimento da minha trajetória na iniciação científica.

A UFRJ-Macaé e todo corpo docente, que de excelente qualidade tanto na didática como no conhecimento foram primordiais na minha formação como farmacêutico.

A PIBIC-UFRJ e FAPERJ pelo fomento para a pesquisa a partir de bolsas de iniciação científica.

Obrigado a todos os envolvidos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura de um nociceptor.....	13
Figura 2 - Ativação e sensibilização de nociceptores.....	14
Figura 3 - Escada de dor de acordo com a Organização Mundial de Saúde.....	20
Figura 4 - <i>Vitex polygama</i> Cham., espécie da família Lamiaceae.....	25
Figura 5 - Esquema do protocolo experimental de indução de dor neuropática por vincristina.....	29
Figura 6 - Foto ilustrativa do teste da placa quente.....	30
Figura 7 - Representação esquemática dos tratamentos e análises de nocicepção.....	31
Figura 8 - Efeito do Extrato de <i>Vitex polygama</i> (EVP) na dor neuropática induzida por vincristina.....	33
Figura 9 - Estudo comparativo dos efeitos do extrato bruto de <i>Vitex polygama</i> e morfina na dor neuropática induzida por vincristina.....	34
Figura 10 - Efeito da Fração Hexânica do EVP na dor neuropática induzida por vincristina.....	36
Figura 11 - Efeito da Fração Diclorometano do EVP na dor neuropática induzida por vincristina.....	36
Figura 12 - Efeito da Fração Butanólica do EVP na dor neuropática induzida por vincristina.....	38
Figura 13 - Efeito da Fração Acetato de Etila do EVP na dor neuropática induzida por vincristina.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Métodos utilizados para avaliar a hiperalgesia ou alodinia em animais.....	19
Tabela 2 - Farmacoterapia para dor neuropática.....	21

LISTA DE ABREVIações

Act – Acetato de etila

AINES – Anti-inflamatórios não esteroidais

ANOVA – Análise de variância simples

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BOH – Butanólica

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

DCM – Diclorometano

DMSO – Dimetilsulfóxido

EVP - Extrato bruto de *Vitex polygama*

FAP - Fibras aferentes primárias

GABA – Ácido γ -aminobutírico

GRD - gânglio da raiz dorsal

HEX – Hexânica

IASP – Associação Internacional para o Estudo da Dor

IL-1 β – Interleucina 1 beta

i.p. – Intraperitoneal

NA - Noradrenalina

NGF – Fator de crescimento neuronal

OMS – Organização Mundial de Saúde

PAG - Região cinzenta periaquedutal

PARNA Jurubatiba – Parque Nacional de Restinga de Jurubatiba

PN - Projeções de neurônios

RVM - Medula rosto-ventromedial

SNC – Sistema nervoso central

SNP – Sistema nervoso periférico

TLR4 – Receptor tipo Toll 4

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

TRPV1 – Receptor de potencial transitório vanilóide tipo I

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Dor e suas classificações	11
1.2 Mecanismos da dor	12
1.3 Dor neuropática	17
1.4 Farmacologia da dor	18
1.4.1 Tratamento da dor neuropática	20
1.5 Produtos naturais	22
1.6 Gênero <i>Vitex</i>	23
1.6.1 <i>Vitex polygama</i> Cham.	24
2 JUSTIFICATIVA	26
3 OBJETIVOS	27
3.1 Objetivos gerais	27
3.2 Objetivos específicos	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Extrato e frações de <i>Vitex polygama</i>	28
4.2 Animais	28
4.3 Modelo de dor neuropática	28
4.4 Teste da placa quente	27
4.5 Tratamentos	29
4.5 Análises estatísticas	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1 Efeito do extrato bruto de <i>Vitex polygama</i> na dor neuropática	32
5.2 Estudo comparativo do efeito antinociceptivo de EVP e morfina	34
5.3 Efeito das frações de <i>Vitex polygama</i> na dor neuropática	35
6 CONCLUSÕES	42
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

RESUMO

A dor neuropática é uma dor crônica onde há lesão de nervo e sendo caracterizada pela sua terapêutica complexa e de longa duração. O tratamento farmacológico desse tipo de dor é pouco eficiente e apresenta diversos efeitos adversos. Com a ampla diversidade de produtos naturais e diversos estudos a partir de moléculas bioativas presentes em plantas mostrando ampla atividade terapêutica, inclusive antinociceptiva, essas substâncias podem atuar no tratamento de diversas patologias. Diversos efeitos do gênero *Vitex* já foram descritos, como ação anti-inflamatória e analgésica, porém ainda não foi elucidado o mecanismo de ação no que tange aos efeitos da espécie *Vitex polygama* na dor neuropática. O objetivo do trabalho foi avaliar o extrato bruto e frações de *Vitex polygama* em modelo de dor neuropática induzida por vincristina em camundongos. Para tal, foram utilizados camundongos suíços fêmeas, pesando entre 25-35g. Os animais tiveram a dor neuropática induzida por vincristina (0,1 mg/kg) administrada em dois ciclos de 5 dias por via intraperitoneal (i.p.). Os animais foram também tratados com salina (NaCl, 0,9%) e morfina (10 mg/kg) nos controles negativo e positivo respectivamente. Para avaliar o efeito antinociceptivo os animais foram tratados com extrato bruto de *Vitex polygama* ou suas frações (5 a 30 mg/kg), administrados por via i.p., 1 hora antes das análises de nocicepção. A nocicepção foi aferida utilizando o ensaio da placa quente onde os animais foram colocados em superfície aquecida a 52°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) e o tempo para lambedura de pata foi cronometrado. Os animais do grupo tratado com vincristina apresentaram tempo de lambedura de $4,6 \pm 1,6\text{s}$ frente aos $10,6 \pm 1,6\text{s}$ do grupo controle, indicando resposta nociceptiva. Posteriormente os animais foram tratados com extrato ou frações de *Vitex polygama* a fim de avaliar os efeitos antinociceptivos. O efeito antinociceptivo foi observado em todas as concentrações do EVP após 1h do tratamento e na dose de 30 mg/kg após 3 e 5h do tratamento. O controle positivo com morfina apresentou efeitos semelhantes comparados ao do EVP, mas observado apenas no tempo de 1h. As frações diclorometano e hexânica promoveram efeito antinociceptivo observado em ambas as frações na dose de 30 mg/kg em 1h após o tratamento, nos demais tempos de medição não foi observado efeitos significativos. Já as frações butanólica e acetato de etila foram as que apresentaram melhor efeito antinociceptivo observado nas doses de 10 mg/kg e 30 mg/kg até três horas após o tratamento, sugerindo o papel de compostos polares ricos nessas frações. Com isso, concluímos que o extrato e frações de *Vitex polygama* apresentam efeito antinociceptivo em modelo de dor neuropática induzida por vincristina sendo uma possível fonte de novas substâncias para o tratamento de dor crônica. O trabalho abre perspectivas para a busca de substâncias presentes na *Vitex polygama* para o tratamento de dor neuropática.

Palavras-chave: Dor neuropática, vincristina, *Vitex*, *Vitex polygama*.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dor e suas classificações

A dor é definida, de acordo com a *International Association for the Study of Pain*, por “uma experiência sensitiva e emocional desagradável associada, ou semelhante àquela associada, a uma lesão tecidual real ou potencial” (IASP, 2020). A dor é o sintoma mais relatado nos pacientes e é visto como um sinal de alerta para que se evite complicações ou lesões posteriormente. Esse estímulo pode ser proveniente de diversos fatores, sendo eles externos ou internos, e variando de acordo com o estado físico e emocional de cada indivíduo. Com isso a dor pode ser classificada de diversas maneiras, quanto à duração, local de atuação ou tipo de lesão (ŚWIEBODA et al., 2013).

Estima-se que mundialmente 20% da população adulta sofra de dor (ISHAK et al., 2018). No Brasil, apesar de poucos estudos epidemiológicos, estima-se uma incidência aproximadamente de 10 a 50%, de acordo com o estudo, de pacientes que se queixam de dor em atendimentos clínicos (ROCHA, 2007). No que tange a dor crônica um estudo recente apontou uma prevalência de 76% de dor crônica na população brasileira (CARVALHO et al., 2018). Por ser uma experiência subjetiva e pessoal, a dor é difícil de ser mensura quanto a sua gravidade por aparelhos nos pacientes. Entretanto é considera um sinal vital e deve ser compreendida e examinada em um ambiente clínico, é a partir dessa avaliação que se entende qual o melhor tipo de tratamento e condição do paciente (SOUSA, 2002).

Quanto aos tipos de lesões, a dor é dita nociceptiva quando decorrente de uma lesão tecidual, geralmente associado a um processo inflamatório. Isso explica o porquê sentimos dor de forma rápida por fatores mecânicos por exemplo, porém essa dor pode continuar mesmo após a potencial perigo ser cessado ou até ocorrer sem ter nenhum gatilho patológico. Já quando ocorre lesão no nervo, ela é dita neuropática, podendo ocasionar desde dormência até hipersensibilidade. Já a dor nociplástica está relacionada com um fator psicológico como medo, depressão, estresse ou ansiedade (KUNER, 2010).

A dor aguda geralmente tem duração limitada em até três meses, é frequentemente causada por danos teciduais e/ou inflamatórios a partir da ativação

de nociceptores. Pode ser vista como um sinal benéfico para o diagnóstico precoce de outras patologias e o tratamento desse tipo de dor costuma ser mais simples (ALLEGRI, et al., 2012). Porém quando a terapia é realizada de forma inadequada ou o tipo de lesão tecidual pode resultar num prolongamento do quadro de dor e desenvolvimento de dor crônica, que por sua vez apresenta uma terapêutica complexa (LEWIS et al., 1994, WANG & MULLALLY, 2020) Essa dor crônica tem duração maior que três meses e geralmente associada a doenças como artrite e diabetes. Além disso, a gravidade e intensidade da dor podem ser influenciadas por fatores psicológicos e sociais (ROSENBLUM et al., 2008).

1.2 Mecanismos da dor

A nocicepção é um processo fisiológico sendo desencadeado por diversos estímulos sejam eles mecânicos, térmicos ou químicos que são detectados por nociceptores enviando o sinal para o sistema nervoso que processa essa informação dolorosa. Os nociceptores são receptores sensoriais envolvidos nesse processo no qual são capazes de captar estímulos dolorosos que atuam na percepção da dor (BASBAUM, et al., 2009).

O processo de nocicepção pode ser dividido em etapas: transdução, transmissão, percepção e modulação. Na Transdução, o estímulo nocivo é convertido em potencial de ação nos dendritos dos nociceptores por meio da ativação de seus receptores de membrana, em especial pelo influxo de Na^+ e Ca^{2+} , que resulta em potencial gerador que leva a despolarização dos terminais pré-sinápticos com a secreção de neurotransmissores e ativação do neurônio seguinte, como observado na Figura 1 (KLAUMANN, 2008).

Os receptores somatossensoriais (nociceptores) tem a capacidade de captar diversos tipos de estímulos, logo, precisam ter diversos mecanismos para que a transdução do sinal seja feita de forma correta. Os nociceptores apresentam canais iônicos para a geração do potencial de ação e por outras moléculas reguladoras, como as do sistema inflamatório. Essa gama de receptores não sinaliza somente a dor aguda, também estão relacionados na persistência da dor ou por dores patológicas. Esse fenômeno é chamado de sensibilização e pode ocorrer tanto no Sistema Nervoso Central (SNC) quanto no Sistema Nervoso Periférico (SNP) onde

há redução dos limiares de ativação do potencial de ação (SCHAIBLE & RICHTER, 2006; GOLD & GEBHART, 2010).

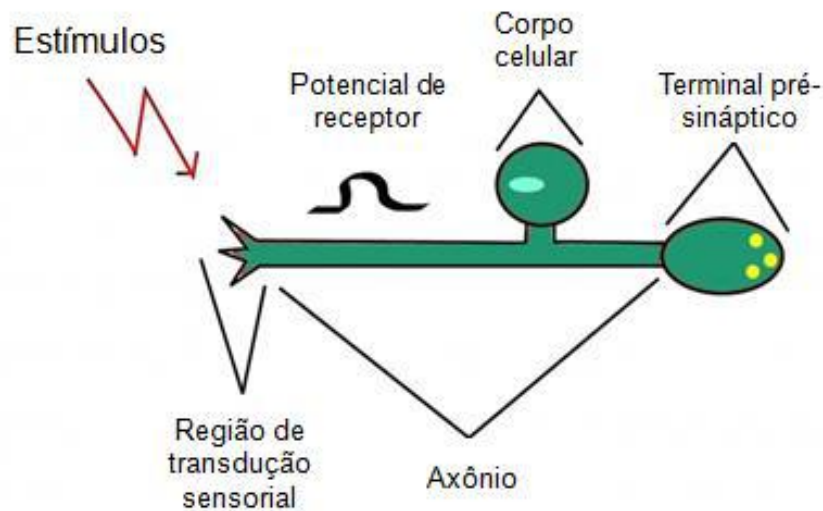


Figura 1: Esquema da estrutura de um nociceptor. A região de transdução sensorial capta os estímulos nocivos e gera um potencial que percorre o axônio até o terminal pré-sináptico onde irá secretar as vesículas contendo neurotransmissores (em amarelo) onde irá ocorrer a sinapse (adaptado de FEIN, 2011).

A mediação é feita por moléculas reguladoras que atuam no terminal do nociceptor quando este é exposto, moléculas como bradicinina, K^+ , aminoácidos, derivados do ácido araquidônico, serotonina, neuropeptídeos e fator de crescimento neuronal (NGF) são algumas delas. Essa modulação pode ser de forma excitatória como pela ação de glutamato e aspartato ou inibitória como pela ação do ácido gama-aminobutírico (GABA) e glicina, por exemplo. No processo inflamatório, o K^+ é liberado após uma lesão e diversos mediadores como bradicinina, prostaglandinas e serotonina são liberados (SCHAIBLE & RICHTER, 2006; KLAUMANN et al., 2008, GOLD & GEBHART GF, 2010).

