

CRISTIANO SCHEIDT

**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO SESQUITERPENO
DRIMANIAL ISOLADO DAS CASCAS DA *Drimys winteri*
(WINTERACEAE) – ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO.**

Dissertação 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 Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto

Florianópolis
2002

**“ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO SESQUITERPENO
DRIMANIAL ISOLADO DAS CASCAS DE *Drimys winteri*
(WINTERACEA) – ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO”**

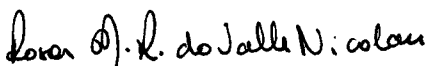
POR

CRISTIANO SCHEIDT

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



**João Batista Calixto
Orientador – PGFMC – UFSC**

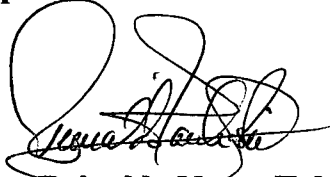


**Rosa Maria R. V. Nicolau
FMC - UFSC**



**Giles Alexander Rae
FMC - UFSC**

Florianópolis, 14 de fevereiro de 2002.



**Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi
Coordenador do Programa**

“ Não basta ensinar ao homem uma
especialidade.
Porque se tornará uma máquina utilizável,
mas não uma personalidade.
É necessário que adquira um sentimento,
um senso prático do que vale ser
empreendido,
daquilo que é tudo, do que é moralmente
correto.
A não ser assim, ele se assemelhará,
com seus conhecimentos profissionais,
mais a um cão ensinado do que a uma
criatura
harmoniosamente desenvolvida.
Deve apreender as motivações dos homens,
suas angústias, suas quimeras,
para determinar com exatidão seu lugar exato
em relação a seus próximos e à comunidade ”

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pai e todo poderoso na criação dos céus, da terra e de tudo o que neles há.

Ao professor Dr. João Batista Calixto, meu especial agradecimento por todo o apoio, paciência, confiança e forma espontânea com que transferiu seus conhecimentos, permitindo-me compartilhá-los na realização deste trabalho.

Aos meus familiares e em especial aos meus pais, pelo constante incentivo, apoio, compreensão, carinho e por acreditarem na minha capacidade. Por terem suportado a saudade em favor de meus sonhos, este foi um, entre os muitos atos de amor de vocês em favor de minha felicidade. Muito obrigado.

A minha namorada Nara pelo amor, carinho, compreensão, incentivo, apoio e dedicação a mim conferido, os quais foram de fundamental importância para a concretização deste trabalho.

Aos amigos Juliano Ferreira, Adair Roberto Soares dos Santos, Eunice André, Alcibia Helena Maia e Cláudio Guimarães pelo seu companheirismo, apoio e paciência os quais foram fundamentais para que eu conseguisse alcançar meus ideais. Compartilhando os momentos felizes e dificuldades pelos quais passamos.

Aos professores do Curso de Pós-graduação em Farmacologia por terem dividido e acrescentado o conhecimento, aos funcionários da Pós-graduação e do Biotério que, direta ou indiretamente, auxiliaram-me no desenvolvimento deste trabalho.

Ao parente, Valfredo Schiemper, pelo seu esforço na coleta do material botânico, imprescindível para a realização deste trabalho.

A Rosana Ostrosky e Patrícia Vianna pelo companheirismo, amizade, carinho, e colaboração.

Aos colegas da turma de mestrado, Geisson, Patrícia, Lúcia, Alcides, Daniel, Marcelo, Michel e aos demais colegas de curso pela colaboração, amizade e companheirismo.

Aos colegas de pesquisa, Maria Martha, Valfredo, Alessandra, Lésiei, Rubens, Rodrigo, Fernanda, Gabriela, Joice, Marien, Marina, Rafael, Márcia, Cláudia, Eduardo, Ricardo, Rui, Edmar, Leandro, George, Giuiliano, Fernando, Niraldo, Karen, Betinha, Gisele, Daniela, Anna Paula, Nelson, Emerson, Jarbas e Joséiia pela amizade, carinho, constante colaboração, entusiasmo, troca de informações, evolução conjunta e tornando a convivência a mais agradável possível.

Ao CNPQ, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIações	i
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. PRODUTOS NATURAIS: FONTE DE NOVAS DROGAS	01
1.2. <i>Drimys winteri</i>	03
1.3. MECANISMOS ENVOLVIDOS NA TRANSMISSÃO DA DOR	06
2. OBJETIVOS	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. ANIMAIS	20
3.2. COLETA E CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA DA <i>Drimys winteri</i>	20
3.3. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO COMPOSTO DRIMANIAL	21
3.4. INJEÇÃO INTRATECAL (i.t.)	22
3.5. INJEÇÃO INTRACEREBROVENTRICULAR (i.c.v.)	22
3.6. ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA	22
3.6.1. Nocicepção induzida pelo ácido acético	23
3.6.2. Nocicepção induzida pela formalina	24
3.6.3. Nocicepção induzida pela capsaicina	26
3.6.4. Nocicepção induzida pelo glutamato	26
3.6.5. Nocicepção induzida pelo forbol miristato acetato (PMA)	27
3.6.6. Hiperalgesia induzida pelo glutamato	27
3.6.7. Teste da placa quente	28
3.6.8. Teste da retirada da cauda (<i>tail flick</i>)	29
3.6.9. Efeito sobre o desempenho motor (<i>rota-rod</i>)	30
3.6.10. Efeito sobre a mucosa gástrica	30
3.7. ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO	31
3.7.1. Participação do sistema glutamatérgico na atividade antinociceptiva do drimianial no modelo do comportamento relacionado a nocicepção causada por aminoácidos excitatórios e substância P em camundongos	32
3.7.2. Participação do sistema vanilóide na atividade antinociceptiva do drimianial no modelo da formalina	33
3.7.3. Participação do sistema vanilóide na variação da temperatura corporal causada pelo drimianial	34

3.7.4. Efeito do tratamento neonatal de camundongos com capsaicina na atividade antinociceptiva do drimanial -----	34
3.7.5. Participação do sistema opióide na atividade antinociceptiva do drimanial no modelo da formalina -----	35
3.7.6. Participação do sistema serotoninérgico na atividade antinociceptiva do drimanial no modelo da formalina -----	36
3.8. EFEITO DO DRIMANIAL SOBRE A LIGAÇÃO ESPECÍFICA (BINDING) DE [³H]GLUTAMATO -----	36
3.9. DROGAS E SOLUÇÕES UTILIZADAS -----	38
3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA -----	39
4. RESULTADOS -----	40
4.1. ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA -----	40
4.1.1. Nocicepção induzida pelo ácido acético -----	40
4.1.2. Nocicepção induzida pela formalina -----	41
4.1.3. Nocicepção induzida pela capsaicina -----	45
4.1.4. Nocicepção induzida pelo glutamato -----	46
4.1.5. Nocicepção induzida pelo forbol miristato acetato (PMA) -----	47
4.1.6. Hiperalgisia induzida pelo glutamato -----	48
4.1.7. Teste da placa quente e retirada da cauda (<i>tail flick</i>) -----	49
4.1.8. Efeito sobre o desempenho motor (<i>rota-rod</i>) -----	49
4.1.9. Efeito sobre a mucosa gástrica -----	50
4.2. ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO -----	52
4.2.1. Participação do sistema glutamatérgico na atividade antinociceptiva do drimanial no modelo do comportamento relacionado a nocicepção causada por aminoácidos excitatórios e substância P em camundongos -----	52
4.2.2. Participação do sistema vanilóide na atividade antinociceptiva do drimanial no modelo da formalina -----	55
4.2.3. Participação do sistema vanilóide na variação da temperatura corporal causada pelo drimanial-----	56
4.2.4. Efeito do tratamento neonatal de camundongos com capsaicina na atividade antinociceptiva do drimanial -----	57
4.2.5. Participação do sistema opióide na atividade antinociceptiva do drimanial no modelo da formalina -----	58
4.2.6. Participação do sistema serotoninérgico na atividade antinociceptiva do drimanial no modelo da formalina -----	59
4.3. EFEITO DO DRIMANIAL SOBRE A LIGAÇÃO ESPECÍFICA (BINDING) DE [³H]GLUTAMATO -----	60
5. DISCUSSÃO -----	61
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	82
7. ANEXOS -----	100

LISTA DE ABREVIações

AAE	Aminoácido excitatório
a.C.	Antes de Cristo
ADP	Adenosina difosfato
AINES	Antiinflamatórios não-esteroidais
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico
AMPc	Adenosina 3,5-monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina 1,4,5-trifosfato
°C	Graus centrígrados
CC	Cromatografia de coluna
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
cm	Centímetros
<i>D. winteri</i>	<i>Drimys winteri</i>
DAG	Diacilglicerol
E.P.M.	Erro padrão da média
GluRi	Receptor glutamatérgico ionotrópico
GluRm	Receptor glutamatérgico metabotrópico
GMPc	Guanosina 3,5-monofosfato cíclico
GRD	Gânglio da raiz dorsal
h	Hora
I.A.S.P.	Associação Internacional do Estudo da Dor
i.c.v.	Intracerebroventricular
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intraplantar
IP ₃	1,4,5-trifosfato de inositol
i.t.	Intratecal
kg	quilograma
m/s	Metros/segundos
μ g	Microgramas
mg	Miligrama
min	Minutos

ml	Mililitros
mm	Milímetros
μl	Microlitros
NMDA	N-metil-D-aspartato
OMS	Organização mundial da saúde
PBS	Salina tampão fosfato
PCPA	Cloridrato de p-clorofenilalanina
PKC	Proteína quinase C
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PLC	Fosfolipase C
PEM	Porcentagem do efeito máximo
PMA	Forbol miristato acetato
RTX	Resiniferatoxina
s	Segundos
s.c.	Subcutâneo
SNC	Sistema nervoso central
SP	Substância P
v.o.	Via oral
VR1	Receptor vanilóide
WDR	Neurônios de amplo alcance dinâmico (<i>wide dynamic range</i>)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Aspectos gerais das partes aéreas da *Drimys winteri* ----- 04
- Figura 2 – Estrutura molecular do composto drimancial isolado das cascas da *Drimys winteri* ----- 22
- Figura 3 – Efeito antinociceptivo do drimancial, administrado pela via i.p., nas contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos ----- 42
- Figura 4 – Duração do efeito antinociceptivo do drimancial, quando administrado pela via i.p., em relação à primeira (A) e a segunda fase (B) da nocicepção induzida pela formalina em camundongos ----- 43
- Figura 5 – Efeito antinociceptivo causado pelo drimancial, quando administrado pelas vias i.p., i.pl., i.c.v. ou i.t., em relação à primeira (A) e a segunda (B) fase da nocicepção induzida pela formalina em camundongos ----- 45
- Figura 6 – Efeito antinociceptivo do drimancial administrado por via intraperitoneal 30 e 10 min antes da primeira (A) e da segunda (B) fase da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos. ----- 46
- Figura 7 – Efeito antinociceptivo causado pelo drimancial, quando administrado pela via i.p., 30 min antes, em relação a nocicepção induzida pela capsaicina (1,6 μg em 20 μl) em camundongos ----- 47
- Figura 8 – Efeito do composto drimancial, administrado pela via i.p., em relação a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato (PMA, 30 $\mu\text{mol/pata}$) em camundongos ----- 48
- Figura 9 – Efeito do composto drimancial administrado pela via i.p., em relação a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de forbol miristato acetato (30 ng/pata) em camundongos ----- 49
- Figura 10 – Efeito do composto drimancial, administrado pela via i.p., em relação a hiperalgisia induzida pela injeção intratecal de glutamato (100 nmol/sítio) em camundongos ----- 50
- Figura 11 – Registro fotográfico mostrando os efeitos da administração i.p. de indometacina ou drimancial sobre a mucosa gástrica de ratos. ----- 53
- Figura 12 – Efeito antinociceptivo do drimancial e da morfina, administrados pelas vias i.p. e s.c., respectivamente, sobre o comportamento relacionado à nocicepção causada pela injeção intratecal de glutamato, NMDA, substância P, AMPA, cainato e *trans*-ACPD em camundongos ----- 55
- Figura 13 – Efeito antinociceptivo dose-dependente do drimancial, administrado pela via i.p., sobre o comportamento relacionado a nocicepção causada pela injeção intratecal de *trans*-ACPD (50 nmol/sítio) em camundongos ----- 56

Figura 14 – Influência do pré-tratamento de camundongos com capsazepina sobre o efeito antinociceptivo causado pelo drimanial ou capsaicina em relação à primeira fase da nocicepção induzida pela formalina-----	57
Figura 15 – Influência do pré-tratamento de camundongos com capsazepina sobre a hipotermia corporal causada pelo drimanial ou capsaicina em relação à medida da temperatura retal de camundongos -----	58
Figura 16 – Influência do pré-tratamento de camundongos com naloxona sobre o efeito antinociceptivo causado pelo drimanial ou morfina em relação à primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela formalina -----	59
Figura 17 – Influência do pré-tratamento de camundongos com PCPA, sobre o efeito antinociceptivo causado pelo drimanial ou morfina em relação à primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela formalina -----	60
Figura 18 – Influência do tratamento neonatal de camundongos com capsaicina, sobre o efeito antinociceptivo causado pelo drimanial ou capsaicina, em relação à primeira fase da nocicepção induzida pela formalina.- -----	61
Figura 19 – Efeito do drimanial sobre a ligação específica (<i>binding</i>) de [³ H]glutamato em membranas de córtex cerebral de camundongos -----	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Escala para determinação da severidade da úlcera formada -----	32
Tabela 2 – Comparação dos valores médios das DI ₅₀ s e inibições máximas observadas para a atividade antinociceptiva do drimanial, administrado pelas vias i.p., i.pl., i.c.v. ou i.t., em relação a primeira e segunda fase da nocicepção induzida pela formalina -----	45
Tabela 3 – Efeito da administração do drimanial ou indometacina pela via i.p. sobre a mucosa gástrica de ratos -----	52

RESUMO

Os resultados do presente estudo demonstram que o sesquiterpeno drimânico, isolado das cascas da planta brasileira *Drimys winteri*, apresentou importante atividade antinociceptiva, quando administrado por via sistêmica, intraplantar, espinhal e supraespinhal, quando analisado na nocicepção induzida pela formalina, capsaicina e pelo forbol miristato acetato em camundongos. Além disso, o sesquiterpeno drimânico, apresentou marcante atividade anti-hiperalgésica quando avaliado na hiperálgia induzida pela injeção intratecal de glutamato. Os experimentos realizados com agonistas e antagonistas seletivos, e com o auxílio da técnica de ligação específica (*binding*) sugerem que a antinocicepção causada pelo composto drimânico provavelmente está relacionada com uma interação com o sistema glutamatérgico, mais especificamente, via interação com receptores glutamatérgicos metabotrópicos. Os resultados do presente estudo também indicam que os receptores vanilóides parecem contribuir para a atividade antinociceptiva do sesquiterpeno drimânico. Além disso, os resultados do presente estudo indicam que o composto drimânico não apresentou atividade antinociceptiva quando avaliado em modelos de nocicepção térmica, como o teste da placa-quente ou da retirada da cauda (*tail flick*). Por outro lado, sua atividade antinociceptiva não foi revertida pelo pré-tratamento dos animais com naioxona (antagonista de receptores opióides não-seletivo) ou com PCPA (inibidor da síntese de serotonina). Dessa forma, a atividade antinociceptiva do composto drimânico não parece depender de uma interação direta ou indireta com os sistemas opióide e serotoninérgico. Estes resultados não só confirmam, mas também estendem os resultados anteriores descritos em nosso laboratório (TRATSK et al., 1997; MENDES et al., 1998, 2000; MALHEIROS et al., 2001), que

demonstram que ambos os sesquiterpenos presentes nas cascas da *D. winteri*, o poligodial e o drimaniol, contribuem de maneira importante para o uso desta planta na medicina popular.

ABSTRACT

The results of the present study demonstrate that the sesquiterpene drimaniol, isolated from the barks of the Brazilian plant *Drimys winteri* (Winteraceae), given by i.p. route, produced marked and dose-related antinociceptive activities against acetic acid-induced abdominal constriction. In addition, this compound given systemically, intraplantarly or by spinal or supraspinal sites, also caused significant inhibition of both phases of formalin-induced pain, capsaicin-induced neurogenic pain and phorbol-induced pain in mice. The systemic injection of drimaniol also inhibited, in a graded manner, the pain-related behaviors induced by intraplantar or intrathecal (i.t.) administration of glutamate. Moreover, drimaniol also caused marked inhibition of the nociception induced by i.t. administration of metabotropic receptor agonist (*trans*-ACPD), without affecting responses induced by ionotropic receptor agonists (NMDA, AMPA and kainate) or SP-mediated biting response. Drimaniol at the same dose, failed to affect the nociception in tail flick and hot plate tests. The antinociception caused by drimaniol was reduced by pretreatment with capsazepine (a competitive antagonist of vanilloid receptors) and neonatal capsaicin-treatment, but unaffected by pretreatment of naloxone (a non-selective opioid receptor antagonist) or PCPA (an inhibitor of serotonin synthesis), nor was it associated with non-specific effects such as muscle relaxation, sedation or interference with motor coordination assessed in the rota-rod test. Furthermore, drimaniol caused graded inhibition of [³H]glutamate binding in cerebral cortical membranes from mice with an IC₅₀ value of 4.39 μM.

Together, these results provide strong evidence indicating that the sesquiterpene drimaniol produces peripheral, spinal and supraspinal

antinociception in mice when assessed against the intraplantar formalin and glutamate-induced nociception and also by i.t. glutamate induced pain-related behavioral in mice. Finally, an interaction with vanilloid or glutamatergic system, more specifically with the metabotropic receptors (mGlu1 or mGlu5), seems to greatly contribute to the mechanisms underlying its antinociceptive action.

Parte dos resultados da presente dissertação está publicada ou submetida em:

MALHEIROS, A.; CECHINEL FILHO, V.; SCHMITT, C.B.; SANTOS, A.R.S.; SCHEIDT, C.; CALIXTO, J.B.; MONACHE, F.D.; YUNES, R.A. A sesquiterpene drimane with antinociceptive activity from *Drimys winteri* bark. **Phytochemistry**, v. 57, p. 103-107, 2001.

CALIXTO, J.B.; SCHEIDT, C.; OTUKI, M.F.; SANTOS, A.R.S. Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v. 6, p. 261-279, 2001.

SCHEIDT, C.; SANTOS, A.R.S.; FERREIRA, J.; MALHEIROS, A.; CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Evidence for the involvement of glutamatergic pathway in the antinociception caused by the sesquiterpene drimaniol in mice. **Neuropharmacology**, (submetido).

1. INTRODUÇÃO

1.1 - Produtos naturais: fonte de novas drogas

A utilização de recursos naturais com finalidades terapêuticas é uma prática tão antiga que remonta os primórdios da humanidade, cujos conhecimentos foram passados através das gerações e persistem até os dias atuais. Os produtos naturais, principalmente os metabólitos secundários derivados de plantas, há muito tempo vêm constituindo uma fonte de novos medicamentos. Atualmente, cerca de 40% dos medicamentos disponíveis no mercado são derivados direta ou indiretamente de fontes naturais (cerca de 25% de plantas, 13% de microorganismos e 2% de animais) (BORRIS, 1996; CLARK, 1996; CRAGG et al., 1997; CALIXTO, 1998; 2000). Atualmente, tendo em vista sua grande diversidade na natureza, os produtos naturais são de grande interesse na identificação de novos alvos terapêuticos, bem como na compreensão dos complexos mecanismos celulares e moleculares envolvidos em muitos processos fisiológicos ou fisiopatológicos. Neste sentido, tem sido utilizados na caracterização de novos receptores, enzimas e/ou canais iônicos e na identificação de ligantes endógenos, contribuindo desta forma na descoberta e no desenvolvimento de novos fármacos (CORDELL, 1995; CALIXTO, 1998; 2000; CALIXTO et al., 2001).

Outro aspecto de grande importância deve-se ao crescente interesse pela população mundial na utilização de plantas medicinais como medicamentos complementares ou alternativos para a prevenção ou tratamento de muitas doenças (CHANG, 2000). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 80% da população que reside em países em desenvolvimento

utiliza as plantas medicinais ou seus derivados para fins terapêuticos (FARNSWORTH et al., 1985; CORDELL, 1995; GRÜNWARD, 1995, 1996; CLARK, 1996; BORRIS, 1996; CRAGG et al., 1997).

É digno de nota que o emprego de modernas técnicas farmacológicas, bioquímicas, toxicológicas e de biologia molecular propiciou um crescente interesse por parte das grandes indústrias farmacêuticas mundiais pelo estudo dos produtos naturais, notadamente das plantas medicinais, na procura por novos medicamentos (para revisão ver MENDELSON e BALICK, 1995; DE SMET, 1997; CALIXTO, 2000; CALIXTO et al., 2001; SOMERVILLE, 2000). Atualmente, a descoberta de novas moléculas desenhadas para atuarem como agentes analgésicos são urgentemente necessárias, pois a terapia da dor constitui-se ainda um dos aspectos mais comuns e de difícil tratamento na prática médica (DAMAJ et al., 1999). A terapia atual é dominada por duas classes de drogas analgésicas, os opióides (tendo como protótipo a morfina) e as drogas antiinflamatórias não esteroidais (AINES, como por exemplo, a aspirina). Ambas as classes estão disponíveis na clínica e, além de terem ação limitada para alguns tipos de dor, produzem graves efeitos colaterais que restringem a sua utilização. No caso da morfina, seu uso é ainda mais problemático devido ao aparecimento de dependência e de tolerância quando a droga é utilizada por períodos prolongados, além de constipação, náusea, vômito, sedação, depressão respiratória e retenção urinária (LICHTENSTEIN et al., 1995; CHERNY, 1996; JACK, 1997; KARLSTEN e GORDH, 1997; BESSON, 1999; CHIZH et al., 1999; DAMAJ et al., 1999).

1.2. – *Drimys winteri*

A *Drimys winteri* (Winteraceae) é uma planta nativa da América do Sul, encontrada principalmente na região sul do território brasileiro, conhecida popularmente como “casca de anta”. Essa espécie pode alcançar até 5 m de altura, suas folhas são dispostas em ordem alternada, alongadas e de extremidades arredondadas, com aproximadamente 8 a 12 cm de comprimento e 2 a 3 cm de largura, apresentando ainda a face inferior branco-prateada. Suas flores são hermafroditas, com 2 a 3 cm de diâmetro, pétalas brancas, muitos estames e frutos carnosos (Figura 1). A casca da *D. winteri* é aromática, espessa, amarelada e amarga, sendo utilizada na medicina popular como estimulante, antiespasmódica, antidiarréica, antipirética, cicatrizante, antiinflamatória, nos processos dolorosos, no tratamento da hemorragia uterina e em certas afecções do trato respiratório, como asma brônquica e alergia (MORTON, 1981; CORRÊA, 1984; SIMÕES et al., 1986; LORENZI, 2000). Esta planta é também utilizada no tratamento do câncer e úlceras (RICCIERI, 1981; HOUGHTON e MAMBY, 1985; GUPTA, 1995; GRAVES, 1996).

Estudos prévios realizados em nossos laboratórios demonstraram que o extrato hidroalcoólico (EH) obtido das cascas da *D. winteri* antagonizou, de maneira dependente da concentração, as contrações induzidas por diversos neurotransmissores conhecidos por participarem na transmissão da dor e processos inflamatórios, quando avaliado em útero isolado de rata, íleo e traquéia isolados de cobaia e na bexiga isolada de ratos *in vitro* (EL SAYAH et al., 1997).

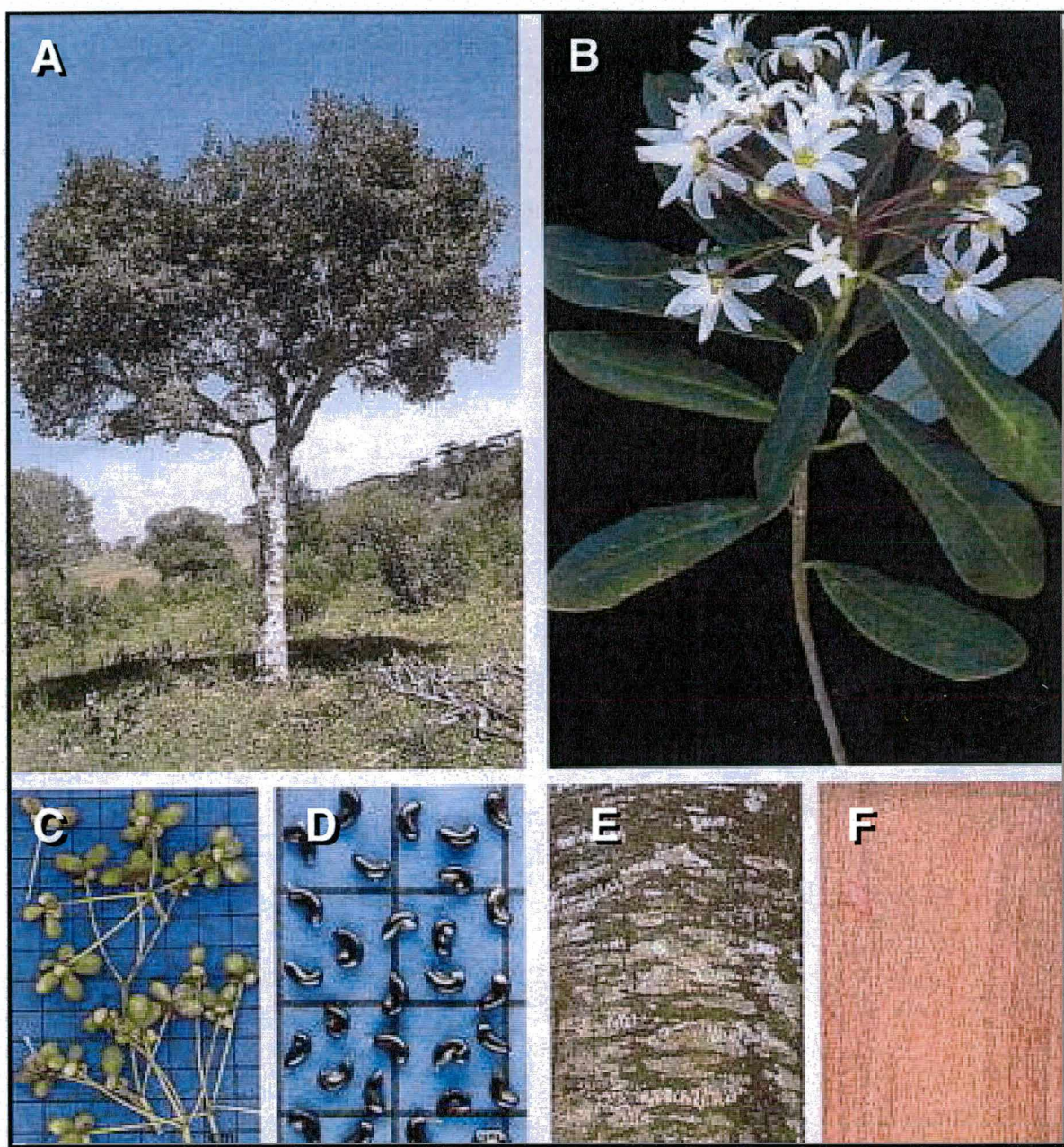


Figura 1 – A- Aspectos gerais das partes aéreas da *Drimys winteri*; B- Vista de um dos ramos laterais, com flores; C- Frutos; D- Sementes; E- Cascas e F- Madeira. (Fonte: LORENZI, 2000).

Quando avaliado *in vivo*, o EH da *D. winteri* produziu antinocicepção prolongada e dose-dependente em vários modelos de nocicepção em camundongos, bem como na hiperalgesia induzida por bradicinina e substância P, mas não por carragenina ou prostaglandina E₂, em ratos (MENDES et al., 1998).

O EH da *D. winteri* também inibiu, marcadamente, o edema de pata de rato causado por diversos mediadores inflamatórios, e foi capaz de inibir, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, a reação alérgica induzida por ovoalbumina em animais ativamente sensibilizados a este antígeno (EL SAYAH et al., 1997; TRATSK et al., 1997). Quando testado na veia porta de rato, o EH produziu inibição significativa da resposta contrátil induzida pelo agonista seletivo do receptor NK₃, o senktide (EL SAYAH et al., 1997).

Vários estudos fitoquímicos realizados com a *D. winteri* e outras espécies do mesmo gênero demonstram a existência de inúmeros metabólitos secundários de diferentes classes químicas, incluindo os sesquiterpenos (APPEL e DOHR, 1958; APPEL et al., 1959; BROWN, 1994; CORTES e OYARZUN, 1981), além de terpenóides, lignanas e flavonóides (CRUZ e SILVA, 1973).

Um dos principais constituintes presentes nas cascas da *D. winteri* foi isolado e identificado quimicamente como sendo o sesquiterpeno denominado poligodial, composto majoritário encontrado nesta planta (CECHINEL et al., 1998). Assim como o extrato hidroalcoólico, o composto poligodial produziu efeito antinociceptivo dose-dependente e de longa duração quando avaliado em vários modelos de nocicepção química em camundongos e ratos (MENDES et al., 1998, 2000). Além disso, o poligodial produziu antinocicepção quando administrado pela via sistêmica, local, espinhal e supraespinhal em modelos de nocicepção química (nocicepção induzida por formalina e capsaicina), porém foi ineficaz quando

avaliado na nocicepção induzida por estímulo térmico (teste da placa quente) em camundongos. Sua ação antinociceptiva parece envolver um complexo mecanismo de ação, destacando-se uma interação com os sistemas opióide, noradrenérgico e serotoninérgico, além do envolvimento da proteína $G_{i/o}$ sensível à toxina pertussis (MENDES et al., 2000).

Estudos realizados por EL SAYAH e colaboradores (1998; 2000) demonstraram que o sesquiterpeno poligodial produziu inibição concentração-dependente sobre as contrações induzidas por diversos neurotransmissores na traquéia de cobaia e na veia porta de rato. Além disso, ANDRÉ e colaboradores (1999) demonstraram que o poligodial causou relaxamento dependente da concentração em vasos de coelho e cobaia na presença do endotélio vascular, através de um mecanismo relacionado à liberação de óxido nítrico e formação de $GMPC$.

Recentemente, um novo sesquiterpeno denominado drimaniol foi isolado das cascas da *D. winteri*. Estudos farmacológicos anteriores demonstraram que o drimaniol possui significativa ação antinociceptiva quando avaliado na nocicepção induzida pelo ácido acético (MALHEIROS et al., 2001).

1.3. – Mecanismos envolvidos na transmissão da dor

A natureza e tratamento da dor têm sido objetos de interesse e controvérsia antes mesmo das mais antigas escrituras humanas conhecidas. Tábuas da civilização Babilônica datadas de 2250 a.C. relatam o uso de ervas em obturações dentárias para o alívio da dor. Os primeiros relatos que explicavam a utilização do ópio foram registradas por Hipócrates em 500 a.C.. Esta droga,

juntamente com a posterior descoberta, das drogas anestésicas locais e gerais, fornece a base de nosso conhecimento atual sobre os caminhos da dor (PLEUVRY e LAURETTI, 1996).

Há quase um século atrás, SHERRINGTON (1906) propôs a existência dos nociceptores, um neurônio sensorial primário, que é ativado por estímulos que têm a capacidade de causar dano tecidual. A sensação que chamamos de dor, geralmente acompanha a maioria das enfermidades da humanidade. Embora a dor seja conhecida por todos, além de uma sensação, é uma experiência extremamente pessoal, subjetiva, diferindo consideravelmente entre os indivíduos. Assim como outras sensações, a dor pode ser modulada por uma série de experiências comportamentais, pois não envolve somente a transmissão do estímulo nocivo, mas também diferentes fatores emocionais, sociais, culturais, ambientais e cognitivos (MERSKEY, 1979; RUSSO e BROSE, 1998; JULIUS e BASBAUM, 2001). Sendo assim, nem todo estímulo nocivo que ativa os nociceptores deflagra necessariamente uma experiência de dor. A relação entre a percepção da dor e a ativação dos nociceptores envolve um complexo processamento pelas vias sensoriais, e a natureza altamente subjetiva da dor é um dos fatores que dificulta sua compreensão e tratamento clínico (BASBAUM et al., 2000).

Uma distinção entre dor e nocicepção se faz necessária, pois o termo nocicepção refere-se somente a recepção do sinal no sistema nervoso central evocado pela ativação de receptores sensoriais especializados (nociceptores), provenientes de um tecido danificado (FÜRST, 1999). MERSKEY (1979) definiu a dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada com um dano tecidual atual ou potencial, ou descrita em termos de tal dano”. Esta

definição foi adotada posteriormente pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (I.A.S.P.) (MERSKEY e BOGDUK, 1994; LOESER e MELZACK, 1999; MILLAN, 1999). Além disso, a dor serve como um sinal de alerta resultante de um estímulo produzido por ameaça a algum tecido do organismo a fim de detectar, localizar e até mesmo identificar o tecido ou órgão lesado (DRAY, 1995; MILLAN, 1999).

A transmissão da dor envolve ainda uma interação complexa de estruturas periféricas e centrais, desde a superfície da pele até o córtex cerebral, onde o sinal nociceptivo está sujeito a uma variedade de modulações facilitatórias e inibitórias, do nociceptor até as estruturas cerebrais envolvidas na percepção e cognição da dor (BROMM e LORENZ, 1998; FÜRST, 1999; URBAN e GEBHART, 1999). Algumas alterações são comumente referidas por sua ocorrência em pacientes que experimentam a dor, como a hiperalgesia (sensibilidade aumentada para estímulo doloroso), alodínia (resposta dolorosa para estímulo mecânico não lesivo) e hiperestesia (sensibilidade anormal dos neurônios sensoriais) (BESSON, 1999; RAJA et al., 1999). Todavia, existem vários tipos de dor, denominadas de “nociceptiva”, “neurogênica”, “neuropática” e “psicogênica”, que são associadas com a estimulação excessiva dos nociceptores, lesão do tecido neuronal, disfunção nervosa, ou fatores psicológicos (FÜRST, 1999; MILLAN, 1999).

As terminações periféricas sensoriais livres encontradas em todas as partes do corpo têm a função de transmitir o sinal nociceptivo da periferia para os neurônios secundários do corno dorsal e, através das vias ascendentes da medula espinhal, levar as informações para os centros integradores do SNC (DRAY e PERKINS, 1997; GRUBB, 1998; BESSON, 1999; MILLAN, 1999; URBAN e GEBHART, 1999).

As fibras que inervam as regiões da cabeça e do corpo, por exemplo, provêm de corpos celulares do gânglio trigeminal e gânglios das raízes dorsais (GRD), respectivamente, e podem ser categorizadas em três principais grupos baseados nos critérios anatômicos e funcionais (DJOUHRI et al., 1998). Corpos celulares de grande diâmetro são características das fibras sensoriais primárias $A\alpha$ e $A\beta$, mielinizadas e de rápida condução, responsáveis pela informação proprioceptiva (toque leve e pressão). Ao contrário, os corpos celulares de pequeno e médio diâmetro são características da maior parte dos nociceptores, incluindo os polimodais, que são ativados por uma variedade de diferentes estímulos mecânicos, químicos e térmicos de alta intensidade, formados por fibras C amielínicas de condução lenta (aproximadamente 0,5-2 m/s) e fibras $A\delta$ mielinizadas de rápida condução (aproximadamente 5-30 m/s). Há muito tempo assume-se que os nociceptores $A\delta$ e C medeiam a dor primária e secundária, respectivamente, evocadas por estímulo nocivo (DRAY e PERKINS, 1997; BROMM e LORENZ, 1998; GRUBB, 1998; BESSON, 1999; FÜRST, 1999; MILLAN, 1999; RAJA et al., 1999; JULIUS e BASBAUM, 2001).

As fibras nociceptivas aferentes C e $A\delta$ podem ser ativadas por vários estímulos locais potencialmente nocivos e substâncias químicas geradas pelo dano tecidual. Esta ativação é transmitida diretamente através das vias aferentes para três sistemas na medula espinhal (para revisão ver FÜRST, 1999). O primeiro é o da substância gelatinosa (lâminas II e III do corno dorsal), o qual modula os padrões aferentes antes de influenciar o segundo sistema espinhal, que são as células de transmissão no núcleo próprio (lâminas III, IV e V do corno dorsal). O último sistema é o das fibras da coluna dorsal, que se projetam para o cérebro. A estimulação do cérebro ativa as fibras eferentes descendentes, que

favorecem a modulação da entrada do sinal nociceptivo (MENSE, 1993; MELZACK e WALL, 1994; PLEUVRY e LAURETTI, 1996; FÜRST, 1999).

Os diferentes mediadores químicos que normalmente participam da gênese, transmissão ou modulação da resposta nociceptiva, bem como da resposta inflamatória, atuam através da ativação de vários tipos de receptores, largamente distribuídos nos diferentes tipos celulares, nos nervos periféricos e centrais (PLEUVRY e LAURETTI, 1996; MILLAN, 1999; CALIXTO et al., 2000; JULIUS e BASBAUM, 2001). Diversos mediadores têm sido propostos na gênese e transmissão da dor, destacando-se entre eles, os metabólitos derivados do ácido araquidônico (prostaglandinas e leucotrienos), peptídeos (bradicinina, taquicininas, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, galanina, colecistocinina, peptídeo intestinal vasoativo), serotonina, citocinas, óxido nítrico, ATP, ADP, prótons. Outros mediadores químicos, como os aminoácidos excitatórios (glutamato, aspartato), substância P, acetilcolina, e outros, que podem ser produzidos ou liberados após lesão tecidual ou ainda por irritantes exógenos (formalina, capsaicina, ácido acético, etc), são também responsáveis pela multiplicidade de eventos que ocorrem durante a transmissão da dor, tanto no sistema nervoso periférico quanto central (DRAY, 1995; PLEUVRY e LAURETTI, 1996; WOOD e DOCHERTY, 1997; BESSON, 1999; MILLAN, 1999; CALIXTO et al., 2000).

Uma propriedade essencial de qualquer célula viva é a sua habilidade em reconhecer e responder a estímulos externos. Diferentes classes de receptores amplamente distribuídos nos tecidos periféricos ou centrais, presentes na superfície celular funcionam transmitindo essa sinalização extracelular para o interior da célula, gerando respostas celulares apropriadas (ULLRICH e

SCHLESSINGER, 1990; HUNTER, 1991). Alguns neurotransmissores ativam diretamente canais iônicos operados por receptor (receptor vanilóide, receptor NMDA), que controlam a permeabilidade da membrana a íons (sódio, cálcio e potássio, por exemplo), ou ativam receptores acoplados a proteínas G (receptores das prostaglandinas, receptores dos opióides, receptores metabotrópicos do glutamato, entre muitos), tendo como consequência, a produção de mensageiros intracelulares (CESARE e MCNAUGHTON, 1997; WOOD e DOCHERTY, 1997; GETHER e KOBILKA, 1998; MILLAN, 1999, CALIXTO et al., 2000; HAWES et al., 2000; HUNTER, 2000; WILKIE, 2000).

A ativação direta de canais iônicos é rápida e geralmente ocorre numa escala de tempo de milisegundos, enquanto que os eventos mediados através de receptores acoplados a proteínas G ocorrem numa escala acima de segundos ou minutos (CLAPHAM e NEER, 1997). Os receptores acoplados a proteínas G são caracterizados por possuírem sete domínios transmembrana e um domínio citoplasmático onde interagem com uma proteína G heteromérica causando uma resposta bioquímica específica dependente do tipo de proteína G que é ativada. A proteína G_s , por exemplo, estimula a adenilato ciclase elevando a concentração de AMPc (adenosina 3,5-monofosfato cíclico), enquanto que a proteína G_i inibe a atividade desta enzima diminuindo os níveis de AMPc. A estimulação da proteína G_q leva a ativação de fosfolipases, como a fosfolipase C (PLC), que promove a formação de 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3) e diacilglicerol (DAG) através de um precursor da membrana lipídica. Esta mesma proteína pode também estimular a fosfolipase A_2 (PLA_2), produzindo os precursores das prostaglandinas através do metabolismo do ácido araquidônico, como também a ativação de proteínas quinases (proteína quinase A, C e G) e mobilização de cálcio intracelular

(CESARE e MCNAUGHTON, 1997; GETHER e KOBILKA, 1998; GRUBB, 1998; FÜRST, 1999; MILLAN, 1999; WILKIE, 2000).

Desta forma, o conhecimento da ação das substâncias que participam da transmissão e processamento da dor e dos mecanismos pelos quais elas estimulam as terminações nervosas sensoriais pode identificar novos alvos para a descoberta de novas drogas analgésicas (TABER, 1974; WOOD, 1984; HUNSKAAR et al., 1985; DRAY, 1995; CHIZH et al., 1999; FÜRST, 1999; MILLAN, 1999; CALIXTO et al., 2001).

Recentes evidências, contudo, têm estabelecido que os aminoácidos excitatórios (AAEs), glutamato e aspartato, medeiam a entrada do sinal nociceptivo na medula espinhal e são encontrados nos terminais nervosos dos neurônios nociceptivos espinhais secundários (WESTLUND et al., 1992; BROMAN e ADAHL, 1994), sendo liberados por estímulos nocivos periféricos (SORKIN e MCADOO, 1993; UEDA et al., 1994). A presença dos receptores dos AAEs no corno dorsal da medula espinhal foi confirmado com estudos autoradiográficos, em ambos, ratos (GREENAMYRE et al., 1984; MONAGHAN e COTMAN, 1985) e humanos (JANSEN et al., 1990; SHAW et al., 1991). O aminoácido glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central de mamíferos, onde pode ativar tanto receptores glutamatérgicos ionotrópicos (GluR_i s), que são acoplados a canais iônicos e incluem os receptores NMDA, AMPA e cainato, quanto receptores glutamatérgicos metabotrópicos (GluR_m s), que são acoplados a proteínas G. Atualmente, 8 subtipos de receptores metabotrópicos foram clonados e denominados GluR_m 1-8, sendo classificados em diferentes grupos: grupo I (GluR_m s 1 e 5) que levam à estimulação da

fosfolipase C, grupo II (GluR_{ms} 2 e 3) e grupo III (GluR_{ms} 4, 5, 6, 7 e 8) que inibem a atividade da adenilato ciclase (para revisão ver: PIN e DUVOISIN, 1995).

Vários estudos têm demonstrado que os receptores dos aminoácidos excitatórios estão criticamente envolvidos na transmissão nociceptiva aferente primária, no desenvolvimento e na sustentação da resposta a dor (AANONSEN e WILCOX, 1987; RAIGORODSKY e URCA, 1990; MAO et al., 1992; COGGESHALL e CARLTON, 1998, 1999; FERREIRA et al., 1999). Além disso, os aminoácidos excitatórios (glutamato e aspartato) e a substância P, apresentam papel relevante no processo de sensibilização do corno dorsal da medula espinhal, uma vez que a estimulação das fibras aferentes primárias induz a liberação desses transmissores nessa região ou nesse local (GO e YAKSH, 1987; SKILLING et al., 1988; SORKIN et al., 1992; CARLTON et al., 1998). Estudos recentes demonstram que a substância P e os aminoácidos excitatórios encontram-se co-localizados nas fibras aferentes nociceptivas (BATTAGLIA e RUSTIONI, 1988; DEBIASI e RUSKIONI, 1988), sendo que a ativação dessas fibras é sensível ao pré-tratamento ou co-injeção de antagonistas da substância P e/ou de glutamato (DICKENSON e SULLIVAN, 1987a, b; CODERRE e MELZACK, 1991; WOOLF e THOMPSON, 1991; MALMBERG e YAKSH, 1992; MAO et al., 1992; REN et al., 1992; YAMAMOTO e YAKSH, 1992).

Enquanto a função do glutamato e dos receptores glutamatérgicos no SNC tem sido estudada em detalhes, a importância destes receptores no sistema nervoso periférico só foi reconhecida recentemente (CARLTON et al., 1995; JACKSON et al., 1995; DOGRUL et al., 2000; MCNEARNEY et al., 2000; BHAVE et al., 2001; KARIM et al., 2001; NEUGEBAUER, 2001; WALKER et al., 2001a; BEIRITH et al., 2002).

Periféricamente, tem-se demonstrado um importante papel fisiológico do glutamato, através da injeção intraplantar desse transmissor, o que causa um aumento da sensibilidade térmica e mecânica em ratos e camundongos, e formação de edema associado com a nocicepção em camundongos (CARLTON et al., 1995; JACKSON et al., 1995; BHAVE et al., 2001; BEIRITH et al., 2002). A importância clínica potencial dos níveis elevados de glutamato na periferia é suportada pela descoberta de que os níveis de glutamato são notadamente elevados no fluido sinovial das articulações do joelho de pacientes com artrite (MCNEARNEY et al., 2000).

Outros estudos demonstram que os níveis de glutamato se elevam nos tecidos periféricos durante a resposta inflamatória (SLUKA e WESTLUND, 1992, 1993; KARIM et al., 2001), como também após a injeção intraplantar de formalina (OMOTE et al., 1998), capsaicina (SAKURADA et al., 1996; TEOH et al., 1996), substância P (JURÁNEK e LEMBECK, 1997) e a estimulação elétrica do nervo ciático de ratos (DEGROOT et al., 2000). Essas evidências sugerem que as fibras nociceptivas primárias aferentes são uma fonte periférica de glutamato.

Analisados em conjunto, estes estudos sugerem um importante papel do glutamato como mediador periférico da dor inflamatória, e que os inibidores da sua liberação, de seus receptores ou segundos mensageiros intracelulares, podem constituir um importante alvo terapêutico para o desenvolvimento de novos analgésicos (KARIM et al., 2001; NEUGEBAUER, 2001).

Outra classe de receptores que são expressos em axônios cutâneos, co-localizados com os receptores glutamatérgicos e que vêm despertando o interesse como alvo para o desenvolvimento de novas drogas, são os receptores vanilóides (VR1), ativados pela capsaicina, prótons e outros compostos vanilóides

(CUNNINGHAM et al., 1994; CALIXTO et al., 2001; CARLTON et al., 2001; JULIUS e BASBAUM, 2001; KARIM et al., 2001; WALKER et al., 2001b). A capsaicina, princípio ativo pungente da pimenta vermelha presente nas espécies do gênero *Capsicum*, originárias da América Central e do Sul. A sua utilização tanto na culinária, como na medicina popular, é relatada desde 7000 a.C. (para revisão ver SZALLASI e BLUMBERG, 1999b).

Na década de 50, JANCSÓ (1955) demonstrou que após uma irritação violenta inicial, a aplicação de capsaicina em humanos e animais causava insensibilidade a um estímulo nocivo posterior. Este processo de dessensibilização permanecia por semanas ou meses após a administração sistêmica de capsaicina. Quando a capsaicina é administrada sistemicamente em animais neonatos, ocorre uma insensibilidade ainda mais duradoura, acompanhada pela destruição de um grupo particular de neurônios aferentes primários de pequeno diâmetro (efeito neurotóxico), conhecidos posteriormente como neurônios sensíveis a capsaicina (JANCSÓ et al., 1977).

A capsaicina, aplicada localmente, causa pungência, reações nociceptivas e inflamatórias resultantes da estimulação de fibras aferentes primárias responsáveis pela condução da informação nociceptiva para o SNC. Estudos com preparações de fibras sensoriais *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o efeito excitatório da capsaicina é causado principalmente pelo aumento do influxo de cálcio (Ca^{2+}), e em menor extensão de sódio (Na^+) (MARSH et al., 1987; RANG et al., 1987).

A busca de um receptor para capsaicina, através do uso de técnicas de ligação específica (*binding*), utilizando análogos da capsaicina, não obteve resultados satisfatórios. HERGENHAHN e colaboradores (1975), na busca de

novos promotores de tumor semelhantes aos ésteres de forbol, isolaram a partir da planta *Euphorbia resinifera* (Euphorbiaceae), um diterpeno extremamente irritante, chamado de resiniferatoxina (RTX). Posteriormente, foi demonstrado que a RTX produzia ações semelhantes à capsaicina em animais, tais como: pungência, inflamação neurogênica e diminuição da temperatura corporal (SZALLASI e BLUMBERG, 1989). As evidências iniciais mostravam que a RTX marcada radioativamente ligava-se em sítios específicos no GRD e em vários outros tecidos periféricos como nervo ciático e vago, bexiga urinária, uretra, traquéia, brônquio e cólon de rato, e que essa ligação era deslocada pela capsaicina (para revisão ver SZALLASI e BLUMBERG, 1999).

