

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**ANÁLISE DOS MECANISMOS DE AÇÃO ANTINOCICEPTIVA DE  
PRINCÍPIOS ATIVOS ISOLADOS DE PLANTAS.**

**Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Farmacologia.**

**Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto.**

**ADAIR ROBERTO SOARES DOS SANTOS  
Florianópolis  
2000**

**“ANÁLISE DOS MECANISMOS DE AÇÃO ANTINOCICEPTIVA DE  
PRINCÍPIOS ATIVOS ISOLADOS DE PLANTAS”**

**POR**

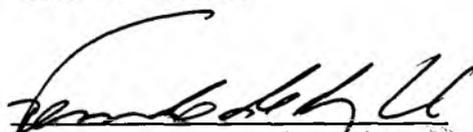
**ADAIR ROBERTO SOARES DOS SANTOS**

**Tese julgada e aprovada em sua forma  
final, pelo Orientador e membros da  
Banca Examinadora, composta pelos  
Professores Doutores:**

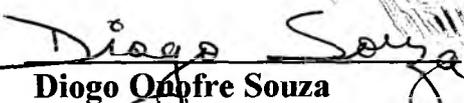
**Banca Examinadora:**

  
\_\_\_\_\_  
**João B. Calixto**

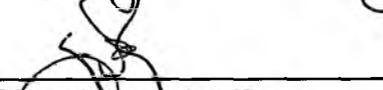
**FMC/UFSC-(Orientadora)**

  
\_\_\_\_\_  
**Fernando Queiroz Cunha**

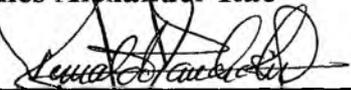
**FMRP/USP**

  
\_\_\_\_\_  
**Diogo Onofre Souza**

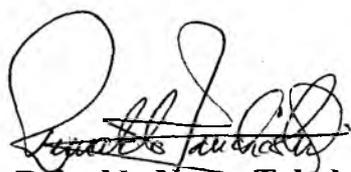
**UFRGS**

  
\_\_\_\_\_  
**Giles Alexander Rae**

**FMC/UFSC**

  
\_\_\_\_\_  
**Reinaldo Naoto Takahashi**

**FMC/UFSC**

  
**Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi**  
**Coordenador do Programa de**  
**Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC**

**Florianópolis, 04 de Agosto de 2000.**

SANTOS, Adair Roberto Soares. ANÁLISE DOS MECANISMOS DE AÇÃO ANTINOCICEPTIVA DE PRINCÍPIOS ATIVOS ISOLADOS DE PLANTAS. Florianópolis, 2000. 146p. Dissertação (Doutorado em Farmacologia) – Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto

Defesa: 04/08/2000

Estudo do efeito [antinociceptivo] da [geranina], [furosina], [quercetina], [rutina] e do [galato de etila] isolados das plantas do gênero [*Phyllanthus*] e do alcalóide [cloridrato de cis-8,10-Di-N-propillobelidiol dihidratado] (DPHD) isolado da [*Siphocampylus verticillatus*], administrados via [sistêmica (i.p. e oral)], [espinhal (i.t.)] e [supraespinhal (i.c.v.)] em vários modelos de [nocicepção] [química] e [térmica] em [camundongos]. A geranina, a furosina, a quercetina, a rutina, o galato de etila e o DPHD, administrados por via [i.p.] ou [oral], foram capazes de reduzir significativamente a nocicepção causada pelo [ácido acético] em camundongos. Além disso, esses compostos administrados por via sistêmica, espinhal e supraespinhal também foram efetivos em reduzir a nocicepção [neurogênica] (primeira fase) e [inflamatória] (segunda fase) induzida pela [formalina] e a dor neurogênica causada pela [capsaicina]. O galato de etila e o DPHD, ao contrário da morfina, foram inativos quando analisados na nocicepção térmica no modelo da [placa quente] em camundongos. O [mecanismo de ação] do DPHD envolve múltiplos sistemas, incluindo a interação com os receptores [opioides] do tipo  $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\delta$ , a via da [L-arginina-óxido nítrico] e o [sistema serotoninérgico], além da ativação da [proteína  $G_{i/o}$  sensível à toxina pertussis]. Por outro lado, o mecanismo de ação do galato de etila está relacionado com a ativação dos [canais de potássio] modulados por [ATP] e aqueles de [baixa] e [alta] condutância ativados por [cálcio], além de envolver a interação com a proteína  $G_{i/o}$ . Esses resultados mostram claramente o potencial dos produtos naturais, especialmente aqueles isolados de plantas medicinais e de seus derivados no descobrimento de novas drogas, com especial interesse no controle de processos dolorosos que ainda carecem de terapias mais adequadas.

[Plantas medicinais], [Tail-flick], [Rota-rod], [*In vitro*], [*In vivo*], [Íleo de cobaia], [Ducto deferente], [Binding], [Sinaptossomas], [Camundongos].

*À minha esposa Romalina e aos meus filhos Carolina e João Guilherme, pelo carinho, por entenderem a minha ausência, mas, sobretudo, pelo incentivo em todos os momentos difíceis dessa jornada.*

*Aos meus pais, João (**in memorium**) e Guilhermina, que forneceram toda a força e garra necessárias para concluir mais esta etapa.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter-me dado forças para não fraquejar diante das dificuldades que se contrapuseram a minha caminhada.

Ao professor Dr. João B. Calixto, meu especial agradecimento pela oportunidade de trabalharmos juntos, pelo constante apoio, prontidão e amizade, e acima de tudo pelo seu caráter profissional, requisitos esses que sempre marcaram sua orientação deste trabalho.

Ao professor Dr. Rosendo Augusto Yunes agradeço pela amizade e inestimável colaboração na concretização desse trabalho.

Aos Doutores Ana Lúcia S. Rodrigues, Jayme A. Bertelli, Valdir Cechinel Filho, Obdúlio G. Miguel, Sônia C. Hess, Rivaldo Niero, Marize M. T. L. Peres, pela amizade, incentivo e constante colaboração.

Aos professores do Curso de Pós-graduação em Farmacologia, que sempre estiveram ao meu lado eliminando dúvidas, transmitindo conhecimento e tornando a convivência a mais agradável possível.

Aos funcionários da Coordenadoria Especial de Farmacologia, pelo carinho e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química pela constante colaboração, especialmente aos amigos Angela Malheiros, Tânia R. Pinheiro, Christiane Meyre-Silva, Alessandro Guedes, Renata Krogh.

Aos colegas de iniciação científica, pela troca de informações e evolução conjunta, especialmente ao Rafael O.P. Campos, Ana Paula Trentin, Sara Pezzini, Gabriela Rosa, Karla S. Tratsk, Ricardo V. Alves.

À Rosana Ostrosky e Patrícia Vianna pela amizade, carinho e colaboração.

Aos colegas de turma e alunos de pós-graduação, pela colaboração, amizade e companheirismo.

À Universidade do Vale do Itajaí, especialmente ao Diretor do Centro de Ciências da Saúde, Prof. Telmo Mezzadri, e ao Coordenador do Curso de Farmácia, Prof. Rogério Corrêa, por nunca terem medido esforços em atender minhas solicitações.

A todos os professores do curso de Farmácia da Universidade do Vale do Itajaí, em especial a Márcia Maria de Souza e Alcibia Helena Maia (BIBA), pela colaboração, amizade e companheirismo.

A todos os alunos que trabalharam comigo com iniciação científica na Universidade do Vale do Itajaí, em especial ao Cristiano e Juliano que seguiram a carreira científica.

Minha gratidão a todos os meus familiares pelo constante incentivo.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

## ÍNDICE

LISTA DE ABREVIações.....	I
LISTA DE FIGURAS.....	ii
LISTA DE TABELAS.....	iv
RESUMO.....	V
ABSTRACT.....	X
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1- Importância dos produtos naturais.....	1
1.2- Plantas do gênero <i>Phyllanthus</i> .....	4
1.3- <i>Siphocampylus verticillatus</i> .....	12
1.4- Mecanismos envolvidos na transmissão da dor.....	14
1.5- Estratégias farmacológicas para o controle da dor.....	19
1.5.1- Drogas que bloqueiam a ação das citocinas.....	22
1.5.2- Drogas inibidoras da síntese de prostaglandinas.....	25
1.5.3- Drogas antagonistas dos receptores para as cininas.....	29
1.5.4- Drogas antagonistas dos receptores H <sub>1</sub> da histamina.....	30
1.5.5- Drogas moduladoras do óxido nítrico.....	31
1.5.6- Drogas antagonistas dos receptores glutamatérgicos.....	33
1.5.7- Drogas antagonistas das taquicininas.....	35
1.5.8- Drogas moduladoras de canais iônicos.....	36
2. OBJETIVOS.....	41
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
3.1- Animais.....	42
3.2- Classificação botânica das plantas estudadas.....	42
3.3- Análise Química.....	42
3.3.1- Isolamento, purificação e identificação química dos compostos.....	42
3.4- Análise Farmacológica.....	44
3.4.1- Atividade antinociceptiva.....	44
3.4.2- Teste das contorções abdominais induzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético em camundongos.....	44
3.4.3- Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos.....	45
3.4.4- Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos.....	45
3.4.5- Teste da placa quente.....	47
3.4.6- Efeito sobre a performance motora no modelo do "Rota-rod".....	48
3.5- Estudo do possível mecanismo de ação antinociceptiva do DPHD e do galato de etila.....	48
3.5.1- Participação do sistema opióide.....	49
3.5.2- Participação da proteína G <sub>i/o</sub> sensível à toxina pertussis.....	50
3.5.3- Participação dos canais de potássio.....	50
3.5.4- Participação da via L-arginina-óxido nítrico.....	51
3.5.5- Participação do sistema serotoninérgico.....	51
3.5.6- Desenvolvimento de tolerância cruzada entre a morfina e o DPHD.....	52
3.5.7- Participação do sistema dopaminérgico.....	52
3.5.8- Participação do sistema gabaérgico.....	53
3.6- Estudos "in vitro".....	53

3.6.1- Efeito do DPHD sobre a contração do íleo de cobaia induzida pela estimulação elétrica de campo.....	53
3.6.2- Efeito do DPHD sobre a contração do ducto deferente de camundongo induzida pela estimulação elétrica de campo.....	54
3.6.3- Efeito do DPHD sobre a união específica (binding) de [ <sup>3</sup> H]naloxona em membranas de córtex cerebral de camundongo.....	55
3.6.4- Efeito do DPHD sobre a união específica (binding) de [ <sup>3</sup> H]glutamato em membranas de córtex cerebral de camundongo.....	56
3.6.5- Efeito do DPHD sobre a captação de [ <sup>3</sup> H]serotonina em sinaptossomas obtidos de córtex cerebral de rato.....	57
3.6.6- Efeito do DPHD sobre a liberação de [ <sup>3</sup> H]serotonina em sinaptossomas obtidos de córtex cerebral de rato.....	58
3.7- Drogas e soluções usadas.....	60
3.8- Análise estatística .....	60
4. RESULTADOS.....	62
4.1 - Nocicepção induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético em camundongos.....	62
4.2 - Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos.....	65
4.3 - Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos.....	78
4.4 - Efeito do galato de etila e do DPHD no teste da placa quente em camundongos.....	83
4.5 - Efeito do galato de etila e do DPHD na performance motora (rota-rod) ...	84
4.6 Análise do mecanismo de ação antinociceptiva do galato de etila e do DPHD.....	84
Estudos "in vivo".....	84
4.6.1 - Participação do sistema opióide .....	84
4.6.2 - Participação da proteína G <sub>i/o</sub> sensível a toxina pertussis.....	85
4.6.3 - Participação de canais de potássio .....	87
4.6.4 - Efeito do pré-tratamento com L-arginina.....	88
4.6.5 - Participação do sistema serotoninérgico.....	90
4.6.6 - Desenvolvimento de tolerância cruzada entre a morfina e o DPHD.....	91
4.6.7 - Participação do sistema dopaminérgico .....	91
4.6.8 - Participação do sistema gabaérgico .....	93
Estudos "in vitro".....	93
4.6.9 - Efeito do DPHD sobre a contração do íleo e ducto deferente isolado de cobaia e de camundongos induzida pela estimulação elétrica de campo .....	93
4.6.10- Efeito do DPHD sobre a união específica da [ <sup>3</sup> H]naloxona e do [ <sup>3</sup> H]glutamato em membranas de córtex cerebral de camundongos.....	94
4.6.11 - Efeito do DPHD sobre a liberação e a captação de [ <sup>3</sup> H]serotonina em sinaptossomas obtidos de córtex cerebral de ratos.....	95
5- DISCUSSÃO.....	96
5.1- Atividades antinociceptivas induzidas pela rutina, geranina, furosina, quercetina e gaiato de etila isolados do gênero <i>Phyllanthus</i> em camundongos.....	96
5.2- Atividade antinociceptiva do alcalóide DPHD isolado da <i>Siphocampylus verticillatus</i> .....	111
6. CONCLUSÕES.....	120
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	121

## LISTA DE ABREVIÇÕES

B <sub>1</sub>	Receptor das cininas tipo 1
B <sub>2</sub>	Receptor das cininas tipo 2
°C	Graus centígrados
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COX	Ciclooxigenase
E.P.M.	Erro padrão da média
EUA	Estados Unidos da América
h	Hora
I $\kappa$ B	Proteína inibitória do fator de transcrição nuclear NF-Kappa B
NF- $\kappa$ B	Fator de transcrição nuclear NF-Kappa B
i.p.	Intraperitoneal
v.o.	Via oral
i.t.	Intratecal
i.c.v.	Intracerebroventricular
VR1	Receptor vanilóide
Kg	Quilograma
mg	Miligrama
min	Minutos
ml	Mililitros
IL	Interleucina
TNF	Fator de necrose tumoral
NK <sub>1</sub>	Receptor das taquicininas do tipo 1
NK <sub>2</sub>	Receptor das taquicininas do tipo 2
NK <sub>3</sub>	Receptor das taquicininas do tipo 3
PBS	Salina tampão fosfato
SP	Substância P
NKA	Neurocinina A
NKB	Neurocinina B
VCAM	Moléculas de adesão vascular
ICAM	Molécula de adesão intercelular
DPHD	Cloridrato de cis-8,10-di-n-propilobelidiol dihidratado
NGF	Fator de crescimento do nervo
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
NT-3	Neurotrofina 3
NT-4/5	Neurotrofina 4/5
AMP <sub>c</sub>	Adenosina 3,5-monofosfato cíclico
GMP <sub>c</sub>	Guanosina 3,5-monofosfato cíclico
AINE	Antiinflamatórios não-esteroides
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
SNC	Sistema nervoso central
NOS	Óxido nítrico sintase
NO	Óxido nítrico
PKC	Proteína quinase C
IP <sub>3</sub>	1,4,5-trifosfato de inositol
DAG	Diacilglicerol

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>PÁG</b>
Figura 1 - Aspectos gerais das partes aéreas de algumas plantas do gênero <i>Phyllanthus</i> .....	5
Figura 2 – Estrutura molecular da geranina, da furosina, da quercetina, da rutina e do galato de etila isolados de algumas plantas do gênero <i>Phyllanthus</i> .....	11
Figura 3 - Aspectos gerais das partes aéreas da <i>Siphocampylus verticillatus</i> .....	13
Figura 4 – Estrutura molecular do alcalóide DPHD isolado da <i>Siphocampylus verticillatus</i> .....	14
Figura 5 – Efeito antinociceptivo do galato de etila administrado pela via i.p. e v.o. nas contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos.....	62
Figura 6 – Efeito antinociceptivo do DPHD administrado pela via i.p. e v.o. nas contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos.....	63
Figura 7 – Efeito antinociceptivo do meloxicam, diclofenaco e da aspirina administrados pela via i.p. e v.o. nas contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos.....	65
Figura 8 – Efeito antinociceptivo do galato de etila administrado pela via i.p. e v.o. na nocicepção causada pela formalina em camundongos.....	66
Figura 9 – Efeito antinociceptivo do DPHD administrado pela via i.p. e v.o. na nocicepção causada pela formalina em camundongos.....	69
Figura 10 – Efeito antinociceptivo tempo dependente do DPHD administrado pela via i.p. e v.o. na nocicepção causada pela formalina em camundongos.....	69
Figura 11 – Efeito antinociceptivo da aspirina administrada pela via i.p. e v.o. na nocicepção causada pela formalina em camundongos.....	70
Figura 12 – Efeito antinociceptivo do meloxicam e do diclofenaco administrado pela via i.p. na nocicepção causada pela formalina em camundongos.....	71
Figura 13 – Efeito do galato de etila administrado pela via i.c.v. ou i.t. na nocicepção causada pela formalina em camundongos.....	73
Figura 14 – Efeito do DPHD administrado pela via i.c.v. ou i.t. na nocicepção causada pela formalina em camundongos.....	76
Figura 15 – Efeito do meloxicam administrado pela via i.c.v. ou i.t. na nocicepção causada pela formalina em camundongos.....	77
Figura 16 – Efeito do diclofenaco administrado pela via i.c.v. ou i.t. na nocicepção causada pela formalina em camundongos.....	77
Figura 17 – Efeito do galato de etila administrado pela via i.p. ou v.o. na nocicepção neurogênica causada pela capsaicina em camundongos.....	79
Figura 18 – Efeito do DPHD administrado pela via i.p., v.o., i.c.v. e i.t. na nocicepção neurogênica causada pela capsaicina em camundongos.....	80
Figura 19 – Efeito do meloxicam e do diclofenaco administrado pela via i.p., v.o., i.c.v. ou i.t. na nocicepção neurogênica causada pela capsaicina em camundongos.....	82

Figura 20 – Influência do pré-tratamento de camundongos com naloxona sobre a antinocicepção do galato de etila e da morfina no modelo da formalina.....	84
Figura 21 – Influência do pré-tratamento de camundongos com os antagonistas opióides sobre a antinocicepção causada pelo DPHD e morfina no modelo da formalina.....	85
Figura 22 – Influência do pré-tratamento de camundongos com toxina pertussis sobre a antinocicepção causada pelo galato de etila no modelo da formalina.....	86
Figura 23 – Influência do pré-tratamento de camundongos com toxina pertussis sobre o efeito antinociceptivo causado pelo DPHD no modelo da formalina.....	86
Figura 24 – Influência do pré-tratamento de camundongos com bloqueadores de canais de potássio sobre a antinocicepção causada pelo galato de etila no modelo formalina.....	87
Figura 25 – Influência do pré-tratamento de camundongos com bloqueadores de canais de potássio sobre a antinocicepção causada pelo DPHD no modelo da formalina.....	88
Figura 26 – Influência do pré-tratamento de camundongos com L-arginina sobre a antinocicepção causada pelo galato de etila no modelo da formalina.....	89
Figura 27 – Influência do pré-tratamento de camundongos com L-arginina sobre antinocicepção causada pelo DPHD no modelo da formalina.....	89
Figura 28 – Influência do pré-tratamento de camundongos com p-clorofenilalanina sobre a antinocicepção causada pelo DPHD no modelo da formalina.....	90
Figura 29 – Influência do pré-tratamento de camundongos com metisergida sobre a antinocicepção causada pelo DPHD na modelo da formalina.....	91
Figura 30 – Influência do pré-tratamento de camundongos com a morfina ou DPHD sobre a antinocicepção causada pelo DPHD e morfina no modelo da formalina.....	92
Figura 31 – Influência do pré-tratamento de camundongos com haloperidol sobre a antinocicepção causada pelo DPHD no modelo da formalina.....	92
Figura 32 – Influência do pré-tratamento de camundongos com antagonista Gabaérgicos sobre a antinocicepção causada pelo DPHD no modelo da formalina.....	93
Figura 33 – Efeito do DPHD sobre a união específica de [ <sup>3</sup> H]naloxona e de [ <sup>3</sup> H]glutamato em membrana de córtex cerebral de camundongos.....	94
Figura 34 – Efeito do DPHD sobre a captação e liberação de [ <sup>3</sup> H]serotonina em sinaptossomas obtidos de córtex cerebral de ratos.....	95

## LISTA DE TABELAS

## PAG

Tabela 1 – Comparação dos valores das $DI_{50}$ s e inibição máximas para a atividade antinociceptiva do galato de etila, rutina, furosina, quercetina, geranina, DPHD, meloxicam, diclofenaco e aspirina no modelo do ácido acético em camundongos .....	63
Tabela 2 – Efeito antinociceptivo de alguns compostos isolados das plantas do gênero <i>Phyllanthus</i> , administrado pela via i.p. ou v.o., no modelo do ácido acético em camundongos .....	64
Tabela 3 – Efeito antinociceptivo da quercetina e da rutina, administradas pela via i.c.v. ou i.t. no modelo da formalina em camundongos .....	67
Tabela 4 – Efeito antinociceptivo da geranina e da furosina, administradas pela via i.c.v. ou i.t. no modelo da formalina em camundongos .....	68
Tabela 5 – Comparação dos valores das $DI_{50}$ s e inibição máximas para a atividade antinociceptiva do galato de etila, rutina, furosina, quercetina, geranina, DPHD, meloxicam, diclofenaco e aspirina, administrados pela via i.p. ou oral, no modelo da formalina em camundongos .....	72
Tabela 6 – Efeito antinociceptivo da quercetina e da rutina administrado pela via i.c.v. ou i.t. no modelo da formalina em camundongos.....	74
Tabela 7 – Efeito antinociceptivo da geranina e da furosina, administrados pela via i.c.v. ou i.t. no modelo da formalina em camundongos.....	75
Tabela 8 – Comparação dos valores das $DI_{50}$ s e inibição máximas para a atividade antinociceptiva do galato de etila, rutina, furosina, quercetina, geranina, DPHD, meloxicam e diclofenaco, administrados pela via i.c.v. ou i.t., no modelo da formalina em camundongos .....	78
Tabela 9 – Efeito antinociceptivo da quercetina, rutina, geranina e da furosina na nocicepção causada pela capsaicina em camundongos.....	80
Tabela 10 – Comparação dos valores das $DI_{50}$ s e inibição máximas para a atividade antinociceptiva do galato de etila, rutina, furosina, quercetina, geranina, DPHD, meloxicam e do diclofenaco no modelo da capsaicina em camundongos .....	81
Tabela 11 – Influência do galato de etila, meloxicam e do diclofenaco no teste da placa quente em camundongos .....	83
Tabela 12 – Influência da morfina e do DPHD no teste da placa quente em camundongos.....	83

## RESUMO

No presente estudo foram analisadas as ações antinociceptivas de vários compostos isolados de plantas medicinais incluindo a geranina, furosina, quercetina, rutina e do galato de etila isolados das partes aéreas de plantas do gênero *Phyllanthus* e do alcalóide cloridrato de cis-8,10-Di-N-propillobelidiol dihidratado (DPHD) isolado das partes aéreas da *Siphocampylus verticillatus*, administrados via sistêmica (i.p. e oral), espinhal (i.t.) e supraespinhal (i.c.v.) em modelos de nocicepção química e térmica em camundongos. Além disso, avaliamos, através de métodos farmacológicos "in vivo" e "in vitro" e bioquímicos, os prováveis mecanismos de ação antinociceptiva produzida pelo galato de etila e pelo DPHD na nocicepção química induzida pela formalina em camundongos.

A geranina, a furosina, a quercetina, a rutina, o galato de etila e o DPHD, administrados por via i.p. ou oral foram capazes de reduzir significativamente a nocicepção causada pelo ácido acético em camundongos. Além disso, esses compostos administrados por via sistêmica, espinhal e supraespinhal também foram efetivos em reduzir a nocicepção neurogênica (primeira fase) e inflamatória (segunda fase) induzida pela formalina e a dor neurogênica causada pela capsaicina. O galato de etila e o DPHD, ao contrário da morfina, foram inativos quando analisados na nocicepção térmica no modelo da placa quente em camundongos.

A atividade antinociceptiva do DPHD foi significativamente diminuída pelo pré-tratamento dos animais com p-clorofenilalanina (inibidora da síntese de serotonina), metisergida (antagonista não seletivo dos receptores serotoninérgicos), naloxona (antagonista não seletivo dos receptores opióides), ciprodimina (antagonista seletivo dos receptores opióide do tipo  $\mu$ ), naitrindol (antagonista seletivo dos receptores opióide do tipo  $\delta$ ), nor-binaltorfimina (antagonista seletivo dos receptores opióides tipo  $\kappa$ ), L-arginina (precursora do óxido nítrico) ou pela toxina pertussis (inativadora da proteína  $G_{i/o}$ ). No entanto, a antinocicepção causada pelo DPHD não foi alterada pelo pré-tratamento dos animais com antagonistas dos receptores  $GABA_A$  (bicuculina) e  $GABA_B$  (faclofeno), com bloqueadores de canal de potássio sensíveis à glibenclamida, caribdotoxina, apamina ou tetraetilamônio; ou ainda pelo haloperidol (antagonista não seletivo dos receptores dopaminérgicos). Além disso, o DPHD, ao contrário da

morfina, não foi capaz de induzir tolerância a seus próprios efeitos antinociceptivos, nem tampouco produziu tolerância cruzada com a morfina. O DPHD também não inibiu as contrações induzidas por estimulação elétrica de campo em íleo de cobaia e ducto deferente de camundongo.

A antinocicepção causada pelo galato de etila, ao contrário do DPHD, foi significativamente inibida pelo pré-tratamento dos animais com bloqueadores de canais de potássio modulados por ATP (sensível à glibenclamida) ou de baixa e alta condutância ativados por cálcio (sensíveis à apamina e caribdotoxina, respectivamente), mas não os dependentes de voltagem sensíveis ao tetraetilamônio. Além disso, o efeito antinociceptivo do galato de etila, da mesma maneira que o da morfina e o DPHD, foi inibido pelo tratamento dos animais com toxina pertussis (inibidora da proteína  $G_{i/o}$ ). No entanto, a sua ação antinociceptiva não foi alterada pelo tratamento dos animais com naloxona ou L-arginina, e nem mostrou estar relacionado com ação depressora do sistema nervoso central ou periférico.

Nossos resultados confirmam e estendem os dados descritos na literatura e mostram que o DPHD, a geranina, a furosina, a quercetina, a rutina e o galato de etila produziram pronunciada ação antinociceptiva quando administrados por via sistêmica, espinhal e supraespinhal em camundongos, incluindo a dor neurogênica e inflamatória induzidas pela formalina e a capsaicina. O mecanismo de ação do DPHD envolve múltiplos sistemas, incluindo a interação com os receptores opióides do tipo  $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\delta$ , a via da L-arginina-óxido nítrico e o sistema serotoninérgico, além da ativação da proteína  $G_{i/o}$  sensível à toxina pertussis. Por outro lado, o mecanismo de ação do galato de etila está relacionado com a ativação com canais de potássio modulados por ATP e aqueles de baixa e alta condutância ativados por cálcio, além de envolver a interação com a proteína  $G_{i/o}$ . Esses resultados, analisados em conjunto, mostram claramente o potencial dos produtos naturais, especialmente aqueles isolados de plantas medicinais e seus derivados no processo de descobrimento de novas drogas, com especial interesse no controle de processos dolorosos que ainda carecem de terapias mais adequadas.

**Parte dos resultados da presente tese foram publicados nas seguintes revistas:**

1. Trentin, A.P.; **Santos, A.R.S.**; Miguel, O.G.; Pizzolatti, M.G.; Yunes, R.A. & Calixto, J.B. Mechanisms involved in the antinociceptive effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. *Journal Pharmacy and Pharmacology*, 49: 567-572, 1997.
2. Calixto, J. B.; **Santos, A.R.S.**; Cechinel Filho, V. & Yunes, R.A. A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology and therapeutic potential. *Medicinal Research Review*, 18: 225-258, 1998.
3. **Santos, A.R.S.**; Vedana, E.M. & De Freitas, G.A. Antinociceptive effect of meloxicam in neurogenic and inflammatory nociceptive models in mice. *Inflammation Research*, 47: 302-307, 1998.
4. Cechinel Filho, V.; **Santos, A.R.S.**; Calixto, J.B.; Delle Monache, F.; Miguel, O.G. & Yunes, R.A. Triterpenes from *Phyllanthus sellowianus* roots. *Planta Medica*, 64: 194, 1998.
5. **Santos, A.R.S.**; Miguel, O.G.; Yunes, R.A. & Calixto, J.B. Antinociceptive properties of the new alkaloid, cis-8,10-Di-N-propyllobelidiol hydrochloride Dihydrate isolated from *Siphocampylus verticillatus*: Evidence for the mechanisms of action. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 289: 417-426, 1999.
6. **Santos, A.R.S.**; DE Campos, R.O.P.; Miguel, O.G.; Cechinel-Filho, V.; Yunes, R.A. & Calixto, J.B. The involvement of K<sup>+</sup> channels and G<sub>i/o</sub> protein in the antinociceptive action of the gallic acid ethyl ester. *European Journal Pharmacology*, 379: 7-17, 1999.
7. **Santos, A.R.S.**; DE Campos, R.O.P.; Miguel, O.G.; Cechinel-Filho, V.; Siani, A.C.; Yunes, R.A. & Calixto, J.B. Antinociceptive properties of extracts of new species of plants of the genus *Phyllanthus* (Euphorbiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 72: 229-238, 2000.
8. Calixto, J.B.; Beirith, A.; Ferreira, J.; **Santos, A.R.S.**; Cechinel Filho, V. & Yunes, R.A. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. (Review). *Phytotherapy Research*, 14: 401-418, 2000.

**Outros trabalhos publicados durante a realização do curso de doutorado.**

1. Miguel, O.G.; Calixto, J.B.; **Santos, A.R.S.**; Messana, I.; Ferrari, F.; Cechinel Filho, V.; Pizzolatti, M.G. & Yunes, R.A. Chemical and preliminary analgesic evaluation of geraniin and furosin isolated from *Phyllanthus sellowianus*. *Planta Medica* 62: 146-149, 1996.
2. Cechinel Filho, V.; **Santos, A.R.S.**; Campos, R.O.P.; Miguel, O.G.; Yunes, R.A.; Ferrari, F.; Messana, I. & Calixto, J.B. Chemical and pharmacological studies of *Phyllanthus carolinienses*. *Journal Pharmacy and Pharmacology* 48: 1231-1236, 1996.
3. Miguel, O.G.; Pizzolatti, M.G.; Yunes, R.A.; Vencato, I.; Calixto, J.B.; **Santos, A.R.S.**; Contin, A. & Moreira, E.A. N-methyl-2(R)-{2(S)-hydroxypentyl}-6(-)-{2(R)-hydroxypentyl}-piperidine hydrochloride dihydrate. *Acta Crystallographica C52*: 1223-1225, 1996.

4. **Santos, A.R.S.** & Calixto, J.B. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes on formalin and capsaicin models of pain in mice. *Neuropeptides*, 31: 381-389, 1997.
5. De Campos, R.O.P.; **Santos, A.R.S.**; Vaz, Z.R.; Pinheiro, T.R.; Pizzolatti, M.G.; Cechinel Filho, V., Yunes, R.A. & Calixto, J.B. Antinociceptive properties of the extract and preliminary study of a xanthone isolated from *Polygala cyparissias* (Polygalaceae). *Life Science*, 61: 1619-1630, 1997.
6. **Santos, A.R.S.** & Calixto, J.B. Ruthenium red and capsazepine antinociceptive effect in formalin and capsaicin models of pain in mice. *Neuroscience Letters*, 263: 1-4, 1997.
7. Bertelli, J.A.; **Santos, A.R.S.** & Calixto, J.B. Effects of neurolysis during nerve regeneration. A behavioral and electrophysiological study. *Journal Reconstructive Microsurgery*, 14: 165-170, 1998.
8. Peres, M.T.L.P; Delle Monache, F.; Pizzolatti, M.G.; **Santos, A.R.S.**; Beirith, A.; Calixto, J.B. & Yunes, R.A. Analgesic compounds of *Croton urucurana* (Baillon). Pharmacological criteria used in the isolation. *Phytotherapy Research*, 12: 209-211, 1998.
9. Pinheiro, T.R.; Cechinel Filho, V.; **Santos, A.R.S.**; Calixto, J.B.; Monache, F.D.; Pizzolatti, M.G. and Yunes, R.A. Three xanthenes from *Polygala cyparissias*. *Phytochemistry*, 48: 725-728, 1998.
10. Bertelli, J.A.; Taleb, M.; Mira, J.-C.; **Santos, A.R.S.** & Calixto, J.B. Selective restoration of sensation by peripheral nerve grafts directly implanted into the contralateral C7 dorsal root ganglion. An experimental study in the rat brachial plexus. *Neurosurgery*, 42: 125-129, 1998.
11. Beirith, A.; **Santos, A.R.S.**; Rodrigues, A.L.S.; Creczyniski-Pasa, T. & Calixto, J.B. Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyrone on formalin, capsaicin and glutamate tests. Study of the mechanism of action. *European Journal Pharmacology*, 345: 233-245, 1998.
12. Mendes, G.L.; **Santos, A.R.S.**; Campos, M.M.; Tratsk, K.S.; Yunes, R.A.; Cechinel Filho, V. & Calixto, J.B. Anti-hyperalgesic properties of the extract and of the main sesquiterpene polygodial isolated from the barks of *Drymis winteri* (Winteraceae). *Life Sciences*, 63: 369-381, 1998.
13. Cechinel Filho, V.; Schlemper, V.; **Santos, A.R.S.**; Pinheiro, T.R.; Yunes, R.A.; Mendes, G.L.; Calixto, J.B. & Delle Monache, F. Isolation and identification of active compounds from *Drymis winteri* barks. *Journal of Ethnopharmacology*, 62: 223-227, 1998.
14. Beirith, A.; **Santos, A.R.S.**; Calixto, J.B.; Hess, S.C.; Messana, I.; Ferrari, F. & Yunes, R.A. Study of the antinociceptive action of the ethanolic extract and the triterpene 24-hydroxytormentonic acid isolated from the stem bark of *Ocotea suaveolens*. *Planta Medica*, 65: 50-55, 1999.
15. Gaertner, M.; Müller, L.; Roos, J.F.; Cani, G.; **Santos, A.R.S.**; Niero, R.; Calixto, J.B.; Yunes, R.A.; Delle Monache, F. & Cechinel Filho, V. Analgesic triterpenes from *Sebastiania schottiana* roots. *Phytomedicine*, 6: 41-44, 1999.
16. Ferreira, J., **Santos, A.R.S.** & Calixto, J.B. The role of systemic, spinal and supraspinal L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway in thermal hyperalgesia caused by intrathecal injection of glutamate in mice. *Neuropharmacology*, 38: 835-842, 1999.

17. Trentin, A.P.; **Santos, A.R.S.**; Guedes, A.; Pizzolatti, M.G.; Yunes, R.A. & Calixto, J.B. Antinociception caused by the extract of *Hedyosmum brasiliense* and its active principle, the sesquiterpene lactone 13-hydroxy-8,9-dehydroshizukanolide. *Planta Medica*, 65: 517-521, 1999.
18. Ferreira, J., **Santos, A.R.S.** & Calixto, J.B. Antinociception produced by systemic, spinal, supraspinal, administration of amiloride in mice. *Life Sciences*, 65: 1059-1066, 1999.
19. Alves, R.V.; Campos, M.M.; **Santos, A.R.S.** & Calixto, J.B. Receptor subtypes involved in tachykinin-mediated edema formation. *Peptides*, 20: 921-927, 1999.
20. Bertelli, J.A., Guizoni, M.F., **Santos, A.R.S.**, Calixto, J.B., Duarte, H.E. Cross-chest radial nerve transfer in brachial plexus injuries. Experimental and anatomical basis. *Chir. Main*, 18: 122-130, 1999.
21. Mendes, G.L.; **Santos, A.R.S.**; Malheiros, A.; Cechinel Filho, V.; Yunes, R.A. & Calixto, J.B. Assessment of mechanism involved in antinociception caused by sesquiterpene polygodial. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 292: 164-172, 2000.
22. Ferreira, J., Floriani, A.E.; Cechinel Filho, V.; Delle Monache, F.; Yunes, R.A. & **Santos, A.R.S.** Antinociceptive properties of the methanolic extract and two triterpenes isolated from *Epidendrum mosenii* stems (Orchidaceae). *Life Sciences*, 66: 791-802, 2000.

## ABSTRACT

In this study, we have evaluated the antinociceptive properties of the some compounds isolated from the aerial parts of the plants of genus *Phyllanthus*, identified as quercetin, rutin, furosin, geraniin and ethyl gallate, as well of a new alkaloid denoted as cis-8,10-Di-n-propyllobelidiol hydrochloride dehydrate (DPHD) isolated from aerial parts of *Siphocampylus verticillatus*, administered by systemically (i.p. and p.o), spinal (i.t.) or by supraspinal (i.c.v.) routes, in different models of chemical and thermal nociception in mice. Besides, by use of several pharmacological and biochemical procedures "in vivo" and "in vitro", we have assessed the characterization of possible mechanisms by which ethyl gallate and DPHD caused antinociception in the formalin-induced nociception in mice.

The compounds isolated from plants, geraniin, furosin, quercetin, rutin, ethyl gallate and DPHD, given by i.p. or p.o. routes produce significant inhibition of acetic acid-induced abdominal constrictions in mice. In addition, these compounds given systemically via spinal or supraspinal routes, also caused significant inhibition of both phases of formalin-induced pain and of capsaicin-induced neurogenic pain. Furthermore, ethyl gallate and DPHD, in contrast to morphine, were completely ineffective in the hot-plate test in mice. In addition, the antinociceptive actions of ethyl gallate and DPHD were not associated with non-specific effects such as muscle relaxation or sedation.

DPHD-induced antinociception assessed in the formalin test was significantly attenuated by treatment of animals with naloxone (a non-selective opioid receptor antagonist), cyprodime (a selective  $\mu$  opioid receptor antagonist), naltrindole (a selective  $\delta$  opioid receptor antagonist), nor-binaltorphimine (a selective  $\kappa$  opioid receptor antagonist), L-arginine (a precursor of nitric oxide), p-chlorophenylalanine (an inhibitor of serotonin synthesis), methysergide (a non-selective serotonin receptor antagonist), or pertussis toxin (an inhibitor of  $G_{i/o}$  protein). However, its action was not affected by phaclofen (a  $GABA_B$  receptor antagonist), bicuculine (a  $GABA_A$  receptor antagonist), apamin (a blocker of small-conductance calcium-gated potassium channel), charybdotoxin (a blocker of large-conductance calcium-gated potassium channel), tetraethylammonium (a blocker of voltage-gated potassium channel),

glibenclamide (a blocker of ATP-gated potassium channel), haloperidol (a non-selective dopamine receptor antagonist). In addition, DPHD given daily for up to 7 days did not develop tolerance to itself nor did it induce cross-tolerance to morphine. However, animals rendered tolerant to morphine presented cross-tolerance to DPHD. Morphine, in contrast to DPHD, inhibited electrical field stimulation of the guinea pig ileum or mouse vas deferens in vitro.

Ethyl gallate-induced antinociception assessed in the formalin test was significantly attenuated by treatment of animals with pertussis toxin (an inhibitor of  $G_{i/o}$  protein), apamin (a blocker of small-conductance calcium-gated potassium channel), charybdotoxin (a blocker of large-conductance calcium-gated potassium channel) or glibenclamide (a blocker of ATP-gated potassium channel). However, its action was not affected by tetraethylammonium (a blocker of voltage-gated potassium channel), naloxone (a non-selective opioid receptor antagonist), or by L-arginine (a precursor of nitric oxide).

These results confirm and extend previous findings from our group and demonstrate that DPHD, geraniin, furosin, quercetin, rutin and ethyl gallate produce systemic, spinal, and supraspinal antinociception, when assessed in chemical (acetic acid-, formalin- and capsaicin-induced pain), but not thermal (hot-plate test), models of nociception in the mouse. The antinociception caused by DPHD involves multiple mechanisms of action, namely interaction with  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$  opioid receptors, L-arginine-nitric oxide and serotonin pathways, as well as pertussis toxin-sensitive  $G_{i/o}$  protein-mediated mechanisms. The mechanism by which ethyl gallate produces antinociception seems likely to be associated with activation of both small- and/or large-conductance calcium-gated potassium channels as well as with ATP-gated potassium channels and by pertussis toxin-sensitive sensitive  $G_{i/o}$  protein. Collectively, these results show the potential of studies on naturally occurring substances derived from plants in the process of drug discovery, particularly as regards the development of new analgesic drugs.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1- Importância dos produtos naturais

A utilização da flora para fins medicinais é prática tão antiga quanto a civilização e compõe um dos principais aspectos da medicina tradicional. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 80% da população mundial que reside em países em desenvolvimento, dos quais 3,2 bilhões de pessoas vivem em pobreza absoluta, usam correntemente extratos de plantas medicinais para atendimento das suas necessidades básicas de saúde (WHO, 1993; FARNSWORTH et al., 1985; AKERELE, 1993; GRÜNWALD, 1995; GRÜNWALD & BÜTTEL, 1996). Além disso, os produtos naturais também desempenham um papel importante em países desenvolvidos. Tal fato é corroborado pelo estudo realizado com prescrições médicas nos Estados Unidos da América (EUA), no período de 1959 a 1980, o qual constatou que 25% dessas prescrições médicas eram de medicamentos que continham extratos ou princípios ativos de vegetais superiores (FARNSWORTH & MORRIS, 1976; ROBBERS et al., 1997).

De acordo com CALIXTO (2000), apesar dos grandes avanços da medicina moderna nos últimos 100 anos, os produtos naturais, principalmente os compostos derivados das plantas medicinais, contribuíram decisivamente para o desenvolvimento da terapêutica moderna. Além disso, eles tiveram e ainda têm papel fundamental no esclarecimento de fenômenos complexos relacionados à biologia celular e molecular, importantes para a descoberta de novas drogas (CALIXTO, 1998; CALIXTO et al., 2000). O mercado mundial de medicamentos é da ordem de US\$ 300 bilhões anuais, sendo que 60% desses medicamentos originam-se de síntese orgânica, especialmente da química combinatória. Os 40% restantes do arsenal terapêutico disponível na atualidade são obtidos direta ou indiretamente de fontes naturais (cerca de 25% de plantas, 13% de microrganismos e 2% de animais) (CALIXTO, 1998, 2000).

Nos últimos 10 anos o interesse pelas plantas medicinais tem crescido muito, e vários fármacos têm sido desenvolvidos a partir de plantas superiores. Em algumas áreas, como no tratamento do câncer, cerca de 60% dos medicamentos disponíveis no mercado ou em fase clínica de desenvolvimento,

são derivados de produtos naturais, principalmente de plantas superiores (para revisão ver CRAGG et al., 1997; FARNSWORTH & BINGEL, 1997; DE SMET, 1997; CALIXTO, 2000a). Além disso, estima-se em cerca de 250.000 o número de espécies vegetais superiores existentes no planeta, sendo que apenas uma pequena porcentagem delas foi, até o momento, estudada fitoquimicamente e um número menor ainda foi submetido a alguma análise biológica ou “screening” farmacológico (para revisão ver FARNSWORTH, 1993; HAMBURGER & HOSTETTMANN, 1991; CALIXTO et al., 2000a). Desta forma, pode-se considerar que menos de 10% das milhares de espécies de plantas distribuídas em todo mundo foram investigadas com vistas ao descobrimento de propriedades terapêuticas (para revisão ver FERREIRA et al., 1998).

Por outro lado, mais da metade dessas espécies de plantas presentes no planeta encontra-se nas florestas tropicais, cuja área corresponde a apenas 7% da superfície da terra (SOEJARTO, 1996), sendo que essas regiões devem ser consideradas como prioritárias no estabelecimento de programas de conservação *in situ* de germoplasma vegetal (SOEJARTO, 1996). Somando-se a isso, o Brasil é o país com maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas, o que corresponde a cerca de 15 a 20% da diversidade biológica do planeta, sendo denominado o país da megadiversidade (WORLD CONSERVATION MONITORING CENTRE, 1992; MITTERMEIER et al., 1992; CALIXTO, 2000a).

No Brasil, 84% das drogas atualmente no mercado são importadas e 60% de todas as drogas processadas são consumidas por 23% da população, o que faz com que os remédios caseiros à base de plantas medicinais sejam ainda a principal fonte de medicamentos para a maioria do povo brasileiro (ELISABETSKY & WANNMCHER, 1993; ELISABETSKY, 1999). Assim, é inegável que a maioria da população de baixa renda recorre às plantas medicinais para o tratamento dos seus males. Apesar de o Brasil não ter uma indústria farmacêutica forte, o comércio interno de medicamentos registrado no país atinge hoje a casa dos 10 bilhões de dólares, sendo o sétimo mercado mundial em termos de vendas. Dentro desse contexto, as plantas medicinais e, em especial, o uso dos medicamentos fitoterápicos adquirem importância como agentes terapêuticos e, por isso, devem ser prioritariamente analisados segundo os métodos modernos disponíveis (LAPA et al., 1999; CALIXTO, 1998, 2000a).

Contudo, a exploração de plantas da flora nativa de uso medicinal, através da extração direta nos ecossistemas tropicais (extrativismo), tem levado a reduções drásticas das populações naturais dessas espécies, seja pelo processo predatório de exploração, seja pelo desconhecimento dos seus mecanismos de perpetuação. Aliado a esse fato, é inquestionável que a riqueza natural representada pelas plantas medicinais está ameaçada, segundo previsão de que 60.000 espécies, aproximadamente 25% do total mundial, serão extintos até meados do século XXI, se a atual tendência permanecer. Assim, a domesticação e o cultivo aparecem como opções para a obtenção da matéria-prima de interesse farmacêutico e redução do extrativismo nas formações florestais.

FARNSWORTH et al. (1985) relataram que há, pelo menos, 117 substâncias químicas obtidas de 91 espécies vegetais, que foram ou estão sendo utilizadas mundialmente como medicamentos. Além disso, alguns medicamentos obtidos de fontes naturais são provenientes de organismos inferiores como os fungos, entre os quais podem-se destacar a penicilina (antibiótico) isolada do *Penicillium notatum*, a cefalosporina (antibiótico) isolada do *Cephalosporium sp.*, a lovastatina (anti-hiperlipidêmico) isolada do *Aspergillus terreus* e a ciclosporina (imunossupressor) isolada do *Beauveria nivea*, entre outras (DE SMET, 1997). Os avanços da química orgânica e analítica, a partir de 1950, permitiram impulsionar a indústria de síntese, tornando possível a síntese de moléculas que antes eram oriundas apenas de fontes naturais, marcadamente dos vegetais. Dessa forma, estima-se que tenham sido identificadas, até o presente, mais de 5 milhões de substâncias químicas e destas muitos são fármacos (para revisão ver DE SMET, 1997).

Recentemente, DE SMET (1997) demonstrou que dentre as 520 novas drogas aprovadas, no período de 1983 a 1994, pelo Departamento de Drogas e Alimentos (FDA) dos Estados Unidos (EUA), ou entidades equiparadas em outros países, 30 delas foram obtidas diretamente a partir de produtos naturais e 173 por processos de semi-síntese ou modeladas a partir de protótipos extraídos de produtos naturais. Somado-se a isso, MENDELSON & BALICK (1995) calcularam em 375 o número potencial de drogas existentes ainda nas florestas tropicais, sendo que destas, 47 já teriam sido descobertas, como a vincristina, a vinblastina, o curare, o quinino, a codeína e a pilocarpina (FERREIRA et al., 1998). Além disso, as "drogas potenciais" representariam um valor de US\$ 449

milhões/droga/ano ou US\$ 48 por hectare. Isto seguramente seria uma das razões para que 125 das maiores empresas farmacêuticas mundiais, que não tinham qualquer projeto com plantas medicinais há cerca de 15 anos, estejam agora empenhadas em pesquisa nessa área (FERREIRA et al., 1998).

Nos últimos anos, tem evidenciado um crescente aumento no estudo de plantas preconizadas pela medicina popular. O emprego de técnicas modernas de farmacologia, bioquímica, toxicologia e de biologia molecular renovou o interesse na procura de novos medicamentos ou de protótipos de novos fármacos a partir de produtos naturais (para revisão ver CALIXTO et al., 2000a).

## 1.2- Plantas do gênero *Phyllanthus*.

As plantas do gênero *Phyllanthus*, pertencentes à família Euphorbiaceae, são amplamente distribuídas em vários continentes, exceto na Antártica, sendo constituídas de 550 a 750 espécies (WEBSTER, 1967; UNANDER et al., 1995; CALIXTO et al., 1998). O gênero *Phyllanthus* é composto por mais de dez subgêneros, incluindo *Isocladius*, *Kirganelia*, *Cicca*, *Embllica*, *Conani*, *Gomphidium*, *Phyllanthodendron*, *Xylophylla*, *Botryanthus*, *Ericoccus* e *Phyllanthus* (UNANDER et al., 1995). Há cerca de 200 espécies distribuídas somente nas Américas, principalmente no Brasil e Caribe (WEBSTER, 1967; UNANDER et al., 1995; CALIXTO et al., 1998).

No Brasil, várias espécies de *Phyllanthus*, como por exemplo o *P. niruri*, *P. stipulatus*, *P. fraternus*, *P. caroliniensis*, *P. sellowianus*, *P. amarus*, *P. tenellus* e *P. urinaria* (Figura 1), são denominados popularmente de "quebra-pedra", "erva pombinha", "arrebenta pedra" ou "sarandi branco" (CALIXTO et al., 1998). Recentemente, diversas espécies do gênero *Phyllanthus* vêm sendo analisadas através de estudos farmacológicos pré-clínicos e clínicos, permitindo comprovar e também estender o seu emprego medicinal pela população (para revisão ver UNANDER et al., 1995; CALIXTO et al., 1998). Entre os vários efeitos biológicos dessas plantas, podem ser mencionadas ações inibitórias, tanto "in vitro" quanto "in vivo", da replicação do vírus da hepatite B (BLUMBERG et al., 1989; THYAGARAJAN et al., 1988; VENKATESWARAN et al., 1987), atividade antineoplásica (KUPCHAN et al., 1978; PETTIT et al., 1983, 1984, 1985, 1990), além de serem utilizadas na medicina popular para o tratamento da diabetes,

disenteria, icterícia, asma e infecções brônquicas e geniturinárias e nas afecções renais, incluindo os problemas relacionados aos cálculos renais e/ou biliares (CHOPRA et al., 1956; PERRY & METZGER, 1980; MORTON, 1981; OLIVER-BEVER, 1983; SANTOS, 1990; para revisão ver CALIXTO et al., 1998).

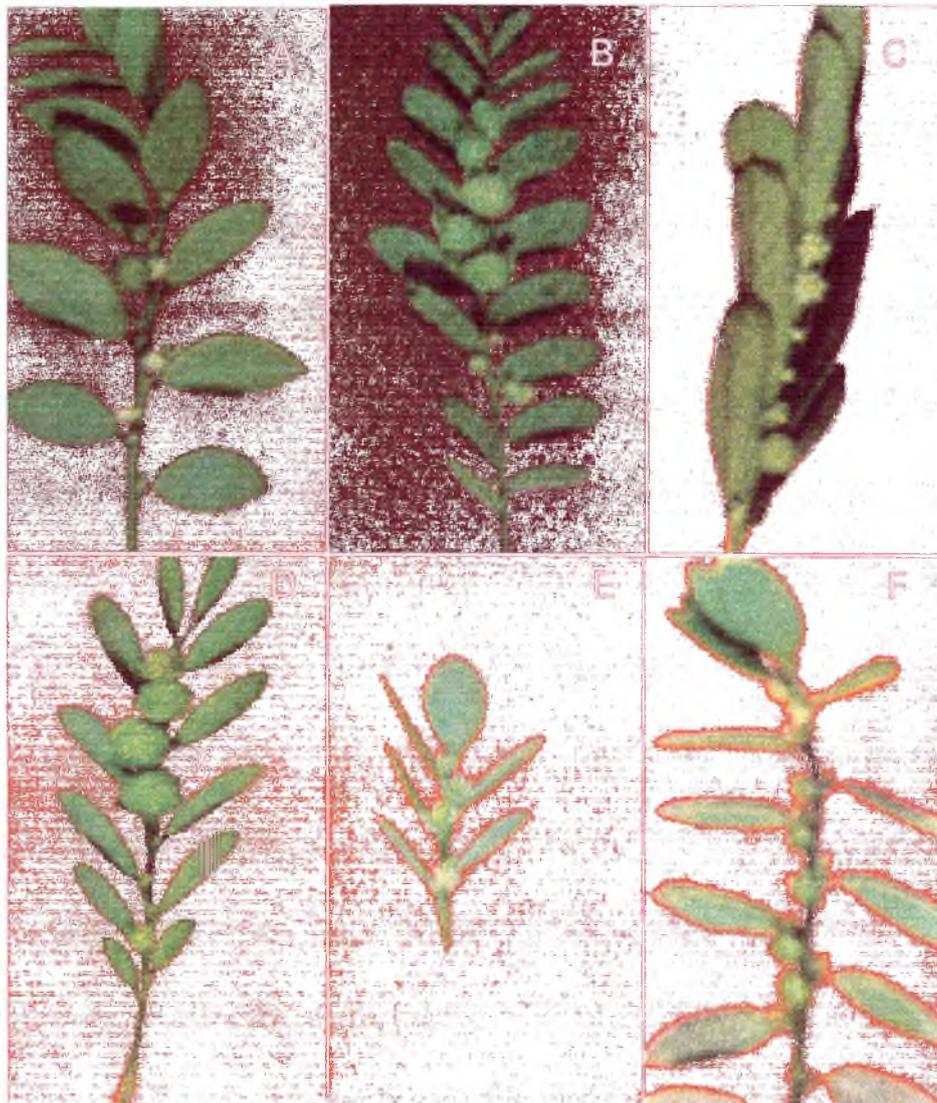


Figura 1 – Aspectos gerais das partes aéreas de algumas plantas do gênero *Phyllanthus*: A- *P. tenellus*; B- *P. niruri*; C- *P. urinaria*; D- *P. stipulatus*; E- *P. fraternus*; F- *P. carolinensis*.