Alguns mediadores são de suma importância para o processo fisiológico da dor. Prostaglandinas e bradicinina sensibilizam os nociceptores para que ocorra a ativação por estímulos menores. Serotonina (5-HT) e íons de hidrogênio atuam diretamente nos canais iônicos dos receptores da membrana celular. Além dessas moléculas os nociceptores ativados geram uma molécula chamada Substância P no terminal periférico, alterando a permeabilidade vascular e aumentando a vasodilatação, que por sua vez ativa células do sistema imune que contribuem para o processo inflamatório. A partir de toda essa cascata de sinalizações que se

desencadeia respostas para ativação de fibras nociceptiva A δ e C a estímulos menores (APKARIAN et al., 2005; STEEDS, 2009). A Figura 2, resume o processo de ativação e sensibilização mediada pelos mediadores químicos na resposta nociceptiva.

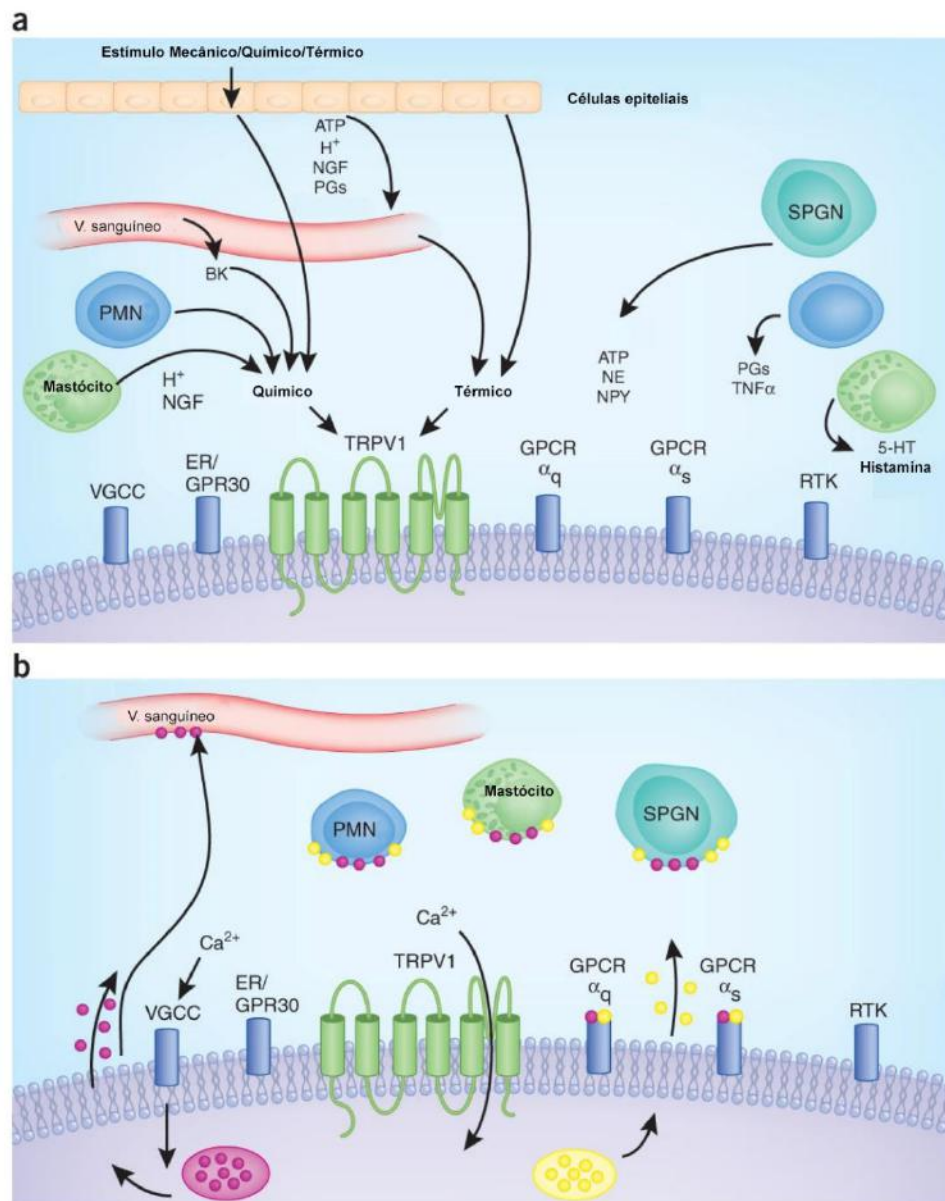


Figura 2: Ativação e sensibilização de nociceptores. Após o estímulo lesivo, ocorre a secreção de mediadores por células estruturais e células inflamatórias (a) assim como pelo nervo pós-ganglionar simpático (SPGN). A ativação de canais iônicos como os receptores vanilóides (TRPV1) resulta na despolarização e conseqüente influxo de Ca²⁺ pelos TRPV1 e canais de cálcio voltagem-dependentes (VGCC) que promovem a secreção de neuropeptídeos (vesículas rosas) e glutamato (vesículas amarelas) que atuam na forma de feedback positivo na secreção de mais mediadores químicos (b). Mediadores como bradicinina e histamina atuam na ativação dos nociceptores, enquanto prostaglandinas, TNF- α e interleucinas sensibilizam os nociceptores.

PMN: leucócitos polimorfonucleares; PGs: prostaglandinas; NE: norepinefrina; 5-HT: serotonina, BK: bradicinina; NGF: fator de crescimento neuronal; NPY: neuropeptídeo Y; GPCR: receptor

acoplado a proteína G; TNF- α : fator de necrose tumoral- α ; RTK: receptor tirosino quinase (Adaptado de GOLD & GEBHART, 2010)

As fibras que inervam nosso corpo são derivadas de corpos celulares do nervo trigêmeo e do gânglio da raiz dorsal. Essas podem ser classificadas em três tipos: Fibras sensoriais primárias A- α , A- β , que são mielinizadas e de condução rápida relacionados à sinais provenientes da pele, músculos, articulações e não contribuem para dor. Fibras A- δ que apresentam diâmetro médio, levemente mielinizadas estão relacionadas com mecanismos nociceptivos por estímulos mecânicos, físicos e químicos. E por último, também relacionada com o sistema nociceptivo estão as Fibras C que tem um diâmetro menor e não são mielinizadas, o que configura uma condução lenta (JULIUS & BASBAUM, 2001; DUBIN & PATAPOUTIAN, 2010).

Na etapa seguinte temos a Transmissão, é nesse momento que o potencial de ação é conduzido do local onde o nociceptor foi estimulado até o SNC. A transmissão da dor ocorre em cinco vias ascendentes principais: Trato espinotalâmico, composto por neurônios específicos provenientes de fibras A δ e C que ascendem até o tálamo. Trato espinoreticular, onde há a presença de neurônios que ascendem da medula espinhal e termina na formação reticular e no tálamo. Trato espinomesencefálico, onde os neurônios estão projetados até a formação mesenfálica. Trato espinocervical, no qual as suas fibras fazem conexão até o tálamo pelo trato cervicotalâmico. Trato espinotalâmico, onde os axônios atingem diretamente o tálamo participando de respostas neuroendócrinas e cardiovasculares induzidas pela dor (PISERA, 2005; KANDELL, 2014).

Quando atinge o córtex, ocorre a Percepção da dor, identificando a origem do estímulo, sua intensidade, e as reações afetivas e cognitivas relacionadas. Diferente de outras sensações corporais onde há uma mais nítida compartimentalização e linearidade do processamento, para a dor isso não ocorre. De fato, existem diversos modelos propostos que se somam na complexidade da experiência dolorosa. Esses modelos mostram a natureza multimodal do processamento da dor envolvendo aspectos, intrínsecos, somatotrópicos e mecânicos da nocicepção, mas também um componente cognitivo e um componente emocional e avaliativo da dor (FENTON et al., 2015). Vale ainda ressaltar que disfunções dessa malha de comunicações que existe no processamento da dor está relacionada a desenvolvimento de dor crônica (BALIKI et al., 2008).

A quarta e última etapa, denominada Modulação, ocorre regulando a intensidade de ativação do sistema nociceptivo pela secreção de mediadores neuronais (KLAUMANN, 2008). Essa modulação é caracterizada pelas vias descendentes, onde ocorre o bloqueio da dor pela inativação dos neurônios nociceptivos. Essa via se origina na região cinzenta periaquedutal (PAG) e se estende para o corno dorsal da medula pela medula rostro-ventromedial (RVM). A PAG é a principal responsável do sistema inibitório endógeno da dor e está localizada no mesencéfalo (SMITH et al., 1995). Esse processo é mediado por neurônios serotoninérgicos e noradrenérgicos que quando ativados realizam conexões com neurônios localizados nas lâminas I, II e V, reduzindo a resposta à dor. Neurônios presentes no núcleo magno de rafe e núcleo reticular gigantocelular também podem contribuir no processo de modulação de dor por atuarem no tráfego nociceptivo (PISERA, 2005, STEEDS, 2009).

Receptores opióides também se mostraram importantes nesse processo de regulação, principalmente os subtipos Mu (μ), Delta (δ) e Kappa (κ). Seus efeitos são relacionados com o acoplamento com a proteína G inibitória, ativando sistemas efetores como de canais iônicos. Geralmente são efeitos inibitórios na transmissão da dor, porém já foram relatos efeitos excitatórios (RIEDEL & NEEK, 2001; KANJHAN, 1995). Neurônios GABAérgicos também podem atuar na modelação da dor tanto na via descendente pela liberação de Ácido γ -aminobutírico (GABA), quanto na via ascendente pela redução da atividade dos canais de cálcio (LAU & VAUGHAN, 2014). Distúrbios no processo de modulação da dor tem sido relacionado com a cronificação da resposta dolorosa inclusive na dor neuropática DN) (GILRON et al., 2015).

1.3 Dor neuropática

De acordo com a IASP (2017), a dor neuropática (DN) é definida como “causada por uma lesão ou doença do sistema somatossensorial”. Trata-se de uma dor causada por diversos tipos de lesões ou doenças, como doenças metabólicas, produtos químicos, câncer, infecções, traumas mecânicos, tratamentos medicamentosos e outros. É um tipo de dor que tanto o sistema nervoso central quanto o periférico podem ser comprometidos (JENSEN et al., 2011).

A prevalência mundial de DN varia de 6,9% a 10,0% (VAN HECKE et al., 2014), entretanto considerando condições específicas como polineuropatia diabética dolorosa, dor neuropática pós-cirúrgica, esclerose múltipla, lesão espinal e no câncer esses valores podem ser maiores (COLLOCA et al., 2017). Em pacientes com câncer apontam uma prevalência variando entre 25-100% dos pacientes de acordo com o estado da doença (PAICE & FERRELL, 2011). A própria terapia antineoplásica pode gerar a dor neuropática induzida por quimioterapia estando presente em 61,5% dos pacientes no início do tratamento e em 30% dos pacientes seis meses após descontinuação da quimioterapia (SERETNY et al., 2014). No Brasil, estudos apontam uma prevalência de 60% de dor neuropática entre os casos de dor crônica e de 10% na população geral (DE MORAES VIEIRA et al., 2012; VIEIRA, et al. 2014, POSSO et al., 2016).

A DN pode surgir por diversas causas, o que a torna uma condição um tanto complexa. Os principais sintomas relatados pelos pacientes são queimações e dor por estímulos que normalmente não causam dor (alodinia). Pacientes com depressão e ansiedade também notam maior frequência dessas sensações, o que agrava o problema. Os locais dessas sensações são predominantemente a parte inferior das costas e os membros inferiores (COLLOCA et al., 2017; BOUHASSIRA et al., 2008).

Aparentemente, o desequilíbrio da sinalização somatossensorial, alterações de canais iônicos e na modulação da dor pelo SNC são fatores envolvidos na dor neuropática. As patologias que envolvem a dor neuropática estão relacionadas com fibras C não mielinizadas e fibras A mielinizadas ($A\beta$ e δ). Devido as diferentes condições que envolvem a dor neuropática, um mecanismo geral não foi identificado, dados da literatura indicam a atuação de receptores do tipo Toll, receptores vanilóides, receptores opióides e outros possam estar atuando no mecanismo de ação, portanto estudos à cerca da patologia ainda se fazem necessários. (KRAYCHETE et al., 2008; FREYNHAGEN et al., 2006; FINNERUP et al., 2016).

Para tal, temos a disposição diversos modelos de dor neuropática em animais, com o intuito de mimetizar a condição humana frente às diferentes patologias. Dentre os modelos utilizados para estudos de DN temos a ligadura ou lesão do nervo ciático, a lesão citotóxica por quimioterápicos (ex: cisplatina, vincristina e paclitaxel), a indução de diabetes mellitus gerando a neuropatia

diabética, infecção pelo vírus da herpes simples tipo 1 entre outros (BOYCE & JARVIS, 2009; GAO & ZHENG, 2014; HAMA & TAKAMATSU, 2016; UEDA et al., 2020).

A vincristina é um alcaloide proveniente da vinca, popularmente conhecida como unha-de-gato. É um medicamento utilizado na prevenção de diversos tipos de tumores, como a leucemia e câncer de linfoma. Um dos seus principais efeitos colaterais é a neuropatia periférica, isso ocorre devido à liberação de diversos mediadores inflamatórios como bradicinina, citocinas pró-inflamatórias, TNF, IL-1 β e outros, que atuam na indução e na manutenção da dor neuropática, a qual pode ser mimetizada em modelos animais dependendo a dose utilizada (GEISLER et al., 2016; SCHOMBERG et al., 2012).

Já o modelo de DN proveniente de lesão de nervo causa hiperalgesia e alodinia mecânica e térmica após três dias do procedimento e se prolonga por 4 semanas até 12 meses em camundongos. Além disso, esse tipo de lesão também pode gerar comportamentos de ansiedade e depressão, apresentando similaridade nos quadros clínicos de pacientes. Alguns fenômenos provenientes da lesão de nervo são descritos para explicar esses comportamentos, como o desequilíbrio de células gliais na indução de alodinia, plasticidade sináptica, excitabilidade neuronal e atuação na transmissão de sinais nas áreas espinhas e supraespinhais (NORMAN et al., 2010; D'ANIELLO et al., 2017; GUIDA et al. 2020).

A detecção da DN em animais (corretamente em animais é detectada a nocicepção) são testes análogos ao método de diagnóstico clínico. Esses métodos consistem na avaliação dos animais frente a estímulos térmico (quente ou frio) ou mecânicos e estudos comportamentais. Os principais fenômenos estudados no que tange a estes métodos são a hiperalgesia (aumento de sensibilidade frente à um estímulo doloroso) ou a alodinia (percepção de dor por um estímulo normalmente não doloroso) (GREGORY et al., 2013; SANDKÜHLER, 2009). Na Tabela 1 podemos observar alguns dos métodos utilizados para avaliar a hiperalgesia ou alodinia em animais.