A capsaicina possui em sua estrutura um grupamento homovanilil, e as substâncias capazes de ligarem-se a este receptor foram denominadas vanilóides (SZALLASI e BLUMBERG, 1990). Evidências sobre a existência de receptores vanilóides também foram obtidas pelo uso da capsazepina, um antagonista sintético seletivo e competitivo para os efeitos causados tanto pela capsaicina como pela RTX (URBAN e DRAY, 1991). Com o emprego de técnicas eletrofisiológicas *in vitro*, foi possível demonstrar que este antagonista bloqueia o influxo de Ca^{2+} causado pela capsaicina em neurônios do GRD de rato, sugerindo que o receptor vanilóide poderia estar ligado a um canal iônico (OH et al., 1996).

A confirmação definitiva da existência de receptores vanilóides foi obtida com a clonagem do receptor vanilóide tipo 1 (VR1) em gânglio sensorial de rato (CATERINA et al., 1997). Uma alta expressão destes receptores foi evidenciada nos neurônios do GRD e no nervo trigeminal (CATERINA et al., 1997; TOMINAGA et al., 1998). O VR1 foi detectado tanto nos terminais centrais de neurônios aferentes primários (corno dorsal da medula espinhal e núcleo caudal do

complexo trigeminal espinhal) como nas terminações periféricas (pele e córnea) de mais de 50 % nos neurônios aferentes primários (GUO et al., 1999). Recentemente, CATERINA e colaboradores (2000) desenvolveram camundongos nocautes para o receptor VR1. Estes camundongos apresentam respostas normais para estímulos mecânicos nocivos, mas não apresentam comportamento de dor quando desafiados por vanilóides, além de apresentarem pequena sensibilidade térmica no local da inflamação. Desta forma, parece evidente que os receptores VR1 são essenciais para o tipo de sensação de dor causada por vanilóides presente na hiperalgesia térmica (CATERINA et al., 2000).

A exposição prolongada ou a aplicação de altas concentrações de capsaicina causa dessensibilização neuronal (HOLZER, 1991; SZOLCSÁNYI, 1993), fenômeno conhecido por depender de Ca^{2+} (para revisão ver SZALLASI e BLUMBERG, 1999b). O fenômeno de dessensibilização contribui significativamente para a analgesia produzida após exposição a capsaicina ou seus análogos. A estimulação de neurônios sensíveis a capsaicina parece estar relacionada com diversas patologias, incluindo neuralgias e neuropatias, entre outras (para revisão ver SZALLASI e BLUMBERG, 1999b). A capsaicina tem sido utilizada topicamente como analgésico coadjuvante em vários estados de dor neuropática, como neuralgia pós-herpética, dor neuropática causada pela diabetes, síndrome da dor pós mastectomia, osteoartrite e artrite reumatóide (SZALLASI e BLUMBERG, 1999b). As propriedades antinociceptivas da capsaicina demonstradas recentemente já haviam sido evidenciadas no século XIX, quando esta era usada para tratar dor de dente. Outros usos incluem a rinite vasomotora, notalgia, parestesia e outras (para revisão ver SZALLASI e BLUMBERG, 1999b).

Nos últimos anos, a capsaicina tornou-se um instrumento poderoso nas pesquisas biomédicas. O interesse científico por este composto é motivado principalmente pelo fato da capsaicina exercer uma ação peculiar sobre uma subpopulação de neurônios sensoriais que transmitem a informação nociceptiva. As evidências de um importante papel fisiológico desta subpopulação de neurônios também têm contribuído para o aumento no interesse dos pesquisadores nesta área.

A compreensão das propriedades dos nociceptores e dos circuitos intracelulares relacionados com os vários neurotransmissores, receptores e múltiplos mecanismos intracelulares, podem seguramente fornecer alvos promissores para o desenvolvimento de novas drogas analgésicas destinadas ao tratamento de diversos estados dolorosos sem terapia satisfatória atualmente.

2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

- 1) Avaliar o efeito antinociceptivo do sesquiterpeno drimaniol, administrado através das vias sistêmica, intraplantar, espinhal e supraespinhal, em modelos de nocicepção térmica e química em camundongos.
- 2) Investigar, através de técnicas farmacológicas e neuroquímicas, os possíveis mecanismos que possam estar contribuindo para o efeito antinociceptivo do composto drimaniol.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos suíços (pesando entre 25 e 35 g) e ratos machos Wistar (pesando entre 150 e 200 g), criados no Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada (23 ± 2 °C), em ciclo 12 h claro/12 h escuro e oferecido água e ração *ad libitum*. Os animais permaneceram no laboratório durante um período de adaptação de pelo menos 1 h antes dos testes farmacológicos, realizados geralmente entre 8 e 17 h, a temperatura de 20 ± 3 °C.

Os experimentos descritos foram conduzidos de acordo com as diretrizes atuais de cuidado com os animais de laboratório e com as diretrizes éticas para investigação de dor experimental em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983). O número de animais e a intensidade do estímulo nocivo utilizado foram o mínimo necessário para demonstrar os efeitos do tratamento com as drogas.

3.2. Coleta e classificação botânica da *Drimys winteri*

As cascas da *Drimys winteri* (Winteraceae) foram coletadas no município de Bom Retiro-SC, e a classificação botânica da espécie foi realizada no Departamento de Botânica da UFSC pela professora Leila da Graça Amaral. Um exemplar da planta está depositado e registrado sob o número 26.313 no Herbário FLOR, do Horto Botânico da Universidade Federal de Santa Catarina, em Florianópolis-SC (Figura 1).

3.3. Isolamento e identificação do composto drimancial

As cascas da *D. winteri* foram secas a uma temperatura entre 45 – 50 °C durante 2 dias. O material seco (1,5 kg) foi triturado e macerado com CHCl₃ em temperatura ambiente durante 7 dias. O solvente foi removido (a vácuo) para obter o extrato CHCl₃ (27 g). O extrato foi exaustivamente fracionado em sílica gel CC, eluído com as misturas de n-hexano, acetato de etila e metanol em polaridades crescentes. A fração eluída com hexano-acetato de etila 1:1, forneceu o composto drimancial, conforme descrito anteriormente (MALHEIROS et al., 2001). O drimancial foi identificado através de dados espectroscópicos (ressonância nuclear magnética de próton e ressonância nuclear magnética de carbono-13). Uma porção de material seco das cascas da planta, equivalente a 1,5 kg, rendeu 362 mg de drimancial, correspondendo a um rendimento de 0,024% e seu grau de pureza foi > 98% (MALHEIROS et al., 2001). A estrutura molecular do composto drimancial, isolado das cascas da *D. winteri*, está apresentado na Figura 2.

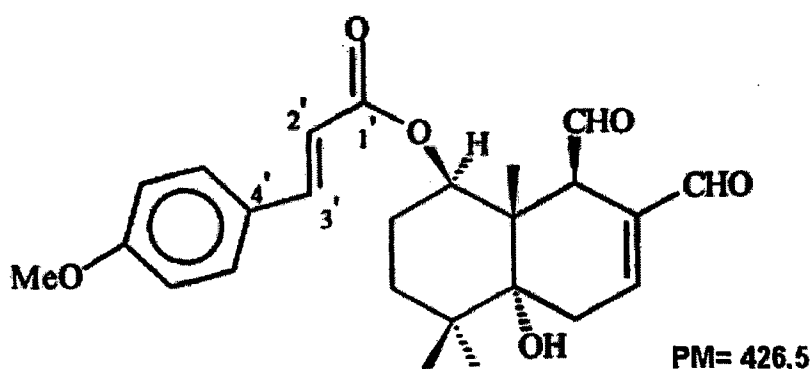


Figura 2 – Estrutura molecular do composto drimancial isolado das cascas da *Drimys winteri*.

3.4. Injeção intratecal (i.t.)

A administração de drogas através da via i.t. foi feita de acordo com o método descrito por HYLDEN e WILCOX (1980), com algumas modificações. As injeções foram realizadas em animais conscientes a fim de eliminar a possível interferência de anestésicos. Uma agulha, conectada a uma microseringa (25 μ l) por intermédio de uma cânula de polietileno, foi inserida através da pele e se fixando entre as vértebras no espaço subdural dos segmentos espinhais L5-L6, para a administração de um volume de 5 μ l das drogas ou veículo.

3.5. Injeção intracerebroventricular (i.c.v.)

Para a administração de drogas através da via i.c.v., seguiu-se o método descrito por LAURSEN e BELKNAP (1986), com algumas modificações. Após serem levemente anestesiados com éter, os animais receberam injeção contendo 5 μ l da droga em análise ou solução salina (NaCl 0,9%, o controle) num dos ventrículos laterais (coordenadas para localização em relação ao bregma: 1 mm lateral, 1 mm rostral, -3 mm vertical). As respostas nociceptivas foram avaliadas após 10 min.

3.6. Estudo da atividade antinociceptiva

Os experimentos a seguir foram realizados com a finalidade de investigar o mecanismo de ação envolvido na atividade antinociceptiva do composto drimanial, em modelos de nocicepção química e térmica, bem como na hiperalgesia causada pela injeção intratecal de glutamato em camundongos. A possibilidade de seu efeito antinociceptivo estar associado a efeitos não-

específicos como relaxamento muscular, hipotermia ou sedação dos animais também foi avaliada.

3.6.1. Teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético

Preliminarmente foi verificado o efeito do composto drimanial no teste de contorções abdominais em camundongos que, embora seja um modelo de nocicepção simples e pouco específico, permite avaliar a atividade analgésica de várias substâncias que atuam tanto no sistema nervoso central quanto periférico (BENTLEY et al., 1981). 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 abdominal juntamente com a extensão de uma das patas posteriores, de acordo com método descrito anteriormente (COLLIER et al., 1968; BENTLEY et al., 1981). Grupos distintos de animais foram pré-tratados com o composto drimanial por via intraperitoneal (2,3 – 23,0 $\mu\text{mol/kg}$) (1 – 10 mg/kg), 30 min antes da injeção de ácido acético. O grupo controle recebeu o mesmo volume do veículo (10 ml/kg) utilizado para diluir o composto drimanial.

Após a injeção de ácido acético, os camundongos foram observados em pares, colocados sob funis de vidro individuais e o número de contorções abdominais foi quantificado cumulativamente durante um período de 20 min. A atividade analgésica foi determinada tomando-se como base a inibição do número das contorções abdominais nos animais pré-tratados com o composto drimanial comparado com o número de contorções abdominais dos animais controles (pré-tratados com salina).

3.6.2. Nociceção induzida pela formalina

Com o objetivo de avaliar o efeito antinociceptivo do drimanial, foi utilizado o modelo da nociceção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos, que permite distinguir dois tipos de dor, uma de origem neurogênica (estimulação direta dos nociceptores) e outra de origem inflamatória (caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios). O teste da formalina permite evidenciar estas duas fases de sensibilidade dolorosa: a primeira, que ocorre durante os primeiros 5 min após a Injeção de formalina (resposta fásica à dor), e a segunda, que ocorre entre 15 e 30 min após a injeção de formalina (resposta tônica à dor).

O procedimento utilizado foi similar ao descrito anteriormente por DUBUISSON e DENNIS (1977) e SHIBATA e colaboradores (1989), com algumas modificações (VAZ et al., 1996). Os animais receberam 20 μ l de formalina 2,5% (0,92% de formaldeído) sob a superfície plantar (intraplantar; i.pl.) da pata posterior direita. Logo após a injeção de formalina, os animais foram colocados, individualmente, sob campânulas transparentes (funis de vidro com 20 cm de diâmetro) ao lado de espelhos, para facilitar a observação. O tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com formalina foi quantificado cumulativamente durante 30 min e considerado como indicativo de dor.

Para verificar a duração da atividade antinociceptiva do drimanial no modelo da formalina e obter o tempo ideal de tratamento para a realização dos experimentos subseqüentes, os animais foram tratados com drimanial através da via i.p. (23,0 μ mol/kg) (10 mg/kg) e observados durante 6 h após sua administração.

Para avaliar a influência da via de administração sobre o efeito antinociceptivo do drimanial neste modelo, camundongos foram tratados com este composto através das vias intraperitoneal (i.p., 7,0 – 70,3 $\mu\text{mol/kg}$) (3 – 30 mg/kg), 30 min antes da injeção de formalina, intraplantar (i.pl., 2,0 – 23,0 nmol/pata, co-administrado com a formalina), ou ainda i.t. (2,3 – 23,0 nmol/sítio) ou i.c.v. (0,7 – 7,0 nmol/sítio), 10 min antes da injeção de formalina. Animais controle receberam um volume similar de veículo utilizado para diluir o drimanial ou as drogas padrão através das vias i.p. (10 ml/kg), intraplantar (20 $\mu\text{l/pata}$), i.t. ou i.c.v. (5 $\mu\text{l/sítio}$).

Ao final do tempo de observação, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e as patas posteriores cortadas na junção tíbio-tarsal e pesadas em balança analítica para quantificação do edema de pata induzido pela formalina. A diferença entre o peso (em mg) da pata direita (injetada com formalina) e da pata esquerda (injetada com solução salina) foi considerada como índice de edema.

Em outra série de experimentos, também foi investigado o possível efeito antinociceptivo terapêutico do composto drimanial administrado após a primeira fase da resposta nociceptiva causada pela injeção de formalina. Com essa finalidade, camundongos foram tratados intraplantarmente com formalina e após 5 min receberam o tratamento com drimanial (23,0 $\mu\text{mol/kg}$) (10 mg/kg) ou veículo (10 ml/kg), administrados por via i.p., e foram avaliados em relação à segunda fase da nocicepção causada pela injeção de formalina.

3.6.3. Nocicepção induzida pela capsaicina

A fim de obter outras evidências sobre a atividade antinociceptiva do composto drimanial na dor de origem neurogênica, camundongos tratados com drimanial foram avaliados no modelo de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina. O procedimento utilizado foi similar ao descrito por SAKURADA e colaboradores (1992), com algumas modificações (CORRÊA et al., 1996). Antes do teste, os animais foram colocados individualmente sob campânulas transparentes (funis de vidro com 20 cm de diâmetro), que serviram de câmaras de observação. Grupos de animais foram tratados com drimanial por via i.p. (7,0 – 70,3 $\mu\text{mol/kg}$) (3 – 30 mg/kg), 30 min antes da injeção de capsaicina. Decorrido o tempo necessário, os animais receberam uma injeção intraplantar com um volume de 20 μl de uma solução de capsaicina (1,6 $\mu\text{g/pata}$, dissolvida em PBS). Os animais foram observados individualmente durante 5 min após a injeção de capsaicina. O tempo despendido pelos animais para lambe ou morder a pata injetada com capsaicina foi quantificado cumulativamente com o auxílio de um cronômetro e considerado como indicativo de nocicepção.

3.6.4. Nocicepção induzida pelo glutamato

Com a finalidade de se obter evidências mais diretas a respeito da interação do composto drimanial com o sistema glutamatérgico, foi avaliada a atividade antinociceptiva do composto drimanial (2,3-23,0 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) (1-10 mg/kg), administrado 30 min antes da injeção intraplantar de glutamato.

Um volume de 20 μl de glutamato (30 $\mu\text{mol/pata}$) foi injetado na superfície plantar da pata traseira direita de camundongos e os animais foram observados durante um período de 15 min, de acordo com método descrito anteriormente

(BEIRITH et al., 2002). Após a injeção intraplantar de glutamato, os animais foram colocados imediatamente e individualmente sob campânulas transparentes (funis de vidro com 20 cm de diâmetro), que serviram como câmaras de observação. O tempo despendido pelos animais para lambar ou morder a pata injetada foi quantificado cumulativamente com o auxílio de um cronômetro e considerado como indicativo de nocicepção.

3.6.5. Nocicepção induzida pelo forbol miristato acetato (PMA)

Para avaliar a participação da proteína quinase C, na atividade antinociceptiva do composto drimanial, camundongos foram tratados com drimanial por via i.p. (7,0 – 70,3 $\mu\text{mol/kg}$) (3 - 30 mg/kg), 30 min antes da injeção intraplantar de 20 μl de uma solução de PMA (30 ng/pata, um ativador de proteína quinase C), de acordo com método descrito anteriormente (TANIGUCHI et al., 1997). Após a injeção, os animais foram colocados individualmente sob campânulas transparentes (funis de vidro com 20 cm de diâmetro), que serviram de câmaras de observação. Os animais foram observados num período que se inicia 15 min após a injeção intraplantar de PMA (início da reação nociceptiva), perdurando até 45 min após a injeção de PMA. O tempo despendido pelos animais para lambar ou morder a pata injetada com PMA foi quantificado cumulativamente com o auxílio de um cronômetro e considerado como indicativo de nocicepção.

3.6.6. Hiperalgisia induzida pelo glutamato

Para testar a hipótese de que os aminoácidos excitatórios estariam envolvidos na antinocicepção causada pelo composto drimanial, este foi

administrado em camundongos através da via intraperitoneal e avaliado sobre as respostas hiperalgésicas causadas pelo glutamato (100 nmol/sítio, i.t.) administrado espinalmente em camundongos. Os experimentos foram realizados com descrito anteriormente (AANONSEN e WILCOX, 1987; BEIRITH et al., 1998; FERREIRA et al., 1999). A resposta nociceptiva foi medida no aparelho de placa quente (Ugo Basile, modelo DS-37), contendo uma área delimitada por um cilindro de acrílico de 24 cm de diâmetro, onde o animal permanece durante o experimento. O tempo entre a exposição à placa e a reação de lamber, agitar as patas ou saltar foi registrado como latência ao estímulo térmico de 50 ± 1 °C, como descrito no item anterior. A resposta hiperalgésica máxima causada pela injeção intratecal de glutamato foi observada 5 min após a injeção. Um tempo máximo de 30 s foi utilizado no teste da placa quente para evitar danos teciduais. Diferentes grupos de animais foram tratados com drimanial (7,0 – 70,3 μ mol/kg, i.p.) (3 – 30 mg/kg) 30 min antes da administração de glutamato. Os grupos controle foram tratados com solução salina (NaCl 0,9%) por via intraperitoneal. A percentagem do efeito máximo (PEM) da hiperalgesia induzida pelo glutamato foi calculado com a seguinte fórmula:

$$\text{PEM} = \frac{\text{latência pós-droga} - \text{latência pré-droga}}{30 - \text{latência pré-droga}}$$

3.6.7. Teste da placa quente

O teste da placa quente foi utilizado para avaliar a latência dos animais ao estímulo térmico. O modelo foi descrito inicialmente por WOOLFE e MACDONALD (1944) e posteriormente modificado por EDDY e LEIMBACK

(1953). Neste experimento, o aparelho de placa quente (Ugo Basile, modelo DS-37) foi mantido a 56 ± 1 °C. Camundongos foram tratados com drimanial (70,3 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) (30 mg/kg), morfina (26,6 $\mu\text{mol/kg}$, s.c., utilizada como controle positivo) (10 mg/kg) ou solução salina (NaCl 0,9%), 30 min antes, e colocados em um cilindro de vidro com 24 cm de diâmetro sobre uma superfície aquecida. O tempo (s) decorrido entre a colocação do animal na superfície aquecida e o aparecimento de reações de balançar, morder ou lambe as patas foi registrado e considerado como índice de latência. Um tempo máximo de 30 s foi utilizado para prevenir possíveis danos teciduais. Cada animal foi avaliado 24 h antes do teste, sendo desprezados aqueles que permaneceram por um período superior a 8 s na placa aquecida sem reagir ao estímulo térmico.

3.6.8. Teste de retirada da cauda (*tail flick*)

O teste de nocicepção térmica induzida por um feixe luminoso (*tail flick*, Albarsch, modelo Tail-Flick Analgesia Meter) foi utilizado para medir a latência dos animais ao estímulo térmico, de acordo com o método descrito anteriormente por D'AMOUR e SMITH (1941), com algumas modificações. Foi medido o tempo de reação (s) que o animal leva para retirar a cauda exposta ao feixe luminoso (90 watts). Camundongos foram tratados com drimanial (70,3 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) (30 mg/kg), morfina (26,6 $\mu\text{mol/kg}$, s.c., utilizada como controle positivo) (10 mg/kg) ou solução salina (NaCl 0,9%), 30 min antes, e submetidos ao teste, respondendo ao estímulo luminoso focalizado na cauda, retirando ou sacudindo-a e, dessa forma, expondo imediatamente a fotocélula do aparelho. O tempo de reação foi registrado, consecutivamente, no intervalo de 30 min após os tratamentos e considerado como período de latência. Um tempo máximo de 20 s foi adotado

para evitar possíveis danos teciduais. Os animais foram selecionados 24 h antes dos experimentos conforme sua reatividade ao teste, sendo desprezados aqueles que permaneceram imóveis por mais de 8 s no aparelho.

3.6.9. Efeito sobre o desempenho motor (*rota-rod*)

Com o intuito de verificar possíveis efeitos relaxantes musculares não específicos ou sedativos produzidos pelo composto drimanial sobre o sistema nervoso central, os animais tiveram seu desempenho motor avaliado no teste do *rota-rod*, conforme descrito anteriormente (DUNHAM e MIYA, 1957; ROSLAND et al., 1990). O aparelho de *rota-rod* (Ugo Basile, Modelo 7600) consiste em um cilindro com 2,5 cm de diâmetro, subdividido em seis compartimentos por discos de 25 cm de diâmetro. O cilindro gira a uma velocidade constante de 22 rotações por minuto. Os camundongos foram selecionados 24 h antes dos experimentos conforme sua reatividade ao teste, sendo desprezados aqueles que não permaneceram 60 s no aparelho. No dia do experimento, os animais foram tratados com drimanial (70,3 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) (30 mg/kg) ou com solução salina (NaCl 0,9%), 30 min antes de serem submetidos ao teste. O resultado foi expresso como tempo (s) que os animais permaneceram sobre o *rota-rod*. O tempo máximo utilizado foi de 60 s.

3.6.10. Efeito sobre a mucosa gástrica

A ulceração gástrica é um dos efeitos colaterais mais comuns provocados pelo uso de drogas antiinflamatórias não esteroidais, sendo que a supressão da síntese de prostaglandinas é um componente chave do mecanismo de sua formação (VANE, 1971; ALLISON et al., 1992; WALLACE e TIGLEY, 1995). Sob

este aspecto, procurou-se avaliar o efeito do composto drimanial sobre a mucosa gástrica de ratos mantidos em jejum por 24 h. Após este período, grupos de animais foram tratados intraperitonealmente com drimanial (70,3 $\mu\text{mol/kg}$) (30 mg/kg), indometacina (83,8 $\mu\text{mol/kg}$) (30 mg/kg) ou veículo (NaCl 0,9%). Quatro horas após o tratamento, os animais foram sacrificados com uma dose excessiva de éter e seu estômago foi retirado e aberto através de uma incisão abdominal ao longo da pequena curvatura estomacal. O número e severidade das úlceras foram observados a olho nu, anotadas e numeradas de acordo com uma escala arbitrária de 0 a 6 pontos (Tabela 1) descrita por MAGISTRETTI e colaboradores (1988). O índice de ulceração (IU) de cada estômago foi expresso através dos pontos obtidos em cada experimento.

Tabela 1. Escala para determinação da severidade da úlcera formada.

0	=	Sem lesão
1	=	1 – 3 lesões pequenas (≤ 10 mm comprimento)
2	=	1 – 3 lesões grandes (> 10 mm comprimento)
3	=	1 – 3 lesões profundas
4	=	Mais de 3 lesões pequenas
5	=	Mais de 3 lesões grandes
6	=	Mais de 3 lesões profundas

Fonte: Tabela descrita por MAGISTRETTI e colaboradores (1988).

3.7. Estudo do mecanismo de ação

Os experimentos relacionados a seguir foram realizados para investigar, através de técnicas farmacológicas e neuroquímicas, os possíveis mecanismos adicionais que podem estar contribuindo para o efeito antinociceptivo do drimanial.

3.7.1. Participação do sistema glutamatérgico na atividade antinociceptiva do drimanial no modelo do comportamento relacionado a nocicepção causada por aminoácidos excitatórios e substância P em camundongos

A fim de obter informações adicionais sobre a possibilidade dos aminoácidos excitatórios (AAE) e/ou da substância P (SP) estarem envolvidos no mecanismo antinociceptivo do composto drimanial, foi avaliada a atividade antinociceptiva do drimanial (70,3 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) (30 mg/kg) ou morfina (13,3 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) (5 mg/kg) sobre a nocicepção direcionada à região dorso/caudal causada pelos AAE e SP, quando administrados intratecalmente em camundongos. As injeções foram realizadas em animais conscientes, a fim de eliminar a possível interferência de anestésicos, de acordo com método descrito por HYLLEN e WILCOX (1980). Uma agulha conectada a uma microseringa (25 μl) por intermédio de uma cânula de polietileno, foi inserida através da pele e se fixando entre as vértebras no espaço subdural dos segmentos espinhais L5-L6, para a administração de um volume de 5 μl das drogas ou veículo. A resposta nociceptiva foi induzida por SP (0,1 nmol/sítio, i.t.) (SAKURADA et al., 1990), *trans*-ACPD (agonista metabotrópico do grupo I e II, 50 nmol/sítio, i.t.) (BOXALL et al., 1998), AMPA (agonista seletivo de receptores AMPA, 135 pmol/sítio, i.t.) (BJORKMAN et al., 1994; BRAMBILLA et al., 1996), glutamato (175 nmol/sítio, i.t.), cainato (110 pmol/sítio, i.t.) ou N-metil-D-aspartato (agonista seletivo de receptores NMDA, 450 pmol/sítio, i.t.) (URCA e RAIGORODSKY, 1988; BJORKMAN et al., 1994). A injeção intratecal dos aminoácidos excitatórios e SP causou uma reação comportamental de nocicepção direcionada a região dorso/caudal. A reação nociceptiva é definida como um único movimento de cabeça direcionada a parte posterior do corpo mordendo ou lambendo os

membros posteriores (patas posteriores, cauda e abdômen), que resulta em contato do focinho do animal com o órgão alvo. O tempo de reação nociceptiva direcionada a região dorso/caudal foi avaliado em períodos apropriados para cada droga, como descrito na literatura: glutamato (3 min); NMDA e substância P (5 min); AMPA (1 min); cainato (4 min) e *trans*-ACPD (15 min) (URCA e RAIGORODSKY, 1988; SAKURADA et al., 1990; BJORKMAN et al., 1994; BRAMBILLA et al., 1996; BOXALL et al., 1998). O tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a região posterior do corpo foi quantificado cumulativamente com o auxílio de um cronômetro e considerado como indicativo de nocicepção.

3.7.2. Participação do sistema vanilóide na atividade antinociceptiva do drimaniai no modelo da formalina

Com a intenção de verificar se a atividade antinociceptiva do drimaniai envolve a participação de receptores vanilóides, os camundongos foram pré-tratados com capsazepina (um antagonista competitivo de receptores vanilóides, 25 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) e após 15 min foram tratados com drimaniai (23,0 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) (10 mg/kg), capsaicina (16,3 $\mu\text{mol/kg}$, s.c., utilizada como controle positivo) (5 mg/kg) ou solução salina (NaCl 0,9%, i.p.), de acordo com método descrito anteriormente (DICKENSON e DRAY, 1991; PERKINS e CAMPBELL, 1992). Decorridos 30 min após a administração de drimaniai ou capsaicina, os animais foram analisados em relação à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina (VAZ et al., 1996). Os grupos controle foram tratados somente com drimaniai (23,0 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) (10 mg/kg), capsaicina (16,3 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) (5 mg/kg), capsazepina (25 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) (9,4 mg/kg) ou solução salina (NaCl 0,9%, i.p.).

3.7.3. Participação do sistema vanilóide na variação da temperatura corporal causada pelo drimanial

Com o objetivo de verificar uma possível alteração na temperatura corporal de camundongos causada pelo composto drimanial, e se essa alteração envolve a participação de receptores vanilóides, camundongos foram pré-tratados (após a medida da temperatura basal) com capsazepina (um antagonista competitivo de receptores vanilóides, 25 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) (9,4 mg/kg) e após 15 min foram tratados com drimanial (23,0 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) (10 mg/kg), capsaicina (16,3 $\mu\text{mol/kg}$, s.c., utilizada como controle positivo) (5 mg/kg) ou solução salina (NaCl 0,9%, i.p.). Decorridos 30 min da administração de drimanial ou capsaicina, os animais foram contidos manualmente e a sonda de um termômetro (LUMISCOPE, Model 2018) foi lubrificada e inserida (3 cm) na região retal dos animais por um período de 10 – 20 s, necessários para a estabilização da medida da temperatura pelo termômetro (MOGIL et al., 1998).

3.7.4. Efeito do tratamento neonatal de camundongos com capsaicina na atividade antinociceptiva do drimanial

O tratamento de animais com capsaicina no período neonatal ou mesmo na fase adulta causa uma destruição de grande parte das fibras C sensíveis a capsaicina, sendo este efeito o responsável pela insensibilidade dos animais a substâncias irritantes e também a outros estímulos nocivos. Além disso, este tratamento também causa depleção de SP nos terminais de fibras aferentes primárias do corno dorsal da medula espinhal promovendo um efeito antinociceptivo quando estes nestes animais são avaliados em modelos de nocicepção (GAMSE, 1982).

Com a finalidade de explorar a participação das fibras sensíveis a capsaicina no efeito antinociceptivo do composto drimanial, camundongos recém nascidos, anestesiados com éter, foram tratados com uma injeção subcutânea de capsaicina ($163,7 \mu\text{mol/kg}$, s.c.) (50 mg/kg) ou veículo (10% etanol, 10% Tween-80 e 80% salina) no segundo dia de vida, como descrito anteriormente por MASSUYAMA e SHIMIZU (1997). O efeito antinociceptivo causado pela administração intraperitoneal do drimanial ($23,0 \mu\text{mol/kg}$, i.p.) (10 mg/kg) ou capsaicina ($16,3 \mu\text{mol/kg}$, s.c., utilizada como controle positivo) (5 mg/kg), foi analisado frente a nocicepção induzida pela formalina, na sétima semana após a administração neonatal de capsaicina ou veículo (utilizado como controle negativo) nos animais recém nascidos.

3.7.5. Participação do sistema opióide na atividade antinociceptiva do drimanial no modelo da formalina

Para investigar uma possível participação do sistema opióide na atividade antinociceptiva do drimanial, grupos de camundongos foram pré-tratados com naloxona (um antagonista não-seletivo de receptores opióides, $13,7 \mu\text{mol/kg}$, i.p.) (5 mg/kg) e após 15 min foram tratados com drimanial ($70,3 \mu\text{mol/kg}$, i.p.) (30 mg/kg), morfina ($13,3 \mu\text{mol/kg}$, s.c., utilizada como controle positivo) (5 mg/kg) ou solução salina (NaCl 0,9%, i.p.). Decorridos 30 min após a administração de drimanial ou morfina, os animais foram analisados em relação à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina (VAZ et al., 1996). Os grupos controle foram tratados somente com drimanial ($70,3 \mu\text{mol/kg}$, i.p.) (30 mg/kg), morfina ($13,3 \mu\text{mol/kg}$, s.c.) (5 mg/kg), naloxona ($13,7 \mu\text{mol/kg}$, s.c.) (5 mg/kg) ou solução salina (NaCl 0,9%, i.p.).

3.7.6. Participação do sistema serotoninérgico na atividade antinociceptiva do drimanial no modelo da formalina

Para avaliar a possível participação da via serotoninérgica eferente no efeito antinociceptivo causado pelo drimanial, os camundongos foram tratados com cloridrato de p-clorofenilalanina (PCPA, um inibidor da síntese de serotonina, 399,8 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) (100 mg/kg) durante 4 dias consecutivos, antes da administração de drimanial (70,3 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) (30 mg/kg), morfina (13,3 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) (5 mg/kg) ou solução salina estéril (NaCl 0,9%, i.p.). Outro grupo de animais foi tratado, durante 4 dias consecutivos, com solução salina (NaCl 0,9%, i.p.), antes da administração de drimanial (70,3 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) (30 mg/kg) ou morfina (13,3 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) (5 mg/kg). Decorridos 30 min da administração de drimanial ou morfina, os animais foram avaliados em relação à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina. Os grupos controle foram tratados somente com drimanial (70,3 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) (30 mg/kg), morfina (13,3 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) (5 mg/kg) ou solução salina (NaCl 0,9%, i.p.) (SANTOS et al., 1995).

3.8. Efeito do drimanial sobre a ligação específica (*binding*) de [^3H]glutamato

Para caracterizar a existência de uma interação entre o composto drimanial com os receptores glutamatérgicos, sua ação sobre sítios de ligação do [^3H]glutamato foi investigada. 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), pH 7,4 e MgCl_2 1 mM em um *potter* de vidro. O homogeneizado foi centrifugado a 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 segundo 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 permaneceu no gelo por pelo menos 30 min (até 1 h), para que ocorresse a lise das vesículas que foram formadas pela sacarose. Depois deste período, foi submetido à centrifugação a 27.000 g durante 15 min. O precipitado foi lavado e ressuspenso com tampão Tris/HCl 10 mM, pH 7,4 e centrifugado a 27.000 g durante 15 min (SOUZA e RAMÍREZ, 1991; BEIRITH et al., 1998), procedimento que foi repetido três vezes. O precipitado resultante da terceira lavagem foi ressuspenso em tampão Tris/HCl 10 mM (pH 7,4) de forma a obter uma concentração proteica em torno de 2,0 mg de proteína por ml, a qual foi determinada em alíquotas dessa suspensão pelo método de LOWRY e colaboradores (1951).

Os ensaios de ligação específica (*binding*) de [³H]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 final), tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) e 40 nM do ligante radioativo ([³H]glutamato, 46 Ci/mmol), na presença e na ausência do composto drimanial (0,1 – 30 μ M). A ligação inespecífica foi conduzida similarmente, com exceção de que 40 μ M de glutamato não-radioativo (deslocador) foi acrescentado ao meio de incubação. Após 15 min de incubação a 30 °C as membranas foram centrifugadas a 12.000 g por 15 min para separar o [³H]glutamato que não se ligou as membranas. O sobrenadante foi descartado e as paredes dos tubos de *ependorf* e as superfícies do *pellets* foram

cuidadosamente lavadas com água deionizada gelada. Após adicionou-se duodecil sulfato de sódio (SDS, 0,1%) para solubilização da proteínas, que foram misturadas ao líquido de cintilação para posterior determinação da radioatividade em cintilador beta. A ligação específica foi calculada como a diferença entre os valores da ligação (*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.

3.9. Drogas e soluções utilizadas

As seguintes substâncias foram utilizadas: ácido acético, formalina, cloridrato de morfina (Merck, AG, Darmstadt, Alemanha); ácido L-glutâmico, cainato, substância P, *trans*-ACPD, indometacina e cloridrato de p-clorofenilalanina-metil-éster (PCPA) (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA); ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico $2H_2O$ (AMPA) e N-metil-D-aspartato (NMDA) (Tocris Cookson, Bristol, UK), cloridrato de naloxona, capsazepina (Research Bichemicals International, Natick, USA), capsaicina (Calbiochem, San Diego, USA). [3H]glutamato (46 Ci/mmol) adquirido da Amersham International, U.K. Os demais reagentes e sais utilizados foram de alto grau de pureza analítica e procedência Merck.

O composto drimanial foi isolado das cascas da *Drimys winteri* pelo Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, como descrito anteriormente (MALHEIROS et al., 2001).

Todas as drogas foram preparadas imediatamente antes do uso em solução salina (NaCl 0,9%), com exceção da capsaicina, que foi preparada em PBS e do composto drimanial, que foi preparado com tween 80 (LabSynth, São

Paulo, Brasil). A capsaicina e a indometacina foram dissolvidas em etanol absoluto e carbonato de sódio (0,5%). As concentrações finais de etanol e de tween, não excederam 5% e 0,05%, respectivamente, de modo a não influenciar nos efeitos causados pelos compostos. Nos estudos neuroquímicos, as drogas foram dissolvidas em água de Milli Q. As demais drogas foram diluídas em salina.

3.10. Análise estatística

Os resultados são apresentados como a média \pm erro padrão da média (E.P.M., 95%), exceto os valores das DI_{50} ou CI_{50} (dose ou concentração das drogas ou compostos que reduziram a resposta em 50% em relação ao grupo controle), que são apresentadas como médias acompanhadas de seus respectivos limites de confiança, em nível de 95%. A análise estatística dos resultados foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) ou teste *t* de Student's, seguido pelo teste de múltipla comparação utilizando-se o método de Dunnett ou Newman Kuels, quando apropriado. Valores de *P* menores que 0,05 ($P < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância. Os valores das CI_{50} ou DI_{50} foram determinados, a partir de experimentos individuais, utilizando o método de regressão linear através do programa "Graph Pad Prism®".

4. RESULTADOS

4.1. Estudo da atividade antinociceptiva

4.1.1. Nocicepção induzida pelo ácido acético

Os resultados apresentados na Figura 3 demonstram que o composto drimanial (2,3 a 23,0 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) (1 a 10 mg/kg), administrado 30 min antes, produziu inibição significativa e dependente da dose das contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético. O valor médio calculado para a DI_{50} e seus respectivos limites de confiança foi de 11,0 (10,3 – 11,5) $\mu\text{mol/kg}$, com inibição (média \pm EPM) de $92 \pm 3\%$.

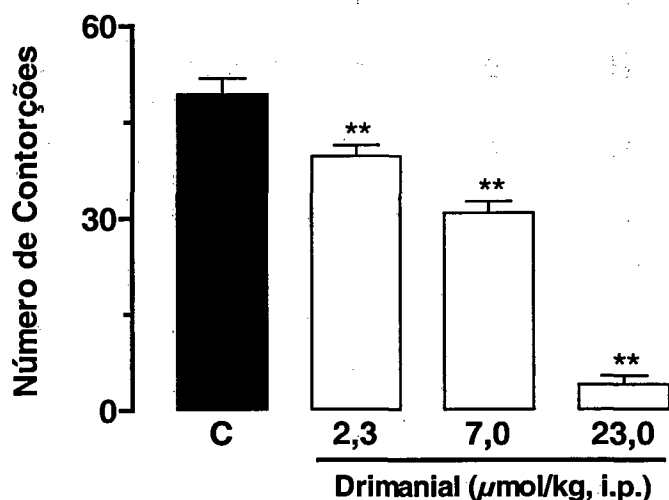


Figura 3 – Efeito do tratamento intraperitoneal (i.p.) com drimanial 30 min antes, sobre as contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético em camundongos. O número total de contorções foi medido durante os primeiros 20 min depois da injeção intraperitoneal de ácido acético. Cada grupo representa a média de 6 - 8 animais, e as linhas verticais os EPM. Difere significativamente dos grupos-controle, ** $P < 0,01$.

4.1.2. Nociceção induzida pela formalina

A fim de verificar a duração do efeito antinociceptivo do drimanial, quando administrado através da via i.p., e para determinar o tempo ideal de tratamento para a realização dos experimentos subseqüentes, um grupo de camundongos recebeu drimanial ($23,0 \mu\text{mol/kg}$) (10 mg/kg) e foi avaliado no modelo da formalina durante 6 h. Os resultados apresentados na Figura 4 mostram que a resposta antinociceptiva máxima do drimanial já foi observada a partir de 30 min após sua administração, sendo significativo até 2 h depois do tratamento.

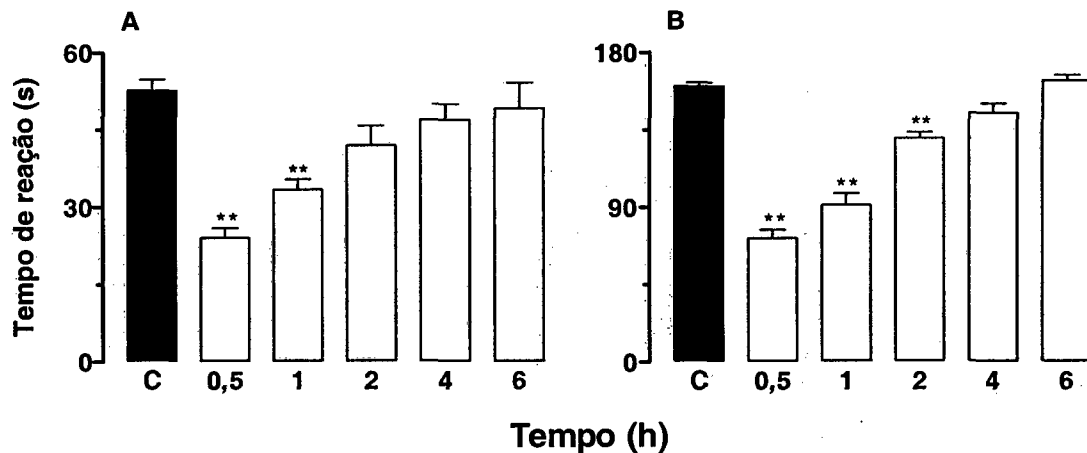


Figura 4 – Duração do efeito antinociceptivo do drimanial ($23,0 \mu\text{mol/kg}$) (10 mg/kg), quando administrado por via intraperitoneal (i.p.), em relação à primeira (A) e a segunda fase (B) da nociceção induzida pela injeção intraplantar de formalina (2,5% em $20 \mu\text{l}$) em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 – 8 animais e as linhas verticais os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle, ** $P < 0,01$.

Os resultados apresentados na Figura 5 mostram que o composto drimanial causou inibição significativa e dependente da dose, tanto na fase neurogênica (0 a 5 min) quanto na fase inflamatória (15 a 30 min) da nociceção induzida pela formalina. Essa atividade antinociceptiva foi observada quando o drimanial foi administrado por via i.p. ($7,0 - 70,3 \mu\text{mol/kg}$) ($3 - 30 \text{ mg/kg}$), 30 min antes, ou i.p., co-administrado com a formalina ($2,3 - 23,0 \text{ nmol/pata}$). Os valores

médios das DI_{50} s para a primeira fase, quando o drimanial foi administrado pelas vias i.p. e i.pl., foram 65,9 (60,6 – 71,6) $\mu\text{mol/kg}$ e 5,9 (4,2 – 8,4) $\mu\text{mol/pata}$, respectivamente. Para a segunda fase, os valores das DI_{50} s foram 46,5 (39,7 – 54,2) $\mu\text{mol/kg}$ e 5,4 (4,9 – 5,9) $\mu\text{mol/pata}$, respectivamente. As inibições observadas, em relação às respostas controle, foram $54 \pm 2\%$ e $58 \pm 4\%$ na primeira fase e $58 \pm 4\%$ e $60 \pm 1\%$, respectivamente (ver Tabela 2).

Administrado por via i.t. (2,3 – 23,0 nmol/sítio) ou i.c.v. (0,7 – 7,0 nmol/sítio) 10 min antes, o drimanial também produziu inibição significativa e dependente da dose de ambas as fases da nocicepção induzida pela formalina (Figura 5). Os valores médios das DI_{50} s (nmol/sítio) para a atividade do drimanial, administrado por via i.t., na primeira e segunda fase da nocicepção induzida pela formalina foram 18,7 (16,6 – 21,1) e 19,1 (17,3 – 21,1) nmol/sítio, respectivamente. As inibições observadas, em relação às respostas controle, foram $53 \pm 2\%$ e $49 \pm 3\%$ na primeira e segunda fase, respectivamente. Os valores médios das DI_{50} s (nmol/sítio) para a atividade do drimanial, administrado por via i.c.v., na primeira e segunda fase da nocicepção induzida pela formalina foram 0,9 (0,8 – 1,0) e 4,1 (3,8 – 4,4) nmol/sítio, respectivamente. As inibições observadas, em relação às respostas controle, foram 53 ± 3 e $73 \pm 7\%$ na primeira e segunda fase, respectivamente (Tabela 2).

Independente da via de administração, o drimanial não demonstrou efeito significativo sobre o edema de pata associado à fase inflamatória do teste da formalina (resultados não apresentados).

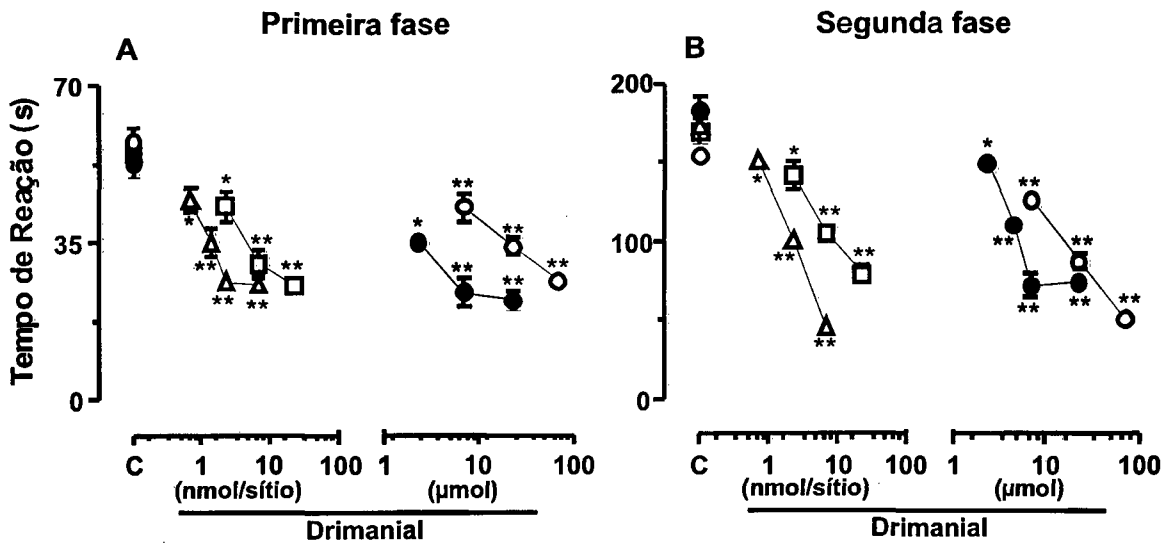


Figura 5 – Efeito antinociceptivo causado pelo drimianal, quando administrado por via i.p. (O, $\mu\text{mol/kg}$, 30 min antes), i.pl. (\bullet , $\mu\text{mol/pata}$, co-administrada), i.c.v. (Δ , nmol/sítio, 10 min antes) ou i.t. (\square , nmol/sítio, 10 min antes) em relação à primeira (A) e a segunda (B) fase da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina (2,5% em 20 μl) em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 – 12 animais e as linhas verticais os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle, * $P<0,05$ e ** $P<0,01$.

Tabela 2 – Comparação dos valores médios das DI_{50} s e inibições máximas observadas para a atividade antinociceptiva do drimianal administrado pelas vias i.p., i.pl., i.c.v. ou i.t., na nocicepção neurogênica (0-5 min) e inflamatória (15-30 min) induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos.

Via de administração	0 – 5 min (DI_{50}) ^a	I (%) ^b	15 – 30 min (DI_{50}) ^a	IM (%) ^b
i.p. ($\mu\text{mol/kg}$)	65,9 (60,6-71,6)	54,0 \pm 2,0	46,5 (39,7-54,2)	67,0 \pm 2,0
i.pl. ($\mu\text{mol/pata}$)	5,9 (4,2-8,4)	58,0 \pm 4,0	5,6 (4,9-6,3)	60,0 \pm 1,0
i.c.v. (nmol/sítio)	2,2 (2,1-2,3)	53,0 \pm 3,0	4,1 (3,8-4,4)	73,0 \pm 7,0
i.t. (nmol/sítio)	18,7 (16,6-21,1)	53,0 \pm 2,0	19,1 (17,3-21,1)	49,0 \pm 3,0

Cada grupo representa a média \pm E.P.M. de 6 a 10 animais. ^a DI_{50} s com seus respectivos limites de confiança de 95%, ^b inibições observadas.