A avaliação farmacológica pré-clínica de extrato do *P. niruri* e do *P. sellowianus*, realizada no Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, demonstrou que essa planta possui efeitos farmacológicos de interesse medicinal, especialmente no que se refere às suas ações antiespasmódicas, quando analisada sobre a musculatura lisa, incluindo o

íleo e a bexiga de cobaia, útero de rata, ureter e artéria renal de cão (CALIXTO et al., 1984; para revisão ver CALIXTO et al., 1998). Além disso, o extrato hidroalcoólico do *P. niruri*, quando administrado por via oral em ratos anestesiados, foi efetivo em inibir as contrações espontâneas da bexiga urinária (para revisão ver CALIXTO et al., 1998). CALIXTO et al. (1984) demonstraram também que o chá obtido das folhas e caules do *P. sellowianus* apresentou atividade antiespasmódica relacionada à presença de um alcalóide, posteriormente identificado e denominado de filantimida (TEMPESTA et al., 1988). Além disso, estudos pré-clínicos realizados na Escola Paulista de Medicina, demonstraram que a administração do chá de *P. niruri* (30 g/ 1 litro de água), durante 42 dias, causou significativa redução do tamanho dos discos de oxalato de cálcio (cálculos) introduzidos experimentalmente na bexiga de rato Wistar, quando comparado com o grupo controle (SANTOS, 1990). No entanto, esses resultados não permitiram evidenciar se a redução do cálculo urinário nos animais foi decorrente da modificação dos elementos inibidores e/ou facilitadores da sua formação, ou se o chá estaria atuando em outros fatores que poderiam estar envolvidos na gênese dos cálculos. O mesmo autor demonstrou, através de estudos clínicos, que a administração crônica do chá de *P. niruri* para pacientes normais não causou nenhum efeito diurético, nem tampouco demonstrou efeitos tóxicos que pudessem comprometer sua utilização pela população. No entanto, o mesmo tratamento com o chá, em pacientes portadores de cálculo renal, causou importante elevação da filtração glomerular e da excreção de creatinina, sendo esses parâmetros associados com significativa facilitação e eliminação dos cálculos pré-formados, acompanhados da diminuição dos episódios dolorosos de cólica nos pacientes portadores de cálculo renal (SANTOS, 1990).

Recentemente, CAMPOS (1997) estendeu as observações descritas por SANTOS (1990), e mostrou que o extrato aquoso de *P. niruri* também causou redução da endocitose de cristais de oxalato por células tubulares de rim de cão *in vitro*. Os mesmos autores mostraram que as células tubulares de rim de cão internalizam os cristais de oxalato de cálcio de maneira dependente do tempo de exposição e da concentração dos cristais, sem comprometimento da viabilidade celular. Além disso, o efeito do extrato aquoso do *P. niruri* não parece ser por um efeito citotóxico inespecífico nas células, mas envolve, em parte, a inibição da proteína quinase C e o bloqueio do influxo de cálcio. Essa ação do extrato aquoso

do *P. niruri* em células tubulares de rim de cão pode explicar as ações dessa planta no tratamento da litíase renal e urinária demonstrado anteriormente (SANTOS, 1990; CAMPOS, 1997).

Desta forma, os estudos realizados anteriormente demonstraram que o *P. niruri* apresenta princípios ativos que podem atuar em diferentes processos patológicos, especialmente na gênese dos cálculos renais e/ou urinários, mas também poderiam apresentar ações analgésicas, corroborando assim o seu emprego pela população para o tratamento da litíase. A partir disso, os estudos farmacológicos e químicos das espécies do gênero *Phyllanthus* prosseguiu, dentro do nosso grupo, procurando investigar outras atividades farmacológicas através de estudos pré-clínicos, com o objetivo principal de analisar o potencial terapêutico dessas plantas como analgésicos. GORSKI et al. (1993) demonstraram, pela primeira vez, que o extrato hidroalcoólico obtido das folhas, caules e raízes do *P. corcovadensis* administrado, tanto por via intraperitoneal quanto por via oral, apresentou atividade antinociceptiva em vários modelos de dor em camundongos. Estudos posteriores, realizados por SANTOS et al. (1995a; 2000) e CECHINEL FILHO et al. (1996), estenderam essas observações e demonstraram que outras espécies do gênero *Phyllanthus*, incluindo o *P. urinaria*, *P. tenellus*, *P. sellowianus*, *P. niruri*, *P. caroliniensis*, *P. fraternus*, *P. stipulatus*, *P. amarus* e *P. orbiculatus* também são dotadas de princípios ativos com atividade antinociceptiva em camundongos. Além disso, os mesmos autores demonstraram que as espécies de *Phyllanthus* estudadas não foram efetivas em inibir os edemas de pata de camundongo e/ou de rato induzidos pela formalina, carragenina e dextrana (GORSKI et al., 1993; SANTOS et al., 1995a; para revisão ver CALIXTO et al., 1998).

Por outro lado, os estudos procurando investigar os mecanismos de ação dos extratos das espécies de *Phyllanthus* demonstraram que sua ação antinociceptiva não era decorrente da inibição de produtos derivados da ciclooxigenase ou da interação com o sistema opióide, e aparentemente indicava um possível envolvimento do sistema taquicinérgico (GORSKI et al., 1993; SANTOS et al., 1995a; b). Procurando entender melhor os mecanismos de ação dos extratos de *Phyllanthus*, em especial do *P. urinaria*, o qual apresentou a melhor atividade antinociceptiva (SANTOS et al., 1995a; b), foram realizados estudos "in vitro" na bexiga e traquéia isoladas de cobaia (DIAS et al., 1995a;

PAULINO et al., 1996a; b). DIAS et al. (1995a) demonstraram que o extrato de *P. urinaria* induzia contração dependente de concentração na bexiga de cobaia, por uma ação direta sobre a musculatura lisa do trato urinário. As respostas contráteis produzidas pelo *P. urinaria* na bexiga foram dependentes da mobilização de cálcio extracelular, não sendo relacionadas à ativação de canais de cálcio do tipo L ou N sensíveis a voltagem, ou à ativação dos receptores taquicinérgicos do tipo NK<sub>1</sub> ou NK<sub>2</sub>, nem tampouco foram associadas à ativação dos receptores vanilóides sensíveis à capsaicina (DIAS et al., 1995a).

Quando o extrato do *P. urinaria* foi testado, na traquéia isolada de cobaia sem epitélio, observou-se que ele causou contração dependente da concentração usada, sendo esse efeito antagonizado pela indometacina (PAULINO et al., 1996a,b). Além disso, a resposta contrátil causada pelo *P. urinaria* foi dependente do cálcio extracelular, sensível ao vermelho de rutênio e aos antagonistas dos receptores NK<sub>1</sub> e NK<sub>2</sub> das taquicininas, FK888 e SR48968, respectivamente. No mesmo estudo, foi também demonstrado que o extrato do *P. urinaria* relaxou a musculatura lisa da traquéia de cobaia pré-contraída pelo carbacol ou sob tônus espontâneo, com ou sem epitélio, quando utilizado em concentrações mais elevadas (0,1 a 10 mg/ml). Além disso, foi demonstrado que o relaxamento induzido pelo extrato do *P. urinaria*, na traquéia de cobaia, parece envolver múltiplos mecanismos de ação, evidenciados pelo fato de que o efeito relaxante do extrato, a exemplo daquele produzido pela cromacalina, um ativador de canal de potássio modulado por ATP, foi antagonizado de maneira dependente da concentração pelo bloqueador não seletivo de canal de potássio tetraetilamônio (TEA), bem como por glibenclâmida, um bloqueador de canal de potássio sensível ao ATP. Contudo, a neurotoxina apamina, um bloqueador de canal de potássio de baixa condutância modulado por cálcio, não afetou o relaxamento induzido pelo extrato de *P. urinaria* ou pela cromacalina na traquéia de cobaia, indicando que os canais de potássio modulados por ATP, mas não aqueles de baixa condutância ativados por cálcio, parecem ser importantes para a resposta relaxante induzida pelo extrato na traquéia de cobaia. Além disso, os mesmos autores confirmaram essas observações pela adição de potássio (KCl 20 a 40 mM) no meio nutritivo, o qual foi capaz de inibir de forma significativa o relaxamento induzido pelo extrato do *P. urinaria* na traquéia de cobaia, enquanto que em alta concentração de potássio (KCl 80 mM) aboliu totalmente essa resposta (PAULINO et al., 1996a, b).

DIAS et al. (1995b) demonstraram que o extrato de *P. urinaria* também foi capaz de causar contração da veia porta isolado de ratos. Além disso, a contração causada pelo extrato foi semelhante à induzida pelos agonistas taquininérgicos para os receptores NK<sub>1</sub> (substância P), NK<sub>2</sub> (neurocinina A) e NK<sub>3</sub> (senktida). Os mesmos autores mostraram que a resposta contrátil do extrato, nessa preparação, foi dependente do cálcio extracelular, insensível a bloqueadores de canal de cálcio do tipo L e N. Contudo, a atropina, a ioimbina, a guanetidina, o prazosin, mas não a indometacina, foram capazes de antagonizar, de forma significativa, a resposta contrátil causada pelo extrato do *P. urinaria* na veia porta isolado de ratos (DIAS et al., 1995b). No mesmo estudo, foi também demonstrado que o extrato do *P. urinaria* causou relaxamento na musculatura lisa vascular da veia porta de ratos pré-contraída pela fenilefrina (DIAS et al., 1996a). No entanto, a ação relaxante do extrato, a exemplo do demonstrado por PAULINO et al. (1996b) na traquéia de cobaia, foi antagonizada significativamente pela glibenclamida, tetraetilamônio, apamina, mas não por inibidor de óxido nítrico ou pelo azul de metileno. Esses resultados estendem os dados anteriores e mostraram que a ação relaxante do extrato de *P. urinaria* na veia porta de ratos, parece ser dependente da ativação de canais de potássio modulados por ATP, e diferentemente do encontrado na traquéia, os canais de potássio de baixa condutância, ativados por cálcio, parecem ser importantes para a resposta relaxante induzida pelo extrato na veia porta de ratos (DIAS et al., 1995b; 1996a).

Um grande número de estudos fitoquímicos tem sido realizado com as plantas pertencentes ao gênero *Phyllanthus*, e muitas moléculas foram isoladas e identificadas (para revisão ver CALIXTO et al., 1998). Neste contexto, diferentes classes de compostos orgânicos de interesse medicinal têm sido identificados, como alcalóides, flavonóides, lactonas, esteróides, terpenóides, lignanas, taninos, entre outros (para revisão ver CALIXTO et al., 1998). Dentre os flavonóides e taninos podem-se destacar a rutina, a quercetina, a geranina, a furosina e o galato de etila (Figura 2). Contudo, cabe salientar que as lignanas, triterpenos, alcalóides e os taninos são as classes químicas mais abundantes no gênero *Phyllanthus* (CALIXTO et al., 1998). Além disso, dados da literatura demonstram que muitos compostos isolados das plantas do gênero *Phyllanthus* apresentam uma gama de efeitos farmacológicos e podem interagir com várias enzimas intracelulares, produzindo os efeitos descritos para essas plantas (para revisão

ver CALIXTO et al., 1998). Os dados do nosso grupo indicam, portanto, que além das diversas ações já descritas nos estudos farmacológicos pré-clínicos e clínicos com os extratos de várias espécies do gênero *Phyllanthus*, eles também apresentam importante efeito antinociceptivo, estendendo assim o grande interesse das plantas desse gênero e de seu potencial medicinal na medicina popular.

Recentemente, DIAS et al. (1996b) demonstram que entre os compostos isolados das plantas do gênero *Phyllanthus*, entre eles o galato de etila, a geranina, a furosina, o ácido gálico, a quercetina, a rutina; somente o galato de etila foi capaz de causar relaxamento na veia porta isolada de ratos. Os mesmos autores mostraram que o mecanismo de ação do galato de etila foi semelhante ao do extrato, ou seja, foi dependente da ativação de canais de potássio modulados por ATP sensível à glibenclamida, e de canais de potássio de baixa condutância ativados por cálcio e sensíveis à apamina (DIAS et al., 1996b). Somando-se a esses resultados, PAULINO (1996), demonstrou que os compostos quercetina, rutina e geranina, a exemplo do extrato do *P. urinaria*, produziram respostas contráteis na traquéia isolada de cobaias, sendo que o mecanismo de ação desses compostos foi dependente da mobilização de cálcio extracelular através de canais de cátions, sensíveis ao cloreto de níquel, mas não parece ser decorrente da estimulação de canais de cálcio do tipo L ou N dependentes de voltagem. Além disso, o mesmo autor demonstrou que a contração causada pelo extrato do *P. urinaria* na traquéia de cobaia foi decorrente do estímulo sobre o sistema taquicinérgico e vanilóide, sendo seus efeitos bloqueados pelos antagonistas de taquicininas, ou pelo vermelho de rutênio (PAULINO, 1996). No entanto, PAULINO et al. (1999) demonstraram que o galato de etila, a exemplo do extrato do *P. urinaria*, foi capaz de induzir uma resposta relaxante na traquéia isolada de cobaias, por um mecanismo que parece envolver a ativação de canais de potássio modulados por ATP e de canais de potássio de baixa condutância ativados por cálcio (PAULINO et al., 1999).

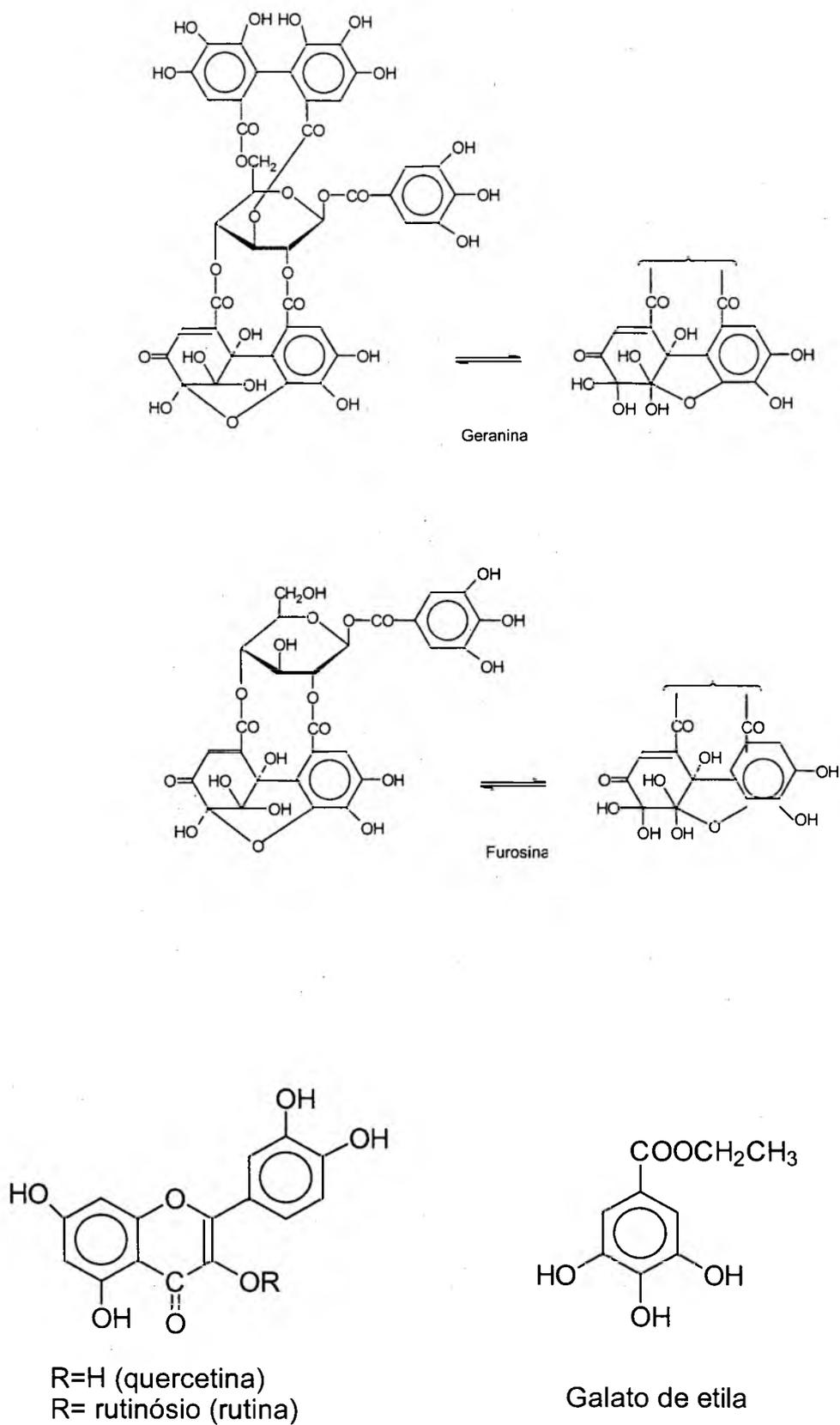


Figura 2 – Estrutura molecular da geranina, da furosina, da quercetina, da rutina e do galato de etila isoladas das partes aéreas das plantas do gênero *Phyllanthus*.

### 1.3- *Siphocampylus verticillatus*.

A *Siphocampylus verticillatus* é uma planta pertencente à família da Campanulaceae, que consiste de aproximadamente 29 gêneros (WIMMER et al., 1968). Há cerca de 1.200 espécies distribuídas em vários países tropicais e subtropicais (WIMMER et al., 1968). O gênero *Siphocampylus* apresenta grande interesse por abrigar várias espécies medicinais, entre as quais destacam-se as lobélias. A *Lobelia inflata* possui diversos alcalóides piperidínicos, como a  $\alpha$ -lobelina, que se caracterizam por sua utilização como estimulante respiratório empregado na terapêutica de recém natos e em anestesia, principalmente na forma de cloridrato e sulfato. Além disso, a  $\alpha$ -lobelina também é utilizada na profilaxia do tabagismo (MIGUEL, 1996).

A *S. verticillatus* (Figura 3) é uma planta nativa e cresce abundantemente no sul do Brasil, empregada na medicina popular para o tratamento de várias patologias, destacando-se o seu emprego na asma (GARELLO, 1950). A avaliação farmacológica pré-clínica do extrato hidroalcoólico da *S. verticillatus*, realizada no Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, demonstrou que essa planta apresentou ação antinociceptiva em vários modelos de nocicepção de origem neurogênica e inflamatória, tanto quando administrada pela via intraperitoneal quanto oral, em camundongos (TRENTIN et al., 1997). Os mesmos autores demonstraram, ainda, que o efeito antinociceptivo do extrato da *S. verticillatus* foi de longa duração, até 8 h, quando administrado pela via oral (TRENTIN et al., 1997). Além disso, estudos realizados com o objetivo de analisar o mecanismo de ação antinociceptiva do extrato, evidenciaram que ele ativa o sistema opióide e a via da L-arginina-óxido nítrico (TRENTIN et al., 1997).

Estudos fitoquímicos realizados com a *S. verticillatus* demonstraram que essa planta apresenta vários flavonóides, taninos, alcalóides e compostos fenólicos (MOREIRA et al., 1984). BURRAS (1985) confirmou os resultados obtidos anteriormente por MOREIRA et al. (1984) e mostrou que essa planta também apresenta esteróides e triterpenos. Além disso, o mesmo autor mostrou que o extrato hexânico apresentou significativo efeito antimicrobiano contra várias bactérias patogênicas, utilizando-se as técnicas de difusão radial e MIC (concentração inibitória mínima). CONTIN (1993) isolou e identificou uma

escoporona, a 6,7-dimetoxicumarina (escoporona), ácido ursólico e um alcalóide que constitui a substância mais abundante das que foram isoladas, o qual não foi identificado. BIAVATTI et al. (1994) mostraram o isolamento de um outro alcalóide a partir do extrato clorídrico (HCl 1%) de *S. verticillatus*, posteriormente tratado com solução de amônia diluída e extraído com clorofórmio, cujo composto foi identificado como sendo o 8,10-di-n-propil-lobelidiol.

Recentemente, MIGUEL et al. (1996a) trabalhando com a *S. verticillatus* demonstraram o isolamento e a identificação química de um alcalóide piperidínico inédito na literatura, denominado de cloreto de cis-8,10-Di-n-propillobelidiol dihidratado (Figura 4). Além disso, os mesmos autores confirmaram a estrutura desse composto através de cristalografia de raio X, e mostraram que esse alcalóide realmente era novo na literatura e que já encontrava-se na forma de cloridrato (MIGUEL et al., 1996a).



Figura 3 – Aspectos gerais das partes aéreas da *Siphocampylus verticillatus*.

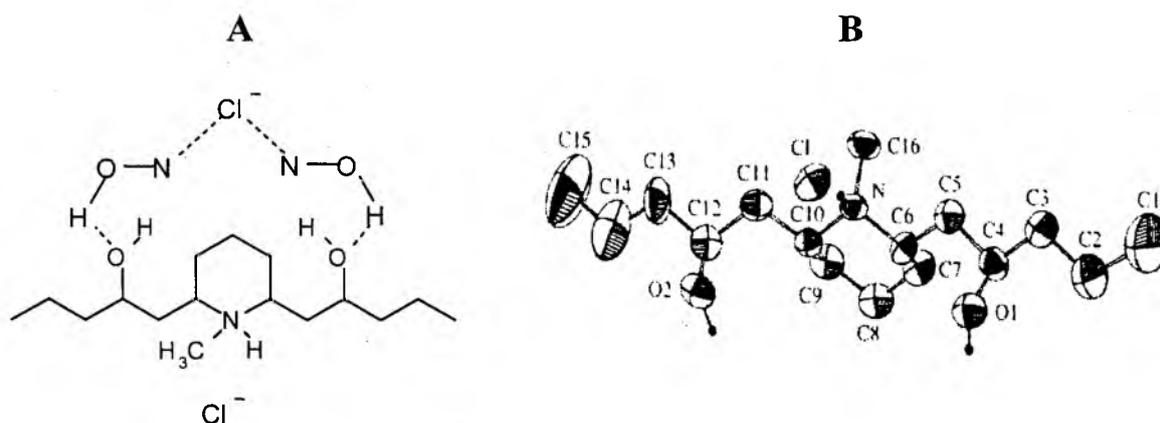


Figura 4 – Estruturas moleculares, convencional (A) e por cristalografia de raio X (B), do alcalóide cloridrato de cis-8,10-Di-n-propillobelidiol dihidratado isolado da *Siphocampylus verticillatus*.

#### 1.4 – Mecanismos envolvidos na transmissão da dor

A transmissão da dor é um mecanismo que envolve interações muito complexas de estruturas periféricas e cerebrais, desde a superfície da pele até o córtex cerebral (FÜRST, 1999). A dor pode ser definida, segundo o Comitê de Taxonomia da Associação Internacional para o Estudo da Dor (I.A.S.P), como uma sensação e experiência desagradável associada com um dano tecidual atual ou potencial, ou descrita como tal dano (MERSKEY & BOGDUK, 1994; MILLAN, 1999). Além disso, a dor pode ser denominada de acordo com o tipo da lesão e/ou dos mediadores envolvidos em “nociceptiva”, “neurogênica”, “neuropática” e “psicogênica”, a qual está associada, respectivamente, com estimulação excessiva dos nociceptores, com lesão ao tecido neural, com a disfunção de um nervo ou com fatores psicológicos (MILLAN, 1999). Somando-se a isso, algumas desordens ocorrem comumente em pacientes que experimentam a dor, como a hiperalgesia (sensibilidade exacerbada à um estímulo doloroso), alodínia (dor em resposta à um estímulo não-doloroso) e hiperestesia (sensibilidade anormal à um estímulo sensorial) (BESSION, 1999).

Em termos de duração, um episódio de dor pode ser transitório, agudo ou crônico. No tipo transitório, a ativação dos nociceptores é feita na ausência de qualquer dano tecidual. Na dor aguda, ocorre geralmente lesão e ativação dos nociceptores no sítio lesionado. Já a dor crônica é causada geralmente por uma lesão ou patologia, sendo que essa também pode ser perpetuada por outros

fatores que não os causadores iniciais da dor (LOESER & MELZACK, 1999). A dor aguda associada com uma lesão tecidual recente pode perdurar menos do que um mês, mas às vezes, pode durar até 6 meses. Estudos pré-clínicos têm demonstrado que a expressão ou a amplificação neuronal de novos genes (a base para sensibilização e remodelamento neuronal) pode ocorrer dentro de 20 minutos após uma lesão. Alguns trabalhos clínicos recentes sugerem que a dor aguda pode tornar-se crônica rapidamente (CARR & GOUDAS, 1999).

O entendimento dos mecanismos envolvidos na transmissão do processo doloroso tem progredido dramaticamente nos últimos anos, em grande parte devido a um aprimoramento na compreensão dos mecanismos envolvidos na fisiologia das fibras aferentes e no processo de neurotransmissão no corno dorsal da medula espinhal (para revisão ver: BESSON & CHAOUCH, 1987; GRUBB, 1998; FÜRST, 1999; MILLAN, 1999). Este progresso foi possível pelo uso de múltiplos protocolos experimentais, incluindo estudos comportamentais, eletrofisiologia "in vivo" e "in vitro", estudos anatômicos e principalmente através de técnicas de biologia molecular (GRUBB, 1998; MILLAN, 1999). Contudo, apesar desses avanços, os mecanismos exatos envolvidos na gênese e na transmissão da dor ainda não são totalmente conhecidos, e analgésicos efetivos e potentes, especialmente para o tratamento da dor crônica, ainda precisam ser desenvolvidos (MACFARLENE et al., 1997). Além disso, as duas principais classes de drogas analgésicas empregadas na prática clínica hoje continuam sendo o alcalóide morfina e os antiinflamatórios não esteroidais, apesar dos seus conhecidos efeitos adversos (APPLETON, 1997; OSSIPOV et al., 1997; MCQUAY & MOORE, 1997).

Os sinais nocivos são gerados em fibras aferentes finas do tipo C e A $\delta$ , que respondem a uma variedade de estímulos fisiológicos intensos tais como calor, frio, compressão e substâncias potencialmente nocivas. Todos os tecidos, com exceção dos neurófilos do sistema nervoso central, são inervados por estas fibras aferentes. Apesar disto, as propriedades dessas fibras diferem, dependendo se elas são aferentes somáticas (que inervam a pele, as articulações, os músculos), ou aferentes viscerais (que inervam os tecidos cardiovasculares e respiratórios, o trato gastrointestinal, ou os sistemas renal e reprodutivo). Os neurônios que respondem preferencialmente a estímulos nocivos são chamados de nociceptores. Eles conduzem as informações nociceptivas ao sistema nervoso

central, e seus corpos celulares encontram-se dentro dos gânglios das raízes dorsais, adjacentes à medula espinhal (DRAY & PERKINS, 1997; GRUBB, 1998; RUSSO & BROSE, 1998; BESSON, 1999; MILLAN, 1999).

Os nociceptores primários fazem uma sinapse no corno dorsal da medula espinhal com neurônios de segunda ordem, predominantemente na lâmina II (substância gelatinosa) da medula espinhal. Os neurônios de segunda ordem cruzam a medula espinhal para ascender o trato espinotalâmico, projetando suas fibras terminais principalmente ao tálamo. No tálamo, neurônios de terceira ordem emitem axônios através da cápsula interna ao córtex somatosensor, onde a somatização do estímulo nocivo ocorre, ou emitem axônios ao giro cingulado anterior, onde existe o componente emocional da dor (RUSSO & BROSE, 1998). A via da dor descrita acima representa uma rota clássica, mas existem outras vias possíveis, envolvendo estruturas nervosas diferentes (BESSON, 1999; JABBUR & SAADÉ, 1999). Além disso, o trato espinotalâmico parece emitir axônios ao mesencéfalo e à ponte rostral, fazendo sinapses em complexos nucleares, incluindo o núcleo magno da rafe (NMR) e o núcleo reticular gigantocelular (NRG). Ambas as estruturas parecem estar envolvidas na regulação descendente dos neurônios de segunda ordem (para revisão ver RUSSO & BROSE, 1998; BESSON, 1999; FÜRST, 1999; MILLAN, 1999). Todos os neurotransmissores envolvidos no controle inibitório descendente da transmissão da dor (tais como opióides endógenos, serotonina, noradrenalina) parecem inibir a excitação dos neurônios de segunda ordem na presença de estímulo nocivo (RUSSO & BROSE, 1998; FÜRST, 1999; MILLAN, 1999).

A dor, além de uma sensação, é uma experiência. Isto é importante porque as sensações possuem vias neuroanatômicas importantes, com receptores específicos que permitem a detecção e medida de um estímulo. Já as experiências incorporam componentes sensoriais com influências pessoais e ambientais importantes. O componente sensorial da dor é denominado nocicepção, que pode ser definida como a resposta fisiológica a uma lesão tecidual. A nocicepção é a progenitora da dor, que por sua vez causa o sofrimento. Além disso, a nocicepção não é uma sensação uniforme. A qualidade da dor e o início das respostas protetoras são determinadas por muitos fatores dentro da medula espinhal e estruturas cerebrais superiores envolvidas na integração e modificação dos sinais nociceptivos (RUSSO & BROSE, 1998).

Existem várias fontes importantes onde mediadores químicos que participam da perpetuação da resposta dolorosa são gerados, das quais destacam-se os tecidos lesionados e adjacentes, sistema vascular, células imunes, nervos simpáticos e sensoriais, entre outras. Além disso, existem mecanismos complexos pelos quais um transmissor pode agir, via múltiplos receptores que são amplamente distribuídos através dos tecidos periféricos ou centrais (MILLAN, 1999).

Embora os muitos mecanismos moleculares envolvidos da sensibilização central tenham sido estabelecidos, os mecanismos de sensibilização periférica ainda não foram completamente elucidados. Entretanto, o conhecimento da biologia molecular dos receptores permitiu extraordinário progresso no entendimento do mecanismo de ação de diversos neurotransmissores e drogas envolvidas na modulação central e periférica da nocicepção. O mecanismo de transdução neuroquímica da dor envolve, geralmente, a interação dos mediadores inflamatórios com um canal iônico da membrana tipo voltagem-dependente (canais de sódio, potássio e cálcio), com canais iônicos operados por receptor (receptor NMDA, receptor colinérgico nicotínico), com receptores associados à tirosina quinase (NGF), ou ainda com receptores da membrana que usualmente encontram-se acoplados a proteínas regulatórias denominadas de proteínas G, como acontece com os receptores das prostaglandinas e bradicinina (RANG et al., 1994; LEVINE & TAIWO, 1994; WOOD & DOCHERTY, 1997; MILLAN, 1999, CALIXTO et al., 2000a,b). Tais mecanismos de transdução nociceptiva geralmente envolvem a atuação dos mediadores inflamatórios em receptores específicos que se encontram acoplados a sistemas efetores que quando devidamente ativados promovem a formação de segundo mensageiros, como o AMPc (adenosina 3,5-monofosfato cíclico) e GMPc (guanosina 3,5-monofosfato cíclico), responsáveis pela ativação de proteínas quinases intracelulares, ou de terceiro mensageiros, como o  $Ca^{2+}$ , que vai interferir em outras proteínas celulares e na regulação de canais iônicos. Os principais sistemas efetores dos receptores ativados pelos mediadores inflamatórios são representados pela adenilato ciclase, guanilato ciclase, fosfolipase C (PLC), fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), tirosina quinase, proteínas quinase A, C e G e canais iônicos (MILLAN, 1999). Os receptores das prostaglandinas, bradicinina, histamina, serotonina e adenosina (A<sub>2</sub>) encontram-se acoplados à proteína G, porém a diferentes sistemas efetores. Os mediadores inflamatórios ao interagirem com tais receptores ativam os

respectivos sistemas efetores promovendo a regulação funcional dos receptores, que incluem, a depender do estímulo, uma regulação crescente, ou uma regulação decrescente. O fenômeno de regulação crescente, ou de hiperalgesia, pode ser observado, por exemplo, por pequena proporção de nociceptores denominados silenciosos ou latentes, encontrados em fibras aferentes que enervam a pele e vísceras, que podem apresentar-se irresponsivos a estímulos de grande intensidade, mas quando influenciado por mediadores inflamatórios exibem atividade espontânea ou tornam-se sensibilizados e responsivos a estímulos sensoriais. Em outras situações, pode haver uma regulação crescente por determinados mediadores inflamatórios que quando liberados, como ocorre com o fator de crescimento do nervo (NGF) e citocinas, promove a expressão de genes que codificam a síntese de novo de proteínas de receptor ou de canal iônico, desencadeando uma resposta mais intensa do estímulo nociceptivo (WOOD e DOCHERTY, 1997; MILLAN, 1999, CALIXTO et al., 2000a).

Diversos mediadores inflamatórios tem sido identificados como potencialmente hiperalgésicos, incluindo a interleucina-1 (IL-1), interleucina-8 (IL-8), fator de crescimento do nervo (NGF), prostaglandinas, leucotrienos, bradicinina, serotonina, adenosina, histamina e substância P. Acredita-se que alguns destes mediadores possam agir diretamente no nociceptor promovendo uma redução no limiar de sensibilidade (prostaglandina, serotonina, adenosina e alguns metabólitos eicosanóides), enquanto outros agiriam produzindo indiretamente a hiperalgesia pela ação inicial em outros tipos de células, como por exemplo em neurônios pós-ganglionares do sistema nervoso autônomo simpático ou em neutrófilos e macrófagos promovendo a liberação de outros mediadores hiperalgésicos (LEVINE & TAIWO, 1994; MILLAN, 1999). Estudos mais recentes demonstram uma importante participação moduladora das fibras simpáticas na excitabilidade de fibras aferentes C e em determinadas modalidades de dor crônica, às vezes denominadas de síndromes dolorosas simpaticamente mantidas, como na distrofia simpático reflexa e causalgia (MILLAN, 1999). O simpático pode estar envolvido em uma variedade de situações álgicas, como por exemplo no herpes zoster agudo, em traumas de tecidos, em neuropatias metabólicas (diabetes, etc) e lesão de nervos periféricos. Tem sido constatado que o mecanismo neural da hiperalgesia promovida pela maioria dos mediadores, incluindo as citocinas (IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ ), prostaglandinas, catecolaminas,

serotonina e bradicinina envolve a elevação nas concentrações de AMPc e de  $Ca^{2+}$  no interior da célula neuronal, que atuam como segundo mensageiros (RANG et al., 1994; LEVINE & TAIWO, 1994; MILLAN, 1999). Vale também ressaltar que as células possuem mecanismos eficientes para degradar o AMPc (fosfodiesterases), para tamponar e seqüestrar o  $Ca^{2+}$ , assim como para inativar as enzimas reatoras e transportar proteínas que tenham sido ativadas. Assim, ocasionalmente pode também ocorrer uma regulação decrescente ou dessensibilização de receptores, seja pela internalização do receptor, pela liberação de segundo mensageiros inibitórios, através de modulação da transcrição gênica, ou ainda, através de mecanismos de feedback (retroalimentação) de modulação dos sistemas efetores intracelulares e de liberação de mediadores inflamatório (DRAY & PERKINS, 1993; MILLAN, 1999). Tem sido também constatado que os agentes que estimulam a formação de GMPc produzem uma regulação decrescente dos nociceptores. Parece que a regulação funcional crescente ou decrescente depende do balanço entre as concentrações de AMPc/GMPc das vias nociceptivas (DRAY & PERKINS, 1993; FERREIRA et al., 1991; FERREIRA, 1993; MILLAN, 1999).

#### 1.5- Estratégias farmacológicas para o controle da dor

Vários trabalhos demonstram que o processo inflamatório, intimamente relacionado com a manifestação da dor, ocorre como uma resposta do tecido à lesão celular e caracteriza-se por um fenômeno complexo, dinâmico e multimediado, podendo manifestar-se a partir de qualquer agente lesivo, como físico (queimadura, radiação, trauma), biológico (microorganismo, reações imunológicas) ou químico (substância cáustica) (DRAY et al., 1994; DRAY, 1997; MILLAN, 1999). Este processo envolve uma complexa cascata de eventos bioquímicos e celulares, que incluem extravasamento de fluídos, ativação enzimática, migração celular, liberação de mediadores, sensibilização e ativação de receptores, lise tecidual e de reparo (VANE & BOTTING, 1995, 1996; MILLAN, 1999). Os macrófagos e os leucócitos polimorfonucleares recrutados pelos sítios de lesão celular, desempenham um papel fundamental no desenvolvimento do processo inflamatório mediante a liberação de fatores solúveis de regulação da fase aguda denominados de citocinas, destacando-se inicialmente a liberação de

interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) (MILLAN, 1999). A migração dos leucócitos envolve um rígido mecanismo de regulação de adesão destas células ao endotélio e subsequente migração transendotelial. Esta interação adesiva com o endotélio constitui um processo dinâmico envolvendo a ativação tanto do endotélio quanto dos leucócitos, resultando na liberação de um grande número de moléculas de adesão, incluindo as selectinas e integrinas, fatores quimiotáticos conhecidos como quimocinas, óxido nítrico e receptores de adesão. A interleucina-1 e o TNF- $\alpha$  são capazes de ativar as células endoteliais para produzirem selectinas iniciando o processo de adesão (ADAMS & NASH, 1996; MILLAN, 1999; FRÖDE, 2000). Além disso os macrófagos e neutrófilos, bem como as células teciduais lesadas, liberam uma variedade de substâncias oxidantes e enzimas criando um estresse oxidativo, no qual espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio são produzidas em abundância, promovendo a indução de um grande número de fatores transcricionais, como NF-kB, dímero *fos-jun* e AP-1, bem como perda dos estoques energéticos celulares, rompimento de mitocôndrias com liberação de enzimas líticas, peroxidação e destruição de membranas e dano em DNA. Estes fatores de transcrição estimulam produção de uma segunda onda de produtos gênicos que codificam enzimas com capacidade de eliminar radicais livres (catalase), com atividade de reparo tecidual (colagenase, estromelina, entre outras), bem como a produção de citocinas, receptores de superfície celular, moléculas de adesão, fatores de crescimento e de outros mediadores inflamatórios (DRAY, 1995, 1997; MILLAN, 1999). Os mediadores inflamatórios uma vez liberados promovem de forma sinérgica uma alteração no mecanismo de transdução periférica do estímulo nociceptivo aumentando a sensibilidade de transdução dos nociceptores de elevado limiar, com conseqüente redução no limiar de percepção do estímulo doloroso, causando exagerada resposta a estímulos nociceptivos supralimiais (hiperalgesia) e dor espontânea a estímulos normalmente inócuos (alodínia) (MILLAN, 1999). Além disso a estimulação dos nociceptores de aferentes primários, produz um reflexo axônico local, resultando na liberação de neuropeptídeos, particularmente, substância P (SP), neurocinina A (NKA) e do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), contribuindo para uma maior estimulação do processo inflamatório e intensificação da hiperalgesia. A substância P liberada produz degranulação de mastócitos,

vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular com extravasamento de plasma, aumento da produção e liberação de enzimas lisossômicas, liberação de prostaglandinas e de interleucina-1 e interleucina-6. Pode ainda estimular a síntese de óxido nítrico (NO) pelo endotélio vascular, causando vasodilatação e extravasamento de mediadores inflamatórios para os tecidos e dessa forma estimulando e sensibilizando os nociceptores de terminais nervosos. O CGRP também produz extravasamento de plasma, vasodilatação e hiperalgesia (MILLAN, 1999). Apesar do grande número de analgésicos e antiinflamatórios disponíveis atualmente para uso clínico, ainda não dispomos do analgésico ideal, com maior especificidade, de menor toxicidade e com indicação para algumas modalidades de dor ainda de difícil terapêutica, notadamente as de origem neurogênicas.

O conhecimento da fisiopatologia da dor, com a identificação precisa dos mediadores inflamatórios liberados e seus mecanismos moleculares de hiperalgesia, é de fundamental importância no desenvolvimento das drogas analgésicas modernas de maior seletividade e de menor toxicidade. Um dos possíveis sítios de ação de drogas analgésicas no mecanismo fisiopatológico da dor seria imediatamente após a instalação do processo inflamatório com a conseqüente migração de células e liberação dos primeiros mediadores inflamatórios representados pelas citocinas, prostaglandinas, cininas e neurocininas, responsáveis pela sensibilização dos nociceptores dos aferentes primários da dor (MILLAN, 1999). Nesta primeira etapa poderíamos atuar bloqueando inicialmente a formação de moléculas de adesão e de quimocinas interferindo na migração transendotelial das células inflamatórias e conseqüentemente inibindo a cascata de formação dos mediadores no sítio inflamatório. Dois grupos de mediadores inflamatórios são igualmente importantes na transmissão nociceptiva: aqueles que promovem uma sensibilização dos nociceptores (hiperalgesia), e outro grupo que ativa os nociceptores sensibilizados. As citocinas e as prostaglandinas seriam os principais representantes do primeiro grupo e as cininas (bradicinina) e os neuropeptídeos (SP, NKA e CGRP) do segundo. As drogas analgésicas com mecanismo de ação predominante sobre os mediadores inflamatórios estariam atuando em duas etapas fundamentais do ciclo destes neurotransmissores: inibindo a produção e/ou liberação do mediador ou bloqueando os receptores ativados por eles. Em

ambas as situações estariam prevenindo a hiperalgesia ou bloqueando a ativação do nociceptor previamente sensibilizado (MILLAN, 1999; CALIXTO et al., 2000a,b). Com esta finalidade tem sido investigados a ação antinociceptiva de antagonistas das prostaglandinas, dos receptores B<sub>2</sub> da bradicinina, da interleucina-1 $\beta$  e das neurocininas, incluindo a substância P (LEVINE & TAIWO, 1994; DRAY & PERKINS, 1993; FERREIRA et al., 1988; GANET et al., 1991; MILLAN, 1999; CALIXTO et al., 2000a,b). Uma outra possibilidade é o desenvolvimento de fármacos com ação inibitória sobre enzimas específicas envolvidas na síntese dos mediadores inflamatórios, como as fosfolipases, lipooxigenase, ciclooxigenase-2 (COX-2) e calicreinas (LEVINE & TAIWO, 1994; MILLAN, 1999). Finalmente, a produção de uma regulação decrescente através da inibição do sistema efetor de formação do AMPc, ou da inibição da ativação das proteínas quinases intracelulares, ou ainda através da ativação do sistema arginina-óxido nítrico-GMPc, constituem importantes alvos de ação de drogas analgésicas e antiinflamatórias. Neste particular, as drogas opióides, conhecidas pelo mecanismo de ativação de uma proteína G inibitória (G<sub>i</sub>), que causa uma redução na produção intracelular de AMPc, produzem ação antinociceptiva em tecidos inflamados e inibem a hiperalgesia periférica (STEIN et al., 1989; GRUBB, 1998; FÜRST, 1999; MILLAN, 1999).

#### 1.5.1- Drogas que bloqueiam a ação das citocinas

Diversos tipos de leucócitos e moléculas de adesão celular exercem papel fundamental no processo inflamatório e na dor. O recrutamento destas células fagocitárias para o sítio lesionado promove a liberação local de importantes substâncias pró-inflamatórias notadamente as citocinas, com propriedades tróficas, mitogênicas e quimiotáticas (MILLAN, 1999). Destas citocinas as mais importantes são as interleucinas (IL-1, IL-2, IL-6 e IL-8) e o fator de necrose tumoral (TNF). A IL-1 e o TNF são liberados por células mononucleares macrófagos do processo inflamatório e produzem muitas das respostas pró-inflamatórias, incluindo indução de febre, mobilização ativação de leucócitos polimorfonucleares, indução das enzimas ciclooxigenase e lipooxigenase, elevação na expressão de moléculas de adesão, ativação de linfócitos T e B estimulação da produção de outras citocinas. A IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ , são

capazes de induzir intensa hiperalgesia. A hiperalgesia produzida é mediada indiretamente através de diversos mecanismos, incluindo liberação de prostaglandinas, elevação na expressão do NGF ou de receptores da bradicinina, ou ainda por afetar as fibras simpáticas (DRAY, 1997; MILLAN, 1999; CALIXTO et al., 2000a,b).

A cascata das citocinas é iniciada quando um determinado estímulo, como por exemplo endotoxina de bactérias gram-negativas, induz a produção e secreção de citocinas proximais ou precoces, representadas pelo TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Estas citocinas estimulam a produção de citocinas mais tardias ou distais, como a IL-6 e IL-8, que parece intensificar e perpetuar a resposta inflamatória. Os fatores de necrose tumoral ( $\alpha$  e  $\beta$ ) exercem um papel central na estimulação do processo inflamatório e doloroso, iniciando a cascata de produção de outras citocinas e fatores da reação imune. Sua larga variedade de efeitos é atribuída a ubiquidade dos seus receptores, em sua habilidade de ativar múltiplas vias de transdução de sinal e de induzir ou suprimir uma série de genes, incluindo os relacionados com a produção de fatores de crescimento, de citocinas, de fatores de transcrição e de receptores e proteínas da fase aguda. Desta forma, em determinados processos inflamatórios crônicos, como na artrite reumatóide, pode ser encontrada a presença de citocinas como a IL-1 e o TNF (GALLEY & WEBSTER, 1996; DRAY, 1997; MILLAN, 1999).

As citocinas não são estocadas em compartimentos intracelulares mas são rapidamente sintetizadas e liberadas em resposta ao estímulo inflamatório. Esta regulação ocorre predominantemente ao nível da transcrição gênica com expressão do RNA mensageiro (RNAm) da citocina (MILLAN, 1999). Proteínas específicas de regulação de transcrição (fatores de transcrição) regulam a transcrição do gene pela ligação à regiões regulatórias de genes da citocina, ativando ou inibindo a transcrição. Cada citocina possui uma variedade de domínios de ligação do fator de transcrição na região promotora de seu gene que interage de forma complexa para controlar a transcrição do gene da citocina. Os genes induzidos nas células imunes são classificados em imediatos, precoces e tardios, de acordo com o período transcorrido para sua ativação. A transcrição de genes imediatos não depende da síntese protéica, em oposição aos genes precoces e tardios que dependem da síntese protéica. Os genes *c-fos*, *c-jun* e *c-myc* são incluídos na categoria dos genes imediatos. O fator de transcrição

denominado de fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), parece exercer importante papel na regulação da cascata das citocinas (MILLAN, 1999; CALIXTO et al., 2000b).

O NF- $\kappa$ B é ativado em diferentes tipos de células por diversos estímulos, como endotoxinas, TNF- $\alpha$ , ROS e IL-1 $\beta$ . A ativação do NF- $\kappa$ B é essencial para a transcrição de muitas citocinas e moléculas relacionadas, incluindo o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 (BLACKWELL & CRHISTMAN, 1996). O mecanismo de ação da IL-1 envolve a ativação da adenilato ciclase provocando elevação do AMPc celular, e a conseqüente ativação da proteína quinase A e fosforilação de proteínas intracelulares (RANG & URBAN, 1995; MILLAN, 1999). Os macrófagos também liberam o fator de crescimento do nervo (NGF).

O NGF constitui um membro de uma pequena família de proteínas secretórias, conhecidas como neurofinas. Os outros membros desta família são representados pelo fator neurotóxico derivado do cérebro (BDNF), neurofina 3 (NT-3) e neurofina 4/5 (NT-4/5) (RANG & URBAN, 1995; MILLAN, 1996). As neurotrofinas, especialmente o NGF, são normalmente produzidas pelas fibras aferentes de tecidos periféricos e por células de suporte, incluindo fibroblastos, células de Schwann e queratinócitos. O NGF é essencial para a sobrevivência e desenvolvimento de neurônios sensoriais e pela manutenção de seu fenótipo, agindo através de um receptor tirosina quinase específico (trkA) na regulação de processos de transcrição de gene específico. Durante o processo inflamatório a produção de NGF é estimulada por outros mediadores inflamatórios como citocinas (IL- $\beta$  e TNF- $\alpha$ ). O NGF aumenta a síntese de diversos neuropeptídeos, incluindo neurocininas e CGRP e regula diversas outras proteínas como o receptor da capsaicina, canais de sódio da membrana e canais iônicos ativados por próton (MILLAN, 1999).

O excesso de produção de NGF, como nos processos inflamatórios, pode produzir hiperalgesia envolvendo um ou mais dos seguintes mecanismos: (a) por sensibilização direta dos nociceptores; (b) por elevação dos níveis de substância P e CGRP, que por seu turno causam sensibilização central e inflamação neurogênica; c) por efeitos locais, como na liberação de histamina dos mastócitos. O uso de anticorpos anti-NGF reduz a hiperalgesia e as alterações neuroquímicas induzidas pelo NGF e inflamação e tem sido usado com sucesso no tratamento da artrite (DRAY, 1995; ANAND, 1995; MCMAHON et al., 1995; MILLAN, 1999).

Os compostos conhecidos como drogas anti-inflamatórias supressoras de citocinas estão sendo desenvolvidas no momento e acredita-se que as drogas inibidoras da produção das citocinas possam ser eficazes como analgésicos no controle da dor aguda e crônica (FERREIRA et al., 1988; MILLAN, 1999). Atribui-se a ação analgésica e antiinflamatória dos glicocorticóides à ação inibitória da atividade da fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), enzima responsável pela liberação de ácido araquidônico e conseqüentemente da ativação da produção de prostaglandinas, tromboxano e leucotrienos. Os esteróides antiinflamatórios inibem a PLA<sub>2</sub> indiretamente através da indução da liberação de uma proteína inibitória da PLA<sub>2</sub> identificada como lipocortina 1 (também conhecida como anexina 1). Um outro mecanismo de ação dos corticosteróides é através da ativação de receptores citoplasmáticos para glicocorticóides que regulam a transcrição de alguns genes de resposta primária, incluindo os que expressam uma ciclooxigenase induzível (COX-2) e o óxido nítrico sintase. O complexo esteróide-receptor também é capaz de promover inibição da transcrição de um grande número de citocinas envolvidas na inflamação crônica, destacando-se principalmente a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ). Além disso, os corticosteróides podem ainda promover uma repressão da síntese dos receptores das citocinas, como por exemplo dos receptores da IL-2. A ação inibitória da liberação de citocinas hiperalgésicas pelos macrófagos e outras células explica a eficácia dos corticosteróides no tratamento da distrofia simpático reflexa e na dor produzida pelo herpes zoster, seja pela administração local, oral ou peridural, indicada em cada situação clínica, com excelentes resultados na maioria dos casos (FERREIRA, 1995; BARNES & ADCOCK, 1993; FLOWER & ROTHWELL, 1994; VANE & BOTTING, 1995; ADAMS & NASH, 1996; MILLAN, 1999).

#### 1.5.2- Drogas Inibidoras da síntese de prostaglandinas

A cascata de metabolismo do ácido araquidônico que origina as prostaglandinas começa com a oxidação e ciclização do ácido graxo para formar o endoperóxidos cíclicos PGG<sub>2</sub> e PGH, precursores de importantes produtos metabólicos como a prostaciclina, tromboxano e prostaglandinas E (PGE<sub>2</sub>) e F (PGF<sub>2</sub>). Esta etapa inicial é catalisada pela prostaglandina endoperóxido

sintetase, também denominada de ciclooxigenase (VANE & BOTTING, 1995, 1996).

Mais recentemente constatou-se que existem duas formas distintas de ciclooxigenases, isoenzimas ou isoformas, denominadas de ciclooxigenase-1 (COX-1) e ciclooxigenase-2 (COX-2). A COX-1 foi a primeira a ser caracterizada e é expressa constitutivamente, ou seja, está presente nas células em condições fisiológicas. A concentração destas enzimas nos tecidos permanece praticamente estável, porém pequena elevação de 2-4 vezes na expressão da enzima pode ocorrer em respostas a estimulação hormonal ou de fatores de crescimento. A produção da COX-1 encontra-se relacionada com ações fisiológicas nos vasos sanguíneos, estômago e rins. A COX-2 é induzida em células expostas a agentes pró-inflamatórios, incluindo citocinas, ésteres do forbol, fatores de crescimento e endotoxinas (VANE & BOTTING, 1995, 1996; MILLAN, 1999). Tem sido demonstrado que as prostaglandinas (PG) são produzidas em neurônios e vasos do SNC com importante participação em diversas funções centrais, incluindo o controle do ciclo do sono e do despertar, da geração de febre e na transmissão da dor. As prostaglandinas e citocinas (interleucina-6) encontram-se também implicadas na fisiopatologia de algumas doenças degenerativas cerebrais como na esclerose múltipla, demência associada a AIDS e na doença de Alzheimer. Em virtude da ação inibitória sobre a COX-2 os AINE têm sido atualmente recomendados para o tratamento de algumas destas doenças, como na doença de Alzheimer. Sabe-se que lipopolissacarídeos (LPS) e citocinas podem promover a indução de COX-2 em várias regiões cerebrais e que a COX-1 é constitutivamente expressa em diversos neurônios (BREDEK & SAPER, 1996; KAUFMANN et al., 1996; MILLAN, 1999). Embora tenha sido aventada a existência de uma outra isoforma de ciclooxigenase em células cerebrais, a ciclooxigenase-3 (COX-3), com a finalidade de explicar o mecanismo de ação do paracetamol, ainda necessita-se de mais informações experimentais para melhor esclarecimento e confirmação, uma vez que as publicações mais recentes não tem evidenciado tal possibilidade (VANE, 1994). As prostaglandinas apresentam importantes ações farmacológicas no organismo animal e no homem. Em diversos tecidos as prostaglandinas estimulam a síntese de AMPc pela ativação da adenilato ciclase. A PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> e PGD<sub>2</sub> aumentam a concentração de AMPc,

enquanto  $TxA_2$  reduz a atividade da adenilato ciclase, reduzindo a formação de AMPc (MILLAN, 1999).

As prostaglandinas e os leucotrienos quando liberados exercem também papel fundamental na gênese dos sinais e sintomas do processo inflamatório. Em diferentes tipos de inflamação, alguns mediadores possuem ação mais proeminentes que outros. A seqüência de liberação do mediador pode também ser importante. Por exemplo, no choque anafilático há uma explosiva e simultânea liberação de histamina, SRS-A,  $PGE_2$ ,  $PGF_{2\alpha}$ , e endoperóxidos. Estes mediadores, uma vez liberados, podem interferir em diversos mecanismos celulares, desenvolvendo os sinais e sintomas da inflamação, como dor, hiperalgesia, destruição do tecido, eritema, edema e febre (VANE, 1994; VANE & BOTTING, 1995, 1996; MILLAN, 1999).

A sensibilização dos nociceptores, presentes nos terminais de neurônios de aferentes primários e distribuídos nos tecidos periféricos e viscerais, por estímulos mecânicos, é reconhecida desde a descrição de Lewis, em 1931 (para revisão ver CARVALHO & LEMÔNICA, 1998). A sensibilização por estimulação química tem sido descrita por diversos pesquisadores para a histamina, acetilcolina, bradicinina, serotonina (5-HT) e prostaglandinas (VANE & BOTTING, 1995, 1996; MILLAN, 1999).