Tabela 1: Métodos utilizados para avaliar a hiperalgesia ou alodinia em animais (Adaptado de Sandkühler, 2009).

Modalidade	Nome do teste	Método do teste	Local avaliado	Parâmetro observado
Mecânica	Von Frey	Aplicação de filamentos calibrados não nocivos	Pata traseira Face	Limiar de força para retirada de pata (alodinia mecânica)
	Randall Selitto	Aplica de força mecânica linearmente crescente na pele	Pata traseira	Limiar de força para retirada de pata (hiperalgesia mecânica)
Quente	<i>Tail-Flick</i>	Estimulação com fonte térmica (água ou luz)	Cauda	Latência para retirada da cauda (hiperalgesia térmica)
	Placa Quente	Estimulação em superfície aquecida	Pata traseira e dianteira	Latência para retirada da pata (hiperalgesia térmica)
Frio	Acetona	Aplicação de solução de acetona	Pata traseira	Duração do tempo de comportamentos nociceptivos (hiperalgesia térmica)
	Placa Fria	Estimulação em superfície aquecida (5 - 10 °C)	Pata traseira e dianteira	Latência para retirada da pata (hiperalgesia térmica)

1.4 Farmacologia da dor

O tratamento da dor é baseado no tipo de dor e suas características, geralmente são utilizados anti-inflamatórios não esteroides (AINES), opióides e analgésicos simples. Alguns outros fármacos podem ser utilizados como adjuvantes dependendo da farmacologia utilizada, como anticolinérgicos, anticonvulsivantes, anestésicos e antidepressivos (ROCHA, 2007; GOMES, 2007). A Organização Mundial de Saúde (2020) preconiza a terapêutica farmacológica de acordo com intensidade de dor que é dividida em 4 degraus conforme apresentada da Figura 3.

Os analgésicos comuns e AINES são os medicamentos mais indicadas para dores leves e moderadas, sendo os AINES como um dos mais utilizados devido a suas características anti-inflamatórias, analgésicas e antipiréticas. Atuam na inibição da enzima ciclooxigenase (COX) e conseqüentemente das prostaglandinas. Com a diminuição do processo inflamatório há diminuição da sensação de dor (VANE, 1971; GROSSER et al., 2012). Porém esses medicamentos podem acarretar

diversos efeitos adversos como gastrite, problemas renais, hipertensão arterial, hipersensibilidade e inibição da função plaquetária (CASTEL-BRANCO et al., 2013). Em relação aos analgésicos simples, os mais utilizados são o paracetamol e a dipirona. Por mais que sejam os medicamentos mais usados no mundo, o uso racional desses medicamentos é imprescindível, visto que já é sabido o efeito hepatotóxico do paracetamol, por exemplo (WANNMACHER, 2005).

Os opióides tem aplicação para dores moderadas a severas, porém muitas vezes sua eficácia analgésica está diretamente ligada a seus efeitos adversos inclusive o potencial efeito de dependência (WEST et al., 2015). Atuam como agonistas dos receptores opióides μ (mi), κ (kappa) e σ (delta) na modulação e transmissão de dor na medula espinhal e no cérebro. Dentre essa classe a morfina é um dos opióides mais conhecidos e tem como efeitos adversos constipação, sedação, insônia entre outros (CHAHL,1996).

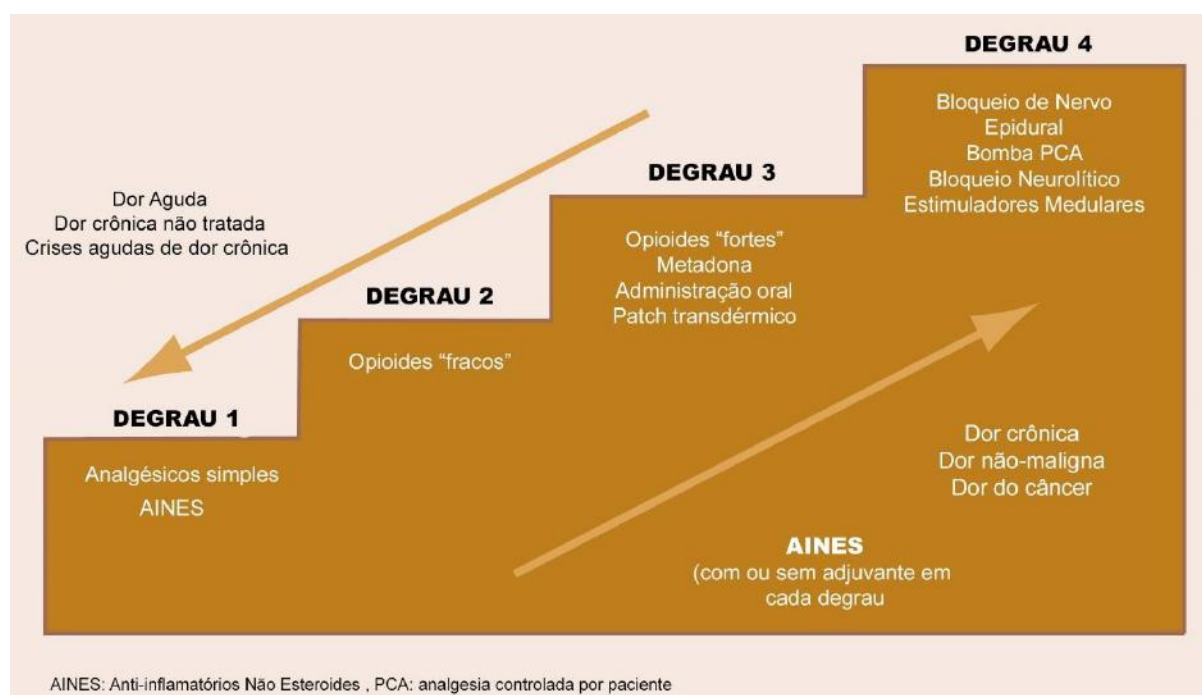


Figura 3: Escada de dor de acordo com a Organização Mundial de Saúde. Para cada degrau um tipo de tratamento é preconizado.

Dentro dos fármacos adjuvantes, tem-se aqueles que são comumente utilizados para aumentar os efeitos dos analgésicos. Fármacos como antidepressivos, anticonvulsivantes e corticosteróides tem diversos usos no manejo da dor (KHAN et al., 2011; PROMMER, 2015). A ação desses fármacos em geral

objetiva a redução da transmissão sináptica e supressão da atividade do neurônio aferente primário e do gânglio da raiz dorsal (OLIVEIRA, 1998).

1.4.1 Tratamento da dor neuropática

O tratamento da DN é ainda ineficiente e com baixa satisfação pelos pacientes. Por se tratar de uma condição com diversas causas, nem sempre os medicamentos utilizados têm eficácia analgésica quando a dor neuropática tem origens diferentes, gerando complexidade na sua terapêutica. Os fármacos mais utilizados no tratamento desse tipo de dor são anticonvulsivantes, antidepressivos e analgésicos opióides (FINNERUP et al., 2005; ZILLIOX, 2017).

Geralmente pacientes com DN não apresentam uma melhora com AINES, analgésicos clássicos ou opióides fracos como normalmente são tratados em outros tipos de dor. Atualmente o tratamento é baseado em diversos estudos e práticas clínicas e são divididos em linhas. Pregabalina, gabapentina, amitriptilina e dulotexina são fármacos promissores e atuam como primeira linha no tratamento da DN. Em relação a fármacos de segunda linha, os mais utilizados são a capsaicina, lidocaína e tramadol. Já a morfina e toxina botulínica A estão indicados como tratamento de terceira linha (COLLOCA et al., 2017).

A amitriptilina e a dulotexina são fármacos antidepressivos com grande uso no tratamento da DN. Alguns mecanismos já foram propostos e um deles é a atuação no controle da modulação da dor pelas vias descendentes e uma possível ação em adrenocetores β_2 . Em relação a pregabalina e gabapentina, anticonvulsivantes muito utilizado no tratamento de DN periférica, os efeitos analgésicos presentes nesses fármacos estão relacionados principalmente a diminuição da sensibilização no SNC através da inibição de canais de cálcio dependentes de voltagem (YALCIN et al., 2009; LUO et al., 2001). Entretanto muitos desses fármacos apresentam uma série de efeitos adversos que dificultam a terapia dos pacientes. A Tabela 2 resume os principais fármacos utilizados na DN, seus mecanismos de ação e efeitos adversos relacionados, com base na revisão de Colloca e colaboradores (2017).

Tabela 2: Farmacoterapia para DN.

Fármacos	Mecanismo de ação	Efeitos adversos
Amitriptilina	Inibição da recaptação de monoaminas	Sonolência Ganho de peso
Nortriptilina	Bloqueio do canal de sódio	Efeitos anticolinérgicos
Duloxetina	Inibição da recaptação de serotonina e noradrenalina	Náusea Dor abdominal Constipação
Gabapentina	Diminuição da sensibilização central por canais de cálcio	Sedação
Pregabalina		Tontura Ganho de peso
Morfina	Agonista de receptores opióides	Uso de forma abusiva, dependência Risco de suicídio
Tramadol	Bloqueio de recaptação de monoaminas	

A alta prevalência de DN entre pacientes com dor crônica ou na população geral, associado a carências de terapias específicas para a DN e ainda a baixa eficácia analgésica muitas vezes associado a uma gama de efeitos adverso, resulta ainda hoje na busca de novas terapias para essa patologia (SERRANO et al., 2021)

1.5 Produtos Naturais

Plantas medicinais são quaisquer vegetais que possuam substâncias com finalidade terapêutica. Seu uso é uma prática antiga e com o passar do tempo as propriedades terapêuticas presentes nessas plantas foram sendo descobertas e utilizadas na medicina. As plantas medicinais são importantes na área da indústria e pesquisa também, os princípios ativos presentes nelas são capazes de servir como tratamento em diversas doenças (DUTRA, 2009; VEIGA et al., 2005).

Por mais que sejam derivados naturais, sua preparação e utilização devem ser conduzidas de forma correta para que não ocorram reações adversas ou intoxicações. Sua utilização pela população é ampla, pois acredita-se que a utilização de medicamentos obtidos de plantas é menos agressiva que os sintéticos (FERREIRA, 2019; BADKE, 2008). Dentre a utilização de extratos vegetais,

frequentemente são relatadas ampla atividade biológica para diversos tipos de doenças, muitas das vezes com grande probabilidade de sinergismo entre os componentes, mecanismo não encontrado quando moléculas isoladas são testadas. Essa combinação de componentes é promissora para doenças que possuem uma terapia mais complexa, devido à atuação em diversos alvos, o que gera uma maior eficácia e menor resistência aos fármacos utilizados (CASANOVA & COSTA, 2017).

Em relação aos medicamentos, sua produção demanda um custo muito alto devido a industrialização e suas patentes tecnológicas, em relação ao custo dos medicamentos fitoterápicos é bem menor. Com a mesma rigorosidade e sem prejudicar os efeitos biológicos presentes para o tratamento de diversas patologias, essa característica torna atrativa para a saúde pública, no qual um dos maiores empecilhos é a alto custo (OLIVEIRA et al., 2006).

O Brasil é um país que possui a maior biodiversidade do mundo com cerca de 20% de todas as espécies do planeta. O mercado mundial no que tange a medicamentos movimenta bilhões de dólares e estima-se que somente os fitoterápicos são responsáveis por aproximadamente 30 bilhões de dólares da movimentação do mercado farmacêutico mundial (LEÃO, 2015).

Há vários fármacos muito utilizados na medicina e que foram desenvolvidos a partir de produtos naturais como, por exemplo, os derivados semi-sintéticos de artemisinina, utilizados no tratamento da malária; o diterpeno paclitaxel, de *Taxus brevifolia*, para tratamento de tumores, a camptotecina, alcaloide também utilizado na quimioterapia do câncer (BARREIRO e BOLZANI, 2009).

Uma das substâncias analgésicas mais importante para humanidade, a morfina, é o componente majoritário do ópio derivado da *Papaver somniferum*. Posteriormente foram descobertos outros alcaloides também derivados do ópio, como: codeína, tebaína e papaverina (DUARTE, 2005). Outra grande marca na história dos medicamentos foi a aspirina que é amplamente utilizada como analgésico, anti-inflamatório e a antipirético. Ela é proveniente do Salgueiro (*Salix alba*) e atualmente é utilizada no mundo inteiro e estima-se que até 2010 já foram produzidos mais de 350 bilhões de comprimidos (LOPES, 2011). Isso mostra o quão importante são os produtos naturais para o desenvolvimento de fármacos.

1.6 Gênero *Vitex*

O gênero *Vitex* é um dos 236 gêneros que pertencem a família Laminaceae (antigamente chamada de Verbenaceae) que abrange mais de 7000 espécies. Conta com cerca de 270 espécies conhecidas do gênero *Vitex* composta por arbustos e árvores predominantes de regiões tropicais e subtropicais, e também em zonas temperadas (MEENA et al., 2011). Esse gênero possui espécies utilizadas de forma medicinal como *V. agnus-cactus*, *V. negundo* Linn, *V. rotundifolia* e *V. polygama* (RANI & SHARMA, 2013).

A espécie *Vitex agnus-cactus* é uma árvore ou arbusto encontrada na linha costeira Anatólia. Na medicina popular é utilizada como diurético, ansiolítico, antifúngico e agente digestivo. Essa planta é uma das mais estudadas do gênero e tem atividade identificada para inibição da síntese de prolactina cuja ação é ligada a efeitos em receptores opióides e de dopamina decorrente de sua composição rica em flavonoides, diterpenos e cetosteróides (WEBSTER et al., 2011; BRATTSTRÖM, 2014). Além disso, recentemente foi associado o uso dessa planta no tratamento de dor na mastalgia cíclica (OOI et al., 2020).

Outra espécie importante é a *Vitex negundo* Linn, é uma árvore conhecida como Nirgundi e cresce predominantemente em áreas desertas. Sua composição é variada a partir de lignanas, flavonoides, terpenos, sesquiterpenos, di e triterpenos, óleos voláteis e esteroides. As principais atividades descritas são proteção frente a hepatotoxicidade, alto potencial antioxidante, anti-inflamatória e analgésica (ALAM, 2003; CHANDRAMU et al., 2003).

