

CANDIDA APARECIDA LEITE KASSUYA

ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA E ANTI-
NOCICEPTIVA DE EXTRATOS E LIGNANAS
ISOLADOS DE *Phyllanthus amarus*

FLORIANÓPOLIS - SC

Janeiro - 2006

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

ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA E ANTI-
NOCICEPTIVA DE EXTRATOS E LIGNANAS
ISOLADOS DE *Phyllanthus amarus*

CANDIDA APARECIDA LEITE KASSUYA

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção de título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto

FLORIANÓPOLIS - SC

Janeiro - 2006

KASSUYA, Candida Aparecida Leite. *Atividade antiinflamatória e anti-nociceptiva de extratos e lignanas isolados de Phyllanthus amarus*. Florianópolis, 2006. 108p. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Curso de Pós graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientadora: João Batista Calixto.

Defesa: 24/01/2006.

O extrato hexânico (EH) obtido do *Phyllanthus amarus* reduziu a nocicepção em modelos experimentais de dor aguda e crônica em camundongos, sendo que o mecanismo analgésico poderia estar relacionado possivelmente com a modulação do receptor TRPV1. Este estudo demonstrou que o EH, a fração rica em lignanas, e as lignanas filtetralina, nirtetralina ou nirantina foram efetivos em inibir o edema, a migração celular e/ou a produção de IL-1 β . O mecanismo de ação da nirantina parece envolver o receptor para fator de ativação plaquetário, enquanto que para a nirtetralina o perfil farmacológico parece envolver a interação com receptor para endotelina-1. Apesar deste trabalho ainda não ter caracterizado o princípio ativo responsável pelas ações anti-nociceptivas, a filtetralina, a nirtetralina e a nirantina parecem ser as responsáveis pelas ações antiinflamatórias do *P. amarus*.

[*Phyllanthus amarus*] [fração rica em lignanas] [Nirantina] [Nirtetralina]
[Filtetralina] [Inflamação] [Nocicepção] [adjuvante completo de Freund]
[Formalina] [TRPV1] [fator de ativação plaquetário] [endotelina-1].

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a grande honra e prazer de ter o professor João Batista Calixto como orientador. Dentre outras coisas, agradeço o professor Calixto: por ter me mostrado que o crescimento profissional depende da disposição, paciência e dedicação; pela preocupação constante e cobrança; pela plena disposição para tirar dúvidas e atendimento; pelos valiosos ensinamentos; e pelo carinho e amizade oferecidos neste período.

*Agradeço também a professora Vera Lúcia Rehder e seu grupo, pelo fornecimento dos extratos, frações e compostos isolados de *P. amarus*, pela ajuda, compreensão e colaboração nesta tese.*

Aos doutores Juliano Ferreira, Tânia Mazzuco, Octávio Menezes Jr, Danielle Duma, pela imensa ajuda para realização deste projeto e principalmente pela verdadeira amizade demonstrada nestes anos.

Ao CNPq, FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro.

DEDICATÓRIA

Ao grande amor da minha vida: Roberto Mikio Kassuya por todo o carinho, amor, por sempre acreditar em mim e me apoiar nas escolhas que fiz e por sempre me incentivar a nunca desistir dos meus sonhos.

Aos meus pais: Toshi Sakate e Pedro Antônio, Yoshio Kassuya (in memoriam) e Iwako Kassuya por sempre estarem ao meu lado.

Aos professores do Departamento de Farmacologia, em especial ao Dr. Anicleto Poli, Dr. Jamil Assreuy, Dr. Reinaldo Takahashi, Dr. Giles Rae e Dra. Rosa Maria Nicolau, pelo aprendizado e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia, em especial a Rita Maria Palma, a Sandra Regina B. de Oliveira, a Diana Lenzi, a Pedro Paulo de Souza, a Redna, pelo carinho e amizade.

Aos meus amigos de laboratório: Valfredo Schlemper, Eunice André, Carlos Eduardo Vitor, Rafaela Claudino, Edinéia Lemos, Allison Freire, Daniela Leite, Daniela Cabrini, Michel Otuki, Janice, pela amizade e por tornarem este período de pós-graduação agradáveis e memoráveis.

Aos meus queridos amigos da pós-graduação na UFSC: Sílvia Dal Bol, Maria Fernanda Werner, Daniel Fernandes, Jarbas Motta Siqueira Jr., Valdelúcia, Inácio, Mariana A. Hort, Sofia Júrgensen, Rui Daniel, Luciano pela troca de informações e amizade.

SUMÁRIO

	Lista de Abreviaturas.....	i
	Lista de Tabelas.....	ii
	Lista de Anexos.....	ii
	Lista de Figuras.....	iii
	Resumo.....	v
	Abstract.....	vi
1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	OBJETIVOS.....	24
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1.	Análises fitoquímicas.....	25
3.1.1.	Isolamento, identificação química e rendimento dos constituintes do <i>P. amarus</i>	25
3.2.	Avaliação farmacológica.....	26
3.2.1.	Animais.....	26
3.2.2.	Modelos experimentais de dor.....	26
3.2.2.1.	Alodínia mecânica induzida pelo adjuvante completo de Freund (CFA).....	26
3.2.2.2.	Lesão parcial do nervo ciático.....	28
3.2.2.3.	Alodínia mecânica induzida pelo fator de ativação plaquetário (PAF)....	29
3.2.2.4.	Alodínia mecânica induzida pela carragenina.....	29
3.2.2.5.	Nocicepção induzida pela formalina.....	30
3.2.2.6.	Nocicepção induzida pela capsaicina.....	31
3.2.2.7.	Nocicepção induzida pela endotelina-1 (ET-1)	32
3.2.3.	Modelos experimentais de inflamação.....	32
3.2.3.1.	Edema induzido pelo CFA.....	32
3.2.3.2.	Edema induzido por outros agentes inflamatórios.....	33
3.2.3.3.	Pleurisia induzida pelo PAF.....	34
3.2.4.	Medidas relacionadas ao processo inflamatório ou doloroso.....	35
3.2.4.1.	Atividade da mieloperoxidase (MPO).....	35
3.2.4.2.	Quantificação da interleucina-1 β (IL-1 β).....	36
3.2.4.3.	Ensaio de união específica para [³ H]-PAF em córtex cerebral de camundongos.....	37
3.2.4.4.	Ensaio de união específica para [³ H]-BK em íleo de ratos.....	38
3.2.4.5.	Ensaio de união específica para [³ H]-resiniferatoxina (RTX) em medula espinhal de ratos.....	39
3.2.4.6.	Expressão da enzima COX-2 pelo ensaio de <i>Western Blot</i>	40
3.2.5.	Drogas e reagentes.....	41
3.2.6.	Análise estatística.....	42
4.	RESULTADOS.....	43
4.1.	Efeito antiinflamatório e anti-nociceptivo de extrato hexânico e frações obtidos do <i>P. amarus</i>	43
4.1.1.	Efeito na alodínia mecânica induzida pelo CFA.....	43
4.1.2.	Efeito na alodínia mecânica induzida pela Cg.....	45
4.1.3.	Efeito na alodínia mecânica induzida por neuropatia.....	45
4.1.4.	Efeito na nocicepção induzida pela formalina.....	47
4.1.5.	Efeito na nocicepção induzida pela capsaicina.....	47
4.1.6.	Efeito no ensaio de união específica para [³ H]-RTX em medula espinhal de ratos.....	49
4.1.7.	Efeito sobre o edema induzido pelo CFA.....	49

4.1.8.	Efeito sobre o edema induzido Cg.....	51
4.2.	Efeito antiinflamatório das lignanas isoladas do <i>P. amarus</i>	51
4.2.1.	Efeito sobre o edema induzido pela Cg.....	51
4.2.2.	Efeito sobre o aumento da atividade da MPO induzido pela Cg.....	54
4.2.3.	Efeito sobre o aumento dos níveis de IL-1 β induzido pela Cg.....	55
4.2.4.	Efeito sobre o aumento da expressão da enzima COX-2 induzido pela Cg.....	57
4.3.	Mecanismo de ação da ET-1 nas respostas antiinflamatórias das lignanas isoladas do <i>P. amarus</i>	58
4.3.1.	Efeito no edema induzido pela ET-1.....	58
4.3.2.	Efeito sobre a nocicepção induzida pela ET-1.....	60
4.4.	Mecanismo de ação do PAF nas respostas antiinflamatórias das lignanas isoladas de <i>P. amarus</i>	64
4.4.1.	Efeito no edema induzido pelo PAF.....	64
4.4.2.	Efeito do EH e das lignanas isolados do <i>P. amarus</i> no ensaio de união específica do [³ H]-PAF em córtex cerebral de camundongos.....	68
4.4.3.	Efeito da nirantina sobre a pleurisia induzida pelo PAF.....	70
4.4.4.	Efeito da nirantina sobre o aumento da atividade da MPO induzido pelo PAF.....	70
4.4.5.	Efeito da nirantina sobre a alodínia induzida pelo PAF.....	73
4.5.	Mecanismo de ação de outros mediadores sobre as respostas antiinflamatórias dos EH e FRL obtidos de <i>P. amarus</i>	73
4.5.1.	Efeito no edema induzido por outros mediadores inflamatórios.....	73
4.5.2.	Efeito no ensaio de união específica para [³ H]-BK em córtex cerebral de camundongos.....	74
5.	DISCUSSÃO	75
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
7.	ANEXOS	108

LISTA DE ABREVIATURAS

AINES	- antiinflamatórios não esteroidais
BK	- bradicinina
CFA	- adjuvante completo de Freund
Cg	- carragenina
COX	- ciclooxigenase
D.O.	- densidade óptica
DEX	- dexametasona
DMSO	- dimetilsulfóxido
EGTA	- ácido bis (2-aminoetil) etilenoglicol- N, N, N', N'-tetraacético
EH	- extrato hexânico
EPM	- erro padrão da média
ET-1	- endotelina-1
F1	- fração 1
F2	- fração 2, rica em ácidos
F3	- fração 3
FRL	- fração rica em lignanas
i.pl.	- intraplantar
IL1- β	- interleucina 1 β
MPO	- mieloperoxidase
PAF	- fator de ativação plaquetário
PBS	- salina tamponada com fosfatos
PG	- prostaglandina
PMSF	- fluoreto de feniltimetilsulfonil
RTX	- resiniferatoxina
TNF- α	- fator de necrose tumoral- α

LISTA DE TABELAS

1.	Efeito do tratamento com dexametasona (DEX), BQ-123, WEB2170, aspirina ou com as lignanas hipofilantina e filantina isoladas de <i>P. amarus</i> sobre o edema de pata induzido pela injeção i.pl. de Cg após 60 min.....	54
2.	Efeito do tratamento local com a filtetralina, nirtetralina, nirantina isoladas do <i>P. amarus</i> , do WEB2170 ou do BQ-123 sobre o edema induzido pela injeção i.pl. de PAF avaliado 60 min após a injeção do PAF.....	68
3.	Efeito do tratamento com EH ou FRL obtidas de <i>P. amarus</i> , sobre o edema induzido pela injeção intraplantar de bradicinina (BK), histamina ou substância P (SP).....	74

LISTA DE ANEXOS

1.	Kassuya CAL, Silvestre AA, Rehder VL, Calixto JB. Anti-allodynic and anti-oedematogenic properties of the extract and lignans from <i>Phyllanthus amarus</i> in models of persistent inflammatory and neuropathic pain. Eur J Pharmacol. 2003, 478:145-153.....	109
2.	Kassuya CAL, Leite, DFP, de Melo, LV, Rehder VL, Calixto JB. Anti-inflammatory properties of extract, fraction and lignans isolated from <i>Phyllanthus amarus</i> . Planta Medica, 2005, 71 (8): 721-6.....	118
3.	Kassuya CAL, Silvestre A, Menezes-de-Lima Jr. O, Marotta DM, Rehder VLG, Calixto JB. Antiinflammatory and antiallodynic actions of the lignan niranthin isolated from <i>Phyllanthus amarus</i> . Evidence for interaction with platelet activating factor. Manuscrito submetido à publicação.....	124

LISTA DE FIGURAS

1.	Fotos de um exemplar de <i>P. amarus</i> cedidas pela Professora Vera L. Rehder na casa de vegetação do CPQBA – UNICAMP.....	4
2.	Estrutura química das lignanas isoladas de <i>P. amarus</i>	10
3.	Efeito do tratamento via oral com o extrato hexânico (EH) ou com a fração rica em lignanas (FRL) obtidos do <i>P. amarus</i> sobre a alodínia mecânica (A) induzida pela injeção intraplantar de CFA e do tratamento via oral com EH, FRL, fração F1 (F1), fração 2 (F2) ou fração F3 (F3) obtidos do <i>P. amarus</i> sobre a alodínia mecânica (B) induzida pela injeção intraplantar de Cg em camundongos.....	44
4.	Efeito do tratamento via oral com o extrato hexânico (EH) obtido do <i>P. amarus</i> ou com a gabapentina sobre a alodínia mecânica induzida pela contração parcial do nervo ciático (OP).....	46
5.	Efeito do tratamento via oral com o extrato hexânico (EH), fração rica em lignanas (FRL), fração F1 (F1), fração 2 (F2) ou fração F3 (F3) obtidos do <i>P. amarus</i> e da aspirina (ASA) sobre a primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos.....	48
6.	Efeito do tratamento via oral com o extrato hexânico (EH), fração 2 (F2) ou fração F3 (F3) obtidas do <i>P. amarus</i> e do tratamento subcutâneo com a capsaicina sobre a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos (A) e efeito do extrato hexânico (EH) ou da fração F3 obtidos do <i>P. amarus</i> e da capsaicina sobre a união específica da [³ H]-RTX em preparações de medula espinhal de rato.....	50
7.	Efeito do tratamento via oral com o extrato hexânico (EH) ou com a fração rica em lignanas (FRL) obtidos do <i>P. amarus</i> sobre o edema induzido pela injeção intraplantar de CFA (A) ou do tratamento por via oral com EH, FRL, fração F1 (F1), fração 2 (F2), fração F3 (F3) obtidos do <i>P. amarus</i> sobre o edema induzido pela injeção intraplantar de Cg em camundongos (B).....	52
8.	Efeito do tratamento via oral com a filtetralina (FILT) (A), nirtetralina (NIRT) (B) ou com a nirantina (NIRA) (C) isoladas do <i>P. amarus</i> sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de Cg em camundongos, após 30, 60, 120 e 240 min.....	53
9.	Efeito do tratamento via oral com o extrato hexânico (EH), fração rica em lignanas (FRL), com a filtetralina (FILT), nirtetralina (NIRT), nirantina (NIRA) obtidos de <i>P. amarus</i> , ou com a dexametasona (DEX) sobre o aumento da atividade da MPO (A) e sobre o aumento da produção de IL-1 β (B) induzido pela injeção intraplantar de Cg em camundongos.....	56
10.	Imunodeteção dos níveis da proteína COX-2 (71-72 kDa) em camundongos que receberam tratamento oral com o extrato hexânico (EH) ou com a fração rica em lignanas (FRL) ou com as lignanas filtetralina (FILT), nirtetralina (NIRT) ou nirantina (NIRA) obtidos de <i>P. amarus</i> após injeção intraplantar de Cg em camundongos.....	57
11.	Efeito do tratamento via oral com o extrato hexânico (EH) na dose de	59

	100 mg/kg (A) ou em diferentes doses de EH (B) e o tratamento via oral com a fração rica em lignanas (FRL) na dose de 100 mg/kg (C) e de diferentes doses de FRL (D) após 15 min da injeção intraplantar de ET-1 em camundongos.....	
12.	Efeito do tratamento via oral com a filtetralina (FILT) na dose de 10 µmol/kg (A) ou em diferentes doses de FILT (B) e o tratamento via oral com nirtetralina (NIRT) na dose de 10 µmol/kg (C) e de diferentes doses de FILT (D) após 15 min da injeção intraplantar de ET-1 em camundongos.....	61
13.	Efeito do tratamento por via intraplantar com a filtetralina (FILT, A), nirtetralina (NIRT, B) e com BQ123 (C) no edema induzido pela injeção intraplantar de ET-1 em camundongos.....	62
14.	Efeito do tratamento por tratamento via intraplantar com a filtetralina (FILT), nirtetralina (NIRT) ou nirantina (NIRA) isoladas do <i>P. amarus</i> ou do BQ-123 sobre a nocicepção induzido pela injeção intraplantar de ET-1 em camundongos.....	63
15.	Efeito do tratamento via oral com o extrato hexânico (EH) na dose de 100 mg/kg (A) ou em diferentes doses de EH (B) e o tratamento via oral com a fração rica em lignanas (FRL) na dose de 100 mg/kg (C) e de diferentes doses de FRL (D) após 60 min da injeção intraplantar de PAF em camundongos.....	65
16.	Efeito do tratamento via oral na dose de 10 µmol/kg com filtetralina (FILT) (A), nirtetralina (NIRT) (B) ou nirantina (NIRA) (C) sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de PAF em camundongos.....	66
17.	Efeito do tratamento por via intraplantar com a filtetralina (FILT, A), nirtetralina (NIRT, B), nirantina (NIRA, C) e com WEB2170 (C) no edema induzido pela injeção intraplantar de PAF em camundongos.....	67
18.	Efeito do extrato hexânico (EH), da fração rica em lignanas (FRL), da filtetralina (FILT), nirtetralina (NIRT), nirantina (NIRA) sobre o ensaio de união específica do [³ H]-PAF preparações de córtex cerebral de camundongos (A) e curva concentração-resposta de inibição para a nirantina ou do WEB2170 sobre ensaio de união específica do [³ H]-PAF em preparações de córtex cerebral de camundongos (B).....	69
19.	Efeito do tratamento via oral com a nirantina (NIRA, 100 µmol/kg) ou com o tratamento via intraperitoneal do WEB2170 (1,7 µmol/kg) sobre o extravasamento protéico induzidos pela injeção intratorácica de PAF em camundongos.....	71
20.	Efeito do tratamento intraplantar com nirantina ou com o WEB2170 sobre o aumento da atividade da MPO induzido pela injeção intraplantar de PAF em camundongos (A) e efeito do tratamento intraplantar com a nirantina (60 nmol/pata) ou com o WEB2170 (30 nmol/pata) sobre a alodínia mecânica induzida pela injeção i.pl. de PAF em ratos (B).....	72
21.	Efeito do extrato hexânico (EH) ou da fração rica em lignanas (FRL) obtidos do <i>P. amarus</i> sobre a união específica para [³ H]-BK em preparações de íleo de rato.....	74

Resumo

O estudo realizado durante o desenvolvimento desta tese demonstrou que o tratamento prolongado por via oral com o extrato hexânico (EH) obtido do *Phyllanthus amarus* reduziu a nocicepção em modelos experimentais de dor aguda e crônica em camundongos. A propriedade analgésica do EH em modelos de dor experimental aguda parece estar relacionada com a fração 3 e possivelmente envolve a modulação do receptor TRPV1, uma vez que tanto o EH como a fração 3 deslocaram o ensaio de união específica para a [³H]-resiniferatoxina em preparações de medula espinhal de rato. Este estudo demonstrou também que o EH e a fração rica em lignanas, bem como as lignanas filtetralina, nirtetralina ou nirantina administrados por via sistêmica ou local foram efetivos em inibir alguns parâmetros inflamatórios, incluindo o edema, a migração celular e/ou a produção de IL-1 β . Além disso, foi também demonstrado que a nirantina parece apresentar efeito antiinflamatório e anti-nociceptivo através da inibição do receptor para fator de ativação plaquetário (PAF), uma vez que apresenta perfil semelhante ao WEB2170 (antagonista de receptor para PAF), além de ambos terem deslocado a união específica do [³H]-PAF em preparação de córtex cerebral de camundongos, de modo concentração-dependente. Por outro lado, a nirtetralina apresenta perfil farmacológico que sugere a interação com receptor para endotelina-1 (ET-1). Nossos resultados mostram que a nirtetralina apresenta perfil antiinflamatório e anti-nociceptivo semelhante ao antagonista do receptor ET_A, o BQ-123, corroborando com resultados da literatura que demonstraram que a nirtetralina desloca a união específica para ¹²⁵I-ET-1 em membranas de células de ovário de hamster chinês (CHO) transfectadas com receptor ET_A. Os resultados do presente estudo são, portanto, relevantes uma vez que o *P. amarus* é uma planta amplamente utilizada pela população e até o presente momento poucos princípios ativos desta planta foram estudados. Apesar deste trabalho ainda não ter caracterizado o princípio ativo responsável pelas ações anti-nociceptivas, a filtetralina, a nirtetralina e a nirantina parecem ser as responsáveis pelas ações antiinflamatórias do *P. amarus*.