FERREIRA & VANE (1979) constataram que a administração intradérmica de prostaglandinas em altas doses produzia dor. No entanto, a infusão subdérmica de baixas concentrações, semelhantes aos níveis encontrados em exsudatos inflamatórios, não desenvolvia dor, mas somente hiperalgesia, ou seja, havia uma redução do limiar da sensibilidade dolorosa. Observou ainda que infusões separadas de  $PGE_2$ , histamina, bradicinina, ou uma mistura de bradicinina e histamina, não provocavam dor. Entretanto, quando  $PGE_1$  foi adicionada à bradicinina ou histamina, ou a uma mistura de ambas, uma forte dor era desenvolvida. Concluiu-se então que os mediadores inflamatórios, como bradicinina, tinham uma ação direta produtora de dor somente quando os nociceptores encontravam-se sensibilizados pelas prostaglandinas. MONCADA et al. (1978) e FERREIRA & VANE (1979), baseando-se em diversos resultados experimentais, demonstraram que a atividade analgésica dos antiinflamatórios não-esteroides, notadamente da aspirina e indometacina, deve-se ao bloqueio da

síntese de prostaglandinas por inibição da ciclooxigenase e que não afetam a hiperalgesia ou a dor causada pela ação direta das prostaglandinas.

A aspirina e os demais derivados dos AINEs não inibem a lipooxigenase, e assim, não suprimem a formação dos leucotrienos. Acredita-se que os compostos com ação inibitória simultânea sobre a ciclooxigenase e lipooxigenase tenham melhor atividade antiinflamatória. Os resultados experimentais sugerem que os efeitos colaterais dos AINEs parecem estar correlacionados com a capacidade dessas drogas de inibir a COX-1, enquanto os efeitos terapêuticos (analgésicos e antiinflamatórios) estariam relacionados com a inibição da COX-2. A inibição da atividade da COX-2 pode ser alcançada em diversos níveis da cascata de eventos que conduzem à indução da atividade da enzima. Uma vez sintetizada a COX-2, os inibidores seletivos da enzima poderiam inibir a produção de pró-inflamatórios, como as prostaglandinas, sem afetar, por exemplo, a produção de prostaciclina pelo endotélio através da ativação da COX-1. Desta forma, uma série de AINEs tem sido testados quanto à capacidade relativa de inibição da COX-1 e COX-2 e a relação entre a atividade para ambas as enzimas tem sido também determinada (VANE & BOTTING, 1995, 1996; MILLAN, 1999). Como o ideal destas drogas é que apresentem uma boa atividade antiinflamatória com baixa incidência de efeitos ulcerogênicos sobre a mucosa gástrica, grande esforço tem sido realizado pelas indústrias farmacêuticas no sentido de se conseguir a síntese de compostos cada vez mais seletivos sobre a atividade da COX-2 (APPLETON, 1997; ENGELHART et al., 1995; MASFERRER et al., 1994; MILLAN, 1999; VANE & BOTTING, 1995). Espera-se que estas novas descobertas venham realmente representar um avanço no tratamento dos pacientes artríticos e de outros processos inflamatórios crônicos, havendo ainda a necessidade de ensaios mais controlados nos quais se evidencie a ação analgésica destes compostos. Embora, sejam apresentados com grande entusiasmo pelas indústrias farmacêuticas, os ensaios clínicos e o uso clínico de rotina é que poderão confirmar a superioridade e eficácia destes novos inibidores da COX-2.

### 1.5.3- Drogas antagonistas dos receptores para as cininas

A bradicinina (BK) e a calidina representam as cininas produzidas a partir de precursores cininogênio de baixo peso molecular, seguido da ativação de calicreinas plasmáticas e teciduais, por diversos estímulos, que incluem principalmente trauma tecidual, inflamação, anóxia e baixo pH (ROCHA E SILVA, 1978; REGOLI & BARABE, 1981; CALIXTO et al., 2000b). No sangue a bradicinina é formada como parte da cascata da coagulação por um processo enzimático a partir do precursor cininogênio (ROCHA E SILVA, 1978; CALIXTO et al., 2000b). As cininas exercem grande número de efeitos pró-inflamatórios, incluindo a liberação de prostaglandinas, citocinas (interleucina-1 e TNF- $\alpha$ ) e radicais livres de uma grande variedade de células. Também estimulam e sensibilizam os neurônios sensoriais e simpáticos pós-ganglionares influenciando no calibre dos vasos, degranula mastócitos liberando histamina e outros mediadores inflamatórios, são potentes agentes algogênicos e induzem dor pela estimulação direta dos nociceptores sensibilizados pelas prostaglandinas e citocinas. A hiperalgesia produzida pela bradicinina é mediada pelo TNF- $\alpha$  que estimula a liberação das citocinas IL-1 e IL-8. A ativação de fibras sensoriais pela bradicinina causa também a liberação de neuropeptídeos como a substância P, neurocinina A e o CGRP. Estes peptídeos podem mediar grande número de efeitos pró-inflamatórios locais e contribuem para sensibilização do nociceptor e hiperalgesia (DRAY & PERKINS, 1993; CALIXTO et al., 2000b). Os efeitos das cininas são mediados através dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> (CALIXTO et al., 2000b). A bradicinina e a calidina são agonistas endógenos dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>. Os receptores B<sub>1</sub> produzem a manutenção da hiperalgesia e sua expressão é aumentada rapidamente durante os processos inflamatórios ou infecciosos. Os receptores B<sub>2</sub> estão presentes em neurônios sensoriais onde estão acoplados com uma proteína G que induz ativação de fosfolipase C e fosfolipase A<sub>2</sub>. A ativação da fosfolipase C forma dois segundo mensageiros, o 1,4,5-trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>) e o diacilglicerol (DAG). O IP<sub>3</sub> estimula a liberação de cálcio dos estoques intracelulares, enquanto o DAG ativa a proteína quinase C (PKC) para fosforilar proteínas celulares, incluindo receptores de membrana e canais iônicos (MILLAN, 1999). A PKC tem grande importância na excitabilidade de fibras aferentes pela bradicinina que está associada com uma elevação da

permeabilidade iônica da membrana, principalmente aos íons sódio. A estimulação de fosfolipase A<sub>2</sub> libera ácido araquidônico a partir de fosfolipase da membrana celular. A liberação do ácido araquidônico promove a formação de endoperóxidos, prostaglandinas e leucotrienos, extremamente importantes na fisiopatologia do processo inflamatório e da hiperalgisia (DRAY, 1995; DRAY & PERKINS, 1993; MILLAN, 1999; CALIXTO et al., 2000b). A maioria das ações da bradicinina, incluindo a ativação aguda de nociceptores e a produção de dor, são mediados através do receptor B<sub>2</sub>. A atividade da bradicinina depende de sua rápida degradação por enzimas proteolíticas e pela rápida dessensibilização (*down regulation*) dos receptores da BK. A quinase dependente de GMPc, que fosforila o receptor BK, representa importante fator na dessensibilização. Neste caso, a dessensibilização da resposta do neurônio sensorial à bradicinina resulta da produção de óxido nítrico, que por sua vez, ativa a guanilato ciclase elevando os níveis celulares de GMPc. Além disso, a dessensibilização pode envolver glicoproteínas da membrana e *down regulation* de receptores seguida da agregação e internalização da proteína receptora (DRAY & PERKINS, 1993).

Em virtude das importantes funções da bradicinina na patogênese da dor inflamatória, tem sido recentemente desenvolvidos e testados os antagonistas do receptor B<sub>2</sub> da bradicinina, apresentando promissores resultados como agentes analgésicos e antiinflamatórios em modelos animais. Entre estes destacam-se principalmente o NPC16731, NPC567, HOE140, CPO127 e WIN64338. Porém, como a ativação de receptores B<sub>2</sub> esta envolvida em processos fisiológicos (como a manutenção da pressão arterial) a intervenção em receptor B<sub>1</sub> (expresso em situações patológicas) poderia ser mais específica e segura. Desta forma, antagonistas do receptor B<sub>1</sub> (des-Arg<sup>9</sup>[Leu<sup>8</sup>]BK) tem sido também desenvolvidos e são dotados de efeito analgésico em modelos de hiperalgisia crônica (DRAY & PERKINS, 1993; RANG & URBAN, 1995; MILLAN, 1999; CALIXTO et al., 2000b).

#### 1.5.4- Drogas antagonistas dos receptores H<sub>1</sub> da histamina

A histamina é um dos mediadores mais precocemente liberados durante o processo inflamatório. Encontra-se estocada principalmente nos mastócitos e basófilos e sua concentração é particularmente elevada nos tecidos ricos em mastócitos, como a pele, mucosa brônquica e mucosa intestinal (LEVINE &

TAIWO, 1994; RANG et al., 1994). No processo inflamatório a histamina é liberada pela degranulação dos mastócitos promovida por diversos estímulos, incluindo a substância P, interleucina-1 (IL-1) e NGF. Além disso a ativação do sistema do complemento e de reações antígeno-anticorpo pelo processo inflamatório também promovem liberação de histamina. Uma vez liberada a histamina pode agir em receptores  $H_1$  e  $H_2$ , produzindo vasodilatação em arteríolas, metarteríolas e vênulas e aumento da permeabilidade vascular, com conseqüente extravasamento de líquido e proteínas para os tecidos perivasculares e formação de edema, componentes essenciais na formação e cronificação do processo inflamatório. A administração intradérmica de histamina provoca uma resposta típica de uma reação inflamatória aguda, conhecida como reação tríplice de Lewis que consiste de (1) um eritema local em torno do ponto de aplicação, resultante da vasodilatação que surge dentro de poucos segundos; (2) de um eritema secundário mais intenso em torno do anteriormente formado, que se instala mais lentamente, promovido pela estimulação de reflexos axônicos e vasodilatação indireta e (3) edema, provocado pelo aumento da permeabilidade da vasculatura local. Alguns neurônios sensoriais expressam receptores  $H_1$  e a ativação destes receptores aumenta a permeabilidade ao cálcio no gânglio trigeminal e em neurônios de gânglios da raiz dorsal e liberam taquicinas, prostaglandinas e CGRP (RANG et al., 1994; MILLAN, 1999). Outras ações não relacionadas ao processo inflamatório incluem a contração de fibra lisa pela histamina, notadamente da musculatura lisa brônquica, prurido e produção de secreção ácida gástrica (DRAY et al., 1994). Os anti-histamínicos  $H_1$  são antagonistas eficazes da ativação de uma classe especial de nociceptores associados ao prurido e os antagonistas dos receptores  $H_2$ , através do bloqueio da produção ácida, eliminam a estimulação química dos nociceptores associados à dor desenvolvida na úlcera gástrica e na pirose (FERREIRA, 1993, 1995; MILLAN, 1999).

#### 1.5.5- Drogas moduladoras do óxido nítrico

Tem sido postulado que algumas drogas analgésicas podem promover uma modulação da ativação dos nociceptores através da estimulação da via da arginina-óxido nítrico-GMP cíclico (FERREIRA, 1993; MONCADA et al., 1991;

MILLAN, 1999; CALIXTO et al., 2000a,b). A síntese do óxido nítrico (NO) ocorre a partir do aminoácido L-arginina que sob a ação da óxido nítrico sintase (NOS) transforma-se em NO e L-citrulina, via metabólica denominada de via L arginina-óxido nítrico. São descritas 3 isoformas da NOS (NATHAN & XIE, 1994), das quais 2 são constitutivas (NOc) e estão localizadas no tecido neural (óxido nítrico sintase neuronal: NOSn ou NOS I), e a outra, nas células endoteliais (óxido nítrico sintase endotelial: NOSe ou NOS III) (FÖRSTEMANN et al., 1993; AUBRY et al., 1997). Já, a óxido nítrico sintase induzida (NOSi ou NOS II) não é, em geral, expressa em condições fisiológicas. Diversos agentes, como citocinas inflamatórias, oxidantes e endotoxinas de bactérias Gram-negativas, induzem a sua expressão em diferentes tipos celulares (MORRIS & BILLIAR, 1994; EISERICH et al., 1998; SALVEMINI et al., 1989; GUO et al., 1995).

O NO uma vez formado ativa a guanilato ciclase promovendo a elevação dos níveis de GMPc que atua como segundo mensageiro na ativação de uma proteína quinase que fosforila proteínas intracelulares e regula a abertura de canais iônicos. Assim influencia diretamente diversas respostas fisiológicas, tais como vasodilatação, secreção intestinal, ação antiagregante, fosfotransdução retiniana, envolvimento na patogênese do choque, da cirrose, inflamação e no fenômeno de regulação dos nociceptores (FERREIRA, 1993; MONCADA et al., 1991; MILLAN, 1999). O GMPc formado é metabolizado pela fosfodiesterase interrompendo o ciclo (MONCADA et al., 1991; MONCADA & HIGGS, 1993).

O NO é importante para comunicação intercelular em tecidos periféricos e no SNC, incluindo as vias nociceptivas. Acredita-se que a dilatação seletiva dos vasos sanguíneos cerebrais pelo NO possa estar envolvida na fisiopatologia da enxaqueca. Diversos estudos tem evidenciado alguma participação do NO durante a transmissão nociceptiva prolongada, notadamente medular, sugerindo importante papel do NO na dor crônica e neuropática (DRAY et al., 1994; DICKENSON, 1995). No SNC, a liberação de NO encontra-se relacionada com a plasticidade sináptica, potenciação a longa prazo no hipocampo e depressão a longo prazo no cerebelo, fenômenos ligados ao mecanismo de memória e processo de aprendizagem. Evidências experimentais mais recentes sugerem que estas ações centrais do NO são mediadas pela estimulação glutamatérgica envolvendo os receptores NMDA. Esta ação requer um co-fator para a atividade da NOS que foi definida como sendo a calmodulina. O passo inicial envolve a

estimulação dos receptores NMDA pelo glutamato ou outro agonista glutamatérgico promovendo a abertura dos canais de cálcio, com consequente ligação do  $\text{Ca}^{+2}$  à calmodulina, que então ativará a NO sintase e liberação de NO, que por seu turno promoverá uma elevação nos níveis de GMPc intracelular (OZAWA et al., 1998; FERREIRA et al., 1999; FÜRST, 1999; MILLAN, 1999).

Mais recentemente XU et al. (1996) demonstraram que a acetilcolina promove a síntese de óxido nítrico na medula espinhal. Portanto, as vias ligadas ao receptor NMDA e ao receptor colinérgico muscarínico ativam a óxido nítrico sintase aumentando a produção de GMPc (DRAY et al., 1994; DICKENSON, 1995; ELLIOTI et al., 1994).

Porém, existe na literatura uma certa contradição sobre o verdadeiro papel do óxido nítrico na nocicepção. Em estudos experimentais MELLER & GEBHART (1993) constataram que a hiperalgesia térmica requer a ativação de receptores NMDA na medula e é mediada pela produção de óxido nítrico, enquanto a hiperalgesia mecânica requer a co-ativação dos receptores AMPA e metabotrópico e é mediada por produtos da ciclooxigenase. Observaram ainda que a administração intratecal de L-NAME, um inibidor da NOS, ou a inibição da guanilato ciclase pelo azul de metileno atenuam a hiperalgesia térmica mediada pelos receptores NMDA. Por outro lado, FERREIRA (1993, 1995) constatou que os agentes capazes de promover hiperalgesia o fazem através da elevação dos níveis intracelulares de AMPc/cálcio, resultando na ativação de uma proteína quinase intracelular com fosforilação de proteínas e ativação de sistemas efetores ligados à proteína G ou de canais iônicos, enquanto que a estimulação do sistema L-arginina/NO/GMPc, por outro lado, promove a regulação decrescente dos nociceptores e analgesia. Espera-se que em futuro bastante breve possa ser melhor esclarecido o verdadeiro papel do NO na nocicepção, notadamente com a aplicação dos diversos agentes com ação em diferentes sítios de seu ciclo.

#### 1.5.6- Drogas antagonistas dos receptores glutamatérgicos

A estimulação repetida de fibras aferentes C que resulta na liberação central de substância P (SP), neurocinina A, glutamato e aspartato. Uma vez liberado, o glutamato pode agir nos receptores AMPA, NMDA e metabotrópico (OZAWA et al., 1998; MILLAN, 1999). Evidências experimentais sugerem o

envolvimento do receptor NMDA na sensibilização central e na hiperalgesia secundária (WOOLF, 1994; DRAY et al., 1994; DICKENSON, 1995, 1997; MILLAN, 1999). Os antagonistas dos receptores NMDA, como o AP5 e dizocilpina (MK801), previnem o fenômeno de facilitação central na medula espinhal e acredita-se que possam ter um importante papel na hiperalgesia inflamatória. Quando administrados pela via intratecal apresentam atividade analgésica em vários modelos animais (MILLAN, 1999).

Acredita-se que os novos antagonistas do receptor NMDA possam ter várias indicações clínicas, incluindo dano cerebral isquêmico, trauma cranioencefálico, epilepsia e analgesia. O seu uso como analgésico é ainda limitado devido aos efeitos colaterais dos produtos disponíveis, particularmente efeitos psicotomiméticos e alterações motoras. A cetamina, conhecida por seus efeitos dissociativos, de forma similar a dizocilpina, bloqueia os canais iônicos associados com o receptor NMDA e é bastante eficiente como analgésico. Em princípio, parece que os antagonistas do receptor NMDA podem se constituir no futuro em novos agentes com bom potencial analgésico (EISEMBERG et al., 1993; MILLAN, 1999; RANG & URBAN, 1995).

Embora o fenômeno de facilitação central e de plasticidade sináptica não estejam completamente compreendidas, alguns eventos celulares associados com a ativação do receptor NMDA parecem de grande importância na fisiopatologia da dor crônica (MILLAN, 1999). Além disso, a estimulação de aferentes primários promovem a liberação de aspartato, glutamato e SP dentro do corno dorsal. A ativação no corno dorsal dos receptores da neurocinina-1 ( $NK_1$ ) pela substância P, liberada pela estimulação de aferentes primários, produz uma lenta e prolongada despolarização e eleva o influxo de  $Ca^{+2}$  extracelular através dos canais de cálcio voltagem-dependentes. Por outro lado, a ação do aspartato e glutamato nos receptores NMDA e metabotrópico poderia produzir influxo de cálcio através dos canais de cálcio. O aumento do  $Ca^{+2}$  intracelular ativa uma cascata de eventos neuronais que inclui a estimulação de fosfolipases e a conseqüente produção de diacilglicerol (DAG), eicosanoides, 1,4,5-trifosfato de inositol ( $IP_3$ ), ativação de proteína quinase C (PKC) e da óxido nítrico sintase (NOS). A PKC ativada fosforila o receptor NMDA e induz alterações persistentes na membrana celular afetando a permeabilidade da membrana por prolongados períodos (MILLAN, 1999). A elevação do  $Ca^{+2}$  intracelular produzido pelo influxo

de cálcio através dos canais de cálcio voltagem-dependentes, operados pelo receptor NMDA ou pela liberação de  $\text{Ca}^{+2}$  dos estoques intracelulares, resulta em indução da expressão de genes, como *c-fos* e *c-jun*. Estes agem como terceiro mensageiros, influenciando diretamente no controle transcricional de genes que codificam uma grande variedade de neuropeptídeos, incluindo as encefalinas, dinorfina e taquicininas na medula espinhal, influenciando, desta forma, na memória da resposta nociceptiva e de outras funções celulares. Além disso, a ativação do receptor NMDA resulta no aumento da produção de óxido nítrico, pela ativação da NOS, que se difunde, ativando a guanilato ciclase e produzindo GMPc (CODERRE et al., 1993; MELLER & GEBHART, 1993; MILLAN, 1999).

Estudos recentes sugerem a importância de outros mecanismos centrais na ação analgésica dos anti-inflamatórios não-esteróides (AINEs) em adição a seu efeito inibitório central e periférico sobre a ciclooxigenase. Dentre estes podemos destacar alguns de maior importância, como por exemplo, todos os AINE, com exceção do ibuprofeno, revertem a hiperalgesia térmica mediada pela ativação dos receptores NMDA, AMPA e  $\text{NK}_1$ . A indometacina e o ácido acetilsalicílico podem abolir a indução de genes imediatamente induzidos, *c-fos* e *c-jun*, via ativação do receptor NMDA na medula espinhal (MCCORMACK, 1994; MILLAN, 1999).

#### 1.5.7- Drogas antagonistas das taquicininas

As taquicininas representam uma família de neuropeptídeos que inclui a substância P (SP), neurocinina A (NKA) e neurocinina B (NKB), que atuam predominantemente nos receptores denominados de  $\text{NK}_1$ ,  $\text{NK}_2$  e  $\text{NK}_3$ . Os receptores das taquicininas estão acoplados à proteína G e podem ativar a fosfolipase C (BIRCH, 1997; MILLAN, 1999).

A substância P é liberada, juntamente com a NKA, na medula espinhal após estimulação nociva. A substância P produz uma despolarização de longa duração nos neurônios do corno dorsal, contribuindo para a transmissão facilitada conseqüente a estimulação continuada de neurônios nociceptivos periféricos. Além do fenômeno de facilitação central a substância P tem várias outras funções centrais e periféricas, contribuindo para a inflamação, ativação de células imunes,

atividade de células musculares lisas e secretórias em diferentes órgãos e a enxaqueca no SNC (BIRCH, 1997; MILLAN, 1999).

O CGRP é liberado por fibras nociceptivas no corno dorsal produzindo uma resposta despolarizante lenta nos neurônios do corno dorsal, potencializando o efeito despolarizante da substância P. Os antagonistas do receptor  $NK_1$  inibem o extravasamento plasmático nos vasos da duramáter induzido por estimulação de neurônios sensoriais e acredita-se que possam ser úteis no tratamento da cefaléias vasculares. Na dor aguda parece que a NKA, agindo nos receptores  $NK_2$ , tenha um papel mais relevante que a substância P que age preferencialmente nos receptores  $NK_1$ . Nos modelos de dor patológica, particularmente aqueles envolvendo hiperalgesia inflamatória, os receptores  $NK_1$  tornam-se extremamente importantes. Os receptores  $NK_1$  sofrem regulação crescente durante condições hiperalgésicas e a liberação de taquicinas pelos aferentes primários, notadamente de substância P, também aumentam. Antagonistas específicos dos receptores  $NK_1$  e  $NK_2$  foram recentemente desenvolvidos e testados em modelos experimentais de dor e inflamação, visando uma futura aplicação terapêutica destes compostos (BIRCH, 1997; RANG & URBAN, 1995; MILLAN, 1999).

#### 1.5.8- Drogas moduladoras de canais iônicos

Como ocorre em outras células excitáveis os neurônios sensoriais expressam uma diversidade de canais iônicos. Os canais iônicos encontrados na membrana celular são de dois tipos: os canais iônicos operados por receptores e os dependentes de voltagem (voltagem-dependentes). O canal iônico operado por receptores são complexos formados por um receptor e um canal iônico que constitui parte integrante da proteína com vários domínios transmembrana, incluindo os receptores colinérgicos nicotínicos, receptor gabaérgico, receptor NMDA, receptor da glicina, etc. Os canais iônicos voltagem sensíveis abrem ou fecham, dependendo da variação de voltagem do potencial da membrana e são representados pelos canais iônicos clássicos como os canais de sódio, potássio e cálcio. A sensibilidade desses canais à voltagem é devida à presença de regiões eletrocarregadas da proteína do canal (MILLAN, 1999). Algumas drogas analgésicas causam uma regulação decrescente ou dessensibilização destes

receptores alterando a permeabilidade iônica da membrana neuronal, reduzindo conseqüentemente a excitabilidade pós-sináptica. Os anestésicos locais bloqueiam a condução do impulso na membrana dos aferentes da dor através do bloqueio dos canais de sódio voltagem-dependentes. A efetividade terapêutica de anticonvulsivantes (carbamazepina e fenitoina), anestésicos locais (lidocaína e tocainida) e antiarrítmicos (mexiletina), no tratamento de determinados tipos de dor, particularmente da dor neuropática e da neuralgia do trigêmio, se deve provavelmente, ao bloqueio dos canais de sódio (RANG & URBAN, 1995; CATTERALL & MACKIE, 1996; MILLAN, 1999).

Os neurônios sensoriais nociceptivos sob condições normais expressam pelo menos dois tipos distintos de canais de sódio, um sensível a tetrodoxina que é rapidamente ativado e é encontrado em todos os neurônios sensoriais, e um outro resistente à tetrodoxina, lentamente ativado e encontrado somente em pequena classe de células de pequeno diâmetro e de condução lenta, que incluem os nociceptores polimodais (RANG & URBAN, 1995; MILLAN, 1999). Mais recentemente foram realizados alguns estudos tentando elucidar o papel dos canais de potássio na modulação da dor. Acredita-se que a hiperpolarização de membrana provocada pela abertura dos canais de potássio, com conseqüente inibição da excitabilidade neuronal possa ter alguma importância na analgesia (MILLAN, 1999). Entre os diversos tipos de canais de potássio conhecidos os que tem despertado maior interesse no estudo da fisiopatologia da dor são principalmente os canais de potássio dependentes de cálcio e o canal de potássio ATP-sensível. Do ponto de vista de hiperexcitabilidade neuronal, interessa principalmente, o canal de potássio cálcio-dependente, presente em elevada densidade em neurônios e células musculares lisas. A sensibilidade destes canais à voltagem e ao cálcio sugere que eles são ativados após o potencial de ação produzindo uma pós-polarização que limita a freqüência de disparo das células (RANG & URBAN, 1995; MILLAN, 1999). Os ativadores destes canais representam uma possibilidade promissora como novas drogas analgésicas (RANG & URBAN, 1995; MILLAN, 1999). As dehidrosaponinas extraídas da *Desmodium adscendens* e as benzimidazolonas substituídas (NS004 e NS1619) são potentes agentes que promovem a abertura dos canais de potássio cálcio-dependente, porém são pouco seletivos e bloqueiam simultaneamente outros canais da membrana (CARVALHO & LEMÔNICA, 1998). O cromacalim, pinacidil

e apicalim são compostos que ativam os canais de potássio ATP-sensíveis tipo I em vários tecidos e neurônios (RANG & URBAN, 1995; MILLAN, 1999).

Os canais de cálcio também possuem destacada importância no mecanismo da analgesia. Os canais de cálcio voltagem dependente da membrana neuronal, tipo T, N e L, contribuem para a excitabilidade de neurônios sensoriais, sendo que os canais tipo N são particularmente importantes no controle da liberação de neuromediadores de terminais de neurônios sensoriais periféricos e centrais. Os canais N e L podem ser bloqueados por um grande número de drogas (dihidropiridinas) e neurotransmissores (opióides, GABA, neuropeptídeo Y) impedindo a sinalização nociceptiva na medula espinhal e modificando a excitabilidade em terminais de neurônios periféricos que indiretamente alteram os efeitos neurogênicos produzidos por neuropeptídeos sensoriais (DRAY, 1995; MILLAN, 1999).

A capsaicina exerce suas atividades analgésicas e antiinflamatórias pela dessensibilização de neurônios nociceptivos, com ações seletivas sobre os neurônios sensoriais primários A $\delta$  e C (CALIXTO et al., 2000a; SZALLASI & BLUMBERG, 1999). Tem sido empregada localmente no tratamento de diversas síndromes dolorosas, incluindo a neuralgia pós-herpética, neuropatia diabética, neuraigia do trigêmio, osteoartrite, artrite reumatóide, distrofia simpático reflexa, dor pós-mastectomia e na fibromialgia (CALIXTO et al., 2000a; SZALLASI & BLUMBERG, 1999). A capsaicina induz uma dessensibilização dos nociceptores neuronais por elevação inicial na permeabilidade ao cálcio. Parece que a elevação da concentração intracelular do cálcio promove a dessensibilização pela estimulação de uma enzima citossólica cálcio e calmodolina-dependente (calcineurina). Inicialmente a capsaicina estimula a liberação de glutamato e neuropeptídeos (SP, NKA e CGRP) de neurônios periféricos e centrais, em conseqüência da elevação do influxo de cálcio na célula neuronal (SZALLASI & BLUMBERG, 1999). Embora a capsaicina inicialmente estimule a liberação destes neuropeptídeos (efeito algésico inicial), a aplicação repetida da droga promove, a longo prazo, um efeito inibitório que é o responsável pelas ações analgésicas e antiinflamatória (CALIXTO et al., 2000a; SZALLASI & BLUMBERG, 1999).

Nesse contexto, o desenvolvimento da biologia molecular tem contribuído para a descoberta de novos alvos terapêuticos e por conseqüência na descoberta

das drogas analgésicas mais modernas. Este avanço da farmacologia tem sido possível graças aos recentes conhecimentos dos mecanismos moleculares da fisiopatologia da dor, com a identificação de importantes alvos envolvidos na transmissão nociceptiva, principalmente receptores, enzimas, sistemas de transporte, canais iônicos e da modulação da liberação de neuromoduladores. Mais recentemente tem ocorrido substancial progresso no conhecimento dos eventos regulatórios ao nível da transcrição gênica, extremamente importantes na modulação da nocicepção, notadamente na dor crônica. É possível que os analgésicos do futuro possam ter alguma intervenção a este nível, no momento em que os mecanismos bioquímicos de controle da transcrição tornarem-se mais conhecidos. Tem sido também bastante desafiador para os pesquisadores o esclarecimento dos mecanismos de modulação, envolvendo as diversas interações entre os diferentes mediadores e como tais eventos influenciam na transcrição gênica. Certamente que o domínio desses conhecimentos poderá trazer importantes informações para o desenvolvimento dos analgésicos do futuro. Diante do exposto, as substâncias que apresentam efeito analgésico, de uma maneira geral, podem ser divididas em pelo menos três categorias: aquelas que atuam em sítios periféricos, prevenindo a ativação das terminações nociceptivas ou inibindo a transmissão do impulso aferente; as que alteram a transmissão dentro do sistema nervoso central; e as que alteram a percepção da dor em nível cortical (WEINSTEIN, 1998). Dessa forma, o arsenal farmacológico disponível, atualmente, na clínica, para o tratamento dos vários tipos de dor incluem os antiinflamatórios não esteroidais e os derivados da morfina. Os primeiros apresentam vasta utilização e inúmeros efeitos adversos, tais como úlceras, discrasias sangüíneas, e alergias, entre outros; os segundos são utilizados no tratamento de dores decorrentes do câncer e sua aplicação também é limitada em função dos seus efeitos adversos. Outras drogas também podem modular a transmissão nociceptiva e dessa forma controlar a dor, como os antidepressivos tricíclicos, os anticonvulsivantes, os bloqueadores de canais de sódio, os neurolépticos, os esteróides, entre outros. No entanto, a efetividade dessas drogas é muito variável entre os indivíduos, assim como outros tratamentos alternativos, por vezes pouco eficiente, como a estimulação elétrica de nervos cutâneos, "biofeedback" e acupuntura, entre outros (MACFARLANE et al., 1997).

No presente estudo foram analisados, através de métodos farmacológicos e bioquímicos, alguns dos mecanismos responsáveis pelas ações antinociceptivas de princípios ativos isolados de algumas plantas utilizadas na medicina tradicional, incluindo vários compostos isolado do *Phyllanthus sellowianus*, contudo presente em outras espécies desse gênero, e de um novo alcalóide isolado da *Siphocampylus verticillatus*.

## 2 - OBJETIVOS

O presente trabalho foi desenvolvido visando atingir os seguintes objetivos:

- Analisar os efeitos antinociceptivos da geranina, da furosina, da quercetina, da rutina e do galato de etila isolados das plantas do gênero *Phyllanthus*, e do novo alcalóide cloridrato de cis-8,10-Di-N-propillobelidiol dihidratado (DPHD) isolado da *Siphocampylus verticillatus*, administrados por via sistêmica, espinhal e supraespinhalmente, em modelos de nocicepção química (testes do ácido acético, formalina e capsaicina) e térmica (modelo da placa quente) em camundongos.
- Investigar, com o emprego de técnicas farmacológicas "in vivo" e "in vitro", os possíveis mecanismos envolvidos nas ações antinociceptivas do galato de etila e do alcalóide DPHD através do emprego de agonistas e antagonistas seletivos de vários receptores, bloqueadores de canais iônicos, bem como de sistema de transdução de sinal e de enzimas que modulam a nocicepção.
- Investigar, utilizando técnicas bioquímicas, as possíveis interações do DPHD com os receptores opióides e para o glutamato, bem como avaliar as ações desse composto na liberação e na captação de serotonina, visando esclarecer seu possível mecanismo de ação antinociceptiva.

### 3 - MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 - Animais

Foram utilizados camundongos "Swiss" machos pesando entre 25 e 35 g, cobaias de ambos os sexos pesando entre 300 e 500 g e ratos Wistar de ambos os sexos pesando entre 150 e 200 g, mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia, CCB, UFSC. Os animais foram mantidos à temperatura controlada ( $20 \pm 3$  °C), em ciclo claro/escuro de 12 h e tratados com água e ração *ad libitum*. Os animais permaneceram no laboratório por um período de adaptação de pelo menos 1 h antes da realização dos experimentos, os quais foram conduzidos entre 8 e 17 h à temperatura de  $20 \pm 3$  °C. Os experimentos foram realizados de acordo com orientações para os cuidados com animais de laboratório e considerações éticas para investigações de dor experimental em animais conscientes (Zimmermann, 1983).

#### 3.2 - Classificação botânica das plantas estudadas.

O material botânico (folhas, caule e raiz) das diferentes espécies de *Phyllanthus*, em especial do *P. sellowianus* foi coletado no município de Apiúna-SC em abril 1994 e classificado pelo Prof. Antônio Reis. A excicata foi depositada no Herbário FLOR do Horto Botânico da Universidade Federal de Santa Catarina sob o número de registro 2.757.

As partes aéreas da *Siphocampylus verticillatus* foram coletadas no município de São José dos Pinhais, Curitiba – PR, em janeiro de 1993, sendo a planta classificada pelo Prof. Gerdt Hatschbach. Uma excicata da planta foi depositada no Jardim Botânico de Curitiba – PR sob o número de registro 68.920.

#### 3.3 - Análise Química

##### 3.3.1 – Isolamento, purificação e identificação química dos compostos.

Os compostos foram isolados e identificados pelo grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Rosendo Augusto Yunes no Laboratório de Produtos

Naturais do Departamento de Química (UFSC). O nosso grupo de pesquisa vem trabalhando há vários anos com diferentes espécies de plantas do gênero *Phyllanthus*, sendo que já conseguiu caracterizar, quimicamente, vários compostos pertencentes a diferentes classes química (para revisão ver CALIXTO et al., 1998). Contudo, o presente trabalho descreve o isolamento e a caracterização química dos compostos somente para a espécie do *P. sellowianus*. No entanto, devo lembrar que os compostos aqui descritos também estão presente em diferentes proporções em outras espécies de *Phyllanthus* estudadas pelo nosso grupo de pesquisa (para revisão ver CALIXTO et al., 1998). As folhas, caules e raízes (9 Kg) de *P. sellowianus* foram secos em estufa à 40 °C, e depois moídos e macerados com metanol 95% à temperatura ambiente por cerca de duas semanas. Posteriormente, o solvente foi evaporado em evaporador rotatório para a obtenção do extrato metanólico bruto. Este extrato foi então fracionado com solventes de polaridade crescente (hexano, clorofórmio, acetato de etila e butanol), para a obtenção das respectivas frações. A fração de acetato de etila, rica em compostos fenólicos, foi cromatografada em coluna de sílica gel eluída com acetato de etila e quantidades crescentes de metanol, o que permitiu a purificação dos seguintes compostos: galato de etila (rendimento 60 mg; ou 0,0007%), quercetina (130 mg, 0,0014%), furosina (272 mg, 0,003%), rutina (1,06 g, 0,012%) e geranina (712 mg, 0,008%)(Figura 2). Os compostos foram identificados com base nos dados espectroscópicos de Infra-vermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN-<sup>1</sup>H) e Carbono 13 (RMN-<sup>13</sup>C), além de comparação com amostras autênticas, quando possível (MIGUEL et al, 1995, 1996b; MIGUEL, 1996; CECHINEL FILHO et al., 1996; para revisão ver CALIXTO et al., 1998).

As partes aéreas (10 kg) de *S. verticillatus*, recém coletadas, foram moídas e em seguidas maceradas com metanol 95% durante duas semanas. O solvente foi evaporado sob vácuo, obtendo-se o extrato metanólico bruto, o qual foi particionado, sucessivamente, com solventes de polaridade crescente. A fração alcaloídica foi cromatografada em coluna de sílica gel, eluída com acetato de etila:metanol na proporção de 98:02, sendo obtidos cerca de 3 g (0,03%) do alcalóide, o qual foi identificado por métodos espectroscópicos usuais (RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C e IV) e espectro de massas, como sendo o cloridrato de *cis*-8,10-di-*N*-propillobelidiol dihidratado (DPHD)(MIGUEL et al., 1996a; MIGUEL, 1996).

### 3.4 – Análise Farmacológica

#### 3.4.1 - Atividade antinociceptiva

#### 3.4.2 - Teste das contorções abdominais induzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético em camundongos.

Inicialmente foi verificado o efeito antinociceptivo dos compostos obtidos das diferentes plantas no teste das contorções abdominais que, embora seja um modelo de nocicepção simples e pouco específico, permite avaliar a atividade antinociceptiva de várias substâncias que atuam tanto em nível central quanto periférico. A resposta nociceptiva foi induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético (0,6%) diluído em solução salina (0,9%). Basicamente as contorções abdominais consistem na contração da musculatura esquelética abdominal juntamente com a extensão de uma das patas posteriores, de acordo com o método descrito anteriormente (COLLIER et al., 1968; BENTLEY et al., 1981). Grupos de animais foram pré-tratados com o galato de etila, quercetina, rutina, geranina, furosina, DPHD, aspirina, diclofenaco e/ou meloxicam (utilizadas como controles positivos para comparação com o efeito dos compostos) por via intraperitoneal (2,8 – 556,7  $\mu\text{mol/kg}$ ) ou por via oral com o galato de etila, quercetina, rutina, geranina, furosina, DPHD e/ou aspirina (26,2 – 1670,3  $\mu\text{mol/kg}$ ) 0,5 e 1 h antes da injeção do ácido acético, respectivamente.

Os grupos controle receberam o mesmo volume dos veículos (10 ml/kg) utilizados para diluir os compostos. Após a injeção do ácido acético, os camundongos foram colocados sob funis de vidros invertidos individuais, e o número de contorções abdominais foi quantificado cumulativamente durante um período de 20 min. A atividade antinociceptiva foi determinada tomando-se como base a inibição do número das contorções abdominais dos animais pré-tratados com os compostos isolados das diferentes espécies de plantas e/ou com as ações da aspirina, diclofenaco ou meloxicam, administrados por via oral ou intraperitoneal, comparados com o número das contorções abdominais dos animais controle (veículo).

### 3.4.3 – Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos.

Para a confirmação do efeito antinociceptivo dos compostos isolados das diferentes espécies de plantas, foi utilizado o teste da dor induzida pela injeção intraplantar de formalina. Esse modelo é mais específico que o teste de contorções abdominais, permitindo avaliar dois tipos de dor: a dor de origem neurogênica (estimulação direta dos neurônios nociceptivos) e a dor inflamatória (caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios). O procedimento utilizado foi similar ao descrito anteriormente (HUNSKAAR et al., 1985, 1986; MURRAY et al., 1988; CORRÊA & CALIXTO, 1993). Os animais receberam 20  $\mu$ l de formalina a 2,5% (0,92% de formaldeído) na região plantar da pata posterior direita. Logo após a injeção da formalina, os animais foram colocados, individualmente, sob funil de vidro invertido, ao lado de um espelho para facilitar a observação. Após foi cronometrado durante 30 min o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com formalina, sendo esse período considerado como indicativo de dor. Esse modelo permite evidenciar duas fases de sensibilidade dolorosa: a primeira fase, que ocorre durante os primeiros 5 min após a injeção da formalina (dor de origem neurogênica); e a segunda fase, que ocorre entre 15 a 30 min após a formalina, representando a resposta tônica à dor, acompanhada de uma resposta inflamatória relacionada à liberação de mediadores inflamatórios (HUNSKAAR & HOLE, 1987).

Grupos distintos de animais foram tratados com o galato de etila, quercetina, rutina, geranina, furosina, DPHD, aspirina, diclofenaco e/ou meloxicam (os três últimos foram utilizados como controles positivos para comparação com o efeito dos compostos) por via intraperitoneal (0,8 – 556,7  $\mu$ mol/kg) ou por via oral com o com o gaiato de etila, quercetina, rutina, geranina, furosina, DPHD e/ou aspirina (26,2 – 3340,7  $\mu$ mol/kg) 0,5 e 1 h antes da injeção da formalina, respectivamente. Os animais controle receberam igual volume dos veículos (10 ml/kg) utilizados para diluir os compostos isolados das diferentes espécies de plantas ou com as drogas padrão.

A fim de investigar a possível ação antinociceptiva dos diferentes compostos em nível espinal (via intratecal, i.t.), na nocicepção induzida pela

formalina, os camundongos foram levemente anestesiados com éter etílico e um volume de 5  $\mu$ l do veículo (grupo controle) ou do veículo contendo o galato de etila, quercetina, rutina, geranina, furosina, DPHD, diclofenaco ou meloxicam (1,5 – 491,3 nmol/sítio) foram injetados diretamente na medula espinhal (via i.t., entre as vértebras L5 e L6), como descrito anteriormente (HYLDEN & WILCOX, 1980; SANTOS & CALIXTO, 1997a,b). Além disso, foi analisado o possível efeito dos compostos em nível supraespinhal (via intracerebroventricular, i.c.v.). Para isso os animais foram levemente anestesiados com éter etílico e um volume de 5  $\mu$ l do veículo (grupo controle) ou do veículo contendo o galato de etila, quercetina, rutina, geranina, furosina, DPHD, diclofenaco e/ou meloxicam (1,5 – 491,3 nmol/sítio) foi injetado diretamente no ventrículo lateral (via i.c.v., coordenadas para a localização em relação ao bregma: 1 mm lateral; 1 mm rostral; -3 mm vertical) como descrito anteriormente (HYLDEN & WILCOX, 1980; VAZ et al., 1996; SANTOS & CALIXTO, 1997a,b). Transcorridos 10 min após a administração i.c.v. ou i.t. dos compostos, os animais foram analisados na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina, como descrito anteriormente.

#### 3.4.4 – Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos.

Esse modelo foi proposto por SAKURADA et al. (1992) para o estudo de compostos que atuam sobre a dor de origem neurôgenica. A injeção de capsaicina induz estimulação direta dos neurônios nociceptivos e causa a liberação de vários neuropeptídeos envolvidos na transmissão dolorosa, incluindo principalmente as taquicininas (substância P, neurocinina A e neurocinina B) (SAKURADA et al., 1992; 1993). Assim, esse teste foi empregado com o objetivo de evidenciar a possível interação dos compostos isolados das diferentes plantas com esses neuropeptídeos.

Os animais foram colocados, individualmente, sob funil de vidro transparente por um período de adaptação de, no mínimo, 20 min. Após, cada animal recebeu intraplantarmente 20  $\mu$ l de solução de capsaicina (1,6  $\mu$ g/pata) na pata posterior direita, sendo que o tempo que o animal permaneceu lambendo ou

mordendo a pata injetada com capsaicina foi cronometrado por um período de 5 min e considerado como indicativo de dor (SAKURADA et al., 1992; 1993). Grupos distintos de animais foram tratados com o galato de etila, quercetina, rutina, geranina, furosina, DPHD, diclofenaco, meloxicam ou indometacina (utilizadas como controles positivos para comparação com o efeito dos compostos) por via intraperitoneal (0,8 – 198,4  $\mu\text{mol/kg}$ ) ou por via oral com o galato de etila ou DPHD (72,8 – 1009,2  $\mu\text{mol/kg}$ ) 0,5 e 1 h antes da injeção da capsaicina, respectivamente. Os animais controle receberam igual volume dos veículos (10 ml/kg) utilizados para diluir os compostos ou as drogas padrão.

Com o objetivo de evidenciar uma possível ação antinociceptiva do DPHD, diclofenaco e meloxicam em nível espinal (i.t.) ou supraespinal (i.c.v.) na dor neurogênica causada pela capsaicina, grupos distintos de animais foram levemente anestesiados com éter etílico e um volume de 5  $\mu\text{l}$  do veículo (grupo controle) ou do veículo contendo o DPHD, diclofenaco e/ou meloxicam (2,8 – 291,1 nmol/sítio) foi injetado diretamente na medula espinal (via i.t.) ou no ventrículo lateral (via i.c.v.), como descrito acima, respectivamente. Após 10 min da administração i.c.v. e/ou i.t. dos compostos, os animais foram analisados na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina.

#### 3.4.5 - Teste da "Placa-Quente"

A atividade antinociceptiva do galato de etila e do DPHD foi analisada no teste da placa quente, que é um modelo de dor muito sensível para drogas que atuam centralmente como a morfina e seus derivados. Para isso, os animais foram colocados dentro de um cilindro de acrílico sobre uma superfície metálica previamente aquecida a  $50 \pm 1$  ou  $56 \pm 1$  °C, utilizando-se o aparelho de placa quente (Ugo Basile, Model-DS 37). O tempo em segundos que o animal levou para lambe, morder ou levantar as patas dianteiras sobre a placa previamente aquecida, foi cronometrado e considerado como indicativo de efeito nociceptivo conforme descrito anteriormente (EDDY & LEIMBACK, 1953). Cada animal foi selecionado conforme sua reatividade ao modelo, sendo desprezados aqueles que permaneceram acima de 15 ou 8 s na placa aquecida sem reagir ao estímulo térmico nas temperaturas de  $50 \pm 1$  e de  $56 \pm 1$  °C, respectivamente. O tempo

máximo permitido de permanência dos animais no aparelho de placa quente foi de 30 s para lhes evitar danos teciduais, cujo lapso foi considerado como índice máximo de analgesia.

Os animais foram pré-tratados 0,5 h antes do experimento com o galato de etila (151,3  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.), DPHD (291,1  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.), diclofenaco (314,4  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.), meloxicam (28,4  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) ou com morfina (na dose de 31,0  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.) utilizada para comparar com o efeito dos compostos. Outros grupos de animais foram pré-tratados via i.c.v. e/ou i.t. com o veículo (5  $\mu\text{l/sítio}$ ), DPHD (291,1  $\text{nmol/sítio}$ ) ou morfina (15,5  $\text{nmol/sítio}$ ) conforme descrito anteriormente, 10 min antes do experimento. O tempo de permanência dos animais na placa quente foi convertido em dados percentuais, sendo utilizada a seguinte fórmula: percentagem de efeito máximo (PEM) =  $\frac{\text{TF} - \text{TI}}{30 - \text{TI}}$  (adaptada de AANONSEN & WILCOX, 1987).

#### 3.4.6 - Efeito sobre a performance motora no modelo do "Rota-rod".

Com o objetivo de evidenciar o possível efeito depressor dos compostos em estudo sobre o sistema nervoso central ou periférico, foi empregado o teste do rota-rod, que analisa a performance motora do animal. O aparelho é constituído de uma barra de 2,5 cm de diâmetro subdividido em 6 compartimentos girando a 22 r.p.m. colocada a 25 cm de altura. Cada animal foi selecionado 24 horas antes dos experimentos, sendo eliminados aqueles que não permaneceram sobre o aparelho de rota-rod por, pelo menos, dois períodos consecutivos de 60 s cada, conforme descrito por DUHAM & MIYA (1957). Os animais foram selecionados e tratados por via intraperitoneal com o galato de etila (151,3  $\mu\text{mol/kg}$ ) ou DPHD (291,1  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.), 0,5 h antes ou somente com os veículos (10 ml/kg) utilizados para diluir os compostos.

#### 3.5 - Estudo do possível mecanismo de ação antinociceptiva do DPHD e do galato de etila.

Nesta etapa do trabalho, procurou-se analisar o(s) possível(eis) mecanismos de ação envolvido(s) na atividade antinociceptiva causada pelo

galato de etila ou pelo DPHD. Para tal, foram realizados diferentes ensaios farmacológicos e bioquímicos "in vitro" e "in vivo" utilizando-se vários agonistas e antagonistas específicos ou inibidores enzimáticos, que serão discutidos a seguir.

### 3.5.1 – Participação do sistema opióide.

Com o objetivo de avaliar a participação do sistema opióide sobre o efeito antinociceptivo do galato de etila e do DPHD, grupos distintos de animais foram pré-tratados com antagonista opióide não seletivo, naloxona (13,7 ou 3,0  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) 15 min antes da administração do galato de etila (50,5  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.), DPHD (87,3  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) ou de morfina (13,3 ou 15,5  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c., utilizada como controle positivo). Decorridos 30 min após a administração dos compostos ou morfina, foi avaliado o efeito desse tratamento em relação à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina. Os grupos utilizados como controle foram tratados com o galato de etila (50,5  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.), DPHD (87,3  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.), morfina (15,5  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.), naloxona (13,7  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) ou com os veículos (10 ml/kg, i.p.) utilizados para diluir os compostos, 30 min antes da injeção da formalina.

Com o objetivo de verificar quais dos subtipos de receptores opióides estariam participando no efeito antinociceptivo causado pelo DPHD, grupos distintos de animais foram pré-tratados com ciprodimina (antagonista seletivo dos receptores opióides do tipo  $\mu$ , 2,3  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.); naltrindol (antagonista seletivo dos receptores opióides do tipo  $\delta$ , 2,2  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.); e com nor-binaltorfimina (antagonista seletivo dos receptores opióides do tipo  $\kappa$ , 1,4  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) 15 min antes da administração do DPHD (87,3  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) ou da morfina (15,5  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c. controle positivo)(CRAFT et al., 1995; FREY & SCHICHT, 1996; OSSIPOV et al., 1996). Decorridos 30 min após a administração do DPHD ou da morfina, foi avaliado o efeito desse tratamento em relação à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina. Os animais utilizados como controle foram tratados com o DPHD (87,3  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.), morfina (15,5  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.), ciprodimina (2,3  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.), naltrindol (2,2  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.), nor-binaltorfimina (1,4  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) ou com os veículos (10 ml/kg, i.p.) utilizados para diluir os compostos e a morfina, 30 min antes da injeção da formalina.

### 3.5.2 – Participação da proteína $G_{i/o}$ sensível à toxina pertussis.

Vários trabalhos descritos na literatura demonstram que o pré-tratamento de animais com toxina pertussis pela via i.c.v. suprime o efeito antinociceptivo causado por drogas (ex. morfina) que atuam ativando a proteína  $G_{i/o}$ , através da ribosilação do ADP da proteína  $G_{i/o}$  (SANCHEZ-BLASQUEZ & GARZON, 1991; HERNANDES et al., 1995; SHAH et al., 1994, 1997). Para investigar a possível participação da proteína  $G_{i/o}$  sensível a toxina pertussis na ação antinociceptiva do galato de etila e do DPHD, os animais foram pré-tratados com a toxina pertussis (1,0  $\mu\text{g}/\text{i.c.v.}$ ), através de uma única injeção, sete dias antes da administração do galato de etila (50,5  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ , i.p.), DPHD (87,3  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ , i.p.), morfina (15,5  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ , s.c., usada como controle positivo) ou somente com o veículo (10 ml/kg, i.p.). Outro grupo de animais foi pré-tratado com salina (NaCl 0,9%, 5  $\mu\text{l}/\text{i.c.v.}$ ) e, sete dias depois, recebeu o galato de etila (50,5  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ , i.p.), DPHD (87,3  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ , i.p.), morfina (15,5  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ , s.c.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.). A nocicepção induzida pela formalina foi analisada 30 min após a injeção dos compostos.

### 3.5.3 – Participação dos canais de potássio.

Para avaliar a possível participação dos canais de potássio nas ações antinociceptivas do galato de etila ou do DPHD, os animais foram tratados com apamina (50 ng/i.t., bloqueador seletivo de canal de potássio de baixa condutância ativado por cálcio), caribdotoxina (250 pg/i.t., bloqueador seletivo de canal de potássio de alta condutância ativado por cálcio), tetraetilamônio (1  $\mu\text{g}/\text{i.t.}$ , bloqueador não-seletivo de canal de potássio dependente de voltagem), glibenclamida (100  $\mu\text{g}/\text{i.t.}$ , bloqueador de canal de potássio modulado por ATP) ou somente com veículo (NaCl 0,9%, 5  $\mu\text{l}/\text{i.t.}$ ) (GIMEMEZ-GALLEGO et al., 1988; WELCH & DUNLOW, 1993; WELCH et al., 1995). Decorridos 15 min, os animais receberam galato de etila (50,5  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ , i.p.), DPHD (87,3  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ , i.p.) ou o veículo (10 ml/kg, i.p.) e, 30 min após a administração dos compostos, foi avaliado o efeito desse tratamento na dor induzida pela injeção de formalina.

### 3.5.4 – Participação da via L-arginina-óxido nítrico.

Em outra série de experimentos, investigou-se a participação da via da L-arginina-óxido nítrico no efeito antinociceptivo causado pelo galato de etila e DPHD. Os animais foram pré-tratados com a precursora do óxido nítrico, a L-arginina (3,4 mmol/kg, i.p.), e após 15 min receberam galato de etila (50,5  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.), DPHD (87,3  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.), morfina (15,5  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.) ou *N*<sup>G</sup>-nitro-L-arginina (L-NOARG, 342,0  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p., inibidor da enzima óxido nítrico sintase)(SANTOS et al., 1995b; VAZ et al., 1996; BEIRITH et al., 1998). Decorridos 30 min após o tratamento, os animais foram analisados na nocicepção induzida pela injeção de formalina. Os animais controles foram tratados com o galato de etila (50,5  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.), DPHD (87,3  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.), morfina (15,5  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.), L-NOARG (342,0  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) ou com os veículos (10 ml/kg, i.p.), 30 min antes da injeção da formalina.

### 3.5.5 – Participação do sistema serotoninérgico.

Visando investigar a possível participação do sistema serotoninérgico no efeito antinociceptivo causado pelo DPHD, os camundongos foram pré-tratados com p-clorofenilalanina (PCPA, 399,8  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p. inibidor da síntese de serotonina, 1 vez ao dia durante 4 dias consecutivos). Transcorridos 30 min após o último tratamento, os animais pré-tratados com PCPA receberam o DPHD (87,3  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.), morfina (15,5  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.) e após 30 min foram analisados na nocicepção induzida pela formalina. Outro grupo de animais foi tratado, durante 4 dias consecutivos, com solução fisiológica (NaCl 0,9%, 10 ml/kg, i.p.), antes da administração de DPHD (87,3  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.), morfina (15,5  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.) e, foi analisado em relação à nocicepção induzida pela formalina.