O tratamento dos animais com drimanial ($23,0 \mu\text{mol/kg}$, i.p.) (10 mg/kg), 5 min após a injeção de formalina, causou inibição mais eficaz da segunda fase da nocicepção induzida por esse agente, do que quando administrado 30 min antes da injeção de formalina. As inibições observadas, em relação às respostas controle, foram $41 \pm 3\%$ e $84 \pm 3\%$ no tratamento antes e após a injeção de formalina, respectivamente (Figura 6).

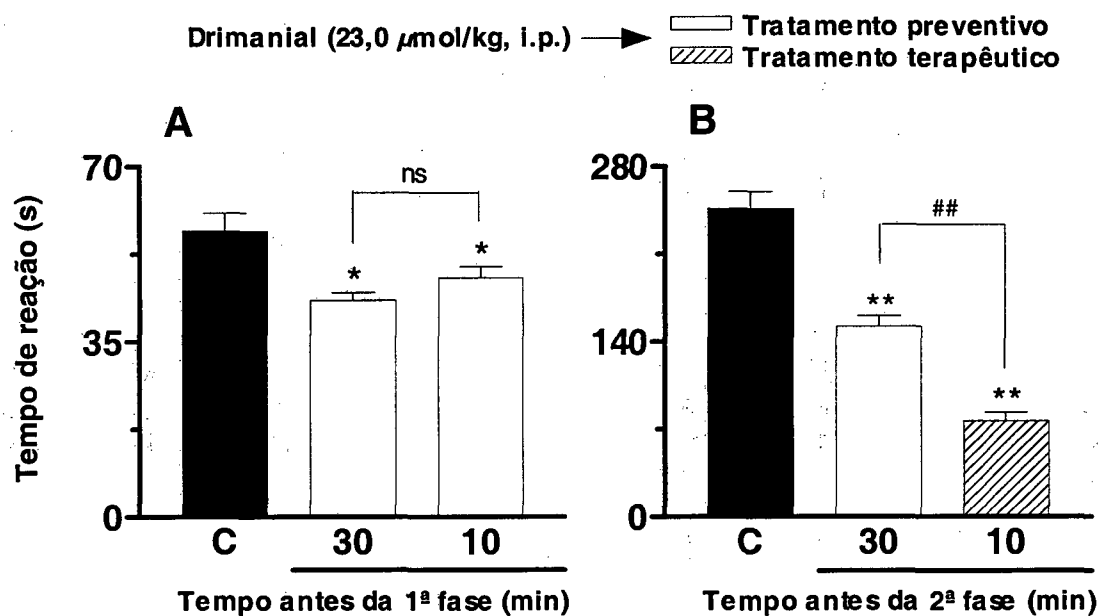


Figura 6 – Efeito antinociceptivo do drimanial ($23,0 \mu\text{mol/kg}$, i.p.) administrado 30 e 10 min antes da primeira (A) e da segunda (B) fase da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina (2,5% em $20 \mu\text{l}$) em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 – 10 animais e as linhas verticais os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e n.s. (não significante). ## $P < 0,01$ demonstra o nível de significância entre o grupo com tratamento terapêutico com drimanial em relação ao grupo com tratamento preventivo.

4.1.3. Nociceção induzida pela capsaicina

Os dados apresentados na Figura 7 demonstram que o drimanial, administrado através da via i.p. (7,0 - 70,3 $\mu\text{mol/kg}$, 30 min antes) (3 - 30 mg/kg), mostrou atividade antinociceptiva significativa e dependente da dose em camundongos quando avaliado no modelo da nociceção induzida pela capsaicina (1,6 μg em 20 μl). O valor médio calculado para a DI_{50} e seus respectivos limites de confiança foi de 35,4 (29,3 - 42,9) $\mu\text{mol/kg}$, com inibição (média \pm EPM) de $80 \pm 3\%$ na maior dose testada.

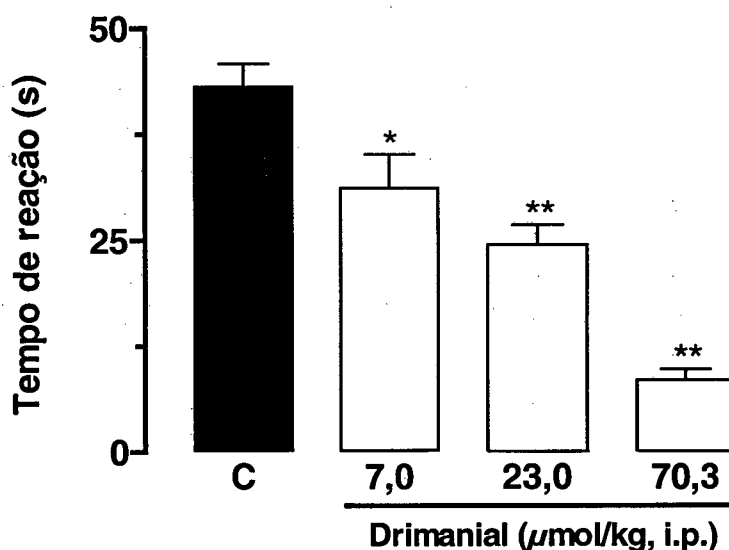


Figura 7 - Efeito antinociceptivo causado pelo drimanial, quando administrado intraperitonealmente 30 min antes, em relação a nociceção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina (1,6 μg em 20 μl) em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 - 10 animais e as linhas verticais os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle, * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

4.1.4. Nociceção induzida pelo glutamato

Os resultados da figura 8 demonstram que o composto drimanial administrado intraperitonealmente (2,3 – 23,0 $\mu\text{mol/kg}$, 30 min antes) (1 – 10 mg/kg), produziu inibição significativa e dependente da dose da nociceção induzida pela injeção intraplantar de glutamato (30 $\mu\text{mol/pata}$) em camundongos. O valor médio calculado para a DI_{50} e seus respectivos limites de confiança foi de 12,3 (10,1 - 15,0) $\mu\text{mol/kg}$, com inibição (média \pm EPM) de $75 \pm 3\%$ na maior dose testada.

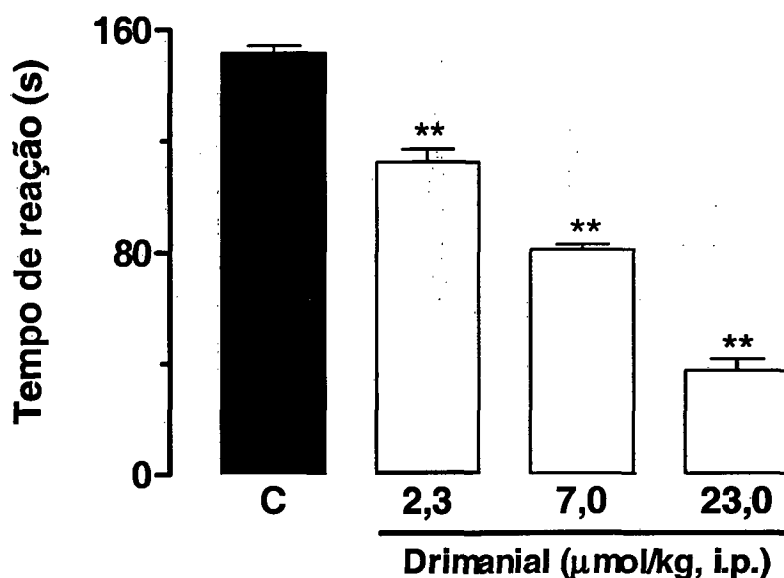


Figura 8 – Efeito do composto drimanial administrado por via intraperitoneal 30 min antes, em relação a nociceção induzida pela injeção intraplantar de glutamato (30 $\mu\text{mol/pata}$) em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 – 10 animais e as linhas verticais os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle, ** $P < 0,01$.

4.1.5. Nociceção induzida pelo PMA

Os resultados apresentados na figura 9 demonstram que o composto drimanial (7,0 a 70,3 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) (3 a 30 mg/kg), administrado 30 minutos antes, produziu inibição significativa e de forma dependente da dose da nociceção induzida pela injeção intraplantar de forbol miristato acetato (PMA, 30 ng/pata) em camundongos. O valor médio calculado para a DI_{50} e seus respectivos limites de confiança foi de 32,1 (27,9 - 36,8) $\mu\text{mol/kg}$, com inibição (média \pm EPM) de $96 \pm 1\%$ na maior dose testada.

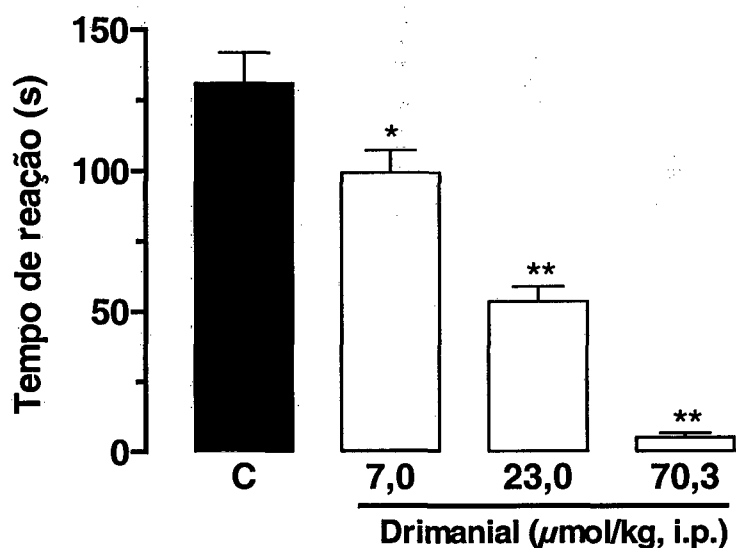


Figura 9 - Efeito do composto drimanial administrado por via intraperitoneal 30 min antes, em relação a nociceção induzida pela injeção intraplantar de forbol miristato acetato (30 ng/pata) em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 – 10 animais e as linhas verticais os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle, * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

4.1.6. Hiperálgia induzida pelo glutamato

O composto drimãnia, quando administrado por via i.p. (2,3 – 23,0 $\mu\text{mol/kg}$, 30 min antes) (1 – 10 mg/kg), reduziu, de maneira dependente da dose, a hiperálgia induzida pela injeção i.t. de glutamato (100 nmol/sítio) (Figura 10). O valor médio calculado para a DI_{50} e seus respectivos limites de confiança foi de 9,3 (7,6 - 11,2) $\mu\text{mol/kg}$, com inibição (média \pm EPM) de $52 \pm 1\%$.

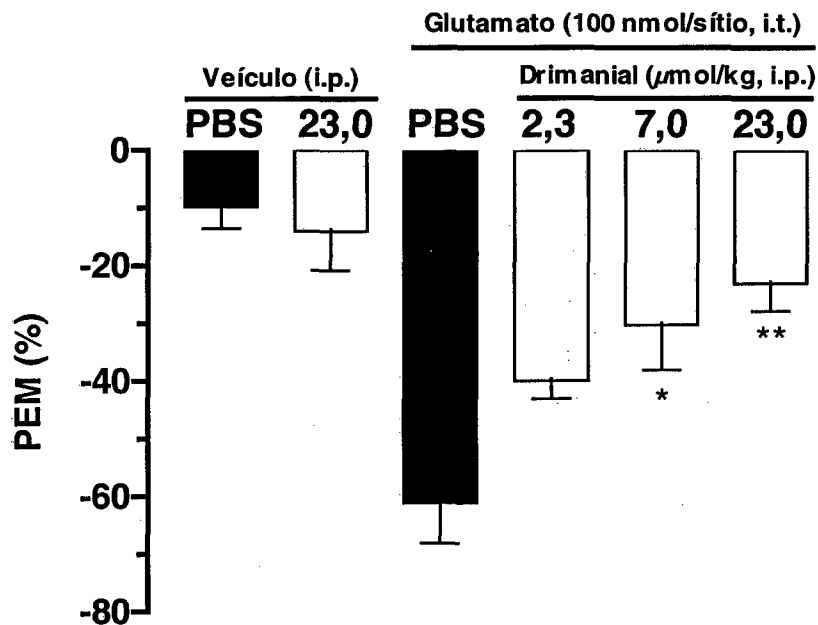


Figura 10 - Efeito do composto drimãnia, administrado por via intraperitoneal 30 min antes, em relação a hiperálgia induzida pela injeção intratecal de glutamato (100 nmol/sítio) em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 – 8 animais e as linhas verticais os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle, * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$. PEM (%), representa a percentagem do efeito máximo da hiperálgia.

4.1.7. Teste da placa quente e retirada da cauda

Os resultados da tabela 4 indicam que o tratamento dos animais com drimanial (23,0 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) (10 mg/kg), 30 min antes, não causou mudanças significativas no tempo de latência da resposta dos animais quando avaliado no testes da placa quente e no teste de retirada da cauda. Já o tratamento dos animais com morfina (26,6 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) (10 mg/kg), 30 min antes, causou marcado efeito analgésico em ambos os testes.

Tabela 4 – Efeito do tratamento com morfina (s.c.) ou com o composto drimanial (i.p.) no teste da placa quente e retirada da cauda em camundongos.

Tratamento	Dose ($\mu\text{mol/kg}$)	Placa-quente (s)	Retirada da cauda (s)
Controle	-	3,1 \pm 0,5	8,5 \pm 0,9
Drimanial	23,0	4,2 \pm 0,6	10,3 \pm 1,2
Morfina	26,6	23,9 \pm 1,5**	19,4 \pm 0,6**

Cada grupo representa a média de 6 - 8 animais.

Difere significativamente em relação ao grupo controle, **P < 0,01

4.1.8. Efeito sobre o desempenho motor (*rota-rod*)

O tratamento de camundongos com drimanial (23,0 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) (10 mg/kg), 30 min antes, não causou nenhum efeito significativo sobre o desempenho motor ou sobre o tempo de permanência dos animais no aparelho de *rota-rod*, quando comparado com o grupo controle (salina). O tempo de permanência dos animais tratados com drimanial ou com solução salina foi de 53, \pm 1,7 e 54,8 \pm 1,6, respectivamente.

4.1.9. Efeito sobre a mucosa gástrica

O tratamento dos animais com indometacina (83,8 $\mu\text{mol/kg}$) (30 mg/kg, i.p.) produziu intensas lesões na mucosa gástrica dos animais (Tabela 3, Figura 11A), 4 h após a sua administração. No entanto, o tratamento dos animais com o composto drimanial (30 mg/kg) ou com veículo, não produziu lesões na mucosa gástrica dos animais (Tabela 3, Figura 11B).

Tabela 3 – Efeito da administração do drimanial ou indometacina sobre a mucosa gástrica de ratos.

Amostra	Dose ($\mu\text{mol/kg}$, i.p.)	IU¹ média \pm EPM
Veículo	-	0
Indometacina (i.p.)	83,8	4,66 \pm 0,88**
Drimanial (i.p.)	70,3	0

n = 4 – 6 animais.

Difere significativamente em relação ao grupo controle **P < 0,01

¹ Índice de ulceração

A**B**

Figura 11 – Registro fotográfico mostrando os efeitos da indometacina (A), na dose de $83,8 \mu\text{mol/kg}$ (30 mg/kg, i.p.), ou drimanial (B), na dose de $70,3 \mu\text{mol/kg}$ (30 mg/kg, i.p.), sobre a mucosa gástrica de ratos.

4.2. Estudo do mecanismo de ação

4.2.1. Participação do sistema glutamatérgico na atividade antinociceptiva do drimanial no modelo do comportamento relacionado a nocicepção causada por aminoácidos excitatórios e substância P em camundongos

O composto drimanial, administrado pela via intraperitoneal ($70,3 \mu\text{mol/kg}$) (30 mg/kg), inibiu significativamente o comportamento relacionado a nocicepção induzido pelo glutamato e o composto *trans*-ACPD em camundongos, com inibições de $49 \pm 6\%$ e $93 \pm 2\%$, respectivamente (Figura 12). No entanto, na mesma dose, o composto drimanial não apresentou nenhum efeito significativo sobre a nocicepção induzida pelo NMDA, AMPA, cainato ou substância P (Figura 12). A morfina administrada pela via subcutânea ($13,3 \mu\text{mol/kg}$, 30 min antes) (5 mg/kg), inibiu significativamente a nocicepção induzida pelo glutamato, cainato, *trans*-ACPD e substância P. As inibições observadas foram 78 ± 2 , 55 ± 7 , 58 ± 2 e $81 \pm 5\%$, respectivamente (Figura 12). Contudo, assim como o drimanial, a morfina não apresentou efeito significativo sobre a nocicepção induzida pelo NMDA e AMPA em camundongos.

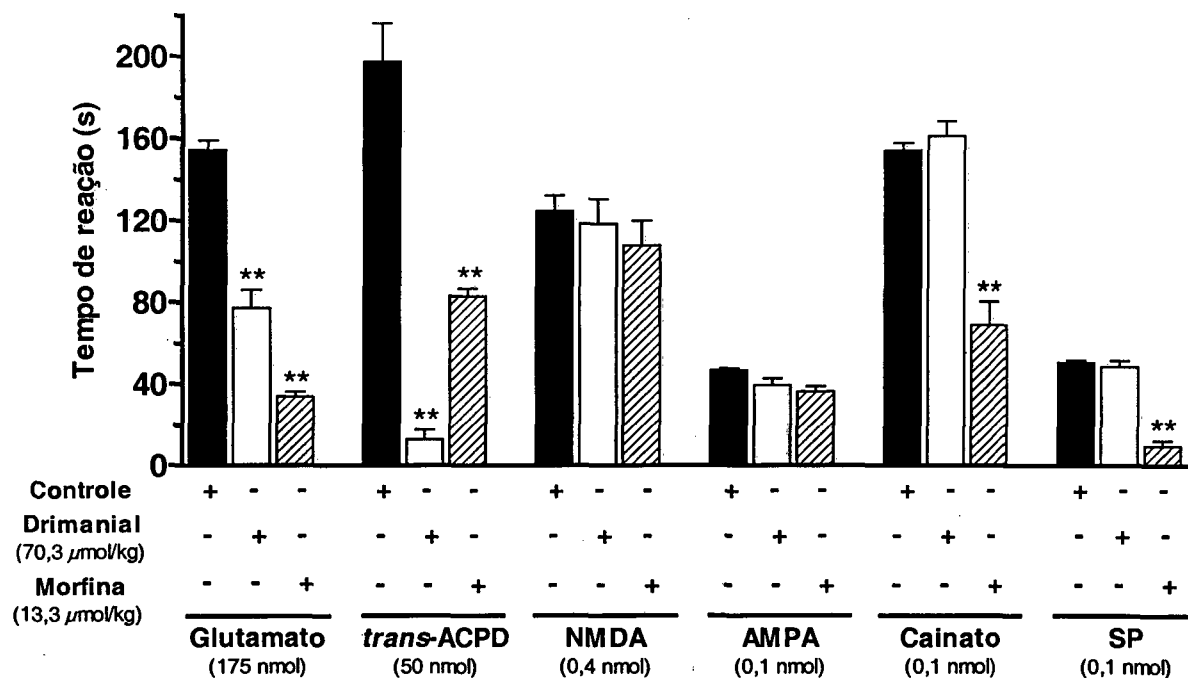


Figura 12 – Efeito do drimianal e da morfina, administrados 30 min antes, sobre o comportamento relacionado a nocicepção causado pela injeção intratecal de glutamato (175 nmol/sítio), *trans*-ACPD (50 nmol/sítio), NMDA (0,4 nmol/sítio), AMPA (0,1 nmol/sítio), cainato (0,1 nmol/sítio) e substância P (0,1 nmol/sítio) em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 – 10 animais e as linhas verticais os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle, **P<0,01.

Os resultados apresentados na Figura 13 demonstram que o composto drimanial (7,0 – 70,3 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) (3 – 30 mg/kg), inibiu de forma dependente da dose a nocicepção causada pela injeção intratecal de *trans*-ACPD (agonista metabotrópico). O valor médio calculado para a DI_{50} e seus respectivos limites de confiança foi de 23,2 (18,3 - 29,5) $\mu\text{mol/kg}$, com inibição (média \pm EPM) de $93 \pm 2\%$, respectivamente.

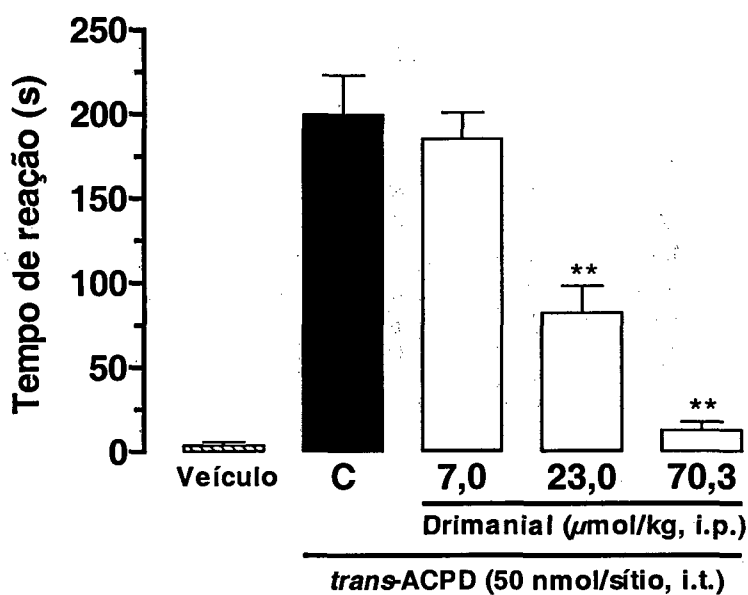


Figura 13 – Efeito dose-dependente do drimanial, 30 min antes, sobre o comportamento relacionado a nocicepção causado pela injeção intratecal de *trans*-ACPD (50 nmol/sítio) em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 – 10 animais e as linhas verticais os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle, ** $P < 0,01$.

4.2.2. Participação do sistema vanilóide na atividade antinociceptiva do drimantal no modelo da formalina

Os resultados apresentados na figura 14 demonstram que o pré-tratamento dos animais com capsazepina (antagonista competitivo de receptores vanilóides, 25 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) (9,4 mg/kg) causou reversão significativa do efeito antinociceptivo causado pelo drimantal (23,0 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) (10 mg/kg) ou capsaicina (16,3 $\mu\text{mol/kg}$, s.c., utilizada como controle positivo) (5 mg/kg), quando analisado na primeira fase da nocicepção induzida pela formalina.

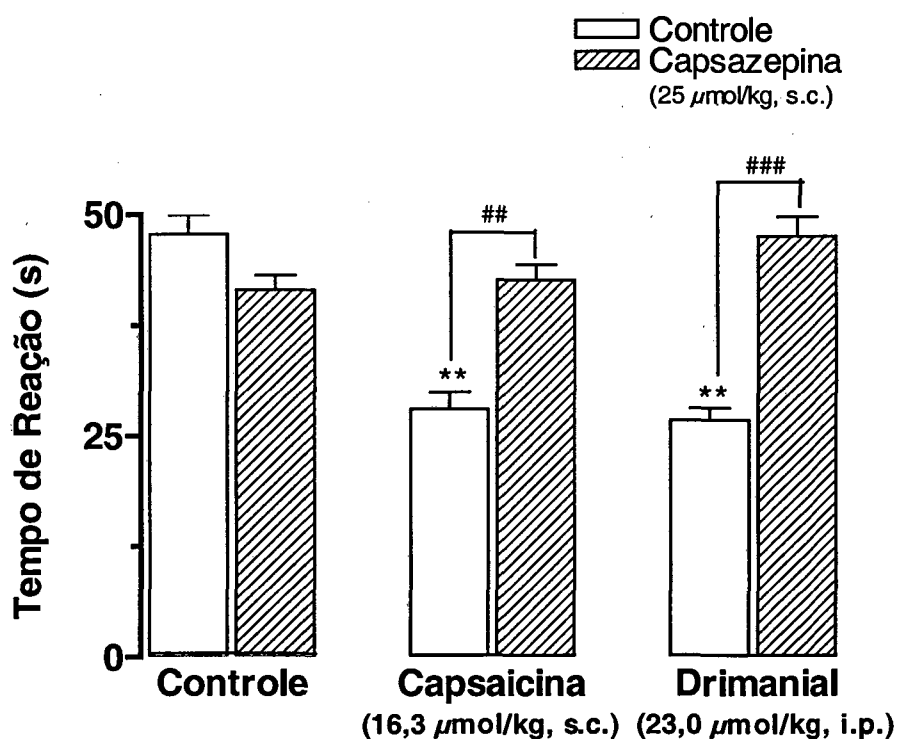


Figura 14 – Influência do pré-tratamento de camundongos com capsazepina (25 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) sobre o efeito antinociceptivo causado pelo drimantal (23,0 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) ou capsaicina (16,3 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) em relação à primeira fase da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina (2,5%). Cada grupo representa a média de 6 – 8 animais e as linhas verticais os E.P.M. Difere significativamente do respectivo grupo controle, ** $P < 0,01$, ## $P < 0,01$ e ### $P < 0,001$.

4.2.3. Participação do sistema vanilóide na variação da temperatura corporal causada pelo drimanial

Conforme ilustrado na figura 15, o pré-tratamento dos animais com capsazepina (um antagonista competitivo de receptores vanilóides, $25 \mu\text{mol/kg}$, s.c.) causou reversão significativa da hipotermia corporal causada pela capsaicina ($16,3 \mu\text{mol/kg}$, s.c., utilizada como controle positivo) (5mg/kg). No entanto, o pré-tratamento com capsazepina não alterou a hipotermia causada pelo drimanial ($23,0 \mu\text{mol/kg}$, i.p.) (10mg/kg), quando analisado na medida da temperatura retal de camundongos.

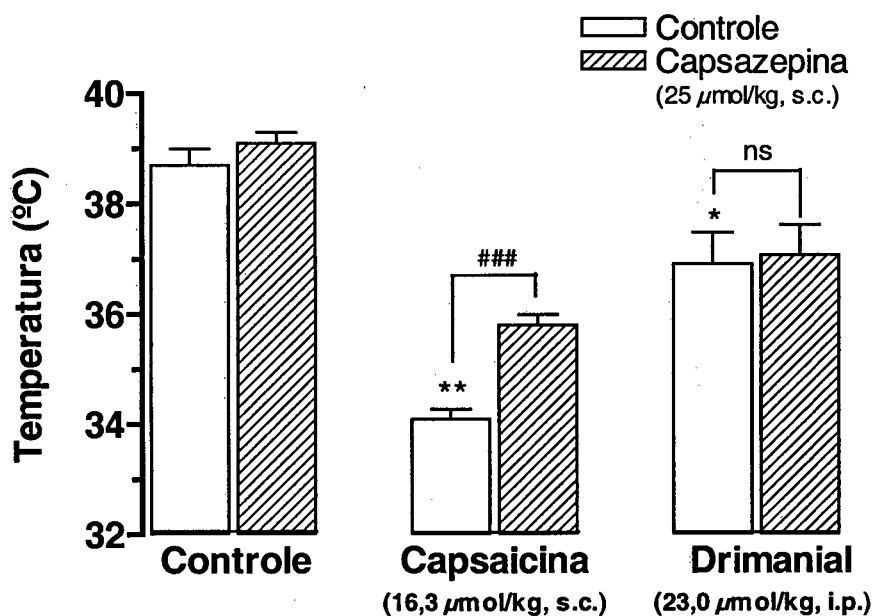


Figura 15 – Influência do pré-tratamento de camundongos com capsazepina ($25 \mu\text{mol/kg}$, s.c.) sobre a hipotermia corporal causada pelo drimanial ($23,0 \mu\text{mol/kg}$, i.p.) ou capsaicina ($16,3 \mu\text{mol/kg}$, s.c.) em relação à medida da temperatura retal de camundongos. Cada grupo representa a média de 6 – 8 animais e as linhas verticais os E.P.M. Difere significativamente do respectivo grupo controle, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e ### $P < 0,001$.

4.2.4. Efeito do tratamento neonatal de camundongos com capsaicina na atividade antinociceptiva do drimanial

O tratamento neonatal de camundongos com capsaicina (163,7 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) (50 mg/kg) causou uma redução significativa do efeito antinociceptivo causado pelo drimanial (23,0 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) (10 mg/kg) ou para a capsaicina (16,3 $\mu\text{mol/kg}$, s.c., utilizada como controle positivo) (5 mg/kg), administrados 30 min antes, quando analisado na primeira fase da nocicepção induzida pela formalina.

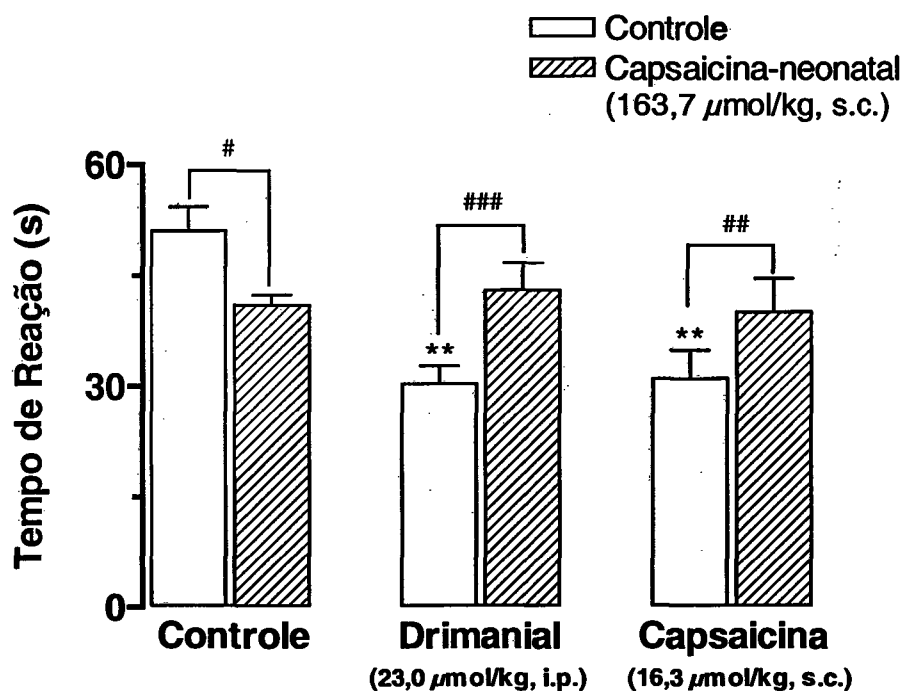


Figura 18 – Influência do tratamento neonatal de camundongos com capsaicina (163,7 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.), sobre o efeito antinociceptivo causado pelo drimanial ou pela capsaicina, administrados 30 min antes, em relação a primeira fase da nocicepção induzida pela formalina. Cada grupo representa a média de 8 -10 animais e as barras verticais os E.P.M. Difere significativamente do controle, ** $P < 0,01$, # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$ e ### $P < 0,001$.

4.2.5. Participação do sistema opióide na atividade antinociceptiva do drimaniai no modelo da formalina

O pré-tratamento dos animais com naloxona (antagonista não seletivo de receptores opióides, 13,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) (5 mg/kg) causou reversão completa do efeito antinociceptivo da morfina (agonista não seletivo de receptores opióides, 13,3 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) (5 mg/kg). No entanto, o pré-tratamento com naloxona não alterou a antinocicepção causada pelo drimaniai (70,3 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) (30 mg/kg), quando analisado em relação a nocicepção induzida pela formalina (Figura 16).

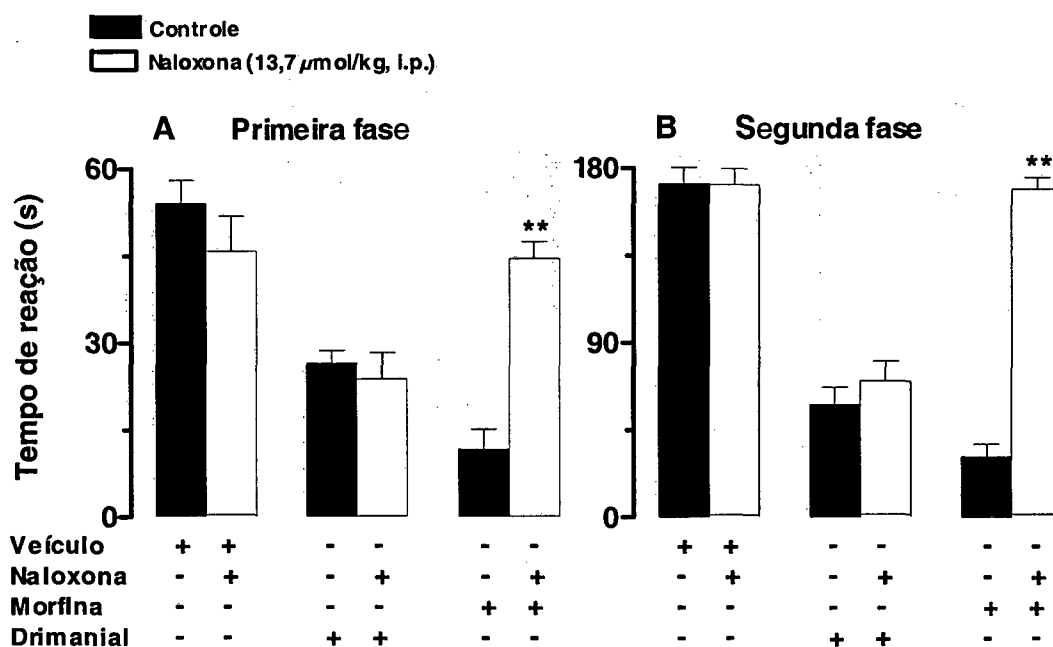


Figura 16 – Influência do pré-tratamento de camundongos com naloxona (13,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo causado pelo drimaniai (70,3 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) ou morfina (13,3 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) em relação à primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina (2,5% em 20 μl). Cada grupo representa a média de 6 – 8 animais e as linhas verticais os E.P.M. Difere significativamente do respectivo grupo controle, ** $P < 0,01$.

4.2.6. Participação do sistema serotoninérgico na atividade antinociceptiva do drimanial no modelo da formaiina

Os dados apresentados na figura 17 mostram que o tratamento dos animais durante 4 dias consecutivos com p-clorofenilalanina (PCPA, inibidor da síntese de serotonina, 399,8 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) (100 mg/kg), causou significativa reversão do efeito antinociceptivo da morfina (13,3 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) (5 mg/kg). No entanto, o pré-tratamento com PCPA não alterou a antinocicepção causada pelo drimanial (70,3 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) (30 mg/kg) quando analisado em relação a nocicepção induzida pela formaiina.

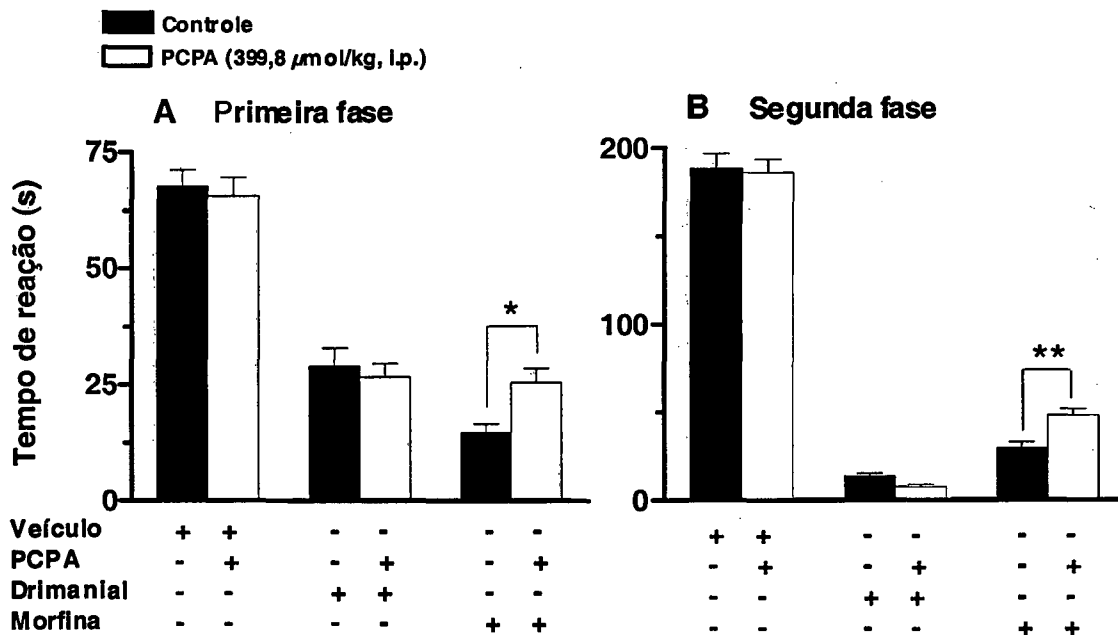


Figura 17 – Influência do pré-tratamento de camundongos com PCPA (399,8 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo causado pelo drimanial (70,3 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) ou morfina (13,3 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) em relação à primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formaiina (2,5% em 20 μl). Cada grupo representa a média de 6 – 10 animais e as linhas verticais os E.P.M. Difere significativamente do respectivo grupo controle, * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

4.3. Efeito do drimanial sobre a ligação específica (*binding*) de [³H]glutamato

Os resultados apresentados na figura 19 mostram que o drimanial (0,01 – 30,0 μ M) produziu inibição significativa da ligação específica (*binding*) do [³H]glutamato em membrana de córtex cerebral de camundongos. O valor médio calculado para a CI_{50} e seus respectivos limites de confiança foi de 4,39 (2,66–7,25) μ M, com inibição (média \pm EPM) de $87 \pm 7\%$ na concentração de 30 μ M de drimanial.

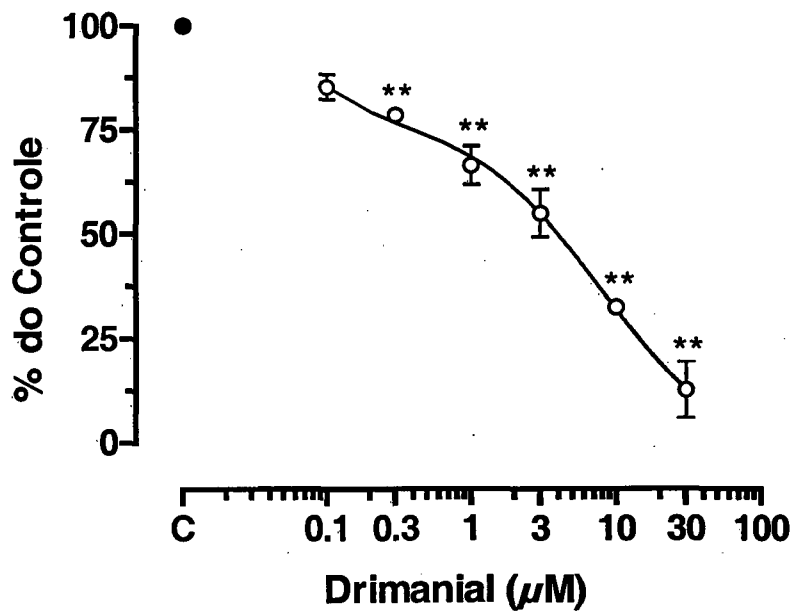


Figura 19 – Efeito do drimanial sobre a ligação específica (*binding*) de [³H]glutamato em membranas de córtex cerebral de camundongos. Cada símbolo representa a média de 3 experimentos independentes realizados em triplicata, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do controle (C), **P<0,01.

5. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que o sesquiterpeno drimânico, isolado das cascas da planta brasileira *Drimys winteri*, apresentou importante atividade antinociceptiva, quando administrado por via sistêmica, intraplantar, espinhal e supraespinhal em diferentes modelos de nocicepção em camundongos. Além disso, o drimânico apresentou marcante atividade anti-hiperalgésica quando avaliado na hiperalgesia induzida pela injeção intratecal de glutamato. Os experimentos realizados com agonistas e antagonistas seletivos, e com o auxílio da técnica de ligação específica sugerem que a antinocicepção causada pelo composto drimânico está provavelmente relacionada com uma interação do sistema glutamatérgico, mais especificamente via interação com receptores glutamatérgicos metabotrópicos.

Os resultados do presente estudo também indicam que os receptores vanilóides parecem contribuir para a atividade antinociceptiva do sesquiterpeno drimânico. Interessantes também são os resultados do presente estudo que indicam que o composto drimânico não apresentou atividade antinociceptiva quando avaliado em modelos de nocicepção térmica, como o teste da placa quente ou da retirada da cauda. Além disso, sua atividade antinociceptiva não foi revertida pelo pré-tratamento dos animais com naioxona (antagonista opióide não-seletivo) ou com PCPA (inibidor da síntese de serotonina). Dessa forma, a atividade antinociceptiva do composto drimânico não parece depender de sua interação direta ou indireta com os sistemas opióide e serotoninérgico. Estes resultados não só confirmam, mas também estendem os resultados anteriores descritos em nosso laboratório (TRATSK et al., 1997; MENDES et al., 1998, 2000; MALHEIROS et al., 2001), demonstrando que ambos os sesquiterpenos

presentes nas cascas da *D. winteri*, o poligodial e o drimanial contribuem de maneira importante para o uso desta planta na medicina popular.

Atualmente, o interesse para o uso clínico de novas substâncias com atividade analgésica utilizadas principalmente para o tratamento de vários tipos de dor (inclusive a dor de origem neurogênica), vem aumentando significativamente. Vários modelos de nocicepção em animais de laboratório podem ser utilizados para verificar a atividade analgésica de compostos. No entanto, de uma maneira geral, esses modelos possuem características próprias que devem ser consideradas, tais como sua simplicidade, reprodutibilidade e validade dos resultados obtidos e principalmente, a possibilidade de serem correlacionados com estudos clínicos.

Dentre os testes de nocicepção utilizados neste trabalho, o teste das contorções abdominais induzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético, é um modelo considerado com pouca especificidade, mas de observação inequívoca, relativamente simples, rápido e atua indiretamente causando a liberação de mediadores endógenos da dor como bradicinina, serotonina, histamina, aminas simpatomiméticas e prostaglandinas. Esse efeito nociceptivo pode ser facilmente prevenido por drogas antiinflamatórias não esteroidais, bem como por drogas semelhantes à morfina e outros analgésicos de ação central (WHITTLE, 1964; CHAU, 1989; VANE e BOTTING, 1995; SANTOS et al., 1998). Os resultados obtidos nesse modelo apresentam boa correlação com a potência das drogas analgésicas em outros modelos pré-clínicos (SIEGMUND et al., 1957a, b; TABER et al., 1964; BLUMBERG et al., 1965; BLANE, 1967). Utilizando esse teste, foi possível demonstrar que o drimanial, quando administrado por via i.p., produziu uma inibição quase que completa e de forma dependente da dose

das contorções abdominais provocadas pelo ácido acético. Comparado com o poligodial, o drimanial foi cerca de 3 vezes menos potente quando avaliado no modelo de dor causado pelo ácido acético. Porém o drimanial foi cerca de 5 e 12 vezes mais potente que o EH obtido das cascas da *D. winteri* e a aspirina, respectivamente neste modelo (VAZ et al., 1996; MENDES et al., 1998, 2000).

A atividade antinociceptiva do drimanial também foi confirmada pelo emprego do modelo de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos. Esse modelo de dor foi descrito por DUBUISSON e DENNIS (1977) em ratos e gatos, e vem, desde então, sendo sistematicamente empregado para o estudo de drogas analgésicas em roedores, especialmente em camundongos (ROSLAND, 1991; TJØLSEN et al., 1992). Esse modelo de nocicepção consiste na injeção intraplantar de solução de formaldeído na pata posterior do animal, a qual desencadeia um processo doloroso através da estimulação direta dos nociceptores, sendo caracterizada por vigorosas lambidas, mordidas e batidas na pata injetada com o irritante. A nocicepção causada pela injeção intraplantar de formalina apresenta duas fases distintas de nocicepção, que envolve diferentes mediadores químicos (DUBUISSON e DENNIS, 1977; HUNSKAAR et al., 1985; HUNSKAAR e HOLE, 1987; ROSLAND, 1991; CORRÊA e CALIXTO, 1993; SANTOS e CALIXTO, 1997). Este modelo de nocicepção é considerado, atualmente, o modelo que mais se aproxima da dor clínica (TJØLSEN e HOLE, 1997). A primeira fase da nocicepção, que inicia nos primeiros 5 min (fase neurogênica), caracterizada pela estimulação direta dos nociceptores presentes nas fibras aferentes do tipo C (DUBUISSON e DENNIS, 1977; HUNSKAAR et al., 1985) e, em parte, pelas fibras do tipo A δ (HEAPY et al., 1987), está associada à liberação de mediadores como o glutamato e a

substância P. A segunda fase da dor causada pela formalina conhecida como fase inflamatória ocorre entre 15 a 30 min após a injeção de formalina e está relacionada com a liberação de mediadores pró-inflamatórios como a adenosina, bradicinina, histamina, prostaglandinas e serotonina (HUNSKAAR e HOLE, 1987; SHIBATA et al., 1989; CORRÊA e CALIXTO, 1993; REEVE e DICKENSON, 1995).

Os resultados do presente estudo demonstram que, quando avaliado no teste da formalina, o pré-tratamento (via i.p., i.c.v. e i.t.) ou co-injeção (i.pl.) com o composto drimanial causou atividade antinociceptiva máxima em 30 min (referencial para os demais pré-tratamentos), sendo significativo em até 2 h após sua administração, em relação a segunda fase da dor induzida pela formalina. Quando comparado com o poligodial ou com drogas analgésicas utilizadas na clínica como os AINES (aspirina e dipirona) e a morfina, nesse mesmo modelo de dor, o drimanial, administrado sistemicamente, foi cerca de 3 a 6 vezes mais potente que a aspirina e a dipirona, porém, foi cerca de 2 vezes menos potente que o poligodial e 10 a 18 vezes menos potente que a morfina (VAZ et al., 1996; BEIRITH et al., 1998; MENDES et al., 2000). Além disso, nas maiores doses utilizadas, que apresentaram eficácia similar à dos AINES, o drimanial não apresentou efeitos colaterais como ulceração gástrica, um dos efeitos colaterais mais comuns provocados por esta classe de drogas, caso em que a supressão da síntese de prostaglandinas é um componente chave (VANE, 1971; ALLISON et al., 1992; WALLACE e TIGLEY, 1995; WALKER et al., 2001a).

Conforme resultados obtidos em relação ao edema de pata associado com a segunda fase da dor induzida pela formalina, o drimanial, nas mesmas doses as quais revelaram ações antinociceptivas, não foi capaz de interferir no edema de

pata associado à injeção intraplantar de formalina. As evidências experimentais demonstram que o edema de pata associado com a segunda fase da dor neste modelo, resulta da liberação de vários mediadores químicos, como as cininas, óxido nítrico e prostaglandina E₂ (YAMAMOTO e YAKSH, 1992; CODERRE e MELZACK, 1992; CORRÊA e CALIXTO, 1993; MALMBERG e YAKSH, 1995; CORRÊA et al., 1996), mas não de taquicininas (SANTOS e CALIXTO, 1997). É interessante ressaltar que, a exemplo do drimanial, antagonistas de receptores GluR_m5 (como o MPEP), também inibem seletivamente a dor, mas não o edema de pata associado pela formalina (WALKER et al., 2001a, b). Tais observações sugerem que, embora o glutamato apresente um papel importante na sensibilização dos neurônios primários aferentes durante a dor inflamatória, ele aparentemente tem um papel menor na formação do edema.

Em outra série de experimentos, demonstramos que a administração do drimanial, 5 min após a injeção de formalina, causou uma pronunciada inibição da segunda fase da dor induzida por este agente, sendo significativamente mais eficaz quando comparado com experimentos similares quando o drimanial foi administrado 30 min antes da injeção de formalina. Esses resultados são interessantes pelo fato de que o composto drimanial possui atividade antinociceptiva não somente profilática (redução da nocicepção pelo pré-tratamento), mas também terapêutica (sendo efetivo também após a nocicepção estar instalada). Os dados disponíveis na literatura têm demonstrado que comportamentos nociceptivos persistentes induzidos pela formalina podem ser prevenidos pelo pré-tratamento (por via intratecal) com lidocaína, sugerindo que a nocicepção na segunda fase do teste da formalina parece envolver um aumento da hiperexcitabilidade central gerada durante a primeira fase. Por outro lado, a

injeção intratecal de lidocaína após o aparecimento da primeira fase da dor induzida pela formalina, não foi capaz de reduzir as respostas nociceptivas da segunda fase desse modelo (YASHPAL et al., 1998).