Abstract

In the present study, it was shown that prolonged oral treatment with hexane extract (HE) obtained from *Phyllanthus amarus* reduced the nociception in experimental models of acute and chronic pain in mice. The analgesic property of HE in experimental models of acute pain could be due to the F3 fraction and possibly involves TRPV1 receptor modulation, since both HE and F3 fraction displaced the specific binding of [³H]-resiniferatoxin in the rat spinal cord. This work also showed that HE and fraction-rich lignans, as well as lignans such as phlytetralin, nirtetralin and niranthin administered by systemic or local pathways were effective in inhibiting some of the inflammatory parameters, including edema, cell influx and/or IL-1 β production. Moreover, it was shown that niranthin exerts its antiinflammatory and anti-nociceptive effects through the inhibition of platelet activating factor (PAF). Niranthin showed similar responses to WEB2170 (the antagonist of PAF receptor). In addition, niranthin and WEB2170 displaced, in a concentration-dependent manner, the specific binding of [³H]-PAF in the mouse cerebral cortex. On the other hand, nirtetralin exhibited pharmacological responses that suggested an interaction with endothelin-1 (ET-1) receptor. The present result showed that NIRT exhibited antiinflammatory and anti-nociceptive effects similar to those of BQ-123 (ET_A receptor antagonist), corroborating the data from the literature that showed that nirtetralin achieved a specific binding of ¹²⁵I-ET-1 in transfected cells with ET_A receptors of Chinese hamster ovary. These results are extremely relevant because the plants of *P. amarus* species are widely used in folk medicine in Brazil and many other countries, but up to the present little have been discovered about the main active principles of these plants. This work did not characterize the main principle responsible for the antinociceptive properties; however phlytetralin, nirtetralin and niranthin seem to be responsible for the antiinflammatory actions of *P. amarus*.

1. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são freqüentemente utilizadas com o intuito de substituir ou auxiliar as terapias convencionais no tratamento de várias doenças. Entre outros fatores, a preferência na utilização das plantas medicinais decorre da facilidade de obtenção e do baixo custo. Porém, sabe-se que as plantas medicinais apresentam ampla diversidade de metabólitos secundários com diferentes atividades biológicas (FARNSWORTH *et al.*, 1985; SIMÕES, 2003), justificando a necessidade de um aprofundamento no conhecimento das propriedades das espécies vegetais e sua utilização na formulação de medicamentos. O maior problema para sua utilização terapêutica no tratamento convencional das diversas doenças é a falta de dados científicos que comprovem a eficácia e a segurança dos medicamentos preparados a partir das plantas medicinais.

Apesar da preferência das grandes indústrias farmacêuticas pelo desenvolvimento de medicamentos pela via sintética, nas últimas décadas observa-se ainda um grande interesse do mercado pelo potencial terapêutico das plantas medicinais (para revisão ver: CALIXTO *et al.*, 1998; CALIXTO *et al.*, 2000; KOEHN e CARTER, 2005). Tal fato é comprovado pela evidência de que hoje cerca de 25% das drogas prescritas no mundo são obtidas direta ou indiretamente de plantas. Além disso, cerca de 49% das drogas desenvolvidas entre 1981 a 2002 foram obtidas a partir de produtos naturais, ou análogos semi-sintéticos ou ainda compostos sintéticos baseados em produtos naturais (para revisão ver: KOEHN e CARTER, 2005).

Ainda que os medicamentos derivados de plantas tenham uma boa aceitação pela população e estejam presentes no mercado farmacêutico,

apenas uma pequena parcela das plantas medicinais possui dados científicos que comprovem sua eficácia e seu espectro toxicológico, assim como garantia de qualidade do produto. Considerando-se os diversos metabólitos secundários presentes nas plantas, as principais categorias de medicamentos derivados de plantas são os terpenóides, glicosídeos, alcalóides e outros tipos. Como exemplos relevantes de medicamentos obtidos de plantas, podemos mencionar a morfina (*Papaver somniferum*), a digoxina (*Digitalis sp.*), o taxol (*Taxus brevifolia*), o quinino (casca da *Chinchona sp*), a vincristina e a vinblastina (*Catharanthus roseus*), dentre outros (RATES, 2001). Assim, na terapêutica moderna, as plantas medicinais fornecem o substrato para a produção de compostos biologicamente ativos ou compostos passíveis de modificações e otimizações estruturais que dão origem às entidades químicas.

Dentro deste contexto, o Brasil é um país privilegiado, pois ocupa o primeiro lugar dentre os 17 países mais ricos do mundo em biodiversidade, detendo cerca de 23% do total de espécies existentes no planeta (RATES, 2001). A imensa variedade de espécies de plantas, animais e microorganismos existentes no ecossistema brasileiro, sem dúvida apresenta um importante diferencial para o desenvolvimento de medicamentos (KATO, 2001). Dentro desta imensa variedade de espécies encontram-se as plantas do gênero *Phyllanthus* conhecidas popularmente como quebra-pedras, arrebenta-pedras, erva-pombinha, saxifraga, filanto, arranca-pedra, fura-parede ou conami (para revisão ver: UNANDER *et al.*, 1992; CALIXTO *et al.* 1998), que serão abordados a seguir.

1.1. A Família Euphorbiaceae, o gênero *Phyllanthus* e a espécie *Phyllanthus amarus*

As plantas pertencentes ao gênero *Phyllanthus* (Euphorbiaceae) compreendem cerca de 550 a 750 espécies distribuídas nos países tropicais e subtropicais (para revisão ver: UNANDER *et al.*, 1992, 1995; CALIXTO *et al.* 1998), sendo que cerca de uma centena dessas espécies são encontradas no Brasil (TORRES *et al.*, 2003; DE SILVA e DE SALES, 2004). Este gênero é dividido em subgêneros: *Isocladius*, *Kirganelia*, *Cicca*, *Emblica*, *Phyllanthus*, *Eriococcus*, *Conami*, *Gomphidium*, *Botryanthus*, *Xylophylla*, *Phyllanthodendron* (para revisão ver: UNANDER *et al.*, 1992, 1995; CALIXTO *et al.* 1998).

Em geral as plantas do subgênero *Phyllanthus* possuem porte herbáceo. Os caules medem entre 50 a 60 cm de altura, sendo delgados e flexíveis. Os frutos, dotados de três compartimentos, contêm seis sementes, duas das quais em cada uma das divisões (DE SILVA e DE SALES, 2004). Existe grande semelhança entre espécies desse gênero dificultando a classificação e a caracterização botânica destas plantas. Como exemplo disto observa-se na literatura que por muitos anos o *P. amarus* foi classificado como *P. niruri* L. (para revisão ver: UNANDER *et al.*, 1990). Além disso, as plantas classificadas como *P. amarus* receberam outras denominações ao longo da história: *P. amarus* Schun. (LANETTI *et al.*, 1980), *P. niruri* L. var. *amarus* ou como *P. amarus* Schumach. & Thonn. (nomenclatura mais recente). Apesar da semelhança do *P. amarus* com o *P. niruri* e *P. abnormis*, existem algumas características que identificam a espécie *P. amarus*, tais como as inflorescências bissexuais com duas flores (estaminada e pistilada) possuindo

estames completamente unidos, flores e sementes com estrias longitudinais semiconcêntricas (Figura 1) (para revisão ver: UNANDER *et al.*, 1992; DA SILVA e DE SALES, 2004).

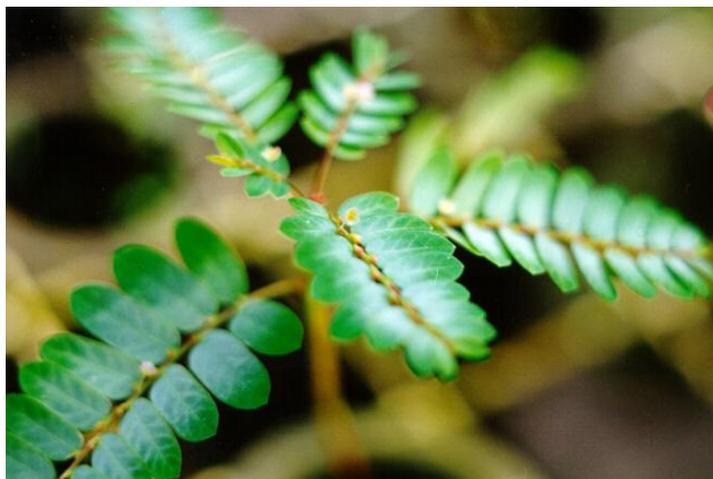


Figura 1: Foto de um exemplar de *P. amarum* cedida pela Professora Vera L. Rehder na Casa de Vegetação do CPQBA – UNICAMP

1.1.1. Propriedades terapêuticas do *Phyllanthus sp*

As plantas do gênero *Phyllanthus* são tradicionalmente utilizadas para tratar distúrbios menstruais, diabetes, herpes, gonorréia, disenteria, icterícia, asma, infecções brônquicas e genitourinárias, assim como afecções renais, incluindo os problemas relacionados a cálculos renais e/ou biliares (UNANDER *et al.*, 1992, 1995; CALIXTO *et al.*, 1998). Em função de seu grande uso popular, estas plantas vêm sendo estudadas cientificamente em vários países. Uma atenção particular foi dada ao subgênero *Phyllanthus*, cujas espécies têm sido investigadas através de estudos fitoquímicos, farmacológicos pré-clínicos e clínicos, permitindo assim comprovar, pelo menos em parte, seus efeitos atribuídos pela medicina popular (para revisão ver: BACCHI, 1984; UNANDER *et al.*, 1995; CALIXTO *et al.*, 1998). O gênero *Phyllanthus* contém espécies que

foram popularmente consagradas para o tratamento terapêutico na litíase urinária (para revisão ver: UNANDER *et al.*, 1990, 1992, 1995) e por esta razão tanto as espécies de *Phyllanthus sp* como outras plantas deste gênero são conhecidas como quebra-pedras. Além disso, estas plantas apresentam a habilidade de crescer entre as rachaduras do solo ou cimento, dando a impressão de que a planta “quebra a pedra”.

Estudos clínicos realizados com o chá das partes aéreas do *P. niruri* (Santos, 1990) demonstraram a eficácia dessa planta no tratamento do cálculo renal, um efeito que foi associado à interferência no crescimento e agregação dos cristais na urina humana sugerindo papel potencial na prevenção do desenvolvimento e tratamento do cálculo. Estudos realizados em animais (BARROS *et al.*, 2003) demonstraram que o extrato aquoso de *P. niruri* foi capaz de prevenir o crescimento de cálculos de oxalato de cálcio implantados na bexiga urinária de ratos. CAMPOS e SCHOR (1999) demonstraram que o extrato do *P. niruri* inibiu a internalização (endocitose) de cristais de oxalato de cálcio em células medulares do ducto renal de cão de forma dependente da concentração, sugerindo que tais mecanismos poderiam contribuir para explicar as ações benéficas desta planta no tratamento da nefrolitíase. FREITAS *et al.* (2002) verificaram que o extrato aquoso de *P. niruri* foi eficaz em inibir o crescimento dos cristais de oxalato de cálcio nos rins e que este efeito parece ser independente das alterações que ocorrem na excreção do citrato e do magnésio na urina.

Além do principal uso popular para o tratamento de cálculos renais e urinários, algumas espécies de plantas do gênero *Phyllanthus* são utilizadas também para o tratamento de infecções intestinais, diabetes e hepatite.

Estudos farmacológicos pré-clínicos, bem como raros ensaios clínicos, demonstraram que os extratos de várias espécies de plantas do gênero *Phyllanthus* apresentaram ações anti-virais, especialmente em relação ao vírus da hepatite B (SHEAD *et al.*, 1992). Além disso, têm sido relatadas ações hepatoprotetoras dos princípios ativos das plantas desse gênero (SATYANARAYAN *et al.*, 1988; SINGH *et al.*, 1989), como a filantina e a hipo filantina (SYAMASUNDAR *et al.*, 1985). Com base na medicina popular, a espécie do gênero *Phyllanthus* mais utilizada para o tratamento da icterícia e hepatite é o *P. amarus* (para revisão ver: UNANDER *et al.*, 1990, 1992; ASHA *et al.*, 2004).

Assim, os extratos de *P. amarus* apresentaram importantes efeitos farmacológicos tanto nos estudos realizados *in vitro* como *in vivo* contra doenças que acometem o fígado (hepatites), no tratamento da dor, da inflamação, estados alérgicos e do câncer, e contra o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) (para revisão ver: CALIXTO *et al.*, 1998; RAJESHKUMAR *et al.*, 2002; NOTKA *et al.*, 2003; LEVY *et al.*, 2004).

1.1.2. Estudos farmacológicos de espécies de *Phyllanthus*

Tendo em vista as manifestações de dores fortes associadas com a litíase reno-ureteral, nosso grupo de pesquisa estudou algumas espécies de plantas do gênero *Phyllanthus* visando verificar suas possíveis ações antinociceptivas. Inicialmente, demonstrou que os extratos do *P. corcovadensis*, *P. urinaria*, *P. tenellus*, *P. sellowianus*, *P. niruri*, *P. caroliniensis*, *P. fraternus*, *P. stipulatus*, *P. amarus* e *P. orbiculatus* administrados tanto por via intraperitoneal quanto por via oral, apresentaram atividade antinociceptiva

em vários modelos de dor em camundongos (GORSKI *et al.*, 1993; SANTOS *et al.* 1995a; 2000; CECHINEL FILHO *et al.* 1996). O possível mecanismo antinociceptivo envolveria o sistema taquicinérgico, mas não a interação com o sistema opióide (GORSKI *et al.*, 1993; SANTOS *et al.*, 1995 a, b). Para melhor entender o mecanismo de ação do extrato de *P. urinaria*, foram realizados estudos “*in vitro*” na bexiga e na traquéia isoladas de cobaia. Quando o extrato do *P. urinaria* foi testado, na traquéia isolada de cobaia sem epitélio, observou-se ação contrátil dependente da concentração usada, sendo esse efeito antagonizado pela indometacina (PAULINO *et al.*, 1996) e pelos antagonistas dos receptores NK₁ e NK₂ das taquicininas (FK888 e SR48968, respectivamente), bem como pelo vermelho de rutênio. No mesmo estudo, foi também demonstrado que, empregado em maior concentração, o extrato do *P. urinaria* causou relaxamento na musculatura lisa da traquéia de cobaia pré-contraída pelo carbacol ou sob tônus espontâneo. Este relaxamento foi antagonizado de maneira dependente da concentração pelo bloqueador não seletivo de canal de potássio tetraetilamônio, bem como por glibenclamida, um bloqueador de canal de potássio sensível ao ATP. Contudo, a neurotoxina apamina, um bloqueador de canal de potássio de baixa condutância modulado por cálcio, não afetou o relaxamento induzido pelo extrato de *P. urinaria* na traquéia de cobaia. Assim, os canais de potássio modulados por ATP, mas não aqueles de baixa condutância ativados por cálcio, parecem ser importantes para a manifestação da resposta relaxante induzida pelo extrato *P. urinaria* na traquéia de cobaia.

Dando seqüência a esses estudos, DIAS *et al.* (1995) demonstraram que o extrato de *P. urinaria* também foi capaz de causar contração da veia porta

isolada de ratos. Os mesmos autores mostraram que a resposta contrátil do extrato nessa preparação foi dependente do cálcio extracelular, sendo insensível a bloqueadores de canal de cálcio do tipo L e N. Contudo, a atropina, a ioimbina, a guanetidina, o prazosin, mas não a indometacina, foram capazes de antagonizar, de forma significativa, as respostas contráteis causadas pelo extrato do *P. urinaria* na veia porta isolado de ratos (DIAS *et al.*, 1995). No entanto, a ação relaxante do extrato, a exemplo do demonstrado por PAULINO *et al.* (1996) na traquéia de cobaia, foi antagonizada pela glibenclamida, TEA, apamina, mas não por inibidor de óxido nítrico ou pelo azul de metileno. Esses resultados estenderam os dados anteriores e mostraram que a ação relaxante do extrato de *P. urinaria* na veia porta de ratos, parece ser dependente da ativação de canais de potássio modulados por ATP, e diferentemente do encontrado na traquéia, os canais de potássio de baixa condutância, ativados por cálcio, parecem ser importantes para a resposta relaxante induzida pelo extrato na veia porta de ratos (DIAS *et al.*, 1995).

1.1.3. *Phyllanthus sp* na resposta inflamatória

Existem poucos relatos na literatura sobre as ações antiinflamatórias das plantas do gênero *Phyllanthus*. Entretanto, alguns estudos têm descrito o potencial antiinflamatório do *P. amarus* (KIEMER *et al.*, 2003, RAPHAEL e KUTTAN, 2003). Recentemente, foi demonstrado que a administração intragástrica do extrato metanólico de *P. amarus* (50-1000 mg/kg) foi capaz de inibir significativamente o desenvolvimento de lesões gástricas induzidas por etanol (8 mg/kg), bem como o edema de pata induzido pela carragenina (Cg) em ratos (RAPHAEL e KUTTAN, 2003). Mais recentemente, KIEMER *et al.*

(2003) demonstraram que o extrato hidroalcoólico e o hexânico obtidos do *P. amarus* atuavam em alvos importantes para a reação inflamatória (KIEMER *et al.*, 2003).

1.1.4. Substâncias derivadas do *Phyllanthus sp*

O estudo dos constituintes químicos presentes no subgênero *Phyllanthus* iniciou-se há algumas décadas (para revisão ver: BACCHI *et al.*, 1984). Grande esforço tem sido realizado para a identificação e isolamento da ampla grande variedade de substâncias químicas presentes neste gênero (para revisão ver: CALIXTO *et al.* 1998). Várias destas substâncias como flavonóides, taninos, alcalóides, cumarinas, lignanas e terpenos foram descritos como sendo as principais responsáveis pelas ações antivirais, hipoglicemiante, antiespasmódica e antialérgicas dos *Phyllanthus sp*. A complexidade das misturas de compostos e a presença de vários compostos em baixa concentração dificultam a identificação e o isolamento dos produtos químicos naturais. Distintas condições ambientais podem afetar a constituição química da planta e interferir na interpretação dos dados dos espectros das estruturas não complexas (para revisão ver: CALIXTO *et al.* 1998).

O *P. niruri L.* é uma das espécies mais estudadas no que se refere aos constituintes químicos (para revisão ver: BACCHI *et al.*, 1984; CALIXTO *et al.* 1998). Entretanto, a real identidade das plantas investigadas originalmente torna-se confusa, uma vez que as diferentes plantas deste subgênero apresentavam muitas vezes mesma denominação (para revisão ver: UNANDER *et al.*, 1990). Dentre os diversos compostos químicos identificados no *P. niruri L.* podemos citar lignanas como as hipofilantina, filantina

(SOMANADANDHU *et al.*, 1993), nirantina, nirtetralina e filtetralina (ANJANEYULU *et al.*, 1973; para revisão ver: CALIXTO *et al.*, 1998)(Figura 2).

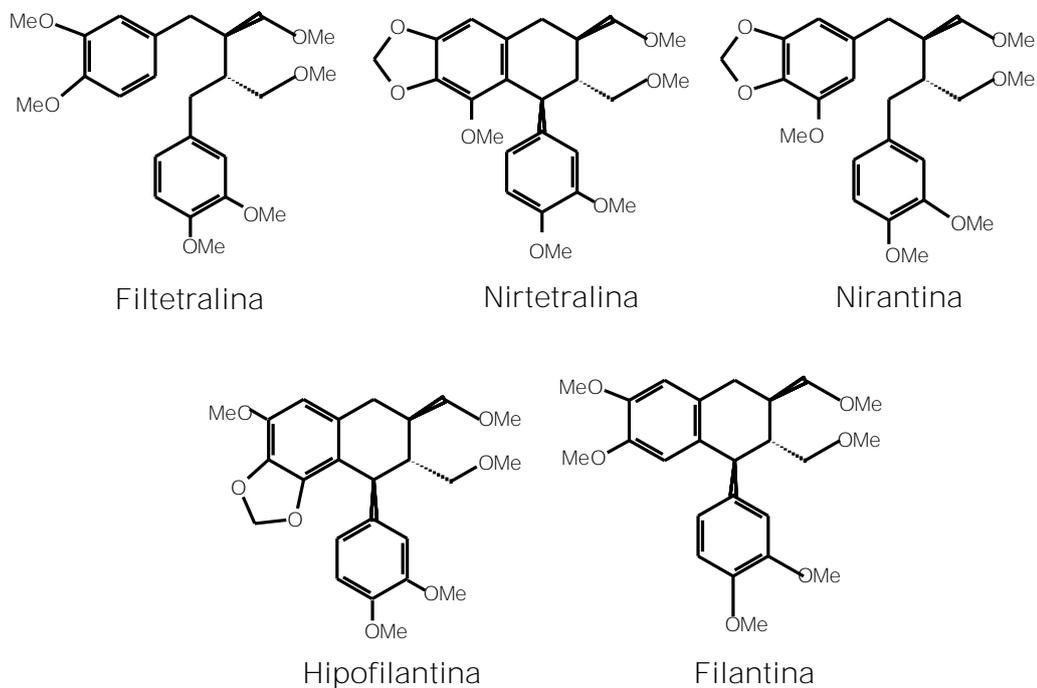


Figura 2: Estrutura química das lignanas isoladas de *P. amarus*.

Além das lignanas, outros metabólitos secundários incluindo os flavonóides quercetina, astralgina, isoquercetina e rutina, taninos, esteróides e saponinas foram identificados no *P. niruri L. var. amarus* (LANETTI *et al.*, 1980; para revisão ver BACCHI *et al.*, 1984). Outros exemplos são os ácidos graxos incluindo os ácidos ricinoléico, linoléico e o linolênico (para revisão ver BACCHI *et al.*, 1984).

1.1.5. Lignanas presentes nas plantas do gênero *Phyllanthus*

Apesar das propriedades antiinflamatórias, imunomoduladoras e anti-nociceptivas serem algumas das diversas ações biológicas das plantas do

gênero *Phyllanthus*, de acordo com a literatura, até o presente momento os compostos responsáveis por estas ações permanecem ainda em grande parte desconhecidos.