Portanto, o gênero *Vitex* mostra-se de grande importância como fonte de substâncias bioativas e que possam ser utilizadas para obtenção de atividade analgésica.

1.6.1 *Vitex polygama* Cham.

No Brasil, o gênero *Vitex* é nativo do Brasil e encontrado em Minas Gerais, Rio de Janeiro, Bahia, São Paulo e Espírito Santo (GALLO, 2006). É um arbusto ou árvore entre 2 à 12 metros de altura com ramos marrons e folhas digitadas que ficam aglomeradas nas pontas dos ramos e tem presença de flores e frutos (Museu Nacional, 2021).

A espécie *Vitex polygama* é um arbusto presente em diversos países como: China, Filipinas, Índia, Brasil e entre outros. Em sua composição química já foram

descritos sesquiterpenos, monoterpenos, flavonóides, ácido fenólico, fitoesteróides entre outros (GALLO, 2006. a). O extrato das folhas de *V. polygama* tem grande atividade anti-inflamatória, antipirético e antitumoral. Também foi descrita atividade de inibição moderada de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (TANDON, 2008; HERNÁNDEZ et al., 1999; TIWARI et al., 2013).



Figura 4: *Vitex polygama* Cham., espécie da família Lamiaceae. Adaptado de Museu Nacional, 2021.

No Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (localizado na região Noroeste do Estado do Rio de Janeiro), encontra-se a espécie *Vitex polygama*, onde é popularmente chamada de tarumã, azeitona do campo, maria preta, velame do campo, marianeira, entre outros. A utilização dessa espécie pela medicina popular tem diversos fins terapêuticos como ação anti-inflamatória, antibiótica, diurética e para combater e prevenir doenças renais. Efeitos anti-inflamatórios foram descritos por pesquisadores do nosso grupo de estudo, flavonoides presentes nessa planta são capazes de modular a produção de NO e TNF- α , o qual pode também estar associado aos seu efeito analgésico (JESUS et al., 2020; GALLO et al., 2008).

Dados do nosso grupo de estudo também mostram os efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios no extrato e frações de *Vitex polygama*. Porém, os mecanismos de ação dessa espécie não são bem elucidados. Considerando que para outras plantas do gênero *Vitex* tiveram descrita ação analgésica, estudos a fim identificar e elucidar as propriedades biológicas espécie se fazem necessárias.

2 JUSTIFICATIVA

A DN está associada a diversas comorbidades e não tem uma terapia eficaz, trata-se de um tratamento complexo e prolongado que traz consigo muitos efeitos adversos proveniente dos fármacos usados no seu tratamento. Com isso, é necessário a busca de novas terapias para esse tipo de síndrome. Os produtos naturais têm sido destaque na busca de novos medicamentos por apresentarem uma ampla atividade terapêutica, inclusive a atividade analgésica. O Brasil tem em seu destaque no mundo devido a grande diversidade em relação a sua fauna e flora. Na região norte do estado do Rio de Janeiro está localizado o Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba onde dentre as mais de 1 mil espécies vegetais encontra-se a *Vitex polygama* a qual o gênero tem descrito atividade analgésica. Portanto, o presente estudo visa estudar as atividades antinociceptiva do extrato bruto e frações de *Vitex polygama* em modelo de DN induzida por quimioterápico a fim de identificar possível atividade analgésica para o tratamento dessa patologia.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos do extrato hidroalcoólico e frações de *Vitex polygama* em modelo de DN em camundongos suíços.

3.2 Objetivos Específicos

- Analisar o efeito do extrato vegetal bruto em modelo de dor neuropática induzida por vincristina no teste de placa quente;
- Analisar o efeito das frações hexânica, butanólica, acetato de etila e diclorometano em modelo de dor neuropática induzida por vincristina no teste de placa quente;
- Analisar comparativamente o efeito analgésico do extrato vegetal com o analgésico clássico morfina na dor neuropática em camundongos utilizando o teste de placa quente.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Extrato e frações de *Vitex polygama*

O extrato bruto das folhas de *Vitex polygama* (EVP) foi gentilmente cedido pela Prof^a. Dr^a. Michelle Frazão Muzitano do Laboratório de Produtos Bioativos (LPBIO) do Centro Multidisciplinar UFRJ-Macaé. A saber o EVP obtido a partir de amostras de *V. polygama* coletadas no Parque Nacional de Jurubatiba localizado na região norte do estado do Rio de Janeiro (22 ° 27'S, 41 ° 65'W). As amostras de planta foram identificadas pela bióloga Dr^a. Tatiana Ungaretti Paleo Konno (UFRJ-Macaé). Um voucher da espécie foi depositada no *herbarium* da Universidade Federal do Rio de Janeiro sob licença número RFA38750. Folhas secas da planta foram submetidos à maceração (78,8g/L) em etanol/água (7:3, v/v) a temperatura ambiente com rendimento de 11,2%.

Para obtenção das frações, foram realizados fracionamentos líquido-líquido a partir da ressuspensão do EVP em 400 mL de metanol:água. A separação foi feita pelos solventes a partir da sua polaridade e de forma crescente: Hexano (HEX), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (Act) e Butanol (BOH).

4.2 Animais

Os experimentos *in vivo* foram realizados no Setor de Farmacologia do Laboratório Produtos Bioativos do Centro Multidisciplinar UFRJ-Macaé. Foram utilizados camundongos suíços fêmeas provenientes do Biotério do Laboratório de Produtos Bioativos, pesando de 35 a 40g, mantidos em biotério com temperatura e umidade controladas, ciclo de 12/12 horas de luz e com água e ração *ad libitum*. Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais d UFRJ com protocolo aprovado de número MAC051.

4.3 Modelo de dor neuropática

A vincristina é um fármaco utilizado na quimioterapia de câncer e um de seus efeitos adversos é a indução de DN (ANGHELESCU et al., 2020). A indução de DN em camundongos pela vincristina tem se mostrado importante para estudos tanto da fisiopatologia da dor quanto para busca de novas terapias analgésicas (HIGUERA, 2004).

Para avaliar a atividade analgésica do extrato bruto e suas frações, foi utilizado o modelo de indução de DN por vincristina em camundongos. O método consiste na administração de vincristina (0,1mg/kg) por via intraperitoneal durante 5 dias consecutivos, e após um intervalo de 2 dias, novamente os animais são tratados com vincristina sob mesma dose por mais 5 dias consecutivos (KAHNG et al., 2015). Após um intervalo de mais dois dias foram realizadas as análises de nocicepção. A Figura 5 apresenta o esquema de tratamentos do protocolo utilizado.

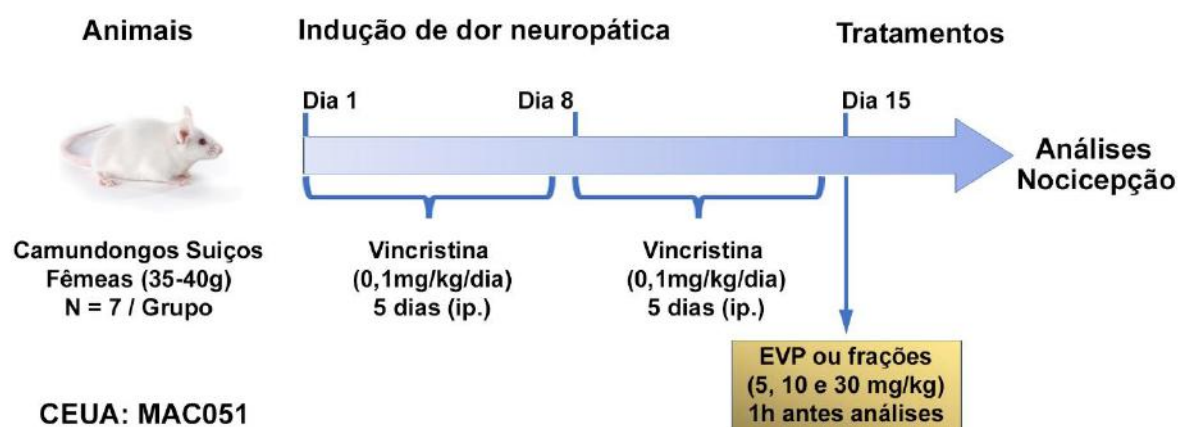


Figura. 5: Esquema do protocolo experimental de indução de DN por vincristina.

4.4 Teste de placa quente

Para a análise nociceptiva foi utilizado o teste de placa quente. Os animais foram colocados sobre a placa quente (Insight, modelo EFF-361) com temperatura de aproximadamente $52 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. A pata posterior direita foi observada e o tempo para que o animal levantasse ou agitasse vigorosamente a pata foi documentado com o auxílio de um cronômetro (MALMBERG; BANNON, 2001). O tempo para resposta nociceptiva (latência) foi registrado em segundos. Animais com dor tendem a levantar a pata num intervalo de tempo menor em relação aos animais sem dor. O

tempo máximo de permanência dos animais na placa quente foi de 20 segundos a fim de se evitar dando tecido na pata dos animais.



Figura. 6: Foto ilustrativa do teste da placa quente. No teste detectamos o levantamento pata posterior após ser colocada sobre a placa quente aquecida. Adaptado de Silva, 2013.

4.5 Tratamentos

Após confirmação da hiperalgesia térmica causada pela administração de vincristina de acordo com protocolo descrito anteriormente, os animais foram administrados com extrato ou frações de *Vitex polygama* (5,10 e 30 mg/kg) diluídos em DMSO (0,1%, ip.). Após os tratamentos a nocicepção foi avaliada de acordo com a cinética de tempo de 1, 3, 5 e 24h após o tratamento com extrato bruto ou frações de *Vitex polygama*.

Para fins de comparação (controle positivo) do efeito analgésico, um grupo de animais com dor foi tratado morfina (10mg/kg) ip., 1 hora antes das análises de nocicepção (CHAMORRO et al., 2018). Foi estipulado um tempo máximo de permanência na placa de 20 segundos, a fim de evitar lesões teciduais. Como controle negativo experimental, animais foram tratados com salina (NaCl, 0,9%) em ciclos de 5 dias similares aos de vincristina e posteriormente tratados novamente com salina antes das análises de nocicepção na placa quente. A Figura 7 representa esquematicamente os grupos experimentais, tratamentos e cinética de avaliação da nocicepção.

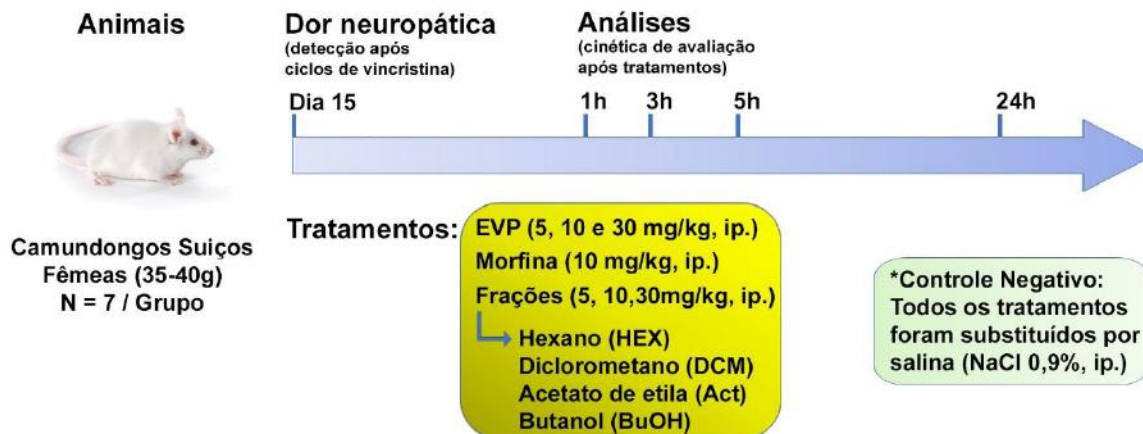


Figura 7: Representação esquemática dos tratamentos e análises de nociceção.

4.6 Análises estatísticas

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média de no mínimo 5 animais por grupo experimental. As análises estatísticas e plotagem dos gráficos foram realizadas utilizando o software GraphPrism 5.0. Foi realizado o teste de análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Newman-Keuls. As variações entre os grupos controle negativo (salina), controle positivo (morfina) e os grupos experimentais (EVP ou frações) foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de $P < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeito do extrato bruto de *Vitex polygama* na dor neuropática

A administração crônica da vincristina induz DN, sendo um modelo utilizado para avaliar tanto a fisiopatologia quanto atividade analgésica de substâncias (HIGUERA, 2004). O tratamento de animais com dois ciclos de cinco dias com vincristina resultou na presença de dor com atestado no teste da placa quente. Como podemos observar na Figura 8, os animais do grupo vincristina apresentavam tempo de latência de $4,6 \pm 1,6s$ após estimulação térmica ($52^{\circ}C \pm 0,5$) enquanto os animais do grupo controle (salina) tiveram tempo de latência de $10,6s \pm 1,6s$ ($P < 0,05$). Esses dados são similares aos encontrados em estudos de DN induzida por vincristina em animais, evidenciando a presença de dor em nosso modelo experimental (GONG et al., 2016). Em pacientes com câncer a vincristina tem aplicação, mas contrasta com um severo efeito adverso, a neuropatia periférica e a DN, fazendo os pacientes muitas vezes descontinuarem o tratamento (CAROZZI et al., 2015). Esse efeito é decorrente do bloqueio da β -tubulina axonal resultando ao edema de axônios de fibras mielinizadas e amielinizadas, além de ativar fibras nociceptivas do tipo C (TANNER et al., 1998a, 1998b). Além disso, é discutindo o aumento de espécies reativas de oxigênio resultando em neurotoxicidade neural, alteração da plasticidade neuronal, inclusive das fibras C, desbalance do sistema opioide, processo inflamatório, aumento da secreção de interleucina- 1β por células gliais, alteração do influxo de Ca^{2+} entre outros (CAROZZI et al., 2015). Assim, substâncias que atuem reduzindo essas alterações podem trazer benefícios para pacientes com DN.