Neste sentido, outra importante descoberta foi a demonstração de que antagonistas GluR_{m5} e GluR_{m1} são efetivos em reduzir a hipersensibilidade nociceptiva em camundongos e ratos, quando o processo inflamatório já está estabelecido. Esse fato é relevante, considerando a sua aplicabilidade clínica para o tratamento da dor neuropática ou inflamatória, como a artrite (CATERINA et al., 1997; GOLD et al., 1998). No entanto, a administração de antagonistas ionotrópicos NMDA (MK-801) e não-NMDA (CNQX), 5 min após a injeção da formalina, falhou em reduzir a dor da segunda fase desse modelo (MALMBERG e YAKSH, 1992; DAVIDSON et al., 1997).

No modelo da formalina, até o presente momento, os resultados apresentados são bastante relevantes e sugerem que o drimanial pode apresentar potencial interesse para o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da dor inflamatória. Essa observação baseia-se na sua versatilidade em inibir, tanto preventivamente quanto terapêuticamente, a dor induzida pela formalina, além de apresentar significativa atividade antinociceptiva quando administrado por diferentes vias.

Atualmente, está bem estabelecido que dentre os diversos neurotransmissores que estão envolvidos nos modelos de dor acima citados, os aminoácidos excitatórios (glutamato e aspartato) e a substância P apresentam papel relevante no processo de sensibilização do corno dorsal da medula espinhal, uma vez que a estimulação das fibras aferentes primárias induz a liberação desses transmissores nesse local (GO e YAKSH, 1987; SKILLING et al.,

1988; SORKIN et al., 1992). Estudos recentes demonstram que a substância P e os aminoácidos excitatórios encontram-se co-localizados nas fibras aferentes nociceptivas (BATTAGLIA e RUSTIONI, 1988; DEBIASI e RUSKTONI, 1988), e seus efeitos são revertidos pelo pré-tratamento ou co-injeção de antagonistas da substância P e/ou de glutamato (DICKENSON e SULLIVAN, 1987a, b; CODERRE e MELZACK, 1991; WOOLF e THOMPSON, 1991; MALMBERG e YAKSH, 1992; MAO et al., 1992; REN et al., 1992; YAMAMOTO e YAKSH, 1992). Periféricamente, tem-se demonstrado um papel fisiológico importante do glutamato. A injeção Intraplantar desse transmissor causa um aumento da sensibilidade térmica e mecânica em ratos e camundongos, e formação do edema associado com a nocicepção em camundongos (CARLTON et al., 1995; JACKSON et al., 1995; BHAVE et al., 2001; BEIRITH et al., 2002).

Diversos trabalhos têm demonstrado que existe uma intensa liberação de aminoácidos excitatórios na medula espinhal, principalmente glutamato e aspartato, após a injeção Intraplantar de formalina (OMOTE et al., 1998; MALMBERG e YAKSHM 1995; TEOH et al., 1996), capsaicina (SAKURADA et al., 1996; TEOH et al., 1996; JURÁNEK e LEMBECK, 1997) ou substância P (JURÁNEK e LEMBECK, 1997). Outros estudos mostram que os aminoácidos excitatórios promovem um comportamento nociceptivo quando injetados por via intraplantar ou intratecal (AANONSEN e WILCOX, 1987; JACKSON et al., 1995; SAKURADA et al., 1996; ZHOU et al., 1996, LIU et al., 1997). O glutamato injetado intraplantarmente, em camundongos, induz um comportamento de nocicepção semelhante ao provocado pela formalina e pela capsaicina (BEIRITH et al., 2002), enquanto que quando injetado intratecalmente causa hiperalgesia térmica em ratos e camundongos (AANONSEN e WILCOX, 1987; FERREIRA et

al., 1999). Levando-se em consideração estes relatos, avaliamos o efeito do drimanial na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato e na hiperalgesia induzida pela injeção intratecal de glutamato, em camundongos. Administrado através da via sistêmica, o drimanial foi capaz de inibir de maneira dependente da dose, tanto a nocicepção quanto a hiperalgesia causadas pelo glutamato. Estes resultados fornecem indícios sobre a possibilidade de seu mecanismo de ação estar relacionado, pelo menos em parte, com os aminoácidos excitatórios.

A fim de obter informações adicionais sobre a possibilidade dos aminoácidos excitatórios e/ou da substância P estarem envolvidos no mecanismo antinociceptivo do composto drimanial, a atividade antinociceptiva do drimanial foi avaliada sobre o comportamento nociceptivo causado pelos AAE e SP, quando administrados intratecalmente em camundongos. Como mostrado na literatura, a injeção intratecal de SP (SAKURADA et al., 1990), *trans*-ACPD (BOXALL et al., 1998), AMPA (BJORKMAN et al., 1994; BRAMBILLA et al., 1996), glutamato, cainato ou NMDA (URCA e RAIGORODSKY, 1988; BJORKMAN et al., 1994), causa reação comportamental de nocicepção dirigida à região caudal. Esta reação nociceptiva é definida como um único movimento de cabeça direcionada à parte posterior do corpo mordendo ou lambendo os membros posteriores (patas posteriores, cauda e abdômen), que resulta em contato do focinho do animal com o membro alvo. Utilizando este modelo, o composto drimanial, administrado sistemicamente, inibiu marcadamente a resposta nociceptiva comportamental induzida pela injeção intratecal tanto do glutamato quanto do *trans*-ACPD (agonista metabotrópico glutamatérgico). Por outro lado, o drimanial não foi capaz de inibir a resposta nociceptiva comportamental induzida pela injeção intratecal de

NMDA, AMPA, cainato ou por substância P. Estes resultados sugerem que a ação antinociceptiva sistêmica produzida pelo drimanial depende, pelo menos em parte, de uma interação com receptores metabotrópicos glutamatérgicos sensíveis ao agonista *trans*-ACPD. Por outro lado, a morfina também inibiu significativamente a resposta nociceptiva comportamental induzida pela injeção intratecal de cainato ou substância P, além da induzida pelo glutamato e *trans*-ACPD.

Recentemente, tem se destacado a importância dos GluR_ms em neurônios sensoriais periféricos na modulação da transmissão nociceptiva (DOGRUL et al., 2000; BHAVE et al., 2001; WALKER et al., 2001a). Trabalhos utilizando uma combinação de estudos anatômicos, de farmacologia comportamental e de eletrofisiologia tem demonstrado um papel particularmente importante para os GluR_ms, principalmente dos subtipos 1 e 5, em modelos de dor crônica. A expressão do GluR_m 5 em neurônios sensoriais foi sugerido há poucos anos atrás (VALERIO et al., 1997; CRAWFORD et al., 1997). Naquele período, acreditava-se que os GluR_ms expressos no gânglio da raiz dorsal (GRD) eram destinados a terminais centrais na medula espinhal, onde funcionariam como autoreceptores, como demonstrado em outras regiões do cérebro (GEREAU e CONN, 1995; MANZONI e BOCKAERT, 1995). Contudo, estudos utilizando microscopia eletrônica demonstraram que os receptores GluR_m 1 e GluR_m 5 são expressos constitutivamente, em torno de 9% e 16%, respectivamente, em um subconjunto de terminais de neurônios predominantemente nociceptivos (axônios não mielinizados) presentes na junção dermo-epidérmica da pata posterior de camundongos (BHAVE et al., 2001). Baseados na demonstração da expressão periférica do grupo i de GluR_ms, vários experimentos realizados permitem

demonstrar claramente que a ativação direta destes receptores, nesses terminais periféricos leva a um aumento da sensibilidade ao estímulo térmico e mecânico (WALKER et al., 2001a; 2001b). Associado aos dados de que o glutamato, liberado em resposta a inflamação periférica, pode alterar o padrão da expressão do GluR_m 5 no GRD, foi possível postular de que os GluR_ms podem ser transportados e expressos nos terminais periféricos dos neurônios sensoriais, e desta forma mediar a hiperalgesia inflamatória. Resultados recentes indicam que a ativação do GluR_m1 ou GluR_m5 nos terminais periféricos dos neurônios sensoriais produz aumento da sensibilidade nociceptiva em ratos e camundongos, causando reações comportamentais relacionadas à dor além de aumentar de forma dependente da dose a nocicepção presente na segunda fase da formalina (FISHER e CODERRE, 1996). Além disso, o grupo I de GluR_ms parece ser ativado na dor inflamatória e neuropática, e antagonistas dos GluR_m 1 e 5 reduzem a hiperalgesia associada a inflamação periférica e lesão neuronal (WALKER et al., 2001a, b).

Outros estudos com o uso de antagonistas glutamatérgicos metabotrópicos demonstram que o pré-tratamento ou a co-injeção de antagonistas de receptores GluR_ms do grupo I previne o desenvolvimento da dor comportamental espontânea e a hipersensibilidade inflamatória induzida pela injeção intraplantar de formalina e carragenina, respectivamente (JACKSON et al., 1995; FISHER e CODERRE, 1996; DAVIDSON et al., 1997; LAWAND et al., 1997; BHAVE et al., 2001; WALKER et al., 2001a).

Dentre os receptores de glutamato, o grupo I dos GluR_ms podem constituir alvo periférico importante (KARIM et al., 2001), tendo em vista que o uso de antagonistas deste grupo de receptores, principalmente aos do subtipo GluR_m5.

Além de prevenir ou reduzir a hiperalgesia estabelecida com eficácia similar às dos AINES e da morfina, estes antagonistas não causam efeitos colaterais centrais como sedação ou distúrbio locomotor, freqüentemente observados com os antagonistas de receptores NMDA (ionotrópicos) e pelos analgésicos opióides potentes como a morfina. Além disso, também não provocam o aparecimento de ulceração gástrica produzida por muitos dos AINES utilizados na clínica para o tratamento da dor inflamatória (VANE, 1971; ALLISON et al., 1992; CARTER, 1994; WALLACE e TIGLEY, 1995; WALKER et al., 2001a). Os nossos resultados também demonstram que o composto drimanial, nas maiores doses utilizadas para causar uma atividade antinociceptiva significativa, não causou efeitos inespecíficos, como a diminuição do desempenho motor, avaliada no teste de *rota-rod*.

Para investigar a existência de uma possível interação entre o composto drimanial e receptores glutamatérgicos, sua ação sobre sítios de ligação do [³H]glutamato foi avaliada utilizando-se a técnica de ligação específica (*binding*). Esta técnica permite verificar, *in vitro*, se uma substância (neurotransmissores, mediadores, compostos e outros) colocada neste sistema pode competir com o radioligante (ligante seletivo marcado radioativamente) pela ligação em sítios específicos em receptores. Neste sentido, poderíamos confirmar se a atividade antinociceptiva causada pelo drimanial poderia estar relacionada a uma interação com receptores glutamatérgicos, utilizando a técnica da ligação específica do [³H]glutamato em sítios de membranas de córtex cerebral de camundongos. De fato, os nossos resultados demonstram que o drimanial causou uma inibição significativa e dependente da concentração sobre a ligação específica do [³H]glutamato em sítios de membranas de córtex de camundongos. Tais

resultados sugerem que os receptores glutamatérgicos parecem estar envolvidos em seu mecanismo de ação.

A ativação dos receptores dos AAEs levam a formação ou ativação de vários sistemas de mensageiros intracelulares. Os receptores NMDA e GluR_ms ativam diferentes mensageiros e sinais intracelulares, porém têm sido demonstrado que ambos ativam a proteína quinase C (PKC) (YASHPAL et al., 2001). Recentes evidências sugerem que a PKC, ativada por forbol éster, sensibiliza e regula as funções dos nociceptores (NISHIZUKA, 1992; CESARE e MCNAUGHTON, 1996). A estimulação espinal da PKC pelo forbol éster (PMA) ou por um ativador seletivo produz aumento da nocicepção induzida pela formalina em ratos, principalmente com relação à segunda fase deste teste (MALMBERG et al., 1997), enquanto que os inibidores seletivos de PKC reduzem esta resposta nociceptiva da formalina (CODERRE, 1992; YASHPAL et al., 1995). Além disso, a aplicação intraplantar de PMA em ratos, evoca um comportamento nociceptivo semelhante ao produzido pela formalina e pela capsaicina (TANIGUCHI, et al., 1997). Neste sentido, verificou-se no presente estudo que o composto drimanial inibiu significativamente e de forma dependente da dose a nocicepção induzida pelo PMA em camundongos, sugerindo que a inibição de vias sensíveis a PKC parece estar implicado na sua atividade antinociceptiva.

Outra classe de receptores que são expressos em axônios cutâneos, co-localizados com o receptor GluR_ms e que vêm despertando o interesse como alvo para o desenvolvimento de novas drogas, são os receptores vanilóides (VR1), ativados pela capsaicina, prótons e outros compostos vanilóides (CALIXTO et al., 2001; JULIUS e BASBAUM, 2001; KARIM et al., 2001; WALKER et al., 2001b). Recentemente, o receptor para capsaicina foi clonado e caracterizado como

sendo um canal catiônico não-seletivo, que permite o influxo de cátions, levando a despolarização da membrana (BEVAN e SZOLCSÁNYI, 1990; CATERINA et al., 1997, 2000), propiciando a geração de um potencial de ação (BEVAN e DOCHERTY, 1993), o qual propaga-se até o SNC através dos neurônios sensíveis a capsaicina, resultando numa sensação de ardência ou dor (HOLZER, 1991).

A capsaicina ativa uma distinta subpopulação de neurônios primários sensoriais, com corpos celulares na raiz dorsal, gânglios nodosos e trigeminal. Esses neurônios transmitem a informação nociceptiva para o SNC, enquanto que suas terminações periféricas são sítios de liberação de neuropeptídeos pró-inflamatórios. A susceptibilidade à capsaicina distingue estes neurônios de outros neurônios aferentes primários (HOLZER, 1991; SZALLASI e BLUMBERG, 1996).

Em 1992, SAKURADA e colaboradores demonstraram que a injeção intraplantar de capsaicina na pata posterior de camundongos causa dor intensa, caracterizada por mordidas e lambidas na pata injetada, sendo relacionada com a dor de origem neurogênica (SAKURADA et al., 1993; SANTOS e CALIXTO, 1997). Assim como a formalina, a nocicepção causada pela capsaicina representa um modelo experimental interessante para o estudo de drogas antinociceptivas que atuam na dor de origem neurogênica (SAKURADA et al., 1992; 1993) e permite evidenciar a participação de vários mediadores químicos liberados pela estimulação de ambas as substâncias irritantes (formalina e capsaicina) tais como AAE, substância P, cininas, CGRP, PGE₂ e NO, que participam do processo doloroso (CODERRE e MELZACK, 1992; SAKURADA et al., 1992; CORRÊA et al., 1996; SANTOS e CALIXTO, 1997; WU et al., 1998).

O composto drimanial, avaliado frente a este modelo, causou potente efeito antinociceptivo quando administrado sistemicamente, sendo cerca de 6 vezes mais potente que a dipirona, porém, foi cerca de 9 a 14 vezes menos potente que o poligodial e a morfina, respectivamente (VAZ et al., 1996; BEIRITH et al., 1998; MENDES et al., 2000).

Além de causar uma irritação inicial violenta, a aplicação de capsaicina em humanos e animais (JANCSÓ, 1955; SZALLASI e BLUMBERG, 1999b) causa insensibilidade a estímulo nocivo posterior. Este processo de dessensibilização permanece por semanas ou meses após a administração sistêmica de capsaicina. Quando esta administração sistêmica é realizada em animais neonatos, observa-se uma insensibilidade ainda mais duradoura, acompanhada pela destruição de um grupo particular de neurônios aferentes primários de pequeno diâmetro (efeito neurotóxico), conhecidos como neurônios sensíveis a capsaicina (JANCSÓ et al., 1977). A degeneração causada pela capsaicina representa uma perda em torno de 84% da população de fibras C não-mielinizadas e de 25% de fibras A δ mielinizadas desses neurônios (HOLZER, 1991). Além disso, este tratamento causa depleção de neuropeptídeos como SP e CGRP nos terminais de fibras aferentes primárias do corno dorsal, diminuindo a sensibilidade a estímulos nocivos, resultando em um significativo efeito antinociceptivo nestes animais, quando avaliados posteriormente em modelos de nocicepção térmica e química (GAMSE, 1982; BUCK e BURKS, 1986; HOLZER, 1991). De fato, tem-se demonstrado que a degeneração de fibras C produzida pelo tratamento neonatal de camundongos com capsaicina causa uma redução significativa da primeira fase da nocicepção induzida pela formalina (FERREIRA et al., 1999).

Da mesma forma, a administração sistêmica aguda de capsaicina produz antinocicepção em vários modelos nociceptivos químicos, térmicos e mecânicos (HAYES e TYERS, 1980; HAYES et al., 1984; CAMPBELL et al., 1989; DICKENSON et al., 1990a). No entanto, o mecanismo responsável por este efeito ainda permanece obscuro. Estudos recentes indicam que os terminais sensoriais nervosos existentes na medula espinhal são importantes para a ação antinociceptiva produzida pela capsaicina ou outros compostos que podem estar interagindo com este sistema (DICKENSON et al., 1990a, b; JULIUS e BASBAUM, 2001).

Os resultados obtidos demonstram uma redução da eficácia antinociceptiva do drimanial em animais tratados no período neonatal com capsaicina, sugerindo que seu efeito antinociceptivo envolva a participação das fibras C. Estes resultados são relevantes e têm sido sustentados pela literatura, uma vez que compostos vanilóides, assim como a própria capsaicina, apresentam atividade antinociceptiva em uma variedade de testes (BRAND et al., 1987; DYKSTRA et al., 1987; COHEN e PERL, 1988; SIETSEMA et al., 1988; JANUSZ et al., 1993), sendo considerados como candidatos a uma nova classe de agentes antinociceptivos (HAYES e TYERS, 1980; HAYES et al., 1984; CAMPBELL et al., 1989; DRAY et al., 1990).

Várias evidências indicam que a relação estrutura-atividade requerida dos análogos da capsaicina para promover excitação ou inibição neuronal, são diferentes (para revisão ver: SZALLASI e BLUMBERG, 1999). Os primeiros estudos que sugeriram tal separação, foram descritos por SZOLCSANYI e JANCSÓ-GÁBOR (1975), demonstrando que análogos da capsaicina que possuem cadeias longas, apresentam atividade analgésica e dessensibilizante,

sem causar pungência. BRAND e colaboradores (1987) estenderam este estudo e produziram o composto olvanil, relativamente não-pungente, mas com significativa atividade analgésica (BRAND et al., 1987). Terapeuticamente, parece importante que análogos da capsaicina que apresentem ação antinociceptiva e não apresentem pungência numa variedade de situações dolorosas, especialmente nas condições persistentes de dor (DRAY e DICKENSON, 1991).

Estudos recentes têm demonstrado que o efeito antinociceptivo sistêmico causado pela capsaicina ocorre devido a uma interação específica com os receptores vanilóides presentes na medula espinhal. Estes resultados foram obtidos com uso da capsazepina, um antagonista sintético seletivo e competitivo para os efeitos causados pela capsaicina ou seus análogos (DICKENSON e DRAY, 1991; URBAN e DRAY, 1991; OHKUBO e SHIBATA, 1997). Dessa forma, utilizamos este antagonista para obter informações adicionais sobre o possível envolvimento dos receptores vanilóides na atividade antinociceptiva do drimanial. Os resultados do presente estudo demonstram claramente que o pré-tratamento dos animais com capsazepina foi capaz de reverter, de forma significativa, a atividade antinociceptiva produzida pelo drimanial ou pela capsaicina frente a nocicepção induzida pela formalina. Estes resultados trazem informações adicionais sugerindo que o composto drimanial pode atuar semelhantemente à capsaicina, através de uma interação com os receptores vanilóides (VR1).

Recentemente, tem sido demonstrado que vários terpenóides, pungentes ou não-pungentes, contendo grupamento funcional 1,4-dialdeído α,β -insaturado (3-formil, 3-butanal) foram isolados de diversas fontes naturais, incluindo plantas, algas, esponjas, moluscos, insetos e fungos (JONASSOHN e STERNER, 1997). Alguns destes compostos têm a habilidade de interagir com receptores vanilóides

(para revisão ver: STERNER e SZALLASI, 1999; SZALLASI e BLUMBERG, 1999b; SZALLASI e DI MARZO, 2000; CALIXTO et al., 2001) e dessa forma podem constituir protótipos para o desenvolvimento de novas drogas terapêuticas (STERNER e SZALLASI, 1999). O composto poligodíal, presente nas cascas da *D. winteri*, apesar de não apresentar uma estrutura química semelhante a capsaicina, é bastante semelhante aos dialdeídos presentes na natureza e suas várias ações parecem ser idênticas as apresentadas pelos vanilóides. SZALLASI e colaboradores (1996), demonstraram uma importante correlação entre a pungência apresentada pelo poligodíal com sua habilidade para inibir a ligação específica de [³H]RTX em membranas do corno da medula espinhal de ratos, reforçando assim a hipótese de que o poligodíal poderia estar atuando através da ativação do receptor vanilóide. Neste sentido, outros estudos devem ser realizados, a fim de obter dados mais conclusivos sobre a interação do composto drimanial com receptores vanilóides.

Além do efeito antinociceptivo, a administração sistêmica de capsaicina causa uma rápida redução (em torno de 6 °C) da temperatura retal de camundongos (JANCSÓ, 1955; JANCSÓ-GÁBOR et al., 1970; CATERINA et al., 2000). A redução da temperatura produzida pela capsaicina tem sido atribuída a um efeito central termo-regulatório em vários espécimes animais (HORI, 1984). Este efeito é resultado de sua ação em neurônios termo-regulatórios hipotalâmicos, causando vasodilatação cutânea e hipersalivação nestes animais (JANCSÓ-GÁBOR et al., 1970; SZOLCSÁNYI e JANCSÓ-GÁBOR, 1975; SASAMURA e KURAISHI, 1999; CATERINA et al., 2000). Esse decréscimo na temperatura não foi observado em animais nocautes para os receptores vanilóides, sugerindo que esse receptor é necessários para o efeito hipotérmico

de compostos vanilóides (CATERINA et al., 2000). Neste sentido, através da medida da temperatura retal de camundongos, foi verificado que o composto drimanial administrado sistemicamente produziu pequena, mas significativa, hipotermia medida em torno de 2 °C. Os experimentos também confirmam que a capsaicina produz uma profunda queda da temperatura corpórea em torno de 6 °C e que esta resposta é antagonizada pelo pré-tratamento dos animais com capsazepina. Estes resultados são interessantes pelo fato de demonstrarem que o composto drimanial, nas doses que produz marcada ação antinociceptiva quando comparada com a capsaicina, não produz respostas indesejáveis, como a redução da temperatura corporal de camundongos.

Analisando estes dados em conjunto, a Figura 20 ilustra de forma esquemática, nossa proposta de que quando nociceptores são expostos aos produtos formados de uma lesão tecidual ou nos processos inflamatórios, sua excitabilidade é alterada através de uma variedade de vias sinalizadoras intracelulares. A figura realça o papel dos receptores metabotrópicos (GluR_m1 e 5) e vanilóides (VR1) como alvos de uma cascata modulatória. As respostas dos VR1, por ação do calor, podem ser potencializadas por uma interação com prótons extracelulares ou metabólitos lipídicos endógenos, como a anandamida. A atividade do VR1, também pode ser aumentada por agentes como o fator de crescimento do nervo (NGF), bradicinina ou glutamato, entre outros, os quais se ligam em seus respectivos receptores na superfície celular (TrkA, $\text{BK}_{1,2}$ ou GluR_m1 e 5, respectivamente) estimulando diferentes tipos de fosfolipase C ($\text{PLC-}\gamma$ ou $\text{PLC-}\beta$). Em decorrência desta ativação, ocorre a hidrólise de lipídios da membrana plasmática e subsequente estimulação das isoformas da PKC, como a PKC- ϵ . Essas vias têm sido propostas para explicar a potencialização após

estimulação do VR1. Outra possibilidade aventada mais recentemente é que, em consequência da inflamação, ocorre também a liberação de neurotransmissores como o glutamato que, uma vez liberado, podem ativar receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA e cainato) e metabotrópicos (GluR_m1 e 5). As respostas mediadas pelos GluR_ms podem ser observadas mediante sua atividade em inúmeros canais iônicos presentes neste neurônio, e em parte, devido à ativação das suas vias de sinalização intracelulares.

Em síntese, os resultados do presente estudo demonstram evidências consistentes que indicam que o sesquiterpeno drimâncio, administrado pelas vias sistêmica, intraplantar, espinhal ou supraespinhal produz inibição significativa e de forma dependente da dose na nocicepção induzida pela formalina, capsaicina, forbol éster, glutamato e *trans*-ACPD em camundongos. Além disso, o drimâncio apresentou marcante atividade anti-hiperalgésica quando avaliado na hiperalgesia induzida pela injeção intratecal de glutamato. Os experimentos realizados com agonistas e antagonistas seletivos e com o auxílio da técnica de ligação específica sugerem que a antinocicepção causada pelo composto drimâncio provavelmente está relacionada com uma interação com receptores glutamatérgicos metabotrópicos. Os resultados do presente estudo também indicam que os receptores vanilídeos parecem contribuir para a atividade antinociceptiva do sesquiterpeno drimâncio. Além disso, os resultados do presente estudo indicam que o composto drimâncio não apresentou atividade antinociceptiva quando avaliado em modelos de nocicepção térmica, como o teste da placa-quente e o da retirada da cauda. O pré-tratamento dos animais com naloxona ou com PCPA não interferiu com a atividade antinociceptiva do composto drimâncio, sugerindo que seu mecanismo de ação não parece depender

de uma interação direta ou indireta com os sistemas opióide e serotoninérgico. Finalmente estes resultados não só confirmam, mas também estendem os resultados anteriores descritos em nosso laboratório (TRATSK et al., 1997; MENDES et al., 1998, 2000; MALHEIROS et al., 2001), demonstrando que ambos os sesquiterpenos presentes nas cascas da *D. winteri*, o poligodial e o drimanial, contribuem de maneira importante para o uso desta planta na medicina popular.

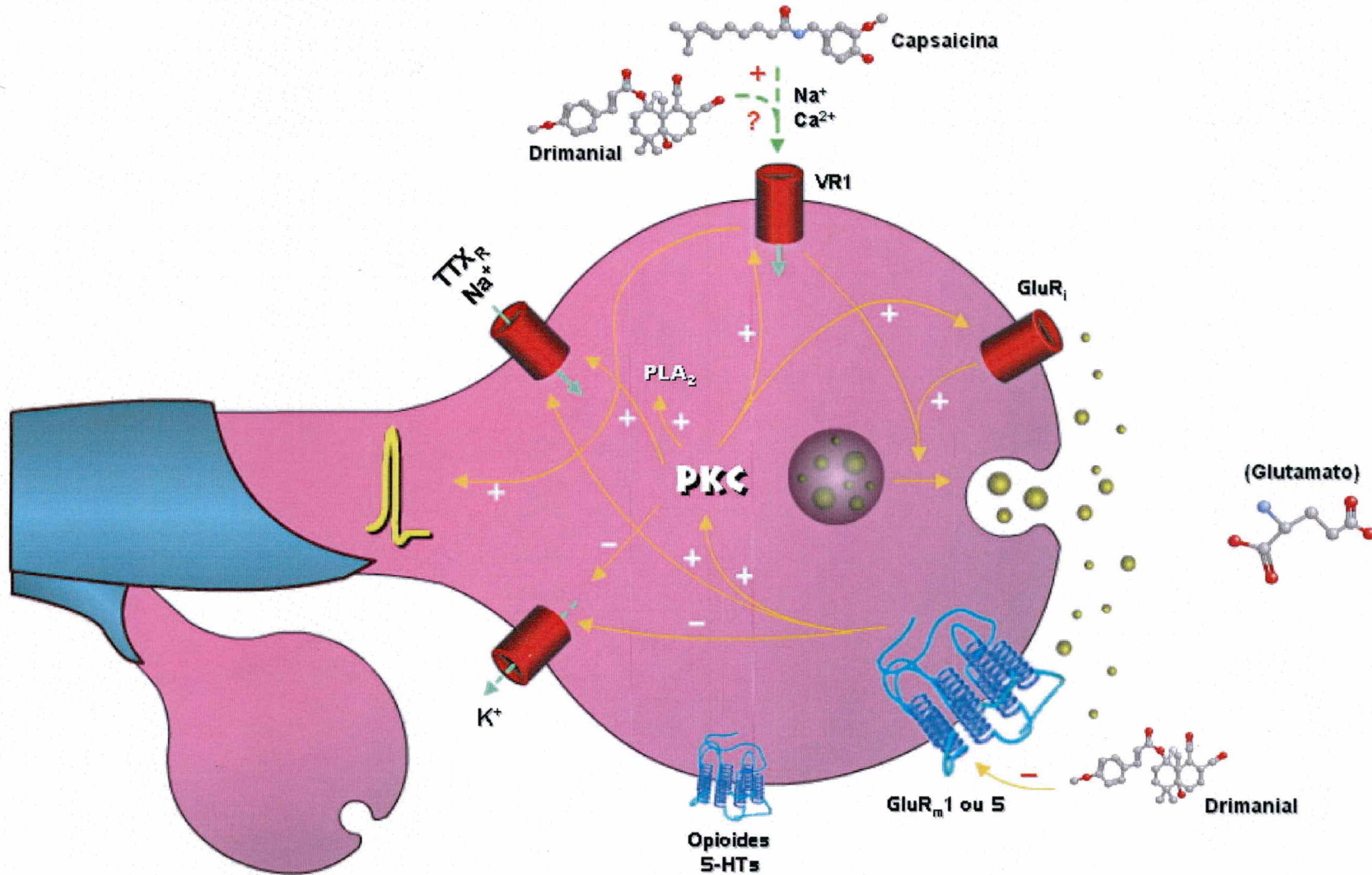


Figura 20 – Representação esquemática da proposta dos possíveis mecanismos envolvidos na atividade antinociceptiva do composto drimanial. Nociceptores, quando expostos aos produtos de uma lesão e inflamação, têm sua excitabilidade alterada por uma variedade de vias sinalizadoras intracelulares, sendo que receptores GluR_m 1 e 5 e VR1 são alvos dessa cascata modulatória. As respostas dos VR1 podem ser aumentadas por agentes como NGF, bradicinina ou glutamato. As suas ações em seus receptores estimulam diferentes vias de sinalização da fosfolipase C e a subsequente estimulação das isoformas da PKC. Ambas ações têm sido propostas para potencializar a função do VR1. A liberação de glutamato pode levar a ativação de GluR_m1 e 5, e assim modular a atividade de inúmeros canais iônicos presentes neste neurônio. Opióides e/ou serotonina podem interagir com receptores acoplados a proteína G_i, produzindo analgesia. (+) ativação, (-) inativação.

6. 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.**, v. 243, p. 9-19, 1987.
- 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.**, v. 243, p. 9-19, 1987.
- ALLISON, M.C.; HOWATSON, A.G.; TORRANCE, C.J. Gastrintestinal damage associated with use of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **New England Journal Of Medicine.**, v. 327, p. 749-754, 1992.
- ANDRE, E.; MALHEIROS, A.; CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Mechanisms underlying the relaxation caused by the sesquiterpene polygodial in vessels from rabbit and guinea-pig. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 386, p. 47-53, 1999.
- APPEL, H.; DOHR, R. Terpenos dei canelo chileno III. **Scientia.**, v. 25, p. 135-142, 1958.
- APPEL, H.; BROOKS, C.J.W.; OVERTON, K.H. The constitution and stereochemistry of drimenol, a novel bicyclic sesquiterpenoid. **J. Chem. Soc.**, v. 673, p. 3322-3332, 1959.
- BASBAUM A.E.; JESSEL, T.M. The perception of pain. In: KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M. **Principies of Neural Science**. 4 ed. McGraw-Hill: New York, p. 472-791, 2000.
- BATTAGLIA, G.; RUSTIONI, A. Coexistence of glutamate and substance P in dorsal root ganglion neurons of the rat and monkey. **J. Comp. Neuron.**, v. 277, p. 302-312, 1988.
- BEIRITH, A.; SANTOS, A.R.S.; RODRIGUES, A.L.S.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; CALIXTO, J.B. Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyrone on formalin, capsaicin and glutamate tests. Study of the mechanism of action. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 345, p. 233-245, 1998.
- BEIRITH, A., SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Res.**, v. 924, p. 219-228, 2002.
- 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.**, v. 73, p. 325-333, 1981.
- BESSON, J.M. The neurobiology of pain. **Lancet.**, v. 353, p. 1610-1615, 1999.
- BEVAN, S.; SZOLCSÁNYI, J. Sensory neuron-specific actions of capsaicin: mechanism and applications. **Trends Pharmacol. Sci.**, 11, 330-333, 1990.

- BEVAN, S.; DOCHERTY, R.J. Cellular mechanisms of the action of capsaicin. In: **Capsaicin in the study of pain.** (ed. Wood, J.N.), Academic Press, San Diego, CA, p. 27-44, 1993.
- BHAVE, G.; KARIM, F.; CARLTON, S.M.; GEREAU, R.W. Peripheral group I metabotropic glutamate receptors modulate nociception in mice. **Nat Neurosci.**, v. 4, p. 417-423, 2001.
- BJORKMAN, R.; HALLMAN, K.M.; HEDNER, J.; HEDNER, T.; HENNING, M. Acetaminophen blocks spinal hyperalgesia induced by NMDA and substance P. **Pain.**, v. 57, p. 259-264, 1994.
- BLANE, G.F. Blockade of bradykinin induced nociception in the rat as a test for analgesic drugs with particular reference to morphine antagonists. **Br. J. Pharmacol.**, v. 19, p. 367-373, 1967.
- BLUMBERG, H.; WOLF, P.S.; DAYTON, H.B. Use of the writhing test for evaluating analgesic activity of narcotic antagonists. **Proc. Spc. Exp. Biol. Med.**, v. 118, p. 763-766, 1965.
- BORRIS, R.P. Natural products: perspectives from a major pharmaceutical company. **J. Ethnopharmacol.**, v. 51, p. 29-38, 1996.
- BOXALL, S.J.; BERTHELE, A.; TOLLE, T.R.; ZIEGLGANSBERGER, W.; URBAN, L. mGluR activation reveals a tonic NMDA component in inflammatory hyperalgesia. **Neuroreport.**, v. 9,1 p. 201-1203, 1998.
- BRAMBILLA, A.; PRUDENTINO, A.; GRIPPA, N.; BORSINI, F. Pharmacological characterization of AMPA-induced biting behaviour in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 305, p. 115-117, 1996.
- BRAND, L.; BERMAN, E.; SCHWEN, R.; LOOMANS, M.; JANUSZ, J.; BOHNE, R.; MADDIN, C.; GARDNER, J.; LAHANN, T.; FARMER, R.; et al. NE-19550: a novel, orally active anti-inflammatory analgesic. **Drugs Exp. Clin. Res.**, v. 13, p. 259-265, 1987.
- BROMAN, J.; ADAHL, F. Evidence for vesicular storage of glutamate in primary afferent terminais. **Neuroreport.**, v. 5, p. 1801-1804, 1994.
- BROMM, B.; LORENZ, J. Neurophysiological evaluation of pain. **Electroenceph. Clin. Neurophysiol.**, v. 107, p. 227-253, 1998.
- BROWN, G.D. Drimenol, a sesquiterpene from *Drymis winteri*. **Phytochemistry.**, v. 35, p. 975-977, 1994.
- CALIXTO, J.B. Desenvolvimento de medicamentos: Ensaios pré-clínicos. **Médicos, (Set/Out.)**: p. 22-25, 1998.
- CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality, control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 33, p. 179-189, 2000.

- 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.**, v. 14, p. 1-18, 2000.
- CALIXTO, J.B.; SCHEIDT, C.; OTUKI, M.F.; SANTOS, A.R.S. Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs. **Expert Opin. Emerging Drugs.**, v. 6, p. 261-279, 2001.
- CAMPBELL, E.A.; DRAY, A.; PERKINS, M.N. Comparison of capsaicin and olvanil as antinociceptive agents In vivo and in vitro. **Br. J. Pharmacol.**, v. 98, p. 907, 1989.
- CARLTON, S.M.; HARGETT, G.L.; COGGESHALL, R.E. Localization and activation of glutamate receptors in unmyelinated axons of rat glabrous skin. **Neurosci Lett.**, v. 197, p. 25-28, 1995.
- CARLTON, S.M.; ZHOU, S.; COGGESHALL, R.E. Evidence for the interaction of glutamate and NK1 receptors in the periphery. **Brain Res.**, v. 790, p. 160-169, 1998.
- CARLTON, S.M.; HARGETT, G.L.; COGGESHALL, R.E. Localization of metabotropic glutamate receptors 2/3 on primary afferent axons in the rat. **Neuroscience.**, v. 105, p. 957-69, 2001.
- CARTER, A.J. Many agents that antagonize the NMDA receptor-channel complex in vivo also cause disturbances of motor coordination. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 269, p. 573-580, 1994.
- 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.**, v. 389, p. 816-824, 1997.
- 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.**, v. 288, p. 306-313, 2000.
- CECHINEL FILHO, V.; SCHLEMPER, V.; SANTOS, A.R.S.; PINHEIRO, T.R.; MENDES, G.L.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B.; DELLE MONACHE, F. Isolation and identification of active compounds from *Drimys winteri* barks. **J. Ethnopharmacol.**, v. 62, p. 223-227, 1998.
- CESARE, P.; MCNAUGHTON, P. A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 93, p. 15435-15439, 1996.
- CESARE, P.; MCNAUGHTON, P. Peripheral pain mechanisms. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 7, p. 493-499, 1997.
- CHANG, J. Medicinal Herbs: Drugs or Dietary Supplements?. **Bioch. Pharmacol.**, v. 59, p. 211-219, 2000.

- CHAU, T.T. Analgesic testing in animal models. **Pharmacol. Meth. Control. Inflamm.**, p. 195-212, 1989.
- CHERNY, N.I. Opioid analgesics. **Drugs.**, v. 51, p. 713-737, 1996.
- CHIZH, B.A.; DICKENSON, A.H.; WNENDT, S. The race to control pain: more participants, more targets. **Tips.**, v. 20, p. 354-357, 1999.
- CLARK, A.M. Natural products as a resource for new drugs. **Pharmac. Res.**, v. 13, p. 1133-1141, 1996.
- CLAPHAM, D.E.; NEER, E.J. G protein $\beta\gamma$ subunits. **Ann. Rev. of Pharmacol. Toxicol.**, v. 37, p. 167-203, 1997.
- CODERRE, T.J.; MELZACK, R. Central neural mediators of secondary hyperalgesia following heat injury in rats: neuropeptides and excitatory amino acids. **Neurosci. Lett.**, v. 131, p. 71-74, 1991.
- CODERRE, T.J. Contribution of protein kinase C to persistent nociception following tissue injury in rats. **Neurosci. Lett.**, v. 140, p. 181-184, 1992.
- CODERRE, T.J.; MELZACK, R. The contribution of excitatory amino acids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury. **J. Neurosci.**, v. 12, p. 3665-3670, 1992.
- COGGESHALL, R.E.; CARLSTON, S.M. Ultrastructural analysis of NMDA, AMPA and kainate receptors on unmyelinated and myelinated axons in the periphery. **J. Comp. Neurol.**, v. 391, p. 78-86, 1998.
- COGGESHALL, R.E.; CARLSTON, S.M. Evidence for an inflammation-induced change in the local glutamatergic regulation of postganglionic sympathetic efferents. **Pain.**, v. 83, p. 163-168, 1998.
- COHEN, R.H.; PERL, E.R. Chemical factors in the sensitization of cutaneous nociceptors. **Prog. Brain Res.**, v. 74, p. 201-206, 1988.
- 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.**, v. 32, p. 295-310, 1968.
- CONN, P.J.; PIN, J.P. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 37, p. 205-237, 1997.
- CORDELL, G.A. Changing strategies in natural products chemistry. **Phytochemistry.**, v. 40, p. 1585-1612, 1995.
- CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v. 2, p.112-113, 1984.
- CORRÊA, C.R.; CALIXTO, J.B. Evidence for participation of B₁ and B₂ kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in mouse. **Br. J. Pharmacol.**, v. 110, p. 193-198, 1993.

- CORRÊA, C.R.; KYLE, D.J.; CHAKRAVARTY, S.; CALIXTO, J.B. Antinociceptive profile of pseudopeptide B₂ bradykinin receptor antagonist NPC 18688 in mice. **Br. J. Pharmacol.**, v. 117, p. 552-558, 1996.
- CORTES, M.M.; OYARZUN, M.L. Tadeonal and isotadeonal from *Drimys winteri*. **Fitoterapia.**, v. 52, p. 33-35, 1981.
- CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J.; SNADER, K.M. Natural products in drug discovery and development. **J. Nat. Prod.**, v. 60, p. 52-60, 1997.
- CRAWFORD, J.H.; WOOTTON, J.F.; SEABROOK, G.R.; SCOTT, R.H. Activation of Ca²⁺-dependent currents in dorsal root ganglion neurons by metabotropic glutamate receptors and cyclic ADP-ribose precursors. **J. Neurophysiol.**, v. 77, p. 2573-2584, 1997.
- CRUZ, A.; SILVA, M. Further terpenoids and phenolics of *Drimys winteri*. **Phytochemistry.**, v. 12, p. 2549-2550, 1973.
- CUNNINGHAM, M.D.; FERKANY, J.W.; ENNA, S.J. Excitatory amino acid receptors: a gallery of new targets for pharmacological intervention. **Life Sci.**, v. 54, p. 135-148, 1994.
- DAMAJ, M.I.; GLASSCO, W.; ACETO, M.D.; MARTIN, B.R. Antinociceptive and Pharmacological Effects of Metanicotine, a Selective Nicotinic Agonist. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 291, p. 390-398, 1999.
- D'AMOUR, F.E.; SMITH, J. A method for determining loss of pain sensation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 72, p. 74-79, 1941.
- DAVIDSON, E.M.; COGGESHALL, R.E.; CARLTON, S.M. Peripheral NMDA and non-NMDA glutamate receptors contribute to nociceptive behaviors in the rat formalin test. **Neuroreport.**, v. 8, p. 941-946, 1997.
- DEBIASI, S.; RUKSTIONI, A. Glutamate and substance P coexist in primary afferent terminals in the superficial laminae of spinal cord. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 85, p. 7820-7824, 1988.
- DEGROOT, J.; ZHOU, S.; CARLTON, S.M. Peripheral glutamate release in the hindpaw following low and high intensity sciatic stimulation. **Neuroreport.**, V. 28, p. 497-502, 2000.
- DE SMET, P.G.A.M. The role of plant-derived drugs and herbal medicines in healthcare. **Drugs.**, v. 54, p. 801-840, 1997.
- DICKENSON, A.H.; SULLIVAN, A.F. Evidence for a role of the NMDA receptor in the frequency dependent potentiation of deep rat dorsal horn nociceptive neurons following C fibre stimulation. **Neuropharmacol.**, v. 26, p. 1235-1238, 1987a.
- DICKENSON, A.H.; SULLIVAN, A.F. Subcutaneous formalin-induced activity of dorsal horn neurons in the rat: differential response to an intrathecal opiate administered pre or post-formalin. **Pain.**, v. 30, p. 349-360, 1987b.

- DICKENSON, A.; ASHWOOD, N.; SULLIVAN, A.F.; JAMES, I.; DRAY, A. Antinociception produced by capsaicin: spinal or peripheral mechanism? **Eur. J. Pharmacol.**, v. 187, p. 225-233, 1990a.
- DICKENSON, A.; HUGHES, C.; RUEFF, A.; DRAY, A. A spinal mechanism of action is involved in the antinociception produced by the capsaicin analogue NE 19550 (olvanil). **Pain.**, v. 43, p. 353-362, 1990b.
- DICKENSON, A.H.; DRAY, A. Selective antagonism of capsaicin by capsazepine: evidence for a spinal receptor site in capsaicin-induced antinociception. **Br. J. Pharmacol.**, v. 104, p. 1045-1049, 1991.
- DJOUHRI, L.; BLEAZARD, L.; LAWSON, S.N. Association of somatic action potential shape with sensory receptive properties in guinea-pig dorsal root ganglion neurones. **J. Physiol.**, v. 513, p. 857-872, 1998.
- DOGRUL, A.; OSSIPOV, M.H.; LAI, J.; MALAN, T.P. JR; PORRECA, F. Peripheral and spinal antihyperalgesic activity of SIB-1757, a metabotropic glutamate receptor (mGLUR(5)) antagonist, in experimental neuropathic pain in rats. **Neurosci. Lett.**, v. 292, p. 115-118, 2000.
- DRAY, A.; BETTANEY, J.; RUEFF, A.; WALPOLE, C.; WRIGGLESWORTH, R. NE-19550 and NE-21610, antinociceptive capsaicin analogues: studies on nociceptive fibres of the neonatal rat tail in vitro. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 181, p. 289-293, 1990.
- DRAY, A.; DICKENSON, A. Systemic capsaicin and olvanil reduce the acute algogenic and the late inflammatory phase following formalin injection into rodent paw. **Pain.**, v. 47, p. 79-83, 1991.
- DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **Br. J. Anaesth.**, v. 75, p. 125-131, 1995.
- DRAY, A.; PERKINS, M. Kinins and pain. In: FARMER, S.G. **The handbook of immunopharmacology: The kinin system**. Academic Press: London, p. 157-172, 1997.
- DRIEDGER, P.E.; BLUMBERG, P.M. Different biological targets for resiniferatoxin and phorbol 12-myristate 13-acetate. **Cancer Res.**, v. 40, p. 1400-1404, 1980.
- 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.**, v. 4, p. 161-174, 1977.
- DUNHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note on a Simple Apparatus for Detecting Neurobiological Deficit in Rats and Mice. **J. Am. Pharm. Assoc.**, v. 46, p. 208-209, 1957.
- DYKSTRA, D.D.; SIDI, A.A.; ANDERSON, L.C. The effect of nifedipine on cystoscopy-induced autonomic hyperreflexia in patients with high spinal cord injuries. **J. Urol.**, v. 138, p. 1155-1157, 1987.

- EDDY, N.B.; LEIMBACK, D. Synthetic analgesics II. Dithienylbutenyl and dithienylbutylamines. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 107, p. 385-393, 1953.
- EL SAYAH, M.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Action of the extract of *Drimys winteri* on contraction induced by inflammatory mediators, compound 48/80 and ovalbumin of the guinea-pig trachea in vitro. **Gen Pharmacol.**, v. 28, p. 699-704, 1997.
- EL SAYAH, M.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A.; PINHEIRO, T.R.; CALIXTO, J.B. Action of polygodial, a sesquiterpene isolated from *Drimys winteri*, in the guinea-pig ileum and trachea 'in vitro'. **Eur J Pharmacol.**, v. 344, p. 215-221, 1998.
- EL SAYAH, M.; FILHO, V.C.; YUNES, R.A.; MALHEIROS, A.; CALIXTO, J.B. Action of polygodial on ago-nist-induced contractions of the rat portal vein in vitro. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 35, p.670-675, 2000.
- FARNSWORTH, N.R.; AKERELLE, O.; BINGEL, A.S.; SOERJARTO, D.D.; GUO, Z. Medicinal plants in therapy. **Bull. Who.**, v. 63, p. 965-981, 1985.
- 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.**, v. 38, p. 835-842, 1999.
- FISHER, K.; CODERRE, T.J. The contribution of metabotropic glutamate receptors (mGluRs) to formalin-induced nociception. **Pain.**, v. 68, p. 255-263, 1996.
- FUNDYTUS, M.E.; YASHPAL, K.; CHABOT, J.G.; OSBORNE, M.G.; LEFEBVRE, C.D.; DRAY, A.; HENRY, J.L.; CODERRE, T.J. Knockdown of spinal metabotropic glutamate receptor 1 (mGluR(1)) alleviates pain and restores opioid efficacy after nerve injury in rats. **Br. J. Pharmacol.**, v. 132, p. 354-367, 2001.
- FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Res. Bull.**, v. 48, p. 129-141, 1999.
- GAMSE, R. Capsaicin and nociception in the rat and mouse. Possible role of substance P. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v. 320, p. 205-216, 1982.
- GEREAU, R.W.; CONN, P.J. Multiple presynaptic metabotropic glutamate receptors modulate excitatory and inhibitory synaptic transmission in hippocampal area CA1. **J. Neurosci.**, v. 15, p. 6879-6889, 1995.
- GETHER, U.; KOBILKA, B.K. G protein-coupled receptors. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 17979-17982, 1998.
- GO, V.L.W.; YAKSH, T.L. Release of substance P from the cat spinal cord. **J. Physiol.**, v. 391, p. 141-167, 1987.