O termo lignóide é uma designação genérica, que caracteriza micromoléculas, cujo esqueleto é formado exclusivamente pelo grupo fenilpropânico (C₆ – C₃)_n. Os lignóides podem ser subdivididos em: lignanas; neolignanas, alolignanas, norlignanas, oligolignóides, heterolignóides. As lignanas são dímeros formados através do acoplamento oxidativo de álcoois cinâmicos entre si ou destes com ácidos cinâmicos (SIMÕES, 2003). Algumas lignanas possuem atividades farmacológicas e/ou imunológicas, podendo possuir também propriedade antiinflamatória, anti-tumoral, anti-mitótica, anti-viral, antiaterosclerótica e/ou citotóxica para alguns tipos de parasitas (MACRAE e TOWERS, 1984) e antialérgicas (ROW *et al.*, 1964).

Dentre as várias classes de compostos químicos presentes na planta *P. amarus*, as lignanas foram uma das primeiras classes a serem descritas. As lignanas isoladas de outras plantas possuem várias atividades farmacológicas incluindo a inibição do receptor do fator de ativação plaquetária (PAF), o antagonismo do receptor para endotelina-1 (ET-1), bem como a inibição do fator nuclear kappa B (NFκB) (HUSSAIN *et al.*, 1995; CHO *et al.*, 2002; HWANG *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2003). Sabe-se que estes efeitos poderiam explicar, pelo menos em parte, as atividades analgésica e antiinflamatória da *P. amarus*.

Apesar das lignanas nirtetralina, hipofilantina, filantina, filtetralina e nirantina, isoladas do *P. amarus* (ver suas estruturas na figura 2), terem sido identificadas há mais de uma década, pouco se sabe sobre suas ações

farmacológicas. Entretanto, o fato de que extratos das plantas do gênero *Phyllanthus* apresentam ações anti-nociceptivas e ainda que extratos do *P. amarus* possuam propriedades antiinflamatórias sugere que as lignanas presentes nessa espécie possam ser de interesse para o estudo farmacológico em modelos de experimentais de inflamação e de dor.

1.2. Aspectos farmacológicos da inflamação e da dor

1.2.1. Inflamação

A palavra inflamação é derivada do “estado de se estar inflamado”. Inflamar significa “colocar fogo” o que implica na cor vermelha, na possibilidade de aquecimento e na geração de dor (para revisão ver: TROWBRIGDE e EMLING, 1996). A resposta inflamatória é um mecanismo benéfico e fisiológico pelo qual o organismo se defende contra infecções e tenta reparar danos teciduais ou perda de função (para revisão ver: LAWRENCE *et al.*, 2002). Assim, o processo inflamatório agudo pode ser definido como um conjunto de alterações bioquímicas e celulares que ocorrem em resposta a estímulos inespecíficos, tais como infecções ou danos teciduais (para revisão ver: HANSSON, 2005). As reações inflamatórias locais são caracterizadas por aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular, seguida de dilatação venular e acúmulo de células do processo inflamatório, caracterizando os quatro sinais típicos da presença de inflamação: rubor (hiperemia), tumor (edema), calor (aumento da temperatura local) e dor, como descritas por Cornelius Celsus, no início da era Cristã (para revisão ver: GILROY *et al.*, 2004). O quinto sinal da inflamação, que é a perda da função do

tecido ou órgão lesado, associado com reações crônicas foi descrito posteriormente por VIRCHOW no século XIX (citado em KALISCH, 1975).

As causas que levam à inflamação são múltiplas e de natureza variável. São reconhecidos os seguintes tipos de agentes que causam inflamação: agentes biológicos (como bactérias, vírus, protozoários); agentes químicos (como ácidos, álcalis, terebentina, formaldeído, carragenina); agentes físicos (como calor excessivo, frio exagerado, radiação ultravioleta e ionizante, eletricidade, traumatismos, fraturas, incisões) e agentes imunes (exposição a antígenos provocando ativação da resposta imunológica do hospedeiro).

Os componentes básicos de um processo inflamatório envolvem eventos vasculares e celulares, mediadores derivados de células e da ativação plasmática, que produzem os sinais clássicos da inflamação descritos anteriormente. As alterações vasculares iniciam-se imediatamente e desenvolvem-se durante as primeiras horas após o estímulo inflamatório. Elas consistem em vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade vascular e exsudação de plasma (WILLIAMS *et al.*, 1983). Em condições normais a microcirculação apresenta baixíssima permeabilidade a macromoléculas. As proteínas plasmáticas circulam muito lentamente entre sangue e tecidos e retornam ao sangue através dos vasos linfáticos. Esta situação muda dramaticamente durante o processo inflamatório. A microcirculação torna-se permeável a macromoléculas e fluídos vindos do sangue, causando edema tecidual (para revisão ver: GILROY *et al.*, 2004).

Os eventos celulares são marcados pela saída das células circulantes da luz do vaso e a migração de leucócitos para o sítio inflamatório. Esse fenômeno segue algumas fases como captura, rolamento dos leucócitos pelo

endotélio, adesão firme e transmigração (MUNRO, 1993; SPRINGER, 1994; WAHL *et al.*, 1996). Todas estas etapas do processo de migração leucocitária são dependentes da expressão pelos leucócitos e pelas células endoteliais de moléculas denominadas moléculas de adesão e de mediadores quimiotáticos (SPRINGER, 1994; WEBER, 2003). A mobilização adequada dos leucócitos circulantes para o sítio inflamado é fundamental para a defesa do organismo, já que estas células podem desenvolver suas ações de fagocitose e destruição de agentes patogênicos levando à resolução do processo. Os leucócitos circulantes migram seletivamente e em número significativo para o tecido inflamado no decorrer do processo. Em uma resposta inflamatória aguda, e logo nos estágios iniciais, há acúmulo predominante de neutrófilos, enquanto que as células mononucleares são observadas mais tardiamente durante a fase aguda, bem como nos processos crônicos. A migração de eosinófilos também pode ocorrer em processos inflamatórios, estando principalmente associada a processos alérgicos e infecções parasitárias. Algumas das células envolvidas já estão presentes no tecido afetado tais como: células endoteliais, células mesoteliais, mastócitos, eosinófilos, macrófagos e alguns linfócitos (SIBILLE e REYNOLDS, 1990; SAMPSON 2000; BROCHE e TELLADO, 2001; BOYTON e OPENSHAW, 2002).

Além da dor derivada do processo inflamatório, podemos citar outros tipos de dor como nociceptiva, neurogênica e a neuropática (para revisão ver: MILLAN, 1999). Além disso, outras manifestações dolorosas como a hiperalgesia (sensibilidade exacerbada à um estímulo doloroso) ou a alodínia (dor em resposta à um estímulo não doloroso), são freqüentes em pacientes acometidos de dor. Em termos de duração, a dor pode ser aguda ou crônica. A

dor aguda está associada com uma lesão tecidual recente, ativação de nociceptores e pode desaparecer até mesmo antes da cura do dano tecidual (para revisão ver: CARR e GOUDAS, 1999; PARK e VASKO, 2005). Por outro lado, a dor crônica pode se perpetuar por meses ou anos, se caracteriza em relação à persistência e alterações adaptativas, o que muitas vezes dificulta o tratamento (para revisão ver: IADAROLA e CAUDLE, 1997; BESSON, 1999).

A percepção dolorosa a um determinado estímulo nocivo tem como propósito biológico alertar o organismo sobre algum perigo no ambiente, incluindo a resposta comportamental de proteger o organismo contra possível lesão (CHENG *et al.*, 2002). A transmissão da dor envolve uma interação complexa de estruturas centrais e periféricas desde a pele, vísceras ou outros tecidos até o córtex cerebral (FURST, 1999). Os estímulos nocivos tais como calor, frio, compressão intensa ou substâncias químicas endógenas ou exógenas potencialmente nocivas, ativam as terminações nervosas livres e periféricas de fibras aferentes sensoriais delgadas do tipo C e A δ , chamadas de nociceptores. Estas fibras são formadas por neurônios cujos corpos celulares encontram-se nos gânglios da raiz dorsal (DRG) e trigeminal, e são responsáveis pela condução das informações nociceptivas até o corno dorsal da medula espinhal e o núcleo trigeminal *pars caudalis* na ponte, respectivamente (para revisão ver: DRAY e PERKINS, 1997; RUSSO e BROSE, 1998; BESSON, 1999, PARK e VASKO, 2005). Imediatamente, um reflexo de retirada mediado pela medula espinhal é desencadeado no intuito de remover a região do corpo ameaçada (WATKINS e MAIER, 2002). Nas lâminas superficiais do corno dorsal da medula espinhal, as terminações dos nociceptores liberam vários neurotransmissores que estimulam neurônios de

segunda ordem. Estes neurônios formam vias que irão distribuir informações para circuitos cerebrais responsáveis pela produção das sensações dolorosas (para revisão ver: CRAIG, 2003; HUNT e MANTYH, 2001; PARK e VASKO, 2005).

Embora diversos mecanismos moleculares envolvidos na sensibilização central tenham sido estabelecidos recentemente, aqueles responsáveis pela sensibilização periférica ainda não foram completamente elucidados. Entretanto, o conhecimento da biologia molecular acerca dos diversos receptores e vias transduccionais envolvidos na gênese da nocicepção permitiram um extraordinário progresso no entendimento do mecanismo de ação de diversos neurotransmissores e, conseqüentemente, de drogas que atuam na modulação central e periférica da nocicepção. Os mecanismos envolvidos na transdução neuroquímica da dor geralmente envolvem a interação dos mediadores inflamatórios e/ou nociceptivos com canais iônicos de membrana dependente de voltagem, canais iônicos operados por receptor, receptores associados à tirosina quinase, ou com receptores de membrana que usualmente encontram-se acoplados a proteínas G (para revisão ver: RANG *et al.*, 1994; LEVINE e TAIWO, 1994; WOOD e DOCHERTY, 1997; MILLAN, 1999; PARK e VASKO, 2005).

Os neutrófilos, os eosinófilos, os mastócitos, os macrófagos dentre outras células são capazes de produzir vários mediadores inflamatórios e/ou nociceptivos como histamina, serotonina, PGs, leucotrienos (LTs), PAF, citocinas, quimiocinas, fator de necrose tumoral (TNF- α) e numerosas proteases entre outros. Estes mediadores podem estar relacionados tanto com a inflamação quanto com a dor.

1.2.2. Alguns mediadores inflamatórios e nociceptivos

Eicosanóides - Os principais eicosanóides envolvidos tanto na geração da inflamação como também da dor, são os Leucotrienos (LTs) e as prostaglandinas (PGs). As PGs e os LTs promovem vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e edema nos sítios de inflamação, enquanto que na dor podem causar hiperalgesia à estímulos mecânico, químico ou térmico (para revisão ver: VANE e BOTTING, 1998). Os eicosanóides são produtos do processamento do ácido araquidônico (AA) que normalmente é encontrado esterificado a fosfolipídios de membrana, de onde é liberado por ação de fosfolipases, como a fosfolipase A₂ (PLA₂). Os AA podem sofrer metabolização pelas vias das enzimas, ciclooxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX) para produzir uma grande família de eicosanóides.

A COX é uma enzima bifuncional, com atividade de ácido graxo (catalisando a conversão do AA em prostaglandina G₂ - PGG₂) e atividade de prostaglandina hidropoxidase (catalisando a conversão da PGG₂ em prostaglandina H₂ - PGH₂). A PGH₂ é convertida, através de diferentes enzimas com especificidade celular, nas prostaglandinas PGE₂, PGF_{2α}, PGD₂, PGI₂ e no tromboxano A₂, entre outras (para revisão ver: VANE e BOTTING, 1998).

Em 1971, VANE demonstrou que o principal mecanismo de ação dos antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs) era a propriedade de bloquear a síntese de prostanóides através da inibição da atividade da COX. Este fato implicou diretamente alguns eicosanóides como pró-inflamatórios. Vários anos se passaram até a descoberta da existência de pelo menos duas isorformas de COX envolvidas na ação não específica dos AINEs, a COX-1 e a COX-2. Como a COX-2 é uma enzima expressa por células envolvidas em processos

inflamatórios, foi correlacionada como sendo a maior responsável pela produção de prostanoídes nos processos inflamatórios e dolorosos. As LOXs originam os LTs, o ácido hidroecosatetraenóico (HETE) e as lipoxinas. Os LTs são produzidos, predominantemente, por células inflamatórias como leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e mastócitos.

Fator de Ativação Plaquetário (PAF) - Outra via de ativação é a hidrólise do ácido araquidônico para formar o lisofosfolípido. O lisofosfolípido pode ser acetilado formando o PAF. O PAF é um potente lipídio bioativo que atua por ligação específica em receptor acoplado à proteína G (para revisão ver: ISHII e SHIMIZU, 2000).

O termo PAF foi denominado pelo fato deste lipídeo ser o responsável pela agregação de plaquetas (para revisão ver: ISHII e SHIMIZU, 2000), além de ser um dos mais potentes fatores quimiotáxicos *in vitro* e *in vivo* principalmente para eosinófilos e neutrófilos. O PAF apresenta várias funções patofisiológicas, alguns dos efeitos biológicos do PAF incluem ativação plaquetária, estimulação neutrofílica, contração da musculatura lisa, aumento da permeabilidade vascular com formação de edema (para revisão ver: ISHII e SHIMIZU, 2000). Foi demonstrado que tanto a injeção intraplantar (i.pl.) de PAF em ratos (DALLOB *et al.*, 1987; BONNET *et al.*, 1981) como a injeção intratecal em camundongos (MORITA *et al.*, 2004) podem causar alodínia ou hiperalgesia mecânica. Contudo, o mecanismo de ação pelo qual o PAF exerce suas ações na dor ainda não está bem estabelecido.

Cininas - As cininas representam um grupo importante de moléculas envolvidas nas doenças inflamatórias, como na pancreatite, peritonite, artrite reumatóide, asma, desordens do trato genito-urinário, além de dor e

hiperalgesia, e inflamação neurogênica (para revisão ver: CALIXTO *et al.*, 2004). A produção de cininas, no sítio inflamatório, resulta em vasodilatação, extravasamento plasmático e aderência de neutrófilos, em consequência de uma ação direta sobre o endotélio da microvasculatura, ou ainda indireta, através da liberação de outras substâncias pró-inflamatórias.

Estes peptídeos exercem seus efeitos biológicos através da ativação dos receptores B₁ e B₂. Enquanto as cininas são os agonistas endógenos para o receptor B₂, a des-Arg⁹-BK e a des-Arg¹⁰-calidina são agonistas preferenciais para o B₁. Ambos os receptores pertencem à superfamília de receptores acoplados à proteína G com sete domínios transmembranares (Gαg/11 e Gαi) (para revisão ver: CALIXTO *et al.*, 2004). O receptor B₂ é constitutivo e está presente em tecidos centrais e periféricos. Estes parecem estar implicados na maioria das ações fisiológicas das cininas. O receptor B₁ é geralmente ausente em tecidos normais e animais saudáveis, mas pode ser induzido e super expresso durante uma lesão tecidual ou administração de alguns mediadores inflamatórios (SIEBECK *et al.*, 1998).

Endotelinas - As endotelinas constituem uma família de peptídeos sendo eles ET-1, ET-2 e ET-3. As endotelinas exercem suas ações através da interação com receptores ET_A, ET_B ou ET_C. Estes mediadores peptídicos estão relacionados ao desenvolvimento de diversos processos fisiopatológicos, incluindo aqueles que envolvem hipertensão, inflamação e dor, dentre outros (FILEP *et al.*, 1995; para revisão ver: SCHIFFRIN, 2005). A produção/secreção de ETs pode ser estimulada, por LPS, Cg, citocinas, fatores de crescimento e autacóides (KLEMM *et al.*, 1995; para revisão ver: RAE e HENRIQUES, 1998). A administração destes peptídeos induz contorções abdominais em roedores,

hiperalgesia mecânica em ratos e incapacitação articular em cães e ratos (RAFFA e JACOBY, 1991; FERREIRA *et al.*, 1989; DE-MELO *et al.*, 1998). Em humanos, tanto a injeção intradérmica como a endovenosa de ET-1 induz respostas dolorosas (FERREIRA *et al.*, 1989; DAHLOF *et al.*, 1990). A injeção i.pl. de ET-1 em camundongos induz uma resposta comportamental nociceptiva *per se* caracterizada pelo ato de lambar a pata (MENENDEZ *et al.*, 2003; PIOVEZAN *et al.*, 2000) e induz a formação de edema (PIOVEZAN *et al.*, 2000), sendo estas respostas dependentes exclusivamente da ativação de receptores do tipo ET_A (PIOVEZAN *et al.*, 2000). Entretanto, os mecanismos envolvidos nas respostas induzidas pela ET-1 permanecem desconhecidos.

1.2.3. Fármacos utilizados no controle da inflamação e da dor

Atualmente, vários medicamentos encontram-se disponíveis para uso clínico como analgésicos e/ou antiinflamatórios, como os corticosteróides, os opióides e os AINEs. Os glicocorticóides possuem grande amplitude de ações farmacológicas, dentre elas, seus efeitos antiinflamatórios e imunossupressores, inibindo tanto as manifestações iniciais quanto as tardias do processo inflamatório (para revisão ver: ADCOCK *et al.*, 2005). Apesar destas classes de substâncias apresentarem excelentes propriedades antiinflamatórias (com exceção dos opióides) e serem utilizadas na terapêutica clínica, seu uso produz importantes efeitos colaterais. Tal fato encoraja a busca por substâncias com menos efeitos indesejáveis e com maior seletividade de ação antiinflamatória e/ou analgésica.

Em relação aos AINEs, sua principal molécula-alvo é a enzima COX. A inibição da atividade das COXs (COX-1 constitutiva, COX-2 induzida, ou

ambas) é um dos principais mecanismos de ação de diversos fármacos, analgésicos e antiinflamatórios, especialmente os AINEs como o ácido acetilsalicílico (aspirina[®]) e a indometacina. Desta forma, seu efeito antiinflamatório deve-se principalmente à inibição da produção de prostaglandinas como a prostaglandina E₂ (PGE₂), PGD₂ e PGI₂, bem como dos tromboxanos (TXs)(para revisão ver: SAFAYHI, 1997; FITZGERALD, 2003).

Como a COX-2 é uma enzima expressa por células envolvidas em processos inflamatórios, foi correlacionada como sendo a maior responsável pela produção de prostanóides nos processos inflamatórios e dolorosos. A partir daí a busca por inibidores seletivos de COX-2 se tornou intensa. Assim, foram desenvolvidos inibidores seletivos da COX-2 da primeira geração, incluindo o celecoxib (Celebrex[®]; Pharmacia), e o rofecoxib (Vioxx[®]; Merck) que foram aprovados pela “Food and Drug Administration” (FDA) para o tratamento da artrite (para revisão ver: FITZGERALD, 2003). Foram desenvolvidos também os inibidores seletivos para COX-2 de segunda geração como o valdecoxib[®] (Bextra; Pfizer), etoricoxib[®] (Arcoxia; Merck) e o lumiracoxib[®] (Prexige; Novartis) (para revisão ver: FITZGERALD, 2003).

Entretanto, um estudo demonstrava que o Vioxx poderia causar sérios eventos cardiovasculares como ataque cardíaco e infarto (BOMBARDIER *et al.*, 2002). Apesar disto, a comercialização do Vioxx continuou e após 18 meses de uso contínuo, vários indivíduos experimentaram os eventos cardiovasculares descritos acima. FITZGERALD (2003) demonstrou que rofecoxib e o celecoxib reduzem além dos níveis de PGE₂, os níveis de prostaciclina (PGI₂). Anteriormente, a produção da PGI₂ parecia ser realizada somente pela COX-1,

entretanto esta proposição estava completamente errada, uma vez que foi demonstrado que a COX-2 é a principal produtora de PGI₂ (para revisão ver: FITZGERALD, 2004). A PGI₂ pode causar inibição da agregação plaquetária, indução da vasodilatação e prevenção à proliferação cardiovascular em células musculares lisas *in vitro*. Os inibidores não seletivos de COX inibem tanto síntese de PGI₂ como também de tromboxano A₂, enquanto que os inibidores seletivos da COX-2 inibem somente a produção da PGI₂. A produção de tromboxano A₂ fica intacta podendo induzir a agregação plaquetária, vasoconstrição e proliferação vascular. Em longo prazo a redução da PGI₂ e o aumento da tromboxano devem predispor os pacientes ao risco de infarto do miocárdio e outros problemas cardiovasculares. Assim, a Merck anunciou a retirada voluntária do mercado, em todo o mundo, do medicamento Vioxx, indicado para o tratamento da artrite e dor aguda.

Por outro lado, o mecanismo pelo qual atuam os fármacos antiinflamatórios esteroidais, como a dexametasona e a hidrocortisona, está relacionado principalmente à inibição da migração celular para a área afetada, através da supressão da expressão de moléculas de adesão, ou da indução da síntese de uma proteína inibidora de fosfolipase A₂ (enzima responsável pela liberação de ácido araquidônico e conseqüentemente da ativação da produção de PGs, tromboxano e leucotrienos) a anexina-1 (também conhecida como lipocortina). Um outro mecanismo de ação dos corticosteróides ocorre através da ativação de receptores nucleares para glicocorticóides que regulam a transcrição de alguns genes de resposta primária, incluindo os que expressam a COX-2 e o óxido nítrico sintase. O complexo esteróide-receptor também é capaz de promover inibição da transcrição de um grande número de citocinas

envolvidas na inflamação crônica, destacando-se principalmente a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF- α). Além disso, os corticosteróides podem ainda promover uma repressão da síntese dos receptores das citocinas, como dos receptores da IL-2 (para revisão ver: BARNES e ADCOK, 1993; FLOWER e ROTHWELL, 1994; VANE e BOTTING, 1998; MILLAN, 1999).