O tratamento com o extrato bruto de *Vitex polygama* (EVP) nas doses crescentes de 5 a 30mg/kg, 1 hora antes das análises de nocicepção, apresentou resultado significativo em inibir a resposta dolorosa quando comparadas aos animais não tratados. O EVP aumentou os tempos de latência 1 h após o tratamento em todas as doses utilizadas. Nas doses de 10 e 30mg/kg observamos o efeito antinociceptivo até 3 horas após o tratamento, que não maior dose ainda

apresentava efeito no tempo de 5h. Após 24 h não observamos nenhum efeito do EVP e os animais voltando a sentir dor (Figura 8).

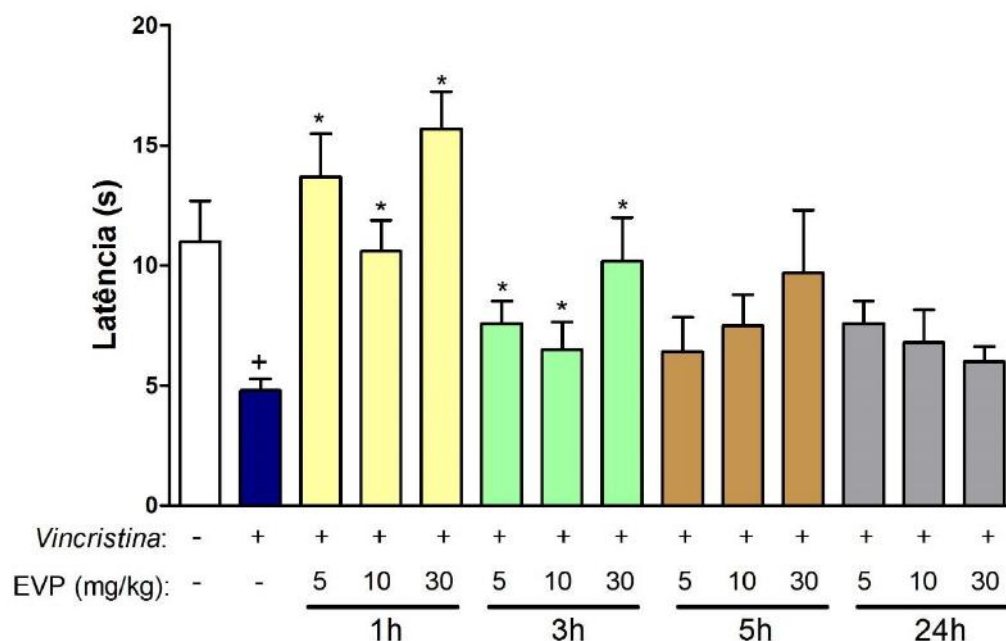


Figura 8: Efeito do Extrato de *Vitex polygama* (EVP) na dor neuropática induzida por vincristina. Os dados apresentam o tempo de latência para levantamento da pata direita no teste da placa quente. Animais controle negativo (barra branca) foram apenas tratados com salina (NaCl, 0,9%). A barra azul representa o grupo com dor induzida por vincristina. As demais barras representam os animais tratados com EVP em doses de 5 a 30 mg/kg (ip.) e o tempo de latência observado 1, 3, 5 e 24 h após o tratamento. Os dados representam a média e E.P.M (+P<0,05 vs controle; *P<0,05 vs. vincristina; ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls; n=7).

Na literatura há relatos de espécies do gênero *Vitex* apresentarem efeitos analgésicos como uma de suas atividades biológicas. Hamamm e colaboradores (2016) mostrou o efeito antinociceptivo do extrato de *Vitex mepatopamica* em ratos. Esse efeito parecia mediado por receptores opióides, visto que houve bloqueio pela naloxona (antagonista do receptor). Além disso, o efeito antidepressivo também foi observado por esse extrato sugerindo a ação central. Já foi descrito também na literatura a afinidade por receptores opiáceos a partir do extrato de *Vitex agnus-castus*, principalmente o receptor μ . Esses estudos corroboram para uma possível indicação para, não único, mecanismo de ação (WEBSTER et al., 2006; KHALILZADEH et al., 2015). Para *V. negundo* foi ainda descrito o efeito anti-inflamatório e antioxidante (KULKARNI et al., 2008; ZHENG et al., 2014). Esses

efeitos descritos seriam interessantes no contexto da DN. Em nossos achados, identificamos o efeito inédito antinociceptivo do extrato de *Vitex polygama* em modelo de DN induzida por vincristina. Esse achado é condizente com o descrito para o gênero *Vitex* (RANI & SHARMA, 2013; YAO et al., 2016).

5.2 Estudo comparativo do efeito antinociceptivo de EVP e morfina

A morfina é um analgésico opioide clássico, oriundo da planta *Papaver somniferum*, e apesar de pouco utilizado no tratamento de DN decorrente da baixa eficácia e efeitos adversos (DWORKIN et al., 2007). Entretanto há dados em modelos animais de DN e em ensaios clínicos controlados que a ativação por agonistas de receptores opióides μ tem eficácia no controle da DN (ABAD et al., 2011) e por isso utilizamos a morfina como controle positivo para fins de comparação do efeito analgésico.

O tratamento com morfina (10mg/kg, ip), 1h antes de avaliar a nocicepção, promoveu efeito antinociceptivo nos animais com DN induzida por vincristina (Figura 9). O efeito foi comparado a dose de 10 mg/kg de EVP no mesmo tempo de análise. Constatamos que o efeito antinociceptivo observado tanto para o extrato quanto para a morfina foram significativamente semelhantes, com valores de latência de $8,8 \pm 0,4s$ e $10,6 \pm 1,2s$ ($P < 0,05$), respectivamente. Ambos os tratamentos foram significativamente diferentes quando comparado ao grupo de animais com DN não tratados ($5,0 \pm 0,3s$). Apesar do mecanismo de ação da *Vitex polygama* ainda não ter descrito a promoção desse efeito antinociceptivo com eficácia similar a morfina tem importante relevância clínica.

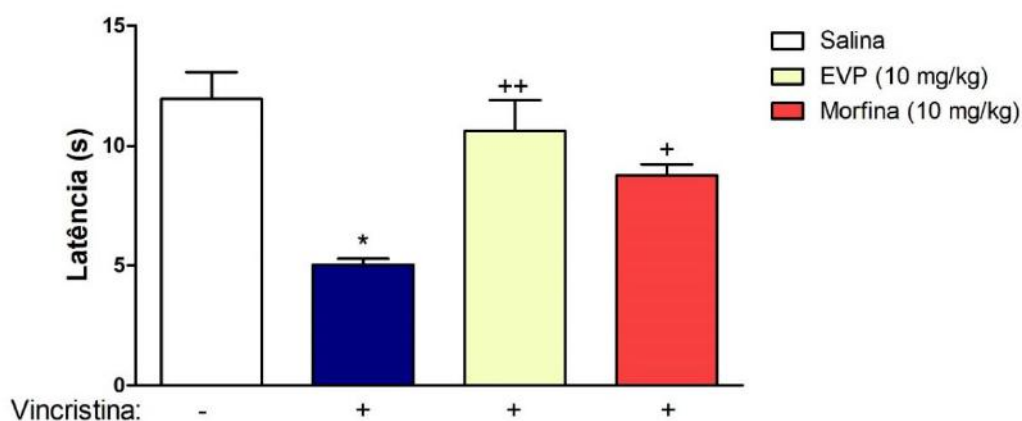


Figura 9: Estudo comparativo dos efeitos do extrato bruto de *Vitex polygama* e morfina na dor neuropática induzida por vincristina. Os dados apresentam o tempo de latência para levantamento da pata direita no teste da placa quente. Animais controle negativo (barra branca) foram apenas tratados com salina (NaCl, 0,9%). A barra azul representa o grupo com animais com dor induzida por vincristina. A barra amarela representa o grupo de animais com dor induzida por vincristina tratados com extrato de *V. polygama* (EVP, 10mg/kg, ip.). A barra amarela representa o grupo de animais com dor induzida por vincristina tratados com morfina (10mg/kg, ip.). O tempo de latência foi observado 1h após o tratamento. Os dados representam a média e E.P.M (*P<0,05 vs controle; **P<0,01 vs. vincristina; *P<0,01 vs. Vincristina. ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls; n=7).

5.3 Efeito das frações de *Vitex polygama* na dor neuropática

Uma das formas de se inferir como um extrato vegetal exerce seus efeitos é realizando o fracionamento do mesmo a fim de entender quais possíveis substâncias bioativas estariam exercendo os efeitos observados pelo extrato bruto. Conforme descrito na literatura a *Vitex polygama* apresenta em sua composição diversos metabólitos secundários como monoterpenos, sesquiterpenos, flavonas, flavonoides, ácidos fenólicos, fitoesteróides e outras (GALLO et al., 2006 a,b; JESUS et al., 2020).

Após o fracionamento, conforme descrito nos métodos, foram obtidas quatro frações: Hexânica (HEX), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (Act) e Butanólica (BOH). Essas frações foram utilizadas para realizar o tratamento dos animais com DN induzida por vincristina, utilizando as doses similares ao extrato bruto (5, 10 e 30mg/kg) e avaliados nos tempos de 1, 3 e 5h após o tratamento com as frações.

A primeira fração avaliada foi a hexânica (Figura 10). Essa fração foi capaz de apresentar efeito antinociceptivo apenas na maior dose testada (30mg/kg) e somente no tempo de 1h, onde foi observado o aumento do tempo de latência de retirada da pata no grupo de animais tratados com a fração ($8,6 \pm 1,2s$) em relação ao grupo de animais com dor não tratados ($3,6 \pm 0,5s$) ($P<0,05$). Já a fração diclorometano (Figura 11) agiu de forma similar à hexânica e teve efeito significativo somente na maior dose utilizada e apenas 1h após o tratamento ($9,0 \pm 0,8s$) quando comparado ao grupo de animais com DN não tratados ($5,1 \pm 0,2s$) ($P<0,05$).

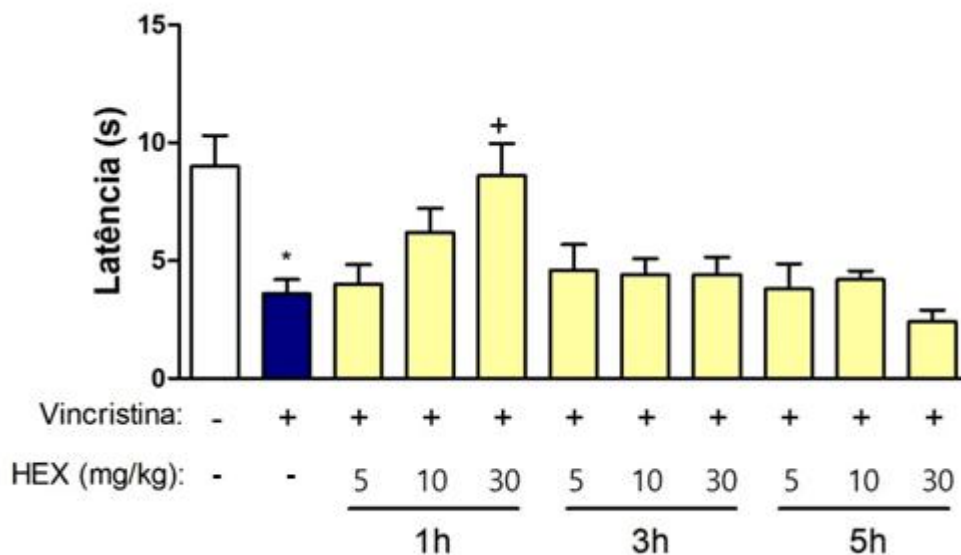


Figura 10: Efeito da Fração Hexânica do EVP na dor neuropática induzida por vincristina. Os dados apresentam o tempo de latência para levantamento da pata direita no teste da placa quente. Animais controle negativo (barra branca) foram apenas tratados com salina (NaCl, 0,9%). A barra azul representa o grupo com dor induzida por vincristina. As demais barras representam os animais com dor tratados com fração Hexânica (HEX) em doses de 5 a 30 mg/kg (ip,) e o tempo de latência observado 1, 3, 5 h após o tratamento. Os dados representam a média e E.P.M (*P<0,05 vs controle; +P<0,05 vs. vincristina; ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls; n=7).

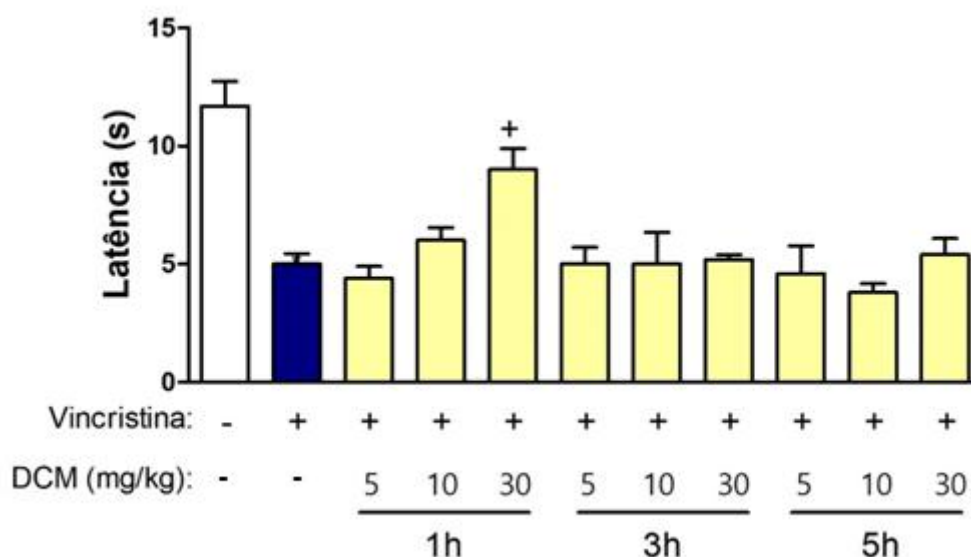


Figura 11: Efeito da Fração Diclorometano do EVP na dor neuropática induzida por vincristina. O dados apresentam o tempo de latência para levantamento da pata direita no teste da placa quente. Animais controle negativo (barra branca) foram apenas tratados com salina (NaCl, 0,9%). A barra azul representa o grupo com dor induzida por vincristina. As demais barras representam os animais com dor tratados com fração Diclorometano (DCM) em doses de 5 a 30 mg/kg (ip,) e o tempo de

latência observado 1, 3, 5 h após o tratamento. Os dados representam a média e E.P.M (* $P < 0,05$ vs controle; $^+P < 0,05$ vs. vincristina; ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls; $n=7$).