Para avaliar a participação dos receptores serotoninérgicos no efeito antinociceptivo causado pelo DPHD, outro grupo de animais foi tratado com metisergida (8,9  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p., antagonista serotoninérgico não seletivo) ou somente com o veículo (10 ml/kg, i.p.). Após 15 min os animais foram tratados com DPHD (87,3  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.). Decorridos 30 min após o

tratamento, os animais foram analisados em relação a ambas as fases da dor induzida pela formalina.

### 3.5.6 – Desenvolvimento de tolerância cruzada entre a morfina e o DPHD.

Tem sido demonstrado na literatura que a administração de morfina por um período acima de 4 dias pode induzir tolerância, ou seja redução do efeito antinociceptivo da morfina (MENARD et al., 1995). Utilizando esse modelo, verificou-se a possibilidade de desenvolvimento de tolerância cruzada entre a morfina e o DPHD nos animais tratados por sete dias consecutivos com a morfina ou com o DPHD. Grupos distintos de animais foram pré-tratados com morfina (15,5  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.), DPHD (87,3  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) ou somente com salina (10 ml/kg, i.p.) durante sete dias. Os animais receberam injeções diárias administradas às 9 h, durante os seis primeiros dias, e uma última injeção no sétimo dia, às 8 h, com morfina, DPHD ou salina. Decorridos 30 min do último tratamento, os animais pré-tratados com morfina ou DPHD receberam injeção de morfina (15,5  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.) ou de DPHD (87,3  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) e, transcorridos 30 min foi analisado o efeito antinociceptivo da morfina e do DPHD no teste da formalina.

### 3.5.7 – Participação do sistema dopaminérgico.

Visando investigar a possível participação dos receptores dopaminérgicos no efeito antinociceptivo causado pelo DPHD, os camundongos foram pré-tratados com haloperidol (0,5  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p., antagonista não-seletivo dos receptores dopaminérgicos) e, após 15 min, os animais receberam o DPHD (87,3  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.), apomorfina (3,2  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.). Decorridos 30 min após o tratamento, os animais foram analisados em relação a ambas as fases da dor induzida pela formalina. Os animais controles receberam o veículo (10 ml/kg, i.p.) e, após 15 min, receberam o DPHD (87,3  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.), apomorfina (3,2  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) ou o veículo (10 ml/kg, i.p.), 30 min antes da injeção de formalina.

### 3.5.8 – Participação do sistema GABAérgico.

Para investigar a possível participação do sistema gabaérgico (ácido  $\gamma$ -aminobutírico) na atividade antinociceptiva do DPHD, grupos de camundongos foram pré-tratados com bicuculina (1,9  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p., antagonista seletivo de receptores  $\text{GABA}_A$ ) ou faclofeno (40  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p., antagonista seletivo de receptores  $\text{GABA}_B$ ), ambos administrados 15 min antes do DPHD (87,3  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.), muscimol (8,7  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c., agonista seletivo de receptores  $\text{GABA}_A$ ), baclofeno (4,6  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p., agonista seletivo de receptores  $\text{GABA}_B$ ) ou veículo (10 ml/kg, i.p.) (SHADFIZADEH et al., 1997; MENDES et al., 2000). Decorridos 30 min após os tratamentos, os animais foram analisados em relação a ambas as fases da dor induzida pela formalina. Os animais controles receberam DPHD (87,3  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.), agonistas gabaérgicos (muscimol 8,7  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c. e baclofeno 4,6  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.), antagonistas gabaérgicos (bicuculina 1,9  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p. e faclofeno 40  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.), 30 min antes da injeção de formalina.

### 3.6- Estudos "in vitro"

#### 3.6.1- Efeito do DPHD sobre a contração do íleo de cobaia induzida pela estimulação elétrica de campo.

Esse experimento foi conduzido com o objetivo de confirmar se o DPHD, a exemplo da morfina, poderia estar interagindo com os receptores opióides (principalmente o subtipo  $\mu$ ) presentes no íleo isolado de cobaia e, desta forma, causar a diminuição da contração induzida eletricamente nessa preparação.

Para isso, após o sacrifício das cobaias, por forte pancada na nuca e deslocamento cervical, a cavidade abdominal foi aberta para retirada de um segmento de íleo situado entre 10 e 30 cm da junção íleo-cecal. Com auxílio de uma pipeta de 10 ml, lavou-se a luz do segmento com 10 a 20 ml de solução fisiológica de Krebs-Henseleit aquecida e oxigenada, e retirou-se os excessos de tecido aderente. O segmento de íleo foi então dividido em fragmentos (de aproximadamente 1 a 3 cm de comprimento sendo obtidos de 6 a 8 segmentos

por animal), que foram transferidos para cubas de vidro contendo 5 ml de solução de Krebs-Henseleit (composição em mM: NaCl 118; KCl 4,8; CaCl<sub>2</sub> 2,5; MgSO<sub>4</sub> 1,2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,9; NaHCO<sub>3</sub> 25; glicose 11 – pH 7,4) à 37 °C, continuamente gaseificada com 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>, e submetido a uma tensão de 1 g.

Decorrido o período de equilíbrio de, pelo menos 30 min, durante o qual a solução nutriente foi renovada a cada 10 min, as preparações foram submetidas à estimulação elétrica de campo com pulsos retangulares de 1 ms de duração e voltagem supramáxima (50 a 70 V), aplicados a uma frequência de 0,1 Hz (GUIMARÃES & RAE, 1992; GUIMARÃES, 1994). A estimulação elétrica foi aplicada através de eletrodo de platina (0,6 mm de diâmetro) que consiste de um gancho situado 3 cm abaixo de um anel de 8 mm de diâmetro. Cada preparação foi posicionada entre os dois eletrodos, conectada com linha de sutura a um transdutor isométrico e distendida a uma tensão basal de 1 g. As contrações isométricas foram registradas por miógrafos (TRI-201 force displacement transducers) acoplados a um polígrafo de mesa (Letica Scientific Instruments, Barcelona, Espanha). Uma vez estabilizadas as contrações induzidas pela estimulação elétrica de campo, uma única curva concentração resposta cumulativa foi obtida para o DPHD ou morfina (1 nM – 10 μM).

### 3.6.2- Efeito do DPHD sobre a contração do ducto deferente de camundongo induzida pela estimulação elétrica de campo.

Esse experimento foi conduzido com o objetivo de confirmar uma possível ação do DPHD sobre os receptores opióides presentes no ducto deferente de camundongo, tendo em vista que alguns trabalhos demonstraram que essa preparação também é rica em receptores opióides do tipo δ.

Os animais foram mortos após anestesia leve com éter, por deslocamento cervical. A cavidade abdominal foi aberta para retirada dos ductos deferentes, que foram colocados numa placa de Petri contendo solução de Krebs aquecida, para remoção dos excessos de tecidos adiposo e conjuntivo. Cada ducto deferente foi então transferido para cubas de vidro contendo 5 ml de solução de Krebs-Henseleit (composição em mM: NaCl 118; KCl 4,7; CaCl<sub>2</sub> 2,5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,9; NaHCO<sub>3</sub> 25; glicose 11 – pH 7,2-7,4) à 37 °C, continuamente gaseificada com

95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>, e submetido a uma tensão inicial de 0,5 g. Decorrido o período de equilíbrio de, pelo menos 45 min, durante os quais a solução nutriente foi renovada a cada 15 min, as preparações foram submetidas à estimulação elétrica de campo utilizando trens de 4 pulsos retangulares de 0,5 ms e voltagem supramáxima (20 a 40 V), aplicados a uma frequência de 10 Hz a cada 20 s (RAE & CALIXTO, 1990; MAAS et al., 1995; MAAS, 1995). A estimulação foi aplicada através de eletrodo de platina (0,6 mm de diâmetro) que consiste de um gancho situado 3 cm abaixo de um anel de 8 mm de diâmetro. Cada preparação foi posicionada entre os dois eletrodos, conectada com linha de sutura a um transdutor isométrico e distendida a uma tensão basal de 0,5 g.

As contrações isométricas foram registradas por miógrafos (TRI-201 force displacement transducers) acoplados a um polígrafo de mesa (Letica Scientific Instruments, Barcelona, Espanha). Uma vez estabilizadas as contrações induzidas pela estimulação elétrica de campo, foram obtidas curvas concentração resposta não cumulativa para o DPHD e a morfina (1 nM – 10 µM).

3.6.3- Efeito do DPHD sobre a união específica (binding) de [<sup>3</sup>H]naloxona em membranas de córtex cerebral de camundongos.

Camundongos foram mortos por decapitação e tiveram seus córtices cerebrais dissecados, pesados e homogeneizados em 20 volumes de uma solução contendo Tris/HCl (50 mM), pH 7,4, em um potter de vidro. O homogeneizado foi centrifugado à 42.500 g durante 25 min. O sobrenadante dessa centrifugação foi desprezado e o precipitado ressuspense no mesmo volume de tampão utilizado inicialmente e centrifugado novamente à 42.500 g durante 25 min (MENZIES et al., 1998; PERT et al., 1976), sendo que esse procedimento foi repetido três vezes. O precipitado resultando da terceira lavagem foi ressuspense em tampão Tris/HCl 50 mM (pH 7,4) de forma a obter uma concentração protéica em torno de 2,0 mg de proteína por ml, a qual foi determinada pelo método de LOWRY e colaboradores (1951).

Os ensaios de união específica ("binding") de [<sup>3</sup>H]naloxona foram realizados em triplicata em um volume total de 1,0 ml contendo 0,25 ml de membrana (0,2-0,3 mg de proteína), tampão Tris/HCl 50 mM (pH 7,4) e 9 nM de ligante radioativo ([<sup>3</sup>H]naloxona, 59 Ci/mmol) na presença e na ausência de DPHD

(1–500  $\mu\text{M}$ ). A união inespecífica foi realizada da mesma maneira, com exceção de que 30  $\mu\text{M}$  de naloxona não-radioativo (deslocador) foi acrescentado ao meio de incubação. Após 30 min de incubação à 25 °C a reação foi interrompida através da técnica de filtração utilizando o filtro de fibra de vidro do tipo GF/B, que foi posteriormente lavado três vezes com solução tampão gelada. Os filtros foram colocados em frascos de vidro para posterior adição do líquido de cintilação e leitura em cintilador beta (Packard, modelo Tri-Carb 1600 TR). A união específica foi calculada como a diferença entre os valores de união (“binding”) total (na ausência de naloxona não radioativa) e a inespecífica (na presença de naloxona não radioativa). Os resultados estão expressos como a média de três experimentos independentes.

#### 3.6.4- Efeito do DPHD sobre a união específica (binding) de [ $^3\text{H}$ ]glutamato em membranas de córtex cerebral de camundongos.

Camundongos foram mortos por decapitação e tiveram seus córtices cerebrais dissecados, pesados e homogeneizados em 20 volumes de uma solução contendo sacarose (0,32 M)/Tris-HCl (10 mM)/MgCl<sub>2</sub> (1 mM), pH 7,4, em um potter de vidro. O homogeneizado foi centrifugado à 1.000 g durante 15 min. O sobrenadante (S1) dessa centrifugação foi separado e mantido em gelo. O precipitado, contendo a fração nuclear e um pouco de mielina, foi ressuspenso no mesmo volume de tampão utilizado inicialmente e centrifugado novamente a 1.000 g durante 15 min. O sobrenadante obtido dessa centrifugação foi misturado a S1 e o precipitado foi desprezado e a mistura centrifugada a 27.000 g durante 15 min. O precipitado resultante foi ressuspenso em 20 volumes de tampão Tris/HCl 1 mM (pH 7,4) e centrifugado novamente a 27.000 g durante 15 min (SOUZA & RAMÍREZ, 1991), sendo que esse procedimento foi repetido três vezes. O precipitado resultando da terceira lavagem foi ressuspenso em tampão Tris/HCl 10 mM (pH 7,4) de forma a obter uma concentração protéica em torno de 2,0 mg de proteína por ml, o qual foi determinada pelo método de LOWRY e colaboradores (1951).

Os ensaios de união específica (“binding”) de [ $^3\text{H}$ ]glutamato foram realizados em triplicata em um volume total de 0,5 ml contendo 0,1 ml de

membrana (0,2-0,3 mg de proteína), tampão Tris/HCl 50 mM (pH 7,4) e 40 nM de ligante radioativo ( $[^3\text{H}]$ glutamato, 53 Ci/mmol) na presença e na ausência de DPHD (1–1000  $\mu\text{M}$ ). A união inespecífica foi realizada da mesma maneira, com exceção de que 40  $\mu\text{M}$  de glutamato não-radioativo (deslocador) foi acrescentado ao meio de incubação. Após 15 min de incubação à 30 °C as membranas foram centrifugadas a 12.000 g durante 15 min para separar o  $[^3\text{H}]$ glutamato não ligado das membranas. O sobrenadante foi descartado e as paredes dos tubos de eppendorf e as superfícies dos *pellets* foram completa e cuidadosamente lavadas com água deionizada gelada. Após adicionou-se dodecil sulfato de sódio (SDS, 0,1%) para solubilização da proteína, que foram misturadas ao líquido de cintilação para posterior determinação da radioatividade em cintilador beta. A união específica foi calculada como a diferença entre os valores de união ('binding') total (na ausência de glutamato não radioativo) e a inespecífica (na presença de glutamato não radioativo). Os resultados estão expressos como a média de três experimentos independentes.

### 3.6.5- Efeito do DPHD sobre a captação de $[^3\text{H}]$ serotonina em sinaptossomas obtidos de córtex cerebral de rato.

Tem sido demonstrado que a serotonina pode exercer um importante papel na modulação da transmissão nociceptiva (BESSION, 1999). Dessa forma, foi analisado o possível efeito do alcalóide DPHD sobre a captação de  $[^3\text{H}]$ serotonina em fração sinaptossomal de ratos.

Após anestesia com hidrato de cloral (0,7%), os animais foram sacrificados por decapitação e seus córtices retirados para posterior preparação da fração sinaptossomal e análise da captação de  $[^3\text{H}]$ serotonina de acordo com o método descrito anteriormente (BENNETT et al., 1993; CHATTERJEE et al., 1998). O córtex foi homogeneizado em potter de vidro com 15 ml de solução de sacarose (0,32 M) e, diluído em 10 ml de tampão HEPES-Krebs (composição em mM: NaCl 150; HEPES 10; KCl 6,2;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1,2;  $\text{MgSO}_4$  1,2; Glicose 10; contendo pargilina (10  $\mu\text{M}$ ) e ácido ascórbico (0,1%, pH 7,4). O homogeneizado foi centrifugado à 750 g por 10 min à 4 °C. A seguir a fração nuclear foi desprezada e o sobrenadante centrifugado à 17.400 g por 20 min à 4°C para obtenção da

fração sinaptossomal. Os sinaptossomas foram ressuspensos em tampão HEPES-Krebs e incubados (37 °C por 10 minutos) na ausência ou na presença de diferentes concentrações do DPHD ou fluoxetina (controle positivo) para posterior análise da captação de serotonina.

Para análise da captação adicionou-se [<sup>3</sup>H]-serotonina (2,9 nM, Amersham, atividade específica: 11,8 Ci/mmol) aos sinaptossomas, que foram incubado à 37 °C por 4 min. Após o período de incubação, a reação foi interrompida através da técnica de filtração utilizando o filtro de fibra de vidro do tipo GF/B, que foi posteriormente lavado três vezes com solução tampão gelada (SINGER et al., 1999; GOBBI et al., 1999). Os filtros foram colocados em frascos de vidro para posterior adição do líquido de cintilação para leitura em cintilador (Packard, modelo Tri-Carb 1600 TR). A radioatividade foi medida após 12 horas, sendo a radioatividade não específica determinada em paralelo com extrato sinaptossomal incubado somente com serotonina (1 mM, não radioativa). Como controle positivo, foram realizados experimentos na ausência e na presença de fluoxetina, potente inibidor da captação de serotonina.

Os experimentos foram realizados em triplicata e pelo menos três animais foram utilizados em cada grupo experimental. A potência do DPHD em inibir a captação de [<sup>3</sup>H]serotonina foi quantificada como porcentagem da captação total de serotonina na ausência do DPHD (controle).

3.6.6- Efeito do DPHD sobre a liberação de [<sup>3</sup>H]serotonina em sinaptossomas obtidos de córtex cerebral de rato.

O objetivo desse experimento foi verificar se o efeito antinociceptivo do DPHD poderia ser em parte mediado pela liberação de serotonina, tendo em vista que ele foi capaz de inibir a captação desse neurotransmissor, somando-se ao fato que drogas que alteram os níveis de serotonina modificaram o efeito antinociceptivo do DPHD nos experimentos realizados anteriormente.

Após anestesia com hidrato de cloral (0,7%), os animais foram sacrificados por decapitação e seus córtices retirados para posterior preparação da fração sinaptossomal e análise da liberação de [<sup>3</sup>H]serotonina de acordo com o método descrito anteriormente (BENNETT et al., 1993; CHATTERJEE et al., 1998). O córtex foi homogeneizado em potter de vidro com 15 ml de solução de sacarose

(0,32 M) diluídos em 10 ml de tampão HEPES-Krebs (composição em mM: NaCl 132; HEPES 10; KCl 3; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,2; MgSO<sub>4</sub> 1,2; CaCl<sub>2</sub> 2; Glicose 10; contendo pargilina (10 µM) e ácido ascórbico (0,1%), pH 7,4). O homogeneizado foi centrifugado à 750 g por 10 min à 4 °C. A seguir a fração nuclear foi desprezada e o sobrenadante centrifugado à 17.400 g por 20 min à 4 °C para obtenção do extrato sinaptossomal. Os sinaptossomas foram ressuspensos em tampão HEPES-Krebs e incubados (37 °C por 15 minutos) na ausência ou na presença de [<sup>3</sup>H]serotonina (2,9 nM, Amersham, 11,8 Ci/mmol). Após o período de incubação, os sinaptossomas foram centrifugados a 12.000 g por 30 s. O sobrenadante foi descartado e as paredes dos tubos de Eppendorf e as superfícies dos sinaptossomas foram completa e cuidadosamente lavadas com tampão gelado, sendo que esse processo foi repetido três vezes para retirar o excesso de [<sup>3</sup>H]serotonina que não foi captada.

Para análise da liberação de [<sup>3</sup>H]serotonina, os sinaptossomas foram pré-incubados à 37 °C por 4 min na presença ou na ausência de 40 mM de K<sup>+</sup> (controle positivo) ou de diferentes concentrações do DPHD. Decorrido o período de incubação, os sinaptossomas foram centrifugados a 12.000 g durante 30 s para separar a [<sup>3</sup>H]serotonina que foi liberada dos sinaptossomas. O sobrenadante foi separado e colocado em vials para posterior determinação da liberação de [<sup>3</sup>H]serotonina, enquanto que as paredes dos tubos de Eppendorf e as superfícies dos *pellets* foram lavadas com tampão gelado e colocado em vials para posterior determinação da [<sup>3</sup>H]serotonina que permaneceu nos sinaptossomas. As amostras foram misturadas ao líquido de cintilação para posterior determinação da radioatividade.

A radioatividade foi medida em cintilador, sendo a radioatividade não específica determinada em paralelo com extrato sinaptossomal incubado somente com serotonina fria (1 mM, não radioativa). Os experimentos foram realizados em triplicata e pelo menos três animais foram utilizados em cada grupo experimental.

A porcentagem de liberação da [<sup>3</sup>H]serotonina foi determinada através da radioatividade presente no sobrenadante dividida pela soma da radioatividade presente no sobrenadante e no pellet multiplicada por cem. A potência do DPHD em induzir liberação de [<sup>3</sup>H]serotonina foi quantificada como porcentagem da liberação de [<sup>3</sup>H]serotonina na ausência do DPHD (controle).

### 3.7 - Drogas e soluções usadas

Os experimentos realizados utilizaram as seguintes drogas e soluções: ácido acético, formalina, cloridrato ou hidrobrometo de morfina (Merck AG, Darmstadt, Alemanha), N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina (L-NOARG), L-arginina, toxina pertussis, 2,2,2-tribromoetanol, hidrato de cloral, glutamato, capsaicina, cloridrato de p-clorofenilalanina-metil-ester (PCPA), aspirina, apamina, cloreto de tetraetilamônio, caribdotoxina, haloperidol, apomorfina, indometacina, diclofenaco (Sigma Chemical CO., St Luis, MO, EUA), dimaleato de metisergida (Sandoz AG, Basel, Suíça), cloridrato de naloxona, glibenclamida, baclofeno, faclofeno, cloridrato de naltrindol, hidrobrometo de ciprodimina, dihidrocloreto de norbinaltrorfimina (Research Biochemicals International, Natick, MA, EUA), muscimol, bicuculina (Tocris, Balwin, MO, EUA), meloxicam (Movatec®, Boehringer Ingelheim, Brasil), [<sup>3</sup>H]glutamato, [<sup>3</sup>H]naloxona e [<sup>3</sup>H]serotonina (Amersham International, UK). Os demais reagentes e sais utilizados foram de alto grau de pureza analítica e procedência Merck.

A rutina, a geranina, a quercetina, a furosina e o galato de etila foram isolados das partes aéreas do *Phyllanthus sellowianus*. O DPHD foi isolado da *Siphocampylus verticillatus* pelo Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, como descrito anteriormente (CECHINEL FILHO et al., 1996; MIGUEL, 1996; MIGUEL et al., 1995, 1996a,b). A rutina, a geranina, a quercetina, a furosina, o galato de etila, a aspirina, o meloxicam, a metisergida, o haloperidol e a apomorfina foram dissolvidas em salina contendo Tween 80. A capsaicina e a indometacina foram dissolvidas em etanol absoluto e carbonato de sódio (0,5%). A concentração final de etanol e de Tween 80 não excedeu a 5%, de modo a não influenciar nos efeitos causados pelos compostos. As demais drogas foram diluídas em salina.

### 3.8 - Análise estatística.

Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  erro padrão da média, exceto as DI<sub>50</sub>s ou as CI<sub>50</sub>s (dose ou concentração das drogas ou compostos que reduziram a resposta em 50% em relação ao grupo controle), que são apresentadas como médias geométricas acompanhadas de seus respectivos

limites de confiança, em nível de 95%. As análises estatísticas dos resultados foram realizados por meio de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de múltipla comparação utilizando-se o método de Dunnett e ou Newman Kuels, quando apropriado. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados como indicativos de significância. As  $DI_{50}$ s e/ou  $CI_{50}$ s foram estimadas a partir de experimentos individuais utilizando o método de regressão linear através do programa "Graph Pad Prism®".

## 4 - RESULTADOS

### 4.1 – Nocicepção induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético em camundongos.

Os resultados apresentados nas Figuras 5 e 6 (A e B) mostram que o galato de etila e o DPHD administrados por via intraperitoneal (29,1 – 504,6  $\mu\text{mol/kg}$ ) ou por via oral (145,6 – 1009,2  $\mu\text{mol/kg}$ ) causaram, respectivamente, inibição dependente da dose das contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético em camundongos. Contudo, quando administrados oralmente, o galato de etila e o DPHD foram menos potentes e eficazes quando comparados com a via intraperitoneal. Os valores médios das  $DI_{50}$ s (juntamente com seus intervalos de confiança de 95%) e as inibições máximas são apresentados na Tabela 1.

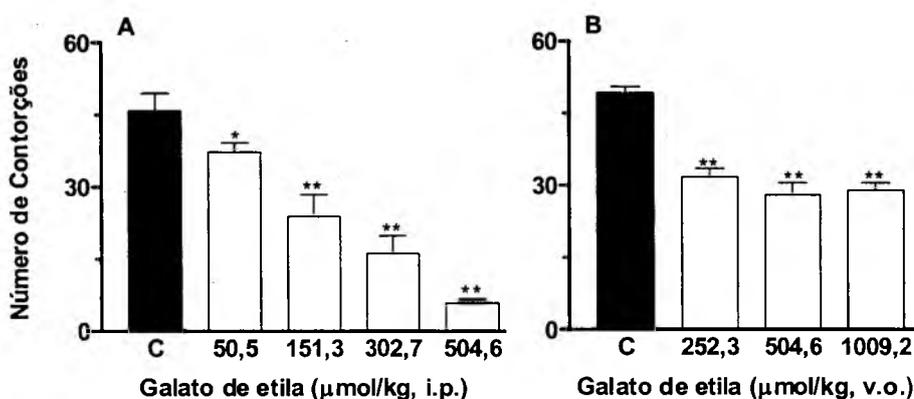


Figura 5 – Efeito antinociceptivo do galato de etila administrado pela via intraperitoneal (A) ou pela via oral (B) em relação às contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético em camundongos. Cada grupo representa a média de 8 a 10 animais, e as linhas verticais, indicam os E.P.M. Difere significativamente do controle (C), \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .

Os dados apresentados na Tabela 2 mostram que os compostos quercetina, rutina, geranina e furosina administrados pela via i.p. (0,5 – 99,2  $\mu\text{mol/kg}$ ) também causaram inibição significativa das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos. Todavia, somente a quercetina e a geranina administrados pela via oral (26,2-661,7  $\mu\text{mol/kg}$ ), a exemplo do galato de etila, causaram redução parcial, porém, significativa da dor causada pelo ácido acético (Tabela 2). Os valores médios das  $DI_{50}$ s (juntamente com seus intervalos de confiança de 95%) e as inibições máximas são apresentados na Tabela 1.

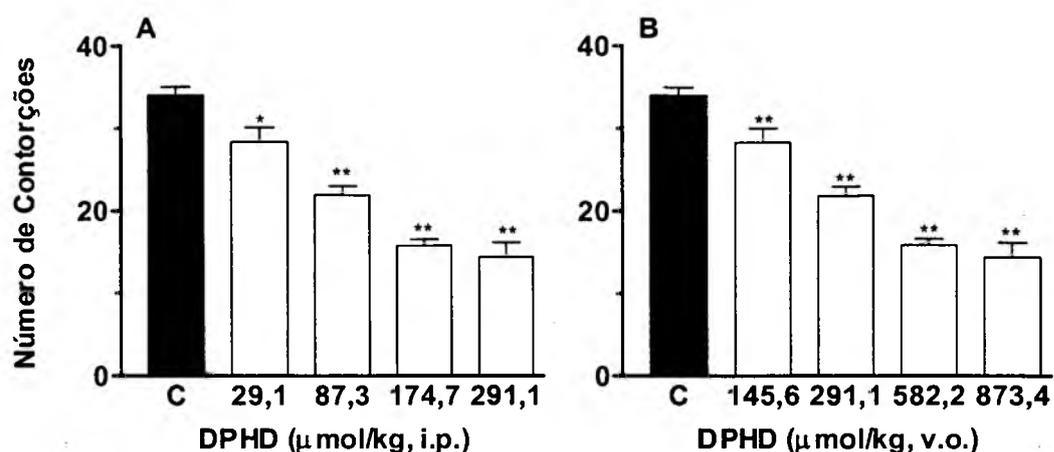


Figura 6 – Efeito antinociceptivo do DPHD administrado pela via intraperitoneal (A) ou pela via oral (B) em relação às contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 a 8 animais, e as linhas verticais, indicam os E.P.M. Difere significativamente do controle (C), \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .

Tabela 1- Comparação dos valores das  $DI_{50}$ s e inibição máximas para a atividade antinociceptiva do galato de etila, rutina, furosina, quercetina, geranina, DPHD, meloxicam, diclofenaco e aspirina no modelo de dor causado pelo ácido acético em camundongos.

Composto	Ácido acético			
	$DI_{50}$ (µmol/kg, i.p.)	Inibição (%)	$DI_{50}$ (µmol/kg, v.o.)	Inibição (%)
Galato de etila	164,2 (128,7-212,5)	88 ± 2	ND	43 ± 5
DPHD	165,0 (148,5-183,4)	57 ± 5	431,1 (370,3-502,2)	61 ± 4
Meloxicam <sup>a</sup>	7,4 (5,7-9,7)	90 ± 4	-	-
Diclofenaco <sup>a</sup>	38,0 (29,5-49,0)	93 ± 7	-	-
Aspirina <sup>b</sup>	133,1 (73,0-243,3)	83 ± 2	605,1 (516,2-705,0)	82 ± 5
Quercetina	14,2 (10,9-18,8)	93 ± 3	ND	29 ± 5
Rutina	2,1 (1,3-3,4)	88 ± 4	ND	14 ± 1
Geranina	19,9 (11,4-34,7)	51 ± 4	ND	25 ± 4
Furosina	17,9 (9,8-32,5)	61 ± 4	ND	17 ± 9

<sup>a</sup>Dados retirados de SANTOS et al. (1998), <sup>b</sup>Dados retirados de VAZ et al. (1996), ND não determinado.

Tabela 2- Efeito antinociceptivo de alguns compostos isolados das plantas do gênero *Phyllanthus*, administrados pela via intraperitoneal ou via oral, no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos

Composto	Dose ( $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.)	Nº Contorções	Dose ( $\mu\text{mol/kg}$ , v.o.)	Nº Contorções
Quercetina	0	$34,9 \pm 1,7$	0	$46,3 \pm 2,2$
	9,9	$22,3 \pm 1,8^{**}$	165,4	$42,8 \pm 2,6$
	33,0	$10,0 \pm 2,4^{**}$	330,8	$34,2 \pm 1,7^*$
	99,2	$2,3 \pm 0,5^{**}$	661,7	$35,4 \pm 2,6^*$
Rutina	0	$34,5 \pm 1,6$	0	$48,5 \pm 2,4$
	0,5	$24,0 \pm 1,2^{**}$	81,8	$49,0 \pm 1,5$
	1,6	$17,7 \pm 1,9^{**}$	163,7	$45,0 \pm 1,5$
	4,9	$12,5 \pm 2,2^{**}$	327,5	$41,7 \pm 1,0$
	16,3	$5,4 \pm 1,4^{**}$	-	-
	49,1	$4,2 \pm 1,4^{**}$	-	-
Geranina	0	$36,6 \pm 1,0$	0	$48,6 \pm 2,9$
	3,1	$33,5 \pm 1,1$	26,2	$43,5 \pm 0,9$
	10,5	$20,4 \pm 3,0^{**}$	52,5	$38,8 \pm 2,5^*$
	31,5	$17,5 \pm 1,6^{**}$	105,0	$36,5 \pm 2,0^*$
Furosina	0	$36,6 \pm 1,0$	0	$40,0 \pm 2,1$
	4,1	$27,2 \pm 2,2^{**}$	69,5	$33,0 \pm 3,9$
	13,9	$15,5 \pm 2,0^{**}$	139,0	$35,4 \pm 1,3$
	41,7	$15,0 \pm 1,9^{**}$	278,1	$37,0 \pm 2,5$

Cada grupo representa a média  $\pm$  E.P.M. de 6 a 10 animais. Difere significativamente do grupo controle (0), \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .

Os resultados apresentados na Figura 7 (A - D) mostram que o meloxicam, diclofenaco e a aspirina administrados via i.p. (2,8 – 556,7  $\mu\text{mol/kg}$ ), também causaram inibição de forma dose dependente das contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético. As  $DI_{50}$ s calculadas e as inibições máximas estão apresentados na Tabela 1. Quando a aspirina foi administrada por via oral (278,3 – 1670,3  $\mu\text{mol/kg}$ ), ela também causou significativa redução da dor induzida pelo ácido acético sendo, no entanto, menos potente que por via i.p. (Tabela 1).

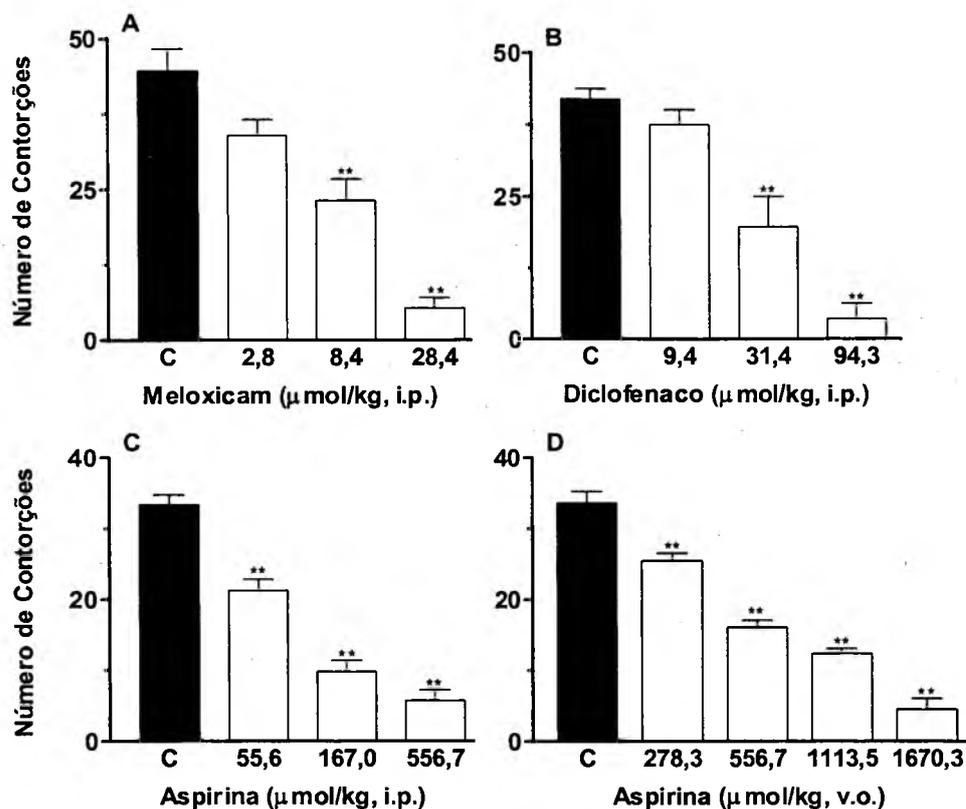


Figura 7 – Efeito antinociceptivo do meloxicam (A), diclofenaco (B) e da aspirina (C) administrado por via intraperitoneal (A) ou da aspirina administrada por via oral (D) em relação às contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 a 10 animais, e as linhas verticais, indicam os E.P.M. Difere significativamente do controle (C), \*\* $P < 0,01$ .

#### 4.2 – Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos.

Os resultados apresentados na Figura 8 (A - D) e os dados da Tabelas 3 e 4 mostram que o galato de etila, a quercetina, a rutina, a geranina e a furosina, isolados do *Phyllanthus sellowianus*, administrados por via intraperitoneal (1,0 – 198,4  $\mu\text{mol/kg}$ ) causaram significativa inibição de ambas as fases da dor induzida pela formalina, sendo contudo mais efetivos em relação à segunda fase deste modelo. As  $DI_{50}$ s calculadas tanto para a primeira quanto para a segunda fase da

dor induzida pela formalina, bem como os valores de inibição estão apresentados na Tabela 5.

Novamente, pode-se observar que quando os compostos foram administrado pela via oral (26,2 – 1009,2  $\mu\text{mol/kg}$ ), eles foram menos potentes e eficazes do que quando administrado pela via intraperitoneal. No entanto, esses compostos também causaram redução significativa da dor induzida pela formalina, sendo contudo mais efetivos em relação à segunda fase desse modelo (Figura 8 A-D e Tabelas 3 e 4).

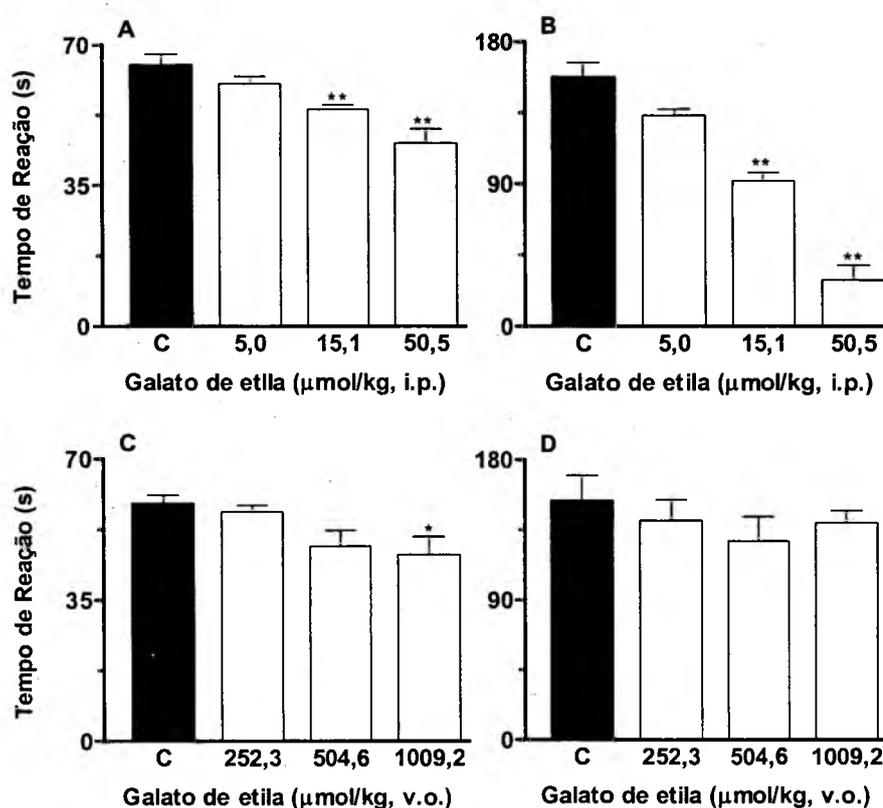


Figura 8 – Efeito do galato de etila administrado por via i.p. (painéis superiores) ou por via oral (painéis inferiores) em relação à primeira (A e C) e segunda (B e D) fase da dor induzida pela formalina. Cada grupo representa a média de 8 a 12 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do controle (C), \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .

Tabela 3- Efeito antinociceptivo da quercetina e da rutina isoladas das plantas do gênero *Phyllanthus*, administrados pela via intraperitoneal ou pela via oral, na dor neurogênica (0-5 min) e inflamatória (15-30 min) induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos.

Composto	Tempo de Reação (s)		
	0 – 5 min	15 – 30 min	
<b>Quercetina</b>			
Dose ( $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.)	0	72,0 $\pm$ 2,1	141,7 $\pm$ 6,0
	33,0	65,7 $\pm$ 4,2	89,8 $\pm$ 10,7**
	99,2	68,5 $\pm$ 3,2	37,2 $\pm$ 14,1**
	198,4	63,0 $\pm$ 3,2	21,0 $\pm$ 13,3**
Dose ( $\mu\text{mol/kg}$ , v.o.)	0	64,9 $\pm$ 3,5	212,5 $\pm$ 11,6
	165,4	61,9 $\pm$ 3,8	169,2 $\pm$ 4,9**
	330,8	57,2 $\pm$ 4,6	208,6 $\pm$ 12,6
	661,7	54,8 $\pm$ 5,6	208,6 $\pm$ 12,6
<b>Rutina</b>			
Dose ( $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.)	0	66,3 $\pm$ 3,0	166,6 $\pm$ 10,5
	1,6	69,0 $\pm$ 1,9	167,0 $\pm$ 7,0
	4,9	53,0 $\pm$ 1,7**	118,8 $\pm$ 6,1**
	16,3	36,0 $\pm$ 2,2**	42,0 $\pm$ 10,9**
	49,1	34,1 $\pm$ 2,2**	1,0 $\pm$ 0,8**
Dose ( $\mu\text{mol/kg}$ , v.o.)	0	62,5 $\pm$ 1,8	143,8 $\pm$ 7,6
	81,8	52,2 $\pm$ 2,9	144,7 $\pm$ 12,4
	163,7	50,3 $\pm$ 1,2*	107,2 $\pm$ 5,3**
	327,5	48,0 $\pm$ 2,3**	95,5 $\pm$ 6,6**

Cada grupo representa a média  $\pm$  E.P.M. de 6 a 10 animais. Difere significativamente quando comparado com o grupo controle (0), \*P<0,05; \*\*P<0,01.

Tabela 4- Efeito antinociceptivo da geranina e da furosina isoladas das plantas do gênero *Phyllanthus*, administradas por via intraperitoneal ou por via oral, na dor neurogênica (0-5 min) e inflamatória (15-30 min) induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos.

Composto		Tempo de Reação (s)	
		0 – 5 min	15 – 30 min
<b>Geranina</b>			
Dose ( $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.)	0	66,3 $\pm$ 3,0	164,0 $\pm$ 4,6
	1,0	59,0 $\pm$ 2,1*	136,0 $\pm$ 1,8**
	3,1	46,3 $\pm$ 2,4**	88,6 $\pm$ 3,9**
	10,5	39,5 $\pm$ 1,5**	22,8 $\pm$ 8,3**
	31,5	40,7 $\pm$ 2,3**	3,4 $\pm$ 0,3**
Dose ( $\mu\text{mol/kg}$ , v.o.)	0	56,0 $\pm$ 3,8	210,0 $\pm$ 13,1
	26,2	41,4 $\pm$ 1,2**	177,7 $\pm$ 14,9
	52,5	39,9 $\pm$ 2,9**	169,8 $\pm$ 22,0
	105,0	42,2 $\pm$ 3,3**	156,0 $\pm$ 13,6*
<b>Furosina</b>			
Dose ( $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.)	0	70,7 $\pm$ 5,0	213,7 $\pm$ 11,4
	13,9	53,7 $\pm$ 7,0*	122,7 $\pm$ 14,0**
	41,7	42,9 $\pm$ 5,2**	90,2 $\pm$ 13,3**
	83,4	36,6 $\pm$ 2,0**	71,7 $\pm$ 11,5**
Dose ( $\mu\text{mol/kg}$ , v.o.)	0	48,8 $\pm$ 2,2	146,5 $\pm$ 8,9
	69,5	45,0 $\pm$ 5,3	130,6 $\pm$ 13,9
	139,0	42,8 $\pm$ 4,4	111,3 $\pm$ 11,1*
	278,1	38,5 $\pm$ 2,6*	150,0 $\pm$ 12,5

Cada grupo representa a média  $\pm$  E.P.M. de 6 a 10 animais. Difere significativamente quando comparado com o grupo controle (0), \*P<0,05; \*\*P<0,01.

Os resultados da Figura 9 (A–D) mostram que o DPHD, administrado, tanto pela via i.p. (29,1 – 174,1  $\mu\text{mol/kg}$ ) quanto pela via oral (145,6 – 582,2  $\mu\text{mol/kg}$ ), causou redução significativa de ambas as fases da dor induzida pela injeção intraplantar de formalina. A exemplo dos compostos citados anteriormente, o DPHD foi mais potente e eficaz em relação à segunda fase desse modelo. Além disso, o DPHD, administrado oralmente, foi cerca de 5 vezes menos potente quando comparado com a via i.p. (Tabela 5). Outro aspecto interessante encontrado para esse composto, foi que seu efeito antinociceptivo pôde ser observado já a partir dos 30 min após sua administração e durou cerca de 6 h pela via i.p. e 8 h quando injetado oralmente (Figura 10 A-D).

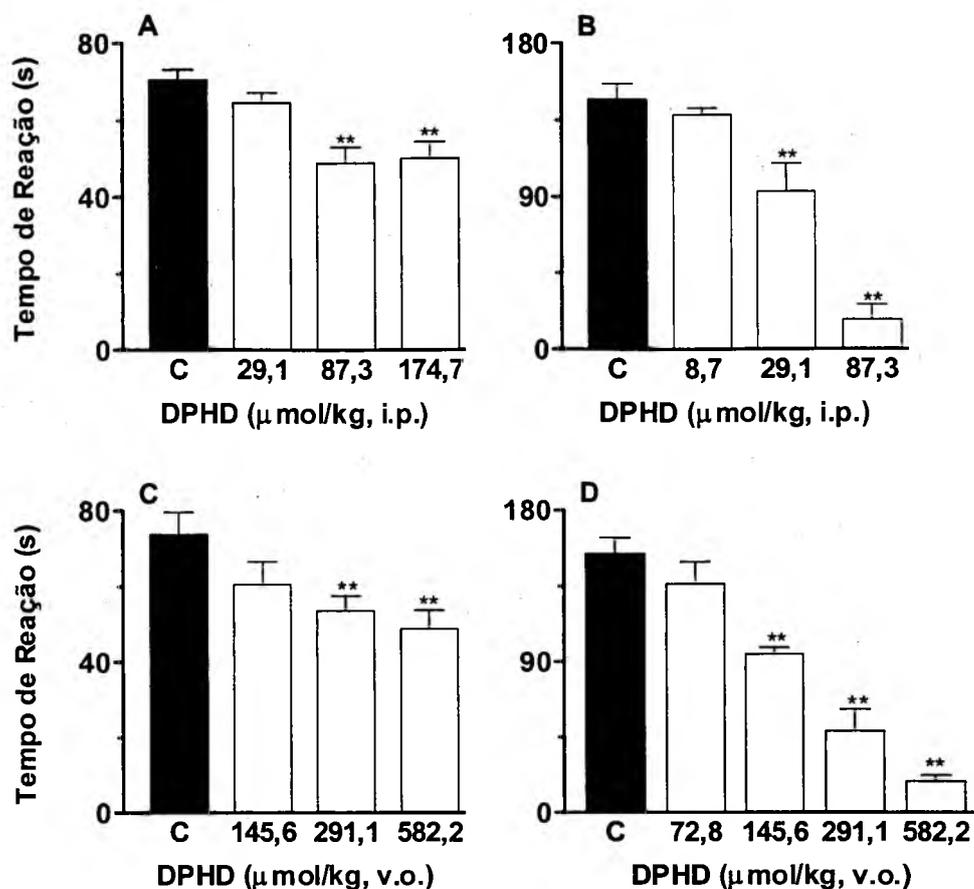


Figura 9 – Efeito do DPHD administrado por via i.p. (painéis superiores) ou por via oral (painéis inferiores) em relação à primeira (A e C) e segunda (B e D) fase da dor induzida pela formalina. Cada grupo representa a média de 6 a 8 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do controle (C), \*\*P<0,01.

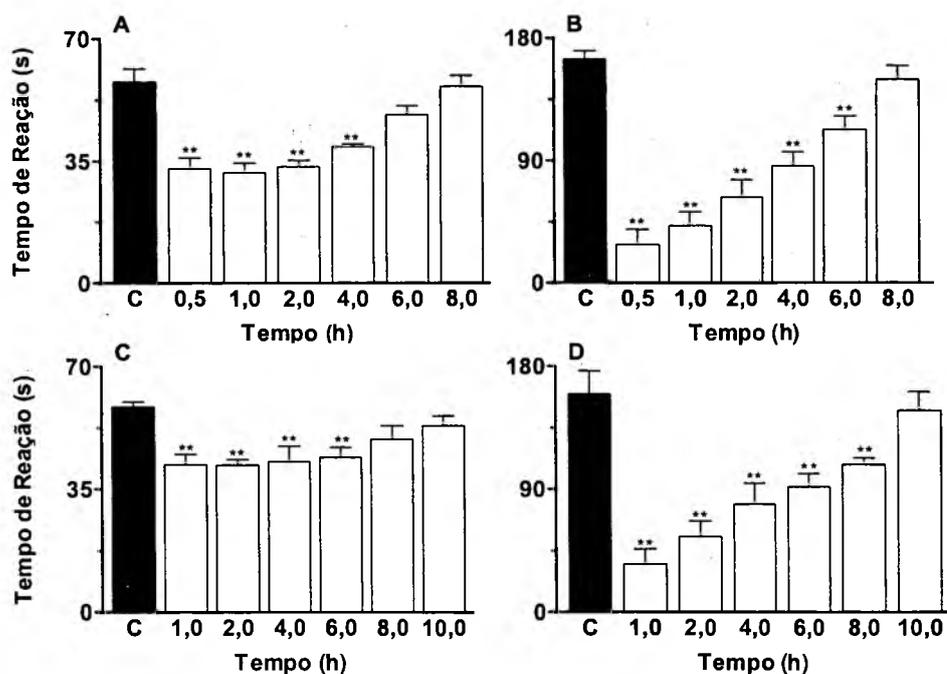


Figura 10 – Efeito antinociceptivo tempo dependente do DPHD administrado por via i.p. (87,3 μmol/kg, painéis superiores) ou por via oral (291,1 μmol/kg, painéis inferiores) em relação à primeira (A e C) e segunda (B e D) fase da dor induzida pela formalina. Cada grupo representa a média de 6 a 8 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do controle (C), \*\*P<0,01.

Ao contrário do observado para os diversos compostos, a aspirina, administrada pela via i.p. (55,6 – 556,7  $\mu\text{mol/kg}$ ) ou oralmente (556,7 – 3340,7  $\mu\text{mol/kg}$ ), apresentou inibição significativa e dependente da dose apenas em relação à segunda fase da dor induzida pela formalina (Figura 11 A-D). No entanto, ela foi cerca de 2,5 a 33 vezes menos potente que os compostos isolados das plantas em estudo, quando administrada pela via i.p.. Além disso, a aspirina foi cerca de 6 vezes menos potente que o DPHD quando administrada pela via oral (Tabela 5).

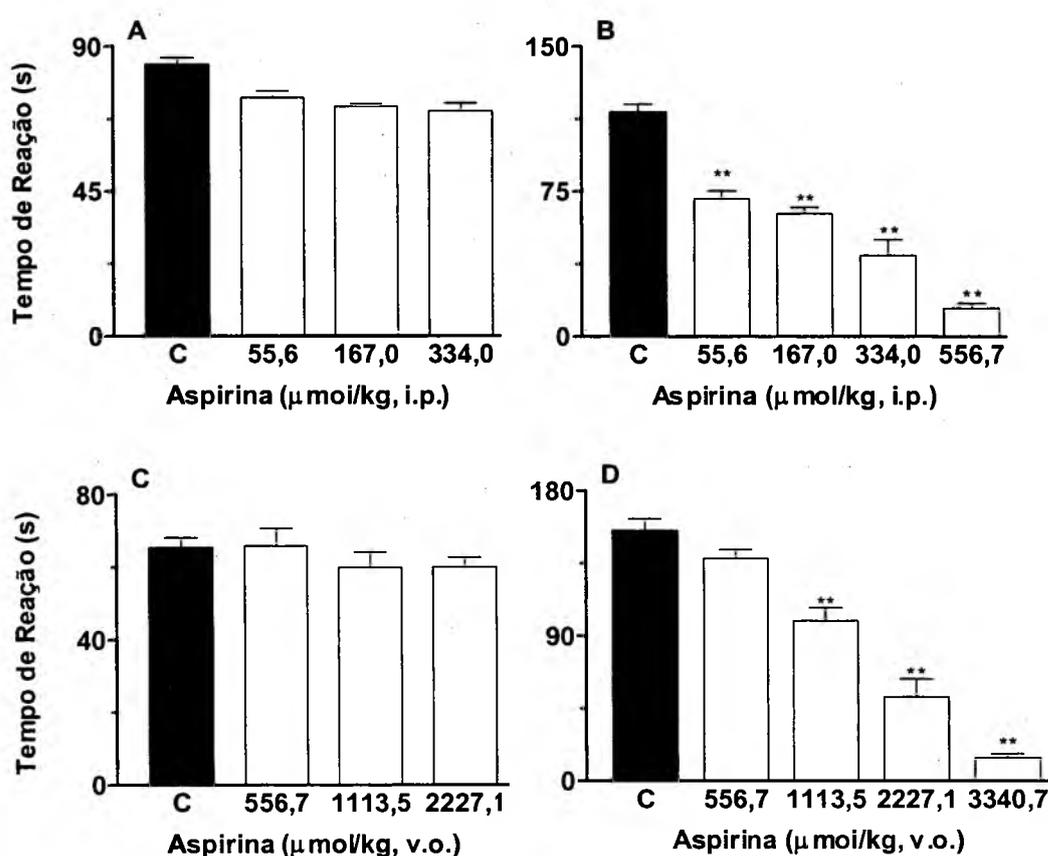


Figura 11 – Efeito da aspirina administrada por via i.p. (painéis superiores) ou por via oral (painéis inferiores) em relação à primeira (A e C) e segunda fase (B e D) da dor induzida pela formalina. Cada grupo representa a média de 6 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do controle (C), \*\* $P < 0,01$ .

Os resultados apresentados na Figura 12 (A-D) mostram que o meloxicam e o diclofenaco (0,8 – 94,3  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.), também foram efetivos em inibir ambas as fases da dor induzida pela formalina, sendo contudo, cerca de 2,5 vezes mais potente em relação à dor inflamatória induzida pela formalina. No entanto, o

meloxicam foi cerca de 12 a 44 vezes mais potente quando comparado com a aspirina e o diclofenaco nesse mesmo modelo (Tabela 5). Além disso, o meloxicam foi cerca de 1,3 a 17,4 vezes mais potente que os compostos quando analisados pela via i.p. no modelo da formalina (Tabela 5).