- GOLD, M.S.; LEVINE, J.D.; CORREA, A.M. Modulation of TTX-R INa by PKC and PKA and their role in PGE2-induced sensitization of rat sensory neurons in vitro. **J. Neurosci.**, v. 18, p. 10345-10355, 1998.
- GRAVES, G. Medicinal Plants. Randon House, London, p. 116–118, 1996.
- GREENAMYRE, J.T.; YOUNG, A.B. PENNY, J.B. Quantitative autoradiographic distribution of L-[³H]glutamate-binding sites in the rat central nervous system. **J. Neurosc.**, v. 4, p. 2133-2144, 1984.
- GRUBB, B.D. Peripheral and central mechanisms of pain. **Br. J. Anaesth.** v. 81, p. 8-11, 1998.
- GRÜNWARD, J. The european phytomedicines market: figures, trends, analysis. **Herbal Gram.**, v. 34, p. 60-65, 1995.
- GRÜNWARD, J. BÜTTEL, K. The european phytotherapeutics market: figures, trends, analysis. **Drugs Made in Germany.**, v. 39, p. 6-11, 1996.
- GUO, A.; VULCHANOVA, L.; WANG, J.; LI, X.; ELDE, R. Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): Relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites. **Eur. J. Neurosci.**, v. 11, p.946-958, 1999.
- GUPTA, M. 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas. Convenio Andres Bello, Colombia, p. 574–576, 1995.
- HAYES, A.G.; TYERS, M.B. Effects of capsaicin on nociceptive heat, pressure and chemical thresholds and on substance P levels in the rat. **Brain Res.**, v. 189, p. 561-564, 1980.
- HAYES, A.G.; OXFORD, A.; REYNOLDS, M.; SHINGLER, A.H.; SKINGLE, M.; SMITH, C.; TYERS, M.B. The effects of a series of capsaicin analogues on nociception and body temperature in the rat. **Life Sci.**, v. 34, p. 1241-1248, 1984.
- HAWES, B.E.; GRAZIANO, M.P.; LAMBERT, D.G. Cellular actions of nociceptin: transduction mechanism. **Peptides**, v. 21, p. 961-967, 2000.
- HEAPY, C.G.; JAMIESON, A.; RUSSELL, N.J.W. Afferent C-fibers and A δ activity in models of inflammation. **Br. J. Pharmacol.**, v. 90, p. 164, 1987.
- HERGENHAHN, M.; ADOLF, W.; HECKER, E. Resiniferatoxin and other esters of novel polyfunctional diterpenes from *Euphorbia resinifera* and *unispina*. **Tetrahedron Lett.**, v. 19, p. 1595-1598, 1975.
- HOLZER, P. Capsaicin: cellular targets mechanisms of action and selectivity for thin sensory neurons. **Pharmacol. Rev.**, v. 43, p. 144-201, 1991.
- HORI, T. Capsaicin and central control of thermoregulation. **Pharmacol. Ther.**, v. 26, p. 389-416, 1984.

- HOUGHTON, P.J.; MANBY, J. Medicinal plants of the Mapuche. **J. Ethnopharmacol.**, v. 13, p. 89–103, 1985.
- HUNSKAAR, S.; FASMER, O.B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesia. **J. Neurosci. Meth.**, v. 14, p. 69-76, 1985.
- HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain.**, v. 30, p. 103-114, 1987.
- HUNTER, T. Cell signaling: protein-serine kinase receptors. **Curr. Biol.**, v. 1, p. 15-16, 1991.
- HUNTER, T. Signaling – 2000 and beyond. **Cell.**, v. 100, p. 113-127, 2000.
- HYLDEN, J.L.; WILCOX, G.L. Intrathecal morphine in mice: a new technique. **Eur J Pharmacol.**, v. 67, p. 313-316, 1980.
- JACK, D.B. One hundred years of aspirin. **Lancet.**, v. 350, p. 437-439, 1997.
- JACKSON, D.L.; GRAFF, C.B.; RICHARDSON, J.D.; HARGREAVES, K.M. Glutamate participates in the peripheral modulation of thermal hyperalgesia in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 284, p. 321-325, 1995.
- JANCSÓ, N. Stoffanreicherung in **Retikuloendothelial und in der Niere**. Budapest, Aladémiai Kiadó, Speicherung, 1955.
- JANCSÓ-GÁBOR, A.; SZOLCSÁNYI, J.; JANCSÓ, N. Stimulation and desensitization of the hypothalamic heat-sensitive structures by capsaicin in rats. **J. Physiol.**, v. 208, p. 449-459, 1970.
- JANCSÓ, G.; KIRÁLY, E.; JANCSÓ-GABOR, A. Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. **Nature.**, v. 270, p. 741-743, 1977.
- JANSEN, K.L.; FAULL, R.L. DRAGUNOW, N.; WALDVOGEL, H. Autoradiographic localisation of NMDA, quisqualate and kainic acid receptors in human spinal cord. **Neurosci. Lett.**, v. 108, p. 53-57, 1990.
- JANUSZ, J.M.; BUCKWALTER, B.L.; YOUNG, P.A.; LAHANN, T.R.; FARMER, R.W.; KASTING, G.B.; LOOMANS, M.E.; KERCKAERT, G.A.; MADDIN, C.S.; BERMAN, E.F.; et al. Vanilloids. 1. Analogs of capsaicin with antinociceptive and antiinflammatory activity. **J. Med. Chem.**, v.36, p. 2595-2604, 1993.
- JONASSOHN, M.; STERNER, O. Terpenoid unsaturated 1,4-dialdehydes, occurrence and biological activities. **Trends Org. Chem.**, v. 6, p. 23-43, 1997.
- JULIUS, D.; BASBAUM A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature.**, v. 413, p. 203-210, 2001.
- JURÁNEK, I.; LEMBECK, F. Afferent C-fibres release substance P and glutamate. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 75, p. 661-664, 1997.

- KARIM, F.; WANG, C.C.; GEREAU, R.W. Metabotropic glutamate receptor subtypes 1 and 5 are activators of extracellular signal-regulated kinase signaling required for inflammatory pain in mice. **J. Neurosci.**, v. 21, p. 3771-3779, 2001.
- KARLSTEN, R.; GORDH, T. How do drugs relieve neurogenic pain?. **Drugs & Aging.**, v.11, p. 398-412, 1997.
- LAURSEN, S.E.; BELKNAP, J.K. Intracerebroventricular injections in mice: Some methodological refinements. **J. Pharmacol. Methods.**, v. 16, p. 355-357, 1986.
- LAWAND, N.B.; WILLIS, W.D.; WESTLUND, K.N. Excitatory amino acid receptor involvement in peripheral nociceptive transmission in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 324, p. 169-177, 1997.
- LICHTENSTEIN, D.R.; SYNGAL, S.; WOLFE, M.M. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the gastrointestinal tract. The double-edged sword., **Arthritis Rheum.** V. 38, p. 5-18, 1995.
- LIU, H.; MANTYH, P.W.; BASBAUM, A.I. NMDA-receptor regulation of substance P release from primary afferent nociceptors. **Nature.**, v. 386, p. 721-724, 1997.
- LOESER, J.D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **Lancet.**, v. 353, p. 1607-1609, 1999.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** 3 ed. São Paulo: Nova Odessa, v. 1, p. 352, 2000.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MAGISTRETTI, M.J.; CONTI, M.; CRISTONI, A. Antiulcer activity of an anthocyanidin from *Vaccinium myrtillus*. **Arzneim.**, v. 38, p. 686-690, 1988.
- MALHEIROS, A.; CECHINEL FILHO, V.; SCHMITT, C.B.; SANTOS, A.R.S.; SCHEIDT, C.; CALIXTO, J.B.; MONACHE, F.D.; YUNES, R.A. A sesquiterpene drimane with antinociceptive activity from *Drimys winteri* bark. **Phytochemistry.**, v. 57, p. 103-107, 2001.
- MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. Hyperalgesia mediated by spinal glutamate or substance P receptor blocked by spinal cyclooxygenase inhibition. **Science.**, v. 257, p. 1276-1279, 1992.
- MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. The effect of morphine on formalin-evoked behavior and spinal release of excitatory amino acids and prostaglandin E₂ using microdialysis in conscious rats. **Br. J. Pharmacol.**, v. 114, p. 1069-1075, 1995.

- MALMBERG, A.B.; HEDNER, T.; FALLGREN, B.; CALCUTT, N.A. The effect of alpha-trinositol (D-myo-inositol 1,2,6-trisphosphate) on formalin-evoked spinal amino acid and prostaglandin E2 levels. **Brain Res.**, v. 747, p. 160-164, 1997.
- MANZONI, O.; BOCKAERT, J. Metabotropic glutamate receptors inhibiting excitatory synapses in the CA1 area of rat hippocampus. **Eur. J. Neurosci.**, v. 7, p. 2518-2523, 1995.
- MAO, J.; PRICE, D.D.; MAYER, D.J.; LU, J.; HAYES, R.L. Intrathecal MK-801 and local nerve anesthesia synergistically reduce nociceptive behaviors in rats with experimental peripheral mononeuropathy. **Brain Res.**, v. 576, p. 254-262, 1992.
- MARSH, S.J.; STANSFELD, C.E.; BROWN, D.A.; DAVEY, R.; MCCARTHY, D. The mechanism of action of capsaicin on sensory C-type neurons and their axons in vitro. **Neuroscience.**, v. 23, p. 275-289, 1987.
- MASUYAMA, T.; SHIMIZU, T. Antinociceptive involvement of substance P in the spinal cord of mice: dose effects of substance P on the behavior elicited by intrathecally administered NMDA. **Brain Res.**, v. 759, p. 241-246, 1997.
- MCNEARNEY, T.; SPEEGLE, D.; LAWAND, N.; LISSE, J.; WESTLUND, K.N. Excitatory amino acid profiles of synovial fluid from patients with arthritis. **J. Rheumatol.**, v. 27, p. 739-745, 2000.
- MELZACK, R.; WALL, P.D. Pain mechanisms: a new theory. **Pain clinic.**, v. 7, p. 52-72, 1994.
- MENDELSON, T.; BALICK, M. The value of undiscovered pharmaceuticals in tropical forests. **Econ. Bot.**, v. 49, p. 223-228, 1995.
- 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 *Drimys winteri* (Winteraceae). **Life Sci.**, v. 63, p. 369-381, 1998.
- 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.**, v. 292, p. 164-172, 2000.
- MENSE, S. Nociception from skeletal muscle in relation to clinical muscle pain. **Pain.**, v. 54, p. 241-289, 1993.
- MERSKEY, H. Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP subcommittee on Taxonomy. **Pain.**, v. 6, p. 249-252, 1979.
- MERSKEY, H.; BOGDUK, N. **Classification of chronic pain**: description of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. IASP Press: Seattle, 1994.

- MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Prog. Neurobiol.**, v. 57, p. 1-164, 1999.
- MOGIL, J.S.; SHIN, Y.H.; MCCLESKEY, E.W.; KIM, S.C.; NAH, S.Y. Ginsenoside Rf, a trace component of ginseng root, produces antinociception in mice. **Brain Res.**, v. 792, p. 218-228, 1998.
- MONAGHAN, D.T.; COTMAN, C.W. Distribution of N-methyl-D-aspartate-sensitive L-[³H]glutamate-binding sites in rat brain. **J. Neurosci.**, v. 5, p. 2909-2919, 1985.
- MORTON, J.F. Atlas of medicinal plants in middle America-Bahamas to Yucatan. 1 st. ed., Springfield: Charles C. Thomas (ed), p. 457-463, 1981.
- NEUGEBAUER, V. Peripheral metabotropic glutamate receptors: fight the pain where it hurts. **Trends Neurosci.**, v. 24, p. 550-552, 2001.
- NISHIZUKA, Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. **Science.**, v. 258, p. 607-614, 1992.
- OH, U.; HWANG, S.W.; KIM, D. Capsaicin activates a nonselective cation channel in cultured neonatal rat dorsal root ganglion neurons. **J. Neurosci.**, v. 16, p. 1659-1667, 1996.
- OHKUBO, T.; SHIBATA, M. The selective capsaicin antagonist capsazepine abolishes the antinociceptive action of eugenol and guaiacol. **J. Dent. Res.**, v. 76, p. 848-851, 1997.
- OMOTE, K.; KAWAMATA, T.; KAWAMATA, M.; NAMIKI, A. Formalin-induced release of excitatory amino acids in the skin of the rat hindpaw. **Brain Res.**, v. 787, p. 161-164, 1998.
- PERKINS, M.N.; CAMPBELL, E.A. Capsazepine reversal of the antinociceptive action of capsaicin in vivo. **Br. J. Pharmacol.**, v.107, p. 329-333, 1992.
- PIN, J.P.; DUVOISIN, R. Review: neurotransmitter receptors: I. The metabotropic glutamate receptors: structure and function. **Neuropharmacol.**, v. 34, p. 1-26, 1995.
- PLEUVRY, B.J.; LAURETTI, G.R. Biochemical aspects of chronic pain and its relationship to treatment. **Pharmacol. Ther.**, v. 71, p. 313-324, 1996.
- RAIGORODSKY, G.; URCA, G. Spinal antinociceptive effects of excitatory amino acids antagonists: quisqualate modulates the action of N-methyl-D-aspartate. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 182, p. 37-47, 1990.
- RAJA, S.N.; MEYER, R.A.; RINGKAMP, M.; CAMPBELL, J.N. in **Textbook of pain.** (eds Wall, P.D. e Melzack, R.), p. 11-57, (Churchill Livingstone, Edinburgh, 1999).
- RANG, H.P.; BEVAN, S.J.; FORBES, A.; WOOD, J.N. The action of capsaicin on the membrane of sensory neurones. **IUPHAR Satellite Symposium, Tools**

for tachykinin and neuropeptide research, 29-30 August, Salamander Bay 1987, Abstr. Book p.29, 1987.

REEVE, A.J.; DICKENSON, A.H. The roles of spinal adenosine receptors in the control of acute and more persistent nociceptive response of dorsal horn neurons in the anaesthetized rat. **Br. J. Pharmacol.**, v. 116, p. 2221-2228, 1995.

REN, K.; HYLDEN, J.L.K.; WILLIAMS, G.M.; RUDA, M.A.; DUBNER, R. The effects of a non-competitive NMDA receptor antagonist, MK-801, on behavioral hyperalgesia a dorsal horn neuronal activity in rats with unilateral inflammation. **Pain.**, v. 50, p. 331-344, 1992.

RICCIERI, T.M.N. Bibliografia de plantas medicinais. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v. 1, p. 224, 1981.

ROSLAND, J.H.; TJOLSEN, A.; MAEHLE, B.; HOLE, K. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. **Pain.**, v. 42, p. 235-242, 1990.

ROSLAND, J.H. The formalin test in mice: the influence of ambient temperature. **Pain.**, v. 45, p. 211-216, 1991.

RUSSO, C.M.; BROSE, W.G. Chronic pain. **Ann. Rev. Med.**, v. 49, p. 123-133, 1998.

SAKURADA, T.; MANOME, Y.; TAN-NO, K.; SAKURADA, S.; KISARA, K. The effects of substance P analogues on the scratching, biting and licking response induced by intrathecal injection of N-methyl-D-aspartate in mice. **Br. J. Pharmacol.**, v. 101, p. 307-310, 1990.

SAKURADA, T.; KATSUMATA, K.; TAN-NO, K.; SAKURADA, S.; KISARA, K. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. **Neuropharmacol.**, v. 31, p. 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. **Neurosc. Lett.**, v. 151, p. 142-145, 1993.

SAKURADA, A.; SUGIYAMA, C.; SAKURADA, K.; TANNO, S.; KISARA, A.; ABIKO, Y. Involvement of nitric oxide in spinally mediated capsaicin- and glutamate-induced behavioral response in the mouse. **Neurochem. Int.**, v. 3, p. 271-278, 1996.

SANTOS, A.R.; FILHO, V.C.; 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.**, v. 26, p. 1499-1506, 1995.

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.**, v. 31, p. 381-389, 1997.

- 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.**, v. 47, p. 302-307, 1998.
- SASAMURA, T.; KURAISHI, Y. Peripheral and central actions of capsaicin and VR1 receptor. **Jpn. J. Pharmacol.**, v. 80, p. 275-280, 1999.
- SCHOEPP, D.D.; JANE, D.E.; MONN, J.A. Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors. **Neuropharmacol.**, v. 38, p. 1431-1476, 1999.
- SHAW, P.J.; INCE, P.G.; JOHNSON, M. PERRY, E.K. CANDY, J. The quantitative autoradiographic distribution of [³H]MK-801 binding sites in the normal human spinal cord. **Brain Res.**, v. 539, p. 164-168, 1991.
- SHERRINGTON, C.S. **The Integrative action of the nervous system.** New York: Scribner, 1906.
- SHIBATA, M.; OHKUDO, T.; TAKAHASHI, H.; INOKI, R. Modified formalin test characteristic biphasic pain response. **Pain.**, v. 38, p. 347-352, 1989.
- SHIGEMOTO, R.; NAKANISHI, S.; MIZUNO, N. Distribution of the mRNA for a metabotropic glutamate receptor (mGluR1) in the central nervous system: an in situ hybridization study in adult and developing rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 322, p. 121-135, 1992.
- SIEGMUND, E.A.; CADMUS, R.A.; LU, G. A method for evaluating both non-narcotic analgesics. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 95, p. 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.**, v. 119, p. 184-193, 1957b.
- SIETSEMA, W.K.; BERMAN, E.F.; FARMER, R.W.; MADDIN, C.S. The antinociceptive effect and pharmacokinetics of olvanil following oral and subcutaneous dosing in the mouse. **Life Sci.**, v. 43, p. 1385-1391, 1988.
- SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; IRGANG, B.E.; STEHMANN, J.R. Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul. Porto Alegre: ed. Da UFRGS, p. 46-47, 1986.
- SKILLING, S.R.; SMULLIN, D.H.; BEITZ, A.J.; LARSON, A.A. Extracellular amino acid concentrations in the dorsal spinal cord of freely moving rats following veratridinine and nociceptive stimulation. **J. Neurochem.**, v. 51, p. 127-132, 1988.
- SLUKA, K.A.; WESTLUND, K.N. An experimental arthritis in rats: dorsal horn aspartate and glutamate increases. **Neurosc. Lett.**, v. 145, p. 141-144, 1992.
- SLUKA, K.A.; WESTLUND, K.N. An experimental arthritis model in rats: the effects of NMDA and non-NMDA antagonists on aspartate and glutamate release in the dorsal horn. **Neurosc. Lett.**, v. 149, p. 99-102, 1993.

- SOMERVILLE, C. The twentieth century trajectory of plant biology. **Cell.**, v. 100, p. 13-25, 2000.
- SORKIN, L.S.; WESTLUND, K.N.; SLUKA, K.A.; DOUGHERTY, P.M.; WILLIS, W.D. Neural changes in acute arthritis in monkeys. IV. Time course of amino acid release into the lumbar dorsal horn. **Brain Res. Rev.**, v. 17, p. 39-50, 1992.
- SORKIN, L.S.; MCADOO, D.J. Amino acids and serotonin are released into the lumbar spinal cord of the anesthetized cat following intradermal capsaicin injections. **Brain Res.**, v. 607, p. 89-98, 1993.
- SOUZA, D.O.; RAMIREZ, G. Effects of guanine nucleotides on kainic acid binding and on adenylate cyclase in chick optic tectum and cerebellum. **J. Mol. Neurosci.**, v. 3, p. 39-45, 1991.
- STERNER, O.; SZALLASI, A. Novel natural vanilloid receptor agonist: new therapeutic targets for drug development. **Trends. Pharmacol. Sci.**, v. 20, p. 459-465, 1999.
- SZALLASI, A.; BLUMBERG, P.M. Resiniferatoxin, a phorbol-related diterpene, acts as an ultrapotent analog of capsaicin, the irritant constituent in red pepper. **Neuroscience.**, v. 30, p. 515-520, 1989.
- SZALLASI, A.; BLUMBERG, P.M. Specific binding of resiniferatoxin, an ultrapotent capsaicin analog, by dorsal root ganglion membranes. **Brain Res.**, v. 524, p. 106-111, 1990.
- SZALLASI, A.; BLUMBERG, P.M. Vanilloid receptors: new insights enhance potential as a therapeutic target. **Pain.**, v. 68, p. 195-208, 1996.
- SZALLASI, A.; JONASSOHN, M.; ACS, G.; BIRO, T.; ACS, P.; BLUMBERG, P.M.; STERNER, O. The stimulation of capsaicin-sensitive neurones in a vanilloid receptor-mediated fashion by pungent terpenoids possessing an unsaturated 1,4-dialdehyde moiety. **Br. J. Pharmacol.**, v. 119, p. 283-290, 1996.
- SZALLASI, A.; BLUMBERG, P.M. Resiniferatoxin, a phorbol-related diterpene, acts as an ultrapotent analog of capsaicin, the irritant constituent in red pepper. **Neuroscience.**, v. 30, p. 515-520, 1999a.
- SZALLASI, A.; BLUMBERG, P.M. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. **Pharmacol Rev.**, v. 51, p. 159-211, 1999b.
- SZALLASI, A.; DI MARZO, V. New perspectives on enigmatic vanilloid receptors. **Trends. Neurosc.**, v. 23, p. 491-497, 2000.
- SZOLCSÁNYI, J.; JANCZO-GABOR, A. Sensory effects of capsaicin congeners I. Relationship between chemical structure and pain-producing potency of pungent agents. **Arzneimittelforschung.**, v. 25, p. 1877-1881, 1975.

- SZOLCSÁNYI, J. **Actions of capsaicin on sensory receptors.** In: Capsaicin in the study of pain. (ed. Wood, J.N.), **Academic Press**, San Diego, CA, p. 1-26, 1993.
- TABER, R.I.; GREENHOUSE, D.D.; IRWIN, S. Inhibition of phenylquinone-induced writhing by narcotic antagonists. **Nature.**, v. 204, p. 189-190, 1964.
- TABER, R.I. Predictive value of analgesic assays in mice and rats. In: **Narcotic antagonists, Advances in Biochemical Psychopharmacology.** Raven Press., New York, v. 8, p. 191-211, 1974.
- TANIGUCHI, K.; SHINJO, K.; MIZUTANI, M.; SHIMADA, K.; ISHIKAWA, T.; MENNITI, F.S.; NAGAHISA, A. Antinociceptive activity of CP-101,606, an NMDA receptor NR2B subunit antagonist. **Br. J. Pharmacol.**, v. 122, p. 809-812, 1997.
- TEOH, H.; MALCANGIO, M.; FOWLER, L.G.; BOWERY, N.G. Evidence for release of glutamic acid, aspartic acid and substance P but not γ -aminobutyric acid from primary afferent fibres in rat spinal cord. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 302, p. 27-36, 1996.
- TJØLSEN, A.; BERGE, O.G.; HUNSKAAR, S.; ROLAND, J.H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluating of the method. **Pain.**, v. 51, p. 5-17, 1992.
- 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.
- TOMINAGA, M.; CATERINA, M.J.; MALMBERG, A.B.; ROSEN, T.A.; GILBERT, H.; SKINNER, K.; RAUMANN, B.E.; BASBAUM, A.I.; JULIUS, D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. **Neuron.**, v. 21, p. 531-543, 1998.
- TRATSK, K.S.; CAMPOS, M.M.; VAZ, Z.R.; CECHINEL FILHO, V.; SCHLEMPER, V.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Anti-allergic effects and oedema inhibition caused by the extract of *Drimys winteri*. **Inflamm. Res.**, v. 46, p. 509-514, 1997.
- ULLRICH, A.; SCHLESSINGER, J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. **Cell.**, v. 61, p. 203-212, 1990.
- UEDA, M.; KURAISHI, Y.; SUGIMOTO, K.; SATOH, M. Evidence that glutamate is release from capsaicin-sensitive primary afferent fibers in rats: study with on-line continuous monitoring of glutamate. **Neurosc. Res.**, v. 20, p. 231-237, 1994.
- URBAN, L.; DRAY, A. Capsazepine, a novel capsaicin antagonist, selectively antagonizes the effects of capsaicin in the mouse spinal corn in vitro. **Neurosci. Lett.**, v. 134, p. 9-11, 1991.
- URBAN, M.O.; GEBHART, G.F. Central mechanisms in pain. **Med. Clin. North. Am.** v. 83, p. 585-596, 1999.

- URCA, G.; RAIGORODSKY, G. Behavioral classification of excitatory amino acid receptors in mouse spinal cord. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 153, p. 211-220, 1988.
- VALERIO, A.; RIZZONELLI, P.; PATERLINI, M.; MORETTO, G.; KNOPFEL, T.; KUHN, R.; MEMO, M.; SPANO, P. mGluR5 metabotropic glutamate receptor distribution in rat and human spinal cord: a developmental study. **Neurosci Res.**, v. 28, p. 49-57, 1997.
- VANE, J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nat. New. Biol.**, v. 231, p. 232-235, 1971.
- VANE, J.R.; BOTTING, R.M. New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. **Inflamm. Res.**, v. 44, p. 1-10, 1995.
- 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 Xanthoxyline derivative on chemical and thermal models of nociception in mice. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 278, p. 304-312, 1996.
- WALKER, K.; BOWES, M.; PANESAR, M.; DAVIS, A.; GENTRY, C.; KESINGLAND, A.; GASPARINI, F.; SPOOREN, W.; STOEHR, N.; PAGANO, A.; FLOR, P.J.; VRANESIC, I.; LINGENHOEHL, K.; JOHNSON, E.C.; VARNEY, M.; URBAN, L.; KUHN, R. Metabotropic glutamate receptor subtype 5 (mGlu5) and nociceptive function. I. Selective blockade of mGlu5 receptors in models of acute, persistent and chronic pain. **Neuropharmacol.**, v. 40, p. 1-9, 2001a.
- WALKER, K.; REEVE, A.; BOWES, M.; WINTER, J.; WOTHERSPOON, G.; DAVIS, A.; SCHMID, P.; GASPARINI, F.; KUHN, R.; URBAN, L. Related Articles. mGlu5 receptors and nociceptive function II. mGlu5 receptors functionally expressed on peripheral sensory neurones mediate inflammatory hyperalgesia. **Neuropharmacol.**, v. 40, p. 10-19, 2001b.
- WALLACE, J.L.; TIGLEY, A.W. Review article: new insights into prostaglandins and mucosal defence. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 9, p. 227-235, 1995.
- WESTLUND, K.N.; CARLTON, S.M.; ZHANG, D.; WILLIS, W.D. Glutamate-Immunoreactive terminals synapse on primate spinothalamic tract cells. **J. Comp. Neurol.**, v. 322, p. 519-527, 1992.
- WHITTLE, B.A. Release of a kinin by intraperitoneal injection of chemical agents in mice. **Int. J. Neuropharmacol.**, v. 3, p. 369-378, 1964.
- WILKIE, T.M. G protein signaling: Satisfying the basic necessities of life. **Curr. Biol.**, v. 10, p. 853-856, 2000.
- WOOD, P.L. **Animal models in analgesic testing.** In: Analgesics; Neurochemical, Behavioral, and Clinical perspectives. **Raven Press.**, New York, p. 175-194, 1984.
- WOOD, J.N.; DOCHERTY, R. Chemical activators of sensory neurons. **Ann. Rev. Physiol.**, v. 59, p. 457-482, 1997.

- WOOLF, C.J.; THOMPSON, S.W.N. The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D-aspartate acid receptor activation implications for post-injury pain hypersensitivity states. **Pain.**, v. 44, p. 293-299, 1991.
- WOOLFE, G.; MACDONALD, A.D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol). **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 80, p. 300-307, 1944.
- WU, J.; LIN, Q.; MCADOO, D.J.; WILLIS, W.D. Nitric oxide contributes to central sensitization following intradermal injection of capsaicin. **Neuroreport.**, v. 9, p. 589-592, 1998.
- YAMAMOTO, T.; UAKSH, T.L. Spinal pharmacology of thermal hyperalgesia induced by incomplete ligation of sciatic nerve: excitatory amino acids. **Pain.**, v. 49, p. 121-128, 1992.
- YASHPAL, K.; PITCHER, G.M.; PARENT, A.; QUIRION, R.; CODERRE, T.J. Noxious thermal and chemical stimulation induce increases in ³H-phorbol 12,13-dibutyrate binding in spinal cord dorsal horn as well as persistent pain and hyperalgesia, which is reduced by inhibition of protein kinase C. **J. Neurosci.**, v. 15, p. 3263-3272, 1995.
- YASHPAL, K.; MASON, P.; MCKENNA, J.E.; SHARMA, S.K.; HENRY, J.L.; CODERRE, T.J. Comparison of the effects of treatment with intrathecal lidocaine given before and after formalin on both nociception and Fos expression in the spinal cord dorsal horn. **Anesthesiology.**, v. 88, p. 157-164, 1998.
- YASHPAL, K.; FISHER, K.; CHABOT, J.G.; CODERRE, T.J. Differential effects of NMDA and group I mGluR antagonists on both nociception and spinal cord protein kinase C translocation in the formalin test and a model of neuropathic pain in rats. **Pain.**, v. 94, p. 17-29, 2001.
- ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain.**, v. 16, p. 109-110, 1983.
- ZHOU, S.; BONASERA, L.; CARLTON, S.M. Peripheral administration of NMDA, AMPA or KA results in pain behaviors in rats. **Neuroreport.**, v. 7, p. 895-900, 1996.

7. ANEXOS



A sesquiterpene drimane with antinociceptive activity from *Drimys winteri* bark

Angela Malheiros^a, Valdir Cechinel Filho^b, Clarisse B. Schmitt^a, Adair R.S. Santos^b, Cristiano Scheidt^c, João B. Calixto^c, Franco Delle Monache^d, Rosendo A. Yunes^{a,*}

^aDepartamento de Química, Campus Universitário, Trindade, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

^bNúcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas (NIQFAR)/CCS, Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), 88302-202, Itajaí, SC, Brazil

^cDepartamento de Farmacologia, Campus Universitário, Trindade, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

^dCentro Chimica Recettori, CNR, Università Cattolica Del Sacro Cuore, Largo F. Vito 1, 00168, Rome, Italy

Received 8 March 2000; received in revised form 20 November 2000

Abstract

Along with three known drimanes, polygodial, 1-β-(*p*-methoxycinnamoyl) polygodial and mukaadial, the sesquiterpene drimane named drimanal was isolated from the bark of *Drimys winteri* (Winteraceae). Its structure was elucidated based on spectroscopic evidence. Drimanal exhibited antinociceptive action against acetic acid induced pain, being about 3-fold less active than polygodial. © 2001 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Drimys winteri*; Winteraceae; Antinociception; Sesquiterpene drimane; Drimanal

1. Introduction

Drimys winteri (J.R. Forst and G. Forst) is a plant used in the folk medicine of many countries, including Brazil, to treat several ailments, such as inflammatory and dolorous processes (Houghton and Manby, 1985). Phytochemical studies have demonstrated that this plant contains mainly sesquiterpenes of the drimane type (Cruz and Silva, 1973; Sierra et al., 1986; Brown, 1994; Cechinel Filho et al., 1998), and flavonoids (Cruz and Silva, 1973; Williams and Harvey, 1982; Reyes et al., 1990; Torres et al., 1992; Cechinel Filho et al., 1998). These drimanes have attracted particular interest because of their anti-feedant, plant growth regulation, cytotoxic, antimicrobial and insecticidal properties (Jansen and Groot, 1991).

In previous studies, we showed that the hydroalcoholic extract obtained from *D. winteri* bark exhibits anti-asthmatic, anti-allergic, anti-inflammatory and antinociceptive effects (El Sayah et al., 1997; Tratsk et al., 1997; Mendes et al., 1998). These effects were related, at least partially,

to the presence of polygodial (1), a sesquiterpene drimane, which is the main component of the plant (Cechinel Filho et al., 1998; El Sayah et al., 1998; Mendes et al., 1998; Andre et al., 1999; Mendes et al., 2000; El Sayah et al., 2000)

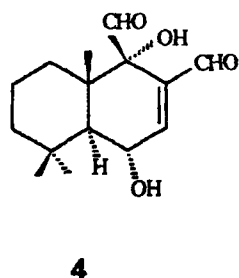
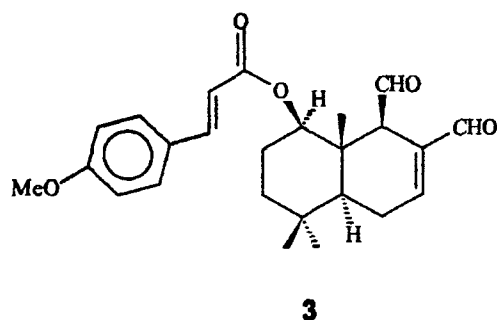
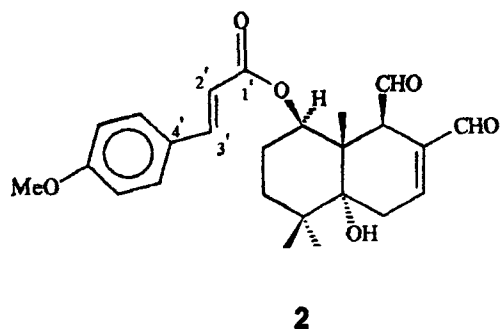
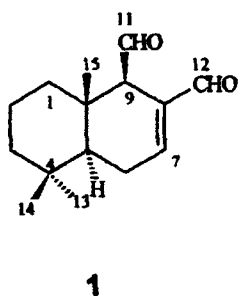
In the present study, we have investigated other components present in the *D. winteri* bark and isolated a new compound named drimanal (2), together with polygodial (1), 1-β-(*p*-methoxycinnamoyl) polygodial (3) and mukaadial (4). The preliminary antinociceptive effect of drimanal was analyzed against acetic acid induced pain in mice.

2. Results and discussion

Drimanal 2 (C₂₅H₃₀O₆) displays a ¹H NMR spectrum with signals for two aldehydes (δ 9.36, *s* and δ 9.78, *d*, *J*=3.3 Hz), one olefinic proton (δ 7.04), three methyl singlets (δ 1.06, 1.17 and 1.23) and a *p*-methoxycinnamoyl residue (δ 3.86, *s*, OMe; δ 7.64 and 6.99, *d*, *J*=8.9 Hz, 2 H each; δ 7.60 and 6.25, *d*, *J*=16 Hz). The complete assignment of ¹H, ¹³C NMR parameters for 2 are reported in Table 1 and are the result of one and two bond HETCOR experiments (Table 2). Comparison of

* Corresponding author. Tel.: +55-48-331-9219; fax: +55-48-331-9711.

E-mail address: ryunes@qmc.ufsc.br (R.A. Yunes).



the ^{13}C NMR spectral data with those of 1- β -(*p*-methoxycinnamoyl) polygodial **3**, $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{O}_5$ (Table 1), there was an additional oxygen present in drimaniol in position 5. The paramagnetic shift of the signals due to C-4,

C-6 and C-10 (α effect), and the diamagnetic shift observed for the signals to C-3, C-7 and C-9 (β effect) support this assignment. The correctness of the assigned structure for drimaniol (**2**) and of the NMR spectral parameters was further supported by the long-range connectivity reported in Table 2. In particular, in the long range NMR spectrum, the resonance at δ 78.1 assigned to C-5 shows a cross peak with Me-13; conversely, in the

Table 1
NMR spectral data for compounds **2** and **3** in acetone- d_6 ^a

Position	^1H	^{13}C	
		2	3
1	5.35 <i>dd</i>	77.6	81.5
2	1.82 <i>m</i>	25.0	24.9
3	2.04; 1.27 <i>m</i>	35.1	39.8
4		38.9	33.3
5		78.1	49.0
6	2.93 <i>dt</i> ; 2.52 <i>dddd</i>	32.6	27.5
7	7.04 <i>q</i>	150.7	153.5
8		141.4	140.7
9	3.73 <i>br s</i>	56.3	60.2
10		47.4	42.8
11	9.78 <i>d</i>	201.2	200.3
12	9.36 <i>s</i>	193.2	193.2
13	1.06 <i>s</i>	27.7	32.7
14	1.23 <i>s</i>	25.6	22.2
15	1.17 <i>s</i>	13.5	10.9
1'		166.4	166.4
2'	6.35 <i>d</i>	116.7	116.6
3'	7.60 <i>d</i>	145.2	145.3
4'		127.9	127.9
5', 9'	7.64 <i>d</i>	130.8	130.9
6', 8'	6.99 <i>d</i>	115.2	115.2
7'		162.5	162.5
Ome	3.86 <i>s</i>	55.6	55.7
OH	3.80 <i>s</i>		

^a J (Hz): J_{1-2} , 11.6 and 4.9; $J_{6\text{gem}}$, 20.0; J_{6-7} , 5.5 and 1.8; J_{11-9} , 3.3; J_{2-3} , 16.0; J_{5-6} , J_{8-9} , 8.9.

Table 2
Long-range connectivities for compound **2**

C-H ^a	H-C ^b
C-3	1.06 (MeH-13) H-1 166.4 (C-1'), 56.3 (C-9), 47.4 (C-10), 13.5 (Me-15)
C-4	1.06 (MeH-13) H ₂ -6 150.7(C-7), 141.4 (C-8) 1.23 (MeH-14) 47.4 (C-10), 78.1 (C-5)
C-5	1.06 (MeH-13) H-11 141.4 (C-8)
C-10	1.17 (MeH-15) H-12 56.3 (C-9)
C-7'	7.64 (H-5'/H-9') MeH-13 78.1(C-5), 38.9 (C-4) 35.1 (C-3)
C-4'	6.99 (H-6'/H-8') MeH-14 78.1(C-5), 38.9 (C-4) 35.1 (C-3) MeH-15 78.1(C-5), 77.6 (C1) 56.3 (C-9), 47.4 (C-10)

^a Long range HETCOR.

^b Selective INEPT experiments.

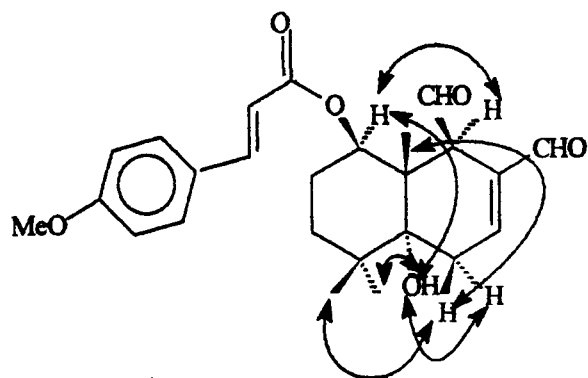


Fig. 1. DIF NOE compound 2.

Table 3

Antinociceptive action of polygodial 1, drimaniol 2 and 1- β -(*p*-methoxycinnamoyl) polygodial 3 isolated from *Drimys winteri* bark against acetic acid induced abdominal constriction in mice

Compound	ID ₅₀ (μ mol/kg, i.p.) ^a	MI (%) ^b
Polygodial 1 ^c	3.6 (2.6–5.0)	90 \pm 3
Drimaniol 2	11.0 (10.3–11.5)	92 \pm 3
1- β -(<i>p</i> -methoxycinnamoyl) polygodial 3 ^c	16.0 (12.0–21.0)	93 \pm 3
Aspirin ^d	133.1 (73.0–243.3)	83 \pm 2
Acetaminophen ^d	125.0 (104.0–250.0)	88 \pm 1

^a With their respective 95% confidence limits.

^b Maximal inhibition, MI.

^c Data from Cechinel Filho et al., 1998.

^d Data from Vaz et al., 1996.

INEPT experiments, the selective irradiation of each methyl signal (δ 1.23, δ 1.17 and δ 1.06) gave a response, inter alia, to the quaternary oxygenated carbon. Finally, the difference NOE spectra (Fig. 1) indicated that H-9, H-1, Me-13 and OH-5 are on the same side of the molecule, establishing the stereochemistry of 2 (Vichnewski et al., 1986).

Polygodial 1 and mukaadial 4 were identified by comparison of the spectral data with that reported in the literature (Brown, 1994; Mashimbye et al., 1999). However, mukaadial is reported for the first time in this genus. No reports were found on the ¹³C NMR for 1- β -(*p*-methoxycinnamoyl) polygodial 3 (Ferreto et al., 1988). Thus, the ¹³C NMR spectral data for 3 are presented in Table 1 in this paper.

The *in vivo* pharmacological studies revealed that drimaniol (2) produced a dose-related and almost complete inhibition of abdominal constrictions elicited by acetic acid. At the ID₅₀ level, drimaniol exhibited the same potency as 1- β -(*p*-methoxycinnamoyl) polygodial but it was about 3-fold less potent than polygodial in antagonizing acetic acid-induced nociception. However, drimaniol was about 11- to 12-fold more potent than the positive control drugs aspirin and acetaminophen (Table 3).

In conclusion, results of the current study and those previously reported by our group indicated that a mixture of at least 3 sesquiterpenes, identified as being polygodial, 1- β -(*p*-methoxycinnamoyl) polygodial and drimaniol, seem to be the main constituents present in the bark of the plant *Drimys winteri*, being responsible for the remarkable antinociceptive, anti-inflammatory and anti-allergic actions reported by the crude extract of this plant (Tratsk et al., 1997; Mendes et al., 1998, 2000). Considering the relatively higher concentrations of polygodial and to a lesser extent, drimaniol in the bark of *D. winteri*, it can be suggested that the 2 sesquiterpenes are the most relevant active compounds and responsible for the major pharmacological action of the plant.

3. Experimental

3.1. General experimental procedures

Optical rotations were recorded on a polarimeter Schmidt + Haensch Polartronic E Eloptron. IR spectra were recorded on FTIR 16 PC Perkin-Elmer apparatus (KBr film). ¹H (300 MHz) and ¹³C (75.5 MHz) NMR were determined on a Varian Gemini 300 Spectrometer in acetone-*d*₆ with TMS as internal standard. MS were recorded on a Shimadzu-14 spectrometer in the electron impact mode (EI-MS) at 70 eV. Elemental analysis was determined in elemental CHN Perkin-Elmer 2400. CC: silica gel 60 (230–400 mesh); TLC: silica gel plates F₂₅₄ (0.25 mm in thickness).

3.2. Plant material

Drimys winteri (Winteraceae) was collected in Bom Retiro (State of Santa Catarina, Brazil) in January 1994 and identified by Professor Leila da Graça Amaral (Department of Botany, Universidade Federal de Santa Catarina). A voucher specimen was deposited in the Herbarium Flor (UFSC) under number 26313.

3.3. Isolation

Air-dried powdered bark (1.5 kg) was extracted at room temperature with CHCl₃ for 7 days. Solvent was removed (in vacuo) to obtain the CHCl₃ extract (27 g). The extract was roughly fractionated by silica gel CC, eluting with *n*-hexane, EtOAc, MeOH mixtures of increasing polarity. Extended purification of the fraction eluted with hexane–EtOAc 9:1 yielded polygodial 1 (2.53 g). In a similar manner, the fraction eluted with hexane–EtOAc 8:2 gave mukaadial 4 (17 mg), hexane–EtOAc 6:3 gave 1- β -(*p*-methoxycinnamoyl) polygodial 3 (25 mg), and that eluted with hexane–EtOAc 1:1 afforded drimaniol 2 (362 mg).

3.4. Acetic acid-induced abdominal constriction

Non-fasted male Swiss mice (25–35 g), housed at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ under a 12-h light/12 h-dark cycle and with access to food and water ad libitum, were acclimatised to the laboratory for at least 1 h before testing and were used throughout the experiments. The abdominal constrictions resulting from intraperitoneal injection of acetic acid (0.6%), consisting of a contraction of the abdominal muscle together with a stretching of hind limbs, was carried out according to the procedure described previously (Vaz et al. 1996; Mendes et al., 1998). Animals (6 to 8 per group) were treated with different doses of drimaniol (2.3–23.5 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) or with vehicle (Tween 80 plus 0.9% NaCl solution) used to dilute the sesquiterpene (10 ml/kg, i.p.), 30 min prior to injection of acetic acid. Antinociceptive activity was expressed as the reduction in the number of abdominal constrictions, i.e. the difference between the control animals (vehicle pre-treated mice) and the mice pre-treated with drimaniol.

3.5. Statistical analysis

Results are presented as mean \pm S.E.M., except the ID_{50} values (i.e. the dose of drugs reducing the nociceptive response by 50% relative to control value), which are reported as geometric means accompanied by their respective 95% confidence limits. The ID_{50} values were determined by linear regression from individual experiments using linear regression Graph Pad software (Graph Pad Software, San Diego, CA). The statistical significance between groups was performed by ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test. P values less than 0.05 ($P < 0.05$) were considered as indicative of significance.

3.6. Drimaniol 2

Amorphous powder. Mp $95\text{--}97^\circ$, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 43.2^\circ$ (CHCl_3 ; c 0.926), IR ν_{max} cm^{-1} : 3482, 2928, 2854, 2732, 1710, 1682, 1632 and 1602. ^1H NMR (300 MHz, acetone- d_6) and ^{13}C NMR (75.5 MHz, acetone- d_6) in Table 1. IEMS: m/z (rel. int.) 426 [M^+] (1.2), 398 (0.5), 380 (0.5), 202 (7.6), 178 (25), 161 (100), 145 (12), 133 (13.6), 118 (7.6), 91 (6.5), 77 (7.6). Elemental analysis results, found: C, 70.25; H, 7.15. $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{O}_6$ requires: C, 70.40; H, 7.09%.

3.6.1. 1- β -(*p*-Methoxycinnamoyl) polygodial 3

^1H NMR (300 MHz, acetone- d_6) δ 9.71 (1H, *d*, $J = 3.3$ Hz, H-11), 9.35 (1H, *s*, H-12), 7.65 (2H, *d*, $J = 9.0$ Hz, H-5', H-9'), 7.60 (1H, *d*, $J = 16.0$ Hz, H-3'), 7.22 (1H, *q*, H-7), 7.00 (2H, *d*, $J = 9.0$ Hz, H-6' and H-8'), 6.37 (1H, *d*, $J = 16.0$ Hz, H-2'), 4.88 (1H, *dd*, $J = 11.0$ and 4.0 Hz, H-1), 3.83 (3H, *s*, OMe), 3.30, (1H, *br s*, H-9), 2.52 (2H, *m*, H-6), 2.05 (H-3a, partially overlapped by the solvent) 1.80 (2H, *m*, H-2), 1.56 (2H, *m*, H-5), 1.28 (1H, *m*, H-3b)

1.09 (3H, *s*, Me 13), 1.03 (3H, *s*, Me 14), 0.98 (3H, *s*, Me 15). ^{13}C NMR (75.5 MHz, acetone- d_6) in Table 1. IEMS: m/z (rel. int.) 410 [M^+] (2), 328 (25), 178 (40), 161 (100), 43 (70). Elemental analysis results, found: C, 73.02; H, 7.46. Calc. for $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{O}_5$: C, 73.14; H, 7.37%.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr. Leila da Graça Amaral (Department of Botany, UFSC, Florianópolis) for classification of the plant. The work was supported by grants from CNPq and FINEP, Brazil.