Essas duas primeiras frações são compostas majoritariamente de substâncias apolares que aparentemente não exercem efeitos nas menores doses ou em tempos de avaliação superiores a 1h. Além dessas substâncias foram identificados flavonoides como a vitexina, orientina, isoorientina e fitoesteróis na fração diclorometano a partir do extrato utilizado (JESUS et al., 2020). A atividade nociceptiva na dose de maior dose (30mg/kg) pode ser explicada pela presença de moléculas apolares como terpenos, monoterpenos, sesquiterpenos (LEITÃO et al., 1999; BARBOSA et al., 1995). Esses compostos têm como características o baixo peso molecular e alta lipossolubilidade, facilitando a penetração da barreira hematoencefálica e atuando no sistema nervoso central. Estudos indicam que esses compostos podem atuar no SNC modulando os sistemas serotoninérgicos, glutamatérgicos, opioides e canabinoides, sistemas esses que podem contribuir na modulação da dor neuropática (QUINTANS et al., 2013).

O limoneno pertence à família dos terpenos e foi isolado a partir das folhas de *Vitex polygama* (LEITÃO et al., 1999). Já foi descrito na literatura atividades antinociceptiva e na redução do comportamento depressivo em modelo animal, porém o mecanismo ainda não foi bem elucidado. Em contrapartida o limoneno parece não apresentar efeito significativo na inibição da hiperalgisia à frio, o que indica que não atuar na via dos receptores de potencial transitório. Outro achado importante foi a capacidade do limoneno de inibir a produção de citocinas e a hiperalgisia mecânica induzida por IL-1 β e TNF- α através de mecanismos anti-inflamatórios (PICCINELLI et al., 2014 a.; 2017 b.).

Terpenos como α -pineno e limoneno já foram indicados como possíveis atuantes do efeito antinociceptivo do óleo essencial de *Vitex agnus-cactus*. Efeitos desse óleo foram promissores em testes de dor em animais e o mecanismo sugerido foi do sistema opioide endógeno com atuação dos receptores muscarínicos do sistema adrenérgico. (KHALILZADEH et al., 2015)

Outra molécula presente nessas frações é o terpinen-4-ol. Por ser um monoterpene que atua na modulação dos canais de potássio dependente de voltagem, pode ser uma possível molécula a possuir efeito analgésico. Esses canais estão diretamente relacionados à DN e inflamatória devido ao papel na modulação das fibras condutoras de dor C e A δ (SANTOS et al., 2015; JOSHI et al., 2008).

Com relação as duas demais frações, butanólica e acetato de etila, foram as que tiveram melhor efeito em promover analgesia nos animais com DN como aferido no teste da placa quente. As Figuras 12 e 13 mostram os efeitos das frações butanólica e acetato de etila, respectivamente. A atividade antinociceptiva na fração butanólica foi observada em 1 e 3 horas após o tratamento, mas apenas nas duas maiores doses. Os tempos de latência no intervalo de 3h foram de $7,2 \pm 0,7s$ e $7,2 \pm 0,8s$ para a dose de 10 e 30mg/kg, respectivamente, já o grupo DN não tratado o valor de latência foi de $4,6 \pm 0,5s$ ($P < 0,05$). Na menor dose de 5mg/kg no tempo de 1h, apesar de haver um aumento do tempo de latência ($6,4 \pm 1,2s$) essa não foi significativamente diferente do grupo DN não tratado.

Já a fração acetato de etila teve efeito antinociceptivo, essa fração apresentou atividade antinociceptiva em todas as doses no tempo de 1h porém no intervalo de 3h só se constatou o efeito nas doses de 10mg/kg e 30mg/kg com tempo de latência de $7,8s \pm 0,4s$ e $8,2s \pm 0,9s$, respectivamente. Após 5h do tratamento, similar ao observado as outras frações não foi observado efeito sobre a nocicepção.

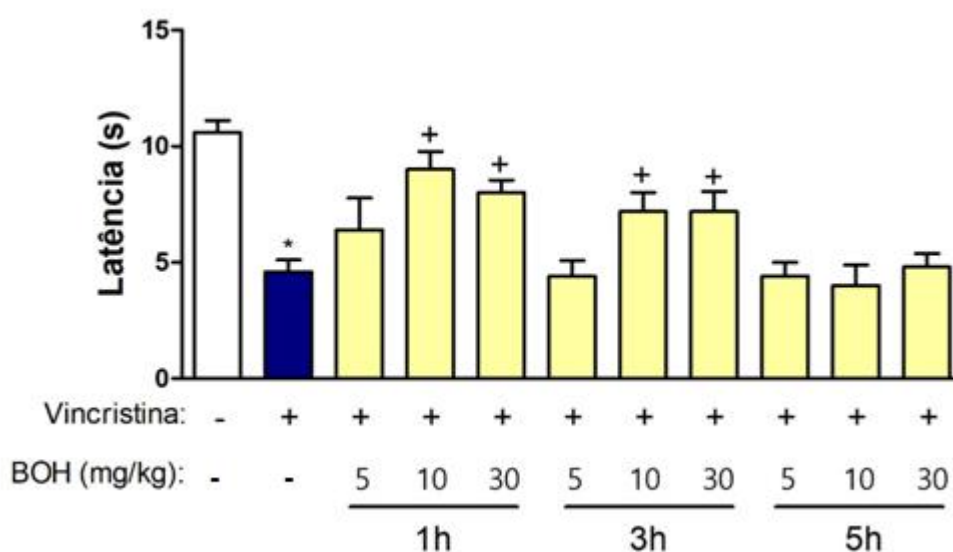


Figura 12: Efeito da Fração Butanólica do EVP na dor neuropática induzida por vincristina. Os dados apresentam o tempo de latência para levantamento da pata direita no teste da placa quente. Animais controle negativo (barra branca) foram apenas tratados com salina (NaCl, 0,9%). A barra azul

representa o grupo com dor induzida por vincristina. As demais barras representam os animais com dor tratados com fração Butanólica (BOH) em doses de 5 a 30 mg/kg (ip,) e o tempo de latência observado 1, 3, 5 h após o tratamento. Os dados representam a média e E.P.M (*P<0,05 vs controle; +P<0,05 vs. vincristina; ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls; n=7).

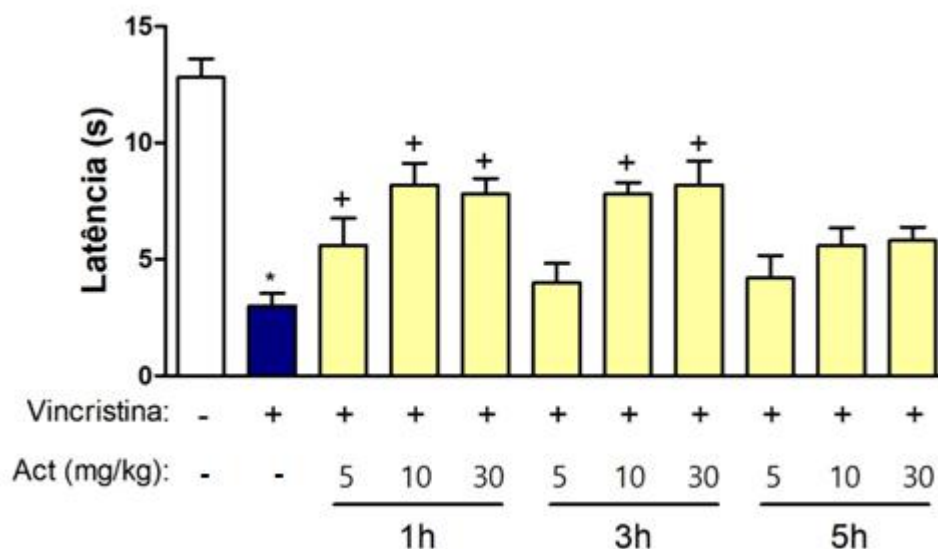


Figura 13: Efeito da Fração Acetato de Etila do EVP na dor neuropática induzida por vincristina. O dados apresentam o tempo de latência para levantamento da pata direita no teste da placa quente. Animais controle negativo (barra branca) foram apenas tratados com salina (NaCl, 0,9%). A barra azul representa o grupo com dor induzida por vincristina. As demais barras representam os animais com dor tratados com fração Acetato de Etila (Act) em doses de 5 a 30 mg/kg (ip,) e o tempo de latência observado 1, 3, 5 h após o tratamento. Os dados representam a média e E.P.M (*P<0,05 vs controle; +P<0,05 vs. vincristina; ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls; n=7).

Dentre os diversos compostos presentes em *Vitex polygama* algumas flavonas já foram identificadas nas frações mais polares como a butanólica e a acetato de etila com destaque para flavonas C-glicosiladas orientina, isoorientina e vitexina (GALLO et al., 2008; MELLO, 2017). Um estudo recente onde a DN foi induzida pela ligadura do nervo espinhal em ratos mostrou que a orientina aliviou a dor nos animais por um mecanismo dependente dos receptores tipo Toll 4 mediados pela via de sinalização TLR4/NF- κ B, assim como exercer atividades anti-inflamatórias pela inibição da produção de citocinas por essa flavona (GUO et al., 2018).

Estudos com vitexina também mostraram atividade antinociceptiva pela inativação de NF- κ B e na diminuição de citocinas pró-inflamatórias no modelo de

constrição crônica do nervo ciático (XU et al., 2020). Esse efeito da vitexina também foi evidenciada a partir do extrato aquoso das folhas de *Luehea divaricata* Mart., a qual foi comparável com a atividade da gabapentina, que parece atuar nas vias de canais de Ca^{2+} e na sinalização de interleucina-10, porém o mecanismo de ação do extrato ainda é desconhecido (KROTH et al., 2020). Além disso, dados mostram que vitexina possui efeito neuroprotetor e anti-inflamatório mediado por receptores vanilóides TRVP1 o que podem contribuir para os efeitos analgésicos da *Vitex polygama* (BORGHI et al., 2013; CHEN et al., 2016). Vale citar, que nenhum trabalho até o momento avaliou os efeitos dessas flavonas em modelo de DN induzida por quimioterapia (BORGHI et al., 2013). Além disso, o possível uso associado com outros fármacos analgésicos pode ser de relevância clínica. Zhu e colaboradores (2016) identificaram um efeito aditivo na associação de vitexina e paracetamol em modelo de dor pós-operatória, num efeito sensível a naloxona e bicuculina, sugerindo as vias de receptores opióides e de GABA para esse efeito.

Múltiplos mecanismos estão envolvidos na DN. São encontrados alto níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) na medula espinal de animais em modelos de DN (KIM et al., 2004). Zhang (2019) mostrou o efeito antioxidante da isoorientina e antinociceptivo a partir do modelo de DN induzida por constrição de nervo crônica. Aparentemente esse flavonoide teve capacidade antioxidante via superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e malondialdeído (MAD), além de outros efeitos anti-inflamatórios que parecem contribuir com a atenuação da DN.

Os fitoesteróis também são classes importantes para possível efeito na DN. Dados de recentes mostraram que o fitoesteróide witametelina, oriundo da *Datura innoxia*, foi capaz de inibir a DN induzida por vincristina em camundongos (KHAN et al., 2021). Esse efeito parece ser mediado pela supressão dos receptores TRPV1/TRPM8/P2Y e da sinalização dependente de proteíno-quinase ativada por mitógeno (MAPK). Para a *Vitex polygama* alguns fitoesteróides foram identificados como 20-Hidroxiecdisona, ajugasterona C, ajugasterone C monoacetona e turquesterona (DOS SANTOS et al., 2001). Entretanto não identificamos na literatura efeitos desses fitoesteróides em modelos de dor.

Com base em nossos e a revisão de literatura, acreditamos que os efeitos do extrato de presente na *Vitex polygama* em promover efeito analgésico, no modelo de DN induzida por vincristina, deve ser associado principalmente ao componente flavonoide e que esses podem estar atuando por mecanismos diversos na

promoção desse efeito. Estudos com as moléculas isoladas da *Vitex* será uma etapa essencial para melhor caracterizar seus efeitos e de extrema importância para o desenvolvimento de novas terapias para a DN.

6 CONCLUSÕES

Concluimos que o extrato *Vitex polygama* foi capaz de promover um efeito antinociceptivo em modelo de dor neuropática induzida por quimioterápico. Esse efeito foi similar ao da morfina. Destacamos ainda que as frações acetato de etila e butanólica do extrato apresentaram as melhores atividades em inibir essa dor neuropática, apontando para a presença de flavonoides como principais mediadores desses efeitos. Dessa forma, a *Vitex polygama* pode ser fonte de substâncias com atividade analgésica para tratamento de dor neuropática. Esses achados nos trazem como perspectivas futuras estudar o efeito de moléculas isoladas da planta, assim como melhor compreender os mecanismos farmacológicos envolvidos nos efeitos analgésicos do extrato da planta.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, A.N.A; NOURI, M.H.K TAVAKKOLI, F. Effect of *Salvia officinalis* hydroalcoholic Extract on Vincristine-induced Neuropathy in Mice. **Chinese Journal of Natural Medicines**, 9(5): 0354–0358, 2011.

AFONSO A.S.; CARNAVAL, T.; VIDELA, S.C. Combination Therapy for Neuropathic Pain: A Review of Recent Evidence. **J Clin Med**, 11;10(16):3533, 2021.

ALAM, M.I.; GOMES, A. Snake venom neutralization by Indian medicinal plants (*Vitex negundo* and *Embllica officinalis*) root extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, 86(1): 75-80, 2003.

ALLEGRI M.; CLARK M.R.; DE ANDRÉS J.; JENSEN T.S. Acute and chronic pain: where we are and where we have to go. **Minerva Anestesiol**, Feb;78(2):222-35, 2012.

ANGHELESCU, D. L.; TESNEY, J. M.; JEHA, S.; WRIGHT, B. B.; TRUJILLO, L.; SANDLUND, J. T.; PUI, C. Prospective randomized trial of interventions for vincristine-related neuropathic pain. **Pediatric Blood & Cancer**, vol.67, n.9, 2020.