Além disso, outros mecanismos de ação podem ser evidenciados para drogas analgésicas e antiinflamatórias como: 1) atuação como falsos substratos: análogos de precursores naturais dos ácidos graxos podem servir de inibidores competitivos da formação de PGs e produtos da ação das lipoxigenases; 2) Atuação em receptores de mediadores inflamatórios; 3) bloqueio de canais de cálcio ou inibindo a calmodulina, diminuindo, assim, a liberação de ácido araquidônico e sua conseqüente metabolização; 4) inibição de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio e a peroxidação lipídica; 5) atuação também por imunossupressão ou por imunoestimulação, estimulando a fagocitose e assim, promovendo aumento da remoção de moléculas que provocam danos ao tecido afetado.

Assim sendo, o presente estudo procurou investigar através de testes farmacológicos *in vivo* e *in vitro* as possíveis ações antinociceptivas e antiinflamatórias de extratos, frações e lignanas isoladas do *P. amarus*, analisando também seus possíveis mecanismos de ação.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar se o extrato hexânico (EH), as frações derivadas do EH, bem como as lignanas fletetralina, nirtetralina, nirantina, hipofilantina e filantina obtidos do *P. amarus* apresentam efeito anti-nociceptivo e/ou antiinflamatório em modelos experimentais. Além disso, também constitui objetivo do presente estudo investigar, com auxílio de técnicas farmacológicas e de dosagens bioquímicas, alguns dos mecanismos que poderiam estar correlacionados às ações antinociceptivas e/ou antiinflamatórias do EH, das frações e das lignanas.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar se o tratamento prolongado com o EH ou com a fração rica em lignanas (FRL) obtidos do *P. amarus* apresenta ações anti-nociceptiva e/ou antiinflamatória em modelos experimentais de dor e inflamação.
- Avaliar se a atividade anti-nociceptiva e/ou antiinflamatória do EH se correlaciona com as frações do EH (fração 1, fração 2, fração 3 e FRL) obtidos do *P. amarus* em modelos experimentais de dor e inflamação.
- Avaliar a ação do EH, FRL e das lignanas obtidos do *P. amarus* em relação a parâmetros inflamatórios como edema, aumento da atividade da mieloperoxidase, aumento da IL-1 β e a alteração na expressão da enzima COX-2 induzidos pela carragenina.
- Avaliar se o efeito anti-nociceptivo e/ou antiinflamatório do EH, da FRL, ou das lignanas obtidas do *P. amarus* estariam relacionados com a interação direta ou indireta sobre mediadores inflamatórios, como a ET-1, PAF ou BK.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Análises fitoquímicas

3.1.1. Isolamento, identificação química e rendimento dos constituintes do *P. amarus*

A planta *P. amarus* foi cultivada no Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da UNICAMP (Campinas, SP) e identificada botanicamente pela Dra. Grady L. Webster (Departamento de botânica, Universidade da Califórnia, Davis, EUA), sendo que uma excicata (*Phyllanthus amarus* Schumach & Thonn.) foi depositada no herbário do Instituto de Biologia da UNICAMP (Campinas, SP) com o código UEC 127.411.

Os estudos de análises fitoquímicas, isolamento e identificação de compostos isolados foram realizados pela Dra. Vera L. G. Rehder (CPQBA-UNICAMP) como previamente descrito (ANJANEYULU *et al.*, 1973; SOMANABANDHU *et al.*, 1993). Inicialmente foram analisados farmacologicamente o extrato hexânico (EH), bem como as frações: FRL (F4-5, fração rica em lignanas), F1 (fração 1), F2 (fração ácidos, rica em ácidos de cadeia longa) e a F3 (fração 3). Posteriormente, as lignanas isoladas filtetralina, nirtetralina, nirantina, hipofilantina e filantina (peso molecular: 416, 430, 432, 430 e 430, respectivamente) também foram avaliadas.

O EH do *P. amarus* foi preparado pela extração do material pulverizado, com um rendimento de 5,5%. A FRL apresentou rendimento de 25% a partir do EH. As lignanas presentes na FRL foram purificadas por métodos cromatográficos. Os rendimentos obtidos na etapa de purificação das lignanas

foram de 1,9% para fildesina; 0,8% para nirtetralina; 1,9% para nirantina; 5,9% para hipofilantina e 13,7% para filantina.

3.2. Avaliação farmacológica

3.2.1. Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos suíços machos (25-35 g) e ratos *Wistar* machos (160-250 g) mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia, em temperatura (22 ± 2 °C) e umidade controlada (60-80%), ciclo claro/escuro de 12 horas e com livre acesso a água e ração. Os animais foram retirados do biotério e mantidos no laboratório para adaptação por um período de pelo menos 1 h antes do início dos experimentos, sendo utilizados somente uma vez em cada teste. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as orientações para os cuidados com animais de laboratório e considerações éticas com os protocolos experimentais aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Santa Catarina (processo nº 263/CEUA).

3.2.2. Modelos experimentais de dor

3.2.2.1. Alodínia mecânica induzida pelo adjuvante completo de Freund (CFA)

O modelo de alodínia mecânica persistente causada pela injeção intraplantar contendo 20 µl de solução do adjuvante completo de Freund (CFA)

foi utilizado para avaliar o possível efeito anti-alodínico do EH ou da FRL obtidos de *P. amarus*.

Os camundongos foram colocados em caixas de acrílico transparente sobre uma plataforma com fundo de tela de arame durante 2 horas para a aclimatização, sendo a reatividade basal ou a alodínia mecânica avaliadas pelo contato da pata traseira com filamentos de von Frey (Stoelting, Chicago, EUA) de 0,4 g. A estimulação basal dos animais (antes da injeção de CFA) com filamento de von Frey de 0,4 g resultou em uma frequência de retirada da pata em torno de 20%. Os animais foram estimulados por 10 aplicações consecutivas de 1 segundo (BORTOLANZA *et al.*, 2002).

Assim, no dia anterior à aplicação de CFA a resposta basal de todos os animais foi avaliada. Dez horas após a injeção do CFA verificou-se o aparecimento da alodínia mecânica. Logo após a constatação do desenvolvimento da alodínia mecânica, os animais foram tratados por via oral com o EH ou com a FRL obtidos do *P. amarus* (100 mg/kg, 2 vezes ao dia), enquanto que o grupo controle recebeu apenas o veículo (1% de Tween 80) por administração oral. Seis horas após a primeira dose de tratamento, a alodínia mecânica foi avaliada em intervalos de 24 horas (aproximadamente às 14:00 h de cada dia), até o 15º dia do experimento. Os animais foram tratados com o EH e a FRL obtidos de *P. amarus* ou com o veículo, do 2º ao 6º dia (após a injeção de CFA) com uma pausa do 7º ao 11º dia, recebendo novamente o tratamento entre o 12º e o 15º dia.

3.2.2.2. Lesão parcial do nervo ciático

Para realização deste experimento foram utilizados camundongos machos, previamente anestesiados por via intraperitoneal com hidrato de cloral 7 % (10 ml/kg). Brevemente, foi feita uma incisão na coxa, o nervo ciático foi exposto próximo à trifurcação ciática e ligado em volta de aproximadamente 1/3 a 1/2 da porção dorsal, com fio de sutura 8.0, conforme o procedimento descrito em ratos por SELTZER *et al.* (1990) e adaptado para camundongos por MALMBERG e BASBAUM (1998). Em um grupo separado de animais, o nervo ciático foi exposto, mas não envolto com fio de sutura (falso-operados).

No dia anterior à cirurgia, os animais foram submetidos ao teste de Von Frey (filamento 0,4) para caracterização da resposta basal e a medida foi realizada conforme descrito no item anterior.

Cinco dias após a cirurgia, foi verificado o aparecimento da alodínia mecânica. Uma vez estabelecida alodínia, os animais foram tratados por via oral com o EH ou com a FRL obtidos do *P. amarus* (100 mg/kg, 2 vezes ao dia), a gabapentina (70 mg/kg, 2 vezes ao dia), ou somente o veículo (1% de Tween 80). A alodínia mecânica foi então avaliada a partir da sexta hora após a primeira dose de tratamento e a cada 24 horas (aproximadamente às 14:00 h de cada dia), até o 20º dia do experimento. Os animais foram tratados com o EH ou com a FRL obtidos de *P. amarus* ou com o veículo, do 7º ao 11º dia (após a mononeuropatia) com uma pausa do 11º ao 15º dia, recebendo novamente o tratamento entre o 15º e o 19º dia.

3.2.2.3. Alodínia mecânica induzida PAF

A alodínia mecânica induzida pelo PAF foi avaliada de forma similar àquela descrita para avaliação da reatividade basal ou da alodínia mecânica induzida pela injeção intraplantar de CFA em camundongos, sendo modificada de BORTOLANZA *et al.* (2002) para ratos. Assim, após a aclimatização e medida do basal da frequência de retirada com filamento de von Frey de 2,0 g, grupos distintos de ratos receberam uma injeção i.pl. de PAF (10 nmol/pata) em conjunto com a nirantina (60 nmol/pata) ou com o antagonista de receptor para PAF, o WEB2170 (30 nmol/pata). A alodínia mecânica foi avaliada em diferentes intervalos de tempo (0,5, 1, 2, 4, 6 e 8 h) após a injeção do PAF. O aparecimento da alodínia mecânica foi verificada após a primeira medida da frequência de retirada da pata decorrente da estimulação com o filamento de Von Frey.

3.2.2.4. Alodínia mecânica induzida pela carragenina (Cg)

Neste modelo, a avaliação do limiar nociceptivo por estimulação mecânica foi realizada antes (basal) e 3 h após a injeção i.pl. de Cg (300 µg/pata) pelo método de *up and down* (DIXON, 1991). Este método foi padronizado para medir (em mg) o limiar da alodínia mecânica de cada camundongo seguindo a metodologia descrita por CHAPLAN *et al.* (1994). Os camundongos foram colocados em caixas de acrílico transparente sobre uma plataforma com fundo de tela de arame, possibilitando o acesso da pata traseira do animal com os filamentos de von Frey. Após a aclimatização dos animais, foi utilizada uma série de filamentos de 0,008 a 6,0 g aplicados em ordem crescente ou decrescente para determinar 50% do limiar de retirada da

pata (limiar 50%) (DIXON, 1991). O primeiro filamento da série testado foi o de 0,4 g na pata posterior direita. Foram realizadas 6 avaliações com intervalos de 10 s. A ausência de resposta levou à utilização de outro filamento de maior massa e assim sucessivamente. Havendo retirada ou lambida da pata pelo animal, um filamento de menor massa foi aplicado após um intervalo de 2 min. O limiar de retirada da pata (50% do limiar) foi calculado de acordo com Dixon (1991).

Para a avaliação da medida do limiar nociceptivo, os camundongos foram tratados via oral com EH, FRL, F1, F2 ou F3 (100 mg/kg) ou somente com veículo (1% de Tween 80) (0,1 ml/10 g). Uma hora depois, os animais receberam na pata direita, 20 µl de Cg (300 µg/pata) diluída em salina tamponada com fosfato (PBS, composição mmol/L: NaCl 137, KCl 2,7 e tampão fosfato 10) ou somente PBS.

3.2.2.5. Nocicepção induzida pela formalina

Uma hora antes da indução da nocicepção espontânea, os animais receberam por via oral EH, FRL, F1, F2, F3 (100 mg/kg), aspirina (300 mg/kg) ou somente com veículo (1% de Tween 80) (0,1 ml/10 g).

O procedimento foi realizado conforme descrito por HUNSKAAR *et al.* (1985). Os animais foram colocados individualmente sob funis de vidro transparente por um período de adaptação de no mínimo 20 min. Em seguida, cada animal recebeu uma injeção i.pl. contendo 20 µl de solução de formalina a 2,5 % (0,92 % de formaldeído) na pata posterior direita. Logo após a injeção da formalina, os animais foram colocados individualmente, sob funil de vidro invertido, ao lado de um espelho para facilitar a observação. O tempo que

animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com formalina foi avaliado durante 30 min, sendo este período considerado indicativo de nocicepção. Este modelo permite avaliar duas fases de sensibilidade dolorosa: a primeira fase, que ocorre durante os primeiros 5 min após a injeção de formalina (dor de origem neurogênica); e a segunda fase, que ocorre entre 15 a 30 min após a formalina, representando a resposta tônica à dor, acompanhada de uma resposta inflamatória, ambas as fases estão relacionadas à liberação de mediadores inflamatórios (HUNSKAAR e HOLE, 1987).

3.2.2.6. Nocicepção induzida pela capsaicina

Uma hora antes da indução da nocicepção espontânea, grupos de camundongos foram tratados por via oral com o EH, F2 ou F3 (100 mg/kg) ou somente com veículo (1% de Tween 80) (0,1 ml/10 g). Como controle positivo, os animais foram tratados com a injeção subcutânea de capsaicina (20 μ mol/kg) 30 min antes da indução da nocicepção espontânea.

Este modelo permite avaliar a nocicepção de origem neurogênica. O procedimento foi realizado conforme descrito por SAKURADA *et al.* (1992) para estudos de compostos que atuam sobre a dor de origem neurogênica. Os animais foram colocados individualmente sob funis de vidro transparente por um período de adaptação de no mínimo 20 min. Em seguida, cada animal recebeu uma injeção i.pl. contendo 20 μ l de solução de capsaicina (1 nmol) ou do veículo, na pata posterior direita. O tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com capsaicina foi cronometrado por um período de 5 min e considerado como indicativo de nocicepção.

3.2.2.7. Nocicepção induzida pela endotelina-1 (ET-1)

O procedimento foi realizado conforme descrito por PIOVEZAN *et al.* (2000). Os animais foram colocados individualmente sob funis de vidro transparente por um período de adaptação de no mínimo 20 min. Em seguida, cada animal recebeu uma injeção i.pl. contendo 20 µl de solução de ET-1 (100 pmol) com veículo (0,15% de etanol) ou somente com o veículo. O tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com ET-1 foi cronometrado por um período de 20 min e considerado como indicativo de nocicepção. Grupos distintos de camundongos receberam co-tratamento via i.pl. com fildetralina ou nirtetralina (30 nmol/pata), ou BQ-123 (antagonista de receptor ET_A) ou nirtetralina (1 nmol/pata).

3.2.3. Modelos experimentais de inflamação

3.2.3.1. Edema induzido pelo CFA

O edema persistente causado pela injeção i.pl. contendo 20 µl de solução com o CFA na pata direita de camundongos foi utilizado para avaliar o possível efeito antiedematogênico do EH e da FRL obtidos de *P. amarus*.

O edema de pata induzido pelo CFA foi medido inicialmente após dez horas da injeção. Após a primeira medida, os camundongos foram tratados com o EH ou com a FRL de *P. amarus* ou com o veículo. As medidas foram feitas 1 vez ao dia (aproximadamente às 14:00 h), até o 15º dia após a aplicação de CFA. Com o início do tratamento, os animais foram avaliados 6 h após a primeira dose do dia. O tratamento seguiu do 2º ao 6º dia (após a injeção do CFA), reiniciou no 12º e seguiu até o 15º dia. O aumento de volume

da pata foi medido com pletismômetro (Ugo Basile). A diferença entre o volume das patas direita e esquerda foi quantificada (em μl) e tomada com índice de edema de acordo com a técnica descrita para medida em pletismômetro por FERREIRA *et al.* (1978) e modificada para camundongos por HENRIQUES *et al.* (1987).

3.2.3.2. Edema induzido por outros agentes inflamatórios

Grupos distintos de camundongos foram tratados por via oral com o EH, FRL, F1, F2 ou F3 (100 mg/kg), filtetralina (até 100 μmol ou 41,6 mg/kg), nirtetralina (até 100 μmol ou 43,0 mg/kg), nirantina (até 100 μmol ou 43,0 mg/kg), filantina (até 100 μmol ou 41,8 mg/kg), hipofilantina (até 100 μmol ou 43,0 mg/kg) ou com veículo. Após uma hora, os animais receberam na pata direita 20 μl de PBS contendo um dos agentes inflamatórios: Cg (300 μg), BK (3 nmol), substância P (30 nmol), ET-1 (30 pmol), histamina (100 nmol) ou PAF (3 nmol). Além do tratamento via oral, grupos distintos de camundongos receberam também as lignanas filtetralina, nirtetralina ou nirantina concomitantemente a injeção com os agentes inflamatórios (Cg, PAF ou ET-1) via intraplantar (0,3-30 nmol/pata). A pata esquerda recebeu o mesmo volume de PBS e foi utilizada como controle. O aumento de volume da pata foi medido conforme descrito no item anterior. A porcentagem de inibição foi calculada 15 (apenas para ET-1), ou 60 min após a injeção i.pl. dos agentes inflamatórios. Nos experimentos com BK, os animais foram pré-tratados com um inibidor da cininase II, o captopril (5 mg/kg, 1 h, s.c), a fim de evitar a degradação das cininas (Corrêa e Calixto, 1993).

Outros grupos de experimentos foram realizados com o intuito de comparar os efeitos dos tratamentos testados com a ação antiinflamatória de drogas conhecidas. Assim, os animais foram tratados com a dexametasona (DEX, 0,5 mg/kg, via subcutânea 4 horas antes da injeção i.pl. da Cg), a aspirina (300 mg/kg, via oral 1 hora antes da injeção i.pl. da Cg), o BQ-123 (1 nmol/pata, concomitantemente com a injeção i.pl. da ET-1) ou o WEB2170 (30 nmol/pata, concomitantemente com a injeção i.pl. do PAF).

3.2.3.3. Pleurisia induzida pelo PAF

Uma hora antes da indução da pleurisia, os camundongos foram tratados por via oral com a nirantina (100 μ mol/kg) ou por via intraperitoneal com o antagonista de PAF, o WEB2170 (8 mg/kg). A pleurisia foi realizada como descrito previamente por SPECTOR (1956) e modificada para camundongos (HENRIQUES *et al.*, 1990). Para a indução da pleurisia, o PAF (1,9 nmol/cavidade em 100 μ L) foi administrado por via intratorácica no lado direito da cavidade pleural do camundongo utilizando-se uma agulha adaptada. Outro grupo distinto de animais recebeu injeção intratorácica de salina estéril e foi utilizado como controle. Os animais foram sacrificados 3 h após a injeção de PAF, sendo a cavidade pleural aberta e lavada com 1 ml de PBS contendo heparina (10 UI/mL).

Quantificação da exsudação protéica – O volume de exsudação foi medido utilizando-se uma pipeta automática e o valor multiplicado pela quantidade de proteínas totais por ml, quantificada pelo método de Bradford, (BRADFORD, 1976) para obtenção do valor total de proteína por cavidade.

3.2.4. Medidas relacionadas ao processo inflamatório ou doloroso

3.2.4.1. Atividade da mieloperoxidase (MPO)

Para avaliação indireta do acúmulo de neutrófilos, grupos de camundongos receberam tratamento oral com o EH ou com a FRL (100 mg/kg), fletetralina, nirtetralina, nirantina (100 μ mol/kg) ou com o veículo uma hora antes da injeção i.pl. de Cg, ou com DEX (0,5 mg/kg, tratamento subcutâneo) 4 h antes da Cg. Outros grupos de animais foram tratados com a nirantina (30 nmol/pata) ou o WEB2170 (30 nmol/pata) concomitantemente com a injeção i.pl. de PAF (3 nmol/pata). Grupo distinto de animais recebeu somente injeção i.pl. de PBS. Seis horas após a injeção de Cg, ou 1, 2, 3 ou 4 horas após a injeção de PAF, ou somente do PBS, os animais foram sacrificados e a pele das suas patas foi removida. As amostras para a medida da atividade da MPO foram preparadas como descrito por DE YOUNG *et al.* (1989). Os tecidos foram homogeneizados em 0,5 ml de tampão fosfato (80 mM, pH de 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio e centrifugado 12000 g, por 15 min, a 4 °C. Trinta μ l de sobrenadante das amostras foram pipetados em uma microplaca de 96 poços. Para o ensaio, 200 μ l de uma solução contendo 100 μ l PBS (80 mM, pH de 5,4), 85 μ l de PBS (0,22 M, pH de 5,4) e 15 μ l de peróxido de hidrogênio (0,017%) foram adicionados em cada poço. A reação foi iniciada pela adição de 20 μ l de tetrametilbenzidina (18,4 mM, em 8% de dimetilformamida). A placa foi incubada a 37 °C por 3 minutos e a reação foi terminada pela adição de 30 μ l de acetado de sódio (1,46 M, pH de 3,0). A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente e expressa como mDO/mg proteína, sendo

utilizado um leitor de ELISA (EL808, Bio-Tek Instruments, Inc.) com filtro de 630 nm. Os experimentos foram realizados 3 vezes em duplicatas. A determinação protéica dos homogenatos foi feita através da absorção ultravioleta no comprimento de onda de 280 nm em cubetas de quartzo, assumindo que 1 unidade de absorbância 280 nm=1 mg de proteína.