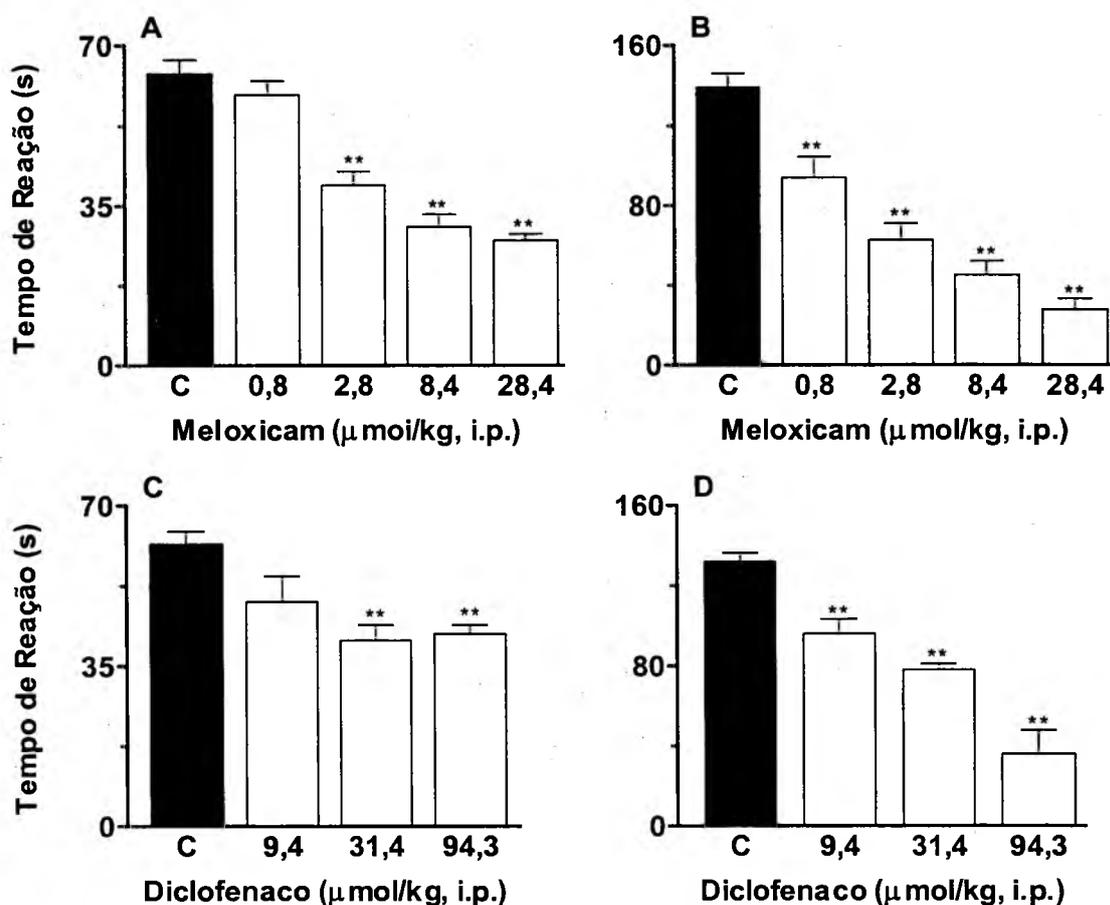


Figura 12 – Efeito antinociceptivo causado pelo meloxicam (painéis superiores) e pelo diclofenaco (painéis inferiores) administrados por via i.p. em relação à primeira (A e C) e a segunda (B e D) fase da dor induzida pela formalina. Cada grupo representa a média de 8 a 14 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do controle (C), \*\*P<0,01.

Tabela 5- Comparação dos valores das  $DI_{50}$ s e inibição máxima para a atividade antinociceptiva do galato de etila, rutina, geranina, furosina, quercetina, DPHD, meloxicam, diclofenaco e aspirina na dor neurogênica (primeira fase) e inflamatória (segunda fase) induzida pela formalina em camundongos.

Composto	Via	Teste da Formalina			
		Primeira Fase $DI_{50}$ ( $\mu\text{mol/kg}$ )	Inibição (%)	Segunda Fase $DI_{50}$ ( $\mu\text{mol/kg}$ )	Inibição (%)
Galato de etila	i.p.	ND	$26 \pm 5$	18,6 (14,6-24,7)	$82 \pm 2$
	v.o.	ND	$22 \pm 8$	ND	$26 \pm 6$
DPHD	i.p.	ND	$36 \pm 5$	48,3 (39,6-59,1)	$88 \pm 6$
	v.o.	ND	$34 \pm 6$	249,2 (191,3-324,3)	$88 \pm 3$
Meloxicam <sup>a</sup>	i.p.	7,1 (3,4-14,5)	$58 \pm 3$	2,8 (2,0-4,3)	$82 \pm 4$
Diclofenaco <sup>a</sup>	i.p.	ND	$35 \pm 6$	34,5 (25,4-46,5)	$73 \pm 8$
Aspirina <sup>b</sup>	i.p.	ND	$17 \pm 3$	123,0 (77,0-209,0)	$85 \pm 4$
	v.o.	ND	$9 \pm 4$	1565,3 (1348,8-1820,6)	$89 \pm 5$
Quercetina	i.p.	ND	$13 \pm 4$	48,9 (24,1-99,2)	$87 \pm 9$
	v.o.	ND	$16 \pm 8$	ND	$20 \pm 3$
Furosina	i.p.	~83,4	$48 \pm 3$	34,6 (28,1-42,4)	$66 \pm 5$
	v.o.	ND	$21 \pm 5$	ND	$24 \pm 7$
Rutina	i.p.	~49,1	$49 \pm 2$	7,5 (5,7-9,8)	$99 \pm 1$
	v.o.	ND	$23 \pm 4$	ND	$20 \pm 3$
Geranina	i.p.	ND	$41 \pm 2$	3,7 (3,0-4,5)	$98 \pm 1$
	v.o.	ND	$25 \pm 6$	ND	$26 \pm 6$

<sup>a</sup>Dados retirados de SANTOS et al. (1998), <sup>b</sup>Dados retirados de VAZ et al. (1996), ND, não determinado.

Os resultados apresentados na Figura 13 (A-D) e nas Tabelas 6 e 7 mostram que o galato de etila, quercetina, rutina, geranina e furosina, isolados das espécies de *Phyllanthus*, administrados por via supraespinhal (i.c.v., 1,5 – 491,3 nmol/sítio) ou espinhal (i.t., 5,0 – 491,3 nmol/sítio), foram efetivos em inibir ambas as fases da dor induzida pela formalina. As  $DI_{50}$ s calculadas tanto para a primeira, quanto para a segunda fases da dor induzida pela formalina e os valores de inibição máximas, estão apresentados na Tabela 8.

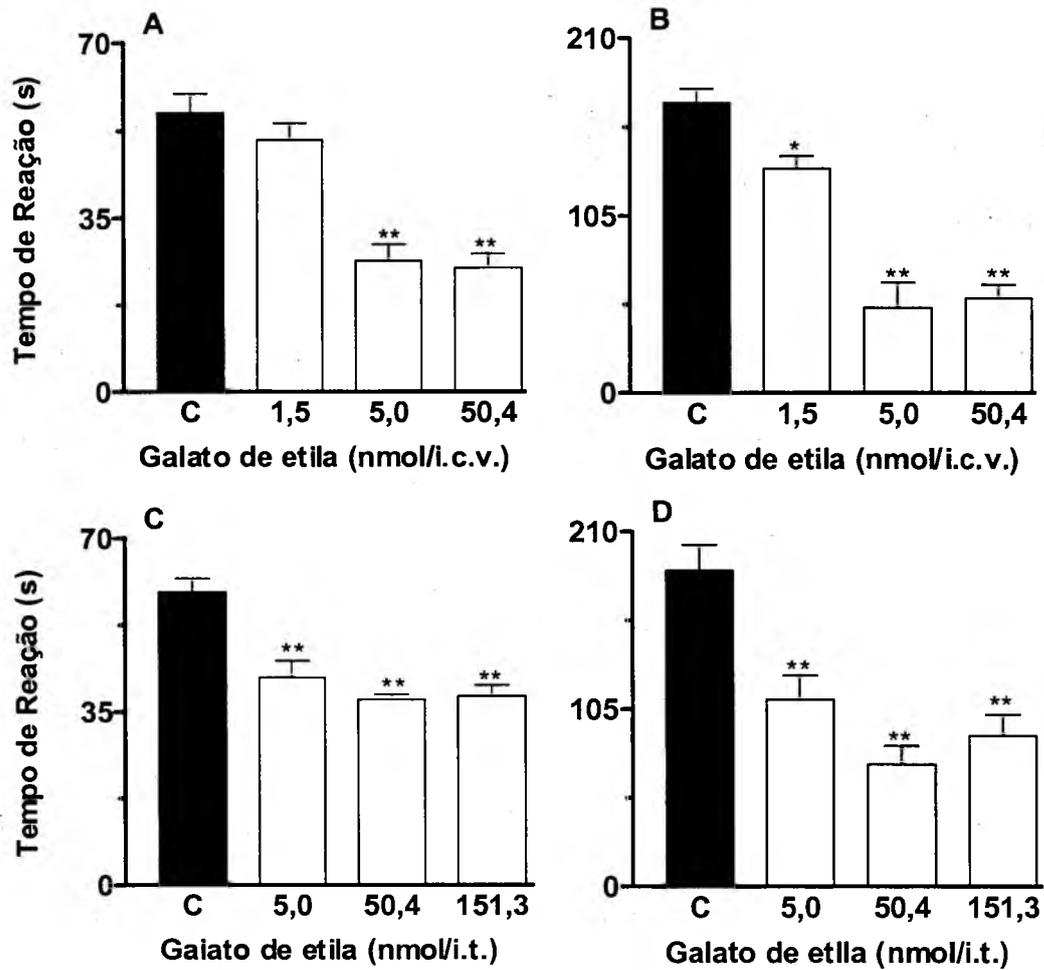


Figura 13 – Efeito do gaiato de etila administrado por via intracerebroventricular (painéis superiores) ou intratecal (painéis inferiores) em relação à primeira (A e C) e a segunda (B e D) fase da dor induzida pela formalina. Cada grupo representa a média de 8 a 14 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do controle (C), \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .

Tabela 6- Efeito antinociceptivo da quercetina e da rutina isoladas das plantas do gênero *Phyllanthus*, administradas por via intracerebroventricular (i.c.v.) ou intratecal (i.t.), na dor neurogênica (0-5 min) e inflamatória (15-30 min) induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos.

Composto		Tempo de Reação (s)	
		0 – 5 min	15 – 30 min
<b>Quercetina</b>			
Dose (nmol/i.c.v.)	0	59,2 ± 4,3	157,0 ± 8,1
	9,9	54,6 ± 7,1	126,0 ± 10,9
	33,0	46,8 ± 3,3*	64,5 ± 6,2**
	99,2	46,2 ± 4,3*	54,6 ± 7,1**
	330,8	42,0 ± 1,9**	-
Dose (nmol/i.t.)	0	58,8 ± 2,5	172,0 ± 20,0
	9,9	56,0 ± 2,5	100,0 ± 12,0**
	33,0	46,2 ± 1,9*	52,0 ± 10,0**
	99,2	37,8 ± 1,4**	60,0 ± 11,2**
	330,8	42,0 ± 1,9**	-
<b>Rutina</b>			
Dose (nmol/i.c.v.)	0	59,5 ± 2,4	141,2 ± 7,7
	16,3	48,7 ± 3,7**	104,8 ± 7,8**
	49,1	33,1 ± 2,2**	77,0 ± 8,5**
	163,8	34,8 ± 2,4**	30,7 ± 11,4**
	491,3	30,2 ± 2,3**	38,5 ± 10,9**
Dose (nmol/i.t.)	0	64,4 ± 1,4	163,8 ± 12,6
	49,1	42,0 ± 2,8**	100,8 ± 14,4**
	163,8	33,6 ± 2,8**	43,2 ± 10,8**
	491,3	33,6 ± 1,7**	28,8 ± 18,0**

Cada grupo representa a média ± E.P.M. de 6 a 10 animais. Difere significativamente quando comparado com o grupo controle (0), \*P<0,05; \*\*P<0,01.

Tabela 7- Efeito antinociceptivo da geranina e da furosina isoladas das plantas do gênero *Phyllanthus*, administradas por via intracerebroventricular (i.c.v.) e/ou intratecal (i.t.), na dor neurogênica (0-5 min) e inflamatória (15-30 min) induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos.

Composto		Tempo de Reação (s)	
		0 – 5 min	15 – 30 min
<b>Geranina</b>			
Dose (nmol/i.c.v.)	0	56,4 ± 2,6	157,0 ± 8,1
	3,1	36,8 ± 1,6**	112,8 ± 9,6**
	10,5	29,5 ± 1,2**	79,6 ± 13,1**
	31,5	31,8 ± 3,5**	43,8 ± 6,0**
	105,0	27,0 ± 4,4**	7,5 ± 2,5**
Dose (nmol/i.t.)	0	62,3 ± 1,8	162,0 ± 9,0
	10,5	42,0 ± 2,8**	133,2 ± 12,6
	31,5	30,8 ± 2,1**	66,6 ± 18,0**
	63,0	31,5 ± 1,9**	54,0 ± 14,4**
<b>Furosina</b>			
Dose (nmol/i.c.v.)	0	60,2 ± 5,6	153,0 ± 10,2
	4,1	40,6 ± 3,2**	108,8 ± 10,2*
	13,9	32,9 ± 2,1**	61,2 ± 10,2**
	41,7	18,9 ± 4,2**	37,4 ± 8,8**
	83,4	23,8 ± 2,8**	57,8 ± 9,5**
Dose (nmol/i.t.)	0	65,8 ± 1,8	165,6 ± 11,5
	13,9	49,0 ± 3,9*	109,8 ± 9,0*
	41,7	42,0 ± 2,8**	43,2 ± 18,0**
	83,4	43,4 ± 4,2**	43,2 ± 10,8**

Cada grupo representa a média ± E.P.M. de 6 a 10 animais. Difere significativamente quando comparado com o grupo controle (0), \*P<0,05; \*\*P<0,01.

A Figura 14 (A–D) mostra que o DPHD, tanto quando administrado por via supraespinhal (29,1 – 291,1 nmol/sítio), quanto espinhalmente (29,1 – 291,1 nmol/sítio), a exemplo dos outros compostos testados, também foi efetivo em inibir ambas as fases da dor induzida pela formalina. As  $DI_{50}$ s calculadas para a primeira e segunda fases da dor induzida pela formalina e os valores das inibições máximas estão apresentados na Tabela 8.

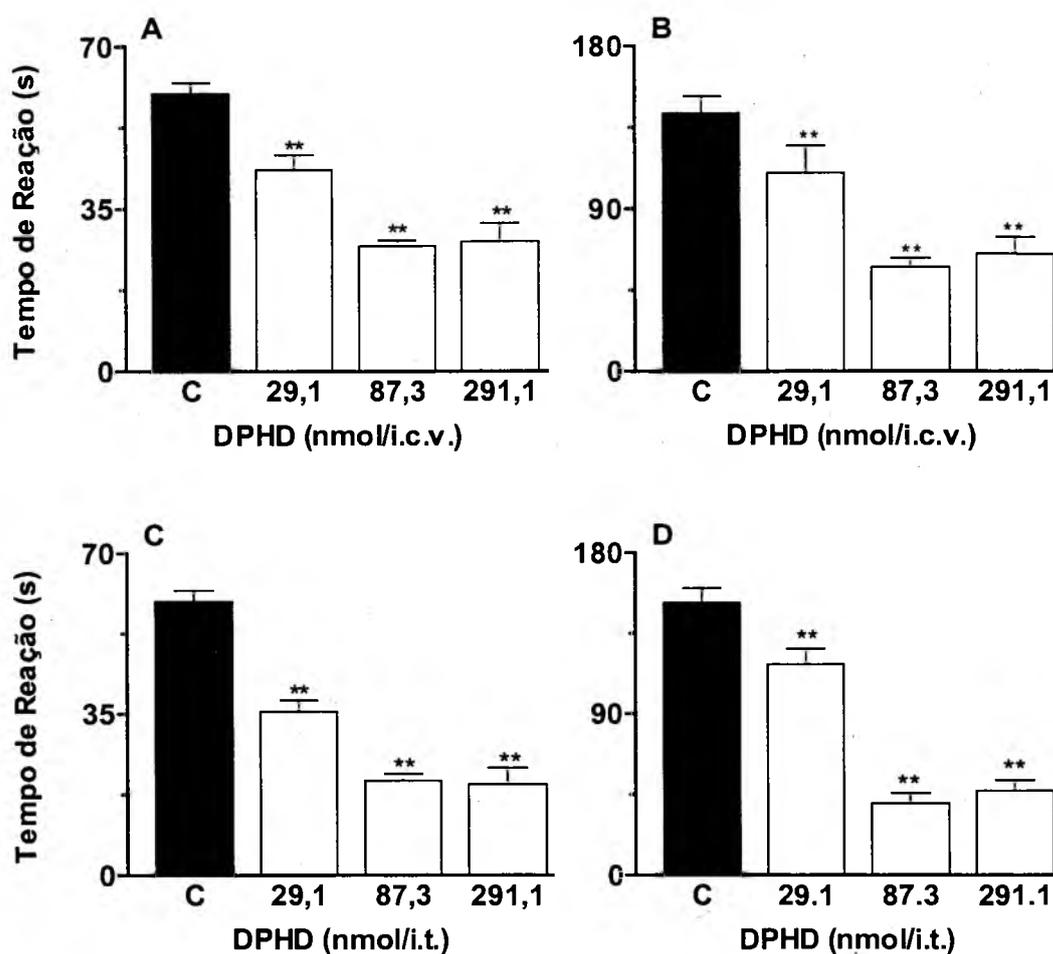


Figura 14 – Efeito antinociceptivo causado pelo DPHD administrado pela via intracerebroventricular (painéis superiores) ou intratecal (painéis inferiores) em relação à primeira (A e C) e a segunda (B e D) fase da dor induzida pela formalina. Cada grupo representa a média de 8 a 14 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do controle (C), \*\*P<0,01.

As Figuras 15 e 16 (A-D) mostram que o meloxicam e o diclofenaco, administrados por via intracerebroventricular (8,5-188,6 nmol/sítio) ou intratecalmente (8,5-188,6 nmol/sítio), também foram efetivos em inibição ambas as fases da dor induzida pela formalina, sendo este efeito maior em relação à segunda fase da dor. As  $DI_{50}$ s calculadas, tanto para a primeira quanto para a segunda fases da dor induzida pela formalina e os valores de inibição, estão apresentados na Tabela 8.

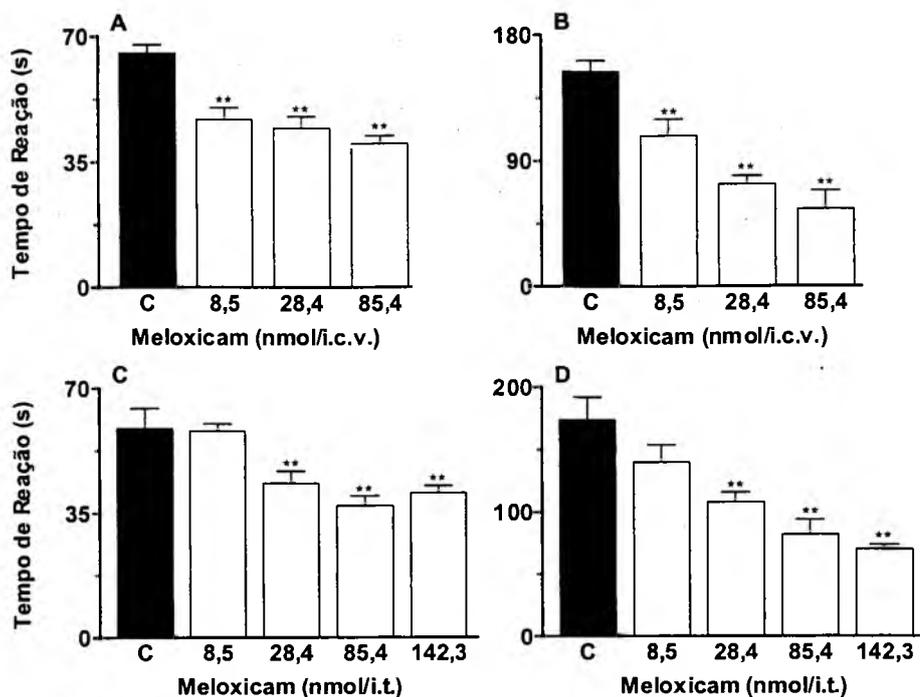


Figura 15 – Efeito do meloxicam administrado pela via intracerebroventricular (painéis superiores) ou intratecal (painéis inferiores) em relação à primeira (A e C) e segunda (B e D) fases da dor induzida pela formalina. Cada grupo representa a média de 8 a 14 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do controle (C), \*\*P<0,01.

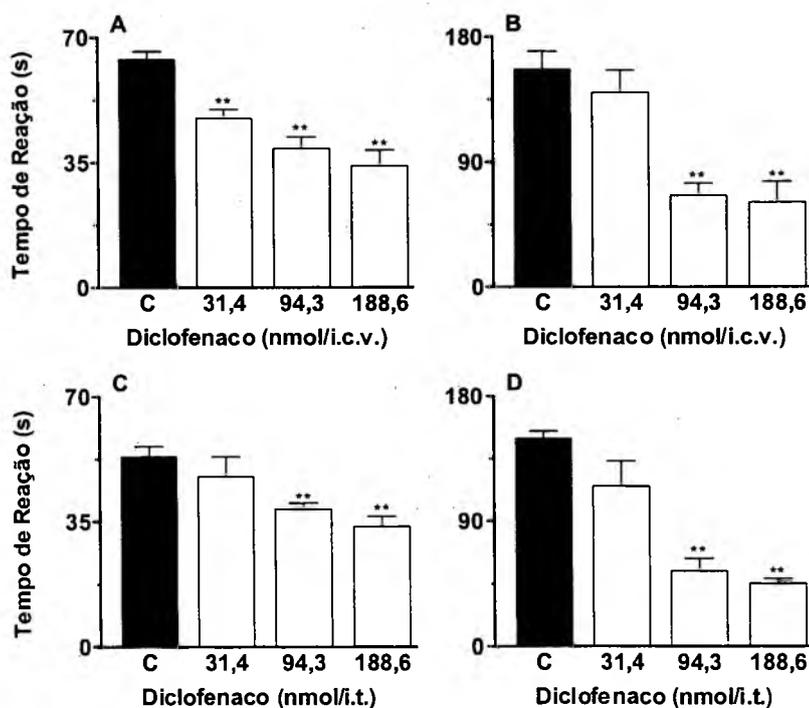


Figura 16 – Efeito do diclofenaco administrado pela via intracerebroventricular (painéis superiores) ou intratecal (painéis inferiores) em relação à primeira (A e C) e segunda (B e D) fases da dor induzida pela formalina. Cada grupo representa a média de 8 a 14 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do controle (C), \*\*P<0,01.

Tabela 8- Comparação dos valores de  $DI_{50}$ s e inibições para a atividade antinociceptiva do galato de etila, rutina, geranina, furosina, quercetina, DPHD, meloxicam e diclofenaco, administrados pela via intracerebroventricular ou intratecal, na dor neurogênica (primeira fase) e inflamatória (segunda fase) induzida pela formalina em camundongos.

Composto	Via	Teste da Formalina			
		Primeira Fase $DI_{50}$ (nmol/sítio)	Inibição (%)	Segunda Fase $DI_{50}$ (nmol/sítio)	Inibição (%)
Galato de etila	i.c.v.	17,6 (8,6-36,2)	55 ± 5	4,9 (0,7-13,1)	66 ± 9
	i.t.	ND	35 ± 4	23,4 (14,7-36,8)	74 ± 4
DPHD	i.c.v.	146,1 (114,9-193,6)	52 ± 3	112,6 (44,2-286,5)	60 ± 3
	i.t.	33,5 (13,1-85,6)	67 ± 6	56,2 (25,3-125,7)	74 ± 4
Meloxicam	i.c.v.	ND	38 ± 3	23,0 (13,0-38,0)	64 ± 9
	i.t.	ND	38 ± 5	76,8 (55,8-105,6)	58 ± 4
Diclofenaco	i.c.v.	ND	46 ± 7	60,0 (34,0-106,0)	61 ± 10
	i.t.	ND	38 ± 3	64,4 (48,5-85,6)	70 ± 2
Quercetina	i.c.v.	ND	19 ± 2	52,0 (34,8-71,4)	65 ± 5
	i.t.	ND	35 ± 3	30,4 (16,2-56,6)	70 ± 6
Furosina	i.c.v.	17,5 (14,2-21,5)	68 ± 7	19,3 (15,7-23,9)	75 ± 6
	i.t.	ND	35 ± 4	27,4 (18,2-36,8)	74 ± 4
Rutina	i.c.v.	ND	49 ± 4	67,7 (34,9-100,0)	78 ± 9
	i.t.	ND	48 ± 3	93,2 (59,3-146,4)	82 ± 10
Geranina	i.c.v.	38,8 (22,8-66,2)	52 ± 8	8,9 (2,9-27,3)	95 ± 2
	i.t.	ND	49 ± 4	18,2 (13,6-24,1)	66 ± 5

ND, não determinado.

#### 4.3 – Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos.

O tratamento dos animais com o galato de etila, quercetina, rutina, furosina, geranina, DPHD, meloxicam e diclofenaco (0,8 – 198,4  $\mu$ mol/kg, i.p.), causou redução significativa da dor neurogênica induzida pela injeção intraplantar de capsaicina (1,6  $\mu$ g/pata) (Figuras 17, 18 e 19 e Tabela 9). No entanto, a

indometacina, administrada por via intraperitoneal (2,8 – 27,9  $\mu\text{mol/kg}$ ), foi completamente destituída de efeito antinociceptivo nesse modelo (resultados não demonstrados).

Administrados oralmente, o galato de etila e o DPHD (72,8 – 1009,2  $\mu\text{mol/kg}$ ) também foram capazes de inibir de forma significativa a dor causada pela capsaicina em camundongos (Figuras 17 e 18). As  $\text{DI}_{50}$ s calculadas e os valores de inibição estão apresentados na Tabela 10. A quercetina, rutina e a furosina não foram analisadas via oral, nesse modelo, devido à reduzida atividade antinociceptiva desses compostos, quando administrados pela via oral nos modelos de dor analisados anteriormente.

Os resultados apresentados na Figura 18 e 19, mostram também que o DPHD, o meloxicam e o diclofenaco, administrados pelas vias i.c.v. e/ou i.t. (8,7 – 291,1 nmol/sítio) foram efetivos em reduzir, de forma significativa, a dor neurogênica induzida pela capsaicina. As  $\text{DI}_{50}$ s calculadas e os valores de inibição estão apresentados na Tabela 10.

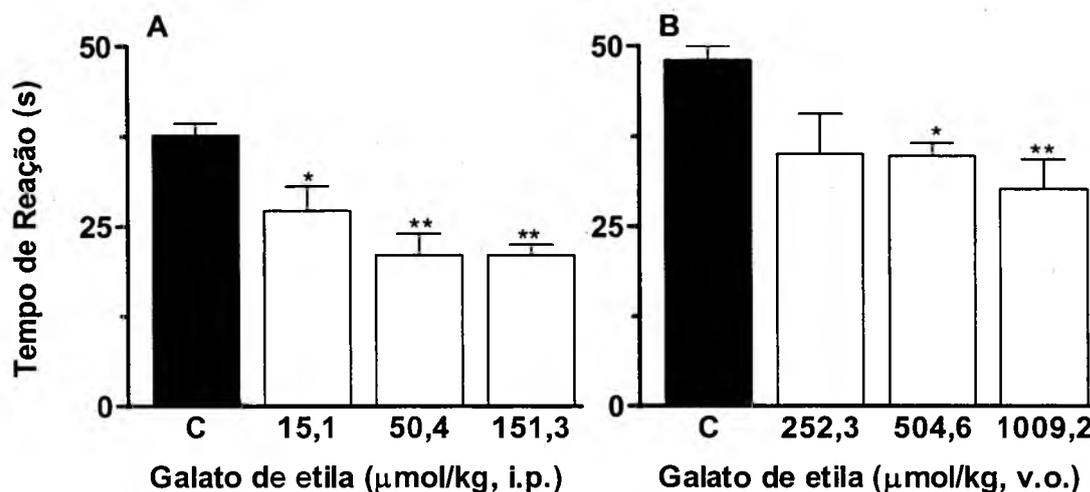


Figura 17 – Efeito do galato de etila administrado por via intraperitoneal (A) ou oral (B) em relação à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos. Cada grupo representa a média de 8 a 10 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do controle (C), \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .

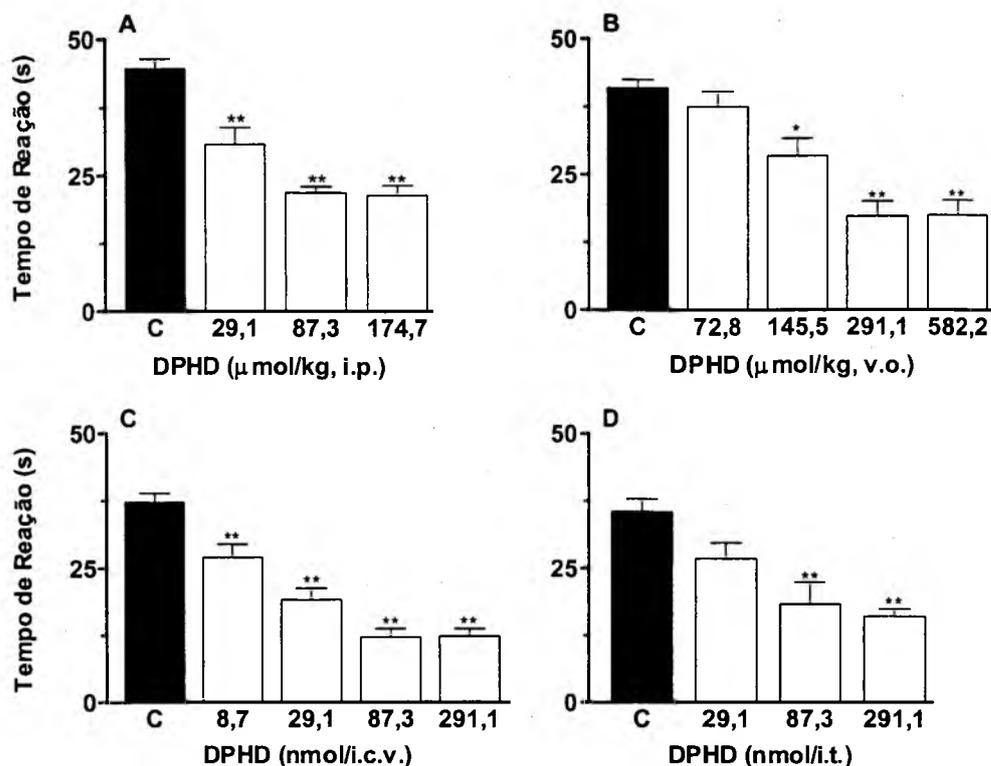


Figura 18 – Efeito do DPHD administrado por via intraperitoneal (A), oral (B), intracerebroventricular (C) ou intratecal (D) em relação à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos. Cada grupo representa a média de 8 a 10 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do controle (C), \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .

Tabela 9- Efeito da quercetina, rutina, geranina e da furosina isoladas das plantas do gênero *Phyllanthus*, administrados por via intraperitoneal, na dor neurogênica induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos.

Composto	Dose ( $\mu\text{mol/kg}$ )	Tempo de Reação (s)
Quercetina	0	$41,6 \pm 3,2$
	33,0	$29,7 \pm 3,1^*$
	99,2	$33,6 \pm 4,0$
	198,4	$31,0 \pm 4,8$
Rutina	0	$44,8 \pm 2,6$
	4,9	$22,3 \pm 4,3^{**}$
	16,3	$11,8 \pm 1,9^{**}$
	49,1	$13,8 \pm 1,9^{**}$
Geranina	0	$46,8 \pm 3,2$
	3,1	$29,0 \pm 1,8^{**}$
	10,5	$33,5 \pm 4,7^*$
	31,5	$35,8 \pm 4,2$
Furosina	0	$36,6 \pm 1,0$
	1,4	$43,2 \pm 1,3$
	4,1	$29,0 \pm 1,0^{**}$
	13,9	$16,5 \pm 2,2^{**}$
	41,7	$5,0 \pm 1,6^{**}$
	83,4	$4,1 \pm 1,4^{**}$

Cada grupo representa a média  $\pm$  E.P.M. de 6 a 10 animais. Difere significativamente quando comparado com o grupo controle (0), \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .

Tabela 10- Comparação dos valores das  $DI_{50}$ s e inibição máximas para a atividade antinociceptiva do galato de etila, rutina, furosina, quercetina, geranina, DPHD, meloxicam e diclofenaco no modelo de dor neurogênica causado pelo injeção intraplantar de capsaicina em camundongos.

Composto	Teste da capsaicina		
	Via	$DI_{50}$	Inibição (%)
Galato de etila	i.p. ( $\mu\text{mol/kg}$ )	ND	$44 \pm 4$
	v.o. ( $\mu\text{mol/kg}$ )	ND	$37 \pm 9$
DPHD	i.p. ( $\mu\text{mol/kg}$ )	105,6 (75,7-147,3)	$53 \pm 3$
	v.o. ( $\mu\text{mol/kg}$ )	285,3 (211,3-385,1)	$58 \pm 7$
	i.c.v. (nmol/sítio)	40,4 (27,6-59,1)	$67 \pm 4$
	i.t. (nmol/sítio)	154,8 (96,4-248,6)	$55 \pm 4$
Furosina	i.p. ( $\mu\text{mol/kg}$ )	9,9 (4,7-20,3)	$87 \pm 4$
Geranina	i.p. ( $\mu\text{mol/kg}$ )	ND	$37 \pm 4$
Quercetina	i.p. ( $\mu\text{mol/kg}$ )	ND	$30 \pm 8$
Rutina	i.p. ( $\mu\text{mol/kg}$ )	5,4 (4,4-6,5)	$74 \pm 4$
Meloxicam	i.p. ( $\mu\text{mol/kg}$ ) <sup>a</sup>	4,0 (2,6-6,0)	$62 \pm 6$
	i.c.v. (nmol/sítio)	ND	$49 \pm 7$
	i.t. (nmol/sítio)	10,6 (7,4-15,2)	$61 \pm 5$
	Diclofenaco	i.p. ( $\mu\text{mol/kg}$ ) <sup>a</sup>	47,4 (34,5-65,4)
	i.c.v. (nmol/sítio)	ND	$45 \pm 9$
	i.t. (nmol/sítio)	ND	$44 \pm 5$

<sup>a</sup>Dados retirados de SANTOS et al. (1998), ND não determinado.

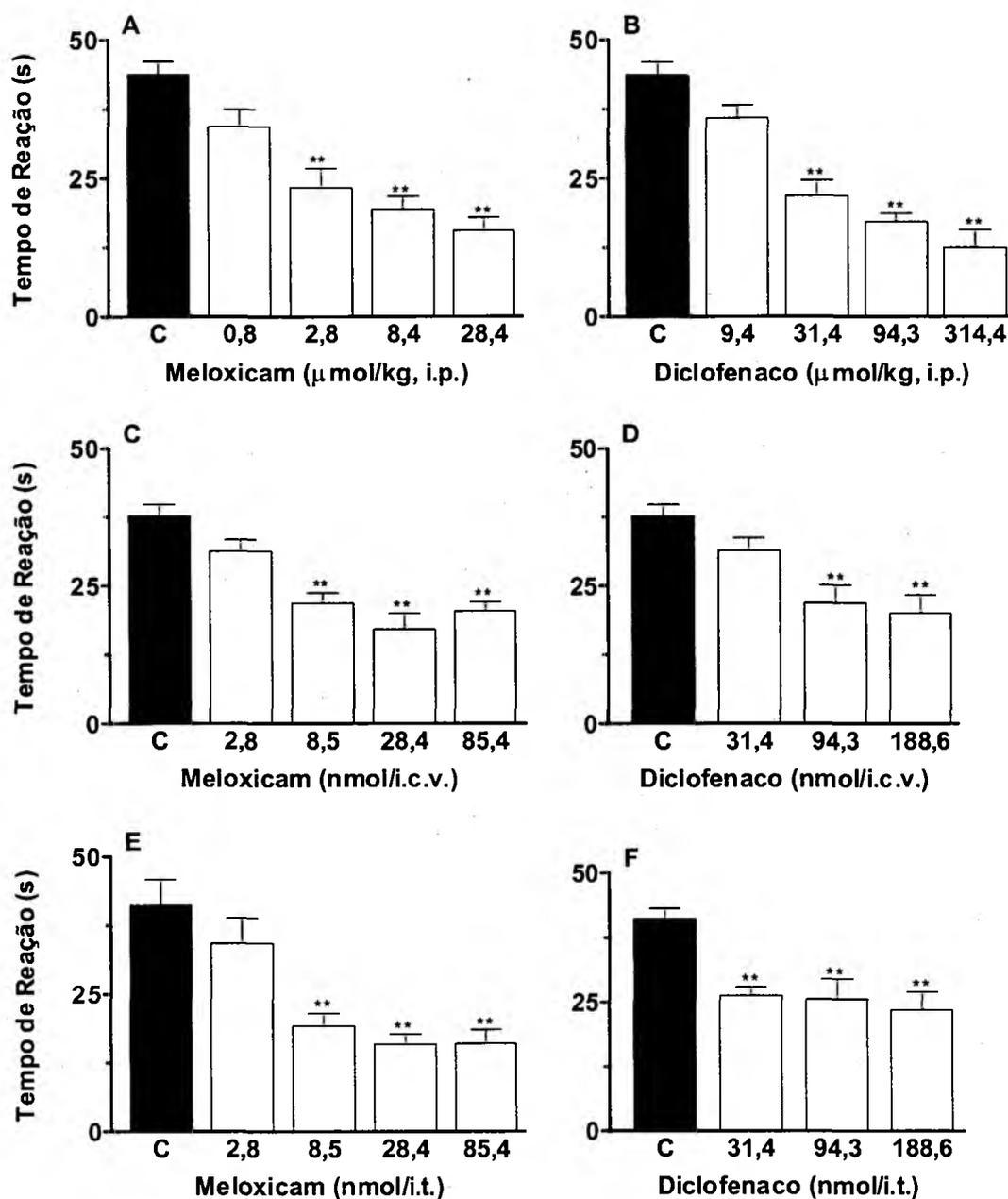


Figura 19 – Efeito do meloxicam (A, C e E) e do diclofenaco (B, D e F) administrados por via intraperitoneal (A e B), intracerebroventricular (C e D) ou intratecal (E e F) em relação à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos. Cada grupo representa a média de 8 a 10 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do controle (C), \*\* $P < 0,01$ .

#### 4.4 - Efeito do galato de etila e do DPHD no teste da placa quente em camundongos.

Os resultados mostrados na Tabela 11 indicam que o tratamento dos animais com o galato de etila (151,3  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.), meloxicam (28,4  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) ou com o diclofenaco (314,4  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) não alterou de forma significativa a latência ao estímulo térmico quando analisados no teste da placa quente.

Os dados apresentados na Tabela 12 também mostram que o DPHD administrado pelas vias i.p. (291,1  $\mu\text{mol/kg}$ ), i.c.v. (291,1  $\text{nmol/sítio}$ ) ou i.t. (291,1  $\text{nmol/sítio}$ ) não foi capaz de aumentar a latência dos animais no teste da placa quente. Ao contrário, o tratamento dos animais com morfina por via s.c. (31,0  $\mu\text{mol/kg}$ ), i.c.v. (15,5  $\text{nmol/sítio}$ ) ou i.t. (15,5  $\text{nmol/sítio}$ ) causou significativo aumento da latência dos animais quando avaliada nesse modelo (Tabela 12).

Tabela 11- Influência do galato de etila, meloxicam, diclofenaco na latência ao estímulo térmico no teste da placa quente em camundongos.

Tratamento	Via	Dose	PEM%
Controle	i.p. (ml/kg)	10	2,5 $\pm$ 1,6
Galato de etila	i.p. ( $\mu\text{mol/kg}$ )	151,3	1,5 $\pm$ 4,0
Meloxicam	i.p. ( $\mu\text{mol/kg}$ )	28,4	2,5 $\pm$ 1,2
Diclofenaco	i.p. ( $\mu\text{mol/kg}$ )	314,4	8,75 $\pm$ 3,1

Cada grupo representa a média  $\pm$  E.P.M. de 6 a 10 animais. PEM, porcentagem máxima de efeito.

Tabela 12- Influência da morfina e do DPHD na latência ao estímulo térmico no teste da placa quente em camundongos.

Tratamento	Via	Dose	PEM%
Controle	i.p. (ml/kg)	10	-2,2 $\pm$ 6,0
	i.c.v. ( $\mu\text{l/sítio}$ )	5	2,4 $\pm$ 6,0
	i.t. ( $\mu\text{l/sítio}$ )	5	-2,1 $\pm$ 5,0
DPHD	i.p. ( $\mu\text{mol/kg}$ )	291,1	12,3 $\pm$ 8,0
	i.c.v. ( $\text{nmol/sítio}$ )	291,1	9,8 $\pm$ 7,6
	i.t. ( $\text{nmol/sítio}$ )	291,1	-8,2 $\pm$ 7,0
Morfina	s.c. ( $\mu\text{mol/kg}$ )	31,0	100**
	i.c.v. ( $\mu\text{mol/sítio}$ )	15,5	94,0 $\pm$ 6,0**
	i.t. ( $\mu\text{mol/sítio}$ )	15,5	74,0 $\pm$ 6,0**

Cada grupo representa a média  $\pm$  E.P.M. de 6 a 10 animais. Difere significativamente quando comparado com o grupo controle, \*\*P<0,01, PEM, porcentagem máxima de efeito.

#### 4.5 - Efeito do galato de etila e do DPHD na performance motora (rota-rod)

O galato de etila (151,3  $\mu\text{mol/kg}$ ) ou o DPHD (291,1  $\mu\text{mol/kg}$ ) administrados intraperitonealmente, não foram capazes de alterar significativamente o desempenho e nem o tempo de permanência dos camundongos no aparelho do "Rota-rod" quando comparado com o grupo controle (tratados somente com o veículo) (resultados não apresentados).

#### 4.6 – Análise do mecanismo de ação antinociceptiva do galato de etila e do DPHD.

##### - Estudos "In vivo"

##### 4.6.1 – Participação do sistema opióide.

Os resultados apresentados na Figura 20 demonstram que o pré-tratamento dos animais com naloxona (13,7  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p., antagonista opióide não seletivo) causou reversão completa do efeito antinociceptivo induzido pela administração de morfina (13,3  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c., agonista opióide não seletivo). No entanto, o mesmo tratamento dos animais com naloxona não alterou a antinocicepção causada pelo galato de etila (50,5  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) quando analisada em relação à dor induzida pela formalina.

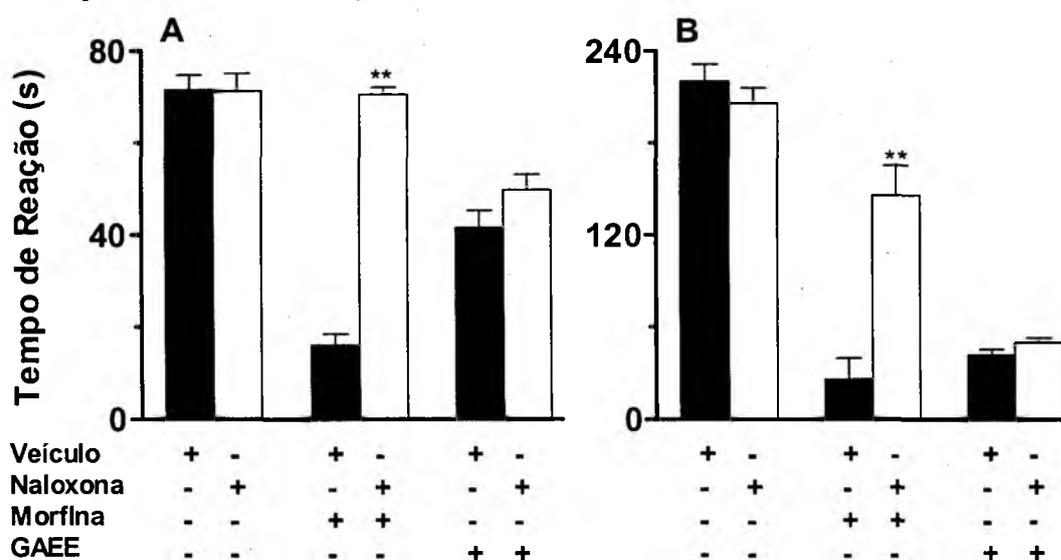


Figura 20 – Influência do pré-tratamento de camundongos com naloxona (13,7  $\mu\text{mol/kg}$ ) sobre o efeito antinociceptivo causado pelo galato de etila (GAEE, 50,5  $\mu\text{mol/kg}$ ) ou morfina (13,3  $\mu\text{mol/kg}$ ) em relação à primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina. Cada grupo representa a média de 6 a 8 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do controle pré-tratado com veículo (barras cheias), \*\* $P < 0,01$ .

Ao contrário do que foi observado para o galato de etila, o pré-tratamento dos animais com naloxona (3,0  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p., antagonista opióide não seletivo) foi capaz de antagonizar completamente o efeito antinociceptivo induzido pelo DPHD (87,3  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.), bem como o da morfina (15,5  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.), quando analisada em relação à dor induzida pela formalina (Figura 21). Além da naloxona, o naltrindol (2,2  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p., antagonista seletivo dos receptores opióide do tipo  $\delta$ ) e a nor-binaltrorfimina (1,4  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p., antagonista seletivo dos receptores opióide do tipo  $\kappa$ ) também foram efetivas em antagonizar, de forma significativa e quase que completamente, o efeito antinociceptivo causado pelo DPHD quando analisado na dor induzida pela formalina (Figura 21). No entanto, a ciprodimina (2,3  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p., antagonista seletivo dos receptores opióide do tipo  $\mu$ ) foi capaz de reverter significativamente o efeito antinociceptivo do DPHD somente na segunda fase da dor causada pela formalina. Ao contrário do observado para o DPHD, somente a ciprodimina foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo induzido pela morfina na segunda da desse modelo (Figura 21).

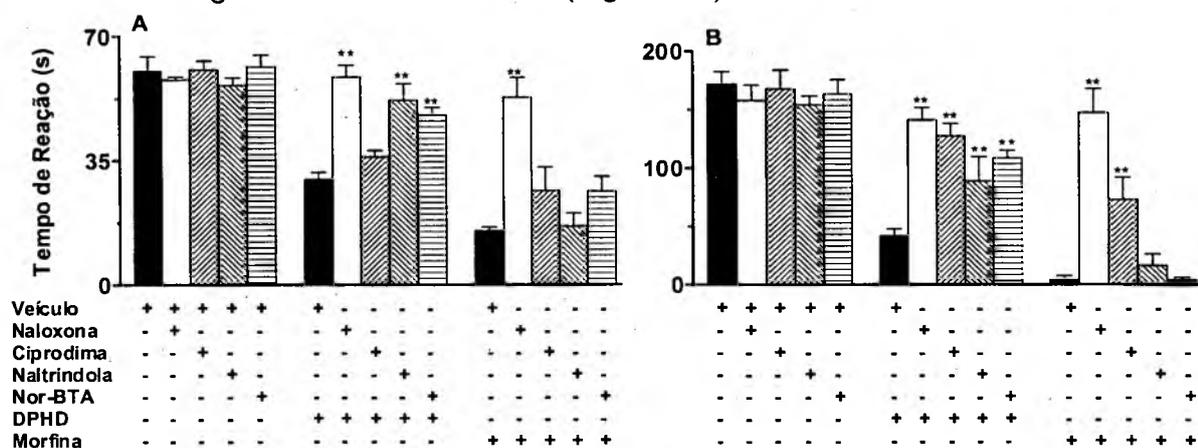


Figura 21 – Influência do pré-tratamento de camundongos com naloxona (3,0  $\mu\text{mol/kg}$ ), ciprodimina (2,3  $\mu\text{mol/kg}$ ), naltrindol (2,2  $\mu\text{mol/kg}$ ) e nor-binaltrorfimina (Nor-BTA, 1,4  $\mu\text{mol/kg}$ ) sobre o efeito antinociceptivo causado pelo DPHD (87,3  $\mu\text{mol/kg}$ ) ou morfina (13,3  $\mu\text{mol/kg}$ ) em relação à primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina. Cada grupo representa a média de 6 a 8 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do controle pré-tratado com o veículo (barras cheias), \*\*P<0,01.

#### 4.6.2 – Participação da proteína $G_{i/o}$ sensível a toxina pertussis

O pré-tratamento dos animais com a toxina pertussis (inativador da proteína  $G_{i/o}$ , 1,0  $\mu\text{g/i.c.v.}$ ; 7 dias antes) causou inibição significativa da antinocicepção provocada pela morfina (13,3  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.) bem como aquela

causada pelo galato de etila (50,5  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) quando analisado em relação a ambas as fases da dor induzida pela formalina (Figura 22).

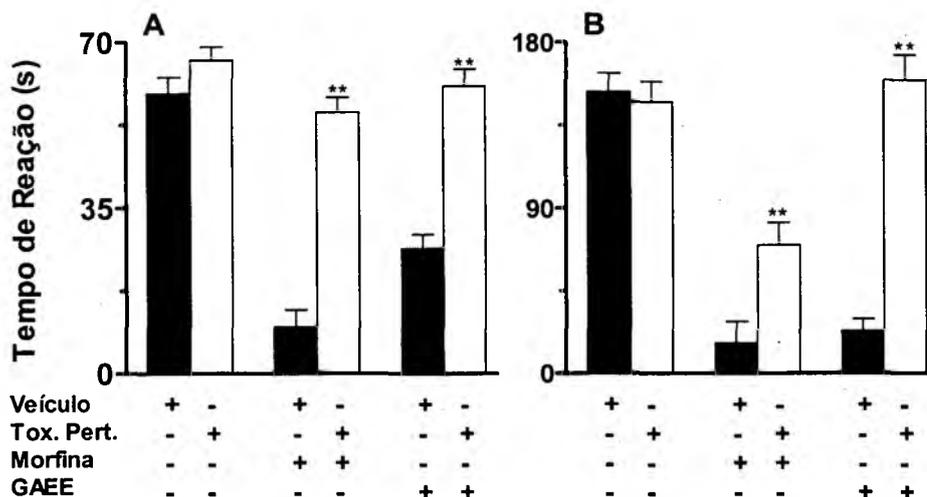


Figura 22 – Influência do pré-tratamento de camundongos com toxina pertussis (Tox. Pert., 1,0  $\mu\text{g/i.c.v.}$ ) sobre o efeito antinociceptivo causado pelo galato de etila (GAEE, 50,5  $\mu\text{mol/kg}$ ) ou morfina (13,3  $\mu\text{mol/kg}$ ) em relação à primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina. Cada grupo representa a média de 6 a 8 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do controle (barras cheias), \*\* $P < 0,01$ .

A Figura 23 mostra que o pré-tratamento dos animais com toxina pertussis (1,0  $\mu\text{g/sítio}$ , 7 dias antes), foi capaz de reverter de forma significativa, e efeito antinociceptivo do DPHD, somente na segunda fase da nocicepção induzida pela formalina, ao passo, que o mesmo tratamento reverteu significativamente o efeito antinociceptivo causado pela morfina (15,5  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.), quando analisado em relação à ambas as fases da nocicepção induzido pela formalina (Figura 23).

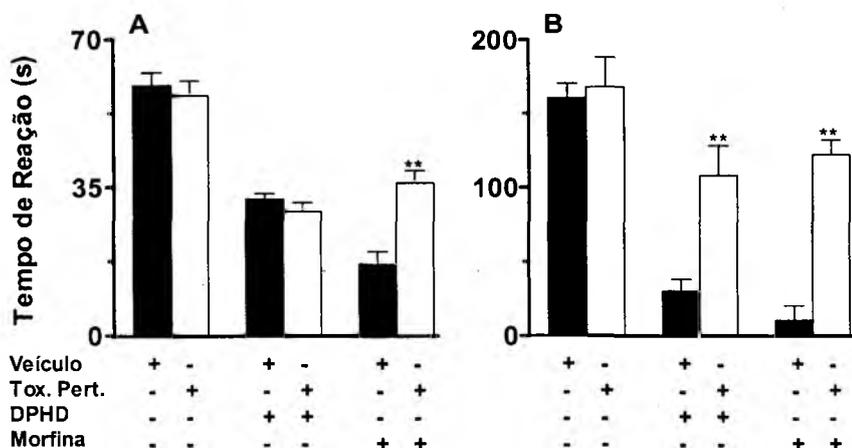


Figura 23 – Influência do pré-tratamento de camundongos com toxina pertussis (Tox. Pert., 1,0  $\mu\text{g/i.c.v.}$ ) sobre o efeito antinociceptivo causado pelo DPHD (87,3  $\mu\text{mol/kg}$ ) ou morfina (15,5  $\mu\text{mol/kg}$ ) em relação à primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina. Cada grupo representa a média de 6 a 8 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do controle pré-tratado com o veículo (barras cheias), \*\* $P < 0,01$ .

#### 4.6.3 – Participação de canais de potássio.

A participação dos canais de potássio modulados por cálcio de baixa e alta condutância e por ATP na antinocicepção causada pelo galato de etila (50,5  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) fica evidente pela reversão do seu efeito antinociceptivo com o pré-tratamento dos animais com a apamina (50 ng/i.t., bloqueador seletivo de canal de potássio de baixa condutância ativado por cálcio), caribdotoxina (250 pg/i.t., bloqueador seletivo de canal de potássio de alta condutância ativado por cálcio) e pela glibenclamida (100  $\mu\text{g/i.t.}$ , bloqueador de canal de potássio modulados por ATP) quando analisado na dor causada pela formalina (Figura 24). No entanto, o pré-tratamento dos animais com o tetraetilamônio (1  $\mu\text{g/i.t.}$ , bloqueador não seletivo de canal de potássio dependente de voltagem) não foi capaz de modificar o efeito antinociceptivo induzido pelo galato de etila (Figura 24). Ao contrário do observado para o galato de etila, o tratamento dos animais com os bloqueadores de canais de potássio não alteraram a resposta antinociceptiva causado pelo DPHD quando analisado em relação a ambas as fases da nocicepção induzida pela formalina (Figura 25).