APKARIAN, A. V.; BUSHNELL, M. C.; TREEDE, R-D.; ZUBIETA, J-K. Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. **European Journal of Pain**, v. 9, n. 4, p. 463–463, 2005.

BADKE, M. R. Conhecimento popular sobre o uso de plantas medicinais e o cuidado de enfermagem. **Dissertação (Cuidado Educação e Trabalho em Enfermagem e Saúde)**, Universidade Federal de Santa Maria, RS. 96 f, 2008.

BALIKI,, M.N; GEHA, P.Y.; APKARIAN, A.V.; CHIALVO, D.R. Beyond feeling: chronic pain hurts the brain, disrupting the default-mode network dynamics. **J. Neurosci**, 28(6), 1398–1403, 2008.

BARBOSA, L.C.A.; DEMUNER, A.J.; HOWARTH, O. W.; PEREIRA, N. S.; VELOSO, D.P. Chemical study of the leaves of *Vitex polygama*. **Fitoterapia**, [s. l.], v. 66, n. 3, p. 279–280, 1995.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversity: potential source for drug discovery. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**, 139(2), 267–284, 2009.

BORGHI, S.M.; CARVALHO, T.T.; STAURENGO-FERRARI, L.; HOHMANN, M.S.; PINGE-FILHO, P.; CASAGRANDE, R.; VERRI, W.A. JR. Vitexin inhibits inflammatory pain in mice by targeting TRPV1, oxidative stress, and cytokines. **J Nat Prod**, Jun 28;76(6):1141-9, 2013.

BOUHASSIRA, D.; LANTERI-MINET, M.; ATTAL, N.; LAURENT, B.; TOUBOUL, C. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. **Pain** 136, 380–387, 2008.

BOYCE-RUSTAY, J.; JARVIS, M. Neuropathic Pain: Models and Mechanisms. **Current Pharmaceutical Design**, 15(15), 1711–1716, 2009.

BRATTSTRÖM, A. Dopaminergic activity of Vitex diterpenoids. USA: Patent No. US 8,637,099 B2, 2014.

CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Cienc. Cult.** vol.55 no.3, 2003.

CAROZZI, V.A.; CANTA, A.; CHIORAZZI, A. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: What do we know about mechanisms? **Neuroscience Letters**, 596, 90–107, 2015.

CARVALHO, R.C.; MAGLIONI, C.B.; MACHADO, G.B.; ARAUJO, J.E.; SILVA, J.R.T.; SILVA, M.L. Prevalence and characteristics of chronic pain in Brazil: a national internet-based survey study. **BrJP**. V. 1, n. 4. 2018.

CASANOVA, L. M.; COSTA, S. S. Interações Sinérgicas em Produtos Naturais: Potencial Terapêutico e Desafios. **Ver. Virtual Quim.**, 9 (2), 575-595, 2017.

CASTEL-BRANCO, M. M.; SANTOS, A. T.; CARVALHO, R. M.; CARAMONA, M. M.; SANTIAGO, L. M.; FERNANDEZ-LLIMOS, F.; FIGUEIREDO, I. V. As bases farmacológicas dos cuidados farmacêuticos: o caso dos AINÉs. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, vol. 2, n. 2, pp. 79-87, 2013.

CHAHN, LA. Opioids – mechanisms of action. **Aust Prescr**, 19:63-5, 1996.

CHAMORRO, P.F.; REDONDO, A.; RIEGO, G.; LEÁNEZ, S.; POL, O. Sulforaphane Inhibited the Nociceptive Responses, Anxiety- and Depressive-Like Behaviors Associated With Neuropathic Pain and Improved the Anti-allodynic Effects of Morphine in Mice. **Frontiers in Pharmacology**, 9, 2018.

CHANDRAMU, C.; MANOHAR, R.D.; KRUPADANAM, D.G.L.; DASHAVANTHA, R.V. Isolation characterization and biological activity of betulinic acid and ursolic acid from *Vitex negundo* L. **Phytother Res**, 17(2): 129-134, 2003.

CHEN, L.; ZHANG, B.; SHAN, S.; ZHAO, X. Neuroprotective effects of vitexin against isoflurane-induced neurotoxicity by targeting the TRPV1 and NR2B signaling pathways. **Molecular Medicine Reports**, 14(6), 5607–5613, 2016.

COLLOCA, L.; LUDMAN, T.; BOUHASSIRA, D.; BARON, R.; DICKENSON, A. H.; YARNITSKY, D.; RAJA, S. N. Neuropathic pain. **Nature Reviews Disease Primers**, 3, 17002. 2017.

D'ANIELLO, A.; LUONGO, L.; ROMANO, R.; IANNOTTA, M.; MARABESE, I.; BOCCELLA, S.; BELARDO, C.; DE NOVELLIS, V.; ARRA, C.; BARBIERI, A. D-Aspartic acid ameliorates painful and neuropsychiatric changes and reduces β -amyloid A β (1-42) peptide in a long lasting model of neuropathic pain. **Neurosci. Lett**, 651, 151–158, 2017.

DUARTE, D.F. Uma Breve História do Ópio e dos Opióides. **Rev Bras Anesthesiol**, 55: 1: 135 – 146, 2005.

DUBIN, A. E.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **Journal of Clinical Investigation**, 120(11), 3760–3772. 2010.

DUTRA, M.G. Plantas Medicinais, Fitoterápicos e Saúde Pública: um diagnóstico situacional em Anápolis, Goiás. 112p. **Dissertação (Mestrado – Área de Concentração em Sociedade, tecnologia e meio ambiente)** - Centro universitário de Anápolis, UniEVANGÉLICA, Anápolis, 2009.

DWORKIN, R.-H. et al. A Possible Cause for Diffuse Upper Abdominal Pain (2007: 2a)”. **European Radiology**, vol. 17, no 2, p. 571–72, 2007.

FEIN, A. Nociceptors and the perception of pain. Disponível em: <https://health.uconn.edu/cell-biology/wp-content/uploads/sites/115/2017/10/Revised-Book-2014.pdf> Acessado em: 09 de Dezembro de 2021.

FERREIRA, E.T.; SANTOS, E.S.; MONTEIRO, J.S.; GOMES, M.S.M., MENEZES, R.A.O.; SOUZA, M.J.S. A utilização de plantas medicinais e fitoterápicos: uma revisão integrativa sobre a atuação do enfermeiro. **Brazilian Journal of health ReviewBraz. J.Hea. Rev.**, v. 2, n. 3, p. 1511-1523, 2019.

FINNERUP, N. B.; OTTO, M.; MCQUAY, H. J.; JENSEN, T. S.; SINDRUP, S. H. Algorithm for neuropathic pain treatment: An evidence-based proposal. **Pain**, 118(3), 289–305, 2005.

FINNERUP, N. B.; HAROUTOUNIAN, S.; KAMERMAN, P.; BARON, R.; BENNETT, D.L.H.; BOUHASSIRA, D.; CRUCCU, G.; FREEMAN, R.; HANSSON, P.; NURMIKKO, T.; RAJA, S.N.; RICE, A.S.C; SERRA, J.; SMITH, B.H.; TREEDE, R.; JENSEN, T.S. Neuropathic pain: an updated grading system for research and clinical practice. **Pain** 157, 1599–1606, 2016.

FREYNHAGEN, R.; BARON, R.; TOLLE, T.; STEMMLER, E.; GOCKEL, U.; STEVENS, M.; MAIER, C. Screening of neuropathic pain components in patients with chronic back pain associated with nerve root compression: a prospective observational pilot study (MIPORT). **Curr. Med. Res. Opin.** 22, 529–537, 2006.

GALLO, M. B.C; ROCHA, W. C.; CUNHA, U. S.; DIOGO, F. A.; SILVA, F. C.; VIEIRA, P. C., PEREIRA, L.G.B. Bioactivity of extracts and isolated compounds from *Vitex polygama* (Verbenaceae) and *Siphoneugena densiflora* (Myrtaceae) against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest management science**, v. 62, n. 11, p. 1072-1081, 2006.a

GALLO, M. B. C.; BELTRAME, F.L.; VIEIRA, P.C.; CASS, Q.B.; FERNANDES, J.B.; SILVA, M.F.G.F. Quantitative determination of 20-hydroxyecdysone in methanolic extract of twigs from *Vitex polygama* Cham. **Journal of Chromatography B**, v. 832, n. 1, p. 36-40, 2006.b

GAO, F.; ZHENG, Z.M. Animal models of diabetic neuropathic pain. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**. Feb;122(2):100-6, 2014.

GEISLER, S.; DOAN, R.A.; STRICKLAND, A.; HUANG, X.; MILBRANDT, J.; DIANTONIO, A. Prevention of vincristine-induced peripheral neuropathy by genetic deletion of SARM1 in mice. **Brain**. 139, 3092–3108, 2016.

GILRON, I.; BARON, R.; JENSEN, T. Neuropathic pain: principles of diagnosis and treatment. **Mayo Clin Proc**, Apr;90(4):532-45, 2015.

GOLD, M.S.; GEBHART, G.F. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. **Nat Med**, 16(11):1248-57, 2010.

GOLDBERG, D.S.; MCGEE, S.J. Pain as a global public health priority. **BMC Public Health**. 11:770, 2011.

GOMES, J. C. P.; TEIXEIRA, M.J. Dor no idoso. **RBM Rev. Bras. Med**, v. 63, n. 11, p. 45-54, 2007.

GONG, S.S.; LI, Y.X.; ZHANG, M.T.; DU, J.; MA, P.S.; YAO, W.X.; YU, J.Q. Neuroprotective Effect of Matrine in Mouse Model of Vincristine-Induced Neuropathic Pain. **Neurochemical Research**, 41(11), 3147–3159, 2016.

GREGORY, N. S.; HARRIS, A. L.; ROBINSON, C. R.; DOUGHERTY, P. M.; FUCHS, P. N.; SLUKA, K. A. An overview of animal models of pain: disease models and outcome measures. **The Journal of Pain**, v. 14, n. 11, p. 1255-1269, 2013.

GROSSER, T., SMYTH, E.; FITZGERALD, G. A. Anti-inflammatory, antipyretic and analgesic agents; gout pharmacotherapy, In: **GOODMAN & GILMAN'S: The Pharmacological Basis of Therapeutics**. McGraw-Hill (Eds.), Chapter 18, 12th ed., 2012.

GUIDA, F.; GREGORIO, D.; PALAZZO, E.; RICCIARDI, F.; BOCCELLA, S.; BELARDO, C.; MAIONE, S. Behavioral, Biochemical and Electrophysiological Changes in Spared Nerve Injury Model of Neuropathic Pain. **International Journal of Molecular Sciences**, 21(9), 3396, 2020.

GUO, D.; HU, X.; ZHANG, H.; LU, C.; CUI, G.; LUO, X. Orientin and neuropathic pain in rats with spinal nerve ligation. **International Immunopharmacology**, 58, 72–79, 2018.

HAMA, A.; TAKAMATSU, H. Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathic Pain and Rodent Models. **CNS Neurol Disord Drug Targets**. 15(1):7-19, 2016.

HAMANN, F. R.; ZAGO, A. M.; ROSSATO, M. F.; BECK, V. R.; MELLO, C. F.; BRUM, T. F.; RUBIN, M. A. Antinociceptive and antidepressant-like effects of the crude extract of *Vitex megapotamica* in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 192, 210–216, 2016.

HERNÁNDEZ, M. M.; HERASO, C.; VILLARREAL, M. L.; VARGAS-ARISPURO, I.; ARANDA, E. Biological activities of crude plant extracts from *Vitex trifolia* L. (Verbenaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, 67(1), 37–44, 1999.

HIGUERA E.S.; LUO Z.D. A Rat Pain Model of Vincristine-Induced Neuropathy. In: **Luo Z.D. (eds) Pain Research**. Methods in Molecular Medicine, vol 99. Humana Press, 2014.

IASP. International Association for the Study of Pain. IASP Taxonomy. Pain terms. Neuropathic pain. Atualizada 14 de dezembro de 2017. Disponível em: www.iasp-pain.org/Taxonomy#Neuropathicpain.

ISHAK, W. W.; WEN, R. Y.; NAGHDECHI, L.; VANLE, B.; DANG, J.; KNOSP, M.; LOUY, C. **Pain and Depression**. Harvard Review of Psychiatry, 26(6), 352–363, 2018.

JENSEN, T. S.; BARON, R.; HAANPÄÄ, M.; KALSO, E.; LOESER, J. D.; RICE, A. S. C.; TREEDE, R.-D. A new definition of neuropathic pain. **Pain**, 152(10), 2204–2205, 2011.

JESUS, C. C. M; ARAÚJO, M. H; SIMÃO, T. L. B. V.; LASUNSKAIA, E. B.; BARTH, T.; MUZITANO, M. F.; PINTO, S. C. Natural products from *Vitex polygama* and their antimycobacterial and anti-inflammatory activity. **Natural Product Research**, 1–5, 2020.

JOSHI, S.; CHANOTIYA, C. S.; AGARWAL, G.; PRAKASH, O.; PANT, A. K.; MATHELA, C. S. Terpenoid Compositions, and Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Rhizome Essential Oils of Different *Hedychium* Species. **Chemistry & Biodiversity**, 5(2), 299–309, 2008.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, 413(6852), 203–210, 2001.

KANDEL, E.R. **Princípios de Neurociências**, Ed. MC HILL 5a. Edição, 2014.

KANJHAN R. Opioids and pain. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, 22(6-7):397-403, 1995.

KHALILZADEH, E.; SAIAH, G.V.; HASANNEJAD, H., GHADERI, A.; HAMIDIAN, G.; MAHMOUDI, R.; ESHGI D.; Zangisheh, M. Antinociceptive effects, acute toxicity and chemical composition of *Vitex agnus-castus* essential oil. **Avicenna J Phytomed**, 5(3): 218–230, 2015.7

KHAN, A; SHAL, B.; KHAN, A.U.; ULLAH, R.; BAIG, M.W. UL, HAQ, I.; SEO E.K.; KHAN, S. Suppression of TRPV1/TRPM8/P2Y Nociceptors by Withametelin via Downregulating MAPK Signaling in Mouse Model of Vincristine-Induced Neuropathic Pain. **Int J Mol Sci**. 4;22(11):6084, 2021.