3.2.4.2. Quantificação da Interleucina-1 β (IL-1 β)

Grupos distintos de camundongos receberam tratamento oral com o EH, com a FRL (100 mg/kg), fildetralina, nirtetralina, nirantina (100 μ mol/kg) ou veículo uma hora antes da injeção i.pl. de Cg. Como controle positivo, a DEX (0,5 mg/kg, injeção subcutânea) foi administrada 4 h antes da Cg. Grupo distinto de animais recebeu somente injeção i.pl. de PBS. Os animais foram sacrificados 6 h após a indução do edema de pata pela Cg. Para a quantificação dos níveis de IL-1 β foi utilizado um protocolo previamente descrito por PINHEIRO e CALIXTO (2002) com pequenas modificações. Assim, a pele das suas patas posteriores foi removida e homogeneizada em um tampão PBS contendo 0,05% de Tween 20, 0,1 mM de fluoreto de feniltimetilsulfonil (PMSF), 0,1 mM cloreto de benzametônio, 10 mM de ácido etilenodiaminotetracético e 20 μ M de aprotinina e centrifugado a 3000 g por 10 min. O sobrenadante foi coletado e estocado para posterior análise (-70 °C). Os níveis teciduais de IL-1 β foram quantificados utilizando um kit de ELISA (R&D System, EUA), segundo as instruções do fabricante.

3.2.4.3. Ensaio de união específica para [³H]-PAF em córtex cerebral de camundongos

O ensaio de união específica para o [³H]-PAF foi realizado como descrito previamente por MARCHESELLI *et al.* (1990). Para a obtenção das membranas, os córtices cerebrais de camundongos foram removidos e homogeneizados em tampão gelado (pH de 7,4) contendo: 50 mM de Tris-HCl; 250 mM sacarose; 2 mM EGTA; 5 mM MgCl₂; 0,1 mM PMSF; 10 µg/ml de aprotinina. O homogenato foi primeiramente centrifugado por 10 minutos, 272 g, a 4 °C. O sobrenadante foi centrifugado a 1000 g por 10 min, a 4 °C. Novamente, o sobrenadante foi centrifugado a 12000 g por 20 min, a 4 °C. O precipitado resultante foi ressuspensão no tampão descrito acima. O experimento foi realizado em duplicata, com volume final de 500 µl, em tampão (pH de 7,4) contendo: 10 mM de Tris-HCl; 5 mM MgCl₂; 2 mM EGTA, 0,1 mM PMSF; 10 µg/ml de aprotinina, com 0,25 mg/ml de BSA, contendo a preparação de membranas de córtex cerebral de camundongos (90 µg/proteína) e 1 nM de [³H]-PAF na presença ou ausência de EH ou da FRL (100 µg/ml), fildetralina, nirtetralina, nirantina ou WEB2170 (0,1 - 100 µM), ou de PAF não radioativo (1 nM, união inespecífica). Após 30 min de incubação (25 °C), a reação foi interrompida por filtração. Os filtros foram lavados três vezes com 2 ml de tampão gelado e colocados em frascos de vidro contendo líquido de cintilação para posterior leitura. A união específica foi calculada como a diferença entre os valores de união total e inespecífica. Este ensaio foi realizado em duplicata de 4 experimentos diferentes.

3.2.4.4. Ensaio de união específica para [³H]-BK em íleo de ratos

Os experimentos foram realizados conforme descrito por MANNING *et al.* (1986). Ratos machos foram sacrificados e tiveram os íleos retirados e imersos em tampão TES 25 mM (pH de 6,8) contendo fenantrolina 1 mM (tampão A). O tecido foi homogeneizado em tampão de sacarose (0,25 M) e centrifugado (2500 g) por 10 min a 4 °C. O precipitado formado foi ressuspenso e centrifugado por 2500 g por 10 min a 4 °C. Os sobrenadantes resultantes da primeira e da segunda centrifugação foram misturados, sendo esta mistura centrifugada a 47000 g por 30 min a 4 °C. O *pellet* resultante foi ressuspenso em tampão TES 25 mM (pH de 6,8) contendo fenantrolina 1 mM, bacitracina 140 µg/ml, captopril 1 mM, ditioneitol 1 mM e BSA 1%. Os ensaios de união específica de [³H]-BK foram realizados em duplicata em um volume total de 350 µl contendo 125 µl de membrana (0,4 mg de proteína), tampão B e 1,0 nM de ligante radioativo [³H]-BK na presença e na ausência do EH ou da FRL (300 µg/ml), ou BK não radioativa (1 µM, união inespecífica). Após 90 min de incubação (25 °C), a reação foi interrompida por filtração. Os filtros foram lavados oito vezes com 1 ml de tampão TRIS/ HCl 50 mM (pH de 7,4) gelado e colocados em frascos de vidro contendo líquido de cintilação para posterior leitura em cintilador beta (Packard, modelo Tri-Carb 1600 TR). A união específica foi calculada como a diferença entre os valores de união total e inespecífica. Este ensaio foi realizado em duplicata de 3 experimentos diferentes.

3.2.4.5. Ensaio de união específica para [³H]-resiniferatoxina (RTX) em medula espinhal de ratos

O ensaio de união específica para a [³H]-RTX foi realizado como descrito previamente por SZALLASI *et al.* (1998). Para a obtenção das membranas, a medula espinhal de ratos foi removida e homogeneizada em tampão de homogeneização gelado (pH de 7,4) contendo: 5 mM de KCl; 5,8 mM de NaCl; 2 mM de MgCl₂; 0,75 mM de CaCl₂; 12 mM de glicose; 137 de sacarose e 10 mM de ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanesulfônico (HEPES). O homogenato foi primeiramente centrifugado por 10 minutos, a 1000 g, 4 °C. O precipitado resultante foi descartado e o sobrenadante centrifugado a 35000 g por 30 min, a 4 °C. O precipitado resultante foi ressuspensão em tampão de homogeneização e estocado a -70 °C, até o dia do experimento.

O experimento foi realizado em duplicata, com volume final de 500 µl, contendo tampão de homogeneização, com 0,25 mg/ml de BSA, membrana (100 µg/proteína), 50 pM de [³H]-RTX, na presença e na ausência do EH ou da F3 (100 µg/ml) ou da capsaicina (3 µM). Para a medida da união inespecífica, 100 nM de RTX não-radioativa foram adicionados aos tubos. A reação de união específica foi iniciada com a transferência dos tubos para um banho com água a 37 °C. Sessenta minutos após a incubação, a reação foi finalizada pela transferência dos tubos para um recipiente contendo gelo. Cem microgramas de glicoproteína ácida bovina α₁ foram adicionados em cada tubo para reduzir a união inespecífica. Finalmente, o radioligante ligado e livre foi separado por centrifugação por 15 minutos, a 20000 g, a 4 °C. A radioatividade foi medida no precipitado obtido, por contagem em cintilador. A união específica foi calculada

como a diferença da união total e inespecífica. Este ensaio foi realizado em duplicata de 3 experimentos diferentes.

3.2.4.6. Expressão da enzima COX-2 pelo ensaio de Western Blot

Grupos distintos de camundongos receberam o tratamento oral com o EH ou a FRL (100 mg/kg), fletetralina, nirtetralina, nirantina (100 μ mol/kg) ou veículo 1 h antes da Cg, ou uma injeção subcutânea de DEX (0,5 mg/kg) 4 h antes da Cg. Os animais foram sacrificados 6 h após a injeção de Cg, sendo o material processado seguindo a metodologia descrita por LEAL *et al.* (2002). O tecido subcutâneo da pata foi removido e homogenizado em tampão de lise gelado (HEPES 10 mM (pH de 7,9)), contendo: 1,5 mM de MgCl₂, 10 mM de KCl, 0,5 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), 0,5 mM de ditioneitol, 50 mM de NaF 2 mM de Na₃VO₄ e 10 μ g/ml de aprotinina), para obtenção do extrato citossólico (Sabourin *et al.*, 2002). O homogenato foi centrifugado a 10000 g por 30 min e o sobrenadante foi separado como a fração citossólica das preparações. A determinação da concentração de proteínas das amostras foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). As frações citossólicas dos extratos obtidos foram submetidas à eletroforese em gel desnaturante e SDS-poliacrilamida (10-12%) e transferidas para membrana de fluoreto de polivinilideno. Após a transferência, a membrana foi bloqueada e posteriormente incubada com anticorpo policlonal para a COX-2. A visualização das proteínas foi realizada utilizando anticorpo secundário específico conjugado à peroxidase e as bandas imunorreativas foram visualizadas usando-se um kit de quimioluminescência (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Inglaterra) e filme radiográfico.

3.2.5. Drogas e reagentes

Foram utilizadas as seguintes drogas ou sais: carragenina (lambda IV), bradicinina, aspirina, histamina, adjuvante completo de Freund (CFA), capsaicina, WEB2170, AM281, aprotinina A, albumina sérica bovina (BSA), cloreto de benzametônio, ácido etilenodiaminotetracético, dexametasona, aspirina, brometo de hexadeciltrimetilamônio, tetrametilbenzidina, peróxido de hidrogênio, anticorpo policlonal de coelho contra a iNOS, Tween 80, Fluoreto de fenilmetilsulfonila, Trizma, sucrose, ditiotriol, Fluoreto de fenilmetilsulfonil, EGTA, cloreto de benzametônio e α_1 glicoproteína ácida bovina foram adquiridos da Sigma (E.U.A.), [3 H]-fator de ativação plaquetária foi obtido da Amersham (UK), o fator de ativação plaquetária foi obtido da Bachem Bioscience Inc. (EUA); substância P foi obtida da Tocris (Reino Unido); endotelina-1 e BQ-123 foram adquiridos da American Peptide Co (E.U.A.), dimetilformamida e formaldeído foram obtidos da Merck Biosciences (Alemanha), o hidrato de cloral foi adquirido da Vetec (Brasil), a gabapentina foi obtida da Neurontin (Park-Davis, Brasil); anticorpo policlonal de boi contra a COX-2, anticorpo policlonal de cabra contra a actina e anticorpo anti IgG de coelho, de boi e de cabra ligados à peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, EUA). A membrana de PVDF foi adquirida da Millipore (E.U.A.). O kit de ELISA para a IL-1 β foi adquirido da R&D systems (E.U.A.). A [3 H]-RTX foi obtida da Perkin Elmer Life Sciences (EUA). O restante dos sais e compostos foram adquiridos de companhias com comprovada certificação de qualidade.

As soluções estoque (0,1-1 M) para a maioria da drogas, inclusive as lignanas purificadas, foram preparadas em etanol ou dimetilsulfóxido (DMSO), exceto para o WEB2170 que foi diluído em DMSO. O PAF foi preparado em

solução de BSA 0,1%. Todas as drogas foram armazenadas em tubos siliconizados, mantidas a -20 °C (quando necessário) e diluídas na concentração desejada no dia dos experimentos. As concentrações finais de etanol ou de DMSO, quando aplicados separadamente, não apresentaram nenhum efeito significativo em alterar as respostas inflamatórias ou nociceptivas ou as respostas *in vitro*.

3.2.6. Análise Estatística

Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM), exceto para os valores das DI_{50} ou de CI_{50} (dose ou concentração do EH, FRL, lignanas ou do WEB2170 necessárias para reduzir em 50% as respostas inflamatórias em relação ao grupo controle ou de deslocamento da união específica de [3H]-PAF em membranas de córtex cerebral de camundongos) que são representados como a média geométrica acompanhada de seu respectivo intervalo de confiança de 95%. Os dados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de Student-Newman Keuls ou de Dunnett. Valores de P menores do que 0,05 ($P < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância. Para os experimentos de união específica, a curva concentração-resposta de deslocamento foi expressa como porcentagem (%) do controle. A análise estatística foi realizada pelo teste t de Student. A concentração dos compostos que produziu 50% do efeito máximo (IC_{50}) foi obtida pelo programa GraphPad Prism Software, San Diego, CA, U.S.A.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito antiinflamatório e anti-nociceptivo de extrato hexânico e frações obtidos do *P. amarus*

4.1.1. Efeito na alodínia mecânica induzida pelo CFA

A injeção i.pl. de CFA foi capaz de induzir uma alodínia mecânica de longa duração em camundongos, caracterizada pelo aumento significativo na frequência de retirada da pata após estimulação mecânica com filamento de Von Frey (Figura 3A). A alodínia mecânica foi observada a partir do 1º dia após a aplicação de CFA e persistiu por pelo menos 15 dias. O tratamento diário com o EH (100 mg/kg, 2 vezes ao dia, v.o.), diminuiu significativamente a alodínia mecânica a partir do 1º dia de tratamento com o EH e atingiu uma inibição máxima de 76 ± 7 % o 4º dia. A suspensão do tratamento com o EH no 6º dia após a injeção de CFA, re-estabeleceu a alodínia mecânica em 2 dias. O tratamento com o EH foi reiniciado no 12º dia após o CFA e mantido até o 15º dia, voltando a causar marcada ação anti-alodínica. Diferentemente do EH, a FRL obtida do *P. amarus* não foi capaz de reduzir significativamente a alodínia mecânica induzida pelo CFA (Figura 3A).

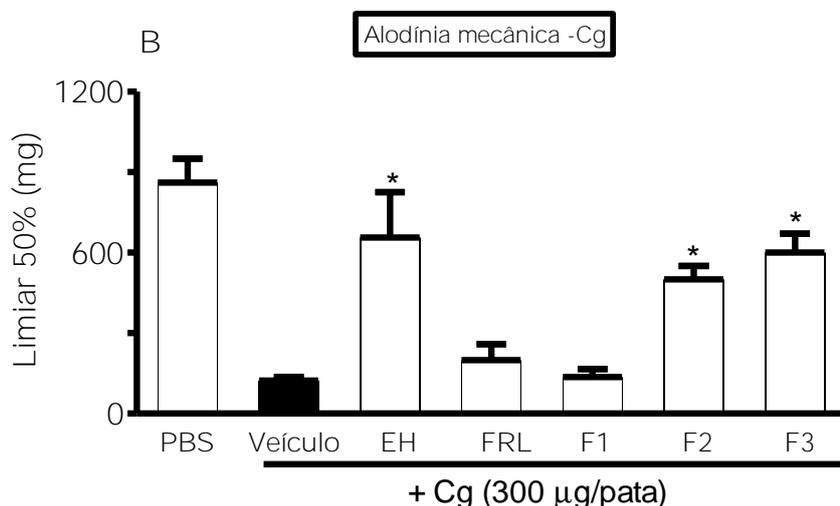
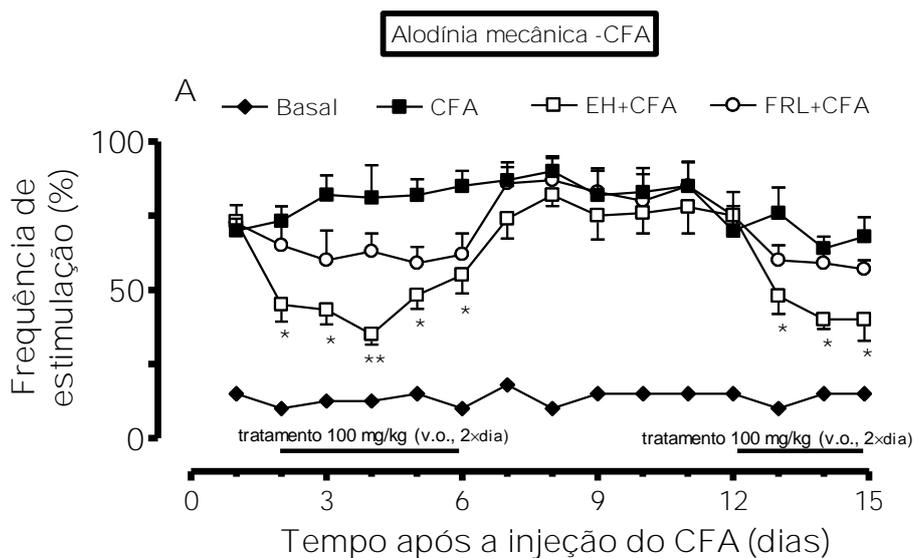


Figura 3. Efeito do tratamento por via oral com o extrato hexânico (EH) ou com a fração rica em lignanas (FRL) obtidos do *P. amarus* sobre a alodínia mecânica (A) induzida pela injeção intraplantar de CFA e do tratamento via oral com o EH, FRL, fração F1 (F1), fração 2 (F2) ou fração F3 (F3) obtidos do *P. amarus* sobre a alodínia mecânica (B) induzida pela injeção intraplantar de Cg em camundongos. Após a injeção de CFA (A), os animais foram tratados com EH ou com a FRL (ambos na dose de 100 mg/kg, 2 x dia) durante dois períodos de tempo (dias 2-6 e dias 12-15, conforme indicado na figura). No modelo de nocicepção induzida pela Cg (B), os animais foram tratados previamente (1 h antes, todos com dose única de 100 mg/kg) com o EH, FRL, F1, F2 ou com a F3 e a alodínia foi medida 3 h após a Cg. Cada ponto representa a média \pm E.P.M. de 5-7 animais. A análise estatística dos resultados foi feita comparando todos os grupos experimentais (nos diferentes tempos) utilizando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Student-Newman Keuls. *Grupos que diferem estatisticamente do grupo CFA ou da Cg (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). Todos os grupos experimentais diferiram dos valores basais após o tratamento com CFA ou com Cg, exceto o grupo que recebeu apenas PBS.

4.1.2. Efeito na alodínia mecânica induzida pela Cg

A injeção i.pl. de Cg foi capaz de induzir alodínia mecânica na pata de camundongos 3 h após a aplicação deste agente inflamatório, com redução do limiar 50 % de aproximadamente 1000 mg (basal) para valores próximos a 100 mg (Figura 3B). O tratamento dos animais com o EH, com a F3 ou com a F2, causou redução na queda do limiar de alodínia mecânica induzido pela Cg. As porcentagens de inibição foram de 81 ± 20 % para o EH, 79 ± 9 % para a F3 e de 75 ± 8 % para a F2. Tanto a FRL como a F1 não alteraram significativamente a queda do limiar mecânico induzido pela injeção i.pl. de Cg (Figura 3B).

4.1.3. Efeito na alodínia mecânica induzida por neuropatia

A ligação parcial do nervo ciático produziu alodínia mecânica prolongada na pata ipsilateral (Figura 4). A instalação da alodínia mecânica foi verificada 5 dias após a cirurgia, alcançando o máximo no dia 7^o e persistindo além do 20^o dia após a cirurgia (Figura 4). Similar ao tratamento dos animais operados com gabapentina (70 mg/kg, v.o.), a administração do EH do *P. amarus* (100 mg/kg, v.o., 2 vezes ao dia) reduziu significativamente (71 ± 10 %) a alodínia mecânica quando avaliada no segundo dia. Esta inibição persistiu por até 1 dia após a interrupção do tratamento (Figura 4).

Entretanto, o tratamento dos animais operados com a FRL obtida do *P. amarus* não afetou a alodínia mecânica induzida pela mononeuropatia. A suspensão do tratamento com o EH de *P. amarus* ou com a gabapentina no 11^o dia reduziu o efeito anti-alodínico dos mesmos.

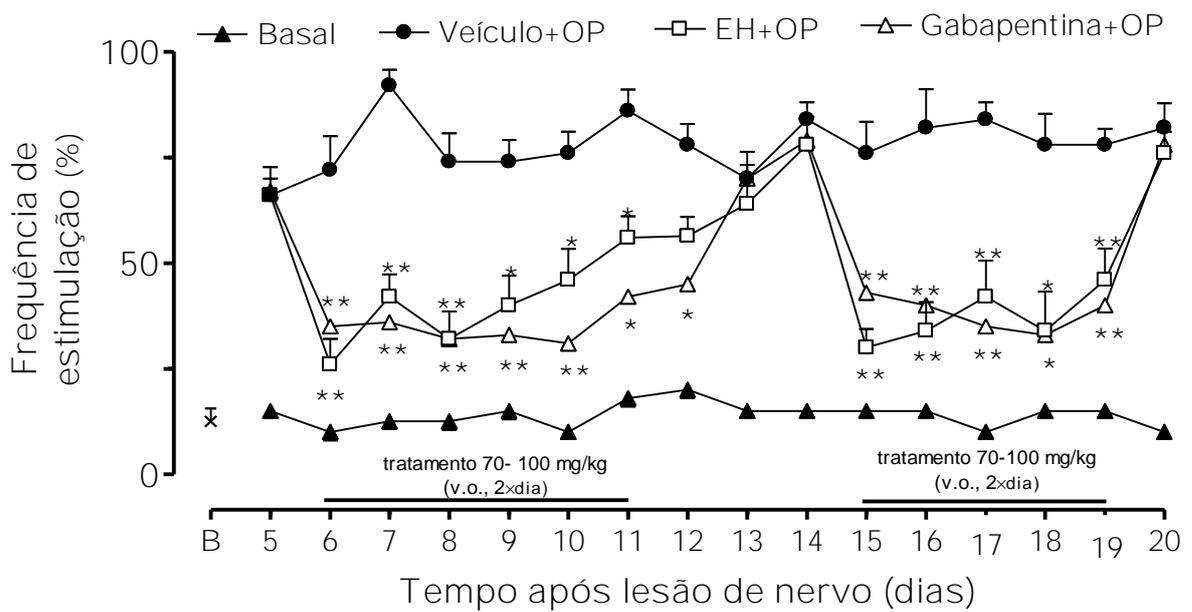


Figura 4. Efeito do tratamento via oral com o extrato hexânico (EH) obtido do *P. amarus* ou com a gabapentina sobre a alodínia mecânica induzida pela contrecção parcial do nervo ciático (OP). Após a neuropatia, os animais foram tratados com o EH ou com a gabapentina (na dose de 100 mg/kg ou 70 mg/kg, respectivamente, 2 × dia) durante dois períodos de tempo (dias 6-11 e dias 15-19, conforme indicado na figura). Cada ponto representa a média ± E.P.M. de 6 animais. A análise estatística dos resultados foi feita comparando todos os grupos experimentais (nos diferentes tempos) utilizando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Student-Newman Keuls. *Grupos que diferem estatisticamente do grupo operado tratado com o veículo (*p<0,05, **p<0,01). Todos os grupos experimentais diferiram dos valores basais após mononeuropatia, exceto o grupo que recebeu apenas veículo.