References

- André, E., Malheiros, A., Cechinel Filho, V., Yunes, R.A., Calixto, J.B., 1999. Mechanisms underlying the endothelium-dependent and independent relaxation caused by the sesquiterpene polygodial in vessels from rabbit and guinea-pig in vitro. *European Journal of Pharmacology* 386, 47–53.
- Brown, G.D., 1994. Drimenol, a sesquiterpene from *Drimys winteri*. *Phytochemistry* 35 (4), 975–977.
- Cechinel Filho, V., Schlemper, V., Santos, A.R.S., Pinheiro, T.R., Yunes, R.A., Mendes, G.L., Calixto, J.B., Delle Monache, F., 1998. Isolation and identification of active compounds from *Drimys winteri* barks. *J. Ethnopharmacol.* 62, 223–227.
- Cruz, A., Silva, M., 1973. Further terpenoids and phenolics of *Drimys winteri*. *Phytochemistry* 12, 2549–2550.
- El Sayah, M., Cechinel Filho, V., Yunes, R.A., Calixto, J.B., 1997. Action of the extract of *Drimys winteri* on contraction induced by inflammatory mediators, compound 40/80 and ovalbumin of the guinea pig trachea in vitro. *Gen. Pharmacol.* 28, 699–704.
- El Sayah, M., Cechinel Filho, V., Yunes, R.A., Pinheiro, T.R., Calixto, J.B., 1998. Action of polygodial, a sesquiterpene isolated from *Drimys winteri* in the guinea pig ileum and trachea in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* 344, 215–221.
- El Sayah, M., Cechinel Filho, V., Yunes, R.A., Malheiros, A., Calixto, J.B., 2000. Action of polygodial on agonist induced contraction of the rat portal vein in vitro. *J. Cardiovas. Pharmacol.* 35 (4), 670–675.
- Ferreto, L., Ciccio, J.F., Castro, V., Andrade, R., 1988. Drimane derivatives from *Drimys granadensis* L. F. (Winteraceae). *Spectroscopy Int. J.* 6, 133–136.
- Houghton, P.J., Manby, J., 1985. Medicinal plants of the Mapuche. *J. Ethnopharmacol.* 13, 89–103.
- Jansen, B.J.M., Groot, A., 1991. The occurrence and biological activity of drimane sesquiterpenoids. *Nat. Prod. Rep.* 8 (3), 309–318.
- Mashimbye, M.J., Maumela, M.C., Drewes, S.E., 1999. A drimane sesquiterpenoid lactone from *Warburgia salutaris*. *Phytochemistry* 51, 435–438.
- Mendes, G.L., Santos, A.R.S., Campos, M.M., Tratsk, K.S., Yunes, R.A., Cechinel-Filho, V., Calixto, J.B., 1998. Anti-hyperalgesic properties of the extract and the main sesquiterpene polygodial isolated from the barks *Drimys winteri*. *Life Sciences* 63 (5), 369–381.
- Mendes, G.L., Santos, A.R.S., Malheiros, A., Cechinel Filho, V., Yunes, R.A., Calixto, J.B., 2000. Assessment of mechanisms involved in antinociception caused by sesquiterpene polygodial. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292, 164–172.
- Reyes, A., Reyes, M., Alveal, A., García, H., 1990. Compuestos fenolicos de *Drimys winteri* Forst variedad andina. *Rev. Latinoam. Quim* 2 (1), 42.

- Sierra, J.R., López, J.T., Cortés, M.J., 1986. (–)-3 β -Acetoxydrimenin from the leaves of *Drimys winteri*. *Phytochemistry* 25 (1), 253–254.
- Torres, R., Pardo, F., Velasco, M.V., 1992. Flavonoid from *Drimys winteri*. *Fitoterapia* 6, 553–558.
- Tratsk, K.S., Campos, M.M., Vaz, Z.R., Cechinel Filho, V., Schlemper, V., Yunes, R.A., Calixto, J.B., 1997. Anti-allergic effects and oedema inhibition caused by the extract of *Drimys winteri*. *Inflamm. Res.* 46, 509–514.
- Vaz, Z.R., Cechinel Filho, V., Yunes, R.A., Calixto, J.B., 1996. Antinociceptive action of 2-(4-bromobenzoyl)-3-methyl-4,6-dimethoxybenzofuran, a novel xanthoxylone derivative on chemical and thermal models of nociception in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 278, 304–312.
- Vichnewki, W., Kulanthaivel, P., Herz, W., 1986. Drimane derivatives from *Drimys brasiliensis*. *Phytochemistry* 25 (6), 1476–1478.
- Williams, C.A., Harvey, W.J., 1982. Leaf flavonoid patterns in the Winteraceae. *Phytochemistry* 21 (2), 329–337.

Expert Opinion

1. Introduction
2. Examples of plants that have contributed to the development of modern analgesic drugs
3. New naturally-occurring substances from plants with antinociceptive properties
4. Preliminary antinociceptive studies with several extracts and compounds isolated from plants
5. Expert opinion

Central & Peripheral Nervous Systems

Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs

João B Calixto, Cristiano Scheidt, Michel Otuki & Adair RS Santos
Department of Pharmacology, CCB, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brazil

The plant-derived secondary metabolites have, over the years, greatly contributed to our current understanding of the important mechanisms related to the process of pain transmission and treatment. Furthermore, they have permitted us to characterise receptor types and identify endogenous ligands involved in the mechanism of nociception. In this review, we discuss the recent advances that have occurred regarding plant-derived substances in the process of development of new analgesic drugs. Plants such as *Papaver somniferum*, *Cannabis sativa* and those of the *Capsicum* and *Salix* species, have greatly accounted for the development of clinically relevant drugs which are useful for the management of pain disorders. The recent advances in our understanding of the mechanisms of action of the above plant-derived substances, together with use of molecular biology techniques, have greatly accelerated attempts to identify promising targets for the discovery of new, safe and efficient analgesic drugs. Despite the great progress which has occurred in the elucidation of pain transmission and despite decades of use, leaving aside its known undesirable side effects, morphine continues to be one of the most used drugs in clinical practice for the treatment of pain disorders. Thus, safer and more efficacious analgesic drugs are urgently needed. A search through the literature reveals that many potentially active antinociceptive plant-derived compounds have been identified. However, studies aiming to investigate their cellular and molecular mechanisms of action and well-controlled clinical trials to prove their efficacy in humans are still lacking. Nevertheless, natural or synthetic substances that bind to vanilloid or cannabinoid receptors, or even those that are capable of modulating the endogenous ligands which bind to these receptors, are expected to soon appear to assist in the treatment of several pain disorders, including those of neuro-pathic or neurogenic origin.

Keywords: analgesia, herbal drugs, medicinal plants, natural compounds, nociception

Expert Opin. Emerging Drugs (2001) 6(2):

1. Introduction

Natural products, including those derived from plants, have over the years largely contributed to the development of modern therapeutic drugs. Certainly, modern therapy and much of our current understanding regarding the complex cellular and molecular mechanisms of drug action at receptors, enzymes, ionic channels, as well as the discovery of new relevant targets for drug development, could not have been achieved without the important role played by natural products, especially those derived from higher plants. To date, many important drugs on the market have been obtained directly or indirectly from natural sources, for example: morphine, pilocarpine, digitalis, quinine, artemisinin, atropine, scopolamine and captopril; many drugs used in the treatment of cancer, such as vinblastine, vincristine and paclitaxel; and also many antibiotics and immunosuppressor agents [1-7]. The worldwide mar-

Ashley Publications
 www.ashley-pub.com



ket of the above mentioned group of drugs reaches several billion US dollars. It is estimated that about 40% of all medicines on the market today have been derived directly or indirectly from natural sources, 25% being from plants, 13% from microorganisms and 3% from animals [1,8-12]. However, so far the relevance of natural products, particularly the plant-derived substances as a source of new drugs, remains poorly explored. It is estimated that about 250,000 plant species exist worldwide but only a small number of them have been the subject of any sort of scientific investigation. About 140,000 secondary metabolites, mainly derived from higher plants, have been isolated and chemically identified [3]. Despite this progress, the majority of naturally-occurring substances continue to remain largely unexplored from the point of view of their pharmacological activity.

In this review article, recent advances regarding the contribution of higher plants in the process of development of new drugs for the relief of pain disorders are highlighted.

2. Examples of plants that have contributed to the development of modern analgesic drugs and to our understanding of the molecular mechanisms of pain transmission

2.1 *Papaver somniferum*

There is compelling evidence indicating that *Papaver somniferum* Papaveraceae (popularly known as opium poppy or keshi) has been used as an analgesic since 3000 BC (for review see [13-15]). Despite the growing use of *Papaver somniferum* as a painkiller, it was only in 1905 that the German scientist Sertürner first isolated the main analgesic constituent from this plant, the alkaloid morphine. Besides morphine, the opium latex contains many other alkaloids, including codeine, thebaine, papaverine etc. [13,14,16,17]. However, the mechanism of analgesic action of the alkaloid morphine was largely unknown until the last century when the existence of the endogenous peptide opioids, such as β -endorphin, met-enkephalin and dynorphin, was first reported [14,17-19]. Later, several groups dramatically extended our understanding concerning the mechanism underlying the analgesic action of opioid drugs by discovering three classical mammalian opioid receptors named μ , δ and κ . Recently, the genes encoding these receptors were cloned and were found to be members of seven transmembrane G-protein coupled receptors [15,17-21]. Despite the intense interest in finding safe, efficacious and non-addictive new analgesic drugs that are free of undesirable side effects, morphine and its analogues continue to be some of the most used drugs in clinical practice today.

2.2 *Salix* species

About 500 species of plants belonging to the genus *Salix* (Salicaceae), popularly known as willow, exist in many parts of the world. These plants have been used since remote times in traditional medicine as antipyretics and in the management of rheumatism. However, only in 1838 did Leroux first isolate

from the willow barks the main active principle known as salicin. Salicylic acid was later used as an external antiseptic and antipyretic, and as a treatment for rheumatism and gout. Other constituents, such as the phenolic glycosides salicortin, fragilin and tremulacin have also been isolated from the willow species [22]. However, the real milestone in the discovery of modern non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) was the synthesis made by Dreser in 1899 [23] of the acetylsalicylic acid, named aspirin, derived from salicylic acid [24-26]. To date, the NSAIDs continue to be extensively used in therapy for the management of inflammatory and nociceptive disorders, including rheumatism, osteoarthritis (OA), headache, acute and chronic pain, dental surgery etc. Vane [27], who discovered that the mechanism by which aspirin exerts its anti-inflammatory and antinociceptive effects derives from its ability to inhibit the enzyme cyclooxygenase (COX), which is responsible for the formation of prostanoid from arachidonic acid pathway, remarkably increased our understanding of the mechanism of action of NSAIDs and also the interest of the pharmaceutical companies in developing safer and more efficacious NSAIDs. In the early 1990s, several groups of investigators reported the existence of a new COX enzyme named COX-2 [28-30]. While COX-1 is present in a constitutive form, COX-2 enzyme is normally, but not exclusively, expressed in an inducible manner in certain inflammatory and pain disorders. The discovery of COX-2 enzymes permitted a great advance in our understanding of the mechanism by which some NSAIDs exert their effects. In addition, it was also reported that at least part of the therapeutic effect of salicylic acid and aspirin was a consequence of their ability to inhibit COX-2 induction. Furthermore, new selective and less toxic NSAIDs known as COX-2 inhibitors (e.g., rofecoxib and celecoxib) have been developed and recently launched on the market to treat inflammatory and pain disorders.

Extracts of the bark of *Salix* (willow) species have also been used for fever, mild rheumatic complaints and pain, including mild headache [25,31,32]. The extract is available in various forms (hydroalcoholic or aqueous extracts, dried or as tinctures or solutions). The principal active ingredient is salicin, which is the prodrug of various salicylate derivatives [25,33]. It has been reported recently that willow bark extract (standardised to yield 240 mg of salicin) was able to induce a moderate analgesic effect in patients with OA when compared with placebo, in a double-blind, randomised controlled trial [34]. Furthermore, Chrubasik *et al.* [35] showed that the willow bark extract was also effective in the management of musculoskeletal pain, including low back pain, in a randomised double-blind study. In addition, these authors demonstrated that willow bark extract induces low incidence of adverse events, suggesting that the extract may be an effective alternative, especially in patients who cannot tolerate NSAIDs [35].

2.3 *Cannabis sativa*

Preparations from the herb *Cannabis sativa* (Moraceae) have been used as a natural therapeutic remedy since antiquity in

the treatment of various ailments. The use of marijuana for medical purposes can be traced back 5000 years [36,37]. The *Cannabis* plant contains a complex mixture of substances that includes at least 60 different cannabinoids, some of which have been shown to present several pharmacological activities such as antinociceptive actions, anti-emetic and anticonvulsive actions, hypothermia, hyperactivity, lowering of intraocular pressure and immunosuppressive actions [38-42]. The earlier phytochemical studies revealed that the active principle of *Cannabis* was an unidentified mixture of isomers of tetrahydrocannabinols (THC) [43]. In 1964, a pure compound was isolated from *C. sativa*, called (-)- Δ^9 -*trans*-THC. It has also been reported that another constituent cannabidiol isolated from *C. sativa* exerts important anti-inflammatory activity (for review see [39]).

Pharmacological and biochemical studies have suggested that THC and other active cannabinoids might act at specific receptor sites. To date, two cannabinoid receptors have been cloned, CB₁ and CB₂ [45,45]; and they were found to belong to the seven transmembrane G-protein coupled receptors. CB₁ receptors are expressed in neurones of both the central and peripheral nervous system, whereas CB₂ receptors are found centrally and peripherally in non-neuronal tissues, mainly in immune cells. CB₁ receptors are found both on C-fibres and on longer diameter A β /A δ -fibres and are co-localised with substance P and calcitonin gene-related peptide and to a lesser extent with somatostatin (for recent review see [46]).

However, the relevance of cannabinoids in controlling most physiological processes and also the medical interest in *C. sativa* or in its active principle, THC, has occurred with the discovery of endocannabinoids (i.e., anandamide and palmitoylethanolamine, among others) isolated in the early 1990s (for review see [39-42,46,47]), all of which are derivatives of polyunsaturated fatty acids [39,40,42]. Both anandamide and palmitoylethanolamine activate the two known cannabinoid receptor subtypes identified so far, the CB₁ and CB₂ receptors. It is believed that the endogenous cannabinoids act as neurotransmitters which are capable of controlling neuronal excitability [40,41,48,49].

Cannabis preparations have been described in Indian folklore medicine as a remedy for inflammation, chronic pain and asthma [50]. However, clinical data indicating whether marijuana has analgesic properties is weak, as a result of the restricted availability of the plant. According to Noyes *et al.* [51], orally administered THC was analgesic in patients suffering from advanced cancer who had pain associated with their disease but the treatment was accompanied by some undesirable side effects, such as sedation and mental clouding. However, THC was able to induce a significant reduction of the chronic relapsing pain in patients with familial Mediterranean fever [52]. There is a wide range of possibilities for the use of cannabinoids in pain treatment but until adequate and well-controlled double-blind clinical trials can be conducted, the therapeutic exploitation of cannabinoids will remain no more than a promising area (for review see [41,53]).

Animal studies show that the most important constituents present in the *C. sativa* THC and some synthetic derivatives possess interesting pharmacological properties according to experiments carried out in several models of nociception. Cannabinoid CB₁ receptor agonists produce antinociception in several animal models of acute pain when injected either peripherally or directly into the spinal cord or into the brain areas. The antinociception caused by THC is selectively prevented by CB₁ but not CB₂, selective receptor antagonists [54,55]. Similar antinociceptive action has been reported from the use of the crude extract of the plant [54]. Several central sites for the antinociceptive action of THC have been proposed, including the periaqueductal grey, the amygdala and the rostral ventrolateral medulla [56]. It has also been demonstrated that endogenous cannabinoids are tonically released and might modulate the nociceptive threshold at the level of the rostral ventrolateral medulla [57]. Besides the central site of action for cannabinoids, Calignano *et al.* [58,59] have proposed that cannabinoid agonists produce antinociception through an action at the peripheral level. It has been reported that the level of anandamide increases significantly in inflammatory pain in the periaqueductal grey area in the brain [56]. Therefore, it is believed that one of the most relevant physiological roles of the endocannabinoid system is related to its ability to suppress tonic pain.

Definitive evidence that endogenous cannabinoids exert a critical role in controlling pain transmission derives from the recent demonstration that the generation of CB₁ receptor knockout mice failed to produce antinociception by administration of CB₁ agonist, although the basal nociceptive threshold was not altered [60]. Bridges *et al.* [61] and Fox *et al.* [62] have reported that synthetic cannabinoid CB₁ agonists were capable of attenuating the hyperalgesia and allodynia in the rat model of neuropathic pain, further suggesting the therapeutic potential of CB₁ receptor agonist in the management of pain disorders. Thalamic cannabinoid CB₁ receptor upregulation has recently been reported in a model of chronic neuropathic pain [63,64]. A recent and very interesting study reported by Wilson and Nicoll [65] has provided evidence indicating that endocannabinoids can be formed at postsynaptic neurones following physiological stimulus. They also reported that the cannabinoids can diffuse back from the stimulated cell and then act as receptors on presynaptic neurones. Thus, it has been proposed that endocannabinoids, acting *via* CB₁ receptors at presynaptic levels in both in excitatory and inhibitory neurones in certain brain regions, might control the release of neurotransmitters [66-69]. However, as CB₁ receptors are widely distributed in the brain areas and since the natural and synthetic cannabinoids have many pharmacological effects apart from their antinociceptive action (for example, they cause nausea, vomiting and appetite stimulation, besides interference with memory, cognition, co-ordination, mood etc.), the use of CB₁ selective agonist for the management of pain and migraine could be associated with the appearance of some of the undesirable side effects [37].

As discussed in the next section, a large amount of evidence now suggests that anandamide and its analogue methanandamide are able to activate the vanilloid receptors, including the human vanilloid receptors expressed in human embryonic kidney (HEK293) cells [70-73]. Recently, Tognetto *et al.* [74] have reported that anandamide is able to excite dorsal ganglion neurones *via* activation of vanilloid receptors. Furthermore, cannabinoids acting *via* CB₁ receptors have been found to inhibit capsaicin-induced calcium response in rat dorsal root ganglion neurones [75]. Thus, at least part of the antinociceptive action of anandamide could be associated with its ability to activate vanilloid receptors.

2.4 *Capsicum* species

The plants from the genus *Capsicum* have been widely used for medicinal purposes and as a food since ancient times. There is evidence for the use of the *Capsicum* species as far back as 7000 BC in Mexico and it is certainly one of the oldest cultivated plants in the world [76]. The *Capsicum* species belong to the family of Solanaceae and they originated in Central and South America. They are distributed throughout the world but only five species are widely cultivated: *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. pendulum* and *C. pubescens* [76]. The main active and pungent constituent present in the *Capsicum* species was first isolated by Thresh [77] who called it 'capsaicin'. Its chemical structure was determined by Nelson [78] as the trans-8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide. Capsaicin represents the main constituent of the total pungent acid amides present in the *Capsicum* species [79]. Capsaicin induces the excitation of nociceptive phase, characterised by a burning/pungent sensation, an effect which is followed by a longer-lasting analgesic and anti-inflammatory phase [80-83]. It has been reported that capsaicin specifically excites C and A δ fibres and causes, in turn, increases in calcium influx and the release of several inflammatory mediators, such as tachykinins, calcitonin-gene related peptide, somatostatin and glutamate. In addition, capsaicin is able to block the intra-axonal transport of macromolecules, mainly the neural growth factor [76].

Capsaicin is a commercially-available medicinal formulation and is used for the management of post-herpetic neuralgia, painful diabetic neuropathy, post-mastectomy pain syndrome and OA and rheumatoid arthritis (RA) (for review see [76]). In addition, capsaicin has also been used in clinical medicine to treat destrusor hyper-reflexia of spinal origin, bladder hypersensitivity, vasomotor rhinitis, notalgia paraesthetica etc. [76].

For decades, the presence of a vanillyl-like moiety was believed to be an essential requirement for capsaicin-like activity [80-83]. This was the main reason why capsaicin and its ultrapotent analogue, resiniferatoxin, which was originally isolated from the cactus-like plant *Euphorbia resinifera*, were collectively termed 'vanilloids' and the receptor at which they interacted was named the 'vanilloid (capsaicin) receptor' [76,83,84]. Compelling evidence now suggests that vanilloid

receptors represent an attractive therapeutic target. To date, one vanilloid receptor, VR1, has been cloned in rat and human dorsal root ganglion and in human embryonic kidney (HEK293) cells [85-88] and this receptor is found expressed at high level in dorsal root ganglion neurones. However, the heterogeneity of vanilloid-induced biological responses predicts the existence of VR1 isoforms, additional receptor subtypes, or both (for review see [76,83,84,89,90]). There is now evidence indicating the presence of VR1 in several brain regions, such as the cerebral cortex, limbic system, striatum, hypothalamus, substantia nigra, locus coeruleus and cerebellum [91].

The vanilloid receptors are permeable to divalent cations, mainly sodium and calcium, and are activated by capsaicin, heat or protons [85] (for review see [76,83,92]). Mice lacking vanilloid receptors (knockout mice) are badly responsive to both thermal and chemical noxious stimuli. The VR1 knockout mice show reduced hypersensitivity in the setting of inflammation. However, several kinds of pain sensation remain unchanged in VR1 knockout mice and VR1 seems not to be involved in the control of neuropathic pain [93,94]. Interestingly, Kamei *et al.* [95] have reported that, by using antivannilloid VR1 receptor serum, thermal allodynia and the hyperalgesia observed in diabetic mice are associated with the sensitisation of VR1 receptor in primary neurones in the spinal cord. Furthermore, the acute inflammation elicited by carrageenan induces bidirectional axonal transport of mRNA to the VR1 receptors along the primary afferents, suggesting the increase of VR1 receptors during inflammatory hyperalgesia [96]. In addition, VR1 receptors are believed to play a relevant role in the process of thermal hyperalgesia associated with inflammatory processes and tissue damage [94]. Recently, Yiangou *et al.* [97] have demonstrated the increased immunoreactivity of the high density of VR1 receptors in the nerve fibres of colonic tissues of patients with inflammatory bowel diseases. Such findings strongly suggest that the discovery of new drugs that could selectively interact with VR1 receptors and that are devoid of pungent activity might have potential therapeutic value in the treatment of inflammatory hyperalgesia.

There is an increasing amount of evidence suggesting a cross-talk between vanilloid and cannabinoid receptors. Thus, some vanilloid agonists including olvanil, AM404, arvanil and the proposed endogenous cannabinoid ligand anandamide, are capable of binding at VR1 and CB₁ receptors and inhibiting the anandamide membrane transporter. Furthermore, it has been shown that VR1 coexists with CB₁ receptors and also with the endogenous ligand anandamide, both in the brain nucleus and in certain sensory neurones [91] (for review see [46,83]). Thus, evidence now suggests that anandamide acts as an endogenous VR1 receptor ligand. Therefore, it is tempting to speculate that at least part of the antinociceptive and anti-inflammatory properties reported for some vanilloid agonists might be associated with their ability to interact with the endocannabinoid pathway.

It has been recently reported that many pungent and non-pungent terpenoids possessing an α,β -unsaturated 1,4-dialde-

hyde (3-formyl-3-butenal) functionality have been obtained from natural sources: the majority have been isolated from higher plants and fungi but some have also been derived from algae, liverworts, arthropods, sponges and molluscs. Some of such compounds have the ability to interact with vanilloid receptors (for review see [76,83,84,90]) and consequently might present a relevant target for the development of new useful therapeutic drugs, including new analgesics for the management of pain disorders (for review see [84]). It is well known that the vanilloid agonists can produce excitatory effects characterised by nociception and neurogenic inflammation, followed by a desensitisation. However, some agonists of VR1 receptor, for instance olvanil, presents analgesic action but fails to produce initial pain. In contrast, piperine has pungent action but does not cause desensitisation (for review see [83]). Therefore, it is expected that the development of vanilloid agonist without the pungent action of capsaicin, or modulators of endogenous vanilloids, might represent a relevant strategy for development of new therapeutically relevant pain killers. Recently, Lee *et al.* [98] have shown that some thiourea derivatives bind with very high affinities at the vanilloid receptor ($K_i \sim 11 - 19$ nM) and exhibit an extremely potent antinociceptive activity ($ED_{50} = 0.5 - 1$ μ g/kg). These compounds are about 300 - 600 times more potent but exhibit less pungent activity when compared with the naturally-occurring vanilloid agonist capsaicin. Such compounds represent a new and very interesting strategy for the development of useful new therapeutic analgesics.

2.5 *Panax ginseng*

The ginseng root has been used as a herbal medicine for a thousand years in China, Korea and Japan for the management of a wide variety of ailments [99,100]. Ginseng has been used to alleviate certain types of pain, such as toothache, abdominal pain, chest pain or neuralgia, in traditional folk medicine [99-101] (see Table 1). Seven major species of ginseng are distributed in East Asia, Central Asia and North America [99]. Most studies of ginseng (Araliaceae) have utilised constituents from three common species: *Panax ginseng* (Asian ginseng), *Panax quinquefolius* (American ginseng) and *Panax japonicus* (Japanese ginseng) [100].

Several classes of active naturally-occurring constituents are found in most ginseng species, such as the ginsenosides, polysaccharides, peptides, polyacetylenic alcohols and fatty acids [99-101]. More than 30 triterpene ginsenosides derivatives containing sugars have been isolated from the ginseng saponin fraction (for review see [100]). However, there is a wide variation (2 - 20%) in the ginsenoside content among the different species of ginseng [99].

Evidence now suggests that ginsenosides Rb and Rc (see Table 1) produce a sedative effect, whereas Rg ginsenosides show stimulatory actions on the CNS [99,100]. Ginsenosides and ginseng saponins are the main active molecules so far isolated from *P. ginseng*. Furthermore, there is evidence indicating that ginsenosides and their total ginseng saponins are

involved in pain modulation as well as in opioid-mediated antinociception and tolerance [102]. Given systemically, Rc, Rd, Re and Rf ginsenosides, but not Rb1 and Rg1 ginsenosides, induce antinociception according to assessment by the writhing and formalin tests but these compounds are destituted of analgesic effect according to the tail-flick and hot plate models of nociception [103,104]. The ginseng antinociceptive effects are not blocked by the opioid receptor antagonist naloxone and seem to be unrelated with non-specific motor dysfunction [104]. The antinociception caused by Rf in the absence of other obvious behavioural alterations suggests that this ginsenoside might be useful as a novel analgesic [103]. Furthermore, Sampson *et al.* [105] have shown that the methanolic extract of *P. ginseng* root caused concentration dependent inhibition of bradykinin (B_2 receptor) and neurokinin (NK_1) receptor binding. Such results suggest that at least part of the antinociception caused by ginseng could be related to B_2 and NK_1 receptor binding.

2.6 Feverfew

Tanacetum parthenium Schultz-Bip (Asteraceae) is a plant commonly known as 'feverfew' and is a popular herbal remedy used in the treatment of migraine, vertigo, fever, toothache and arthritis among others [106-108]. Previous phytochemical investigations of several species of plants belonging to the genus *Tanacetum*, namely *T. parthenium*, *T. serotinum*, *T. vulgare*, *T. macrophyllum* and *T. corymbosum*, have permitted the isolation and chemical characterisation of several sesquiterpene lactones, such as the eudesmanolide, germacranolide and guaianolide type, besides flavonoids, tannins etc. [109-111] (see Table 1). However, pharmacological studies have revealed that the antinociceptive action is probably associated with the presence of some of the sesquiterpene lactones, parthenolide, 3 β -hydroxyl parthenolide, canin and artecanin, which form an α -methylene butyrolactone moiety [112]. Parthenolide is considered to be the most important biologically-active constituent present in the feverfew extract [112]. Parthenolide has recently been found to be a potent inhibitor of transcription factor NF- κ B activation and the inducible nitric oxide synthase (iNOS) [107,113-115].

Apart from these actions, feverfew extracts have also been found to be capable of inhibiting platelet aggregation and prostaglandin, thromboxane and leukotriene production, through inhibition of the enzyme phospholipase A_2 [109-111]. The migraine prophylactic effects of feverfew have been confirmed by three independent, randomised double-blind, placebo-controlled studies [116-118]. In addition, prophylactic effects of feverfew have also been claimed with regard to a number of forms of arthritis [119-121]. However, another double-blind, placebo-controlled study has failed to confirm the beneficial use claimed for this plant [122]. Jain and Kulkarni [112] have reported that feverfew extract and its main active constituent, the sesquiterpene lactone parthenolide, produce antinociception and inhibition of oedema formation according to assessment against acetic acid-induced writhing in mice

Biological activity of plant extracts

Table 1. Pharmacological properties of some plant-derived compounds.

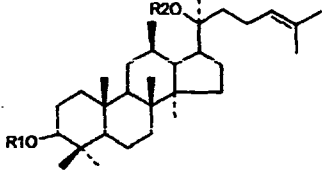
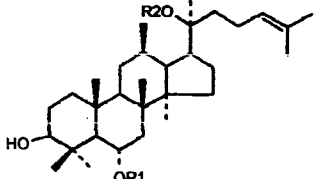
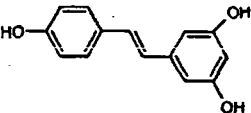
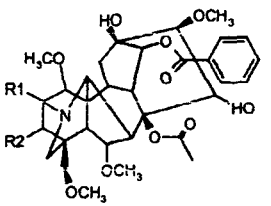
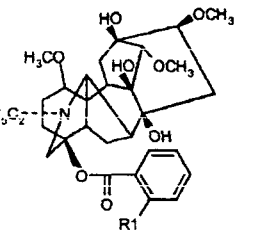
Plant	Compound	Activity	Reference												
Panax ginseng	<p>Ginsenosides: (Rc, Rd, Re and Rf)</p>  <p>R10 R20</p> <table border="1" data-bbox="450 622 680 705"> <tr> <td>Rc:</td> <td>Glc - ²Glc</td> <td>Are(f) - ⁶Glc</td> </tr> <tr> <td>Rd:</td> <td>Glc - ²Glc</td> <td>Glc</td> </tr> </table>  <p>OR1 R20</p> <table border="1" data-bbox="450 929 680 1019"> <tr> <td>Re:</td> <td>Rha - ²Glc</td> <td>Glc</td> </tr> <tr> <td>Rf:</td> <td>Glc - ²Glc</td> <td>H</td> </tr> </table>	Rc:	Glc - ² Glc	Are(f) - ⁶ Glc	Rd:	Glc - ² Glc	Glc	Re:	Rha - ² Glc	Glc	Rf:	Glc - ² Glc	H	Rc, Rd, Re and Rf induce antinociception in the writhing and formalin tests.	Mogil <i>et al.</i> [103] Shin <i>et al.</i> [104]
Rc:	Glc - ² Glc	Are(f) - ⁶ Glc													
Rd:	Glc - ² Glc	Glc													
Re:	Rha - ² Glc	Glc													
Rf:	Glc - ² Glc	H													
Grape berry red wine	<p>Resveratrol</p> 	Decreases hyperalgesia induced by carrageenan in the rat paw. Inhibited the COX-2 and iNOS induction in LPS-activated macrophages.	Gentili <i>et al.</i> [176] Martinez & Moreno [181] Matsuda <i>et al.</i> [182]												

Table 1. Pharmacological properties of some plant-derived compounds.

Plant	Compound	Activity	Reference												
Aconitum sp.	 <table border="1" data-bbox="450 616 722 712"> <thead> <tr> <th></th> <th>R1</th> <th>R2</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>aconitine</td> <td>C₂H₅</td> <td>OH</td> </tr> <tr> <td>mesaconitine</td> <td>CH₃</td> <td>OH</td> </tr> <tr> <td>3-acetylaconitine</td> <td>C₂H₅</td> <td>CH₃COO</td> </tr> </tbody> </table>		R1	R2	aconitine	C ₂ H ₅	OH	mesaconitine	CH ₃	OH	3-acetylaconitine	C ₂ H ₅	CH ₃ COO	Produce antinociception in several models of pain by activation of sodium channels.	Ameri [123] Gutser <i>et al.</i> [124]
		R1	R2												
aconitine	C ₂ H ₅	OH													
mesaconitine	CH ₃	OH													
3-acetylaconitine	C ₂ H ₅	CH ₃ COO													
 <table border="1" data-bbox="450 974 722 1064"> <thead> <tr> <th></th> <th>R1</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>lappaconitine</td> <td>NHCOCH₃</td> </tr> <tr> <td>N-deacetylappaconitine</td> <td>NH₂</td> </tr> </tbody> </table>		R1	lappaconitine	NHCOCH ₃	N-deacetylappaconitine	NH ₂									
	R1														
lappaconitine	NHCOCH ₃														
N-deacetylappaconitine	NH ₂														
Hedysmum brasiliense	13-Hydroxy-8,9-dehydroshizukanolide	Produces antinociception against acetic acid and capsaicin in mice and glutamate induced nociception.	Trentin <i>et al.</i> [132] unpublished results												
Feverfew (<i>Tanacetum parthenium</i>)	Parthenolide	Prevent the TNF- α -induced induction of I κ B kinase and IKK β . Inhibit inducible nitric oxide synthase gene and exhibits antinociceptive and anti-inflammatory effects in mice and rats.	Hehner <i>et al.</i> [114] Fukuda <i>et al.</i> [107] Wong & Menendez [113] Jain & Kulkarni [112]												

Biological activity of plant extracts

Table 1. Pharmacological properties of some plant-derived compounds.

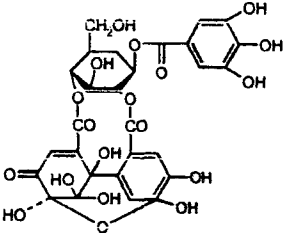
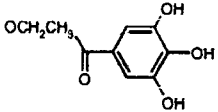
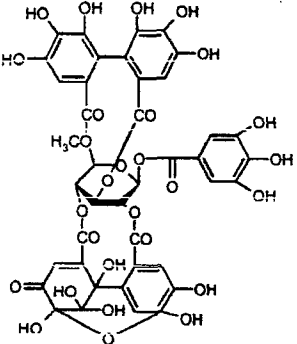
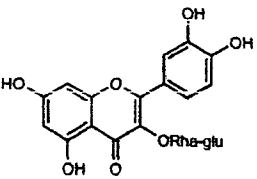
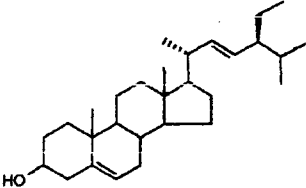
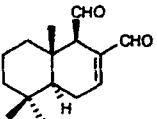
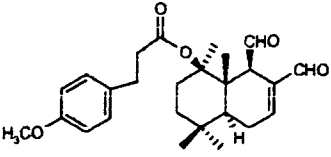
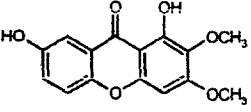
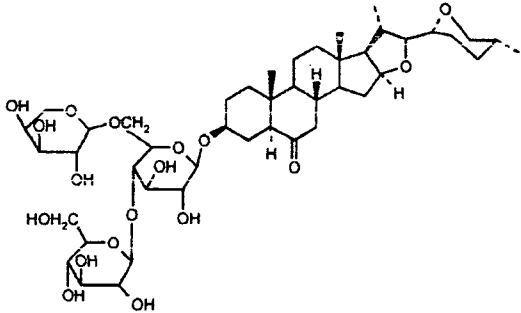
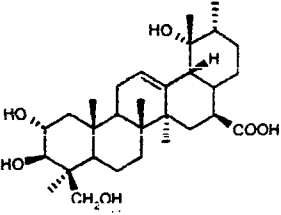
Plant	Compound	Activity	Reference
<i>Phyllanthus</i> sp.	 <p>Furosin</p>	Exhibit antinociceptive effect in several chemical models of pain in mice.	Calixto <i>et al.</i> [17,134] Santos <i>et al.</i> [135]
	 <p>Gallic acid ethylester</p>		
	 <p>Geraniin</p>		
	 <p>Rutin</p>		
	 <p>Stigmasterol</p>		
<i>Drimys winteri</i>	Polygodial	Induces antinociceptive action against several models of nociception in mice.	Mendes <i>et al.</i> [128,130]
			

Table 1. Pharmacological properties of some plant-derived compounds.

Plant	Compound	Activity	Reference
<i>Drimys winteri</i>	Drimalial 	Exhibits antinociceptive action against several models of nociception in mice and caused graded inhibition on [³ H]-glutamate binding in cerebral cortical membranes from mice.	Malheiros <i>et al.</i> [131] unpublished results
<i>Polygala cyprisii</i>	1,7-dihydroxy-2,3-dimethoxy xanthone 	Exhibits pronounced antinociception against acetic acid model of pain in mice.	De Campos <i>et al.</i> [154]
<i>Smilax sieboldii</i>	Smilaxin B 	Exhibits antinociceptive effects by interaction with GABA _A or NMDA receptors and activating descending noradrenergic neurones against tail flick model.	Suh <i>et al.</i> [156]
<i>Ocotea suaveolens</i>	24-Hydroxytormentonic acid 	Exhibits pronounced antinociception against several models of pain in mice.	Beirith <i>et al.</i> [157]

and the carrageenan-induced paw oedema in rats. Such effects and the reported inhibition of the transcriptional factor NF- κ B caused by parthenolide, might account, at least in part, for the use of feverfew extract in the treatment of certain pain disorders, mainly migraine.

2.7 *Aconitum* species

Preparations of *Aconitum* sp. (Ranunculaceae) (mostly *A. japonicum* Thunberg and *A. carmichaeli* Debeaux) roots are employed in Chinese and Japanese traditional medicine as analgesics and antirheumatics and for the treatment of neurological disorders [123]. Various plant extracts and preparations containing *Aconitum* sp. have been reported to possess analgesic activity but the obtained results have been somewhat inconsistent (for review see [123]). The pharmacological effects

of preparations containing *Aconitum* roots are attributed to the presence of several diterpenoid alkaloids in this plant. Several *Aconitum* alkaloids, such as aconitine, mesaconitine, 3-acetylaconitine, hyaconitine, heteratisine, songorine, lappaconitine and lappacodine (see Table 1) have revealed antinociceptive effects in thermal, mechanical and chemical nociceptive tests in animals (for review see [123]). Studies to explore the mechanism of action of *Aconitum* alkaloids have revealed that they bind, with different affinities, to site II of Na⁺ channels. Some of them exhibit high affinity Na⁺ channel ligands (such as aconitine, 3-acetylaconitine and hyaconitine) and exhibit antinociceptive action, besides strong arrhythmogenesis [124]. However, these pharmacological effects are accompanied by high acute toxicity [124]. It has been reported that certain diterpenoid alkaloids isolated from the plant species of *Aconitum*

Biological activity of plant extracts

are less toxic and have cardiac effects quite opposite to those of aconitine, 3-acetylaconitine, mesaconitine and hyaconitine. The members of this group of alkaloids, lappaconitine, N-desacetylappaconitine, 6-benzoylheteratisine, heteratisine and napelline have an affinity for Na⁺ channels which is an order of magnitude lower and also have a lower antinociceptive and cardiotoxic activity, acting in the manner of local anaesthetics. Other alkaloids with lower Na⁺ channel affinity, such as lappaconitine and oxydelcorine, fail to exhibit antinociceptive effect [124] and this strongly suggests that their antinociception correlates with their ability to interact with Na⁺ channels. In addition, mesaconitine and 3-acetylaconitine have been shown experimentally to possess anti-inflammatory activity [123]. Although several alkaloids isolated from *Aconitum* sp. with antinociceptive and anti-inflammatory actions have been identified, their cardiotoxic actions have hampered potential clinical interest in their use as analgesics.

3. New naturally-occurring substances from plants with antinociceptive properties

3.1 *Siphocampylus verticillatus*

The plant *Siphocampylus verticillatus* (Campanulaceae) is a native species of Brazil and is used in traditional medicine for the management of asthma. The hydroalcoholic extract from their dried stems and leaves, given systemically to mice, produces graded and long-lasting antinociception when assessed in several chemical models of nociception [125]. Its antinociceptive effect is antagonised by the opioid antagonist naloxone and by the nitric oxide (NO) precursor L-arginine [125]. The main active substance present in the plant has been isolated and chemically characterised as being the alkaloid denoted cis-8,10-di-N-propyllobelidiol hydrochloride dihydrate (DPHD) [126]. This alkaloid, given systemically (ip. or p.o.), icv. or it. to mice, produces dose-related antinociception in chemical, but not thermal, models of nociception. Like the extract of *S. verticillatus*, the DPHD antinociception is reversed by naloxone and also by the μ , δ and κ opioid antagonists ciprodimine, naltrindole and nor-binaltorphimine, respectively, as well as by p-chlorophenylalanine and L-arginine [126]. On the basis of these results it was concluded that the antinociception produced by DPHD involves multiple sites of action, mainly the interaction with μ , δ and κ opioid receptors and serotonin, besides its interaction with L-arginine-NO pathway. Interestingly, the antinociceptive effect of this alkaloid was prevented by the treatment of animals with pertussis toxin, indicating the participation of G_{i/o} proteins in its action. However, DPHD, in contrast to morphine, did not inhibit charcoal meal transit in mice, nor did it interfere with electrical field stimulation of the guinea-pig ileum or mouse was deferens *in vitro*. The alkaloid, in contrast to morphine, failed to produce tolerance, since when it was given daily for up to 7 days it did not develop either tolerance to itself or cross-tolerance to morphine [126]. Recently, we have shown (unpublished results) that the hydroalcoholic extract

from *S. verticillatus*, given orally to mice, elicits significant antidepressant-like effect, according to evaluation by the forced swimming test and tail suspension test in mice. The antidepressant like action of the extract of *S. verticillatus* appears to be, at least in part, associated with its ability to inhibit the re-uptake of the monoamines serotonin, noradrenaline and to a lesser extent, dopamine (unpublished results).

3.2 *Drymis winteri*

Drymis winteri (Winteraceae), a well-known medicinal plant found in Brazil and some of the American countries, is commonly used in folk medicine as an anti-inflammatory and as a treatment for asthma and allergy. The hydroalcoholic extract of *D. winteri*, given orally to rats, inhibits paw oedema formation caused by various inflammatory agents or by ovalbumin (in actively sensitised rats). The extract of *D. winteri* greatly increases the survival rate in anaphylactic shock assessment using mice that have been actively sensitised to ovalbumin [127]. The main constituent present in the bark of *D. winteri* has been isolated and chemically characterised as the sesquiterpene denoted polygodial (see Table 1) [128]. Like the extract of *D. winteri*, polygodial, administered either ip. or p.o. to mice, produces dose-related and long-lasting (at least 8 h) inhibition of abdominal constriction caused by acetic acid, kaolin and zymosan and the neurogenic and inflammatory pain caused by formalin and capsaicin [128,129]. Given either it. or icv. to mice, polygodial also produces marked antinociception against both phases of the formalin response, indicating its spinal and supraspinal site of action. Given p.o. to rats, the extract of *D. winteri* fully reverses the hyperalgesia produced by paw injection of bradykinin and substance P but not that caused by prostaglandin E₂ or carrageenan [128]. The mechanism by which polygodial exerts its antinociceptive action does not seem to be related to interaction with L-arginine-NO or GABA_A and GABA_B receptors, or to activation of small and large conductance calcium and ATP activated K⁺ channels. On the other hand, opioid system (namely κ and μ receptor subtypes), serotonin, α_1 adrenoceptor pathways and activation G_{i/o} protein sensitive to pertussis toxin are not involved in the mechanism by which polygodial induces antinociception [129]. Interestingly, polygodial action is not cross-tolerant to morphine, nor is it affected by previous adrenalectomy of the animals. In a preliminary study, Cechinel Filho *et al.* [130] and Malheiros *et al.* [131] have demonstrated that the other sesquiterpenes identified as 1- β -(p-methoxycinnamyl) polygodial and drimaniol (see Table 1) isolated from the bark of *D. winteri*, also cause significant inhibition of acetic acid-induced nociceptive response in mice, although they are less potent than polygodial. Unpublished results from our group have shown that drimaniol produces pronounced antinociception in formalin-, capsaicin- and glutamate-induced nociception, an effect which is not reversed by naloxone. In addition, we found that drimaniol was very effective in blocking the hyperalgesia produced by intratecal injection of glutamate but not by NMDA or substance P in mice (unpublished results).

Finally, drimanol also produces concentration-dependent inhibition of [^3H]-glutamate binding in mouse cortex membrane (about 87% at 30 μM). Thus, *D. winteri* or its sesquiterpenes might be of great interest in the development of potential new agents for the management of painful disorders.

3.3 *Hedyosmum brasiliense*

Hedyosmum brasiliense (Chloranthaceae) is a native plant that grows in central and southern Brazil and it used in folk medicine for the management of headache and rheumatism. The extract and active constituent, the 12-hydroxy-8,9-dehydroshizukanolide isolated from *H. brasiliense* (see Table 1), cause pronounced antinociception in the acetic acid, formalin and capsaicin tests, an effect which is not reversed by naloxone [132]. In addition, the sesquiterpene lactone produces spinal and supraspinal antinociception in mice [132]. Unpublished results from our group have shown that 12-hydroxy-8,9-dehydroshizukanolide produces concentration-dependent inhibition of [^3H]-glutamate binding in mouse cortex membrane (about 75% at 500 μM) but it fails to block the [^3H]-glutamate release from mouse brain synaptosomes elicited by KCl. The 12-hydroxy-8,9-dehydroshizukanolide, given systemically, was found to be very effective in blocking the hyperalgesia produced by intratecal injection of glutamate in mice (unpublished results), a model that has been demonstrated to be dependent on the activation of NO cGMP pathways [133]. Together, these results suggest that the sesquiterpene lactone inhibits glutamate binding sites and consequently might be of interest for the development of new analgesic drugs, particularly for the management of neurogenic and neuropathic pain.

3.4 *Phyllanthus* species

The genus *Phyllanthus* (Euphorbiaceae) consists of a great number of species widely distributed in most tropical and subtropical countries. The infusion of the leaves, stems and roots of the majority *Phyllanthus* species are largely used in folk medicine in most countries to treat hepatitis, disturbances of the kidney and urinary bladder, intestinal infections and diabetes (for review see [134]). Previous studies carried out by our group have demonstrated that the extracts obtained from leaves, stems and roots of several species of plants belonging to this genus, namely *P. niruri*, *P. urinaria*, *P. carolinensis*, *P. amarus*, *P. tenellus*, *P. fraternus*, *P. selkowitzianus*, *P. orbiculatus*, *P. stipulatus* and *P. corcovadensis*, exhibit a pronounced antinociception according to assessment against chemical pain response elicited by acetic acid, formalin and capsaicin but this does occur in thermal pain models [17,134]. Interestingly and in contrast with most available analgesic drugs, the extract of *Phyllanthus* species causes an important inhibition of the neurogenic pain responses elicited by formalin and capsaicin. The antinociceptive action of plants of the genus *Phyllanthus* are unrelated to interaction of opioid or serotonin or to L-arginine-NO pathways. Furthermore, these antinociceptive actions are independent of interference with endogenous glucocorticoids and are unrelated with central or

peripheral non-specific action (for review see [134]).

Phytochemical studies carried out by our group and also by others have demonstrated the presence of a large number of naturally-derived secondary substances in these plants, such as flavonoids, alkaloids, lignans, tannins, steroids, phenols, triterpenes, coumarin etc. [134]. At least six naturally-occurring substances present in most of the plants, namely gallic acid ethyl ester, furosin, geraniin, quercetin, rutin and stigmasterol (see Table 1), as reported by the extract of *Phyllanthus*, are effective in reducing the nociceptive response caused by chemical models of pain in mice [17,134,135]. Most of these compounds, when injected at the spinal and supraspinal sites into mice, produce pronounced antinociception against several models of chemical nociception [17,134].

We have recently shown that the antinociception response caused by gallic acid ethyl ester depends on the activation of $G_{\beta\gamma}$ protein sensitive to pertussis toxin and that it involves the activation of both small- and large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels and ATP-sensitive K^+ channel mechanisms [135]. As reported for the extract of these plants [134], the L-arginine-NO, serotonin and opioid pathways, or even the non-specific action, such as the disturbances of motor coordination, have apparently no major participation in the gallic acid ethyl ester-mediated antinociception [135]. As these particular types of K^+ channel are implicated in the regulation of most physiological and pathological processes, including pain transmission [136], such compounds might have potential therapeutic interest.