KHAN, M.I.; WALSH, D.; BRITO-DELLAN, N. Opioid and adjuvant analgesics: compared and contrasted. **Am J Hosp Palliat Care**, 28(5):378-83, 2011.

KIM, H.K.; PARK, S.K.; ZHOU, J.L.; TAGLIALATELA, G.; CHUNG, J.M. Reactive oxygen species (ROS) are involved in enhancement of NMDA-receptor phosphorylation in animal models of pain, **Pain** 111 (1–2) 116–124, 2004.

KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. PATOFISIOLOGIA DA DOR. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n.1, p.1-12, 2008.

KRAYCHETE, D. C.; GOZZANI, J. L.; KRAYCHETE, A. C. Dor neuropática: aspectos neuroquímicos. **Rev. Bras. Anesthesiol.** Campinas, v. 58, n. 5, p. 492-505, 2008.

KROTH, A.; SANTOS, M.C.Q., SILVA, T.C.B.; SILVEIRA, E.M.S.; TRAPP, M., BEZZERRA, R.M.N.; SIMABUCO, F.; NIERO, R.; PARTATA, W.A. Aqueous extract from *Luehea divaricata* Mart. leaves reduces nociception in rats with neuropathic pain. **Journal of Ethnopharmacology**, 112761, 2020.

KULKARNI, R.R.; VIRKAR, A.D.; D'MELLO, P. Antioxidant and Antiinflammatory Activity of *Vitex negundo*. **Indian J Pharm Sci**, 70(6):838-840, 2008.

KUNER, R. Central mechanisms of pathological pain. **Nature Medicine**, 16(11), 1258–1266, 2010.

LAU, B.K.; VAUGHAN, C.W. Descending modulation of pain: the GABA disinhibition hypothesis of analgesia. **Curr Opin Neurobiol**, 2014.

LEÃO, M. Avaliação dos fitoterápicos padronizados no Sistema Único de Saúde brasileiro. Dissertação (Mestrado-Profissional em farmácia), Universidade Anhanguera de São Paulo, São Paulo, 2015.

LEITÃO, S. G.; FONSECA, E. N.; DOS SANTOS, T. C. Essential oils from two brazilian vitex. **Acta Horticulturae**, no 500, p. 89–92, 1999.

LEWIS, K. S.; WHIPPLE, J. K.; MICHAEL, K. A.; QUEBBEMAN, E. J. Effect of analgesic treatment on the physiological consequences of acute pain. **American Journal of Health-System Pharmacy**, 51(12), 1539–1554, 1994.

LOPES, Ricardo Oliveira Monteiro. Aspirina: aspectos culturais, históricos e científicos. 2011. [47] f., il. **Monografia (Licenciatura em Química)—Universidade de Brasília**, Brasília, 2011.

LUO, Z. D.; CHAPLAN, S. R.; HIGUERA, E. S.; SORKIN, L. S.; STAUDERMAN, K. A.; WILLIAMS, M. E.; YAKSH, T. L. Upregulation of dorsal root ganglion $\alpha 2\delta$ calcium channel subunit and its correlation with allodynia in spinal nerve-injured rats. **J. Neurosci.** 21, 1868–1875, 2001.

MALMBERG, A. B.; BANNON, A. W. Models of Nociception: Hot-Plate, Tail-Flick, and Formalin Tests in Rodents. **Current Protocols in Neuroscience**, 2001.

MEENA, A.K.; NIRANJAN U.S.; RAO, M.M.; PADHI, M.M.; BABU, R. A review of the important chemical constituents and medicinal uses of Vitex genus / **Asian Journal of Traditional Medicines**, 6 (2), 2011.

MELLO, Renata de Jesus. Atividades analgésicas e anti-inflamatórias do extrato hidroalcolico e frações de folhas da espécie Vitex polygama. 2017. Tese (mestrado em ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro Campus Macaé, Macaé, 2017.

NASCIMENTO, T.S.; VERAS, K.M.; CRUZ, J.S.; LEAL-CARDOSO, J.H. Inhibitory Effect of Terpinen-4-ol on Voltage-Dependent Potassium Currents in Rat Small Sensory Neurons. **Journal of Natural Products**, 78(2), 173–180, 2015.

NORMAN, G.J.; KARELINA, K.; ZHANG, N.; WALTON, J.C.; MORRIS, J.S.; DEVRIES, A.C. Stress and IL-1beta contribute to the development of depressive-like behavior following peripheral nerve injury. **Mol. Psychiatry**, 15, 404–414, 2010.

OLIVEIRA, A. B.; LONGHI, J.G.; ANDRADE, C.A.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D.A. Normatização dos Fitoterápicos no Brasil. **Visão Acadêmica**, Paraná, v.7, n.2, 2006.

OLIVEIRA, A.S.B.; GABBAI, A.A. Abordagem terapêutica da dor neuropática na clínica neurológica. **Neurociências**, p. 86, 1998.

OOI, S.L.; WATTS, S.; MCCLEAN, R.; PAK, S.C. Vitex Agnus-Castus for the Treatment of Cyclic Mastalgia: A Systematic Review and Meta-Analysis. **J Womens Health (Larchmt)**, 29(2):262-278, 2020.

PEREIRA, M.C.A; CORDEIRO, S.Z; ARAUJO, D.S.D. Estrutura do estrato herbáceo na formação aberta de Clusia do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, RJ, Brasil. **Acta bot. bras.** 18(3): 677-687. 2004.

PAICE, J.A.; FERRELL, B. The management of cancer pain. **CA Cancer J Clin**, 61(3):157-82, 2011.

PICCINELLI, A. C.; MORATO, P. N.; BARBOSA, M.S.; CRODA, J.; SAMPSON, J.; KONG, X.; KASSUYA, C. A. L. Limonene reduces hyperalgesia induced by gp120 and cytokines by modulation of IL-1 β and protein expression in spinal cord of mice. **Life Sciences**, 174, 28–34, 2017.

PICCINELLI, A. C.; SANTOS, J. A.; KONKIEWITZ, E. C.; OESTERREICH, S. A.; FORMAGIO, A. S. N.; CRODA, J.; KASSUYA, C. A. L. Antihyperalgesic and antidepressive actions of (R)-(+)-limonene, α -phellandrene, and essential oil

from *Schinus terebinthifolius* fruits in a neuropathic pain model. **Nutritional Neuroscience**, 18(5), 217–224, 2014.

PISERA, D. Fisiologia da dor. In: *Dor Avaliação e Tratamento em Pequenos Animais*. São Paulo: Interbook, 2005. p. 30-74.

PROMMER, E.E. Pharmacological Management of Cancer-Related Pain. **Cancer Control**, 22(4):412-25, 2015.

POSSO, I.P.; PALMEIRA, C.C.; VIEIRA E.B. Epidemiology of neuropathic pain. **Rev Dor**, 17(Suppl 1):S11-4, 2016.

QUINTANS, J. S. S.; ANTONIOLLI, A. R.; ALMEIDA, J. R. G. S.; FILHO, V. J.S.; JUNIOR, L.J.Q. Natural Products Evaluated in Neuropathic Pain Models - A Systematic Review. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 114(6), 442–450, 2013.

RANI, A.; SHARMA, A. The genus *Vitex*: A review. **Pharmacognosy Reviews**, 7(14), 188, 2013.

RIEDEL, W.; NEECK, G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. **Zeitschrift Fr Rheumatologie**, 60(6), 404–415, 2001.

ROCHA, A. P. C.; KRAYCHETE, D. C.; LEMONICA, L.; CARVALHO, L. R.; BARROS, G. A. M.; GARCIA, J. B.S.; SAKATA, R. K. Dor: aspectos atuais da sensibilização periférica e central. **Rev Bras Anestesiol**, v. 57, n. 1, p. 94-105, 2007.

ROSENBLUM, A.; MARSCH, L. A.; JOSEPH, H.; PORTENOY, R. K. Opioids and the treatment of chronic pain: Controversies, current status, and future directions. **Experimental and Clinical Psychopharmacology**, 16(5), 405–416, 2008.

SANDKÜHLER, J. Models and Mechanisms of Hyperalgesia and Allodynia. **Physiological Reviews**, 89(2), 707–758, 2009.

SANTOS, T.C.; MONACHE, F.D.; LEITÃO, S.G. Ecdysteroids from two Brazilian *Vitex* species. **Fitoterapia**. Mar;72(3):215-20, 2001.

SCHAIBLE, H.G.; RICHTER, F. Pathophysiology of pain. *Langenbeck's Archives of Surgery*, Berlin, v. 389, n. 4, p. 237-243, 2004.

SCHOMBERG, D.; AHMED, M.; MIRANPURI, G.; OLSON, J.; RESNICK, D.K. Neuropathic pain: role of inflammation, immune response, and ion channel activity in central injury mechanisms. **Ann Neurosci** 19:125–132, 2012.

SERETNY, M.; CURRIE, G.L.; SENA, E.S.; RAMNARINE, S.; GRANT, R.; MACLEOD, M.R.; COLVIN, L.A.; FALLON, M. Incidence, prevalence, and predictors of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A systematic review and meta-analysis. **Pain**, 155(12):2461-2470, 2014.

SMITH, M. S.; SCHAMBRA, U. B.; WILSON, K. H.; PAGE, S. O.; HULETTE, C.; LIGHT, A. R.; SCHWINN, D. A. α 2-adrenergic receptors in human spinal cord: specific localized expression of mRNA encoding α 2- adrenergic receptors subtypes at four distinct levels. **Molecular Brain Research**, v.34, p.109-117, 1995.

SOUSA, F.A.E.F.DOR: O QUINTO SINAL VITAL. **Rev Latino-am Enfermagem**, 10(3):446-7, 2002.

STEEDS, C.E. "The Anatomy and Physiology of Pain". **Surgery** (Oxford), vol. 31, no 2, p. 49–53, 2013.

ŚWIEBODA, P.; FILIP, R.; PRYSTUPA A.A; DROZD, M. Assessment of pain: types, mechanism and treatment. **Ann Agric Environ Med Spec no. 1:2-7**, 2013.

TANDON V R. Hepatoprotective activity of Vitex negundo leaf extract against anti-tubercular drugs induced hepatotoxicity. **Fitoterapia**, 79(7-8): 533-538, 2008.

TANNER, K.D.; LEVINE, J.D.; TOPP, K.S. Microtubule disorientation and axonal swelling in unmyelinated sensory axons during vincristine-induced painful neuropathy in rat. **J Comp Neurol**, 395(4):481-92, 1998 a.

TANNER, K.D.; REICHLING, D.B.; LEVINE, J.D. Nociceptor hyper-responsiveness during vincristine-induced painful peripheral neuropathy in the rat. **J Neurosci**, 18(16):6480-91, 1998 b.

TIWARI, N.; THAKUR, J.; SAIKIA, D.; GUPTA, M.M. Antitubercular diterpenoids from Vitex trifolia. **Phytomedicine**, 20(7), 605–610, 2013.

UEDA, Y.; UTA, D.; TANBO, S.; KAWABATA, A.; KANAYAMA, S.; OSAKI, M.; NOZAWA, N.; MATSUMOTO, T.; ANDOH, T. Inhibitory effect of amenamevir on acute herpetic pain and postherpetic neuralgia in mice infected with herpes simplex virus-1. **J Dermatol Sci**, 98(1):50-57, 2020.

VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature**, v. 231, n. 25, p. 232-235, 1971.

VARGAS, G.S. Is the WHO analgesic ladder still valid? Twenty-four years of experience. **Can Fam Physician**. 56:514-7, 2010.

VEIGA, V. F.J.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Quimica Nova**. V. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VIEIRA AS, BAPTISTA AF, MENDES L, et al. Impact of neuropathic pain at the population level. **J Clin Med Res**, 6(2):111–119, 2014.

VIEIRA E.B.M.; GARCIA J.B.; SILVA, A.A.; MUALEM, R.L.A.; JANSEN, R.C. Prevalence, characteristics, and factors associated with chronic pain with and without neuropathic characteristics in São Luís, Brazil. **J Pain Symptom Manage**. Aug; 44(2):239-251, 2012.

WANG, V.C.; MULLALLY, W.J. Pain Neurology. **Am J Med**, 133(3):273-280, 2020.

WANNMACHER L. Paracetamol versus Dipirona: como mensurar o risco?. **ISSN 1810-0791 Vol. 2**, 2005.

WEBSTER, D. E.; LU, J.; CHEN, S.N.; FARNSWORTH, N. R.; WANG, Z. J. Activation of the μ -opiate receptor by *Vitex agnus-castus* methanol extracts: Implication for its use in PMS. **Journal of Ethnopharmacology**, 106(2), 216–221, 2006.

WEST, N. A.; SEVERTSON, S. G.; GREEN, J. L.; DART, R. C. Trends in abuse and misuse of prescription opioids among older adults. **Drug and Alcohol Dependence**, 149, 117–121, 2015.

YALCIN, I.; CHOUCAIR-JAAFAR, N.; BENBOUZID, M.; TESSIER, L.H.; MULLER, A.; HEIN, L.; BARROT, M. β 2-Adrenoceptors are critical for antidepressant treatment of neuropathic pain. **Ann. Neurol**. 65, 218–225, 2009.

YAO, J.L.; FANG, S.-M.; LIU, R.; OPPONG, M.B.; LIU, E.-W.; FAN, G.-W.; ZHANG, H. A Review on the Terpenes from Genus *Vitex*. **Molecules**, 21, 1179, 2016.

ZILLIOX, L.A. Neuropathic Pain. **CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology**, 23(2), 512–532, 2017.

ZHANG, G.; LIU, N.; ZHU, C.; MA, L.; YANG, J.; DU, J.; YU, J. Antinociceptive effect of isorientin against neuropathic pain induced by the chronic constriction injury of the sciatic nerve in mice. **International Immunopharmacology**, 75, 105753, 2019.

ZHENG, C.J.; ZHANG, X.W.; HAN, T.; JIANG, Y.P.; TANG, J.Y.; BRÖMME, D.; QIN, L.P. Anti-inflammatory and anti-osteoporotic lignans from *Vitex negundo* seeds. **Fitoterapia**, 93:31-8, 2014.

ZHU, Q.; MAO, L.N.; LIU, C.P.; SUN, Y.H.; JIANG, B.; ZHANG, W.; LI, J.X. Antinociceptive effects of vitexin in a mouse model of postoperative pain. **Sci Rep.** Jan 14;6:19266, 2016.