Entretanto, quando o tratamento com o EH ou com a gabapentina foi reiniciado no 15º dia, observou-se um marcante efeito anti-alodínico que se manteve até a próxima suspensão do tratamento (Figura 4).

4.1.4. Efeito na nocicepção induzida pela formalina

O tratamento por via oral com o EH, as frações F2 e F3 obtidas de *P. amarus* (100 mg/kg) reduziu significativamente tanto a fase neurogênica (0 a 5 min), quanto a fase inflamatória (15 a 30 min) da nocicepção induzida pela formalina. Na primeira fase, a inibição foi de 55 ± 3 , 36 ± 4 e 40 ± 5 % e na segunda fase foi de 37 ± 7 , 36 ± 7 e 33 ± 8 %, respectivamente (Figura 5A e 5B). A administração por via oral da FRL (100 mg/kg) e a aspirina (300 mg/kg), mas não da fração F1 (100 mg/kg), causaram inibição na fase inflamatória, mas não na fase neurogênica da nocicepção induzida pela formalina. A inibição observada foi 65 ± 7 % e de 73 ± 9 %, respectivamente (Figura 5B).

4.1.5. Efeito na nocicepção induzida pela capsaicina

O tratamento subcutâneo com capsaicina (20 μ mol/kg) foi capaz de inibir (97 ± 4 % de inibição) significativamente a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina (1nmol). Similarmente, os resultados apresentados na Figura 6A demonstram que o EH, e as frações F2 e F3 obtidos do *P. amarus*, administrados por via oral (100 mg/kg), 1 h antes, apresentaram efeitos anti-nociceptivos significativos quando avaliados no modelo da nocicepção induzida pela capsaicina. A inibição máxima observada, em relação à resposta controle, foi de 65 ± 5 , 44 ± 4 e 58 ± 3 %, respectivamente (Figura 6A).

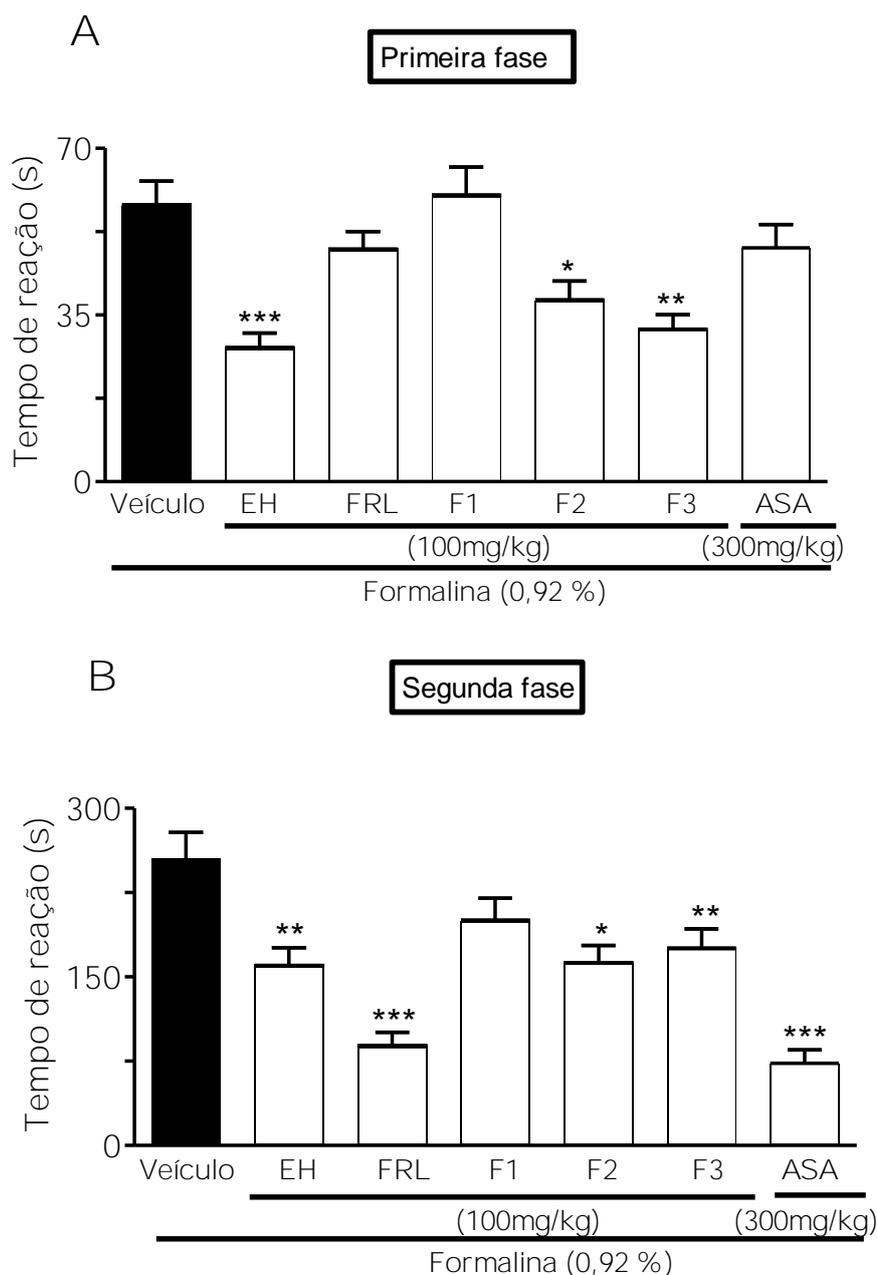


Figura 5. Efeito do tratamento por via oral com o extrato hexânico (EH), fração rica em lignanas (FRL), fração F1 (F1), fração 2 (F2) ou fração F3 (F3) obtidos do *P. amarus* e da aspirina (ASA) sobre a primeira (A) e a segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos. Neste modelo de nocicepção induzida pela formalina, os animais foram tratados previamente (1 h antes, todos com dose única de 100 mg/kg e somente a ASA com 300 mg/kg) com o EH, FRL, F1, F2, F3 e com a ASA e a nocicepção espontânea foi medida de 0-5 min (na primeira fase) e de 15-30 min (na segunda fase) após a injeção intraplantar de formalina (0,92%). Cada ponto representa à média \pm E.P.M. de 5-7 animais. A análise estatística dos resultados foi feita comparando todos os grupos experimentais (nos diferentes tempos) utilizando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Student-Newman Keuls. *Grupos que diferem estatisticamente do grupo formalina (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

4.1.6. Efeito no ensaio de união específica para [³H]-RTX em medula espinhal de ratos

A capsaicina (3 µM) foi capaz de causar redução significativa da ligação específica da [³H]-RTX em membranas de medula espinhal de ratos. Com uma inibição de 73±7 %. Semelhantemente, A Figura 6B demonstra que tanto o EH (100 µg/ml), quanto à fração F3 (100 µg/ml) foram capazes de deslocar a ligação específica da [³H]-RTX em membranas de medula espinhal de ratos (Figura 6B). A percentagem de deslocamento em relação ao grupo controle foi de 76±9 e de 89±10 %, respectivamente.

4.1.7. Efeito sobre o edema induzido pelo CFA

Uma única injeção i.pl. de CFA foi capaz de causar um aumento no volume do edema de pata por vários dias em camundongos (Figura 7A). Esse aumento foi observado a partir do 1º dia após a aplicação de CFA e persistiu por pelo menos 15 dias (Figura 7A). O tratamento diário com o EH (100 mg/kg, 2 vezes ao dia, v.o.) 24 h após a injeção de CFA, diminuiu significativamente o edema a partir do 1º dia de tratamento e atingiu inibição máxima de 53±3% no 4º dia. A suspensão do tratamento com o EH no 6º dia após a injeção de CFA restabeleceu o edema 2 dias após a retirada do tratamento com o EH. O tratamento com EH foi reiniciado no 12º dia após o CFA e mantido até o 15º dia, voltando a apresentar ação anti-edematogênica. Similarmente, a FRL inibiu o edema de pata induzido pelo CFA, com inibição de 39±9 % no 4º dia após a injeção de CFA (Figura 7A).

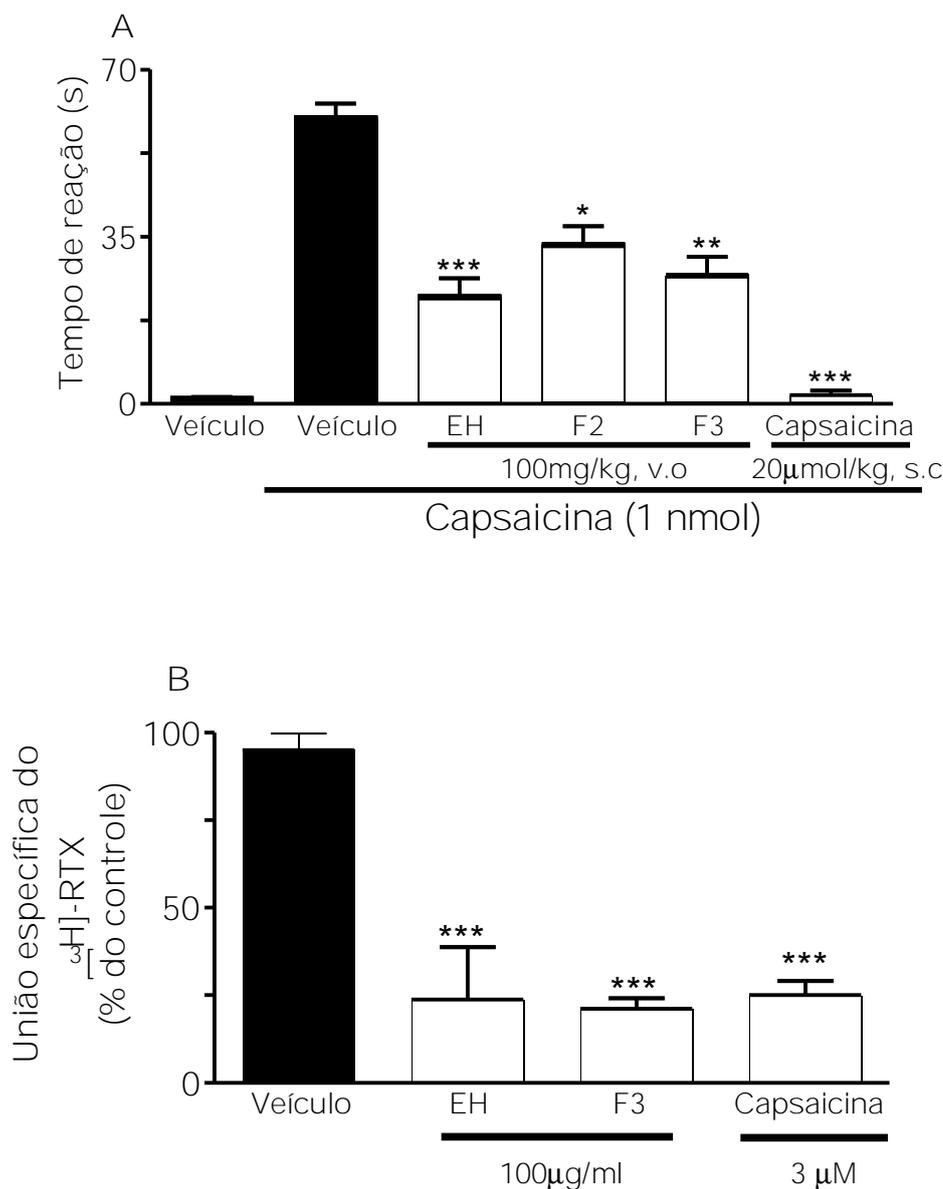


Figura 6. Efeito do tratamento por via oral com o extrato hexânico (EH), fração 2 (F2) ou com a fração F3 (F3) obtidos do *P. amarus* e do tratamento subcutâneo com a capsaicina sobre a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos (A) e efeito do EH ou da fração F3 obtidos do *P. amarus* e da capsaicina sobre a união específica para a [³H]-resiniferatoxina (RTX) em preparações de medula espinhal de rato. **No modelo de nocicepção induzida pela capsaicina, os animais foram tratados previamente (1 h antes, todos com dose única de 100 mg/kg) com o EH, F2 ou com a F3.** O tratamento subcutâneo com a capsaicina (20 µmol/kg) foi realizado 30 min antes da injeção intraplantar de capsaicina. A nocicepção espontânea foi medida de 0-5 min. Para a Figura A, cada ponto representa a média ± E.P.M. de 7 animais e para a Figura B, cada ponto representa a média ± E.P.M. de 3 experimentos. A análise estatística dos resultados foi feita comparando todos os grupos experimentais (nos diferentes tempos) utilizando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Student-Newman Keuls. *Grupos que diferem estatisticamente do grupo capsaicina ou controle (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

4.1.8. Efeito sobre o edema induzido pela Cg

A injeção i.pl. de Cg (300 µg) produziu edema significativo quando analisado até 4 h após a injeção. Os resultados da Figura 7B demonstram que o tratamento oral com o EH, FRL ou com a F1 (100 mg/kg) reduziu o edema quando avaliada 3 h após a injeção i.pl. de Cg. As inibições foram de 41±6% para o EH, 46±7% para FRL e de 39±4% para a F1. Entretanto, as frações F3 e F2 não foram capazes de inibir de maneira significativa o edema induzido por este agente inflamatório (Figura 7B).

4.2. Efeito antiinflamatório das lignanas isoladas do *P. amarus*

4.2.1. Efeito sobre o edema induzido pela Cg

Como a FRL foi efetiva em inibir significativamente o edema de pata induzido pela Cg (Figura 7B), foram testadas também as lignanas purificadas do *P. amarus*, assim como o EH e a FRL. O tratamento por via oral com as lignanas filtetralina, nirtetralina ou nirantina (100 µmol ou 43 mg/kg, v.o) reduziu significativamente o edema induzido pela Cg. As porcentagens de inibição para as maiores doses testadas (43 mg/kg que corresponde a 100 µmol/kg) foram de 40±5% para a filtetralina, 56±7% para a nirtetralina e 59±8% para a nirantina aos 60 min após a injeção i.pl. de Cg, respectivamente (Figura 8).

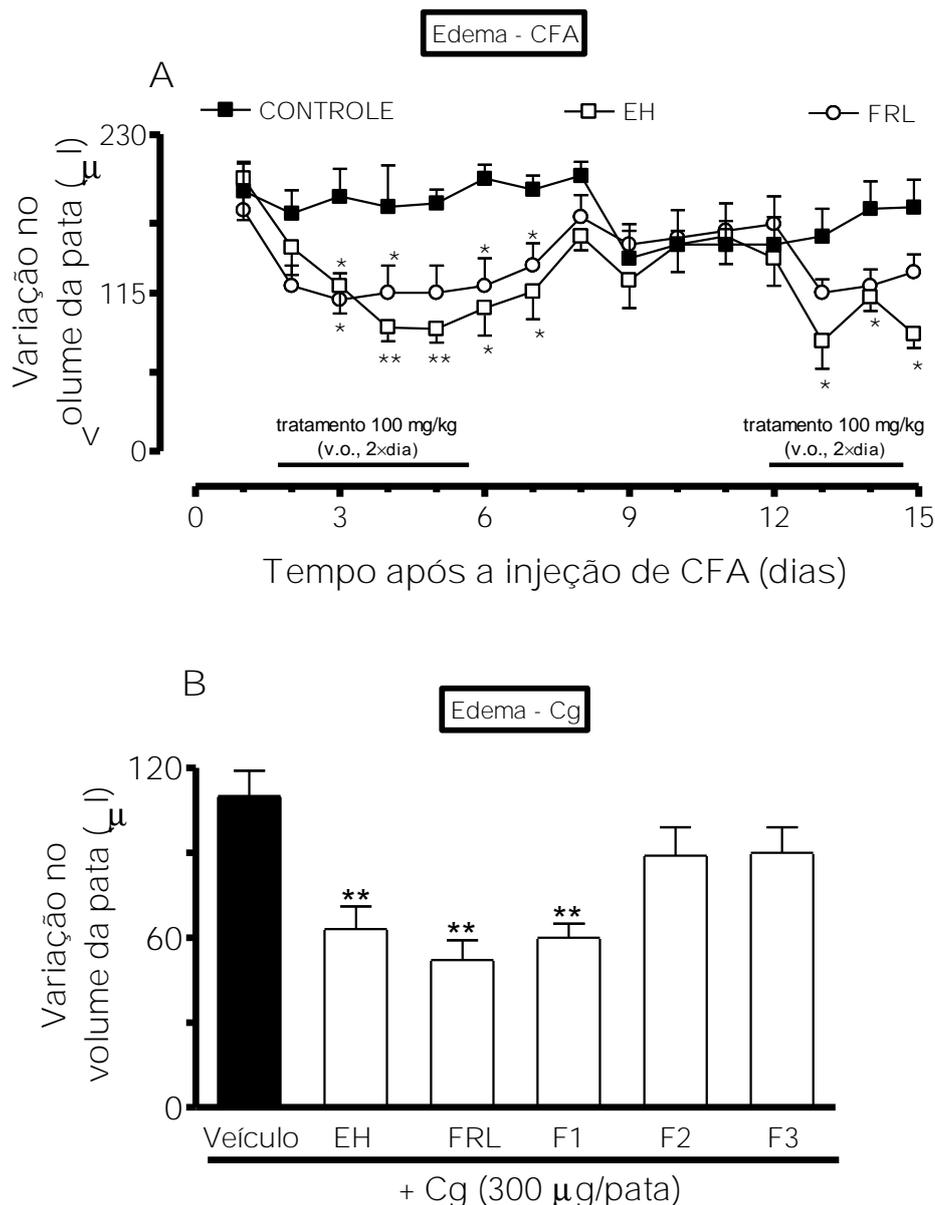


Figura 7. Efeito do tratamento por via oral com o extrato hexânico (EH) ou com a fração rica em lignanas (FRL) obtidos do *P. amarus* sobre o edema induzido pela injeção intraplantar de CFA (A) ou do tratamento via oral com EH, FRL, fração F1 (F1), fração 2 (F2), fração F3 (F3) obtidos do *P. amarus* sobre o edema induzido pela injeção intraplantar de Cg em camundongos (B). Após a injeção de CFA (A), os animais foram tratados com o EH ou com a FRL (ambos na dose de 100 mg/kg, 2 × dia) durante dois períodos de tempo (dias 2-6 e dias 12-15, conforme indicado na figura). Após a medida da alodínia, o edema de pata foi medido nos mesmos animais por pletismometria. No modelo de edema induzido pela Cg (B), os animais foram tratados previamente (1 h antes, todos com dose única de 100 mg/kg) com o EH, FRL, F1, F2 ou com a F3. 3 h após a injeção de Cg foi medida a alodínia mecânica e o edema dos mesmos animais. Cada ponto representa a média ± E.P.M. de 5-7 animais. A análise estatística foi feita comparando todos os grupos experimentais (nos diferentes tempos) utilizando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Student-Newman Keuls. *Grupos que diferem estatisticamente do grupo CFA ou da Cg (*p<0,05, **p<0,01).

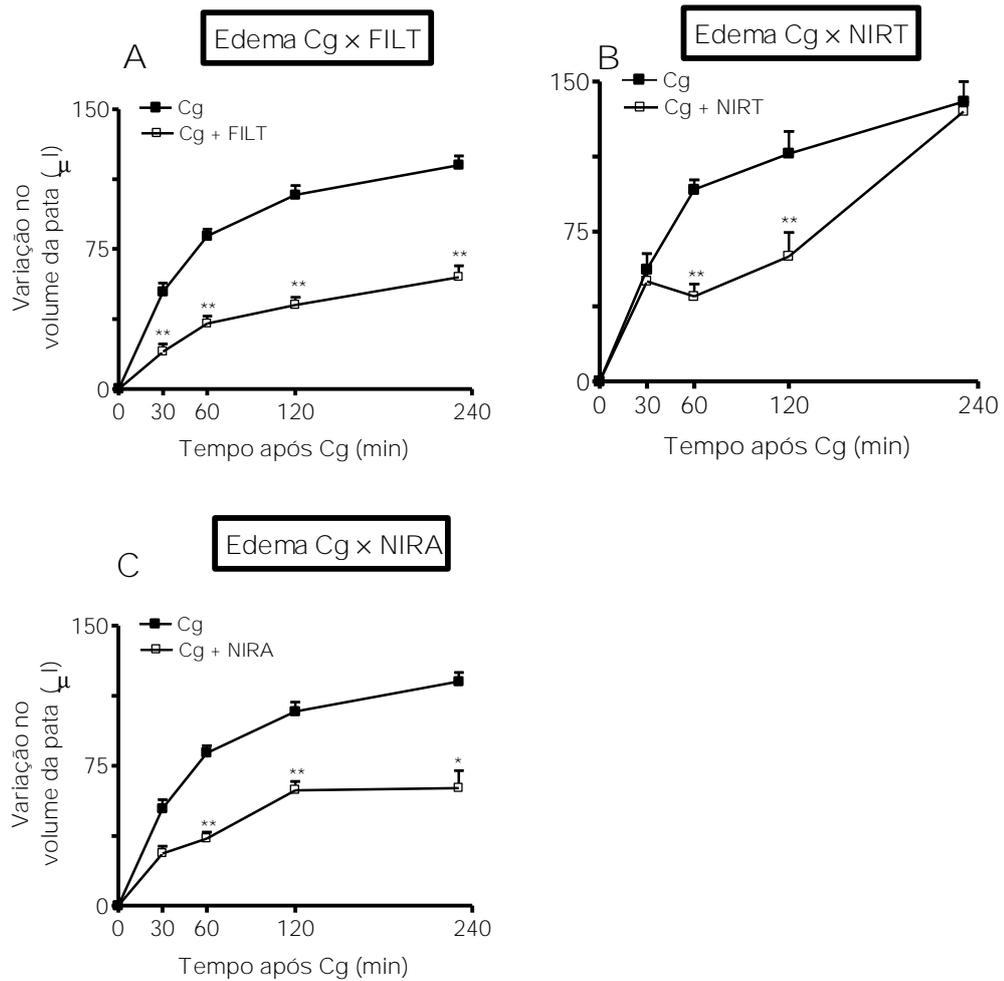


Figura 8. Efeito do tratamento por via oral com a filtetralina (FILT) (A), nirtetralina (NIRT) (B) ou com a nirantina (NIRA) (C) isoladas do *P. amarum* sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de Cg em camundongos, após 30, 60, 120 e 240 min. O tratamento dos animais com FILT, NIRT ou NIRA (todos na dose de 100 µmol/kg) foi realizado 1 h antes da injeção de Cg e o edema foi avaliado 30, 60, 120 ou 240 min após a injeção de Cg. Cada ponto representa à média ± E.P.M. de 5-7 animais. A análise estatística foi feita comparando todos os grupos experimentais utilizando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste Student-Newman Keuls. *Grupos que diferem estatisticamente do grupo Cg (*p<0,05, **p<0,01).