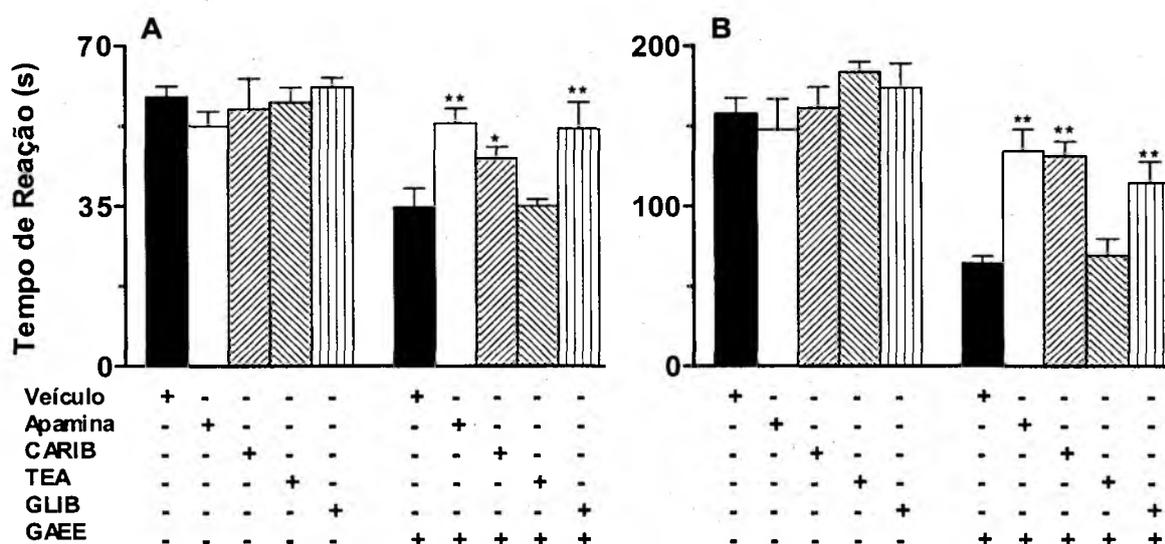


Figura 24 – Influência do pré-tratamento de camundongos com a apamina (50 ng/i.t.), caribdotoxina (CARIB, 250 pg/i.t.), glibenclamida (GLIB, 100  $\mu\text{g/i.t.}$ ) ou com o tetraetilamônio (TEA, 1  $\mu\text{g/i.t.}$ ) sobre o efeito antinociceptivo causado pelo galato de etila (GAEE, 50,5  $\mu\text{mol/kg}$ ) em relação à primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina. Cada grupo representa a média de 6 a 8 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do controle pré-tratado com o veículo (barras cheias), \*P < 0,05; \*\*P < 0,01.

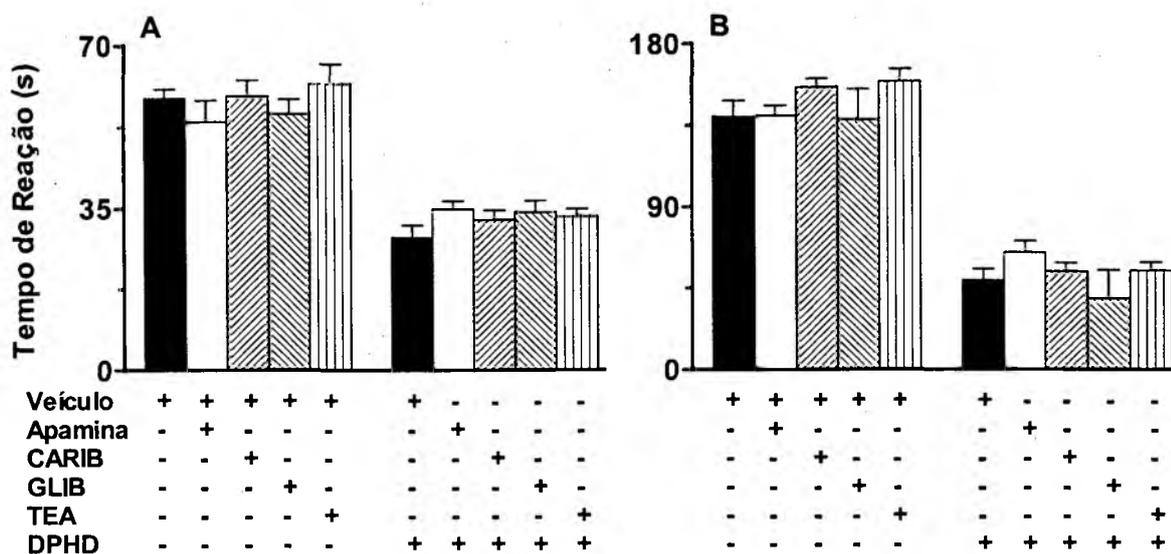


Figura 25 – Influência do pré-tratamento de camundongos com a apamina (50 ng/i.t.), caribdotoxina (CARIB, 250 pg/i.t.), glibenclamida (GLIB, 100  $\mu$ g/i.t.) ou com o tetraetilamônio (TEA, 1  $\mu$ g/i.t.) sobre o efeito antinociceptivo causado pelo DPHD (87,3  $\mu$ mol/kg) em relação à primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina. Cada grupo representa a média de 6 a 8 animais, e as linhas verticais, os E.P.M.

#### 4.6.4 - Efeito do pré-tratamento com L-arginina.

Os resultados apresentados na Figura 26 mostram que o pré-tratamento dos animais com L-arginina (substrato da óxido nítrico sintase, 3,4 mmol/kg, i.p.), reverteu completamente a ação antinociceptiva causado pela administração de L-NOARG (342,0  $\mu$ mol/kg, i.p.). No entanto, o mesmo tratamento com L-arginina não interferiu de maneira significativa na atividade antinociceptiva produzida pelo galato de etila (50,5  $\mu$ mol/kg, i.p.), quando analisado em relação à dor induzida pela injeção de formalina (Figura 26).

Ao contrário do que foi observado para o galato de etila, o pré-tratamento dos animais com L-arginina foi capaz de inibir, de forma significativa, a atividade antinociceptiva causada pelo DPHD (87,3  $\mu$ mol/kg, i.p.) em relação a ambas as fases da dor induzida pela formalina, sendo que esse mesmo tratamento também reverteu significativamente a ação antinociceptiva produzida pela morfina (15,5  $\mu$ mol/kg, s.c.) somente na segunda fase da dor causada pela formalina (Figura 27).

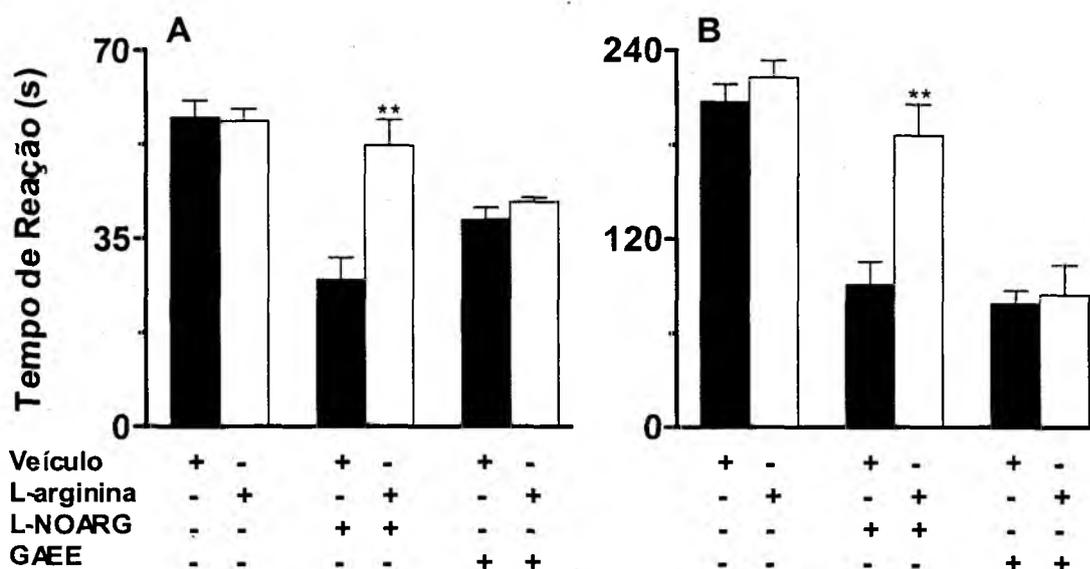


Figura 26 – Influência do pré-tratamento de camundongos com a L-arginina (3,4 mmol/kg) sobre o efeito antinociceptivo causado pelo galato de etila (GAEE, 50,5  $\mu\text{mol/kg}$ ) ou L-NOARG (342,0  $\mu\text{mol/kg}$ ) em relação à primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina. Cada grupo representa a média de 6 a 8 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do controle pré-tratado com o veículo (barras cheias), \*\*P<0,01.

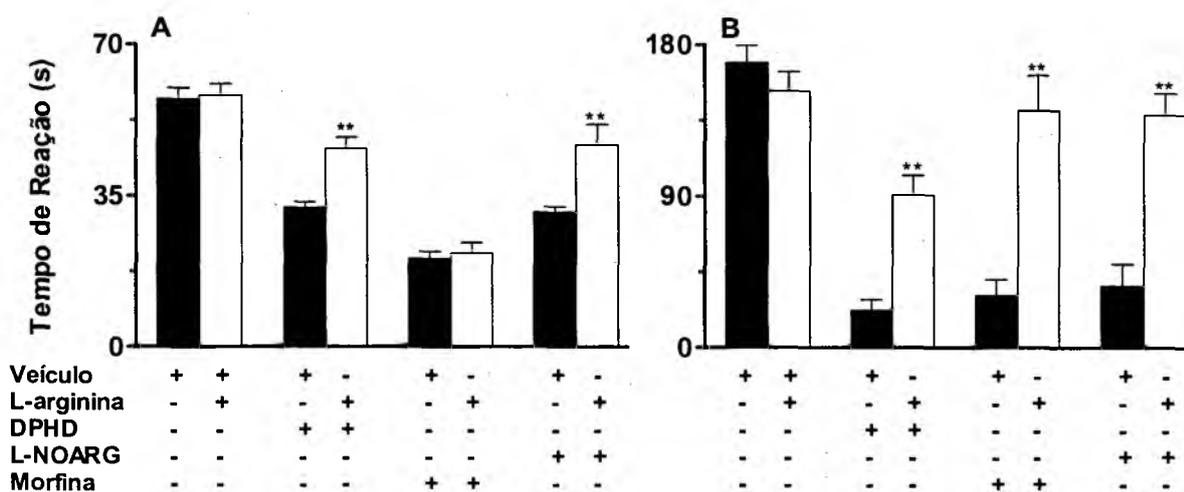


Figura 27 – Influência do pré-tratamento de camundongos com a L-arginina (3,4 mmol/kg) sobre o efeito antinociceptivo causado pelo DPHD (87,3  $\mu\text{mol/kg}$ ), L-NOARG (342,0  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) ou morfina (15,5  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) em relação à primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina. Cada grupo representa a média de 6 a 8 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do controle pré-tratado com o veículo (barras cheias), \*\*P<0,01.

## 4.6.5 – Participação do sistema serotoninérgico.

O pré-tratamento dos animais com p-clorofenilalanina (PCPA, inibidor da síntese de serotonina; 399,8  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p., 1 vez ao dia por 4 dias consecutivos), alterou significativamente a ação antinociceptiva causada tanto pelo DPHD (87,3  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) bem como por aquela induzida pela morfina (15,5  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.) em relação a ambas as fases da dor causada pela injeção de formalina (Figura 28).

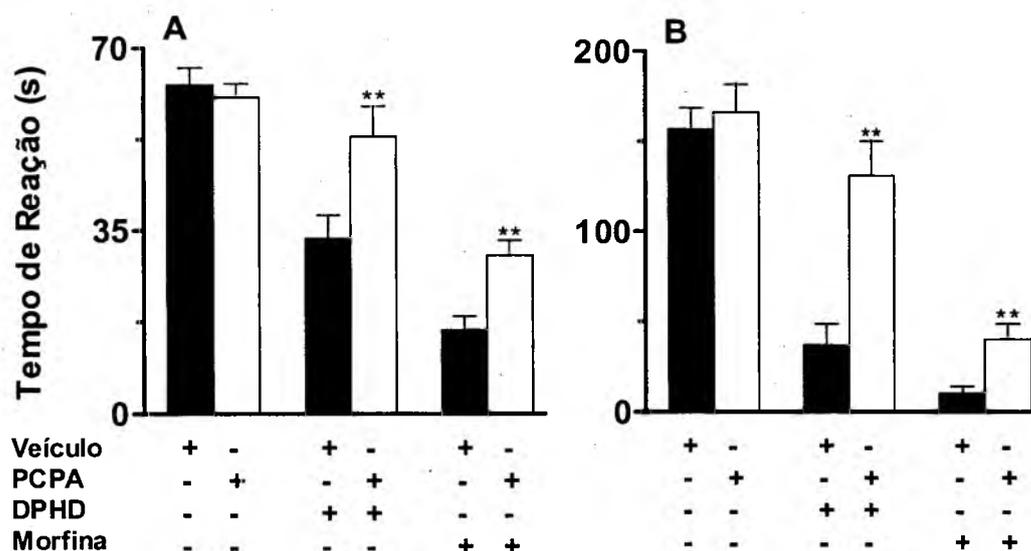


Figura 28 – Influência do pré-tratamento de camundongos com a p-clorofenilalanina (399,8  $\mu\text{mol/kg}$ ) sobre o efeito antinociceptivo causado pelo DPHD (87,3  $\mu\text{mol/kg}$ ) e/ou morfina (15,5  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) em relação à primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina. Cada grupo representa a média de 6 a 8 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do controle pré-tratado com o veículo (barras cheias), \*\*P<0,01.

A Figura 29 mostra que o pré-tratamento dos animais com metisergida (8,9  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p. antagonista serotoninérgico não seletivo) foi capaz de reverter, quase que completamente, a atividade antinociceptiva causada pelo DPHD (87,3  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.), quando analisado em relação a ambas as fases da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina.

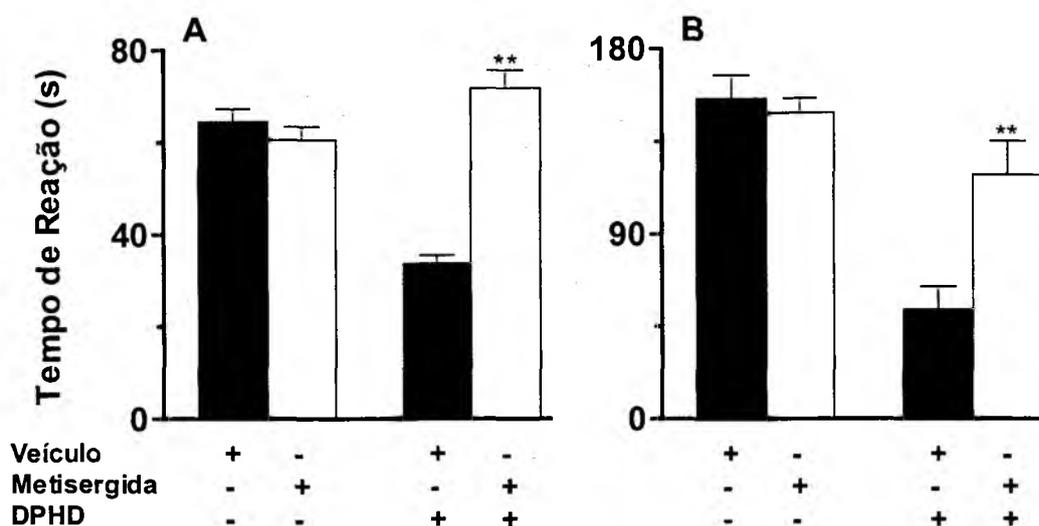


Figura 29 – Influência do pré-tratamento de camundongos com a metisergida (8,9  $\mu\text{mol/kg}$ ) sobre o efeito antinociceptivo causado pelo DPHD (87,3  $\mu\text{mol/kg}$ ) em relação à primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina. Cada grupo representa a média de 6 a 8 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do controle pré-tratado com o veículo (barras cheias), \*\* $P < 0,01$ .

#### 4.6.6 – Desenvolvimento de tolerância cruzada entre a morfina e o DPHD.

Os resultados apresentados na Figura 30, confirmam os dados da literatura e demonstram que o pré-tratamento dos animais com morfina (15,5  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c., uma vez ao dia por sete dias consecutivos), foi capaz de produzir tolerância, caracterizada pela redução significativa do efeito antinociceptivo induzido pela morfina (15,5  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.) e pelo DPHD (87,3  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.), quando comparados com os animais pré-tratados com salina e, analisado na nocicepção causada pela formalina em camundongos. Ao contrário do que foi observado para a morfina, o pré-tratamento dos animais com o DPHD (87,3  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.), uma vez ao dia durante 7 dias consecutivos, não alterou a resposta antinociceptiva produzida pela morfina (15,5  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.) e pelo DPHD (87,3  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) em relação a ambas as fases da dor causada pela injeção de formalina (Figura 30).

#### 4.6.7 – Participação do sistema dopaminérgico.

Os resultados apresentados na Figura 31 mostram que o pré-tratamento dos animais com o haloperidol (0,5  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.; antagonista dopaminérgico não

seletivo) causou redução, de forma significativa, do efeito antinociceptivo induzido pela apomorfina (3,2  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.; agonista dopaminérgico), sem alterar a resposta do DPHD (87,3  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.), quando analisado na nocicepção causado pela formalina em camundongos.

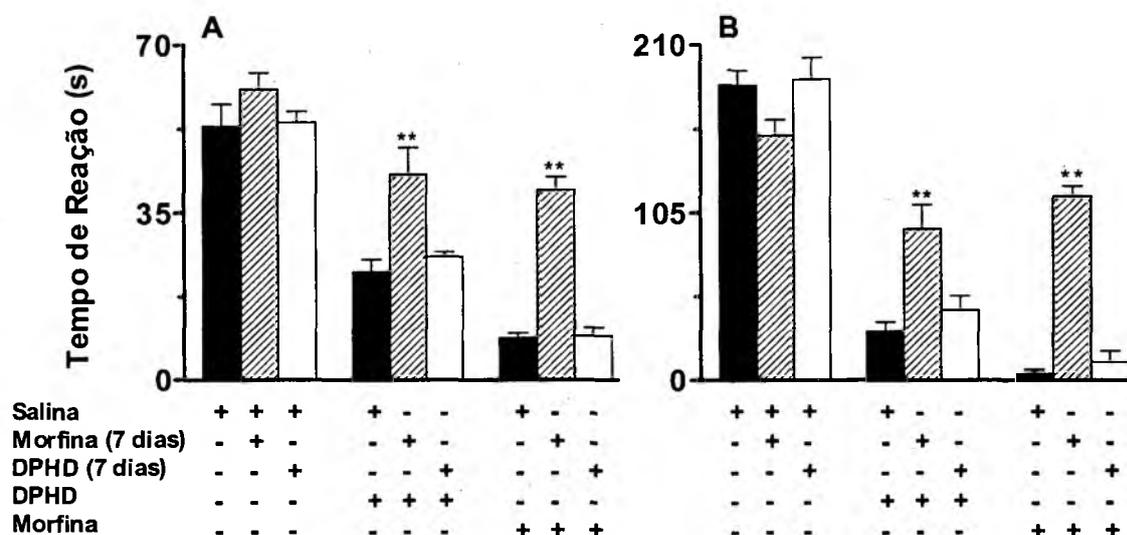


Figura 30 – Influência do pré-tratamento de camundongos com a morfina (15,5  $\mu\text{mol/kg}$  durante 7 dias, barras hachuradas), DPHD (87,3  $\mu\text{mol/kg}$  durante 7 dias, barras abertas) ou salina (10 ml/kg, durante 7 dias, barras cheias) sobre o efeito antinociceptivo causado pelo DPHD (87,3  $\mu\text{mol/kg}$ ) ou morfina (15,5  $\mu\text{mol/kg}$ ) em relação à primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina. Cada grupo representa a média de 6 a 8 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do controle pré-tratado com o veículo (barras cheias), \*\* $P < 0,01$ .

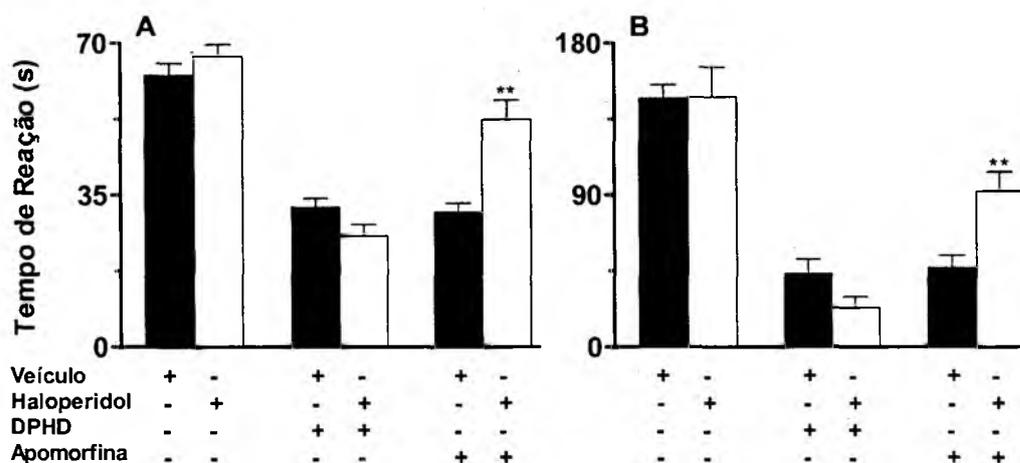


Figura 31 – Influência do pré-tratamento de camundongos com o haloperidol (0,5  $\mu\text{mol/kg}$ ) sobre o efeito antinociceptivo causado pelo DPHD (87,3  $\mu\text{mol/kg}$ ) ou apomorfina (3,2  $\mu\text{mol/kg}$ ) em relação à primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina. Cada grupo representa a média de 6–8 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do controle pré-tratado com o veículo (barras cheias), \*\* $P < 0,01$ .

#### 4.6.8 – Participação do sistema gabaérgico.

Os resultados apresentados na Figura 32 mostram que o pré-tratamento dos animais com bicuculina (1,9  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) ou com faclofeno (40  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.), antagonistas de receptores  $\text{GABA}_A$  e  $\text{GABA}_B$ , respectivamente, reverteu significativamente o efeito antinociceptivo causado pelo baclofeno (4,6  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p., agonista seletivo dos receptores  $\text{GABA}_A$ ) e pelo muscimol (agonista seletivo dos receptores  $\text{GABA}_B$ ). No entanto, o mesmo tratamento dos animais com bicuculina e o faclofeno não alterou significativamente o efeito antinociceptivo causado pelo DPHD (87,3  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.), quando analisado em relação à nocicepção causada pela formalina (Figura 32).

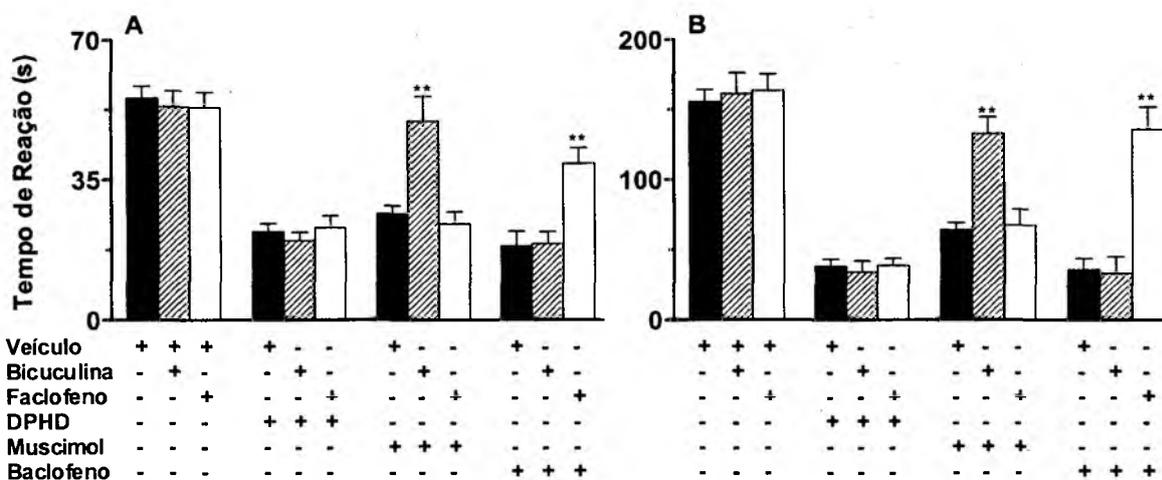


Figura 32 – Influência do pré-tratamento de camundongos com bicuculina (1,9  $\mu\text{mol/kg}$ ) ou faclofeno (40,0  $\mu\text{mol/kg}$ ) sobre o efeito antinociceptivo causado pelo DPHD (87,3  $\mu\text{mol/kg}$ ), muscimol (8,7  $\mu\text{mol/kg}$ ) ou baclofeno (4,6  $\mu\text{mol/kg}$ ) em relação à primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina. Cada grupo representa a média de 6 a 8 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do controle pré-tratado com o veículo (barras cheias), \*\* $P < 0,01$ .

#### - Estudos "In vitro"

#### 4.6.9 – Efeito do DPHD sobre a contração induzida pela estimulação elétrica de campo no íleo e ducto deferente isolado de cobaia e de camundongo.

A estimulação elétrica de campo causou, no íleo de cobaia e ducto deferente de camundongo, contrações que foram abolidas por tetrodotoxina (1  $\mu\text{M}$ ,  $n = 4$  para cada grupo, resultado não mostrados). Adições cumulativas de morfina (1 nM-10  $\mu\text{M}$ ) induziram depressão concentração-dependente das

contrações evocadas pela estimulação elétrica de campo no íleo isolado de cobaia (n= 9, resultados não mostrados), fornecendo  $CI_{50}$  de 25,6 (4,8–137,4) nM e um  $E_{máx}$  de  $87,5 \pm 2,9\%$ . Além disso, a adição de concentrações crescentes não cumulativas de morfina (1 nM-10  $\mu$ M) também causou depressão de maneira concentração-dependente das contrações induzidas por estimulação elétrica de campo no ducto deferente de camundongo (n= 8, resultados não mostrados), com  $CI_{50}$  de 2,5 (0,8–8,4)  $\mu$ M e o  $E_{máx}$  de  $65,0 \pm 4,5\%$  (resultado não mostrado). Ao contrário da morfina, a adição de concentrações crescentes cumulativa ou não cumulativas de DPHD (1 nM-10  $\mu$ M, n = 5 a 8) resultou numa discreta (10 a 20%) inibição das contrações evocada pela estimulação elétrica de campo tanto no íleo de cobaia quanto no ducto deferente de camundongo (resultados não mostrados).

#### 4.6.10 – Efeito do DPHD sobre a união específica da [ $^3$ H]naloxona e do [ $^3$ H]glutamato em membranas de córtex cerebral de camundongos.

Os resultados apresentados na Figura 33 mostram que o DPHD (0,03–1000  $\mu$ M) produziu modesta, porém significativa, inibição da união específica (binding) da [ $^3$ H]naloxona e do [ $^3$ H]glutamato em membranas de córtex cerebral de camundongos. A porcentagem máxima de inibição para o binding de [ $^3$ H]glutamato foi de  $44 \pm 4\%$  na concentração de 1000  $\mu$ M de DPHD. Entretanto, o DPHD foi mais potente e eficaz em inibir o binding de [ $^3$ H]naloxona, fornecendo uma  $CI_{50}$  de 230,0 (248,6-323,5)  $\mu$ M e inibição de  $62 \pm 5\%$  na concentração de 500  $\mu$ M (Figura 33).

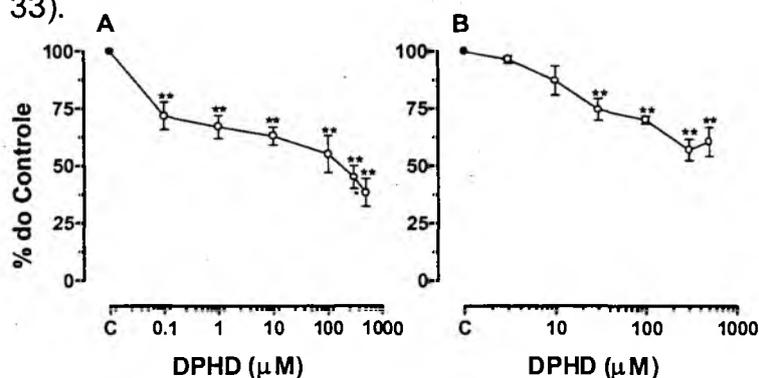


Figura 33 – Efeito do DPHD sobre a união específica (binding) de [ $^3$ H]naloxona (A) e de [ $^3$ H]glutamato (B) em membranas de córtex cerebral de camundongos. Cada símbolo representa a média de 3 a 4 experimentos independentes realizados em triplicata, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do controle (C), \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ . Os valores referentes à união específica de [ $^3$ H]naloxona e de [ $^3$ H]glutamato foram  $2,80 \pm 0,30$  e  $0,40 \pm 0,03$  pmol/mg, respectivamente.

4.6.11 – Efeito do DPHD sobre a liberação e a captação de [ $^3\text{H}$ ]serotonina em sinaptossomas obtidos de córtex cerebral de ratos.

A incubação dos sinaptossomas com a fluoxetina (1 – 100 nM) causou inibição concentração dependente da captação de [ $^3\text{H}$ ]serotonina, fornecendo uma  $\text{Cl}_{50}$  de 4,9 (3,0 – 8,2) nM e  $\text{E}_{\text{máx}}$  de  $77 \pm 4\%$  (resultados não mostrados). Da mesma forma, a incubação dos sinaptossomas com o DPHD (289,0 – 2900,0  $\mu\text{M}$ ) causou inibição significativa da captação de [ $^3\text{H}$ ]serotonina com  $\text{E}_{\text{máx}}$   $80 \pm 10\%$  na concentração de 2900,0  $\mu\text{M}$  (Figura 34 A). Além disso, o DPHD (28,9<sup>?</sup> – 2900,0  $\mu\text{M}$ ) produziu liberação concentração dependente da [ $^3\text{H}$ ]serotonina, fornecendo  $\text{Cl}_{50}$  de 364,1 (108,2 – 1225,1)  $\mu\text{M}$  e  $\text{E}_{\text{máx}}$  de  $119 \pm 9\%$  (Figura 34 B). O KCl (40 mM) também produziu significativa liberação de [ $^3\text{H}$ ]serotonina, contudo, seu efeito foi menor quando comparado com o DPHD (Figura 34 B).

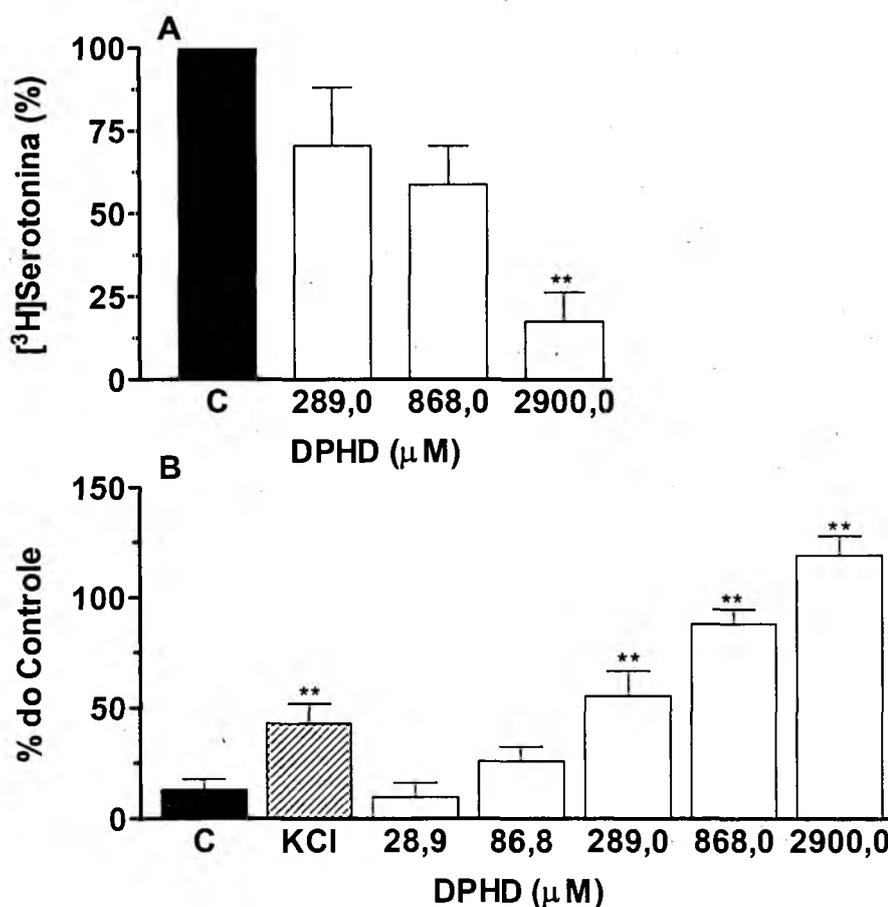


Figura 34 - Efeito do DPHD sobre a captação (A) e liberação (B) de [ $^3\text{H}$ ]serotonina em sinaptossomas obtidos de córtex cerebral de ratos. Cada barra representa a média de 3 experimentos independentes realizados em triplicata e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle (barras cheias), \*\*  $P < 0.01$ .

## 5 – DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo confirmam e também estendem os estudos iniciais descritos anteriormente neste laboratório (CECHINEL FILHO et al., 1996; GORSKI et al., 1993; SANTOS et al., 1995a,b,c; MIGUEL et al., 1996a,b; SANTOS et al., 2000; TRENTIN et al., 1997) e demonstram que a quercetina, a geranina, a furosina e o galato de etila, isolados das plantas do gênero *Phyllanthus* e o DPHD isolado da *S. verticillatus*, apresentaram efeitos antinociceptivos significativos quando analisados em vários modelos de dor neurogênica e inflamatória em camundongos. Neste trabalho, foram também analisados os possíveis mecanismos de ação que poderiam estar contribuindo para o efeito antinociceptivo apresentado pelo galato de etila e o DPHD.

### 5.1 Atividade antinociceptiva induzidas pela rutina, quercetina, geranina, furosina e galato de etila isolado do gênero *Phyllanthus* em camundongos.

As plantas do gênero *Phyllanthus* há muito tempo vem sendo estudadas por diferentes grupos de pesquisa (para revisão ver UNANDER et al., 1995; CALIXTO et al., 1998), sendo a elas atribuídas várias atividades farmacológicas, podendo ser destacadas suas ações benéficas no tratamento da litíase, suas ações anti-espasmódicas e anti-diabéticas (CALIXTO et al., 1998). Nos últimos 15 anos, o nosso grupo vem dedicando grandes esforços aos estudos químico e farmacológico de várias plantas pertencentes ao gênero *Phyllanthus*, principalmente com relação às suas ações antinociceptivas (para revisão ver CALIXTO et al., 1998). GORSKI e colaboradores (1993) foram os primeiros a demonstrar que uma espécie de *Phyllanthus*, o *P. corcovadensis*, apresentava efeito antinociceptivo em modelos de nocicepção que utiliza estímulos químicos, mas não térmicos, em camundongos. Esses autores demonstraram que a ação antinociceptiva causada pelo extrato de *P. corcovadensis* era independente da ativação do sistema opióide e não estava relacionada com a inibição da síntese dos metabólitos do ácido araquidônico (GORSKI et al., 1993). Estudos posteriores de outras espécies desse mesmo gênero, como o *P. urinaria*, *P. niruri*, *P. tenellus* e o *P. sellowianus*, também revelaram ação antinociceptiva, sendo que essas espécies, a exemplo do *P. corcovadensis*, foram efetivas em inibir a dor de origem

neurogênica e inflamatória induzidas pela formalina e capsaicina em camundongos (SANTOS et al., 1995a,b). Recentemente, CECHINEL FILHO et al. (1996) e SANTOS et al. (2000), estenderam esses estudos demonstrando que o *P. caroliniensis*, *P. amarus*, *P. fraternus*, *P. orbiculatus* e o *P. stipulatus* eram também dotados de efeito antinociceptivo em camundongos. SANTOS et al. (1995b), confirmaram e estenderam os dados obtidos por GORSKI et al. (1993) e mostraram que os extratos do *P. urinaria* e do *P. niruri*, contêm princípios ativos de duradouro efeito antinociceptivo em camundongos, sendo que esses efeitos não foram relacionados com a ativação do sistema opióide, inibição da síntese de prostaglandinas, interação com os glicocorticóides endógenos, com os receptores  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  adrenérgicos ou serotoninérgicos ou com a síntese de serotonina e tampouco com a via da L-arginina-óxido nítrico e a depressão do sistema nervoso central ou periférico (SANTOS et al., 1995b).

As análises fitoquímicas realizadas pelo nosso grupo e em outros laboratórios com algumas espécies de plantas pertencentes ao gênero *Phyllanthus* demonstraram a presença de vários flavonóides como astragalina, quercetina, quercitrina, isoquercetrina e rutina (NARA et al., 1977; MIGUEL et al., 1995, 1996b; MIGUEL, 1996). Além desses, outros compostos fenólicos foram identificados, entre os quais podem ser mencionados a geranina e a furosina e alguns esteróides como o  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol e campesterol, entre outros (UENO et al., 1988; CECHINEL FILHO et al., 1996; MIGUEL et al., 1995, 1996b; SANTOS et al., 1995c, para revisão ver CALIXTO et al., 1998). As análises farmacológicas realizadas com a quercetina, a rutina, a geranina, e com o  $\beta$ -sitosterol mostraram que esses compostos causaram efeito contrátil dependente de concentração na traquéia de cobaia, sendo que essa contração foi facilmente reversível e sem evidência de taquifilaxia (PAULINO, 1996). Além disso, o mesmo autor demonstrou que a quercetina, a rutina e a geranina causaram efeito contrátil semelhante ao apresentado pelo extrato do *P. urinaria*, sendo seus efeitos dependentes do influxo de cálcio e sensíveis, parcialmente, à inibição por nicardipina. No entanto, as respostas contráteis para esses compostos na traquéia de cobaia, diferentemente daquelas observadas para o extrato, foram insensíveis ao vermelho de rutênio e aos antagonistas de receptores das taquicininas, tanto do tipo  $NK_1$  como  $NK_2$  (PAULINO et al., 1996a). PAULINO

(1996) também demonstrou que alguns ésteres do ácido gálico promoveram, a exemplo do extrato obtido do *P. urinaria*, relaxamento dependente de concentração na traquéia isolada de cobaia, sendo que a resposta produzida pelo ácido gálico foi dependente da integridade do epitélio traqueal, enquanto que as respostas causadas pelo galato de etila e galato de metila não foram alterados pela remoção do epitélio da traquéia (PAULINO, 1996; PAULINO et al., 1996b). No entanto, PAULINO et al. (1999) demonstraram que as respostas relaxantes causadas por éster de ácido gálico, galato de etila ou de metila, foram inibidas por concentrações elevadas de potássio no meio de incubação (80 mM) e também pelos bloqueadores de canais de potássio modulados por ATP, como a glibenclamida, e pela caribdotoxina, droga conhecida por inibir os canais de potássio de alta condutância modulados por cálcio (PAULINO et al., 1999). No entanto, entre todos os compostos isolados das espécies de *Phyllanthus*, os flavonóides são os que mais foram estudados cientificamente (CALIXTO et al., 1998).

A quercetina é, provavelmente, o flavonóide isolado de plantas que mais tem sido estudado. Para ela são propostas, na literatura, ações em vários sítios, tais como: ações sobre o músculo liso (ABDALA et al., 1989), inibição da ATPase dependente de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (MIRSALIKOKA & PAKUDINA, 1977), inibição da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de retículo sarcoplasmático (SHOSHAN & MACLENNAN, 1981), inibição da fosfodiesterase seletiva para AMPc (BERETZ et al., 1978), atividade mutagênica em bactérias (BJELDANES & CHANG, 1977). Além disso, a quercetina produz efeito vasodilatador na aorta de rato (DUARTE et al., 1993; CHEN & PACE-ASCIAK, 1996), sendo também capaz de regular a transdução de sinal em células de carcinoma humano (SINGHAL et al., 1995) e a diferenciação de células de leucemia promielocítica humana (HL-60) (KIM et al., 2000). Além disso, a quercetina é capaz de inibir a fosforilase quinase, tirosina quinase (SRIVASTAVA, 1985) e fosfolipase  $\text{A}_2$  (LINDAHL & TAGESSON, 1993). Tem sido também proposto que a quercetina é capaz de atuar como antagonista de canal de cálcio no músculo liso vascular (MORALES & LOZOYA, 1993) e de inibir a produção de óxido nítrico e de fator de necrose tumoral alfa ( $\text{TNF-}\alpha$ ) em macrófagos de camundongos (CHIESI & SCHWALLER, 1995; MANJEET & GHOSH, 1999). Somando-se a todas essas atividades, a quercetina também

apresenta efeito antiinflamatório e antioxidante (DUGAS et al., 2000; JUURLINK & PATERSON, 1998; SKAPER et al., 1997; BUSSE et al., 1984).

A rutina, outro flavonóide presente em espécies de *Phyllanthus*, apresenta algumas das ações descritas acima, para a quercetina (CECHINEL FILHO et al., 1996; MIGUEL et al., 1995; MIGUEL, 1996; GENE et al., 1996; FRICK, 2000; LINDAHL & TAGESSON, 1997; BORISSOVA et al., 1994; ALEKSANDROV et al., 1986a,b). Além disso, a rutina é utilizada clinicamente para o tratamento da insuficiência venosa crônica, patologia caracterizada por processo inflamatório e doloroso severo, que pode causar a perda da função do vaso e dos tecidos próximos (FRICK, 2000; SHEU et al., 1997; LUND et al., 1999). Estudos clínicos controlados randomicamente (duplo-cego) demonstraram que o derivado da rutina (hidroxietilrutosida, 500 mg/kg) administrado oralmente, duas vezes ao dia, reduziu significativamente a dor, a hemorragia, a exsudação e o prurido quando comparado com o grupo de mulheres tratadas com o placebo, sem no entanto apresentar qualquer efeito adverso. Tais resultados mostram a efetividade do derivado da rutina no tratamento de certas patologias como a hemorróida gestacional (WIJAYANEGARA et al., 1992). POYNARD & VALTERIO (1994), demonstraram através do estudo de meta-análise que a hidroxietilrutosida apresenta eficácia clínica superior ao placebo para o tratamento dos sintomas relacionados a insuficiência venosa crônica.

Nossos resultados estendem os dados descritos na literatura e demonstram que os flavonóides rutina e quercetina, administrados pela via i.p. apresentaram efeito antinociceptivo significativo, quando analisados na nocicepção causada pela injeção de ácido acético em camundongos. Esse modelo de dor, apesar de ser relativamente simples e com possibilidades de pouca especificidade, é de fácil observação, apresenta boa sensibilidade a várias drogas analgésicas e antiinflamatórias não esteroidais, bem como a drogas semelhantes à morfina e outros analgésicos que atuam centralmente. Além disso, os resultados obtidos com as várias classes de drogas analgésicas, neste modelo, mostram boa correlação com a ação analgésica encontrada em outros modelos pré-clínicos, bem como com estudos clínicos (KOSTER et al., 1959; BLANE et al., 1967; BLUMBERG et al., 1965; SIEGMUND et al., 1957a,b). Foi postulado por WHITTLE (1964) que o ácido acético atua indiretamente causando a liberação de mediadores endógenos envolvidos na modulação da dor, incluindo

a bradicinina, serotonina, histamina e as prostaglandinas. Além disso, recentemente RIBEIRO et al. (2000) mostraram que a nocicepção induzida pelo ácido acético depende da liberação de citocinas, como a IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e a IL-8, a partir de macrófagos e basófilos residentes na cavidade abdominal, e que, em conjunto com outros mediadores, podem induzir a dor característica observada nesse modelo. Portanto, a dor abdominal induzida pelo ácido acético pode ser prevenida por vários fármacos, destacando-se entre esses os antiinflamatórios não esteroidais (WHITTLE, 1964). Tais constatações são reforçadas no nosso trabalho, que demonstra que a ação do diclofenaco e do meloxicam, drogas antiinflamatórias não esteroidais que atuam inibindo preferencialmente a ciclooxigenase-1 e a ciclooxigenase-2, respectivamente, ou a aspirina (inibidora não seletiva das ciclooxigenases) (ENGLHARDT et al., 1994, 1995, 1996a,b; VANE & BOTTING, 1995; VANE et al., 1998) foram efetivas em reduzir as contorções abdominais causadas pelo ácido acético em camundongos. Além disso, os nossos resultados mostram, pela primeira vez, que a geranina, a furosina e o galato de etila presente nas várias espécies de planta do gênero *Phyllanthus*, administrados por via i.p., também foram efetivos em reduzir, de forma significativa e dependente da dose, a nocicepção causada pelo ácido acético em camundongos. Contudo, a geranina e a furosina também inibiram a nocicepção causada pelo ácido acético, sendo, no entanto, menos eficazes que os outros compostos analisados. A ordem de potência encontrada para os compostos foi: rutina>> meloxicam> quercetina> furosina> Geranina>> diclofenaco >> aspirina> galato de etila. Todavia, os mesmos compostos, administrados pela via oral, foram menos potentes e eficazes quando comparado com a via i.p. no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos. Esses resultados iniciais corroboram a hipótese de que esses compostos também são dotados de atividade antinociceptiva, a exemplo do que foi relatado para os extratos das plantas do gênero *Phyllanthus* (GORSKI et al., 1993; SANTOS et al., 1995a,b, 2000; CECHINEL FILHO et al., 1996).

A atividade antinociceptiva da quercetina, rutina, furosina, geranina e do galato de etila foram confirmadas na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos. Esse modelo, descrito inicialmente em gatos e em ratos por DUBUISSON & DENNIS (1977), consiste na injeção intraplantar de solução de formaldeído diretamente na pata do animal, sendo conhecido por

induzir intensa dor pela estimulação direta dos nociceptores. A dor, causada pela injeção intraplantar, de formalina é caracterizada por vigorosas lambidas, mordidas e batidas na pata injetada com o irritante. A grande maioria dos estudos realizados com esse modelo geralmente utiliza roedores, predominantemente ratos e camundongos (para revisão ver TJØLSEN et al., 1992). Este teste é caracterizado por apresentar duas fases distintas de nocicepção, que parecem envolver diferentes mediadores (DUBUISSON & DENNIS, 1977; HUNSKAAR et al., 1985; HUNSKAAR & HOLE, 1987; ROSLAND, 1991; CORRÊA & CALIXTO, 1993; SANTOS & CALIXTO, 1997a; SEGUIN et al., 1995), além de ser considerado atualmente, o modelo que mais se aproxima da dor clínica (TJØLSEN & HOLE, 1997). A primeira fase inicia-se imediatamente após a injeção da formalina, estendendo-se pelos primeiros 5 min, o que se acredita dever-se à estimulação química direta dos nociceptores (DUBUISSON & DENNIS, 1977; HUNSKAAR et al., 1985), predominantemente das fibras aferentes do tipo C e, em parte, as do tipo A $\delta$  (HEAPY et al., 1987). A segunda fase da nocicepção, observada nesse modelo, ocorre entre 15 - 30 min após a injeção de formalina e está relacionada principalmente com a liberação de vários mediadores pró-inflamatórios (HUNSKAAR & HOLE, 1987; TJØLSEN & HOLE, 1997).

Resultados descritos na literatura indicam que vários mediadores químicos, como a substância P, o glutamato e a bradicinina estão envolvidos na primeira fase (dor neurogênica), enquanto que a histamina, a serotonina, as prostaglandinas e a bradicinina participam da segunda fase (também chamada dor inflamatória) da dor induzida pela formalina (CORRÊA & CALIXTO, 1993; HUNSKAAR & HOLE, 1987; SHIBATA et al., 1989; TJØLSEN & HOLE, 1997). Recentemente, foi demonstrado, através de técnicas de microdiálise no espaço subaracnóide medular, seguida de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), que a injeção intraplantar de formalina, na pata posterior de ratos conscientes, causou significativo aumento de vários aminoácidos, entre eles, o glutamato, o aspartato, a taurina, a glicina, a citrulina, além de aumentar os níveis de prostaglandina E<sub>2</sub>, mas não aumentou os níveis de serina, asparagina e glutamina em relação à primeira fase da dor induzida pela formalina. Por outro lado, na segunda fase desse modelo foi observado aumento dos níveis de citrulina, prostaglandina E<sub>2</sub>, glutamato e aspartato (MALMBERG & YAKSH, 1995). SEGUIN et al. (1995), demonstraram que a administração subcutânea de antagonistas seletivos dos receptores taucinérgicos

do tipo NK<sub>1</sub> (RP67580, CP 99994, WIN 62577, WIN 51708 e SR 140333) e NK<sub>2</sub> (SR48968) foram capazes de reduzir ambas as fases da dor induzida pela formalina. SANTOS & CALIXTO (1997a) mostraram que a administração intracerebroventricular e tópica de antagonistas seletivos dos receptores taquicinérgicos do tipo NK<sub>2</sub> (SR48968) e NK<sub>3</sub> (SR142801) foram efetivos em bloquear, tanto a dor neurogênica como a inflamatória causada pela administração de formalina em camundongos. No entanto, os antagonistas seletivos dos receptores taquicinérgicos do tipo NK<sub>1</sub> (FK888 e GR82334) causaram redução apenas da primeira fase da dor causada pela formalina (SANTOS & CALIXTO, 1997a).

Recentemente, MOGIL & GRISEL (1998) analisaram os dados disponíveis na literatura, sobretudo no que diz respeito aos avanços que a biologia molecular e a modificação genética forneceram para a compreensão dos mecanismos envolvidos na transmissão da dor. Os autores mostraram cerca de 25 tipos diferentes de animais criados por adição de gene (transgênico) ou por inativação de gene ("knock-out"), com as possíveis alterações na integridade das respostas nociceptivas nesses animais. Em relação ao modelo da formalina, foi demonstrado por DE FELIPE et al. (1998) que a falta do receptor para a substância P (NK<sub>1</sub>) foi capaz de alterar apenas a segunda fase (dor inflamatória) da dor induzida pela formalina. Já CAO et al. (1998) e ZIMMER et al. (1998) mostraram que a ausência do gene da pré-prótaquicinina A (PPT-A), que codifica a substância P e a neurocinina A, praticamente aboliu a inflamação neurogênica nos animais mutantes, além de ter reduzido, significativamente, a resposta nociceptiva induzida pela formalina na primeira fase (dor neurogênica). No entanto, essas modificações genéticas parecem não alterar a segunda fase da dor induzida pela formalina nesses mesmos animais. Além disso, KONIG et al. (1996) mostraram que a falta da produção de encefalina diminui a nocicepção na primeira fase da dor induzida pela formalina nos animais "knock-out", e SIMONIN et al. (1997) mostraram que a supressão do receptor opióide do tipo  $\kappa$  não foi capaz de alterar a nocicepção da formalina em camundongos. MALMBERG et al. (1997a,b) demonstraram que a ausência da subunidade regulatória I $\beta$  da proteína quinase A foi capaz de diminuir a sensibilidade dolorosa quando analisada em ambas as fases da dor induzida pela formalina. Além disso, os mesmos autores mostraram que a falta da proteína

quinase  $C\gamma$  reduziu especificamente a primeira fase da dor no teste da formalina em camundongos "knock-out". Somando-se a essas observações, BOYCE et al. (1996) e CROSBY et al. (1995) demonstraram que a ausência do receptor  $B_2$  para bradicinina e da óxido nítrico sintase neuronal não foram capazes de modificar a resposta nociceptiva causada pela injeção da formalina, em camundongos mutantes, quando comparadas com os animais selvagens. Contudo, vários trabalhos descritos na literatura demonstram que antagonistas seletivos dos receptores  $B_2$  para bradicinina e que inibidores da óxido nítrico sintase causam inibições, tanto da primeira quanto da segunda fase da nocicepção causada pela injeção intraplantar de formalina em camundongos (CORRÊA & CALIXTO, 1993; CORRÊA et al., 1996; DE CAMPOS et al., 1996, 1998; 1999 e para revisão ver DRAY & PERKINS, 1997; CALIXTO et al., 2000b, APPLETON, 1997; MOGIL & GRISEL, 1998). Recentemente, PESQUERO et al. (2000) demonstraram que camundongos "knock-out" para o receptor  $B_1$  das cininas apresentaram uma diminuição da resposta nociceptiva induzida pela injeção intraplantar de formalina, quando comparados com os animais selvagens. Todos esses dados, analisados em conjunto, mostram que a nocicepção causada pela injeção intraplantar de formalina envolve diferentes mediadores químicos os quais, conseqüentemente, ativam vários receptores e induzem a formação de distintas sinalizações intracelulares. Desta forma, esse modelo pode representar uma ferramenta farmacológica muito interessante para o estudo de novas drogas antinociceptivas. Por outro lado, a dor induzida pela formalina possui vários aspectos que a tornam de interesse, quando comparada com outros modelos de dor, sendo o mais relevante sua semelhança com a dor clínica (TJØLSEN & HOLE, 1997).

Os nossos resultados demonstram que a rutina, a quercetina, a furosin, a geranina e o galato de etila administrados por via i.p., intracerebroventricular e/ou intratecal produziram significativo efeito antinociceptivo em relação a ambas as fases da dor induzida pela formalina, sendo mais efetivos em relação à segunda fase desse modelo. Contudo, esses compostos não foram capazes de inibir completamente a primeira fase da nocicepção no teste da formalina. Somando-se a esses dados, SANTOS et al. (1995c) demonstraram que o fitoesteróide, isolado do *P. corcovadensis* identificado como estigmasterol, também foi capaz de reduzir ambas as fases da dor induzida pela formalina, sugerindo que esse esteróide também pode estar contribuindo para o efeito antinociceptivo demonstrado para os

extratos totais das plantas do gênero *Phyllanthus*. Com relação às drogas padrão estudadas, os nossos resultados também mostram que o meloxicam e o diclofenaco, a exemplo dos compostos estudados, inibiram ambas as fases da dor induzida pela formalina, sendo, no entanto, mais efetivos na dor inflamatória desse modelo. Contudo, a aspirina foi capaz de inibir, de forma significativa e dependente da dose, somente a dor inflamatória (segunda fase) causada pela formalina em camundongos. Diversos pesquisadores têm mostrado que a primeira fase, por ser causada pela estimulação direta dos nociceptores, é normalmente sensível aos opióides, enquanto que a segunda fase desse modelo está associada à resposta inflamatória e envolve a produção de prostaglandinas e outros mediadores inflamatórios, sendo controlada por drogas antiinflamatórias não esteroidais (HUNSKAAR & HOLE, 1987; ABBOTT & FRANKLIN, 1986; CHAPMAN & DICKENSON, 1992; CORRÊA & CALIXTO, 1993; HUNSKAAR et al., 1985; ; MURRAY et al., 1988; TJØLSEN & HOLE, 1997).