Also relevant is the data demonstrating that quercetin (but not rutin and geraniin) present in the *Phyllanthus* species is capable of inhibiting [^3H]-glutamate binding and [^3H]GMP-PNP, a GTP analogue that binds to the extracellular site modulating glutamatergic transmission in rat brain membranes [137]. Whether or not such data could account for the antinociception caused by quercetin remains to be seen. Unpublished results from our group have demonstrated that several lignans isolated from *Phyllanthus amarus*, namely hypophyllanthin, nirtetralin, niranthin, phyllanthin and phyltetralin, produce pronounced antinociceptive actions when assessed by ip. route in the formalin model of nociception. Thus, it seems quite obvious that such compounds might account for the antinociception reported for several plants belonging to the genus *Phyllanthus*. Several lines of evidence now suggest that diverse classes of naturally-occurring secondary metabolites present in most plants of the genus *Phyllanthus* are involved in the antinociceptive action reported for such plants. Even though it has not yet been demonstrated experimentally, it is quite possible that the diversity of compounds that are present in low concentration in these plants might act in a synergistic manner in the extract. As clinical trials have demonstrated that some of the extracts of *Phyllanthus* species were well-tolerated in humans with no evidence of side effects [138-141], it is expected that these plants should be of clinical interest to promote the development of well-controlled and standardised phytomedicinals for the management of painful disorders, especially of neurogenic pain.

4. Preliminary antinociceptive studies with several extracts and compounds isolated from plants

Preliminary studies of various plant-derived substances that present antinociceptive and/or anti-inflammatory properties are shown in Table 1. Thus, the extracts and/or constituents isolated from *Nepeta casearea* [142], *Sophora alopecuroides* [143], *Mitragyna speciosa* [144-146], *Psychotria colorata* [147-149], *Croton cajucara* [150-151], *Nepeta italica* [152], *Epidendrum mosenii* [153], *Polygala cyparissias* [154], *Croton urucurana* [155], *Smilax sieboldii* [156], *Ocotea suaveolens* [157], *Anredera leptostachys* [158], *Marrubium vulgare* [159], *Nigella sativa* [160], *Sebastiania schottiana* [161], *Curatella americana* [162], *Pterodon polygalaeiflorus* [163], *Sida cordifolia* [164], *Mangifera indica* [165], *Tarhonoranthus camphoratus* [166], *Eriocephalus africanus* [166], *Saposhnikovia divaricata* [167], *Cassia italica* [168], *Hypericum triquetrifolium* [169] and *Aconiti tuber* [170], among others, produce antinociceptive and/or anti-inflammatory actions in mice and rats. Furthermore, the herbal medicine Catuama (consisting of a mixture of *Trichilia catigua*, *Paullinia cupana*, *Ptychopetalum olacoides* and *Zingiber officinale*) produces oral long-lasting antinociception when assessed against acetic acid-, formalin-, or capsaicin-induced pain and hot-plate and tail-flick assays in mice. The analgesic action of the herbal medicine Catuama seems to be dependent on the synergistic action of the active principles present in the several plants and involves an opioid component which is sensitive to naloxone [171]. Likewise, the Japanese herbal medicine Saiko-Keishi-To [172], Goshajinkigan [173] and Kami-kihi-to [174] present antinociceptive properties in several models of nociception, including trigeminal neuralgia, RA and in neuropathic pain in diabetes animals. De Souza *et al.* [175] have reported that methanolic extract obtained from aerial parts of *Ipomoea pes-caprae* produces antinociception according to assessment against either acetic acid-induced writhing and formalin-induced licking in mice. Furthermore, Sampson *et al.* [105] have extended these preliminary observations by demonstrating that the methanolic extract of *Ipomoea pes-caprae* seed caused concentration dependent inhibition of bradykinin (B₂ receptor) and NK₁ receptor binding. Such results strongly suggest that, at least in part, the antinociception caused by *Ipomoea pes-caprae* could be related to inhibition of the bind for B₂ and NK₁ receptors. Recently, Gentili *et al.* [176] have demonstrated that resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, was able to reverse the hyperalgesia but not the swelling and oedema formation, induced by local tissue injury provoked by carrageenan injection in the rat paw. In addition, double-blind, randomised controlled clinical trials have demonstrated that the extracts of *Harpagophytum procumbens* (HarpadolTM) [177], *Urtica dioica* [178] and the herbal medicine known as Tong Luo Kai Bi [179] and the standardised ayurvedic plant extract formulation [180] were able to induce a moderate analgesic effect in patients with OA and RA when compared with placebo.

Although a number of studies have demonstrated that the

extracts and/or compounds isolated from various plants produced relevant antinociceptive and anti-inflammatory actions in several models of nociception and inflammation in mice and rats, the great majority of these reported studies are merely preliminary. Thus, scientific evidence on the mechanism of action, toxicology and especially randomised double-blind clinical trials of such extracts (plants) or substances are lacking.

5. Expert opinion

Since very remote times, naturally-occurring substances, especially those derived from higher plants, have been widely used throughout the world to treat pain disorders. The use of extracts and/or compounds from *Papaver somniferum*, *Cannabis sativa*, *Capsicum* and *Salix* species are good examples regarding the great contribution of higher plants to the development of clinically-relevant drugs for the management of pain. However, the isolation and chemical identification of morphine from *P. somniferum*, salicin from *Salix* sp., capsaicin from *Capsicum* sp. and the Δ^9 -tetrahydrocannabinol from *C. sativa* have produced remarkable progress in our understanding of the molecular mechanisms of pain transmission and treatment. Furthermore, the recent advances on the mechanisms of action of the naturally-occurring substances of the above plants, conjugated with the use of modern molecular biology techniques, have, over the past decade, greatly accelerated attempts to identify promising targets for the discovery of new safe and efficacious analgesic drugs.

To date, despite decades of use and apart from its known undesirable side effects, the plant alkaloid morphine still continues to be one of the most used drugs in clinical practice for the treatment of pain disorders. In recent years, our understanding of the molecular and cellular mechanisms of pain transmission have increased dramatically and this has led to the discovery of most promising targets for the development of new drugs to treat pain disorders. It is known that the secondary metabolites derived from plants are able to interfere directly or indirectly with most inflammatory mediators (arachidonic acid metabolites, peptides, cytokines, excitatory amino acids etc.) with the production or action of the second messengers (such as PKC, PKA, among others) acting at the level of expression of the transcriptional factors, such as AP-1, NF- κ B, proto-oncogenes (*c-jun*, *c-fos* and *c-myc*), changes in gene expression, such as iNOS, COX-2, cytokines (IL-1 β , TNF- α etc.), neuropeptides and proteases etc. Thus, it is not surprising that widely diverse groups of naturally-occurring plant substances described in the literature exhibit antinociceptive properties. Recently, important advances have occurred in the study of higher plants aimed at finding new analgesic drugs. A search through the literature reveals that although most potentially-active antinociceptive naturally-occurring substances from plants have been identified, studies aimed at investigating their cellular and molecular mechanisms of action and above-all randomised placebo-controlled clinical trials to prove their efficacy in humans are

lacking. In addition, recent clinical studies conducted with some of the standardised plant extracts, such as those obtained from *Salix alba* (willow) or *Tanacetum parthenium* (feverfew), have revealed that they possess antinociceptive properties. However, it is becoming increasingly apparent that agents able to block critical signalling mechanisms and membrane receptors for neurotransmitters might offer exciting opportunity to develop safe and clinically-relevant drugs for the treatment of pain disorders, including neuropathic and neurogenic pain. Thus, both natural and synthetic compounds which are capable of binding to vanilloid or cannabinoid receptors, or even those that are able to modulate the endogenous ligands for these receptors, are relevant targets of current study and new analgesic drugs derived from both

pathways will certainly emerge in the near future.

Acknowledgements

Michel Otuki and Cristiano Scheidt are MSc students in Pharmacology and they thank the Coordenação de Apoio de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) for fellowship support. The works of our group were supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) and by Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência (PRONEX), Brazil.

Bibliography

Papers of special note have been highlighted as either of interest (*) or of considerable interest (**) to readers.

1. DE SMET PAGM: The role of plant-derived drugs and herbal medicines in healthcare. *Drugs* (1997) 54(6):801-840.
2. CRAGG GM, NEWMAN DJ, SNADER KM: Natural products in drug discovery and development. *J. Nat. Prod.* (1997) 60(1):52-60.
3. VERPOORTE R: Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. *Drug Discov. Today* (1998) 3(5):232-238.
4. HARVEY A: Strategies for the discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discov. Today* (2000) 5(7):294-300.
5. CALIXTO JB: Efficacy, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutics agents). *Braz. J. Med. Biol. Res.* (2000) 33(2):179-189.
6. CORDELL GA: Biodiversity and drug discovery - a symbiotic relationship. *Phytochemistry* (2000) 55(6):463-480.
7. STROHL WR: The role of natural products in a modern drug discovery program. *Drug Discov. Today* (2000) 5(2):39-41.
8. BLUMENTHAL M: Harvard study estimates consumers spend \$5.1 billion on herbal products? *Herbal Gram* (1999) 45:68.
9. BLUMENTHAL M: Herb industry sees mergers, acquisitions, and entry by pharmaceutical giants in 1998. *Herbal Gram* (1999) 45:67-68.
10. BORCHERS AT, SAKAI S, HENDERSON GL *et al.*: Shosaiko-to and other kampo (Japanese herbal) medicines: a review of their immunomodulatory activities. *J. Ethnopharmacol.* (2000) 73(1-2):13.
11. PANDEY RC: Prospecting for potentially new pharmaceuticals from natural sources. *Med. Res. Rev.* (1998) 18(5):333-346.
12. SHU YZ: Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. *J. Nat. Prod.* (1998) 61(8):1053-1071.
13. BENYHE S: Morphine: new aspects in the study of an ancient compound. *Life Sci.* (1994) 55(13):969-979.
14. BROWNSTEIN MJ: A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1993) 90(12):5391-5393.
15. MATTHES HWD, MALDONADO R, SIMONIN F *et al.*: Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the μ -opioid-receptor gene. *Nature* (1996) 383(6603):819-823.
16. TREASE GE, EVANS WC: Alkaloids. In: *Pharmacognosy*. Trease GE, Evans WC (Eds.), Cassell & Collier Macmillan Publishers Ltd., London, UK (1978):527-620.
17. CALIXTO JB, BEIRITH A, FERREIRA J, SANTOS ARS, CECHINEL FILHO V, YUNES RA: Naturally occurring antinociceptive substances from plants. *Phytother. Res.* (2000) 14(6):401-418.
- This review article discusses the historical contribution of medicinal plants to the development of modern analgesic therapy and also discusses some recent studies on the antinociceptive substances of plant origin.
18. KIEFFER LB: Opioids: first lessons from knockout mice. *Trends Pharmacol. Sci.* (1999) 20(1):19-26.
19. PASTERNAK GW: Insights into mu opioid pharmacology the role of mu opioid receptor subtypes. *Life Sci.* (2001) 68(19-20):2213-2219.
20. KITCHEN I, SLOWE SJ, MATTHES HWD, KIEFFER B: Quantitative autoradiographic mapping of mu, delta and kappa-opioid receptors in knockout mice lacking the mu-opioid receptor gene. *Brain Res.* (1997) 778(1):73-88.
21. NARITA M, FUNADA M, SUZUKI T: Regulations of opioid dependence by opioid receptor types. *Pharmacol. Ther.* (2001) 89(1):1-15.
22. ROBBERS JE, TYLER VE: Arthritic and musculoskeletal disorders. In: *Tyler's Herbs of Choice. The Therapeutic Use of Phytochemicals*. Robbers JE, Tyler VE (Eds.), Haworth Herbal Press, Inc., Binghamton, USA (1999):199-209.
23. DRESER II: Pharmacologisches über aspirin (acethylsalicylsäure). *Pflüger's Arch. Gesamte Physiol. Menschen Tiere* (1899) 76:306.
24. WALKER JS: NSAID: an update on their analgesic effects. *Clin. Exp. Pharmacol.*

Biological activity of plant extracts

- Physiol.* (1995) 22(11):855-860.
25. JACK DB: One hundred years of aspirin. *Lancet* (1997) 350(9075):437-439.
 26. NORTON WL, MEISINGER MA: An overview of nonsteroidal antiinflammatory agents (NSAIA). *Inflammation* (1977) 2(1):37-46.
 27. VANE JR: Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature* (1971) 231(25):232-235.
 28. VANE JR, BAKHLE YS, BOTTING RM: Cyclooxygenases 1 and 2. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* (1998) 38:97-120.
 29. VANEGAS II, SCHIAIBILE IIG: Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. *Prog. Neurobiol.* (2001) 64(4):327-363.
 30. BOTTING RM, BOTTING JH: Pathogenesis and mechanisms of inflammation and pain. *Clin. Drug Invest.* (2000) 19(Suppl. 2):1-7.
 31. VANE JR: The fight against rheumatism: from willow bark COX-1 sparing drugs. *J. Physiol. Pharmacol.* (2000) 51(4):573-586.
 32. BORENSTEIN DG: Epidemiology, etiology, diagnostic evaluation, and treatment of low back pain. *Curr. Opin. Rheumatol.* (2001) 13(2):128-134.
 33. STEINEGGER E, HAVEL A: Analytical and biological studies of salicaceae substances, especially an salicin II biological study. *Pharm. Acta Helv.* (1972) 47(3):222-234.
 34. SCHMID B, LUDTKE R, SELBMANN HK *et al.*: Effectiveness and tolerance of standardized willow bark extract in arthrosis patients. Randomized, placebo controlled double-blind study. *Z. Rheumatol.* (2000) 59(5):314-320.
 - Reported from clinical trial demonstrating that willow bark extract shows a moderate analgesic effect in osteoarthritis.
 35. CHRUBASIK S, EISENBERG E, BALAN E, WEINBERGER T, LUZZATI R, CONRADT C: Treatment of low back pain exacerbations with willow bark extract: a randomized double-blind study. *Am. J. Med.* (2000) 109(1):9-14.
 - Results from this clinical trial show that willow bark extract may be a useful and safe treatment for low back pain.
 36. RUSSO CM, BROSE WG: Chronic pain. *Ann. Rev. Med.* (1998) 49:123-133.
 37. MECHOULAM R, FRIDE E: Physiology. A hunger for cannabinoids. *Nature* (2001) 410(6830):822-825.
 38. AMERI A: The effects of cannabinoids on the brain. *Prog. Neurobiol.* (1999) 58(4):15-48.
 39. BURSTEIN SH: The cannabinoid acids: nonpsychoactive derivatives with therapeutic potential. *Pharmacol. Ther.* (1999) 82(1):87-86.
 40. DE PETROCELLIS L, MELCK D, BISOGNO T, DI MARZO V: Endocannabinoids and fatty acid amides in cancer, inflammation and related disorders. *Chem. Phys. Lipids* (2000) 108(1-2):191-209.
 - This is an interesting review that describes the medicinal use of *Cannabis sativa* and also discusses its chemical constituents, the cannabinoids. The authors also discuss the therapeutic potential of the endogenous ligands of cannabinoid receptors, the endocannabinoids, and their derivatives.
 41. MECHOULAM R: Looking back at *Cannabis* research. *Curr. Pharm. Des.* (2000) 6(13):1313-1322.
 42. PALMER SL, KHANOLKAR AD, MAKRIYANNIS A: Natural and synthetic endocannabinoids and their structure-activity relationships. *Curr. Pharm. Des.* (2000) 6(13):1381-1397.
 43. MECHOULAM R: Marijuana chemistry. *Science* (1970) 168(936):1159-1166.
 44. MATSUDA LA, LOLAIT SJ, BROWNSTEIN MJ, YOUNG AC, BONNER TI: Structure of cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* (1990) 346(6284):561-564.
 45. MUNRO S, THOMAS KL, ABU-SHAAR M: Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* (1993) 365(6441):61-65.
 46. PERTWEÉ RG: Cannabinoid receptors and pain. *Prog. Neurobiol.* (2001) 63(5):569-611.
 - This is an extensive review that focuses on recent knowledge in connection with CB1 and CB2 receptors and regarding their interest for the development of new analgesic drugs.
 47. MARTIN BR, MECHOULAM R, RAZDAN RK: Discovery and characterization of endogenous cannabinoids. *Life Sci.* (1999) 65(6-7):573-595.
 48. DI MARZO V, SEPE N, DE PETROCELLIS L *et al.*: Trick or treat from food endocannabinoids? *Nature* (1998) 396(6712):677-678.
 49. MECHOULAM R, FRIDE E, DI MARZO V: Endocannabinoids. *Eur. J. Pharmacol.* (1998) 359(1):1-18.
 50. MECHOULAM R: Interview with Prof. Raphael Mechoulam, codiscoverer of THC. Interview by Stanley Einstein. *Int. J. Addict.* (1986) 21(4-5):579-587.
 51. NOYES R Jr, BRUNK SF, BARAN DA, CANTER A: Analgesic effect of delta-9-tetrahydrocannabinol. *J. Clin. Pharmacol.* (1975) 15(2-3):139-143.
 52. HOLDCROFT A, SMITH M, JACKLIN A, HODGSON IL, SMITH B, NEWTON M, EVANS F: Pain relief with oral cannabinoids in familial Mediterranean fever. *Anaesthesia* (1997) 52(5):483-486.
 53. RUSSO E: *Cannabis* for migraine treatment: the one and future prescription? An historical and scientific review. *Pain* (1998) 76(1-2):3-8.
 54. FORMUKONG EA, EVANS AT, EVANS FJ: The medicinal uses of *Cannabis* and its constituents. *Phytother. Res.* (1989) 3:219-231.
 55. HIRST RA, LAMBERT DG, NOTCUTT WG: Pharmacology and potential therapeutic uses of cannabis. *Dr. J. Assoc.* (1998) 81(1):77-84.
 56. WALKER JM, HOHMANN AG, MARTIN WJ, STRANGMAN NM: The neurobiology of cannabinoid analgesia. *Life Sci.* (1999) 65(6/7):665-673.
 57. MENG ID, MANNING BH, MARTIN WJ, FIELDS HL: An analgesic circuit activated by cannabinoids. *Nature* (1998) 395(6700):381-383.
 58. CALIGNANO A, LA RANA G, GIUFFRIDA A, PIOMELLI D: Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature* (1998) 394(6690):277-281.
 59. CALIGNANO A, LA RANA G, PIOMELLI D: Antinociceptive activity of the endogenous fatty acid amide, palmitylethanolamide. *Eur. J. Pharmacol.* (2001) 419(2-3):191-198.
 60. LEDENT C, VALVERDE O, COSSU G *et al.*: Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science* (1999) 283(5400):401-404.
 61. BRIDGES D, AHMAD K, RICE ASC: The synthetic cannabinoid WIN55,212-2 attenuates hyperalgesia and allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Br. J. Pharmacol.* (2001) 133(4):586-594.
 62. FOX A, KESINGLAND A, GENTRY C *et*

- a.l.*: The role of central and peripheral cannabinoid₁ receptors in the antihyperalgesic activity of cannabinoids in a model of neuropathic pain. *Pain* (2001) 92(1-2):91-100.
63. PIOMELLI D, GIUFFRIDA A, CALIGNANO A, FONSECA FR: The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs. *Trends Pharmacol. Sci.* (2000) 21(6):218-224.
 64. SIEGLING A, HOFMANN HA, DENZER D, MAULER F, DE VRY J: Cannabinoid CB₁ receptor upregulation in a rat model of chronic neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* (2001) 415(1):R5-7.
 65. WILSON RI, NICOLL RA: Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature* (2001) 410(6828):588-592.
 66. HUANG CC, SW L, HSU KS: Presynaptic mechanism underlying cannabinoid inhibition of excitatory synaptic transmission in rat striatal neurons. *J. Physiol.* (2001) 532(3):731-748.
 67. KATTIMANN M, WEBER B, SCHLICKER E: Cannabinoid CB₁ receptor-mediated inhibition of acetylcholine release in the brain of NMRI, CD-1 and C57BL/6J mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* (2001) 363(1):50-56.
 68. OHNO-SHOSAKU T, MAEJIMA T, KANO M: Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron* (2001) 29(3):729-738.
 69. KREITZER AC, REGEHR WG: Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron* (2001) 29(3):717-727.
 70. ZYGMUNT PM, PETERSSON J, ANDERSSON DA *et al.*: Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* (1999) 400(6743):452-457.
 - This paper shows that anandamide induces vasodilatation by activating vanilloid receptors on perivascular sensory nerves and causes the release of calcitonin-related peptide.
 71. ZYGMUNT PM, CHUANG H, MOVAHED P, JULIUS D, HOGESTATT ED: The anandamide transport inhibitor AM404 activates vanilloid receptors. *Eur. J. Pharmacol.* (2001) 396(1):39-42.
 72. SMART D, JERMAN JC: Anandamide: an endogenous activator of the vanilloid receptor. *Trends Pharmacol. Sci.* (2000) 21(4):134.
 73. OLAH Z, KARAI L, LADAROLA MJ: Anandamide activates vanilloid receptor 1 at acidic pH in DRG neurons and cells ectopically expressing VR₁. *J. Biol. Chem.* (2001). In Press.
 - This interesting paper suggests that tissue acidification during inflammatory processes, ischaemia or traumatic injury can sensitise VR₁ in dorsal root ganglia receptor to eicosanoids and thus is able to facilitate the transduction of pain from the periphery.
 74. TOGNETTO M, AMADESI S, HARRISON S *et al.*: Anandamide excites central terminals of dorsal root ganglion neurons via vanilloid receptor-1 activation. *J. Neurosci.* (2001) 21(4):1104-1109.
 75. MILNS PJ, CHAPMAN V, KENDALL DA: Cannabinoid inhibition of the capsaicin induced calcium response in rat dorsal root ganglion neurones. *Br. J. Pharmacol.* (2001) 132(5):969-971.
 76. SZALLASI A, BLUMBERG P: Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol. Rev.* (1999) 51(2): 159-211.
 - This is an extensive and very interesting review that describes the initial research on capsaicin and the discovery of vanilloid receptors, their pharmacological effects and potential interest for the development of new therapeutic agents.
 77. TRESH LT: Isolation of capsaicin. *Pharm. J.* (1846) 6:941.
 78. NELSON EK: The constitution of capsaicin. The pungent principle of capsaicin. *J. Am. Chem. Soc.* (1919) 41:1115-1117.
 79. IWAI K, SUZUKI T, SUZUKI T, KOBASHI M: Quantitative microanalysis of capsaicin, dihydrocapsaicin and nordihydrocapsaicin using mass fragmentography. *J. Chromatogr.* (1976) 123 (1):119-128.
 80. JANCÓS N: Role of nerve terminals in the mechanism of inflammatory reactions. *Bull. Millard Fillmore Hosp.* (1960) 7:53-77.
 81. JUNG J, HWANG SW, KWAK J *et al.*: Capsaicin binds to the intracellular domain of the capsaicin-activated ion channel. *J. Neurosci.* (1999) 19(2):529-538.
 82. OH U, HWANG SW, KIM D: Capsaicin activates a nonselective cation channel in cultured neonatal rat dorsal root ganglion neurons. *J. Neurosci.* (1996) 16(5):1659-1667.
 83. SZALLASI A, DI MARZO V: New perspectives on enigmatic vanilloid receptors. *Trends Neurosci.* (2000) 23(10):491-497.
 - This is a relevant review that describes the recent studies on vanilloid receptors and their potential interest for the development of new therapeutically useful drugs.
 84. STERNER O, SZALLASI A: Novel natural vanilloid receptor agonist: new therapeutic targets for drug development. *Trends Pharmacol. Sci.* (1999) 20(11):459-465.
 - This interesting paper describes the pharmacological properties of unsaturated dialdehydes and triprenyl phenols that represent two newly discovered chemical classes of vanilloids. The authors propose that the uses of unsaturated dialdehydes in indigenous medicine might help identify new therapeutic targets for vanilloids and avoid unwanted actions.
 85. CATERINA MJ, SCHUMACHER MA, TOMINAGA M, ROSEN TA, LEVINE JD, JULIUS D: The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* (1997) 389(6653):816-824.
 - This study demonstrates, for the first time, that the VR₁ receptor is a non-selective cation channel that is structurally related to members of the TRP family of ion channels. The cloned capsaicin receptor is also activated by increases in temperature in the noxious range, suggesting that it functions as a transducer of painful thermal stimuli *in vivo*.
 86. MCINTYRE P, MACLATCHIE LM, CHAMBERS A *et al.*: Pharmacological differences between the human and rat vanilloid receptor 1 (VR₁). *Br. J. Pharmacol.* (2001) 132(1):1084-1094.
 - In this study, VR₁ were cloned from human and rat dorsal root ganglion libraries and expressed in *Xenopus* oocytes or Chinese hamster ovary (CHO) cells, showing the pharmacological differences between the human and rat VR₁.
 87. HAYES P, MEADOWS HJ, GUNTHORPE MJ *et al.*: Cloning and functional expression of a human orthologue of rat vanilloid receptor-1. *Pain* (2000) 88:205-215.
 - This paper shows the cloning of a human VR₁ cDNA containing a 2517 bp open reading frame that encodes a protein with 92% homology to the rat VR₁. Together with the sequence homology, a similar expression profile and functional

Biological activity of plant extracts

- properties confirm that the cloned cDNA represents the human orthologue of rat VR1.
88. SMART D, JERMAN JC, GUNTORPE MJ *et al.*: Characterisation using FLIPR of human vanilloid VR1 receptor pharmacology. *Eur. J. Pharmacol.* (2001) 417:51-58.
 89. PIOMELLI D: The ligand that came from within. *Trends Pharmacol. Sci.* (2001) 22(1):17-19.
 90. REEH PW, KRESS M: Molecular physiology of proton transduction in nociceptors. *Curr. Opin. Pharmacol.* (2001) 1:45-51.
 91. MEZY E, TOTH ZE, CORTRIGHT DN *et al.*: Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2000) 97(7):3655-3660.
 - A very interesting study that demonstrates that VR1 is expressed not only in primary sensory neurones but also in several brain nuclei, and is of great importance in that it places VRs in a much broader perspective than pain perception. It also suggests that VRs in the brain (and putative endogenous vanilloids) may be involved in the control of emotions, learning and satiety, just to name a few exciting possibilities.
 92. BARON R: Capsaicin and nociception: from basic mechanisms to novel drugs. *Lancet* (2000) 356(9232):785-787.
 - This is a very interesting and comprehensive review that comments on the distribution of vanilloid receptors in several brain areas. This review also comments that the selective agonists at these receptors, which are free from pungent activity, may represent a very attractive alternative for the development of new analgesic drugs.
 93. CATERINA MJ, LEFFLER A, MALMBERG AB *et al.*: Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* (2000) 288(5464):306-313.
 - This study reports for the first time that mice lacking the VR1 receptor for capsaicin exhibit normal response to noxious mechanical stimuli but exhibit no vanilloid-evoked pain behaviour, suggesting that VR1 is essential for pain sensation and for tissue injury-induced thermal hyperalgesia.
 94. DAVIS JB, GRAY J, GUNTORPE MJ *et al.*: Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* (2000) 405(6783):183-187.
 - This paper reports that VR1 receptors are essential for the development of sensitisation to thermal stimuli during inflammation but not for normal sensation of noxious heat.
 95. KAMEI J, ZUSHIDA K, MORITA K, SASAKI M, TANAKA SI: Role of vanilloid VR1 receptor in thermal allodynia and hyperalgesia in diabetic mice. *Eur. J. Pharmacol.* (2001) 422:83-86.
 96. TOHDA C, SASAKI M, KONEMURA T, SASAMURA T, ITOH M, KURAIISHI Y: Axonal transport of VR1 capsaicin receptor mRNA in primary afferents and its participation in inflammation-induced increase in capsaicin sensitivity. *J. Neurochem.* (2001) 76(6):1628-1635.
 97. YANGOU Y, FACER P, DYER NHC *et al.*: Vanilloid receptor 1 immunoreactivity in inflamed human bowel. *Lancet* (2001) 357:1338-1339.
 - This interesting study demonstrates that VR1 is substantially higher in nerve fibres in inflammatory bowel in human disease than in normal bowel. The authors show that VR1 immunoreactivity is largely increased in colonic nerve fibre of patients with active inflammatory bowel disease.
 98. LEE J, LEE J, KIM J *et al.*: N-(3-acyloxy-2-benzylpropyl)-N'-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl) thiourea derivatives as potent vanilloid receptor agonists and analgesics. *Bioorg. Med. Chem.* (2001) 9(1):19-32.
 - This study reports the synthesis of new thioureas derivatives with strong and non-pungent vanilloid receptor agonists that exhibit potent analgesic activity.
 99. ROBBERS JE, TYLER VE: Performance and immune deficiencies. In *Tyler's Herbs of Choice. The Therapeutic Use of Phytochemicals*. Robbers JE, Tyler VE (Eds.), Haworth Herbal Press, Inc., Binghamton, USA (1999):235-260.
 100. ATTELE A, WU JA, YUAN CS: Ginseng pharmacology. Multiple constituents and multiple actions. *Biochem. Pharmacol.* (1999) 58(11):1685-1693.
 101. NAH JJ, HAHN JH, CHUNG S, CHOI S, KIM YI, NAH SY: Effect of ginsenosides, active components of ginseng, on capsaicin-induced pain-related behavior. *Neuropharmacology* (2000) 39(11):2180-2184.
 102. YOON SR, NAH JJ, SHIN YH *et al.*: Ginsenosides induce differential antinociception and inhibition substance P-induced nociceptive response in mice. *Life Sci.* (1998) 62(21): PL319-PL325.
 103. MOGIL JS, SHIN YH, MCCLESKEY EW, KIM SC, NAH SY: Ginsenoside Rf, a trace component of ginseng root, produces antinociception in mice. *Brain Res.* (1998) 792(2):218-228.
 104. SHIN YH, JUNG OM, NAH JJ, NAM KY, KIM CY, NAH SY: Ginsenosides that produce differential antinociception in mice. *Gen. Pharmacol.* (1999) 32(6):653-659.
 105. SAMPSON JH, PHILLIPSON JD, BOWERY NG, O'NEILL MJ, HOUSTON JG, LEWIS JA: Ethnomedicinally selected plants as sources of potential analgesic compounds: indication of *in vitro* biological activity in receptor binding assays. *Phytother. Res.* (2000) 14(1):24-29.
 106. VOGLER BK, PITTLER MH, ERNST E: Feverfew as a preventive treatment for migraine: a systematic review. *Cephalalgia* (1998) 18(10):704-708.
 107. FUKUDA K, HIBIYA Y, MUTOH M *et al.*: Inhibition by parthenolide of phorbol ester-induced transcriptional activation of inducible nitric oxide synthase gene in a human monocyte cell line THP-1. *Biochem. Pharmacol.* (2000) 60(4):595-600.
 108. ERNST E, PITTLER MJ: The efficacy and safety of feverfew (*Tanacetum parthenium*): an update of a systematic reviews. *Public. Health. Nutr.* (2000) 3(4A):500-514.
 109. ALJANCIC I, VAJS V, BULATOVIC V, MENKOVIC N, MILOSAVLJEVIC S: Parthenolide from the aerial parts of *Tanacetum larvatum*. *Biochem. Syst. Ecol.* (2001) 29(6):655-657.
 110. WILLIAMS CA, HARBORNE JB, GEIGER H, HOULT JRS: The flavonoids of *Tanacetum parthenium* and *T. vulgare* and their anti-inflammatory properties. *Phytochemistry* (1999) 51(3):417-423.
 111. MILBRODT M, SCHRÖDER F, KÖNIG WA: 3,4- β -epoxy-8-deoxycumambrin B, a sesquiterpene lactone from *Tanacetum parthenium*. *Phytochemistry* (1997) 44(3):471-474.
 112. JAIN NK, KULKARNI SK: Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Tanacetum parthenium* L. Extract in mice and rats. *J. Ethnopharmacol.* (1999) 68(1-3):251-259.
 113. WONG HR, MENENDEZ IY:

- Sesquiterpene lactones inhibit inducible nitric oxide synthase gene expression in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1999) 262(2):375-380.
114. HEHNER SP, HEINRICH M, BORK PM *et al.*: Sesquiterpene lactones specifically inhibit activation of NF- κ B by preventing the degradation of I κ B- α and I κ B- β . *J. Biol. Chem.* (1998) 273(3):1288-1297.
115. HEHNER SP, HOFMANN TG, DROGE W, SCHMITZ ML: The antiinflammatory sesquiterpene lactone parthenolide inhibits NF- κ B by targeting the I κ B kinase. *J. Immunol.* (1999) 163(10):5617-5623.
116. JOHNSON ES, KADAM NP, HYLANDS DM, HYLANDS PJ: Efficacy of feverfew as prophylactic treatment of migraine. *Br. Med. J.* (1985) 291(6495):569-573.
117. MURPHY JJ, HEPTINSTALL S, MITCHELL JRA: Randomized double-blind placebo-controlled trial of feverfew in migraine prevention. *Lancet* (1988) 2(8604):189-192.
118. PALEVITCH D, EARON G, CARASSO R: Feverfew (*Tanacetum parthenium*) as a prophylactic treatment for migraine: a double-blind placebo-controlled study. *Phytother. Res.* (1997) 11(7):508-511.
119. BERRY MI: Feverfew faces the future. *Pharm. J.* (1984) 232:611-614.
120. PATTRICK M, HEPTINSTALL S, DOHERTY M: Feverfew in rheumatoid arthritis: a double-blind, placebo controlled study. *Ann. Rheum. Dis.* (1989) 48(7):517-549.
121. KLEPSE TB, KLEPSE ME: Unsafe and potentially safe herbal therapies. *Ann. J. Health Syst. Pharm.* (1999) 56(2):125-138.
122. ANDERSON D, JENKINSON PC, DEWDNEY PS, BLOWERS SD, JOHNSON ES, KADAM NP: Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in lymphocytes and urine mutagenicity of migraine patients: a comparison of chronic feverfew users and matched non-users. *Hum. Toxicol.* (1988) 7(2):145-152.
123. AMERI A: The effects of *Aconitum* alkaloids on the central nervous system. *Prog. Neurobiol.* (1998) 56(2):211-235.
124. GUTSER UT, FRIESE J, HEUBACH JF *et al.*: Mode of antinociceptive and toxic action of alkaloids of *Aconitum* species. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* (1998) 357(1):39-48.
125. TRENTIN AP, SANTOS ARS, MIGUEL OG, PIZZOLATTI MG, YUNES RA, CALIXTO JB: Mechanisms involved in the antinociceptive effect in mice of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. *J. Pharm. Pharmacol.* (1997) 49(5):576-572.
126. SANTOS ARS, MIGUEL OG, YUNES RA, CALIXTO JB: Antinociceptive properties of the new alkaloid, *cis*-8,10-di-N-propylpiperidino hydrochloride dihydrate isolated from *Siphocampylus verticillatus*: evidence for the mechanism of action. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1999) 289(1):417-426.
- This study shows that the new alkaloid (DPHD) produces dose-dependent and pronounced systemic, spinal and supraspinal antinociceptive action in mice, including against the neurogenic nociception induced by formalin and capsaicin.
127. TRATSK KS, CAMPOS MM, VAZ ZR, CECHINEL FILHO V, SCHLEMPER V, YUNES RA, CALIXTO JB: Anti-allergic effects and oedema inhibition caused by the extract of *Drymys winteri*. *Inflamm. Res.* (1997) 46(12):509-514.
128. MENDES GL, SANTOS ARS, CAMPOS MM *et al.*: Anti-hyperalgesic properties of the extract and of the main sesquiterpene polygodial isolated from the barks of *Drymys winteri* (Winteraceae). *Life Sci.* (1998) 63(5):369-381.
129. MENDES GL, SANTOS ARS, MALHEIROS A, CECHINEL FILHO V, YUNES RA, CALIXTO JB: Assessment of the mechanisms involved in the antinociception caused by sesquiterpene polygodial. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2000) 292(1):164-172.
- This study reveals that polygodial, a sesquiterpene isolated from the bark of *Drymys winteri*, produces dose-dependent and pronounced systemic, spinal and supraspinal antinociceptive action in mice.
130. CECHINEL FILHO V, SCHLEMPER V, SANTOS ARS *et al.*: Isolation and identification of active compounds from *Drymys winteri* barks. *J. Ethnopharmacol.* (1998) 62(3):223-227.
131. MALHEIROS A, CECHINEL FILHO V, SCHMITT CB *et al.*: A sesquiterpene drimane with antinociceptive activity from *Drymys winteri* bark. *Phytochemistry* (2001) 57(1):103-107.
132. TRENTIN AP, SANTOS ARS, GUEDES A, PIZZOLATTI MG, YUNES RA, CALIXTO JB: Antinociception caused by the extract of *Hedyosmum brasiliense* and its active principle, the sesquiterpene lactone 13-hydroxy-8,9-dehydroshizukanolide. *Planta Med.* (1999) 65(6):517-521.
133. FERREIRA J, SANTOS ARS, CALIXTO JB: 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* (1999) 38(6):835-842.
134. CALIXTO JB, SANTOS ARS, CECHINEL FILHO V, YUNES RA: A review of the genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. *Med. Res. Rev.* (1998) 18(4):225-258.
- This review article describes the recent phytochemical, pharmacological and clinical studies carried out with the plants of the genus *Phyllanthus*, including their antinociceptive properties.
135. SANTOS ARS, DE CAMPOS RO, MIGUEL OG, CECHINEL FILHO V, YUNES RA, CALIXTO JB: The involvement of K⁺ channels and G_o protein in the antinociceptive action of the gallic acid ethyl ester. *Eur. J. Pharmacol.* (1999) 379(1):7-17.
- This study reveals that gallic acid ethyl ester (GAEE) produces dose-dependent and pronounced systemic, spinal and supraspinal antinociception in mice, probably by activation of K⁺ channels and by a G_o pertussis toxin-sensitive mechanism.
136. MILLAN MJ: The induction of pain: an integrative review. *Prog. Neurobiol.* (1999) 57(1):1-164.
137. MARTINI LH, SOUZA CR, MARQUES PB, CALIXTO JB, YUNES RA, SOUZA DO: Compounds extracted from *Phyllanthus* and *Jatropha elliptica* inhibit the binding of [³H]glutamate and [³H]GMP-PNP in rat cerebral cortex membrane. *Neurochem. Res.* (2000) 25(2):211-215.
138. THYAGARAJAN SP, SUBRAMANIAN S, THIRUNALASUNDARI T, VENKATESWARAN PS, BLUMBERG BS: Effect of *Phyllanthus amarus* on chronic carriers of hepatitis B virus. *Lancet* (1988) 2(8614):764-766.
139. BLUMBERG BS, MILLMAN I, VENKATESWARAN PS, THYAGARAJAN SP: Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma-treatment of HBV carriers with *Phyllanthus amarus*. *Cancer Detect. Prev.* (1989) 14(2):195-201.

Biological activity of plant extracts

140. WANG M, CHENG H, LI Y, MENG L, ZHAO G, MAI K: Herbs of the genus *Phyllanthus* in the treatment of chronic hepatitis B: observations with three preparations from different geographic sites. *J. Lab. Clin. Med.* (1995) 126(4):350-352.
141. SANTOS DR: Chá de quebra-pedra (*Phyllanthus niruri*) na litíase urinária em humanos e em ratos. In: *Escola Paulista de Medicina (PhD Thesis)*. São Paulo, SP, Brazil (1990):157.
142. AYDIN S, BEIS R, OZRURK Y, BASER KH, BASER C: Nepetalactone: a new opioid analgesic from *Nepeta caesarea* Boiss. *J. Pharm. Pharmacol.* (1998) 50(7):813-817.
143. XIAO P, KUBO H, OHSAWA M: Kappa-opioid receptor mediated antinociceptive effects of stereoisomers and derivatives of (+)-marine in mice. *Planta Med.* (1999) 65(3):230-233.
144. MATSUMOTO K, MIZOWAKI M, SUCHITRA T *et al.*: Central antinociceptive effects of mitragynine in mice: contribution of descending noradrenergic and serotonergic systems. *Eur. J. Pharmacol.* (1996) 317(1):75-81.
145. MATSUMOTO K, MIZOWAKI M, SUCHITRA T *et al.*: Antinociceptive action of mitragynine in mice: evidence for the involvement of supraspinal opioid receptors. *Life Sci.* (1996) 59(14):1149-1155.
146. THONGPRADICHOTE S, MATSUMOTO K, TOHDA M *et al.*: Identification of opioid receptor subtypes in antinociceptive actions of supraspinally-administered mitragynine in mice. *Life Sci.* (1998) 62(16):1371-1378.
147. AMADOR TA, ELIZABETSKY E, SOUZA DO: Effects of *Psychotria colorata* alkaloids in brain opioid system. *Neurochem. Res.* (1996) 21(1):97-102.
148. AMADOR TA, VEROTTA L, NUNES DS, ELIZABETSKY E: Antinociceptive profiles of hodgkinsine. *Planta Med.* (2000) 66(8):770-772.
149. AMADOR TA, VEROTTA L, NUNES DS, ELIZABETSKY E: Involvement of NMDA receptors in the analgesic properties of psychoiridine. *Phytother. Res.* (2001) 15(3):202-206.
150. CARVALHO JC, SILVA MF, MACIEL MA *et al.*: Investigation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of trans-dehydrocrotonin, a 19-nor-crotonane diterpene from *Croton cajucara*. Part 1. *Planta Med.* (1996) 62(5):402-404.
151. BIGHETTI EJ, HIRUMA-LIMA CA, GRACIOSO JS, BRITO AR: Anti-inflammatory and antinociceptive effects in rodents of the essential oil of *Croton cajucara* Benth. *J. Pharm. Pharmacol.* (1999) 51(12):1447-1453.
152. AYDIN S, DEMIR T, OZTURK Y, BASER KH: Analgesic activity of *Nepeta italica* L. *Phytother. Res.* (1999) 13(1):20-23.
153. FERREIRA J, FLORIANE AE, CECHINEL FILHO V *et al.*: Antinociceptive properties of the methanolic extract and two triterpenes isolated from *Epidendrum mosonii* stems. *Life Sci.* (2000) 66(9):791-802.
154. DE CAMPOS RO, SANTOS ARS, VAZ ZR *et al.*: Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract and preliminary study of a xanthone isolated from *Polygala cyparissias* (Polygalaceae). *Life Sci.* (1998) 61(16):1619-1630.
155. PERES MTLR, DELLE MONACHE F, PIZZOLATTI MG *et al.*: Analgesic compounds from *Croton urucurana* Baillon. *Phytother. Res.* (1998) 12:209-211.
156. SUH HW, SONG DK, SON, KH *et al.*: Antinociceptive effect of smilaxin B administered intracerebroventricularly in the mouse. *Planta Med.* (1996) 62(2):141-145.
157. BEIRITH A, SANTOS ARS, CALIXTO JB *et al.*: Study of the antinociceptive action of the ethanolic extract and the triterpene 24-hydroxytormentonic acid isolated from the stem bark of *Croton suaveolens*. *Planta Med.* (1999) 65(1):50-55.
158. TORNOS MP, SAENZ MT, GARCIA MD, FERNANDES MA: Antinociceptive effects of the tubercles of *Anredera leptostachys*. *J. Ethnopharmacol.* (1999) 68(1-3):229-234.
159. DE JESUS RA, CECHINEL FILHO V, OLIVEIRA AE, SCHLEMPER V: Analysis of the antinociceptive properties of marrubitin isolated from *Marrubium vulgare*. *Phytother. Res.* (2000) 14(2):111-115.
160. ABDEL-FATTAH AM, MATSUMOTO K, WATANABE H: Antinociceptive effects of *Nigella sativa* oil and its major component, thymoquinone, in mice. *Eur. J. Pharmacol.* (2000) 400(1):89-97.
161. GAERTNER M, MULLER L, ROOS JF *et al.*: Analgesic triterpenes from *Sebastiania schottiana* roots. *Phytother. Res.* (1999) 13(1):41-44.
162. ALEXANDRE-MOREIRA MS, PIUVEZAM MR, ARAUJO CC, THOMAS G: Studies on the anti-inflammatory and analgesic activity of *Curatella americana* L. *J. Ethnopharmacol.* (1999) 67(2):171-177.
163. DUARTE ID, FERREIRA-ALVES DL, VELOSO DP, NAKAMURA-CRAIG M: Evidence of the involvement of biogenic amines in the antinociceptive effect of a vouacapan extract from *Pterodon polygalaeiflorus* Benth. *J. Ethnopharmacol.* (1996) 55(1):13-18.
164. FRANZOTTI EM, SANTOS CV, RODRIGUES HM, MOURAO RH, ANDRADE MR, ANTONIOLLI AR: Anti-inflammatory, analgesic activity and acute toxicity of *Sida cordifolia* L. (Malvaceae). *J. Ethnopharmacol.* (2000) 72(1-2):273-277.
165. GARRIDO G, GONZALES D, DELPORTE C *et al.*: Analgesic and anti-inflammatory effects of *Mangifera indica* L. extract (Vimang). *Phytother. Res.* (2001) 15(1):18-21.
166. AMABEOKU GJ, GREEN I, EAGLES P, BENJEDDOU M: Effects of *Tarhananthus camphoratus* and *Eriocephalus africanus* on nociception in mice and pyrexia in rats. *Phytotherapy* (2000) 7(6):517-522.
167. OKUYAMA E, HASEGAWA T, MATSUSHITA T, FUJIMOTO H, ISHIBASHI M, YAMAZAKI M: Analgesic components of saposchnikovia root (*Saposhnikovia divaricata*). *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* (2001) 49(2):154-160.
168. ALI BH, BASHIR AK, TAMIRA MO: Some effects of *Cassia itaica* on the central nervous system in mice. *J. Pharm. Pharmacol.* (1997) 49(5):500-504.
169. APAYDIN S, ZEYBEK U, INCE I *et al.*: *Hypericum triquetrifolium* Turra. Extract exhibits antinociceptive activity in the mouse. *J. Ethnopharmacol.* (1999) 67(3):307-312.
170. OMIYA Y, GOTO K, SUZUKI Y, ISHIGE A, KOMATSU Y: Analgesia-producing mechanism of processed *Aconiti tuber*: role of dynorphin, an endogenous kappa-opioid ligand, in the rodent spinal cord. *Jpn. J. Pharmacol.* (1999) 79(3):295-301.
171. VAZ ZR, MATA LV, CALIXTO JB: Analgesic effect of the herbal medicine catuama in thermal and chemical models of nociception in mice. *Phytother. Res.* (1997) 11(2):101-106.
172. SUNAGAWA M, OKADA M, GUO SY, HISAMITSU T: Effectiveness of Saiko-

- keishi-to (TJ-10, a Kampo herbal medicine) for trigeminal neuralgia in rats. *Masui* (2001) 50(4):486-490.
173. SUZUKI T, GOTO K, ISHIGE A, KOMATSU Y, KAMEI J: Antinociceptive mechanism of Goshu-jinki-gan in streptozotocin-induced diabetic animals: role of nitric oxide in the periphery. *Jpn. J. Pharmacol.* (1999) 79(3):378-391.
174. YANASE T, NISHIZAWA K, INOUE O, SUKAMATO T, SAITO Y: Antinociceptive effects of Kami-kihi-to in mice. *Nippon Yakurigaku Zasshi* (1996) 109(2):77-83.
175. DE SOUZA MM, MADEIRA A, BERTI C, KROGH R, YUNES RA, CECHINEL FILHO V: Antinociceptive properties of the methanolic extract obtained from *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. *J. Ethnopharmacol.* (2000) 69(1):85-90.
176. GENTILI M, MAZOIT JX, BOUAZIZ H *et al.*: Resveratrol decreases hyperalgesia induced by carrageenan in the rat hind paw. *Life Sci.* (2001) 68(11):1317-1321.
177. CHANTRE P, CAPPELAERE A, LEBLAN D, GUEDON D, VANDERMANDER J, FOURNIE B: Efficacy and tolerance of *Harpagophytum procumbens* versus diacerhein in treatment of osteoarthritis. *Phytomedicine* (2000) 7(3):177-183.
178. RANDALL C, RANDALL H, DOBBS F, HUTTON C, SANDERS H: Randomized controlled trial of nettle sting for treatment of base-of-thumb pain. *J. R. Soc. Med.* (2000) 93(6):305-309.
179. SHI Z, ZHANG H, DU X *et al.*: A double blind observation for therapeutic effects of the tong luo kai bi tablets on rheumatoid arthritis. *J. Tradit. Chin. Med.* (1999) 19(3):166-172.
180. CHOPRA A, LAVIN P, PATWARDHAN B, CHITRE D: Randomized double blind trial of an ayurvedic plant derived formulation for treatment of rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* (2000) 27(6):1365-1372.
181. MARTINEZ J, MORENO JJ: Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochem. Pharmacol.* (2000) 59(7):865-870.
182. MATSUDA H, KAGEURA T, MORIKAWA T, TOGUCHI IIDA I, HARINA S, YOSHIKAWA M: Effects of stilbene constituents from rhubarb on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2000) 10(4):323-327.