Apesar de todas as lignanas apresentarem estruturas químicas muito semelhantes, nem a filantina nem a hipofilantina (100 µmol/kg, v.o.) foram capazes de causar inibição significativa sobre o edema de pata induzido pela Cg (Tabela 1). No entanto, o edema de pata induzido pela injeção i.pl. de Cg foi inibido pelo tratamento subcutâneo com a DEX (0,5 mg/kg, 4 h antes da injeção i.pl. de Cg), assim como pela administração oral de aspirina (300 mg/kg, 1 h antes da injeção i.pl. de Cg), ou ainda, pela administração intraplantar de WEB2170 (30 nmol/pata) ou pelo BQ-123 (1 nmol/pata) (administrados concomitantemente com a Cg) (Tabela 1).

Tabela 1 – Efeito do tratamento com dexametasona (DEX), BQ-123, WEB2170, aspirina ou com as lignanas hipofilantina e filantina isoladas de *P. amarus* sobre o edema de pata induzido pela injeção i.pl. de Cg após 60 min.

TRATAMENTO	DOSE/VIA DE ADMINISTRAÇÃO	INIBIÇÃO DO EDEMA (%)
Dexametasona	0,5 mg/kg (s.c)	79 ± 2**
Aspirina	300,0 mg/kg (v.o.)	47 ± 5*
BQ-123	1,0 nmol (pata)	72 ± 10**
WEB2170	30,0 nmol (pata)	32 ± 5*
Hipofilantina	43,0 mg/kg (v.o.)	5 ± 2
Filantina	43,0 mg/kg (v.o.)	10 ± 7

Cada grupo representa a média ± E.P.M. de 4 – 6 animais

*P<0,05, **P<0,01, comparado com o controle (Cg) (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

4.2.2. Efeito sobre o aumento da atividade da MPO induzido pela Cg

A injeção de Cg (300 µg/pata) aumentou em cerca de 7 vezes a atividade da MPO quando comparado com os valores de animais tratados apenas com PBS (Figura 9A). A injeção subcutânea prévia de DEX (0,5 mg/kg,

4 h antes) reduziu significativamente a atividade da enzima MPO (82 ± 7 %). Da mesma forma, o tratamento dos animais com o EH ou com a FRL do *P. amarus* (100 mg/kg, v.o.) produziu inibição significativa da atividade da MPO (54 ± 4 e 44 ± 8 %, respectivamente) (Figura 9A). Além disso, a fildetralina, a nirtetralina ou a nirantina (100 μ mol/kg) quando administrada por via oral também reduziu o aumento da atividade da MPO induzido pela injeção i.pl. de Cg (66 ± 4 , 65 ± 3 e 58 ± 5 % de inibição, respectivamente) (Figura 9A).

4.2.3. Efeito sobre o aumento dos níveis de IL-1 β induzido pela Cg

A injeção i.pl. de Cg em camundongos promoveu aumento expressivo dos níveis teciduais da IL-1 β quando comparado aos de animais que receberam PBS (cerca de 8 vezes) (Figura 9B). O tratamento subcutâneo prévio dos animais com DEX (0,5 mg/kg) inibiu significativamente o aumento da IL-1 β (91 ± 7 %). O tratamento dos animais com o EH ou com a FRL obtidos de *P. amarus* (100 mg/kg), assim como com a nirtetralina (100 μ mol/kg) também foi capaz de reduzir significativamente a produção de IL-1 β induzida pela Cg (56 ± 11 , 60 ± 9 e 65 ± 9 %, respectivamente). Entretanto, nem a fildetralina nem a nirantina foram efetivas em reduzir os níveis de IL-1 β em animais que receberam a injeção i.pl. de Cg (Figura 9B).

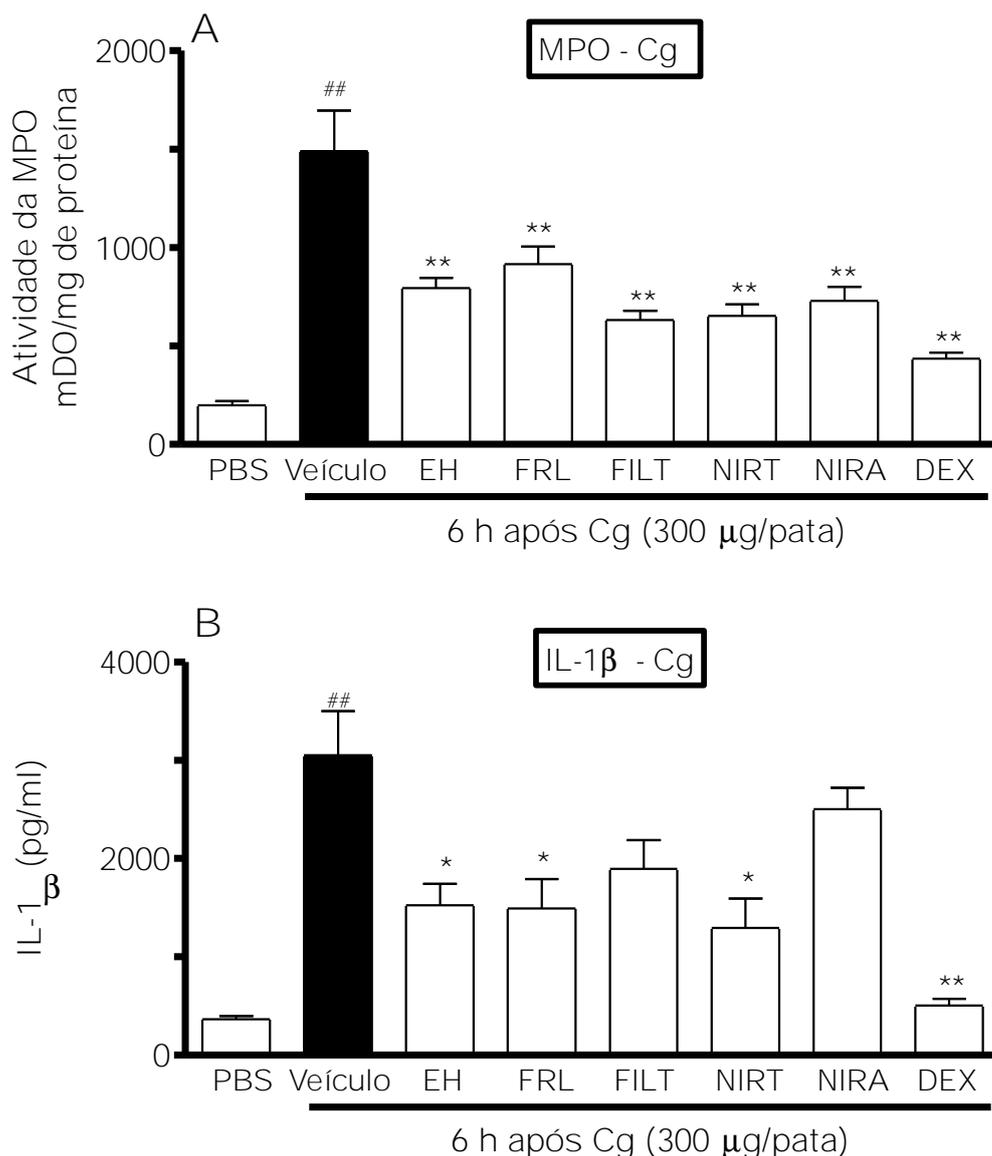


Figura 9. Efeito do tratamento por via oral com o extrato hexânico (EH), fração rica em lignanas (FRL), com a filtetralina (FILT), nirtetralina (NIRT), nirantina (NIRA) obtidos de *P. amarus*, ou com a dexametasona (DEX) sobre o aumento da atividade da MPO (A) e sobre o aumento da produção de IL-1 β (B) induzido pela injeção intraplantar de Cg em camundongos. Uma hora antes da injeção i.pl. de Cg, animais foram tratados com EH ou com a FRL (ambas na dose de 100 mg/kg, v.o.), FILT, NIRT ou NIRA (todos na dose de 100 µmol/kg, v.o.) e o tratamento via subcutâneo com DEX (na dose de 0,5 mg/kg) foi efetuado 4 h antes da injeção de Cg. Após 6 horas da injeção de Cg, os animais foram sacrificados para a coleta de material para as dosagens. Cada ponto representa a média \pm E.P.M. de 5-7 animais. A análise estatística foi feita comparando todos os grupos experimentais utilizando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste Student-Newman Keuls. *Grupos que diferem estatisticamente do grupo Cg (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). Após o tratamento com Cg, o grupo tratado com veículo diferiu do grupo que recebeu PBS na pata (## $p < 0,01$).

4.2.4. Efeito sobre o aumento da expressão da enzima COX-2 induzido pela Cg

A injeção i.pl. de Cg em camundongos aumentou de maneira relevante a expressão das enzimas COX-2 nos tecidos cutâneo e subcutâneo da pata edemaciada. Este aumento foi verificado 6 h após a injeção i.pl. de Cg. A Figura 10 juntamente com a análise de densitometria (resultado não mostrado) demonstraram que a administração oral do EH ou da FRL (100 mg/kg) e das lignanas filtetralina, nirtetralina ou nirantina (100 μ mol/kg) não foram capazes de alterar de maneira significativa o aumento da expressão da COX-2 induzido pela Cg.

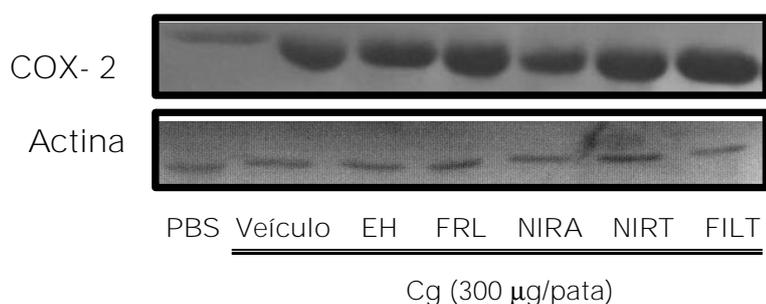


Figura 10 - Imunodeteccção dos níveis da proteína COX-2 (71-72 kDa) em camundongos que receberam tratamento oral com o extrato hexânico (EH) ou com a FRL ou com as lignanas filtetralina (FILT), nirtetralina (NIRT) ou nirantina (NIRA) obtidos de *P. amarus* após injeção intraplantar de Cg em camundongos. Uma hora antes da injeção i.pl. de Cg, animais foram tratados com EH ou com a FRL (ambas na dose de 100 mg/kg, v.o.), FILT, NIRT ou NIRA (todos na dose de 100 μ mol/kg, v.o.). Após 6 horas da injeção de Cg, os animais foram sacrificados. A imunodeteccção da actina (47 kDa) foi utilizada como controle interno. Figura representativa de 3 experimentos similares.

4.3. Mecanismo de ação da ET-1 nas respostas antiinflamatórias das lignanas isoladas do *P. amarus*

4.3.1. Efeito no edema induzido pela ET-1

A ET-1 (30 pmol) foi capaz de causar uma resposta edematogênica com duração maior que 90 minutos após sua injeção i.pl., de acordo com resultados previamente publicados (PIOVEZAN *et al.*, 2000). A administração oral do EH ou da FRL (100 mg/kg) foi efetiva em causar redução do edema de pata induzido pela ET-1 sendo a inibições de 72 ± 11 e 78 ± 6 %, respectivamente (Figura 11). O valor médio da DI_{50} para o tratamento por via oral com o EH foi de 67,0 (60,9–74,9) mg/kg, enquanto que para a FRL foi de 55,5 (45,1 – 68,4) mg/kg. Tanto a porcentagem de inibição como os valores de DI_{50} foram calculados 15 min após a injeção de ET-1, para todos os extratos e lignanas isoladas de *P. amarus*.

A administração por via oral das lignanas filtetralina ou nirtetralina (1 - 30 μ mol/kg) também causou inibição do edema induzido pela ET-1. Com inibição de 75 ± 5 e 50 ± 4 %, respectivamente (Figura 12). Por outro lado, a administração da lignana nirantina (30 μ mol/kg) não foi capaz de inibir o edema induzido pela ET-1 (resultado não mostrado). O valor médio da DI_{50} calculada para o tratamento por via oral com a filtetralina foi de 1,9 (1,1–3,5) mg/kg enquanto que para a nirtetralina foi de 1,8 (1,1–3,0) mg/kg (Figura 12).

O edema induzido pela ET-1 foi também significativamente inibido pelo tratamento com o BQ-123 (1 nmol/pata) com inibição de 80 ± 4 % (15 min após a injeção i.pl. de ET-1) (Figura 13C).

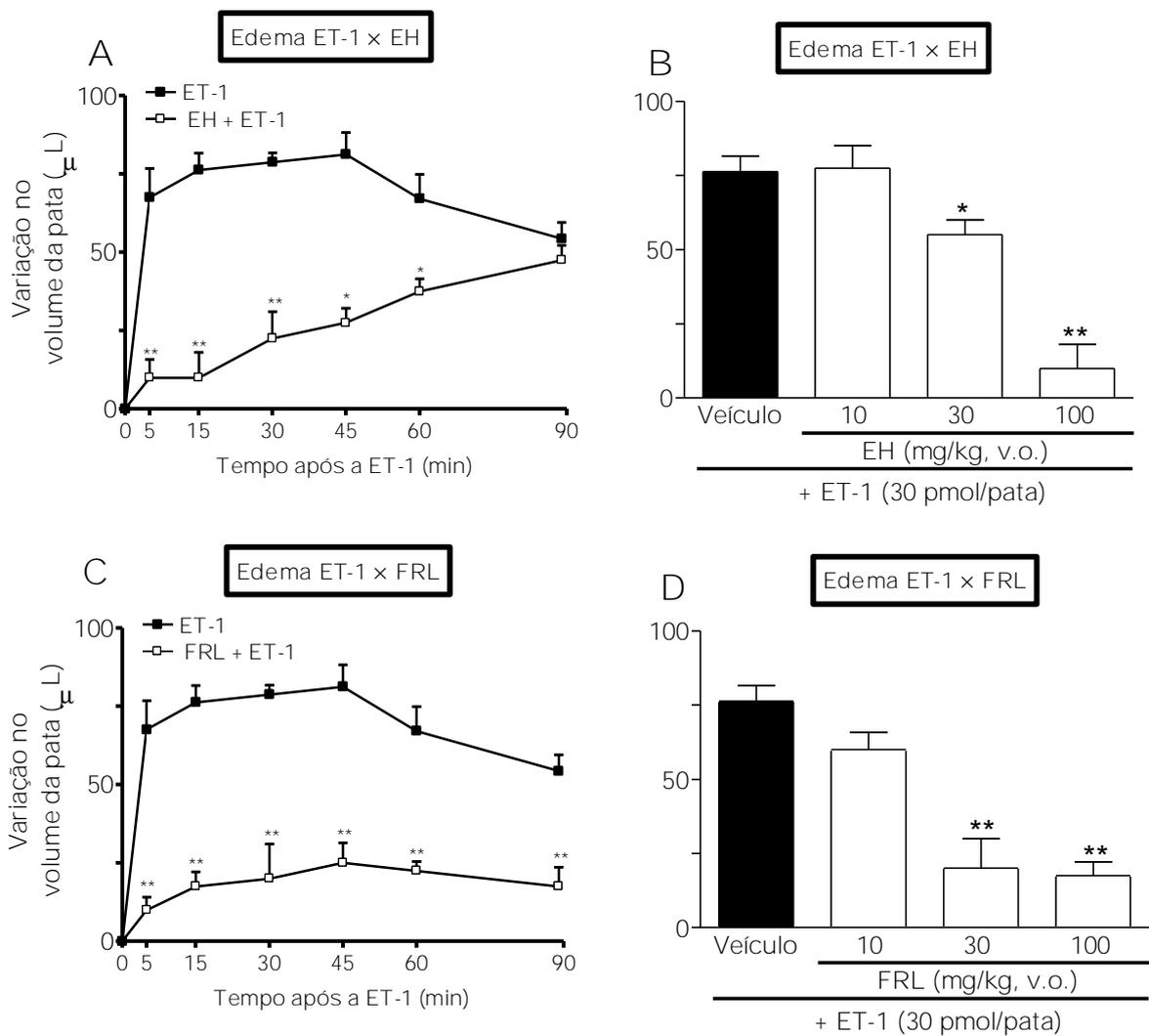


Figura 11. Efeito do tratamento por via oral com o extrato hexânico (EH) na dose de 100 mg/kg (A) ou em diferentes doses de EH (B) ou o tratamento por via oral com a fração rica em lignanas (FRL) na dose de 100 mg/kg (C) e de diferentes doses de FRL (D) após 15 min da injeção intraplantar de ET-1 em camundongos. O tratamento dos animais com o EH ou com a FRL (ambos na dose de 10-100 mg/kg, v.o.) foi realizado 1 h antes da injeção de ET-1 e a avaliação do edema foi realizado 5, 15, 30, 45, 60 ou 90 min após a injeção de ET-1. Cada ponto representa a média \pm E.P.M. de 5-7 animais. A análise estatística foi realizada comparando todos os grupos experimentais utilizando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste Student-Newman Keuls. *Grupos que diferem estatisticamente do grupo ET-1 (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Para comparação com o BQ-123, as lignanas filtetralina e nirtetralina foram administradas por via i.pl. (0,1-1,0 nmol/pata) e foram também capazes de reduzir de maneira significativa o edema de pata induzido pela ET-1, sendo a inibição observada de $63\pm 8\%$ para a filtetralina e de $82\pm 6\%$ para a nirtetralina (Figura 13). De forma semelhante ao tratamento sistêmico dos animais, o tratamento i.pl. com a lignana nirantina (30 nmol/pata) não inibiu o edema induzido pela ET-1 (resultado não mostrado).

4.3.2. Efeito sobre a nocicepção induzida pela ET-1

A injeção i.pl. de 100 pmol de ET-1 produziu aumento significativo no tempo do comportamento nociceptivo em camundongos após observação durante 20 min. A Figura 14 demonstra que o tratamento i.pl. com a nirtetralina (1 nmol/pata), similarmente ao antagonista seletivo de receptor ET_A , o BQ-123 (1 nmol/pata), reduziu o tempo do comportamento nociceptivo causado pela ET-1, quando administrado concomitantemente. As porcentagens de inibição foram de $72\pm 8\%$ para a nirtetralina e de $69\pm 10\%$ para o BQ-123. No entanto, nem o tratamento i.pl. com a nirantina (30 nmol/pata) ou com a filtetralina (30 nmol/pata) foram capazes de inibir a resposta nociceptiva induzida pela ET-1 (Figura 14).