No presente estudo procurou-se analisar também as possíveis ações antinociceptivas dos flavonóides (quercetina e rutina), dos taninos (furosina e geranina) e do gaiato de etila, todos isolados de plantas do gênero *Phyllanthus* na nocicepção neurogênica induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos. SAKURADA et al. (1992) foram os primeiros a demonstrar que a injeção intraplantar de capsaicina, na pata posterior de camundongos, causava vigorosa dor, caracterizada por lambidas e mordidas na pata injetada, sendo esse efeito relacionado com a dor de origem neurogênica. A capsaicina é uma amina neurotóxica extraída da pimenta vermelha que, quando aplicada na pele ou injetada em animais, produz irritação caracterizada por reação dolorosa e subsequente dessensibilização para a dor induzida quimicamente (JANCSÓ et al., 1981). Recentemente, foi demonstrado que a capsaicina atua através da ativação de receptores específicos, os quais foram denominados de receptores vanilóides do tipo 1 (VR1). Esses receptores estão presentes principalmente nos gânglios da raiz dorsal da medula espinhal e no gânglio do trigêmio (CATERINA et al., 1997). Estudos de biologia molecular permitiram, recentemente, demonstrar que os receptores vanilóides estão acoplados a um canal iônico permeável a cátions mono e divalentes (ordem de permeabilidade: cálcio>magnésio>sódio~potássio~césio), o qual, quando ativado, produz despolarização e excitação dos neurônios levando à liberação de neuropeptídeos como a substância P, neurocinina A e neurocinina B,

peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e somatostatina, entre outros (GAMSE et al., 1979; 1981; LEMBECK, 1988; SZOLCSANYI, 1985; SANTOS & CALIXTO, 1997a,b; CATERINA et al., 1997; OH et al., 1996; SZALLASI & BLUMBERG, 1999).

Recentemente, CATERINA et al. (2000) demonstraram que a falta do receptor vanilóide do tipo VR1 aboliu completamente a resposta dolorosa induzida pela injeção intraplantar de capsaicina e de resineferatoxina em camundongos “knock-out” quando comparados com os animais selvagens. Além disso, os autores mostraram que a falta do receptor VR1 foi capaz de alterar significativamente a sensibilidade térmica, mas não a mecânica, nos camundongos mutantes (CATERINA et al., 2000). Corroborando estes resultados, SANTOS & CALIXTO (1997b) demonstraram que o antagonista seletivo do receptor vanilóide, a capsazepina, e o bloqueador do canal ativado pela capsaicina, o vermelho de rutênio, administrados via i.c.v. ou topicamente, foram capazes de reduzir, significativamente, a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos. DE CAMPOS et al. (1999) e CORRÊA et al. (1996) demonstraram, ainda, que antagonistas dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> para a bradicinina foram efetivos em reduzir a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina. Em um estudo recente, PESQUERO et al. (2000) confirmaram essas observações e mostraram que animais sem receptor B<sub>1</sub> para a bradicinina tiveram suas respostas nociceptivas alteradas, no modelo de dor induzido pela injeção intraplantar de capsaicina em animais “knock-out”, quando comparados com os camundongos selvagens. Além disso, MALMBERG & YAKSH (1994) demonstraram que a capsaicina, ativando diretamente as fibras nervosas aferentes primárias, pode levar à produção e liberação de prostaglandina E<sub>2</sub> na medula espinhal “in vitro”, podendo além disso, causar a liberação de glutamato e de substância P na medula espinhal de rato “in vivo” e “in vitro”, respectivamente. SAKURADA e colaboradores (1996a,b), mostraram que a nocicepção induzida pela injeção intraplantar ou intratecal de capsaicina pode ser mediada, pelo menos em parte, pela produção de óxido nítrico, glutamato e aspartato, além dos neuropeptídeos (SP, NKA, NKB e CGRP). Tais observações são confirmadas no nosso estudo, no qual demonstrou-se que o meloxicam e o diclofenaco, administrados pelas vias i.p., i.c.v. e i.t., causaram significativa redução da nocicepção neurogênica causada pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos. Além disso, os nossos resultados também

mostram que a rutina, a furosina e o galato de etila, administrados pela via i.p., e em menor extensão a geranina e a quercetina, foram capazes de inibir a nocicepção causada pela capsaicina. Esses últimos resultados são interessantes, tendo em vista que a indometacina, que não foi efetiva na primeira fase da dor induzida pela formalina, também foi destituída de efeito antinociceptivo no teste da capsaicina (CORRÊA & CALIXTO, 1993; resultados não apresentados). Somando-se a esses dados, VAZ et al. (1996) demonstraram que a morfina inibiu com a mesma potência, tanto a dor induzida pela injeção intraplantar de formalina, quanto a produzida pela capsaicina em camundongos (VAZ et al., 1996).

A análise conjunta dos resultados obtidos até aqui com os compostos isolados das plantas do gênero *Phyllanthus*, nos modelos da dor induzida pelo ácido acético, formalina e capsaicina, indicam que esses compostos apresentam potencialidade terapêutica para o tratamento da dor, tanto no que se refere à nocicepção de origem neurogênica como inflamatória. Considerando que a dor de origem neurogênica é muito complexa, e que até o momento não possui alternativas terapêuticas satisfatórias para seu tratamento (MACFARLANE et al., 1997; FÜRST, 1999; MILLAN, 1999), esses resultados podem abrir novas perspectivas para o desenvolvimento de novas moléculas com potencial interesse terapêutico no tratamento da nocicepção.

O segundo objetivo do nosso trabalho foi analisar, através de estudos "in vivo", alguns dos mecanismos pelos quais o galato de etila poderia estar promovendo seus efeitos antinociceptivos. Para tal, foi utilizado o modelo da dor induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos. O galato de etila foi escolhido para essa análise, tendo em vista que estudos prévios realizados "in vitro", na traquéia de cobaia, por PAULINO (1996) e PAULINO et al. (1999) mostraram que o galato de etila mostrou interessante mecanismo de ação, relacionado com a ativação de canais de potássio modulados por ATP sensível à glibenclamida e de canais de potássio de alta condutância modulados por cálcio sensível à caribdotoxina. Além disso, o galato de etila mostrou-se efetivo em produzir antinocicepção nos modelos de dor induzido pela formalina e capsaicina em camundongos.

Os nossos resultados confirmam os dados obtidos anteriormente para o extratos totais das plantas do gênero *Phyllanthus* por SANTOS et al. (1995a,b) e indicam também que o galato de etila, na dose que causa significativa inibição da

dor nos modelos da formalina e capsaicina em camundongos, não causou nenhum efeito antinociceptivo quando analisado na nocicepção térmica estudada no modelo da placa quente, em condições onde a morfina apresentou potente e significativo efeito antinociceptivo. O modelo da placa quente foi descrito, inicialmente, por WOOLFE & MACDONALD (1944) e, posteriormente, modificado por EDDY & LEIMBACK (1953), sendo conhecido por ser bastante sensível às drogas que atuam em nível central (CARTER, 1991; HWANG & WILCOX, 1987; WOOLFE & MACDONALD, 1944). Os nossos resultados também mostram que a atividade antinociceptiva causada pelo galato de etila, a exemplo do obtido para os extratos das espécies de *Phyllanthus* (SANTOS et al., 1995a,b), não parece ser secundária aos possíveis efeitos centrais depressores e/ou inespecíficos, tendo em vista que na dose em que o galato de etila foi efetivo, nos outros modelos de dor analisado, ele foi destituído de ação incapacitante ou mesmo depressora da coordenação motora do animal, que são detectáveis no teste do rota-rod (DUHAM & MIYA, 1957; ROSLAND et al., 1990). Os nossos resultados também estendem os dados obtidos anteriormente para o extrato do *P. urinaria*, *P. niruri*, *P. tenellus* e *P. sellowianus* (SANTOS et al., 1995a,b) e mostram que o tratamento prévio dos animais com a naloxona (antagonista não seletivo dos receptores opióides), em condições nas quais essa droga reverteu quase que completamente, a antinocicepção causada pela morfina, não foi capaz de reverter a atividade antinociceptiva causada pelo galato de etila na dor provocada pela formalina. Contudo, o nosso estudo também indica que os efeitos antinociceptivos causados pelo galato de etila, bem como pela morfina, foram significativamente inibidos pelo tratamento dos animais com toxina pertussis. Vários trabalhos descritos na literatura mostram que a administração intracerebroventricular de toxina pertussis pode causar a inativação da proteína  $G_{i/o}$  por ribosilação da sua subunidade catalítica (SÁNCHEZ-BLÁQUEZ & GARZON, 1991; HERNANDEZ et al., 1995; SHAH et al., 1994, 1997; STANDIFER & PASTENAK, 1997; WOMER et al., 1997). Além disso, a toxina pertussis normalmente é utilizada para a elucidação do mecanismo de ação de drogas, entre essas as que apresentam ação antinociceptiva, que possam estar interagindo com receptores acoplados à proteína  $G_{i/o}$  (SHAH et al., 1994, 1997; STANDIFER & PASTENAK, 1997; WOMER et al., 1997; JIANG et al., 1998). Além disso, WOMER e colaboradores (1997) demonstraram que a administração intratecal de toxina pertussis causa hiperalgesia e a alodínia que são sintomas normalmente comuns

em pacientes com dor neuropática. Esses resultados, analisados em conjunto, indicam que a antinocicepção causada pelo galato de etila, tal como a da morfina, parece envolver a ativação de proteínas  $G_{i/o}$ , cujos mecanismos são sensíveis à toxina pertussis.

Recentemente, tem sido sugerido que a via da L-arginina-óxido nítrico exerce um papel importante na modulação da nocicepção (HALEY et al., 1992; SNYDER, 1992; YAKSH & RUDY, 1977; FERREIRA et al., 1999). MOORE et al. (1991) demonstraram que a L-N<sup>G</sup>-nitro-arginina metil éster (inibidor da óxido nítrico sintase), administrada sistêmica ou centralmente, causou importante efeito antinociceptivo em relação a ambas as fases da dor induzida pela formalina, além de ter causado inibição da hiperalgesia induzida por agonistas de receptores de NMDA (N-metil-D-aspartato) (KITTO et al., 1992). Além disso, a L-N<sup>G</sup>-nitro-arginina metil éster deprimiu a facilitação do reflexo nociceptivo (VERGE et al., 1992) e reduziu a resposta em neurônios dorsais da medula após estimulação mecânica e térmica (CODERRE E YASHPAL, 1994; MOORE et al., 1991; YAKSH E RUDY, 1977; YAMAMOTO et al., 1993). Os resultados obtidos no presente estudo confirmam essas observações e demonstram que a administração sistêmica de L-N<sup>G</sup>-nitro arginina (L-NOARG, inibidor da síntese de óxido nítrico) antagonizou, de maneira pronunciada, tanto a primeira quanto a segunda fase da dor causada pela formalina, sendo esse efeito seletivamente revertido pela injeção de L-arginina (precursor do óxido nítrico). Contudo, o mesmo tratamento dos animais com a L-arginina não foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo causado pelo galato de etila. Esses resultados demonstram, portanto, que a via da L-arginina-óxido nítrico não parece estar envolvida com a ação antinociceptiva do galato de etila.

A seguir, procuramos analisar se as ações antinociceptivas do galato de etila dependem da ativação de canais de potássio, tendo em vista que o galato de etila produziu relaxamento dependente de concentração em traquéia de cobaia e veia porta de rato, pré-contraída com histamina ou endotelina, por um mecanismo dependente da ativação de canal de potássio modulado por ATP e de canal de potássio de alta condutância ativado por cálcio (PAULINO et al., 1999; resultados não publicados). Os nossos resultados mostram que o tratamento dos animais, pela via intratecal, com glibenclamida, caribdotoxina, ou apamina foi capaz de inibir, de forma significativa e quase que completamente, o efeito antinociceptivo causado pelo galato de etila. Contudo, o pré-tratamento dos animais com o

tetraetilamônio (bloqueador não seletivo de canal de potássio dependente de voltagem) não foi capaz de alterar a antinocicepção produzida pelo galato de etila. Esses resultados estendem os dados obtidos "in vitro" em nosso laboratório (PAULINO, 1996; PAULINO et al., 1999) e demonstram que a atividade antinociceptiva causada pelo galato de etila envolve a ativação de canais de potássio modulados por ATP sensível a glibenclamida e de canais de potássio de baixa e de alta condutância ativados por cálcio, sensíveis à apamina e à caribdotoxina, respectivamente. Por outro lado, nossos resultados não confirmam o envolvimento dos canais de potássio ativados por voltagem, sensível ao tetraetilamônio. Além disso, vários trabalhos descritos na literatura, mostram que a antinocicepção, causada pela noradrenalina, morfina, apomorfina e ativadores de canal de potássio, foi significativamente inibida por bloqueadores de canal de potássio modulado por ATP (YANG et al., 1998; KANG et al., 1998; LOHMANN & WELCH, 1999; WELCH & DUNLOW, 1993). Por outro lado, o efeito antinociceptivo causado por antagonistas dos receptores  $H_1$  para histamina, em camundongos foi inibido, tanto por bloqueadores de canal de potássio modulado por ATP quanto por cálcio sensível à glibenclamida e à apamina, respectivamente (GALEOTTI et al., 1999a, b). Corroborando esses resultados, WELCH et al. (1995) demonstraram que a antinocicepção causada pelos opióides deve-se à ativação da proteína  $G_{i/o}$  sensível à toxina pertussis que, em consequência, diminui o influxo de cálcio para o neurônio, além de reduzir os níveis de AMPc através da hiperpolarização neuronal por um mecanismo dependente da ativação de canal de potássio sensível à apamina e ao ATP. Dessa forma, não pode ser descartada a possibilidade de, canais de cálcio ou moduladores desses canais, estarem participando da atividade antinociceptiva causado pelo galato de etila. Contudo, essa hipótese precisa ser melhor investigada futuramente.

Recentemente, MURASE et al. (1999) demonstraram que alguns ésteres do ácido gálico, em especial o galato de etila, foram capazes de suprimir a expressão de moléculas de adesão (VCAM-1, ICAM-1, e selectina E) induzidas pela  $IL-1\alpha$  e pelo  $TNF-\alpha$  em culturas de células endoteliais obtidas de cordão umbilical humano. Além disso, os autores demonstraram que o galato de etila foi capaz de inibir a translocação do fator nuclear kappa B induzido pelas citocinas por um mecanismo independente da degradação I-KB $\alpha$ , levando assim à diminuição da expressão de moléculas de adesão e, conseqüentemente, à

redução da adesão leucocitária. Esses resultados obtidos "in vitro" mostram, portanto, que o galato de etila e outros ésteres do ácido gálico podem ter importantes efeitos antiinflamatórios pelo bloqueio da ativação do NF- $\kappa$ B e sugerem que esses compostos presentes em várias plantas, mas principalmente na uva vermelha, podem desempenhar um papel importante na prevenção da resposta inflamatória e na arteriosclerose "in vivo" (MURASE et al., 1999). Assim, analisado em conjunto com os resultados obtidos por RIBEIRO et al. (2000), é possível atribuir um novo mecanismo de ação para o galato de etila que, além da ativação dos canais de potássio demonstrado no presente estudo, poderia também agir modulando a transmissão do processo nociceptivo atuando nas respostas mediadas pelas citocinas (DRAY, 1997).

Em síntese, os resultados apresentados nessas primeiras partes do nosso trabalho confirmam e estendem os dados descritos na literatura e indicam que o galato de etila, a geranina, a furosina, a rutina e a quercetina, isolados das plantas do gênero *Phyllanthus* apresentam importante efeito antinociceptivo na nocicepção química induzida pelo ácido acético, formalina e capsaicina, em camundongos. Além disso, os nossos resultados também demonstram que a ação antinociceptiva causada pelo galato de etila é particularmente interessante, tendo em vista que ele parece interagir com a proteína  $G_{i/o}$  sensível à toxina pertussis e com os canais de potássio ativados, tanto por cálcio, como por ATP. Contudo, estudos eletrofisiológicos adicionais e de biologia molecular são ainda necessários para a confirmação do preciso mecanismo de ação desse composto. Além disso, conforme discutido acima, não pode ser completamente descartada a possibilidade de o galato de etila e dos outros compostos estarem interagindo com as diferentes citocinas que participam da gênese de várias patologias, através da inibição do NF $\kappa$ B. Esses resultados, analisados em conjunto, fornecem a base farmacológica da utilização das plantas do gênero *Phyllanthus* na medicina popular e mostram, claramente, o potencial dessas plantas e de seus compostos para o desenvolvimentos de novas drogas analgésicas.

## 5.2 Atividade antinociceptiva do alcalóide DPHD isolado da *Siphocampylus verticillatus*.

A avaliação farmacológica pré-clínica do extrato hidroalcoólico da *S. verticillatus* realizada pelo nosso grupo (TRENTIN et al., 1997), demonstrou que essa planta apresentou importante efeito antinociceptivo, quando o extrato foi administrado, tanto pela via intraperitoneal, quanto pela oral em camundongos, analisados em vários modelos de nocicepção de origem neurogênica e inflamatória em camundongos (TRENTIN et al., 1997). Os autores demonstraram, ainda, que o efeito antinociceptivo do extrato da *S. verticillatus* foi de longa duração, perdurando por até 8 h, quando administrado pela via oral (TRENTIN et al., 1997). Além disso, esses mesmos autores analisaram o possível mecanismo de ação antinociceptiva do extrato, demonstrando que os princípios ativos presente no extrato da *S. verticillatus* parecem estar atuando através da ativação do sistema opióide, além de interação com a via da L-arginina-óxido nítrico (TRENTIN et al., 1997).

Estudos fitoquímicos realizados com a *S. verticillatus* por MIGUEL et al. (1996a) permitiram o isolamento e a identificação de um novo alcalóide que foi denominado de cloridrato de *cis*-8,10-di-*N*-propillobelidiol dihidratado (DPHD) (MIGUEL et al., 1996a). Além disso, a estrutura química desse alcalóide foi também determinada através de cristalografia de raio X, confirmando que se tratava de um alcalóide realmente inédito na literatura, e que curiosamente o composto se encontra na forma de cloridrato na natureza (MIGUEL et al., 1996a). O presente estudo estende os dados existentes na literatura e demonstra que o alcalóide DPHD, administrado tanto por via i.p. quanto oral, apresentou significativo efeito antinociceptivo dependente da dose, quando analisado na nocicepção causada pela injeção de ácido acético em camundongos. Contudo, o DPHD foi cerca de 5 vezes mais potente pela via i.p. do que a oral. Outro aspecto importante observado nesse composto, foi o fato que, independentemente da via de administração utilizada, o DPHD não apresentou alteração significativa na sua eficácia, demonstrando que esse composto tem boa absorção através da via oral. Esse fato é interessante, tendo em vista que, no nosso estudo, pudemos observar que isso não ocorreu nos compostos isolados das espécies de plantas do gênero *Phyllanthus*. Além disso, o DPHD foi cerca de 10 a 20 vezes mais potente que o

extrato obtido da *S. verticillatus*, quando analisado nas contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (TRENTIN et al., 1997). Esses resultados iniciais sugerem, fortemente, que o DPHD, parece ser o composto majoritário presente nas partes aéreas da *S. verticillatus* e que ele é o principal responsável pelo efeito antinociceptivo demonstrado previamente para o extrato dessa planta (TRENTIN et al., 1997; MIGUEL et al., 1996a). Além disso, o DPHD administrado por via i.p., v.o., i.c.v. ou i.t. apresentou significativo efeito antinociceptivo em relação a ambas as fases da dor induzida pela injeção intraplantar de formalina, sendo, a exemplo dos outros compostos estudados, mais efetivo em relação à segunda fase desse modelo. Em nosso estudo, pudemos observar também que a atividade antinociceptiva do DPHD em relação à dor causada pela formalina foi de longa duração, de 6 a 8 h, tanto quando o composto foi administrado pela via i.p. quanto pela via oral. Por outro lado, o DPHD administrado pelas vias i.p., v.o., i.c.v. e i.t. foi capaz de inibir, de forma significativa, a nocicepção neurogênica induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos. Tais observações indicam que o DPHD, a exemplo dos outros compostos aqui analisados, apresenta potencialidade para o desenvolvimento de novas moléculas para tratar a dor de origem neurogênica.

Examinamos também, no presente estudo, os mecanismos pelos quais o DPHD poderia estar promovendo seus efeitos antinociceptivos nos modelos de dor analisados. Os nossos resultados corroboram os dados obtidos para o extrato da *S. verticillatus* por TRENTIN et al. (1997) e indicam também que o DPHD, não produziu efeitos centrais depressores e/ou inespecíficos, tendo em vista que na dose em que o DPHD foi efetivo nos outros modelos de dor analisados, ele foi destituído de ação incapacitante ou mesmo depressora sobre a coordenação motora dos animais, as quais teriam sido detectadas no teste do rota-rod (DUHAM & MIYA, 1957; ROSLAND et al., 1990). Além disso, TRENTIN et al. (1997) haviam demonstrado que o efeito antinociceptivo causado pelo extrato da *S. verticillatus* era dependente da ativação do sistema opióide. Confirmando e estendendo esses resultados iniciais, no presente estudo pode-se observar que o tratamento prévio dos animais com a naloxona (antagonista não seletivo dos receptores opióides), reverteu completamente o efeito antinociceptivo causado, tanto pelo DPHD, quanto pela morfina, quando analisado em relação a ambas as fases da dor induzida pela formalina. A seguir, investigou-se qual dos subtipos de receptores opióides estariam

participando na antinocicepção causada pelo DPHD. Pudemos observar, através dos nossos resultados, que o tratamento prévio dos animais com os antagonistas ciprodimina (antagonista seletivo dos receptores  $\mu$  opióides), naltrindol (antagonista seletivo dos receptores  $\delta$  opióides) ou nor-binaltorfimina (antagonista seletivo dos receptores  $\kappa$  opióides) foram capazes de reverter, significativamente, o efeito antinociceptivo causada pelo DPHD em relação a ambas as fases da dor induzida pela formalina. Contudo, somente o antagonista seletivo dos receptores  $\mu$  opióides (ciprodimina) inibiu significativamente a antinocicepção causada pela morfina na segunda fase da dor causada pela formalina. Esses resultados permitem sugerir que a ação antinociceptiva causada pelo DPHD parece depender da ativação direta ou indireta dos três tipos de receptores opióides, ou seja, os receptores opióides dos tipos  $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\delta$  (CRAFT et al., 1995; FREY & SCHICHT, 1996; OSSIPOV et al., 1996). Outro resultado que confirma essas observações foi o fato do DPHD ter inibido a ligação da [ $^3$ H]naloxona em sítios de membranas de córtex cerebral de camundongos. Contudo, ao contrário do que foi observado para a morfina (resultados não apresentados), a inibição causada pelo DPHD foi parcial. Tais resultados sugerem que, pelo menos, parte da atividade antinociceptiva do DPHD parece estar associada com a estimulação dos receptores opióides. Contudo, essa afirmação não pode ser confirmada nos experimentos realizados "in vitro" em preparações de íleo e ducto deferente isolados de cobaia e camundongos. Nossos resultados confirmam dados da literatura e indicam que a morfina foi capaz de inibir, de forma dependente de concentração, as respostas contráteis induzidas pela estimulação elétrica de campo em íleo e ducto deferente. Ao contrário, o DPHD não alterou as respostas contráteis induzida pela estimulação elétrica de campo em ambas as preparações. Além disso, verificou-se que a antinocicepção causada pelo DPHD poderia estar associada á inibição direta da união específica do [ $^3$ H]glutamato em sítios de membranas de córtex cerebral em camundongos. Vários trabalhos descritos na literatura têm demonstrado que existe uma intensa liberação de aminoácidos excitatórios na medula espinhal, principalmente de glutamato e aspartato, após a injeção intraplantar de formalina (OMOTE et al., 1998; MALMBERG & YAKSH, 1995; TEOH et al., 1996) ou de capsaicina (SAKURADA et al., 1996a, JURÁNEK & LEMBERCK, 1997). Os nossos resultados mostram que a antinocicepção causada pelo DPHD, nos

modelos de dor analisados, não parece estar relacionada à interação com os receptores glutamatérgicos, tendo em vista que o DPHD, mesmo em altas concentrações, inibiu apenas parcialmente a união específica do glutamato a sítios em membranas de córtex cerebral de camundongos. Tais resultados sugerem, portanto, que a atividade antinociceptiva do DPHD não parece estar associada à inibição direta dos sítios de ligação do glutamato. No entanto, novos estudos devem ser conduzidos com ligantes de sítios modulatórios dos receptores glutamatérgicos, para confirmar essa hipótese.

Os nossos resultados também mostram que o efeito antinociceptivo causado pela morfina foi significativamente inibido pelo tratamento dos animais com toxina pertussis, quando analisado em relação a ambas as fases da dor induzida pela formalina (SÁNCHEZ-BLÁQUEZ & GARSON, 1991; HERNANDEZ et al., 1995; SHAH et al., 1994, 1997; STANDIFER & PASTENAK, 1997; BEIRITH et al., 1998; MENDES et al., 2000). No entanto, o mesmo tratamento dos animais com a toxina pertussis reverteu significativamente a antinocicepção do DPHD somente na segunda fase desse modelo. Estes resultados indicam que a antinocicepção causada pelo DPHD na segunda fase da formalina parece envolver, pelo menos em parte, a ativação de proteínas  $G_{i/o}$ . Outro resultado interessante apresentado nesse trabalho, foi o fato de o DPHD não ter apresentado efeito antinociceptivo quando analisado na nocicepção térmica induzida pela placa quente, em condições onde a morfina causou potente e significativo efeito antinociceptivo nesse modelo. Analisados em conjunto, esses resultados permitem sugerir que o DPHD compartilha alguns dos mecanismos comuns já descritos para a morfina. Contudo, existem várias discrepâncias apresentadas que podem ser explicadas pela falta de especificidade do DPHD no sistema opióide.

Outro aspecto muito interessante analisado no presente trabalho, foi a observação de que o tratamento dos animais por sete dias consecutivos com o DPHD, ao contrário do observado para a morfina, não foi capaz de causar tolerância para a atividade antinociceptiva causada pelo DPHD, quando analisado na dor induzida pela formalina. Além disso, o mesmo tratamento dos animais com o DPHD não causou tolerância cruzada com a morfina, enquanto que os animais tolerantes à morfina, foram também tolerantes ao DPHD. Esses resultados são muito interessantes considerando ser a morfina, ainda nos dias de hoje, a droga de escolha para o tratamento das dores relacionadas a várias patologias, incluindo

alguns tipos de câncer (OSSIPOV et al., 1997), apesar dos seus efeitos adversos como a dependência, tolerância e depressão respiratória (MÉNARD et al., 1995; OSSIPOV et al., 1997).

Tem sido descrito que a atividade antinociceptiva da morfina na nocicepção causada pela formalina depende, em parte, da ativação de canais de potássio modulados por ATP sensíveis á glibenclamida (YANG et al., 1998; KANG et al., 1998; LOHMANN & WELCH, 1999; WELCH & DUNLOW, 1993; WELCH et al., 1995). Os nossos resultados mostram que o tratamento dos animais pela via intratecal com glibenclamida, caribdotoxina, apamina ou com o tetraetilamônio não foi capaz de alterar significativamente o efeito antinociceptivo causado pelo DPHD, em relação a ambas as fases da dor causada pela formalina. Esses resultados demonstram, portanto, que a atividade antinociceptiva causada pelo DPHD, ao contrário daquela produzida pela morfina, não parece depender da ativação de canais de potássio modulados por ATP sensível á glibenclamida e da ativação de canais de potássio de baixa e de alta condutância ativados por cálcio (YANG et al., 1998; KANG et al., 1998; LOHMANN & WELCH, 1999; WELCH & DUNLOW, 1993; BEIRITH et al., 1998; MENDES et al., 2000). Assim, apesar do DPHD atuar principalmente através do sistema opióide, suas ações antinociceptivas são sob vários aspectos distintas daquelas descritas para a morfina.

Em outra etapa do nosso protocolo experimental, foi analisado o possível envolvimento da via da L-arginina-óxido nítrico na antinocicepção causada pelo DPHD, tendo em vista, as evidencias anteriores de que o efeito antinociceptivo causado pelo extrato da *S. verticillatus* foi revertido pela pré-tratamento dos animais com L-arginina (precursor do óxido nítrico) (TRENTIN et al., 1997). Os resultados obtidos no presente estudo confirmam essas observações iniciais e demonstram que a administração sistêmica de L-arginina foi capaz de reverter, de forma significativa, o efeito antinociceptivo causado, tanto pela L-N<sup>G</sup>-nitro arginina (L-NOARG, inibidor da síntese de óxido nítrico), quanto aquele causado pelo DPHD em relação a ambas as fases da dor induzida pela formalina. Por outro lado, o pré-tratamento dos animais com a L-arginina foi capaz de inibir somente o efeito da morfina na segunda fase da dor causada pela formalina, indicando, mais uma vez, diferenças entre os mecanismos de ação do DPHD e da morfina. Esses resultados estendem, portanto, os dados obtidos anteriormente (TRENTIN et al., 1997) e

mostram que a via da L-arginina-óxido nítrico parece exercer um importante papel na ação antinociceptiva do DPHD.

Estudos descritos na literatura demonstraram que o sistema serotoninérgico está intimamente envolvido no mecanismo da regulação da transmissão da informação nociceptiva no sistema nervoso central (BASBAUM & FIELDS, 1984; FIELDS et al., 1991; LIPP, 1991; YAKSH, 1985; MILLAN, 1997, 1999; BESSON, 1999; DRAY, 1997). Assim, um grande número de drogas vem sendo utilizado para o tratamento de dores crônicas, destacando-se, principalmente, os antidepressivos tricíclicos (WALSH, 1983; VENTAFRIDDA et al., 1990; MAGNI, 1991; MILLAN, 1999; BESSON, 1999). Vários estudos sugerem que esse efeito pode estar relacionado com a melhora do humor (ALMAY et al., 1987; MAGNI, 1987; WARD et al., 1979), enquanto que outros autores sugerem que eles produzem analgesia por mecanismos mais específicos (ANSUATEGUI et al., 1989; PANERAI et al., 1991; MILLAN, 1999; BESSON, 1999). No entanto, os antidepressivos tricíclicos são tradicionalmente conhecidos por estimular a atividade da serotonina e da noradrenalina pelo bloqueio da captação neuronal (CARLSSON et al., 1969a, b). Além disso, eles não parecem agir especificamente nos neurônios monoaminérgicos, mas principalmente em outros sistemas neuroquímicos justificando, portanto, a manifestação da resposta analgésica em pacientes não-deprimidos (LEIJON & BOIVIE, 1989; SHARAV et al., 1987). É também conhecido que os antidepressivos tricíclicos induzem significativa ação antinociceptiva em animais (ANSUATEGUI et al., 1989; ARDID et al., 1991; FIALIP et al., 1992), aparentemente por interação com o sistema opióide endógeno, uma vez que essas drogas potencializam a resposta antinociceptiva induzida por drogas opióides (DE FELIPE et al., 1986; MALSEED & GOLDSTEIN, 1979; TAIWO et al., 1985). Tal efeito é evidenciado pelo tratamento dos animais com p-clorofenilalanina (PCPA), um inibidor da síntese de serotonina, que é capaz de antagonizar parte do efeito antinociceptivo mediado pela morfina e alguns antiinflamatórios não esteroidais (TABER & LATRANYI, 1981; VON VOIGTLANDER et al., 1984; PINI et al., 1996; BEIRITH et al., 1998; MENDES et al., 2000), indicando que esses efeitos antinociceptivos parecem estar relacionados, pelo menos em parte, à interação com os neurônios serotoninérgicos centrais que estão envolvidos na modulação da transmissão da dor. No presente estudo, demonstramos que o tratamento dos animais durante quatro dias, com o PCPA, foi capaz de reverter, de forma

significativa, embora parcialmente, o efeito antinociceptivo causado, tanto pela morfina, como pelo DPHD quando analisado em relação a ambas as fases da dor induzida pela formalina. Além disso, os nossos resultados também demonstram que a metisergida (antagonista serotoninérgico não seletivo) reverteu completamente a ação antinociceptiva causada pelo DPHD. Diante dos resultados descritos acima, não se pode destacar a possibilidade de que a liberação de serotonina endógena e/ou a ativação dos receptores serotoninérgicos sensíveis a metisergida possam estar envolvidas na ação antinociceptiva causada pelo alcalóide DPHD. Dessa forma, a próxima etapa do nosso protocolo experimental foi procurar analisar se o DPHD poderia estar interferindo com a liberação de serotonina dos neurônios serotoninérgicos centrais, através de experimentos "in vitro" de liberação e de captação de [<sup>3</sup>H]serotonina em sinaptossomas de córtex cerebral de rato. De fato, nossos resultados mostram claramente que o DPHD foi capaz de induzir a liberação e de inibir a captação de [<sup>3</sup>H]serotonina em sinaptossomas de córtex cerebral de rato. Tais resultados são favoráveis à hipótese de que o efeito antinociceptivo do DPHD parece estar relacionado com o sistema serotoninérgico, tanto causando liberação, quando impedindo a captação de serotonina.

Recentemente, SILVA et al. (1999) demonstraram que o extrato da *S. verticillatus* foi também dotado de atividade antidepressiva em dois modelos clássicos de depressão, os testes de suspensão da cauda e do nado forçado em camundongos. Os autores também demonstraram, no mesmo estudo, que o efeito antidepressivo apresentado pelo extrato da *S. verticillatus* envolve, pelo menos em parte, o sistema serotoninérgico, tendo em vista que o extrato foi ativo tanto em liberar, bem como em inibir a captação de serotonina em sinaptossomas de córtex de rato (FERNANDES et al., 2000). Dessa forma, esses resultados preliminares parecem indicar que o extrato da *S. verticillatus* e seu principal componente, o alcalóide DPHD, interagem com o sistema serotoninérgico. Considerando o fato de que muitos tipos de dor crônica são tratadas clinicamente com antidepressivos (BESSON, 1999; MILLAN, 1997, 1999), esses estudos abrem novas possibilidades de aproveitamento do DPHD para o desenvolvimento de novos analgésicos.

Nossos resultados demonstraram também, que o efeito antinociceptivo do DPHD não parece envolver a interação com os receptores GABA<sub>A</sub> ou GABA<sub>B</sub>. Tal afirmativa foi confirmada pelo uso do baclofeno e do muscimol (agonistas seletivos

dos receptores GABA<sub>B</sub> e GABA<sub>A</sub>, respectivamente) que mostraram ações antinociceptivas quando administrados em camundongos avaliados no teste da formalina, sendo seus efeitos revertidos pelo faclofeno e pela bicuculina (SAWYNOK, 1984.; MALCANGIO et al., 1991; VAZ et al., 1996; SHAFIZADEH et al., 1997 e resultado do presente estudo). Em nossos experimentos, os antagonistas seletivos dos receptores gabaérgicos, bicuculina (GABA<sub>A</sub>), bem como o faclofeno (GABA<sub>B</sub>), administrados sistemicamente, não foram capazes de modificar a antinocicepção produzida pelo DPHD, em doses onde esses compostos foram efetivos em reverter o efeito antinociceptivo causado pelos agonistas seletivos muscimol (GABA<sub>A</sub>) e baclofeno (GABA<sub>B</sub>). Além disso, os nossos resultados também mostram que o efeito antinociceptivo causado pelo DPHD parece ser independente da ativação dos receptores dopaminérgicos sensíveis ao haloperidol, tendo em vista que a ação antinociceptiva causada pela apomorfina (agonista dos receptores dopaminérgico) foi significativamente antagonizada pelo haloperidol na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina, ao contrário do efeito antinociceptivo causado pelo DPHD.

Em síntese, os resultados apresentados no presente estudo confirmam e ampliam os resultados anteriores obtidos em nosso laboratório (TRENTIN et al., 1997) e mostram que o alcalóide DPHD, isolado das partes aéreas da *S. verticillatus*, apresenta efeito antinociceptivo significativo quando testado em vários modelos de nocicepção química causada pelo ácido acético, formalina e capsaicina, mas não em modelo de dor térmica em camundongos. Além disso, o DPHD foi efetivo tanto quando administrado por via i.p., v.o., i.t. e i.c.v., sugerindo que esse alcalóide possui ação antinociceptiva sistêmica, espinhal e supraespinhal. As ações antinociceptivas do DPHD parecem estar relacionadas com a interação com vários sistemas, destacando-se, entre eles, a ativação dos receptores opióides do tipo  $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\delta$ , o sistema serotoninérgico, a via da L-arginina-óxido nítrico e a participação de proteínas Gi/o sensíveis à toxina pertussis. Finalmente, o presente estudo mostra que a antinocicepção causada pelo DPHD parece não envolver a interação com canais de potássio e com os receptores gabaérgicos ou dopaminérgicos. Estes resultados demonstram, portanto, que a atividade antinociceptiva causada pelo DPHD, ao contrário daquela produzida pela morfina, não parece depender da ativação de canais de potássio modulados por ATP e por baixa ou alta condutância ativados por cálcio, com o sistema

gabaérgico ou dopaminérgico, e nem tampouco esse alcalóide produz tolerância a si próprio ou tolerância cruzada com a morfina. Embora os mecanismos pelos quais o alcalóide DPHD produz antinocicepção não estejam completamente esclarecidos, os presentes resultados indicam fortemente que esse novo alcalóide, a exemplo dos outros compostos analisados no presente trabalho, também possui potencialidade para o desenvolvimento de novas drogas analgésicas.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo confirmam e estendem os dados do nosso grupo e outros descritos na literatura e mostram, claramente, que os compostos isolados das plantas do gênero *Phyllanthus*: geranina, furosina, quercetina, rutina e galato de etila, bem como o novo alcalóides isolado da *Siphocampylus verticillatus*, DPHD, apresentaram uma importante ação antinociceptiva, especialmente em relação à dor de origem neurogênica.

Os mecanismos envolvidos nas ações desses compostos não estão ainda completamente esclarecidos, contudo, no presente estudo foram obtidos avanços significativos a esse respeito, o que torna alguns desses compostos atraentes para o aproveitamento e desenvolvimento de novas moléculas com potencial ação antinociceptiva.

Em conjunto, os resultados do presente estudo indicam que compostos obtidos dos produtos naturais, especialmente aqueles obtidos de plantas medicinais, ainda têm e continuarão tendo um lugar importante no processo de descoberta de novas drogas, particularmente no desenvolvimento de drogas analgésicas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AANONSEN, L.M.; WILCOX, G.L. Nociceptive action of excitatory amino acids in the mouse: effects of spinally administered opioids, phencyclidine and *sigma* agonists. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **243**: 9-19, 1987.
- ABBOTT, F.V.; FRANKLIN, K.B.J. Non competitive antagonism of morphine analgesia by diazepam in the formalin test. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, **24**: 319-321, 1986.
- ABDALA, S., ZARGA, M.A., AFIFI, F., AL-KHALIL, S., MAHASNEH, A., SABRI, S. Effects of 3,3'-di-O-methylquercetin on guinea pig isolated smooth muscle. **J. Pharm. Pharmacol.**, **41**: 138-141, 1989.
- ADAMS, D.H.; NASH, G.B. Disturbance of leucocyte circulation and adhesion to the endothelium as factors in circulatory pathology. **Br. J. Anaesth.**, **77**: 17-31, 1996.
- AKERELE, O. Summary of WHO guidelines for the assessment of herbal medicines. **Herbal Gram**, **28**: 13-19, 1993.
- ALEKSANDROV, P.N., SPERANSKAIA, T.V., BOBKOV, I.G., ZAGOREVSKII, V.A., ZYKOV, D.A. Dynamics of the inflammatory process caused by carrageenin administration during experimental therapy. **Bull. Eksp. Biol. Med.**, **101**: 149-151, 1986a.
- ALEKSANDROV, P.N., SPERANSKAIA, T.V., BOBKOV, I.G., ZAGOREVSKII, V.A., ZYKOV, D.A. Effect of rutin and esculamine on models of aseptic inflammation. **Farmakol. Toksikol.**, **49**: 84-86, 1986b.
- ALMAY, B.G.L.; HAGGENDAL, J.; VON KNORRING, L.; ORELAND, L. 5-HIAA and HVA in CSF in patients with idiopathic pain disorders. **Biol. Psychiat.**, **22**: 403-412, 1987.
- ANAND, P. Nerve growth factor regulates nociception in human health and disease. **Br. J. Anaesth.**, **75**: 201-208, 1995.
- ANSUATEGUI, M.; NAHARRO, L.; FERIA, M. Noradrenergic and opioidergic influences on the antinociceptive effect of clomipramine in the formalin test in rats. **Psychopharmacology**, **98**: 93-96, 1989.
- APPLETON, I. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and pain. *In*: The pharmacology of pain (ed. Dickenson, A. and Besson, J.-M.), pp. 43-60, Springer, Berlin, 1997.
- ARDID, D.; ESCHALIER, A.; LAVAREMSE, J. Evidence for a central but not a peripheral analgesic effect of clomipramine in rats. **Pain**, **45**: 95-100, 1991.

- AUBRY, J.P.; DUGAS, N.; LECOANET-HENCHOZ, S.; HENCHOZ, S.; OUAZ, F.; ZHAO, H.; DELFRAISSY, J.F.; GRABER, P.; KOLB, J.P.; DUGAS, B.; BONNEFOY, J.Y. The 25-KDa soluble CD23 activates type III constitutive nitric oxide-synthase activity via CD11b and CD11c expressed by human monocytes. **J. Immunol.**, **159**: 614-622, 1997.
- BARNES, P.J.; ADCOCK, I. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. **Trends Pharmacol. Sci.**, **14**: 436-441, 1993.
- BASBAUM, A.L.; FIELDS, H.L. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathway and endorphin circuitry. **Annu. Rev. Neurosci.**, **7**: 309-338, 1984.
- BEIRITH, A.; SANTOS, A.R.S.; RODRIGUES, A.L.S.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; CALIXTO, J.B. Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyron in formalin, capsaicin and glutamate tests. Study of supraspinal of the mechanism of action. **Eur. J. Pharmacol.**, **345**: 233-245, 1998.
- BENNETT, G.W., SHARP, T., MARSDEN, C.A., PARKER, T.L. A manually-operated brain tissue slicer suitable for neurotransmitter release studies. **J. Neurosci. Methods**, **7**: 107-115, 1993.
- BENTLEY, G.A.; NEWTON, S.H.; STARR, J. Evidence for an action of morphine and enkephalin on sensory nerve endings in the mouse peritoneum. **Br. J. Pharmacol.**, **73**: 325-333, 1981.
- BERETZ, A., ANTON, R., STOCLET, J.C. Flavonoid compounds are potent inhibitors of cAMP phosphodiesterase. **Experientia**, **34**: 1054, 1978.
- BESSON, J.M. The neurobiology of pain. **Lancet**, **353**: 1610-1615, 1999.
- BESSON, J.M.; CHAOUCH, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. **Physiol. Rev.**, **67**: 67-186, 1987.
- BIAVATTI, M.W., BROWN, R.T., CONTIN, A., LEONART, R. SANTOS, C.A.M. 8,10-n-propyl-lobelidol, um novo alcalóide isolado de *Siphocampylus verticillatus* (Cham.) G. Don, Campunulaceae. In: Anais do XIII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, 1994.
- BIRCH, P.J. Tachykinins central and peripheral effects. In: The Pharmacology of Pain. Handbok of Experimental Pharmacology, vol. 130, pp. 117-134. Eds. A. Dickenson and J.-M. Besson, Springer-Verlag, Berlin, 1997.
- BJELDANES, L.F., CHANG, G.W. Mutagenic activity of quercetin and related compounds. **Science**, **197**: 577-578, 1977.
- BLACKWELL, T.S.; CRHISTMAN, J.W. Sepsis and cytokines: current status. **Br. J. Anaesth.**, **77**: 110-117, 1996.

- BLANE, G.F. Blockade of bradykinin induced nociception in the rat as a test for analgesic drugs with particular reference to morphine antagonists. **J. Pharmacol.**, **19**: 367-373, 1967.
- BLUMBERG, B.S.; MILLMAN, I.; VENKATESWARAN, P.S.; THYAGARAJAN, S.P. Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma-treatment of HBV carries with *Phyllanthus amarus*. **Cancer Detect. Prevent.**, **14**: 195-201, 1989.
- BLUMBERG, H.; WOLF, P.S.; DAYTON, H.B. Use of the writhing test for evaluating analgesic activity of narcotic antagonists. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, **118**: 763-766, 1965.
- BORISSOVA, P., VALCHEVA, S., BELCHEVA, A. Antiinflammatory effect of flavonoids in the natural juice from *Aronia melanocarpa*, rutin and rutin-magnesium complex on an experimental model of inflammation induced by histamine and serotonin. **Acta Physiol. Pharmacol. Bulg.**, **20**: 25-30, 1994.
- BOYCE, S.; RUPNIAK, N.M.J.; CARLSON, E.J.; WEBB, J.; BORKOWSKI, J.A.; HESS, J.F.; STRADER, C.D.; HILL, R.G. Nociception and inflammatory hyperalgesia in B<sub>2</sub> bradykinin receptor knockout mice. **Immunopharmacology**, **33**: 333-335, 1996.
- BREDER, C.; SAPER, C.B. Expression of inducible cyclooxygenase mRNA in the mouse brain after systemic administration of bacterial lipopolysaccharide. **Brain Res.**, **713**: 64-69, 1996.
- BULLETIN OF THE WORLD HEALTH ORGANIZATION. Research guidelines for evaluation the safety and efficacy of herbal medicine. Geneva, pp. 1-86, 1993.
- BURRAS, J.S. Verificação da sensibilidade bacteriana aos princípios de *Siphocampylus verticillatus* (Cham.) G.Don, Campanulaceae. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR, pp. 102, 1985.
- BUSSE, W.W., KOPP, D.E., MIDDLETON, E.Jr. Flavonoid modulation of human neutrophil function. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **73**: 801-809, 1984.
- CALIXTO, J.B. Desenvolvimento de medicamentos: Ensaios pré-clínicos. **Médicos, (Set/Out.)**: pp. 22-25, 1998.
- CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality, control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **33**: 179-189, 2000.
- CALIXTO, J.B., CABRINI, D.A., FERREIRA, J., CAMPOS, M.M. Kinins in pain and inflammation. **Pain**, **87**: 1-5, 2000b.
- CALIXTO, J.B., SANTOS, A.R.S., CECHINEL FILHO, V., YUNES, R.A. A review of the genus *Phyllanthus*: Their chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. **Med. Res. Rev.**, **18**: 225-258, 1998.

- CALIXTO, J.B.; BEIRITH, A.; FERREIRA, J.; SANTOS, A.R.S.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Naturally-occurring antinociceptive substances from plants. A review. **Phytother. Res.**, **14**:1-18, 2000a.
- CALIXTO, J.B.; YUNES, R.A.; NETO, A.S.O.; VALLE, R.M.R.; RAE, G.A. Antispasmodic effects of an alkaloid extracted from *Phyllanthus sellowianus*: a comparative study with papaverine. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **17**, 313-321, 1984.
- CAMPOS, A.H. Mecanismos celulares envolvidos na fisiopatologia da litíase urinária. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Paulo. São Paulo, pp. 87, 1997.
- CAO, Y.Q., MANTYH, P.W., CARLSON, E.J., GILLESPIE, A.-M., EPSTEIN, C.J., BASBAUM, A.I. Primary afferent tachykinins are required to experience moderate to intense pain. **Nature**, **392**: 390-394, 1998.
- CARLSSON, A.; CORRODI, H.; FUXE, K.; HÖKFELT, T. Effect of antidepressant drugs on the depletion of intraneuronal brain 5-hydroxytryptamine caused by 4-methoxy-*-ethyl-meta*-tyramine. **Eur. J. Pharmacol.**, **5**: 357-366, 1969b.
- CARLSSON, A.; CORRODI, H.; FUXE, K.; HÖKFELT, T. Effects of some antidepressant drugs on the depletion of intraneuronal brain catecholamine stores by 4,4-dimethyl-*-meta*-tyramine. **Eur. J. Pharmacol.**, **5**: 367-373, 1969a.
- CARR, D.B.; GOUDAS, L.C. Acute pain. **Lancet**, **353**: 2051-2058, 1999.
- CARTER, R.B. Differentiating analgesic and non-analgesic drug activities on rat hot plate: effect of behavioral endpoint. **Pain**, **47**: 211-220, 1991.
- CARVALHO, W.A.; LEMÔNICA, L. Mecanismos celulares e moleculares da dor inflamatória. Modulação periférica e avanços terapêuticos. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, **48**: 137-158, 1998.
- CATERINA, M.J., LEFFLER, A., MALMBERG, A.B., MARTIN, W.J., TRAFTON, J., PETERSEN-ZEITZ, K.R., KOLTZENBURG, M., BASBAUM, A.I., JULIUS, D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. **Science**, **288**: 306-313, 2000.
- CATERINA, M.J.; SCHUMACHER, M.A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T.A.; LEVINE, J.D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, **389**: 816-824, 1997.
- CATTERALL, W.; MACKIE, K. Local Anesthetics. In: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB et al - Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics, 9 th Ed., New York, McGraw-Hill, pp. 331-347, 1996.
- CECHINEL-FILHO, V., SANTOS, A.R.S., DE CAMPOS, R.O.P., MIGUEL, O.G., YUNES, R.A., FERRARI, F., MESSANA, I., CALIXTO, J.B. Chemical and

- pharmacological studies of *Phyllanthus caroliniensis* in mice. **J. Pharm. Pharmacol.**, **48**: 1231-1236, 1996.
- CHAPMAN, V.; DICKENSON, A.H. The spinal and peripheral roles of bradykinin and prostaglandins in nociceptive processing in the rat. **Eur. J. Pharmacol.**, **219**: 427-433, 1992.
- CHATTERJEE, S.S., BHATTACHARYA, S.K., WONNEMANN, M. SINGER, A., MULLER, W.E. Hyperforin as a possible antidepressant component of *hypericum* extracts. **Life Sci.**, **63**:499-510, 1998.
- CHEN, C.K., PACE-ASCIAK, C.R. Vasorelaxing activity of resveratrol and quercetin in isolated rat aorta. **Gen. Pharmacol.**, **27**: 363-366, 1996.
- CHIESI, M., SCHWALLER, R. Inhibition of constitutive endothelial NO-synthase activity by tannin and quercetin. **Biochem. Pharmacol.**, **49**: 495-501, 1995.
- CHOPRA, R.N.; NAYAR, S.L.; CHOPRA, I.C. In Glossary of Indian Medicinal Plants. Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi, 1956.
- CODERRE, T.J.; KATZ, J.; VACCARIANO, A.L.; MELZACK, R. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: Review of clinical and experimental evidence. **Pain**, **52**: 259-285, 1993.
- CODERRE, T.J.; YASHPAL, K. Intracellular messengers contributing to persistent nociception and hyperalgesia induced by L-glutamate and substance P in the rat formalin pain model. **Eur. J. Pharmacol.**, **6**: 1328-1334, 1994.
- COLLIER, H.O.J.; DINNEEN, L.C.; JOHNSON, C.A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **Br. J. Pharmacol. Chemother.**, **32**: 295-310, 1968.
- CONTIN, A. Contribuição ao estudo fitoquímico de *Siphocampylus verticillatus* (Cham.) G.Don, Campanulaceae. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR, pp. 122, 1993.
- CORRÊA, C.R.; CALIXTO, J.B. Evidence for participation of B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in mouse. **Br. J. Pharmacol.**, **110**: 193-198, 1993.
- CORRÊA, C.R.; KYLE, D.J.; CHAKRAVARTY, S.; CALIXTO, J.B. Antinociceptive profile of the pseudopeptide B<sub>2</sub> bradykinin receptor antagonist NPC 18688 in mice. **Br. J. Pharmacol.**, **117**: 552-558, 1996.
- CRAFT, R.M., HENLEY, S.R., HAASETH, R.C., HRUBY, V.J., PORRECA, F. Opioid antinociception in a rat model of visceral pain: systemic versus local drug administration. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **275**: 1535-1542, 1995.
- CRAGG, G.M., NEWMAN, D.J., SNADER, K.M. Natural products in drug discovery and development. **J. Nat. Prod.**, **60**: 52-60, 1997.