Affiliation

João B Calixto^{1*}, Cristiano Scheidt¹, Michel Otuki¹ & Adair RS Santos^{1,2}

¹Author for correspondence

Department of Pharmacology, CCB,

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC),

Florianópolis, SC, Brazil

Tel.: +55 (48) 3319491; Fax: +55 (48) 2224164;

E-mail: calixto@farmaco.ufsc.br

²Núcleo de Investigações Químico-farmacêuticas (NIQFAR), CCS, Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), Itajaí, SC, Brazil

**EVIDENCE FOR THE INVOLVEMENT OF GLUTAMATERGIC PATHWAY IN THE
ANTINOCICEPTION CAUSED BY THE SESQUITERPENE DRIMANIAL IN MICE.**

¹Cristiano Scheidt, ¹Adair R.S. Santos, ¹Juliano Ferreira, ³Angela Malheiros, ²Valdir Cechinel-Filho, ³Rosendo A. Yunes and ^{1*}João B. Calixto.

¹Department of Pharmacology, Center of Biological Sciences, UFSC, Florianópolis, SC, Brazil.

²Chemical-Pharmaceutical Investigations Center, Center of Health Sciences, UNIVALI, Itajaí, SC, Brazil.

³Department of Chemistry, Center of Physical and Mathematical Science, UFSC, Florianópolis, SC, Brazil.

Running title: Antinociceptive properties of drimianial.

*Corresponding author: J.B. Calixto, Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Rua Ferreira Lima, 82, 88015-420, Florianópolis, SC, Brazil, Fax: (5548) 222-4164, Tels: (5548) 331-9491, (5548) 331-9764;

E-mail: calixto@farmaco.ufsc.br or calixto3@terra.com.br

Summary

Drimanial, a new sesquiterpene isolated from the barks of the plant *Drimys winteri* (Winteraceae), given systemically, intraplantarly, or by spinal or supraspinal routes, produced pronounced antinociception against both phases of formalin-induced licking. The systemic injection of drimanial also inhibited, in a graded manner, the pain-related behaviours induced by intraplantar or intrathecal (i.t.) administration of glutamate. Moreover, drimanial also caused marked inhibition of the nociception induced by i.t. administration of metabotropic agonist (*trans*-ACPD), without affecting nociceptive responses induced by ionotropic agonists (NMDA, kainate, AMPA) or by substance P. The antinociception caused by drimanial was not influenced by naloxone, nor did it interfere with the motor coordination of animals in the rota-rod test. Furthermore, drimanial caused graded inhibition of [³H]glutamate binding in cerebral cortical membranes from mice, with an IC₅₀ value of 4.39 μM. Together, these results provide strong evidence indicating that the sesquiterpene drimanial produces peripheral, spinal and supraspinal antinociception in mice according to assessment against intraplantar formalin and glutamate-induced nociception and also i.t. glutamate induced pain-related behaviour in mice. Finally, an interaction with glutamatergic system, more specifically with the metabotropic receptors, seems to greatly contribute to the mechanisms underlying its antinociceptive action.

Keywords: Drimanial, *Drimys winteri*, sesquiterpene, glutamatergic system, antinociception, mice.

Introduction

The management and treatment of pain constitutes one of the most common and yet most difficult aspects of medical practice. Analgesic therapy is currently dominated by two major classes of analgesic drugs; namely, opioids and non-steroidal anti-inflammatory drugs. Both classes of analgesic drugs produce serious side effects, and consequently the discovery of new molecules designed as analgesic agents for the treatment of pain are urgently needed (Damaj et al., 1999).

The transmission of nociceptive signals from peripheral nociceptors to secondary neurons in the dorsal horn of the spinal cord involves several transmitter systems. Among them, the excitatory amino acid, L-glutamate, is generally recognized as an important neurotransmitter released by the primary afferent fibres. Drugs which antagonize the glutamate action or block its release from primary sensory neurons might constitute a relevant strategy for the development of a useful new class of therapeutic analgesics (Neugebauer, 2001; Parson, 2001).

In a previous study, we reported that the hydroalcoholic extract obtained from bark of *Drimys winteri* antagonizes, in a graded manner, contractions induced by several neurotransmitters known to participate in pain transmission and inflammatory states (El Sayah et al., 1997). *In vivo* experiments carried out with the extract of *D. winteri* and the sesquiterpene polygodial isolated from the plant showed dose-related and long-lasting antinociception in several chemical models of nociception in mice and rats (Mendes et al., 1998; 2000).

Another constituent present in the bark of *D. winteri* has been isolated and chemically characterized as being the sesquiterpene denoted drimaniol (see Figure 1) (Malheiros et al., 2001). In this preliminary study, it was demonstrated that drimaniol exhibits antinociceptive action against the writhing test in mice. In the present study, we therefore investigated further the antinociception caused by drimaniol in chemical behavioural models of nociception. We also

investigated, through *in vivo* and *in vitro* techniques, the mechanisms by which the sesquiterpene drimaniol exerts its antinociceptive action, particularly regarding its possible involvement with the glutamatergic pathways.

Material and Methods

Animals

Experiments were conducted using male Swiss mice (25 - 35 g), housed at 22 ± 2 °C under a 12-h light/12-h dark cycle (lights on 6:00) and with access to food and water *ad libitum*. Animals were acclimatized to the laboratory for at least 1 h before testing and were used only once throughout the experiments. The experiments reported were carried out in accordance with the current guidelines for the care of laboratory animals and the ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals as specified by Zimmermann, 1983. The numbers of animals and intensities of noxious stimuli used were the minimum necessary to demonstrate the consistent effects of the drug treatments.

Formalin-induced nociception

The procedure used was essentially similar to that described previously (Mendes et al., 2000). Animals received 20 μ l of 2.5% formalin solution (0.92% of formaldehyde), made up in phosphate-buffered saline solution (concentration: NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM and phosphate buffer 10 mM), injected intraplantarly (i.pl.) in the right hindpaw of the mouse, with a microsyringe and a 26-gauge needle. Animals were pre-treated with drimaniol via intraperitoneal (i.p., 7.0-70.3 μ mol/kg), intrathecal (i.t., 2.3-23.0 nmol/site) or intracerebroventricular (i.c.v., 0.7-7.0 nmol/site) routes, 30, 10 and 10 min before formalin injection, respectively, or intraplantarly (2.3-23.0 nmol/paw, co-administered in association with formalin) as described previously

(Mendes et al., 2000). Control animals received an equal volume of vehicle by i.p. (10 ml/kg), i.pl. (20 μ l/paw), i.t. or i.c.v. (5 μ l/site) route. After i.pl. injection of formalin, the animals were observed from 0-5 (neurogenic phase) and 15-30 (inflammatory phase) min, and the time spent licking the injected paw was timed with a chronometer and considered as indicative of pain.

In an attempt to investigate the participation of opioid system in the antinociceptive effect of the drimanial, animals were pretreated with naloxone (a non-selective opioid receptor antagonist, 13.7 μ mol/kg, i.p.), 15 min before administration of drimanial (70.3 μ mol/kg, i.p.), morphine (13.3 μ mol/kg, s.c.) or vehicle (10 ml/kg, i.p.). The other groups of animals received drimanial, morphine, naloxone or vehicle, 30 min before the formalin injection (Mendes et al., 2000).

In a separate series of experiments, we also investigated the possible antinociceptive effect of drimanial given after formalin injection. For this purpose, mice were injected intraplantarly with formalin, and after 5 min they received drimanial (23.0 μ mol/kg) or vehicle (10 ml/kg) given by i.p. route for evaluation against the second phase of the nociception caused by the formalin.

Spinal excitatory aminoacids and substance P inducing pain-related behaviour in mice

To test the hypothesis that excitatory aminoacids (EAA) or substance P (SP) might be involved in the drimanial antinociception, we assessed the effect of drimanial (70.3 μ mol/kg, i.p.) or morphine (13.3 μ mol/kg, s.c., used as positive control), on the EAA- or SP-induced biting response in mice. Animals received an intrathecal injection of 5 μ l of drug or vehicle solution. Injections were given to waking animals using the method described by Hylden and Wilcox (1980). The animals were restrained manually, and a 30-gauge needle, attached to a 50- μ l microsyringe, was inserted through the skin and between the vertebrae into the subdural space of

the L₅-L₆ spinal segments. Injections were given over a period of 5 s. The nociceptive response was elicited by SP (0.1 nmol/site, i.t.) (Sakurada et al., 1990), *trans*-ACPD (a metabotropic agonist, 50 nmol/site, i.t.) (Boxall et al., 1998), AMPA (AMPA selective agonist, 135 pmol/site, i.t.) (Brambilla et al., 1996), glutamate (175 nmol/site, i.t.), kainate (110 pmol/site, i.t.) or N-methyl-D-aspartate (NMDA selective agonist, 450 pmol/site, i.t.) (Urca and Raigorodsky, 1988).

The amount of time the animal spent biting or licking was evaluated following local post-injections of one of the following agonists: glutamate: 3 min; NMDA and substance P: 5 min; AMPA: 1 min; kainate: 4 min; and *trans*-ACPD: 15 min, as described previously (Urca and Raigorodsky, 1988, Sakurada et al., 1990; Brambilla et al., 1996, Boxall et al., 1998). A bite is defined as a single head movement directed at the flanks or hindlimbs, resulting in contact of the animal's snout with the target organ.

Measurement of motor performance

The rota-rod apparatus has potential value for testing pharmacological agents that produce skeletal muscle relaxation, convulsion and depression of the central nervous system. In order to exclude the possible cause of non-specific disturbances of motor coordination effect caused by drimanyl, the mice were tested on the rota-rod (Dunham and Miya, 1957). The apparatus consisted of a bar, 2.5 cm in diameter, subdivided into five compartments by disks 25 cm in diameter (Rota Rod Treadmill for mice 7600, Ugo Basile, Varese, Italy). The bar rotated at a constant speed of 22 revolutions per min. The animals were selected 24 h previously by eliminating those mice that did not remain on the bar for two consecutive periods of 60 s. After the selection, animals were treated with drimanyl (70.3 µmol/kg, i.p.) or with the same volume of vehicle (10 ml/kg, i.p.) 30 min before the experiments. The results are expressed as the time in secs for which animals remained on the rota-rod. The cut-off time used was 60 s.

Peripheral excitatory aminoacid-induced paw nociception

In an attempt to provide more direct evidence concerning the possible interaction of the drimaniol with glutamatergic system, we also investigated whether or not drimaniol antagonized glutamate-induced licking in the mouse paw. The procedure used was similar to that described previously (Beirith et al., 2002). A volume of 20 μ l of glutamate (30 μ mol/paw made in phosphate-buffer saline solution) was injected intraplantarly into the right hindpaw. Animals were observed individually for 15 min following glutamate injection. The amount of time spent licking the injected paw was timed with a chronometer and was considered as indicative of nociception. Animals were treated with drimaniol (2.3-23.0 μ mol/kg, i.p.) or morphine (13.3 μ mol/kg, s.c.), 30 min before glutamate injection.

[³H]glutamate binding assay

In an attempt to provide direct evidence concerning the possible interaction of the drimaniol with glutamate receptors, we also investigated whether drimaniol action could be associated with direct inhibition of [³H]glutamate binding sites in cerebral cortical membranes. In these experiments, cerebral cortices obtained from mice (killed by decapitation) were dissected and homogenized in 20 volumes of ice-cold 0.32 M sucrose containing 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, and 1 mM MgCl₂. The homogenate was centrifuged at 1000 x g, and the pellet was rehomogenized and centrifuged again. The second pellet was discarded, and both supernatants were pooled and centrifuged at 27000 x g for 15 min. The resulting pellet was dissolved in 1 mM Tris-HCl, pH 7.4, for 30 min. The pellet was washed three times in 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, at 27000 x g for 15 min. The final pellet was resuspended in 10 mM Tris-HCl and the suspensions were assayed for [³H]glutamate binding (Beirith et al., 1998). Protein concentration was determined in aliquots of this final suspension by the method of Lowry et al. (1951), using bovine

serum albumin as the standard. Assays of [³H]glutamate binding were carried out in triplicate in a total volume of 0.5 ml containing 0.1 ml membrane (0.2-0.3 mg protein), 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 40 nM radioactive ligand ([³H]glutamate, 46 Ci/mmol), in the presence or absence of drimaniol (concentration in the range 0.1 to 30 μM). Unspecific binding was assayed similarly, except that 40 μM non-radioactive glutamate (displacer) was added to the incubation medium. Centrifugation at 12000 x g for 25 min was used to separate [³H]glutamate not bound to membranes. The supernatant was discarded, and the walls of the Eppendorf tubes and the surfaces of the pellets were quickly and carefully rinsed with cold deionized water, followed by the procedure of counting the radioactivity. Specific binding was calculated as the difference between binding values in the absence and the presence of the displacer. The results represent the means of three independent experiments (each experiment was carried out in triplicate).

Drugs

The following substances were used: formalin and morphine hydrochloride (Merck, Darmstadt, Germany); L-glutamic acid, Kainate, Substance P and *trans*-ACPD (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA); α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid 2H₂O (AMPA) and N-methyl-D-aspartate (NMDA) (Tocris Cookson, Bristol, UK); naloxone hydrochloride (Research Biochemicals International, Natick, USA). [³H]glutamate (46 Ci/mmol) was purchased from Amersham International (England, UK) and Tween 80 from LabSynth (São Paulo, Brazil). The drimaniol was isolated from the bark of *D. winteri* at the Chemistry Department of the Federal University of Santa Catarina, Brazil, as described previously (Malheiros et al., 2001). Its degree of purity was > 98%. Drugs were dissolved in 0.9% of NaCl solution, with the exception of drimaniol that was dissolved in Tween 80. The final concentration of Tween did not exceed 0.05% and did not cause any effect "per se".

Statistical analysis

The results are presented as mean \pm S.E.M., except the ID₅₀ or IC₅₀ values (i.e., the dose or the concentration of drimaniol reducing the nociceptive or binding response by 50% relative to the control value), which are reported as geometric means accompanied by their respective 95% confidence limits. When possible, ID₅₀ or IC₅₀ values were calculated using at least three dosages of drimaniol, among minimum and maximal effect, determined by linear regression from individual experiments using linear regression GraphPad software (GraphPad software, San Diego, CA). The statistical significance of differences between groups was performed by ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test. *P*-values less than 0.05 (*P*<0.05) were considered as indicative of significance.

Results

Formalin-induced nociception

The results in Figure 2 (A and B) show that drimaniol (7.0–70.3 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) caused a significant and dose-related inhibition of the neurogenic (0 to 5 min) and inflammatory (15 to 30 min) phases of the formalin-induced licking. The calculated mean ID₅₀ values for these effects were 65.9 (60.6-71.6) and 46.5 (39.7-54.2) $\mu\text{mol/kg}$, respectively. Drimaniol was more efficacy in inhibiting the inflammatory phase than the neurogenic phase of the formalin response. The inhibitions observed were 54 ± 2 and $67 \pm 2\%$, respectively. The i.p. injection of the animals with drimaniol (23.0 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), given 5 min after the formalin injection, caused a more marked inhibition of the second phase of the formalin-induced pain than when it was given before the formalin injection, the inhibitions observed for therapeutic (pre-administered) and prophylactic (post-administered) treatment were 69 ± 3 and $38 \pm 3\%$, respectively (Figure 2, C and D).

When co-injected intraplantarly in association with formalin (Figure 2, A and B), drimantal (2.3–23.0 nmol/paw) also produced a dose-related inhibition of both the neurogenic and the inflammatory phases of the formalin test. The calculated mean ID₅₀ values for the early and the late phase were: 5.9 (4.2-8.4) and 5.4 (4.9-5.9) µmol/site, and the inhibitions observed were 58 ± 4 and 60 ± 1%, respectively. Given by i.c.v. (0.7–7.0 nmol/site) or i.t. (2.3-23.0 nmol/site) routes, drimantal produced dose-dependent inhibition of both phases of the formalin-induced licking (Figure 2, A and B). The calculated mean ID₅₀ values for these effects for the i.c.v. route were 0.9 (0.8-1.0) and 4.1 (3.8-4.4) nmol/site, and for the i.t. route they were 18.7 (16.6-21.1) and 19.1 (17.3-21.1) nmol/site, against the early and the late phase of the formalin response, respectively. The inhibitions observed for the early and the late phase were 53 ± 3 and 73 ± 7% for the i.c.v. route, and for the i.t. route they were 53 ± 2 and 49 ± 3%, respectively.

The previous treatment of the animals with naloxone (13.7 µmol/kg, i.p.), given 15 min beforehand, did not significantly reverse the antinociception caused by drimantal (70.3 µmol/kg, i.p.) against either of the phases of formalin-induced nociception (data not shown). However, the antinociception produced by morphine (13.3 µmol/kg, s.c.) was significantly reversed (results not shown).

Spinal excitatory aminoacids and substance P inducing pain-related behavioural in mice

Drimantal (70.3 µmol/kg) given by i.p. route significantly inhibited glutamate and *trans*-ACPD-induced biting responses in mice (49 ± 6 and 93 ± 2%, respectively) (Figure 3 A). In contrast, at the same dose, drimantal had no significant effect against the NMDA, kainate, AMPA or SP-mediated biting response (Figure 3 A). Morphine given by subcutaneous route (13.3 µmol/kg, 30 min prior) significantly inhibited the glutamate, kainate, *trans*-ACPD and SP-mediated biting responses. The inhibitions observed were 78 ± 2, 55 ± 7, 58 ± 2 and 81 ± 5 %,

respectively. However, like drimaniol, morphine did not significantly inhibit the NMDA and AMPA-induced biting responses (Figure 3 A). The results in Figure 3 B show that drimaniol (7.0-70.3 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) dose-dependently inhibited the nociceptive response caused by intrathecal injection of *trans*-ACPD (metabotropic agonist). The calculated mean ID_{50} value and inhibition observed were 23.2 (18.3-29.5) $\mu\text{mol/kg}$ and $93 \pm 2\%$, respectively.

Rota-rod test

Drimaniol (70.3 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), given 30 min beforehand, did not significantly affect the motor response of the animals. The control response in the rota-rod test was 53.3 ± 1.7 s versus 54.8 ± 1.6 s in the presence of the tested compound ($n= 7$).

Peripheral excitatory aminoacid-induced paw nociception

Figure 4 A shows that drimaniol (2.3-23.0 $\mu\text{mol/kg}$), given by i.p. route, dose dependently inhibited the peripheral nociception induced by intraplantar injection of glutamate. The calculated mean ID_{50} value and inhibition observed were 12.3 (10.1-15.0) $\mu\text{mol/kg}$ and $75 \pm 3\%$, respectively. The previous treatment of the animals with morphine (13.3 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.), significantly inhibited ($93 \pm 4\%$) the nociception caused by intraplantar injection of glutamate.

[^3H] glutamate binding

The results depicted in Figure 4 B show that drimaniol (0.1–30 μM) produced a significant and concentration-dependent inhibition of [^3H]glutamate binding in cerebral cortical membranes of the mice. The calculated mean IC_{50} value (and 95% confidence interval) for this effect was: 4.39 (2.66–7.25) μM , and the maximal percentage of inhibition was $87 \pm 7\%$ at 30 μM .

Discussion

In this study, we show that the sesquiterpene drimaniol, isolated from the bark of the Brazilian plant *Drimys winteri*, produces systemic, spinal and supraspinal potent antinociception according to testing by different models of nociception in mice. However, the antinociceptive action of drimaniol was not reversed by the non-selective opioid antagonist naloxone. In this respect, the drimaniol antinociception seems likely to be independent of the interaction with opioid pathway. These findings not only confirm but also greatly extend our previous studies (Tratsk et al., 1997; Mendes et al., 1998; 2000; Malheiros et al., 2001) by demonstrating that both the sesquiterpenes polygodial and the drimaniol present in the bark of the plant *Drimys winteri* largely contribute to the use of this plant in folk medicine.

Of great interest are the findings demonstrating for the first time that the antinociception caused by drimaniol is probably related with an action at the glutamatergic pathways, more specifically via interaction with the metabotropic glutamatergic receptors. This observation derives from the following results. First, drimaniol, on being administered intraperitoneally to mice, caused dose-dependent inhibition of glutamate-induced nociception when injected directly into the hindpaw. We have shown recently (Beirith et al., 2002) that in this model of nociception glutamate apparently acts through peripheral receptors via interaction with NMDA and non-NMDA receptors by a mechanism, which depends heavily on the activation of L-arginine-nitric oxide pathway. Secondly and more conclusively with regard to the evidence, drimaniol administered i.p. markedly attenuated the biting response induced by intrathecal injection of the metabotropic agonist *trans*-ACPD and, to a lesser extent, that induced by glutamate. On the other hand, drimaniol did not inhibit the biting response caused by intrathecal injections of NMDA, AMPA, kainate or SP. These findings strongly suggest that the antinociceptive action of drimaniol depends on its selective interaction with the metabotropic receptor that is sensitive to the *trans*-

ACPD. In contrast with drimantal, morphine inhibited glutamate, *trans*-ACPD, kainate and SP-induced biting. Third, drimantal produced a significant and concentration-dependent inhibition of [³H]glutamatergic binding in cerebral cortical membranes of mice, with a mean IC₅₀ value of 4.39 μM. Although drimantal has relatively low potency in inhibiting glutamate binding sites, such moderate drimantal potency might be desirable and would explain why it has no relevant side effects commonly reported with most glutamate receptor antagonists (Parsons, 2001). However, in contrast to that reported for several GluR antagonists, especially from those that act at the ionotropic site (see for review Parsons, 2001), the antinociception caused by drimantal was not associated with non-specific effect such as ataxia or motor incoordination, as revealed in the rota-rod test.

An increasing amount of experimental evidence now indicates that glutamate receptors (GluRs) are located in the periphery on the nociceptive primary afferent terminals and that they play a relevant role in the transduction of sensory input at the periphery. Thus, NMDA, AMPA and kainate receptors are present in dorsal root ganglions (Budai and Larson, 1998; Jia et al., 1999; see for review Carlton, 2001; Parsons, 2001). Furthermore, injection of L-glutamate or the selective glutamate agonists NMDA, AMPA or kainate into the rat or mouse hindpaws produces nociception and mechanical hyperalgesia (Carlton et al., 1995; Zhou et al, 1996; Lawand et al., 1997; Omote et al., 1998; Beirith et al, 2002).

Pharmacological and electron microscopic studies indicate that group I mGluRs (mGluR1 and mGluR5) are present in peripheral tissues and that the activation of these receptors leads to increased sensitivity to noxious heat which in turn causes hyperalgesia (Fisher andCoderre, 1996; Boxall et al., 1998; Bhave et al., 2001; Walker et al., 2001 a,b). Fundytus et al. (2001) showed that knockdown of spinal mGluR1 significantly reduces cold and heat hyperalgesia and

mechanical allodynia in the hindpaw of neuropathic rats. There are also indications that mGluR1 is critically important in the inflammation-induced hyperexcitability of spinal cord neurones (Neugebauer et al., 1994). However, the possibility of the drimaniol acts selectively in mGlu1 or mGlu5 receptors remains to be seen in future studies.

The result showing that drimaniol given systemically or locally, or by spinal or supraspinal routes, produces graded inhibition against both phases of the formalin-induced pain in mice is also relevant. There is a great amount of experimental evidence indicating that GluRs are implicated in formalin-induced nociception (Davidson et al., 1997; Omote et al., 1998; Vetter et al., 2001; Yashpal et al., 2001). Fisher andCoderre (1996) reported that i.t. injection of mGluR1/mGluR5 agonist dose-dependently enhanced the second phase of formalin-induced pain. Very recently, using anatomical and pharmacological evidence, Zhou et al. (2001), reported that peripheral mGlu1 α receptor is present in peripheral cutaneous axons and that activation of these receptors largely contributes to formalin-induced nociception in the rat. The great inhibition caused by drimaniol, when administered after formalin injection into the hind paw, is very interesting, since it was not only prophylactic (i.e. producing preemptive analgesia when it was pre-administered), but was also therapeutic (i.e. effective when post-administered). These findings might have additional therapeutic implications for the development of a new drug to treat inflammatory pain.

In conclusion, the results of the present study have shown consistent evidence for the first time indicating that the sesquiterpene drimaniol, given locally into the paw, by systemical, intrathecal or intracerebroventricular routes, produces dose-related inhibition of formalin-, glutamate- and *trans*-ACPD-induced nociception in mice and also glutamate binding in cerebral cortical membranes from mice. In contrast, at the same range of dose, drimaniol fails to affect the

NMDA-kainate-AMPA and SP-mediated behaviour pain responses. Taken together, our results indicate that drimanol or its derivatives might be of potential interest in the effort to develop glutamate-target therapeutic drugs with improved safety and efficacy for the treatment of inflammatory and neuropathic pain.

Acknowledgements

This work was supported by grants from CNPq, FINEP and PRONEX (Brazil). CS. and JF are MSc and PhD students of pharmacology, respectively, receiving grants from CNPq.

5. References

- Beirith, A., Santos, A.R.S., Rodrigues, A.L.S., Creczynski-Pasa, T.B., Calixto, J.B., 1998. Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyron on formalin, capsaicin and glutamate tests. Study of the mechanism of action. *Eur. J. Pharmacol.* 345, 233-245.
- Beirith, A., Santos, A.R.S. and Calixto, J.B., 2002. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. *Brain Res.*, 924, 219-228.
- Bhave, G., Karim, F., Carlton, S.M., Gereau, R.W., 2001. Peripheral group I metabotropic glutamate receptors modulate nociception in mice. *Nat. Neurosci.* 4, 417-423.
- Boxall, S.J., Berthele, A., Tolle, T.R., Zieglgansberger, W., Urban, L., 1998. mGluR activation reveals a tonic NMDA component in inflammatory hyperalgesia. *Neuroreport.* 9, 1201-1203.
- Brambilla, A., Prudentino, A., Grippa, N., Borsini, F., 1996. Pharmacological characterization of AMPA-induced biting behaviour in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 305, 115-117.
- Budai, D., Larson, A.A., 1998. The involvement of metabotropic glutamate receptors in sensory transmission in dorsal horn of the rat spinal cord. *Neuroscience* 83,571-580.

- Carlton, S.M., Hargett, G.L., Coggeshall, R.E., 1995. Localization and activation of glutamate receptors in unmyelinated axons of rat glabrous skin. *Neurosci. Lett.* 197, 25-28.
- Carlton, S.M., Zhou, S., Coggeshall, R.E., 1996. Localization and activation of substance P receptors in unmyelinated axons of rat glabrous skin. *Brain Res.* 734, 103-108.
- Carlton, S.M., Hargett, G.L., Coggeshall, R.E., 2001. Localization of metabotropic glutamate receptors 2/3 on primary afferent axons in the rat. *Neuroscience* 105, 957-69.
- Damaj, M.I., Glassco, W., Aceto, M.D. and Martin, B.R., 1999. Antinociceptive and Pharmacological Effects of Metanicotine, a Selective Nicotinic Agonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 291(1), 390-398.
- Davidson, E.M., Coggeshall, R.E., Carlton, S.M., 1997. Peripheral NMDA and non-NMDA glutamate receptors contribute to nociceptive behaviors in the rat formalin test. *Neuroreport.* 8, 941-946.
- Dunham, N.W. and Miya, T.S., 1957. A note on a Simple Apparatus for Detecting Neurobiological Deficit in Rats and Mice. *J. Am. Pharm. Assoc.* 46, 208-209.
- El Sayah, M., Cechinel Filho, V., Yunes, R.A., Calixto, J.B., 1997. Action of the extract of *Drimys winteri* on contraction induced by inflammatory mediators, compound 48/80 and ovalbumin of the guinea-pig trachea in vitro. *Gen. Pharmacol.* 28, 699-704.
- Fisher, K., Coderre, T.J., 1996. The contribution of metabotropic glutamate receptors (mGluRs) to formalin-induced nociception. *Pain* 68, 255-263.
- Fundyus, M.E., Yashpal, K., Chabot, J.G., Osborne, M.G., Lefebvre, C.D., Dray, A., Henry, J.L., Coderre, T.J., 2001. Knockdown of spinal metabotropic glutamate receptor 1 (mGluR(1)) alleviates pain and restores opioid efficacy after nerve injury in rats. *Br. J. Pharmacol.* 132, 354-367.

- Hylden, J.L. and Wilcox, G.L., 1980. Intrathecal morphine in mice: a new technique. *Eur. J. Pharmacol.* 67, 313-316.
- Jia, H., Rustioni, A., Valtchanoff, J.G., 1999. Metabotropic glutamate receptors in superficial laminae of the rat dorsal horn. *J. Comp. Neurol.* 410, 627-642.
- Lawand, N.B., Willis, W.D., Westlund, K.N., 1997. Excitatory amino acid receptor involvement in peripheral nociceptive transmission in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 324, 169-77.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- Malheiros, A., Cechinel Filho, V., Schmitt, C.B., Santos, A.R.S., Scheidt, C., Calixto, J.B., Monache, F.D., 2001. A sesquiterpene drimane with antinociceptive activity from *Drimys winteri* bark. *Phytochemistry* 57, 103-107.
- Mendes, G.L., Santos, A.R.S., Campos, M.M., Tratsk, K.S., Yunes, R.A., Cechinel Filho, V., Calixto, J.B., 1998. Anti-hyperalgesic properties of the extract and of the main sesquiterpene polygodial isolated from the barks of *Drimys winteri* (Winteraceae). *Life Sci.* 63, 369-381.
- Mendes, G.L., Santos, A.R.S., Malheiros, A., Cechinel Filho, V., Yunes, R.A., Calixto, J.B., 2000. Assessment of mechanisms involved in antinociception caused by sesquiterpene polygodial. *J Pharmacol Exp Ther.* 292, 164-172.
- Neugebauer, V., Lucke, T., Schaible, H.G., 1994. Requirement of metabotropic glutamate receptors for the generation of inflammation-evoked hyperexcitability in rat spinal cord neurons. *Eur. J. Neurosci.* 6, 1179-1186.
- Neugebauer, V., 2001. Peripheral metabotropic glutamate receptors: fight the pain where it hurts. *Trends Neurosci.* 24, 550-552.
- Omote, K., Kawamata, T., Kawamata, M., Namiki, A., 1998. Formalin-induced release of excitatory amino acids in the skin of the rat hindpaw. *Brain Res.* 787, 161-164.

- Parsons, C.G., 2001. NMDA receptors as targets for drug action in neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* 429, 71-78.
- Sakurada, T., Manome, Y., Tan-No, K., Sakurada, S., Kisara, K., 1990. The effects of substance P analogues on the scratching, biting and licking response induced by intrathecal injection of N-methyl-D-aspartate in mice. *Br. J. Pharmacol.* 101, 307-310.
- Tratsk, K.S., Campos, M.M., Vaz, Z.R., Cechinel Filho, V., Schlemper, V., Yunes, R.A., Calixto, J.B., 1997. Anti-allergic effects and oedema inhibition caused by the extract of *Drimys winteri*. *Inflamm. Res.* 46, 509-514.
- Urca, G., Raigorodsky, G., 1988. Behavioral classification of excitatory amino acid receptors in mouse spinal cord. *Eur. J. Pharmacol.* 153, 211-220.
- Vetter, G., Geisslinger, G., Tegeder, I., 2001. Release of glutamate, nitric oxide and prostaglandin E2 and metabolic activity in the spinal cord of rats following peripheral nociceptive stimulation. *Pain* 92, 213-218.
- Walker, K., Reeve, A., Bowes, M., Winter, J., Wotherspoon, G., Davis, A., Schmid, P., Gasparini, F., Kuhn, R., Urban, L., 2001a. Related Articles. mGlu5 receptors and nociceptive function II. mGlu5 receptors functionally expressed on peripheral sensory neurones mediate inflammatory hyperalgesia. *Neuropharmacology* 40, 10-19.
- Walker, K., Bowes, M., Panesar, M., Davis, A., Gentry, C., Kesingland, A., Gasparini, F., Spooren, W., Stoehr, N., Pagano, A., Flor, P.J., Vranesic, I., Lingenhoehl, K., Johnson, E.C., Varney, M., Urban, L., Kuhn, R., 2001b. Metabotropic glutamate receptor subtype 5 (mGlu5) and nociceptive function. I. Selective blockade of mGlu5 receptors in models of acute, persistent and chronic pain. *Neuropharmacology* 40, 1-9.

- Yang, K., Wang, G.D., Li, Y.Q., Shi, J.W., Zhao, Z.Q., 1998. Co-existence of glutamate and substance P in electrophysiologically identified dorsal root ganglion neurons of rats. *Sheng Li Xue Bao.* 50, 453-459.
- Yashpal, K., Mason, P., McKenna, J.E., Sharma, S.K., Henry, J.L., Coderre, T.J., 1998. Comparison of the effects of treatment with intrathecal lidocaine given before and after formalin on both nociception and Fos expression in the spinal cord dorsal horn. *Anesthesiology* 88, 157-164.
- Yashpal, K., Fisher, K., Chabot, J., Coderre, T.J., 2001. Differential effects of NMDA and group I mGluR antagonists on both nociception and spinal cord protein kinase C translocation in the formalin test and a model of neuropathic pain in rats. *Pain* 94, 17-29.
- Zhou, S., Bonasera, L., Carlton, S.M., 1996. Peripheral administration of NMDA, AMPA or KA results in pain behaviors in rats. *Neuroreport.* 7, 895-900.
- Zhou, S., Komak, S., Du, J., Carlton, S.M., 2001. Metabotropic glutamate 1alpha receptors on peripheral primary afferent fibers: their role in nociception. *Brain Res.* 913, 18-26.
- Zimmermann, M., 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109-110.

Legends to figures

Figure 1 – Molecular structure of the sesquiterpene drimaniol.

Figure 2 - Effect of i.p. (O, $\mu\text{mol/kg}$), i.pl. (\bullet , $\mu\text{mol/paw}$), i.c.v. (Δ , $\mu\text{mol/site}$) or i.t. (\square , $\mu\text{mol/site}$) injection of drimaniol against formalin-induced licking (first phase, panel A, and second phase, panel B) in mice. Panel C and D shows the time-dependent effect of drimaniol against the first and second phase of formalin nociception. Each group represents the mean of 6 to 8 animals and the vertical lines indicate the S.E.M. Control values "C" indicate the animals injected with the vehicle and the asterisks denote the significance levels, when compared with control groups (ANOVA) $*P < 0.05$, $**P < 0.01$. In some cases, the error lines are hidden within the symbols. ## Denote the significant levels of mice pre-administered with drimaniol when compared with post-administered, $P < 0.01$ (one-way ANOVA followed by Dunnett's test).

Figure 3 – Effect of drimaniol and morphine on the biting response caused by i.t. injection of glutamate, NMDA, SP, AMPA, kainate and *trans*-ACPD in mice (panel A). Panel B shows the dose-dependent effect of drimaniol on the biting response caused by i.t. injection of *trans*-ACPD in mice. Each column represents the mean of 6 to 10 animals and vertical lines show S.E.M. Asterisks denote the significance levels in comparison with control group values (one-way ANOVA followed by Dunnett's test). $**P < 0.01$.

Figure 4 – Panel A shows the effect of drimaniol (O, 2.3-23.0 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) and morphine (Δ , 13.3 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) on the nociception caused by i.pl. injection of glutamate (30 $\mu\text{mol/paw}$) in mouse paw. The asterisks denote the significance levels in comparison with control (glutamate) values (one-way ANOVA followed by Dunnett's test), $**P < 0.01$. Panel B shows the effect of increasing concentrations of drimaniol (0.1–30 μM) on [^3H]glutamate binding in cerebral cortex membranes from mice. Each point represents the mean of three independent experiments (each experiment was carried out in triplicate) and the vertical lines indicate the S.E.M. The asterisks denote the significance levels when compared with the control group, $**P < 0.01$. In some cases, the error lines are hidden within the symbols.

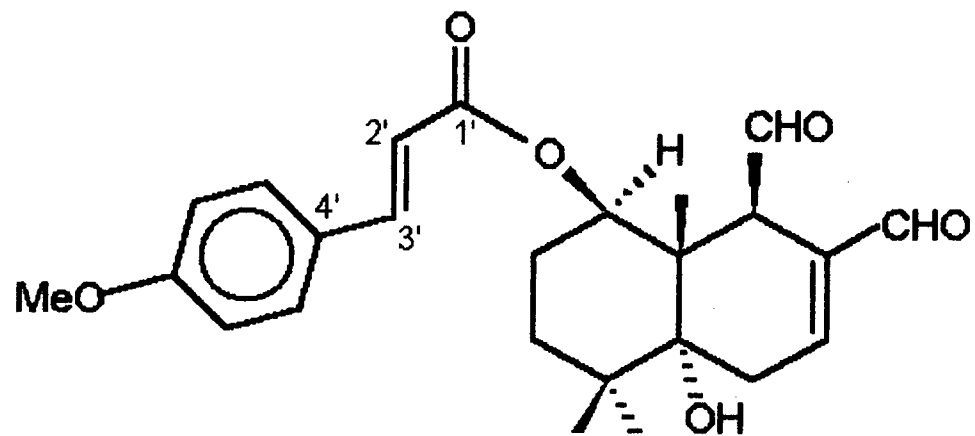


Figure - 1

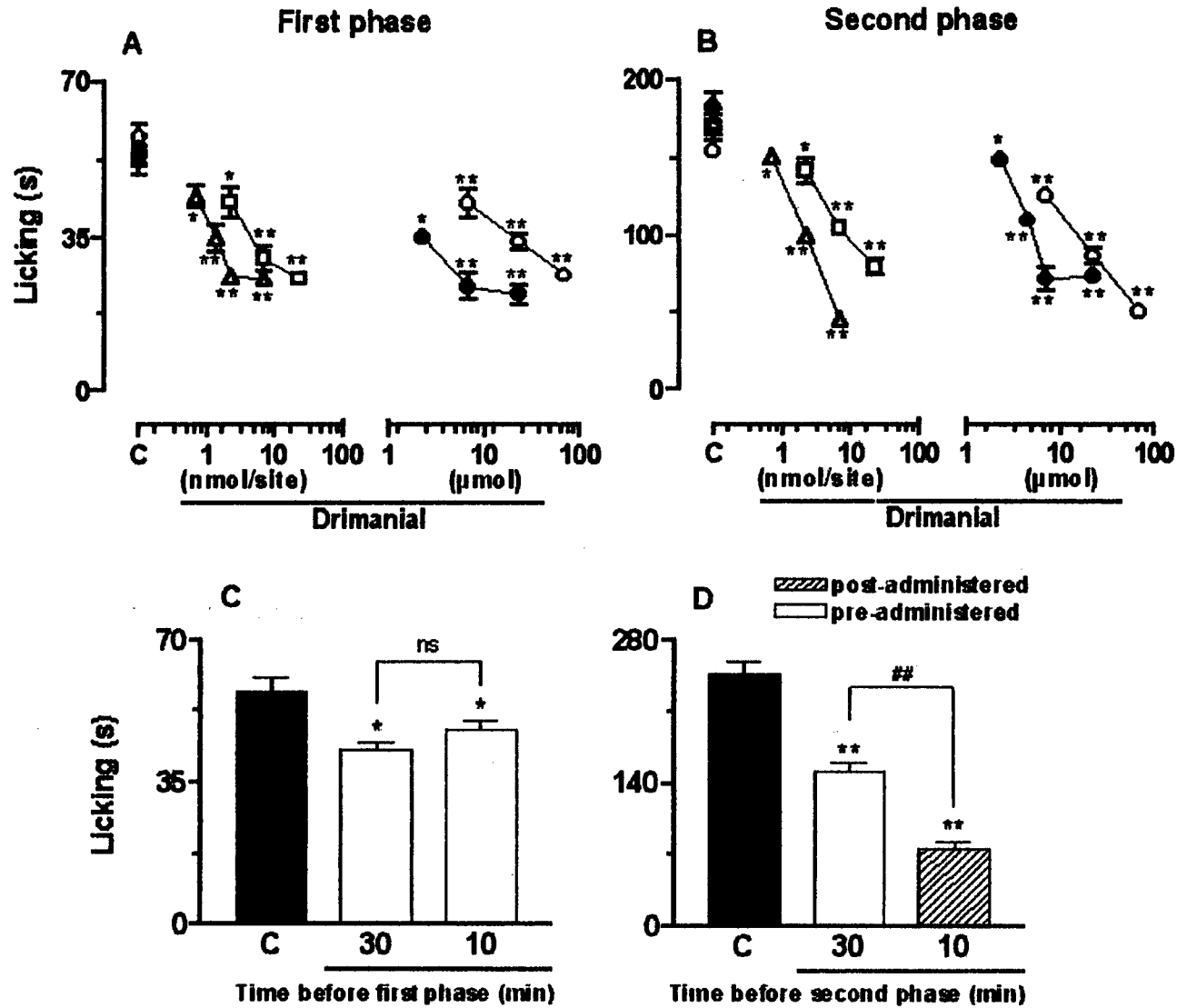


Figure - 2

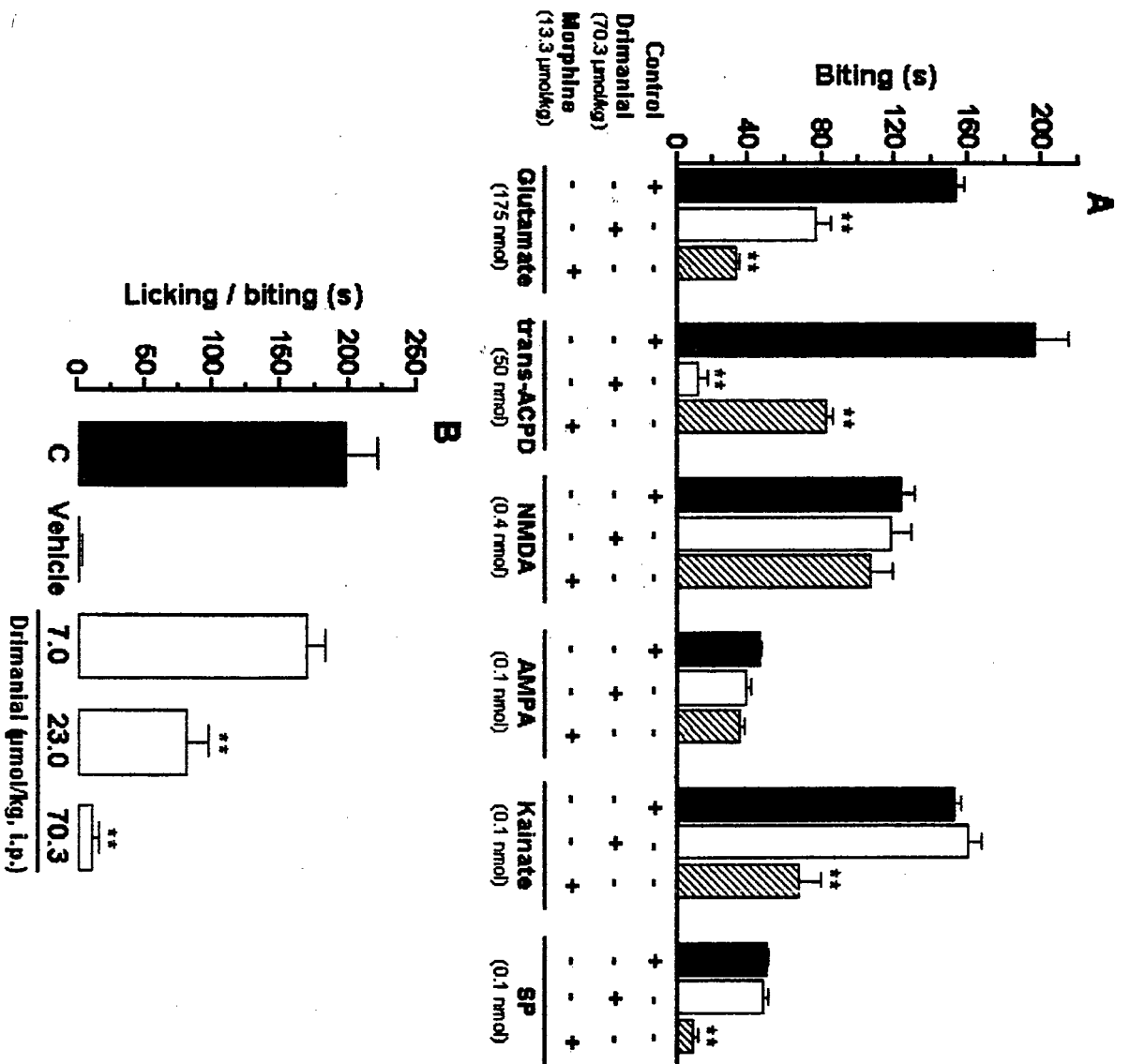


Figure - 3

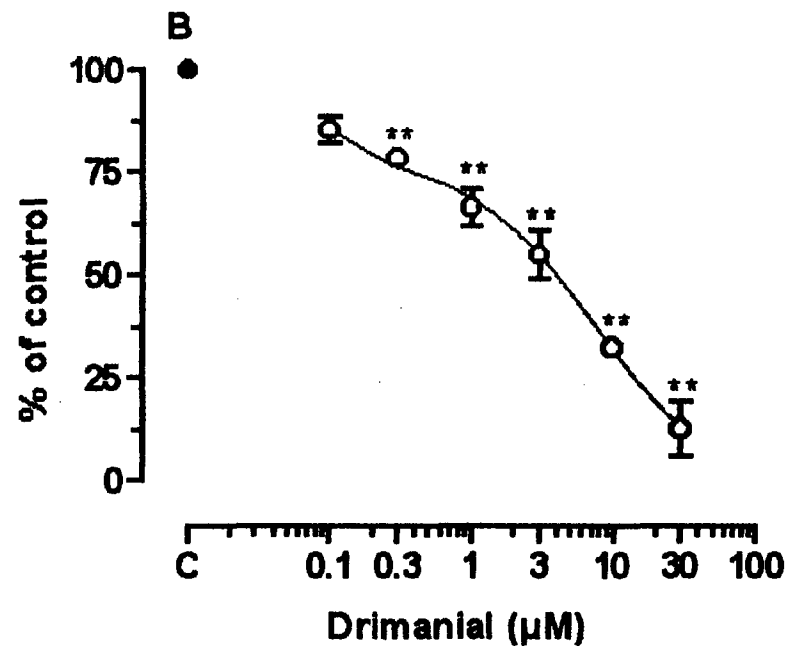
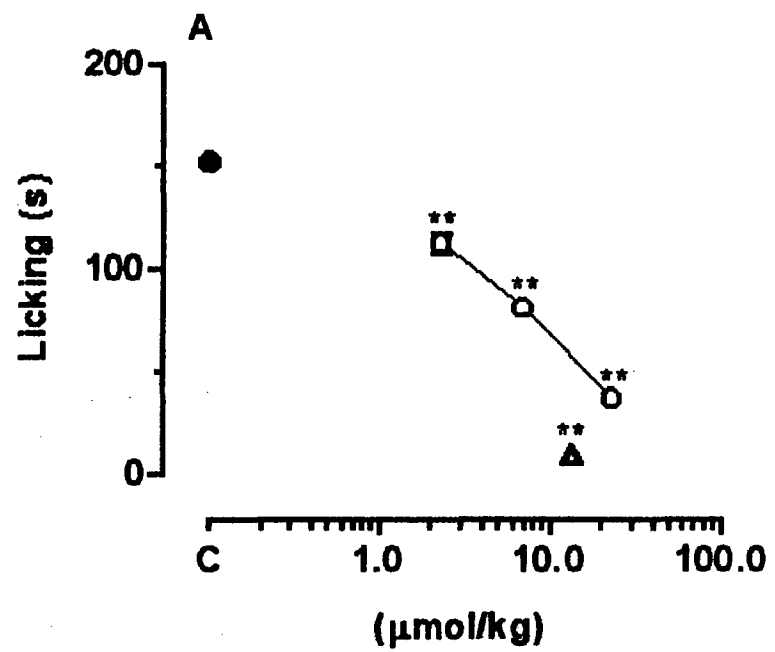


Figure - 4