- CROSBY, G., MAROTA, J.J.A., HUANG, P.L. Intact nociception-induced neuroplasticity in transgenic mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. **Neuroscience**, **69**: 1013-1017, 1995.
- DE CAMPOS, R.O.P.; ALVES, R.V.; FERREIRA, J.; KYLE, D.J.; CHAKRAVARTY, S.; MAVUNKEL, B.L.; CALIXTO, J.B. Oral antinociception and oedema inhibition produced by NPC 18884, a non-peptidic bradykinin B<sub>2</sub> receptor antagonist. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, **360**: 278-286, 1999.
- DE CAMPOS, R.O.P.; ALVES, R.V.; KYLE, D.J.; CHAKRAVARTY, S.; MAVUNKEL, B.J.; CALIXTO, J.B. Antioedematogenic and antinociceptive actions of NPC 18521, a novel bradykinin B<sub>2</sub> receptor antagonist. **Eur. J. Pharmacol.**, **316**: 277-286, 1996.
- DE CAMPOS, R.O.P.; HENRIQUES, M.G.M.O.; CALIXTO, J.B. Systemic treatment with *Mycobacterium bovis* bacillus calmette-guérin (BCG) potentiates kinin B<sub>1</sub> receptor agonist-induced nociception and oedema formation in the formalin test in mice. **Neuropeptides**, **32**: 393-403, 1998.
- DE FELIPE, C., HERRERO, J.F., O'BRIEN, J.A., PALMER, J.A., DOYLE, C.A., SMITH, A.J.H., LAIRD, J.M.A., BELMONTE, C., CERVERO, F., HUNT, S.P. Altered nociception, analgesia and aggression in mice lacking the receptor for substance P. **Nature**, **392**: 394-397, 1998.
- DE FELIPE, M.C.; DE CEBALLOS, M.L.; FUENTES, J.A. Hypoalgesia induced by antidepressants in mice: a case for opioid and serotonin. **Eur. J. Pharmacol.**, **125**: 193-199, 1986.
- DE SMET, P.G.A.M. The role of plant-derived drugs and herbal medicines in healthcare. **Drugs**, **54**: 801-840, 1997.
- DIAS, M.A., CAMPOS, A.H., CECHINEL FILHO, V., YUNES, R.A., CALIXTO, J.B. Analysis of the mechanisms underlying the contractile response induced by the hydroalcoholic extract of *Phyllanthus urinaria* in the guinea pig urinary bladder "in vitro". **J. Pharm. Pharmacol.**, **47**: 847-855, 1995a.
- DIAS, M.A., CECHINEL FILHO, V., YUNES, R.A., CALIXTO, J.B. Análise do mecanismo envolvido na resposta contrátil para o extrato hidroalcoólico do *Phyllanthus urinaria* na veia porta isolada de rato. *In*: Anais da X Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 23 a 26 Agosto, Serra Negra, SP; pp. 260, 1995b.
- DIAS, M.A., CECHINEL FILHO, V., YUNES, R.A., CALIXTO, J.B. Efeito relaxante do extrato do *Phyllanthus urinaria* na veia porta isolada de rato. *In*: Anais da XI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 21 a 24 Agosto, Caxambu, MG; pp. 380, 1996a.
- DIAS, M.A., CECHINEL FILHO, V., YUNES, R.A., CALIXTO, J.B. Efeito relaxante do galato de etila "in vitro" isolado do *Phyllanthus urinaria* na veia porta

- isolada de rato. *In: Anais da XIV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil*, 17 a 20 Setembro, Florianópolis, SC; p. 111, 1996b.
- DICKENSON, A.H. Mechanism of central hypersensitivity: excitatory amino acid mechanism and their control. *In: The Pharmacology of Pain. Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 130, pp. 167-210. Eds. A. Dickenson and J.-M. Besson, Springer-Verlag, Berlin, 1997.
- DICKENSON, A.H. Spinal cord pharmacology of pain. **Br. J. Anaesth.**, **75**: 193-200, 1995.
- DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **Br. J. Anaesth.**, **75**:125-131, 1995.
- DRAY, A. Peripheral mediators of pain. *In: The pharmacology of pain* (ed. Dickenson, A. and Besson, J.-M.), pp. 21-41, Springer, Berlin, 1997.
- DRAY, A., PERKINS, M. Kinins and pain. *In: FARMER, S.G. The handbook of immunopharmacology: The kinin system*. Academic Press: London, pp. 157-172, 1997.
- DRAY, A., URBAN, L., DICKENSON, A. Pharmacology of chronic pain. **Trends Pharmacol. Sci.**, **15**: 190-197, 1994.
- DRAY, A.; PERKINS, M. Bradykinin and inflammatory pain. **Trends Neurosci.**, **16**: 99-104, 1993.
- DUARTE, J., PÉREZ-VIZCAÍNO, F., ZARZUELO, A., JIMÉNEZ, J., TAMARGO, J. Vasodilator effects of quercetin in isolated rat vascular smooth muscle. **Eur. J. Pharmacol.**, **239**: 1-7, 1993.
- DUBUISSON, D.; DENNIS, S.G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, **4**: 161-174, 1977.
- DUGAS, A.J.Jr., CASTANEDA-ACOSTA, J., BONIN, G.C., PRICE, K.L., FISCHER, N.H., WINSTON, G.W. Evaluation of the total peroxyl radical-scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships. **J. Nat. Prod.**, **63**: 327-331, 2000.
- DUHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **J. Amer. Pharm. Assoc.**, **46**: 208-209, 1957.
- EDDY, N.B.; LEIMBACK, D. Synthetic analgesics II. Dithienylbutenyl and dithienylbutylamines. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **107**: 385-393, 1953.
- EISEMBERG, E.; VOS, B.P.; STRASSMAN, A.M. The NMDA antagonist nemantine blocks pain behavior in a rat model of formalin-induced facial pain. **Pain**, **54**: 302-307, 1993.

- EISERICH, J.P.; HRISTOVA, M.; CROSS, C.E.; JONES, A.D.; FREEMAN, B.A.; HALLIWELL, B.; VAN DER VLIET, A. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. **Nature**, **391**: 393-397, 1998.
- ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. *In: Farmacognosia: da planta ao medicamento*/Organizado por Simões, C.M.O. et al.. Porto Alegre/Florianópolis: ed. Universidade/UFRGS/ed. Da UFSC, pp. 87-99, 1999.
- ELISABETSKY, E., WANNMACHER, L. The status of ethnopharmacology in Brazil. **J. Ethnopharmacol.**, **38**: 137-143, 1993.
- ELLIOTI, K.; MINAMI, N.; KALOESNIKOV, Y.A. The NMDA receptor antagonist LY 274614 and MK-801, and the nitric oxide synthase inhibitor, NG-nitro-L-arginine, attenuate analgesic tolerance to the mu opioid morphine but not to kappa opioids. **Pain**, **56**: 69-75, 1994.
- ENGLHARDT, G. Meloxicam inhibits preferentially COX-2. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, **47**: A98, 1994.
- ENGLHARDT, G., BÖGEL, R., SCHNITZLER, C., UTZMANN, R. Meloxicam: influence on arachidonic acid metabolism. Part I. In vitro findings. **Biochem. Pharmacol.**, **51**: 21-28, 1996a.
- ENGLHARDT, G., BÖGEL, R., SCHNITZLER, C., UTZMANN, R. Meloxicam: influence on arachidonic acid metabolism. Part II. In vivo findings. **Biochem. Pharmacol.**, **51**: 29-38, 1996b.
- ENGLHARDT, G., HOMMA, D., SCHLEGEL, K., UTZMANN, R., SCHNITZLER, C. Anti-inflammatory, analgesic, antipyretic and related properties of meloxicam, a new non-steroidal anti-inflammatory agent with favourable gastrointestinal tolerance. **Inflamm. Res.**, **44**: 423-433, 1995.
- FARNSWORTH, N.R. Ethnopharmacology and future drug development the north american experience. **J. Ethnopharmacol.**, **38**: 145-152, 1993.
- FARNSWORTH, N.R., AKERELLE, O., BINGEL, A.S., SOERJARTO, D.D., GUO, Z. Medicinal plants in therapy. **Bull. WHO.**, **63**: 965-981, 1985.
- FARNSWORTH, N.R., BINGEL, A.S. *In: New natural products and plant drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity*. Springer: New York; pp. 61-73, 1997.
- FARNSWORTH, N.R., MORRIS, R.W. Higher plants the sleeping giant of drug development. **Am. J. Pharmac. Educ.**, **148**: 46-52, 1976.
- FERNANDES, E.S., SANTOS, A.R.S., RODRIGUES, A.L.S., MIGUEL, O.G., YUNES, R.A., CALIXTO, J.B. Effect of the extract and the alkaloid, cis-8,10-di-n-propyllobelidiol hydrochloride dihydrate from *Siphocampylus verticillatus*

on the uptake and release of monoamines. *In: Abstract of XVI Latinoamerican Congress of Pharmacology, September 13-17, Águas de Lindóia, SP, Brasil, 2000.*

- FERREIRA, J., SANTOS, A.R.S., CALIXTO, J.B. The role of systemic, spinal and supraspinal L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway in thermal hyperalgesia caused by intrathecal injection of glutamate in mice. **Neuropharmacology**, **38**: 835-842, 1999.
- FERREIRA, S.H. Hiperalgesia inflamatória, óxido nítrico y control periférico del dolor. **Rev. Lat. Amer. del Dolor**, **1**:2:6-17, 1995.
- FERREIRA, S.H. The Role of Interleukins and Nitric Oxide in the Mediation of Inflammatory Pain and its Control by Peripheral Analgesics. **Drugs**, **46** (Suppl. 1):1-9, 1993.
- FERREIRA, S.H., BARATA, L.E., SALLES, S.L.M., QUEIRÓZ, S.R.R., HELUY NETO, N.E., CORAZZA, R., FARIAS, R.C. Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil. Rio de Janeiro. Academia Brasileira de Ciências; pp. 33-34, 1998.
- FERREIRA, S.H.; DUARTE, I.D.G.; LORENZETTI, B.B. The molecular mechanism of action of morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. **Eur. J. Pharmacol.**, **201**:121-122, 1991.
- FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; BRISTOW, A.F. Interleukin-1 $\beta$  as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. **Nature**, **334**: 698-700, 1988.
- FERREIRA, S.H.; VANE, J.R. Mode of action of antiinflammatory agents which are prostaglandin synthetase inhibitory. *In: Vane, J.R.; Ferreira, S.H. Anti-inflammatory Drugs, New York, Springer-Verlag, pp: 348-398, 1979.*
- FIALIP, J.; AMAITRE, O.; BOUGEROLLE, A.M.; BERGER, Z.A.; ESCHALIER, A.; MARTY, H. Antinociceptive activity of metopramine in mice. Relationship with its pharmacokinetic properties. **Life Sci.**, **50**: 161- 168, 1992.
- FIELDS, H.L.; HEINRICHER, M.M.; MASON, P. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. **Annu. Rev. Neurosci.**, **14**: 219-245, 1991.
- FLOWER, R.J.; ROTHWELL, N.J. Lipocortin-1: Cellular mechanisms and clinical relevance. **Trends Pharmacol. Sci.**, **15**: 71-76, 1994.
- FÖRSTEMANN, U.; NAKANE, M.; TRACEY, W.T.; POLLOCK, J.S. Isoform of nitric oxide synthase: functions in the cardiovascular system. **Eur. Heart J.**, **14**: 10-15, 1993.
- FREY, H.H., SCHICHT, S. Interaction of mu-opioid antagonistic drugs with antiepileptics. **Pharmacol. Toxicol.** **78**: 264-268, 1996.

- FRICK, R.W. Three treatments for chronic venous insufficiency: escin, hydroxyethylrutin, and Daflon. **Angiology**, **51**: 197-205, 2000.
- FRÖDE, T.S. Mediadores e mecanismos envolvidos na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos. Dissertação de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, pp. 176, 2000.
- FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Res. Bull.**, **48**: 129-141, 1999.
- GALEOTTI, N., GHELARDINI, C., BARTOLINI, A. The role of potassium channels in antihistamine analgesia. **Neuropharmacology**, **38**: 1893-1901, 1999a.
- GALEOTTI, N., GHELARDINI, C., VINCI, M.C., BARTOLINI, A. Role of potassium channels in the antinociception induced by agonists of  $\alpha_2$ -adrenoceptors. **Br. J. Pharmacol.**, **126**: 1214-1220, 1999b.
- GALLEY, H.F.; WEBSTER, N.R. The Immuno-inflammatory cascade. **Br. J. Anaesth.**, **77**: 11-16, 1996.
- GAMSE, R.; LACKNER, D.; GAMSE, G.; LEEMAN, S.E. Effect of capsaicin pretreatment on capsaicin-evoked release of immunoreactive somatostatin and substance P from primary afferent neurons. **Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, **316**: 38-41, 1981.
- GAMSE, R.; MOLNAR, A.; LEMBECK, F. Substance P release from spinal cord slices by capsaicin. **Life Sci.**, **25**: 629-636, 1979.
- GANET, C.; CARRVETTE, A.; FARDIN, V. Pharmacological properties of a potent and selective non peptide substance P antagonist. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **88**: 10208-10212, 1991.
- GARELLO, F. Estudio del *Siphocampylus foliosus* Gris. **Archivos de Farmácia y Bioquímica (Tucuman)**, **5**: 5-46, 1950.
- GENE, R.M., CARTANA, C., ADZET, T., MARIN, E., PARELLA, T., CANIGUERAL, S. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*: identification of its active constituents. **Planta Med.**, **62**: 232-235, 1996.
- GIMEMEZ-GALLEGO, G., NAVIA, M.A., REUBEN, J.P., KATZ, G.M., KACZOROWSKI, G.J., GARCIA, M.L. Purification, sequence and model structure of charybdotoxin, a potent selective inhibitor of calcium-activated potassium channels. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **85**: 3329-3333, 1988.
- GOBBI, M., DALLA VALLE, F., CIAPPARELLI, C., DIOMEDE, L., MORAZZONI, P., VEROTTA, L., CARCCIA, S., CERVO, L., MENNINI, T. *Hypericum perforatum* L. extract does not inhibit 5-HT transporter in rat brain cortex. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, **360**: 262-269, 1999.

- GORSKI, F.; CORRÊA, C.R.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Potent antinociceptive activity of the hydroalcoholic extract from *Phyllanthus corcovadensis*. **J. Pharm. Pharmacol.**, **45**: 1046-1049, 1993.
- GRUBB, B.D. Peripheral and central mechanisms of pain. **Br. J. Anaesth.** **81**: 8-11, 1998.
- GRÜNWALD, J. The European phytomedicines market: figures, trends, analysis. **Herbal Gram**, **34**: 60-65, 1995.
- GRÜNWALD, J., BÜTTEL, K. The European phytotherapeutics market: figures, trends, analyses. **Drugs Made in Germany**, **39**: 6-11, 1996.
- GUIMARÃES, C.L. Efeitos das endotelinas no íleo isolado de cobaia submetido à estimulação elétrica de campo. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, pp. 96, 1994.
- GUIMARÃES, C.L., RAE, G.A. Dual effects of endothelins -1, -2 and -3 on guinea pig field-stimulated ileum: Possible mediation by two receptors coupled to pertussis toxin-insensitive mechanisms. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **261**: 1253-1259, 1992.
- GUO, F.H.; DE RAEVE, H.R.; RICE, T.W.; STUEHR, D.J.; THUNNISSEN, F.B.; ERZURUM, S.C. Continuous nitric oxide synthase by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **92**: 7809-7813, 1995.
- HALEY, J.E.; DICKENSON, A.H.; SCHACHTER, M. Electrophysiological evidence for a role of nitric oxide in prolonged chemical nociception in rat. **Neuropharmacology**, **31**, 51-58, 1992.
- HAMBURGER, M., HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, **30**: 3864-3874, 1991.
- HEAPY, C.G.; JAMIESON, A.; RUSSELL, N.J.W. Afferent C-fibre and A delta activity in models of inflammation. **Br. J. Pharmacol.**, **90**: 164p, 1987.
- HERNANDEZ, A., SOTO-MOYANO, R., MESTRE, C., ESCHALIER, A., PELISSIER, I., PAEILE, C., CONTRERAS, E. Intrathecal pertussis toxin but not cyclic AMP blocks kappa opioid-induced antinociception in rat. **Int. J. Neurosci.**, **81**: 193-197, 1995.
- HUNSKAAR, S.; BERGE, O.-G.; HOLE, K. Dissociation between antinociceptive and anti-inflammatory effects of acetylsalicylic acid and indomethacin in the formalin test. **Pain**, **25**: 125-132, 1986.
- HUNSKAAR, S.; FASMER, O.B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesia. **J. Neurosci. Meth.**, **14**: 69-76, 1985.

- HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, **30**: 103-114, 1987.
- HWANG, A.S.; WILCOX, G.L. Analgesic properties of intrathecally administered heterocyclic antidepressants. **Pain**, **28**: 343-355, 1987.
- HYLDEN, J.K.L.; WILCOX, G.L. Intrathecal morphine in mice: A new technique. **Eur. J. Pharmacol.**, **67**: 313-316, 1980.
- JABBUR, S.J., SAADÉ, N.E. From electrical wiring to plastic neurons: evolving approaches to the study of pain. **Pain, Supl. 6**: S87-S92, 1999.
- JANCSÓ, G.; HOKFELT, T.; LUNDBERG, J.M.; KIRALY, E.; HALASZ, N.; NILSSON, G.; TERENIUS, L.; REHFELD, J.; STEINBUSCH, H.; VERHOFSTAD, A.; ELDE, E.; SAID, S.; BROWN, M. Immunohistochemical studies on the effects of capsaicin on spinal and medullary peptide and monoamine neurons using antisera to substance P, gastrin CCK, somatostatin, VIP, enkephalin, neurotensin and 5-HT. **J. Neurocytol.**, **10**: 963-980, 1981.
- JIANG, M., GOLD, M.S., BOULAY, G., SPICHER, K., PEYTON, M., BRABET, P., SRINIVASAN, Y., RUDOLPH, U., ELLISON, G., BIRNBAUMER, L. Multiple neurological abnormalities in mice deficient in the G protein G<sub>o</sub>. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **95**: 3269-3274, 1998.
- JURÁNEK, I.; LEMBECK, F. Afferent C-fibres release substance P and glutamate. **J. Physiol. Pharmacol.**, **75**: 661-664, 1997.
- JUURLINK, B.H., PATERSON, P.G. Review of oxidative stress in brain and spinal cord injury: suggestions for pharmacological and nutritional management strategies. **J. Spinal Cord Med.**, **21**: 309-334, 1998.
- KANG, Y.M., HU, W.M., QIAO, J.T. Endogenous opioids and ATP-sensitive potassium channels are involved in the mediation of apomorphine-induced antinociception at the spinal level: a behavioral study in rats. **Brain Res. Bull.**, **46**: 225-228, 1998.
- KAUFMANN, W.E.; WORLEY, P.F.; PEGG, J.; BARMER, M.; ISAKSON, P. COX-2, a synaptically induced enzyme, is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **96**: 2317-2321, 1996.
- KIM, S.Y., GAO, J.J., KANG, H.K. Two flavonoids from the leaves of *Morus alba* induce differentiation of the human promyelocytic leukemia (HL-60) cell line. **Biol. Pharm. Bull.**, **23**: 451-455, 2000.
- KITTO, K.F.; HALEY, J.E.; WILCOX, G.L. Involvement of nitric oxide in spinally mediated hyperalgesia in the mouse. **Neurosci. Lett.**, **148**: 1-5, 1992.

- KONIG, M., ZIMMER, A.M., STEINER, H., HOLMES, P.V., CRAWLEY, J.N., BROWNSTEIN, M.J., ZIMMER, A. Pain responses, anxiety and aggression in mice deficient in pre-proenkephalin. **Nature**, **383**: 535-538, 1996.
- KOSTER, R., ANDERSON, M., DE BEER, E.J. Acetic acid for analgesic screening. **Fed. Proc.**, **18**: 412, 1959.
- KUPCHAN, S.M., LA VOIE, E.J., BRANFMAN, A.R., FEI, B.Y., BRIGHT, W.M., BRYAN, R.F. Phyllanthocin, a novel bisabolane aglycone from the antileukemic glycoside phyllanthoside. **J. Am. Chem. Soc.**, **99**: 3199-3201, 1978.
- LAPA, A.J., SOUCCAR, C., LIMA-LANDMAN, M.T.R., GODINHO, R.O., DE LIMA, T.C.M. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. *In: Farmacognosia: da planta ao medicamento*/Organizado por Simões, C.M.O. et al.. Porto Alegre/Florianópolis: ed. Universidade/UFRGS/ed. Da UFSC, pp. 181-196, 1999.
- LEIJON, G.; BOIVIE, J. Central post-stroke pain: a controlled trial of amitriptyline and carbamazepine. **Pain**, **36**: 27-36, 1989.
- LEMBECK, F. The 1988 Ulf von Euler Lecture. Substance P: from extract to excitement. **Acta Physiol. Scand.**, **133**: 435-454, 1988.
- LEVINE, J.D.; TAIWO, Y. Inflammatory Pain. *In: Wall PD, Melzack R - Textbook of Pain*, 3 rd Ed, Edin-burgh, Churchill Livingtone, pp. 45-56, 1994.
- LINDAHL, M., TAGESSON, C. Flavonoids as phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors: importance of their structure for selective inhibition of group II phospholipase A<sub>2</sub>. **Inflammation**, **21**: 347-356, 1997.
- LINDAHL, M., TAGESSON, C. Selective inhibition of group II phospholipase A<sub>2</sub> by quercetin. **Inflammation**, **17**: 573-582, 1993.
- LIPP, J. Possible mechanisms of morphine analgesia. **Clin. Neuropharmacol.**, **14**: 131-147, 1991.
- LOESER, J.D., MELZACK, R. Pain: an overview. **Lancet**, **353**: 1607-1609, 1999.
- LOHMANN, A.B., WELCH, S.P. Antisenses to opioid receptors attenuate ATP-gated K<sup>+</sup> channel opener-induced antinociception. **Eur. J. Pharmacol.**, **384**: 147-152, 1999.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FSRR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, **193**: 266-275, 1951.
- LUND, F., GLENNE, P.O., INACIO, J., LARSSON, U.B., LAVSTEDT, S., QIAN, Z., SCHIOTZ, J., TILGREN, C. Intravenous hydroxyethylrutosides combined

with long-term oral anticoagulation in arteriosclerotic nonreconstructable critical leg ischemia: a retrospective study. **Angiology**, **50**: 433-445, 1999.

MAAS, J. Efeitos das endotelinas e cininas sobre respostas neurogênicas no ducto deferente de camundongo. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, pp. 103, 1995.

MAAS, J., RAE, G.A., HUIDOBRO-TORO, J.P., CALIXTO, J.B. Characterization of kinin receptors modulating neurogenic contractions of the mouse isolated vas deferens. **Br. J. Pharmacol.**, **114**: 1471-1477, 1995.

MACFARLENE, B.V., WRIGHT, A., O'CALLAGHAN, J., BENSON, H.A. Chronic neuropathic pain and its control by drugs. **Pharmacol. Ther.**, **75**: 1-19, 1997.

MAGNI, G. On the relationship between chronic pain and depression when there is on organic lesion. **Pain**, **31**: 1-21, 1987.

MAGNI, G. The use of antidepressants in the treatment of chronic pain. A review of the current evidence. **Drugs**, **42**: 730-748, 1991.

MALCANGIO, M., GHELARDINI, C., GIOTTI, A., MALMBERG-AIELLO, P., BARTOLINI, A. CGP 35348, a new GABA<sub>B</sub> antagonist, prevents antinociception and muscle-relaxant effect by baclofen. **Br. J. Pharmacol.**, **103**: 1303-1308, 1991.

MALMBERG, A.B., BRANDON, E.P., IDZERDA, R.L., LIU, H., MACKNIGHT, G.S., BASBAUM, A.I. Diminished inflammation and nociceptive pain with preservation of neuropathic pain in mice with a targeted mutation of the Type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. **J. Neurosci.**, **17**: 7462-7470, 1997a.

MALMBERG, A.B., CHEN, C., TONEGAWA, S., BASBAUM, A.I. Preserved acute pain and reduced neuropathic pain in mice lacking PKC $\gamma$ . **Science**, **278**: 279-283, 1997b.

MALMBERG, A.B., YAKSH, T.L. Capsaicin-evoked prostaglandin E<sub>2</sub> release in spinal cord slice: Relative effect of cyclooxygenase inhibitors. **Eur. J. Pharmacol.**, **271**: 293-299, 1994.

MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. The effect of morphine on formalin-evoked behaviour and spinal release of excitatory amino acids and prostaglandin E<sub>2</sub> using microdialysis in conscious rats. **Br. J. Pharmacol.**, **114**: 1069-1075, 1995.

MALSEED, R.T.; GOLDSTEIN, J.F. Enhancement of morphine analgesia by tricyclic antidepressants. **Neuropharmacology**, **18**: 827-829, 1979.

MANJEET, K.R., GHOSH, B. Quercetin inhibits LPS-induced nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha production in murine macrophages. **Int. J. Immunopharmacol.**, **21**: 435-443, 1999.

- MASFERRER, J.L.; ZWEIFEL, B.S.; MANNING, P.T.; HAUSER, S.D.; LEAHY, K.M.; SMITH, W.G.; ISAKSON, P.C.; SEIBERT, K. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase-2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **91**: 3228-3232, 1994.
- MCCORMACK, K. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and spinal nociceptive processing. **Pain**, **59**: 9-43, 1994.
- MCCMAHON, J.L.; DIMITRIEVA, N.; KOLTZENBURG, M. Visceral pain. **Br. J. Anaesth.**, **75**: 132-144, 1995.
- MCQUAY, H.J., MOORE, R.A. Opioid problems, and morphine metabolism and excretion. *In*: The pharmacology of pain (ed. Dickenson, A. and Besson, J.-M.), pp. 335-360, Springer, Berlin, 1997.
- MELLER, S.T.; GEBHART, G.F. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. **Pain**, **52**: 127-136, 1993.
- MÉNARD, D.P., VAN ROSSUM, D., KAR, S., JOLICOEUR, F.B., JHAMANDAS, K., QUIRION, R. Tolerance to the antinociceptive properties of morphine in the rat spinal cord: Alteration of calcitonin gene-related peptide-like immunostaining and receptor binding sites. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **273**: 887-894, 1995.
- MENDELSON, R., BALICK, M. The value of undiscovered pharmaceuticals in tropical forests. **Econ. Bot.**, **49**: 223-228, 1995.
- MENDES, G.L., SANTOS, A.R.S., MALHEIROS, A., CECHINEL FILHO, V., YUNES, R.A., CALIXTO, J.B. Assessment of mechanisms involved in antinociception caused by sesquiterpene polygodial. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **292**: 164-172, 2000.
- MENZIES, J.R.W., PATERSON, S.J., DUWIEJUA, M., CORBETT, A.D. Opioid activity of alkaloids extracted from *Picralima nitida* (fam. Apocynaceae). **Eur. J. Pharmacol.**, **350**: 101-108, 1998.
- MERSKEY, H.; BOGDUK, N. Classification of chronic pain: description of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. IASP Press: Seattle, 1994.
- MIGUEL, O.G. Estudo químico e farmacológico das espécies *Phyllanthus sellowianus*, *Phyllanthus fraternus* e *Siphocampylus verticillatus*. Dissertação de Doutorado. Universidade Federal de Santa de Catarina. Florianópolis, pp. 219, 1996.
- MIGUEL, O.G., CALIXTO, J.B., SANTOS, A.R.S., MESSANA, I., FERRARI, F., CECHINEL-FILHO, V., PIZZOLATTI, M.G., YUNES, R.A. Chemical and preliminary analgesic evaluation of geraniin and furososin isolated from *Phyllanthus sellowianus*. **Planta Med.**, **62**: 97-102, 1996b.

- MIGUEL, O.G., CECHINEL-FILHO, V., PIZZOLATTI, M.G., SANTOS, A.R.S., CALIXTO, J.B., FERRARI, F., MESSANA, I., YUNES, R.A. A triterpene and phenolic compounds from leaves and stems of *Phyllanthus sellowianus*. **Planta Med.**, **61**: 391, 1995.
- MIGUEL, O.G., PIZZOLATTI, M.G., YUNES, R.A., VEANCATO, I., CALIXTO, J.B., SANTOS, A.R.S., CONTIN, A., MOREIRA, E.A. *cis*-8,10-Di-*n*-propyllobelidiol hydrochloride dihydrate. **Acta Crystallogr. C** **52**: 1223-1225, 1996a.
- MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Prog. Neurobiol.**, **57**: 1-164, 1999.
- MILLAN, M.J. The role of descending noradrenergic and serotonergic pathways in the modulation of nociception: Focus on receptor multiplicity *In*: The pharmacology of pain (ed. Dickenson, A. and Besson, J.-M.), pp. 385-446, Springer, Berlin, 1997.
- MIRSALIKOKA, N.M., PAKUDINA, Z.P. Flavonoid inhibitors of Na-K-dependent ATPase. **Klim. Prir. Soedin**, **1**: 44-46, 1977.
- MITTERMEIER, R.A., WERNWR, T., AURES, J.M., FONSECA, G.A.B. O país da megadiversidade. **Ciência Hoje**, **14**: 21-27, 1992.
- MOGIL, J.S., GRISEL, J.E. Transgenic studies of pain. **Pain**, **77**: 107-128, 1998.
- MONCADA, S.; FERREIRA, S.H.; VANE, J.R. Pain and inflammatory mediators. *In*: Vane, J.R., Ferreira S.H. – HandBooks of Experimental Inflammation, New York, Springer-Verlag, pp. 588-616, 1978.
- MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric-oxide pathway. **N. Engl. J. Med.**, **329**: 2002-2012, 1993.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, **43**: 109-142, 1991.
- MOORE, P.K.; OLUYOMI, A.O.; BABBEDGE, R.C.; WALLACE, P.; HART, S.L. L-N<sup>G</sup>-nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. **Br. J. Pharmacol.**, **102**, 198-202, 1991.
- MORALES, M.A., LOZOYA, X. Calcium-antagonist effects of quercetin on aortic smooth muscle. **Planta Med.**, **60**: 313-317, 1993.
- MOREIRA, E.A., SANTOS, C.A.M., LEONART, R. LAMB, L. Investigação química preliminar de 2 espécies de *Siphocampylus verticillatus*, Campanulaceae. **Tribuna Farmacêutica**, **51**: 26-31, 1984.
- MORRIS, S.M.; BILLIAR, T.R. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. **Am. J. Physiol.**, **266**: 829-839, 1994.

- MORTON, J.F. Atlas of Medicinal Plants in Middle America - Bahamas to Yucatan. 1 st ed., Springfield: Charles C. Thomas (ed.), pp. 457-463, 1981.
- MURASE, T., KUME, N., HASE, T., SHIBUYA, Y., NISHIZAWA, Y., TOKIMITSU, I., KITA, T. Gallates inhibit cytokine-induced nuclear translocation of NF-kappaB and expression of leukocyte adhesion molecules in vascular endothelial cells. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, **19**: 1412-1420, 1999.
- MURRAY, C.W.; PORRECA, F.; COWAN, A. Methodological refinements to the mouse paw formalin test. An animal model of tonic pain. **J. Pharmacol. Meth.**, **20**: 175-186, 1988.
- NARA, T., GLEYE, J., LAVERGNEDE, C.E., STANILAS, E. Flavonoids of *Phyllanthus niruri* L.; *Phyllanthus urinaria* L. and *Phyllanthus orbiculatus* L. C. Rich. **Planta Med. Phytother.**, **11**: 82, 1977.
- NATHAN, C.; XIE, Q. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. **J. Biol. Chem.**, **269**: 13725-13728, 1994.
- OH, U., HWANG, S.W., KIM, D. Capsaicin activates a nonselective cation channel in cultured neonatal rat dorsal root ganglion neurons. **J. Neurosci.**, **15**: 1659-1667, 1996.
- OLIVER-BEVER, B. Medicinal plants in tropical West Africa III. Anti-infection therapy with higher plants. **J. Ethnopharmacol.**, **9**: 1-83, 1983.
- OMOTE, K., KAWAMATA, T., KAWAMATA, M., NAMIKI, A. Formalin-induced release of excitatory amino acids in the skin of the rat hindpaw. **Brain Res.**, **787**: 161-164, 1998.
- OSSIPOV, M.H., KOVELOWSKI, C.J., WHEELER-ACETO, H., COWAN, A., HUNTER, J.C., LAI, J., MALAN T.P., PORRECA, F. Opioid antagonists and antisera to endogenous opioids increase the nociceptive response to formalin: demonstration of an opioid kappa and delta inhibitory tone. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **277**: 784-788, 1996.
- OSSIPOV, M.H., MALAN Jr., T.P., LAI, J., PORRECA, F. Opioid pharmacology of acute and chronic pain. *In*: The pharmacology of pain (ed. Dickenson, A. and Besson, J.-M.), pp. 305-334, Springer, Berlin, 1997.
- OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Prog. Neurobiol.**, **54**: 581-618, 1998.
- PANERAI, A.E.; BIANCHI, M.; SACERDOTE, P.; RIPAMONTI, C.; VENTRAFRIDDA, V.; DE CONNO, F. Antidepressants in cancer pain. **J. Palliat. Care**, **7**: 42-44, 1991.
- PAULINO, N. Análise farmacológica do extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus urinaria* e de alguns de seus constituintes sobre a traquéia isolada de cobaia.

Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, pp. 156, 1996.

- PAULINO, N., CECHINEL FILHO, V., PIZOLLATTI, M.G., YUNES, R.A., CALIXTO, J.B. Mechanisms involved in the contractile response induced by the hydroalcoholic extract of *Phyllanthus urinaria* on the guinea pig isolated trachea: evidence for participation of tachykinin and influx of extracellular  $Ca^{2+}$  sensitive to ruthenium red. **Gen. Pharmacol.**, **27**: 795-802, 1996a.
- PAULINO, N., CECHINEL FILHO, V., YUNES, R.A., CALIXTO, J.B. The relaxant effect of extract of *Phyllanthus urinaria* on the guinea pig isolated trachea: Evidence for involvement of ATP-sensitive potassium channels. **J. Pharm. Pharmacol.**, **48**: 1158-1163, 1996b
- PAULINO, N., PIZOLLATTI, M.G., YUNES, R.A., CECHINEL-FILHO, V., CRECZYNSKI-PASA, T.B., CALIXTO, J.B. The mechanisms underlying the relaxant effect of methyl and ethyl gallates in the guinea pig trachea in vitro: contribution of potassium channels. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, **360**: 311-336, 1999.
- PERRY, L.M., METZGER, J. Medicinal plants of East and Southeast Asia: Attributed properties and uses. Cambridge : MIT Press, pp. 149-151, 1980.
- PERT, C.B., SNYDER, S.H., MAY, E. Opiate receptor interactions of benzomorphans in rat brain homogenates. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **196**: 316-322, 1976.
- PESQUERO, J.B., ARAUJO, R.C., HEPPESTALL, P.A., STUCKY, C.L., SILVA Jr., J.A., WALTHER, T., OLIVEIRA, S.M., PESQUERO, J.L., PAIVA, A.C., CALIXTO, J.B., LEWIN, G.R., BADER, M. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin  $B_1$  receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **97**: 8140-8145, 2000.
- PETTIT, G.R., CRAGG, G.M., NIVEN, M.L., NASSIMBENI, L.R. Structure of the principal antineoplastic glycosides of *Phyllanthus acuminatus* Vahl. **Can. J. Chem.**, **61**: 2630-2632, 1983.
- PETTIT, G.R., CRAGG, G.M., SUFFNESS, M.I., GUST, D.; BOETTNER, F.E., WILLIAMS, M., SAENZ-RENAULD, J.A., BROWN, P., SCHMIDT, J.M.; ELLIS, P.D. Antineoplastic agents 104. Isolation and structure of the *Phyllanthus acuminatus* Vahl. (Euphorbiaceae) glycosides. **J. Org. Chem.**, **49**: 4258-4266, 1984.
- PETTIT, G.R., SCHAUFELBERGER, D.E., NIEMAN, R.A., DUFRESNE, C., SAENZ-REUNAULD, J.A. Antineoplastic agents, 177. Isolation and structure of phyllanthostatin 6. **J. Nat. Prod.**, **53**: 1406-1413, 1990.
- PETTIT, G.R.; CRAGG, G.M.; SUFFNESS, M.I. Phyllanthostatin 1. phyllanthoside orthoacid rearrangement. **J. Org. Chem.**, **50**: 5060-5063, 1985.

- PINI, L.A., SANDRINI, M., VITALE, G. The antinociceptive action of paracetamol is associated with changes in the serotonergic system in the rat brain. **Eur. J. Pharmacol.**, **308**: 31-40, 1996.
- POYNARD, T., VALTERIO, C. Meta-analysis of hydroxyethylrutosides in the treatment of chronic venous insufficiency. **Vasa**, **23**: 244-250, 1994.
- RAE, G.A., CALIXTO, J.B. Effects of endothelins on nerve-mediated contractions of the mouse vas deferens. **Life Sci.** **47**: 83-89, 1990.
- RANG, H.P.; BEVAN, S.; DRAY, A. Nociceptive peripheral neurons: cellular properties, In: Wall, P.D., Melzack, R. Textbook of Pain, 3rd Ed, Edinburgh, Churchill Livingstone, pp. 57-78, 1994.
- RANG, H.P.; URBAN, L. New molecules in analgesia. **Br. J. Anaesth.**, **75**: 145-156, 1995.
- REGOLI, D.; BARABE, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. **Pharmacol. Rev.**, **32**: 1-46, 1980.
- RIBEIRO, R.A., VALE, M.L., THOMAZZI, S.M., PASCHOALATO, A.B.P., POOLE, S., FERREIRA, S.H., CUNHA, F.Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, **387**: 111-118, 2000.
- ROBBERS, J.E., SPEEDIE, M.K., TYLER, V.E. Farmacognosia e farmacobiocnologia. São Paulo: Primier, pp. 1-16, 1997.
- ROCHA E SILVA, M.O. Brief history of inflammation. In: Handbook of Experimental Pharmacology. VANE, J.R.; FERREIRA, S.H. (eds), New York: Springer-Verlag, pp: 6-25, 1978.
- ROSLAND, J.H. The formalin test in mice: the influence of ambient temperature. **Pain**, **45**: 211-216, 1991.
- ROSLAND, J.H., HUNSKAAR, S., HOLE, K. Diazepam attenuates morphine antinociception test dependently in mice. **Pharmacol. Toxicol.**, **66**: 382-386, 1990.
- RUSSO, C.M., BROSE, W.G. Chronic pain. **Ann. Rev. Med.** **49**:123-133, 1998.
- SAKURADA, T., SUGIYAMA, A., SAKURADA, C., TAN-NO, K., SAKURADA, S., KISARA, K., HARA, A., ABIKO, Y. Involvement of nitric oxide spinally mediated capsaicin- and glutamate-induced behavioural responses in the mouse. **Neurochem. Int.**, **29**: 271-278, 1996a.
- SAKURADA, T., SUGIYAMA, A., SAKURADA, C., TAN-NO, K., YONEZAWA, A., SAKURADA, S., KISARA, K. Effect of nitric oxide inhibition on capsaicin-induced nociceptive response. **Life Sci.**, **59**: 921-930, 1996b.

- SAKURADA, T.; KATSUMATA, K.; TAN-NO, K.; SAKURADA, S.; KISARA, K. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. **Neuropharmacology**, **31**: 1279-1285, 1992.
- SAKURADA, T.; KATSUMATA, K.; YOGO, H.; TAN-NO, K.; SAKURADA, S.; KISARA, K. Antinociception induced by CP 96,345, a non-peptide NK-1 receptor antagonist, in the mouse formalin and capsaicin tests. **Neurosci. Lett.**, **151**, 142-145, 1993.
- SALVEMINI, D.; DE NUCCI, G.; GRYGLEWSKI, R., VANE, J.R. Human neutrophils and mononuclear cells inhibit platelet aggregation by releasing a nitric oxide-like factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **86**: 6328-6332, 1989.
- SÁNCHEZ-BLASQUEZ, P., GARZÓN, J. Cholera toxin and pertussis toxin on opioid- and  $\alpha_2$ -mediated supraspinal analgesia in mice. **Life Sci.**, **48**: 1721-1727, 1991.
- SANTOS, A.R.S., CALIXTO, J.B. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neuropeptides**, **31**: 381-389, 1997a.
- SANTOS, A.R.S., CALIXTO, J.B. Ruthenium red and capsazepine antinociceptive effect in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neurosci. Lett.**, **235**: 73-76, 1997b.
- SANTOS, A.R.S., CECHINEL-FILHO, V., YUNES, R.A., CALIXTO, J.B. Analysis of the mechanisms underlying the antinociceptive effect of the extracts of plants from the genus *Phyllanthus*. **Gen. Pharmacol.**, **26**: 1499-1506, 1995b.
- SANTOS, A.R.S., CECHINEL-FILHO, V., YUNES, R.A., CALIXTO, J.B. Further studies on the antinociceptive action of the hydroalcoholic extracts from plants of the genus *Phyllanthus*. **J. Pharm. Pharmacol.**, **47**: 66-71, 1995a.
- SANTOS, A.R.S., DE CAMPOS, R.O.P., MIGUEL, O.G., CECHINEL FILHO, V., SIANI, A.C., YUNES, R.A., CALIXTO, J.B. Antinociceptive properties of extracts of new species of plants of the genus *Phyllanthus* (Euphorbiaceae). **J. Ethnopharmacol.**, **72**: 229-238, 2000.
- SANTOS, A.R.S., NIERO, R., CECHINEL-FILHO, V., YUNES, R.A., PIZZOLATTI, M.G., DELLE MONACHE, F., CALIXTO, J.B. Antinociceptive properties of steroids isolated from *Phyllanthus corcovadensis* in mice. **Planta Med.**, **61**: 329-332, 1995c.
- SANTOS, A.R.S., VEDANA, E.M., DE FREITAS, G.A. Antinociceptive effect of meloxicam, in neurogenic and inflammatory nociceptive models in mice. **Inflamm. Res.**, **47**: 302-307, 1998.

- SANTOS, D. R. dos. Chá de quebra-pedra (*Phyllanthus niruri*) na litíase urinária em humanos e ratos. Dissertação de Doutorado. Escola Paulista de Medicina, São Paulo, pp. 157, 1990.
- SAWYNOK, J. Gabaergic mechanisms in antinociception. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.**, **8**: 581-586, 1984.
- SEGUIN, L., MAROUILLE-GIRARDON, L., MILLAN, M.J. Antinociceptive profiles of non-peptidergic neurokinin-1 and neurokinin-2 receptor antagonists, a comparison to other classes of antinociceptive agent. **Pain**, **61**: 325-343, 1995.
- SHAFIZADEH, M., SEMMANIAN, S., ZARRINDAST, M.R., HASHEMI, B. Involvement of GABA<sub>B</sub> receptors in the antinociception induced by baclofen in the formalin test. **Gen. Pharmac.** **28**: 611-615, 1997.
- SHAH, S., BREIVOGEL, C., SELLY, D., MUNIRATHINAM, G., CHILDERS, S., YOBURN, C. Time-dependent effects of in vivo pertussis toxin on morphine analgesia and G-proteins in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, **56**: 465-469, 1997.
- SHAH, S., DUTTARROY, A., DAVIS, T., YOBURN, B.C. Spinal and supraspinal effects of pertussis toxin on opioid analgesia. **Pharmacol. Biochem. Behav.** **49**: 773-776, 1994.
- SHARAV, Y.; SINGER, E.; SCHMIDT, E.; DIONNER, A.; DUBNER, R. The analgesic effect of amitriptyline on chronic facial pain. **Pain**, **31**: 199-209, 1987.
- SHEU, S.Y., TSUANG, Y.H., HSU, F.L., LU, F.J., CHIANG, H.C. Superoxide anion scavenger effect of *Quercus glauca* Thumb. In whole blood of patients with ankylosing spondylitis. **Am. J. Chin. Med.**, **25**: 307-315, 1997.
- SHIBATA, M.; OHKUDO, T.; TAKAHASHI, H.; INOKI, R. Modified formalin test characteristic biphasic pain response. **Pain**, **38**: 347-352, 1989.
- SHOSHAN, V., MACLENNAN, D.H. Quercetin interaction with the Ca-ATPase of sarcoplasmic reticulum. **J. Biol. Chem.**, **256**: 887-892, 1981.
- SIEGMUND, E.A.; CADMUS, R.A.; LU, G. A method for evaluating both non-narcotic and narcotic analgesics. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, **95**: 729-731, 1957a.
- SIEGMUND, E.A.; CADMUS, R.A.; LU, G. Screening analgesics, including aspirin-type compound, based upon the antagonism of chemically induced "writhing" in mice. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **119**: 184-193, 1957b.
- SILVA, G.L., MATTEUSSI, A.S., MIGUEL, O.G., YUNES, R.A., SANTOS, A.R.S., CALIXTO, J.B., RODRIGUES, A.L.S. Efeito antidepressivo do extrato obtido da *Siphocampylus verticillatus*. In: Anais da XIV Reunião Anual da

Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 25-28 Agosto, Caxambu, MG, Brasil, pp. 99, 1999.

- SIMONIN, F., VALVERDE, O., SMADJA, C., SLOWE, S., KITCHEN, I., DIERICH, A., LE MEUR, M., ROQUES, B.P., MALDONADO, R., KIEFFER, B.L. Disruption of the  $\kappa$ -opioid receptor gene in mice enhances sensitivity to chemical visceral pain impairs pharmacological actions of the selective  $\kappa$ -agonist U-50,488H and attenuates morphine withdrawal. **EMBO. J.**, **17**: 886-897, 1997.
- SINGER, A., WONNEMANN, M., MÜLLER, W.E. Hyperforin, a major antidepressant constituent of St. John's Wort, inhibits serotonin uptake by elevating free intracellular  $\text{Na}^+$ . **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **290**: 1363-1368, 1999.
- SINGHAL, R.L., YEH, Y.A., PRAJA, N., OLAH, E., SLEDGE, G.W.Jr. WEBER, G. Quercetin down-regulates signal transduction in human breast carcinoma cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **208**: 425-431, 1995.
- SKAPER, S.D., FABRIS, M., FERRARI, V., DALLE CARBONARE, M., LEON, A. Quercetin protects cutaneous tissue-associated cell types including sensory neurons from oxidative stress induced by glutathione depletion: cooperative effects of ascorbic acid. **Free Radic. Biol. Med.**, **22**: 669-678, 1997.
- SNYDER, S.H. Nitric oxide: First in a new class of neurotransmitters. **Science**, **257**: 494-496, 1992.
- SOERJATO, D.D. Biodiversity prospecting and benefit sharing: perspectives from the field. **J. Ethnopharmacol.**, **51**: 1-15, 1996.
- SOUZA, D.O., RAMÍREZ, G. Effects of guanine nucleotides on kainic acid binding and on adenylate cyclase in chick optic tectum and cerebellum. **J. Mol. Neurosci.**, **3**: 39-45, 1991.
- SRIVASTAVA, A.K. Inhibition of phosphorylase kinase, and tyrosine protein kinase activities by quercetin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **131**: 1-5, 1985.
- STANDIFER, K.M., PASTENAK, G.W. G proteins and opioid receptor-mediated signalling. **Cell Signal.**, **9**: 237-248, 1997.
- STEIN, C.; MILLAN, M.J.; SHIPPENBERG, T.S.; PETER, K.; HERZ, A. Peripheral opioid receptors mediating antinociception in inflammation. Evidence for involvement of mu, delta and kappa receptors. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **248**:1269-1275, 1989.
- SZALLASI, A.; BLUMBERG, P.M. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. **Pharmacol. Rev.**, **51**:159-211, 1999.

- SZOLCSÁNYI, J. Sensory receptors and the antinociceptive effects of capsaicin. In: HAKANSON, R.; SUNDLER, F. (Eds.) *Tachykinin Antagonists*. Amsterdam : Elsevier, 1985. p. 45-56.
- TABER, R.I.; LATRANYI, M.B. Antagonism of the analgesic effect of opioid and non-opioid agents by p-chlorophenylalanine (PCPA). **Eur. J. Pharmacol.**, **75**: 215- 222, 1981.
- TAIWO, Y.O.; FABIAN, A.; PAZOLES, C.J.; FIELDS, H.L. Potentiation of morphine antinociception by monoamine reuptake inhibitors in the rat spinal cord. **Pain**, **21**: 329-337, 1985.
- TEMPESTA, M.S.; CORLEY, D.G.; BEUTLER, J.A.; METRAL, C.J.; YUNES, R.A.; GIACOMOZZI, C.D.; CALIXTO, J.B. Phyllanthimide, a new alkaloid from *Phyllanthus sellowianus*. **J. Nat. Prod.**, **51**: 617-618, 1988.
- TEOH, H., MALCANGIO, M., FOWLER, L.J., BOWERY, N.G. Evidence for release of glutamic acid, aspartic acid and substance P but not  $\gamma$ -aminobutyric acid from primary afferent fibres in rat spinal cord. **Eur. J. Pharmacol.**, **302**: 27-36, 1996.
- THYAGARAJAN, S.P.; SUBRAMANIAN, S.; THIRUNALASUNDARI, T.; VENKATESWARAN, P.S.; BLUMBERG, B.S. Effect of *Phyllanthus amarus* on chronic carriers of hepatitis B virus. **Lancet II**: 764-766, 1988.
- TJØLSEN, A., HOLE, K. Animal models of analgesia. In: *The pharmacology of pain* (ed. Dickenson, A. and Besson, J.-M.), pp. 1-20, Springer, Berlin, 1997.
- TJØLSEN, A., BERGE, O.-G., HUNSKAAR, S., ROLAND, J.H. and HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, **51**: 5-17, 1992.
- TRENTIN, A.P., SANTOS, A.R.S., MIGUEL, O.G., PIZZOLATTI, M.G., YUNES, R.A., CALIXTO, J.B. Mechanisms involved in the antinociceptive effect in mice of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. **J. Pharm. Pharmacol.**, **49**: 576-572, 1997.
- UENO, H.; HORIE, S.; NISHI, Y.; SHAGAWA, H.; KAWASAKI, M.; SUZUKI, S.; HAYASHI, T.; ARISAWA, M.; SHIMIZU, M.; YOSHIZAKI, M.; MORITA, N. Chemical and pharmaceutical studies on medicinal plants in Paraguay. Geraniin, an angiotensin converting enzyme inhibitor from "Paraparai Mi", *Phyllanthus niruri*. **J. Nat. Prod. (Lloydia)**, **51**: 357-359, 1988.
- UNANDER, D.W.; WEBSTER, G.L.; BLUMBERG, B.S. Uses and bioassays in *Phyllanthus* (*Euphorbiaceae*). IV. Clustering of antiviral uses and other effects. **J. Ethnopharmacol.**, **45**: 1-18, 1995.
- VANE, J.R. Neuronal Plasticity. Implications for Pain Therapy Foreward. **Drugs**, (Suppl.5): 1-47, 1994.

- VANE, J.R., BOTTING, R.M. Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. **Scand. J. Rheumatol.**, **25**: 9-21, 1996.
- VANE, J.R., BOTTING, R.M. New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. **Inflamm. Res.**, **44**: 1-10, 1995.
- VANE, J.R.; BAKHLE, Y.S.; BOTTING, R.M. Cyclooxygenase 1 and 2. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, **38**: 97-120, 1998.
- VAZ, Z.R., CECHINEL FILHO, V., YUNES, R.A., CALIXTO, J.B. Antinociceptive action of 2-(4-Bromobenzoyl)-3-Methyl-4,6-Dimethoxy Benzofuran, a novel Xanthoxylone derivative on chemical and thermal models of nociception in mice. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **278**: 304-312, 1996.
- VENKATESWARAN, P.S.; MILLMAN, I.; BLUMBERG, B.S. Effects of an extract from *Phyllanthus niruri* on hepatitis B and woodchuck hepatitis viruses: In vivo and in vitro studies. **Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)**, **84**: 274-278, 1987.
- VENTAFRIDDA, V.; BIANCHI, M.; RIPAMONTI, C.; SACERDOTE, P.; DE CONNO, F.; ZECCA, E.; PANERAI, A.E. Studies on the effects of antidepressant drugs on the antinociceptive action of morphine and on plasma morphine in rats and man. **Pain**, **43**: 155-162, 1990.
- VERGE, V.M.; XU, X.-J.; WIESENFELD-HALLIN, Z.; HÖKFELT, T. Marked increase in nitric oxide synthase mRNA in rat dorsal root ganglia after peripheral axotomy. In situ hybridization and functional studies. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **89**: 11617-11621, 1992.
- VON VOIGTLANDER, P.F.; LEWIS, R.A.; NEFF, G.L. Kappa opioid analgesia is dependent on serotonergic mechanisms. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **231**: 270-274, 1984.
- WALSH, T.D. Antidepressants in chronic pain. **Clin. Neuropharmacol.**, **6**: 271-295, 1983.
- WARD, N.G.; BLOOM, V.L.; FRIEDEL, R.O. The effectiveness of tricyclic antidepressants in the treatment of coexisting pain and depression. **Pain**, **7**: 311-338, 1979.
- WEBSTER, G.L. The genera of Euphorbiaceae in the Southeastern United States. **J. Arnold Arboretum**, **48**: 303-361; 363-430, 1967.
- WEINSTEIN, S.M. New pharmacological strategies in the management of cancer pain. **Cancer Invest.**, **16**: 94-101, 1998.
- WELCH, S.P., DUNLOW, L.D. Antinociceptive activity of intrathecally administered potassium channel openers and opioid agonists: A common mechanism of action? **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **267**, 390-399, 1993.

- WELCH, S.P., DUNLOW, L.D., PATRICK, G.S., RAZDAN, R.K. Characterization of anandamide- and fluoroanandamide-induced antinociception and cross-tolerance to  $\Delta^9$ -THC after intrathecal administration to mice: Blockade of  $\Delta^9$ -THC-induced antinociception. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **273**: 1235-1244, 1995.
- WHITTLE, B.A. Release of a kinin by intraperitoneal injection of chemical agents in mice. **Int. J. Neuropharmacol.**, **3**: 369-378, 1964.
- WIJAYANEGARA, H., MOSE, J.C., ACHMAD, L., SOBARNA, R., PERMADI, W. A clinical trial of hydroxyethylrutosides in the treatment of haemorrhoids of pregnancy. **J. Int. Med. Res.**, **20**: 54-60, 1992.
- WIMMER, E.F. Campanulaceae-Lobeliodeae, Supplementon et Campanulaceae-Cyphioideae. In: **Emmgler, A.(ed.) Das Pflanzen reich 4**, 1968.
- WOMER, D.E., DELAPP, N.W., SHANNON, H.E. Intrathecal pertussis toxin produces hyperalgesia and allodynia in mice. **Pain**, **70**: 223-228, 1997.
- WOOD, J.N., DOCHERTY, R. Chemical activators of sensory neurons. **Ann. Rev. Physiol.**, **59**: 457-482, 1997.
- WOOLF, C.J. A new strategy for the treatment of inflammatory pain prevention or elimination of central sensitization. **Drugs**, **47** (Suppl. 5): 1-9, 1994.
- WOOLFE, G.; MACDONALD, A.D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol). **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **80**: 300-307, 1944.
- WORLD CONSERVATION MONITORING CENTRE – **Global biodiversity: status of the Earth's living resources**. Chapman and Hall, London, 1992.
- XU, Z.; TONG, C.; EISENACH, J.C. Acetylcholine stimulates the release of nitric oxide from rat spinal cord. **Anesthesiology**, **85**: 107-111, 1996.
- YAKSH, T.L. Pharmacology of spinal adrenergic system with modulate spinal nociceptive processing. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, **22**: 845-858, 1985.
- YAKSH, T.L.; RUDY, T.A. Studies on the direct spinal action of narcotics on the production of analgesia in the rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **202**: 411-428, 1977.
- YAMAMOTO, T., SHIMOYAMA, N., MIZUGUCHI, T. Nitric oxide synthase inhibitor blocks spinal sensitization induced by formalin injection into the rat paw. **Anesth. Analg.**, **77**: 886-890, 1993.
- YANG, S.W., KANG, Y.M., GUO, Y.Q., QIAO, J.T., DAFNY, N. ATP-sensitive potassium channels mediate norepinephrine- and morphine-induced antinociception at the spinal cord level. **Int. J. Neurosci.**, **93**: 217-223, 1998.

ZIMMER, A., ZIMMER, A.M., BAFFI, J., USDIN, T., REYNOLDS, K., KONIG, M., PALKOVITS, M., MEZEY, E. Hypoalgesia in mice with a targeted deletion of the tachykinin I gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **95**: 2630-2635, 1998.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, **16**: 109-110, 1983.