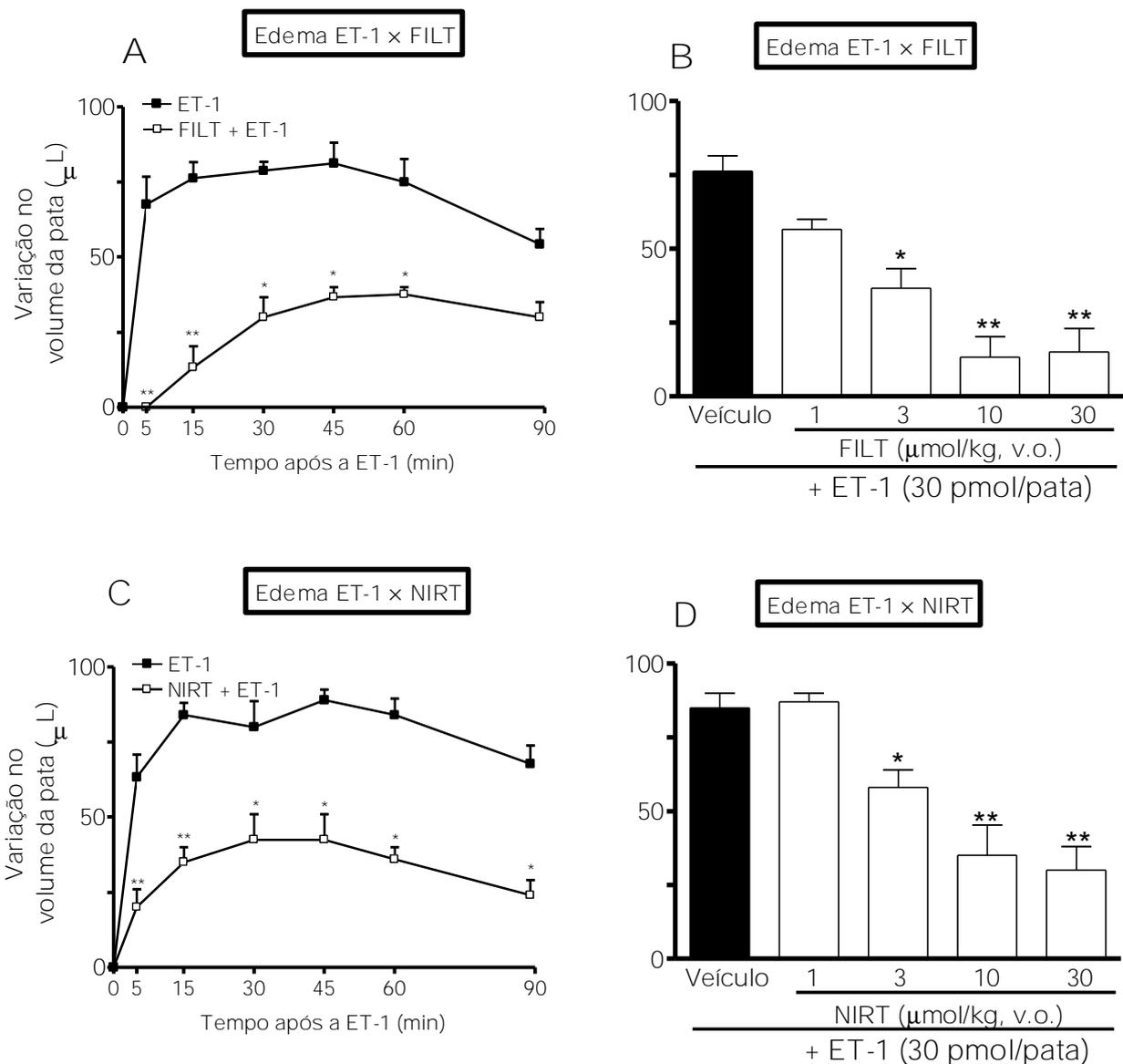


Figura 12. Efeito do tratamento por via oral com a filtetralina (FILT) na dose de 10 $\mu\text{mol/kg}$ (A) ou com diferentes doses de FILT (B) e o tratamento via oral com nirtetralina (NIRT) na dose de 10 $\mu\text{mol/kg}$ (C) e de diferentes doses de NIRT (D) após 15 min da injeção intraplantar de ET-1 em camundongos. O tratamento dos animais com a FILT ou com a NIRT (ambos na dose de 1-30 $\mu\text{mol/kg}$, v.o.) foi realizado 1 h antes da injeção de ET-1 e a avaliação do edema foi realizada 5, 15, 30, 45, 60 ou 90 min após a injeção de ET-1. Cada ponto representa a média \pm E.P.M. de 5-7 animais. A análise estatística foi efetuada comparando todos os grupos experimentais utilizando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste Student-Newman Keuls. *Grupos que diferem estatisticamente do grupo ET-1 (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

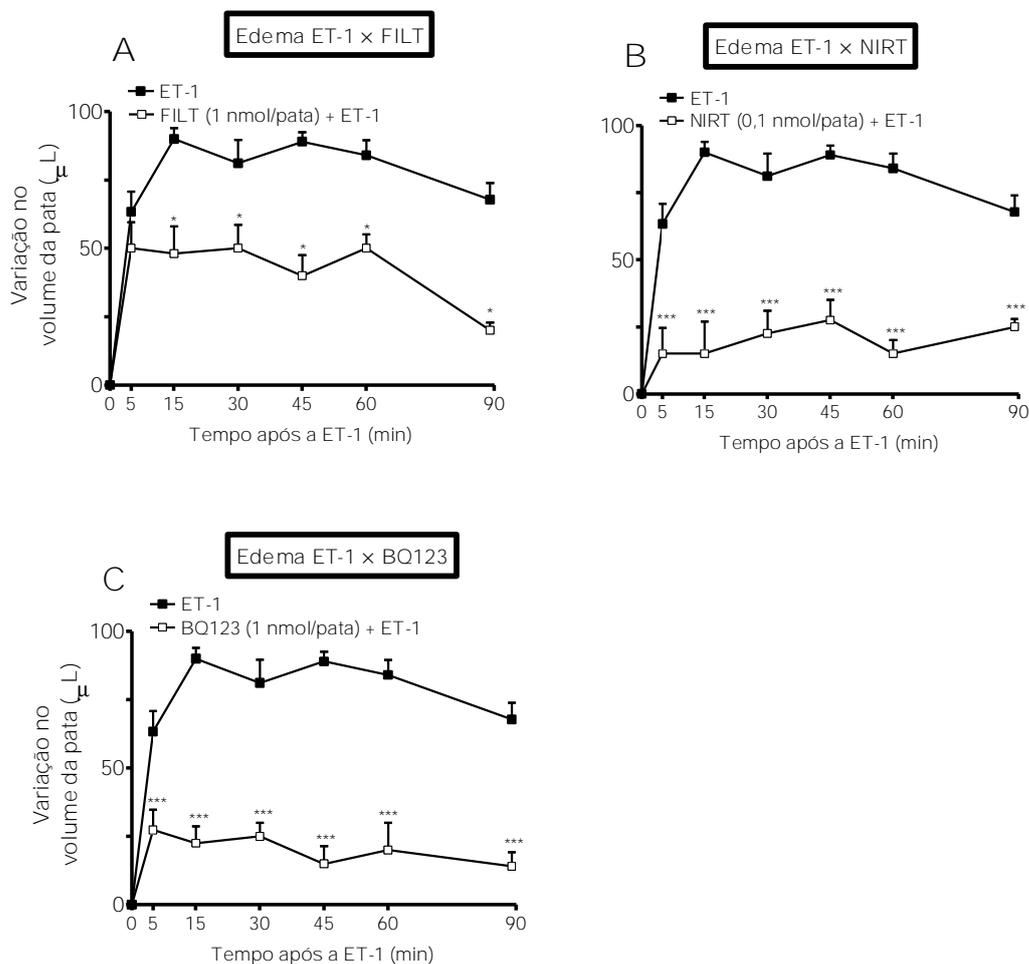


Figura 13. Efeito do tratamento por via intraplantar com a filtetralina (FILT, A), nirtetralina (NIRT, B) e com o BQ123 (C) no edema induzido pela injeção intraplantar de ET-1 em camundongos. O tratamento dos animais com a FILT, a NIRT ou com BQ123 (na dose de 1, 0,1 e 1 nmol/pata respectivamente) foi realizado concomitante com a injeção de ET-1 (30 pmol/pata) e a avaliação do edema foi realizada 5, 15, 30, 45, 60 ou 90 min após a injeção de ET-1. Cada ponto representa a média \pm E.P.M. de 5-7 animais. A análise estatística foi efetuada comparando todos os grupos experimentais utilizando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste Student-Newman Keuls. *Grupos que diferem estatisticamente do grupo ET-1 (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

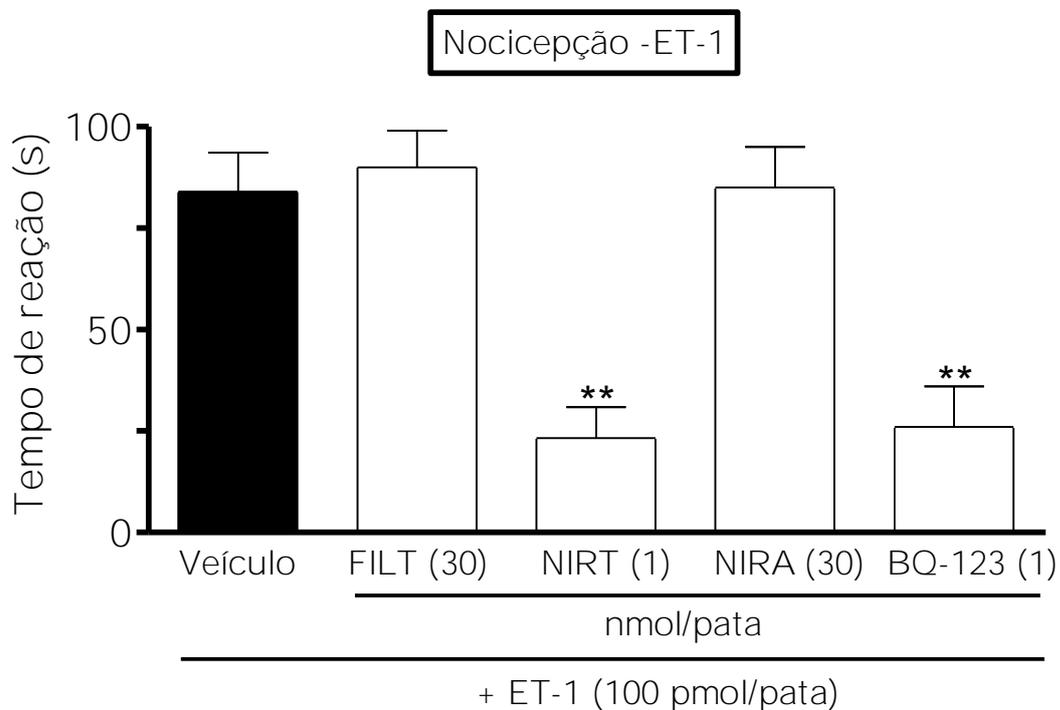


Figura 14. Efeito do tratamento por via intraplantar com a filtetralina (FILT), nirtetralina (NIRT) ou nirantina (NIRA) isoladas do *P. amarus* ou BQ-123 sobre a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de ET-1 em camundongos. Os animais foram tratados localmente com FILT ou NIRA (ambas na dose de 30 nmol/pata) ou com NIRT ou BQ-123 (ambos na dose de 1 nmol/pata) no mesmo momento da injeção i.pl. de ET-1 (100 pmol/pata). A análise estatística foi realizada comparando todos os grupos experimentais utilizando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste Student-Newman Keuls. *Grupos que diferem estatisticamente do grupo veículo+ET-1 (** $p < 0,01$).

4.4. Mecanismo de ação do PAF nas respostas antiinflamatórias das lignanas isoladas do *P. amarus*

4.4.1. Efeito no edema induzido pelo PAF

O PAF é relatado como um mediador lipídico importante e também está envolvido no edema de pata induzido pela Cg (MERLOS *et al.*, 1990). Nossos resultados confirmaram estes dados uma vez que o antagonista de receptor do PAF, o WEB2170, foi efetivo em reduzir (32 ± 5 %) o edema induzido pela Cg (Tabela 1). O PAF (3 nmol/pata) produziu edema de pata em camundongos. O tratamento por via oral com o EH ou com a FRL (100 mg/kg) causou inibição de 29 ± 4 e 75 ± 9 %, respectivamente (Figura 15). O valor médio da DI_{50} para a FRL foram de 90,5 (80,5 – 101,8) mg/kg. A administração da fildetralina, nirtetralina ou nirantina (10 μ mol/kg, v.o.) também foi efetiva em inibir o edema de pata induzido pelo PAF (65 ± 5 , 57 ± 11 , 53 ± 7 %, respectivamente) (Figura 16). Os valores médios das DI_{50s} foram de 3,2 (2,6 – 3,9) mg/kg para a fildetralina; 4,7 (2,8 – 8,1) mg/kg para a nirtetralina e de 6,1 (4,4 – 8,5) mg/kg para a nirantina.

O antagonista seletivo do receptor de PAF, o WEB2170 quando co-administrado intraplantarmente (30 nmol/pata) reduziu em 52 ± 7 % o edema induzido pelo PAF (Figura 17). Para comparação com o WEB2170, as lignanas fildetralina, nirtetralina e nirantina foram administradas também por via i.pl. (30 nmol/pata), apresentando as inibições relatadas na Tabela 2 e na Figura 17, sendo a nirantina a lignana mais eficaz em reduzir o edema induzido pelo PAF. Interessantemente, o BQ-123 quando administrado intraplantarmente, também reduziu o edema induzido pela injeção i.pl. de PAF, com inibição de 50 ± 9 % (Tabela 2).

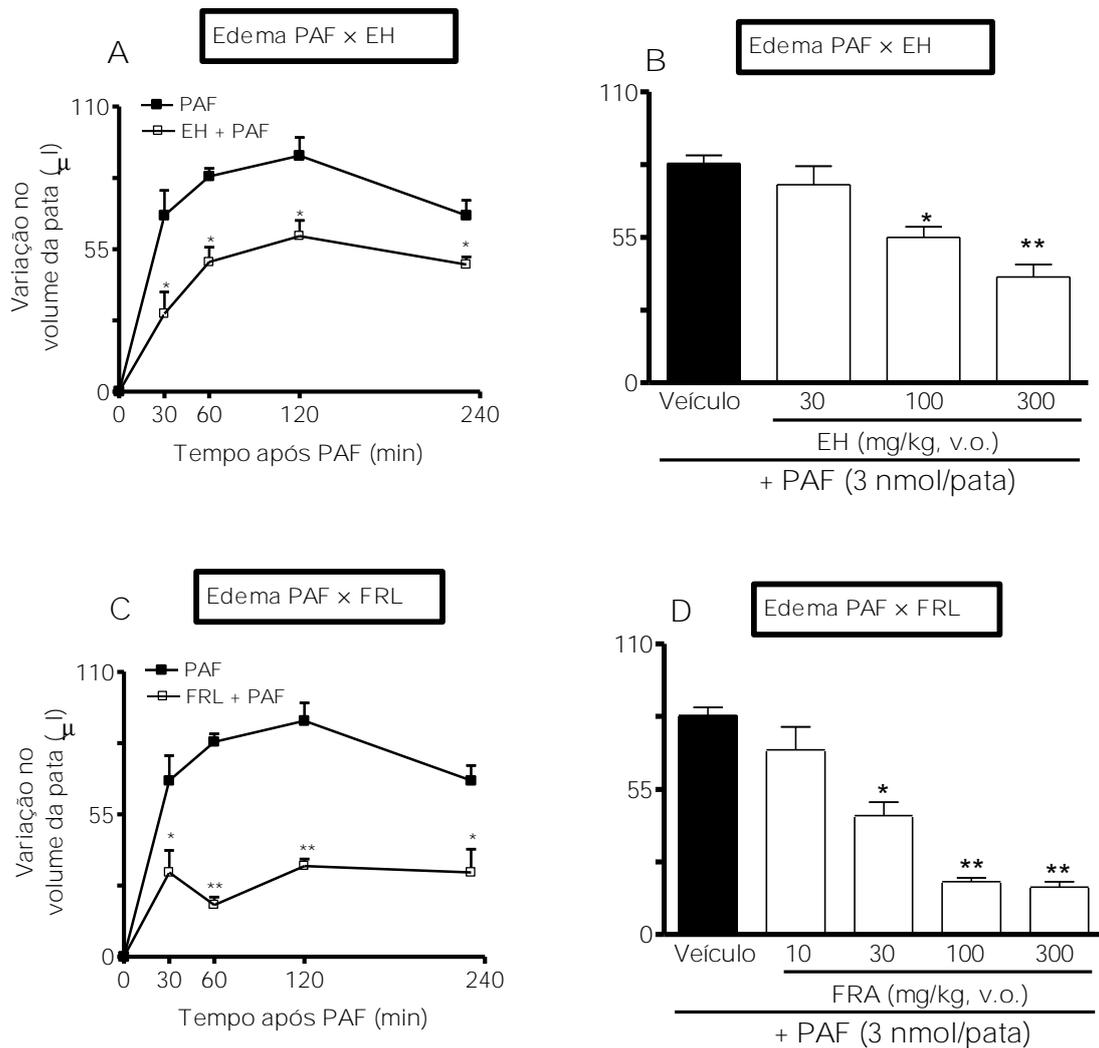


Figura 15. Efeito do tratamento por via oral com o extrato hexânico (EH) na dose de 100 mg/kg (A) ou em diferentes doses de EH (B) e o tratamento via oral com a fração rica em lignanas (FRL) na dose de 100 mg/kg (C) e de diferentes doses de FRL (D) após 60 min da injeção intraplantar de PAF em camundongos. O tratamento dos animais com EH ou FRL (ambos na dose de 10-300 mg/kg, v.o.) foi realizado 1 h antes da injeção de PAF e a avaliação do edema foi realizado 30, 60, 120 ou 240 min após a injeção de PAF. Cada ponto representa a média \pm E.P.M. de 5-7 animais. A análise estatística foi feita comparando todos os grupos experimentais utilizando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste Student-Newman Keuls. *Grupos que diferem estatisticamente do grupo PAF (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

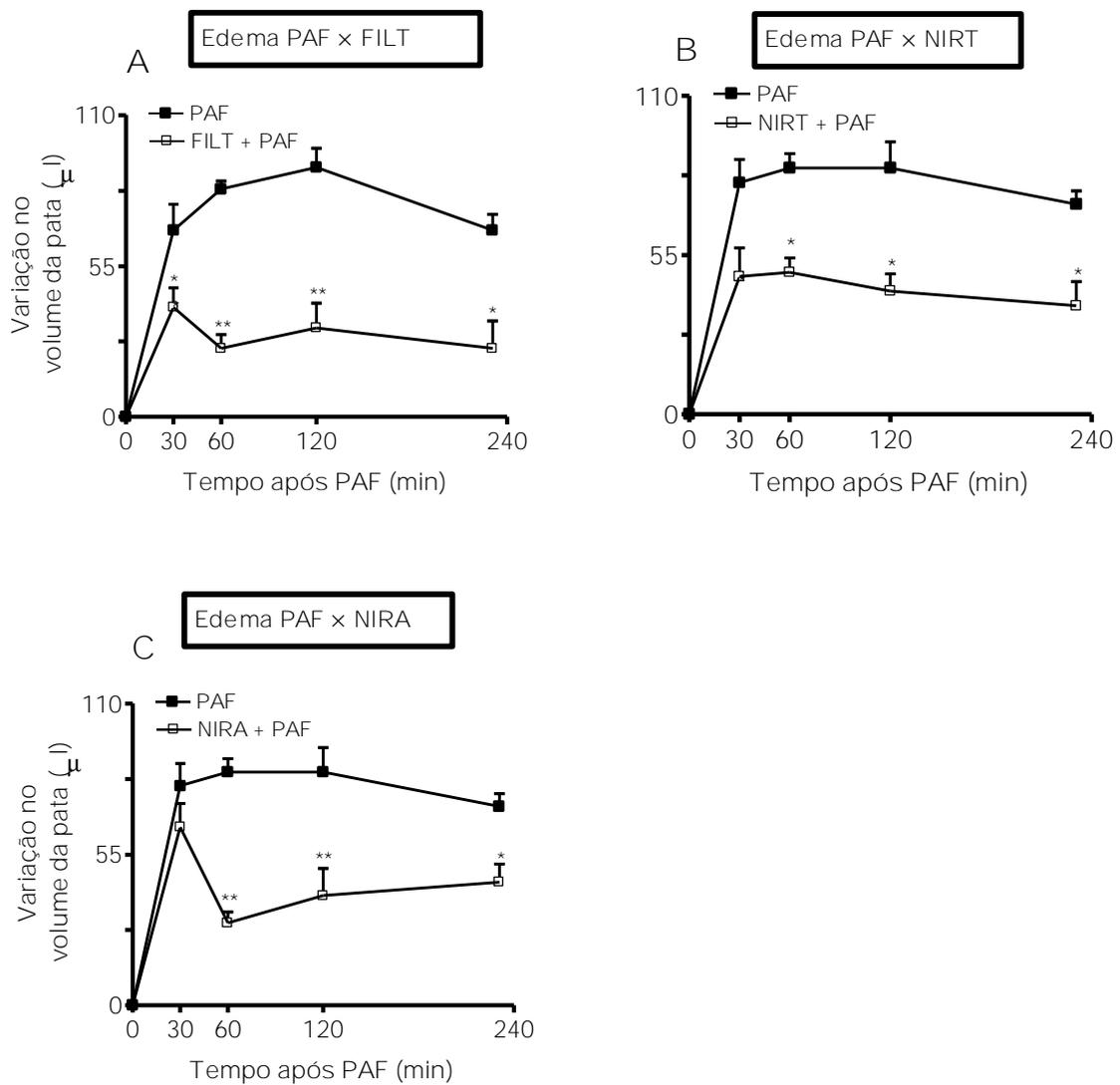


Figura 16. Efeito do tratamento por via oral na dose de 10 $\mu\text{mol/kg}$ com filtetralina (FILT) (A), nirtetralina (NIRT) (B) ou nirantina (NIRA) (C) sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de PAF em camundongos. O tratamento dos animais com FILT, NIRT ou NIRA (todos na dose de 10 $\mu\text{mol/kg}$, v.o.) foi realizado 1 h antes da injeção de PAF e a avaliação do edema foi realizado 30, 60, 120 ou 240 min após a injeção de PAF. Cada ponto representa a média \pm E.P.M. de 5-7 animais. A análise estatística foi realizada comparando todos os grupos experimentais utilizando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste Student-Newman Keuls. *Grupos que diferem estatisticamente do grupo PAF (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

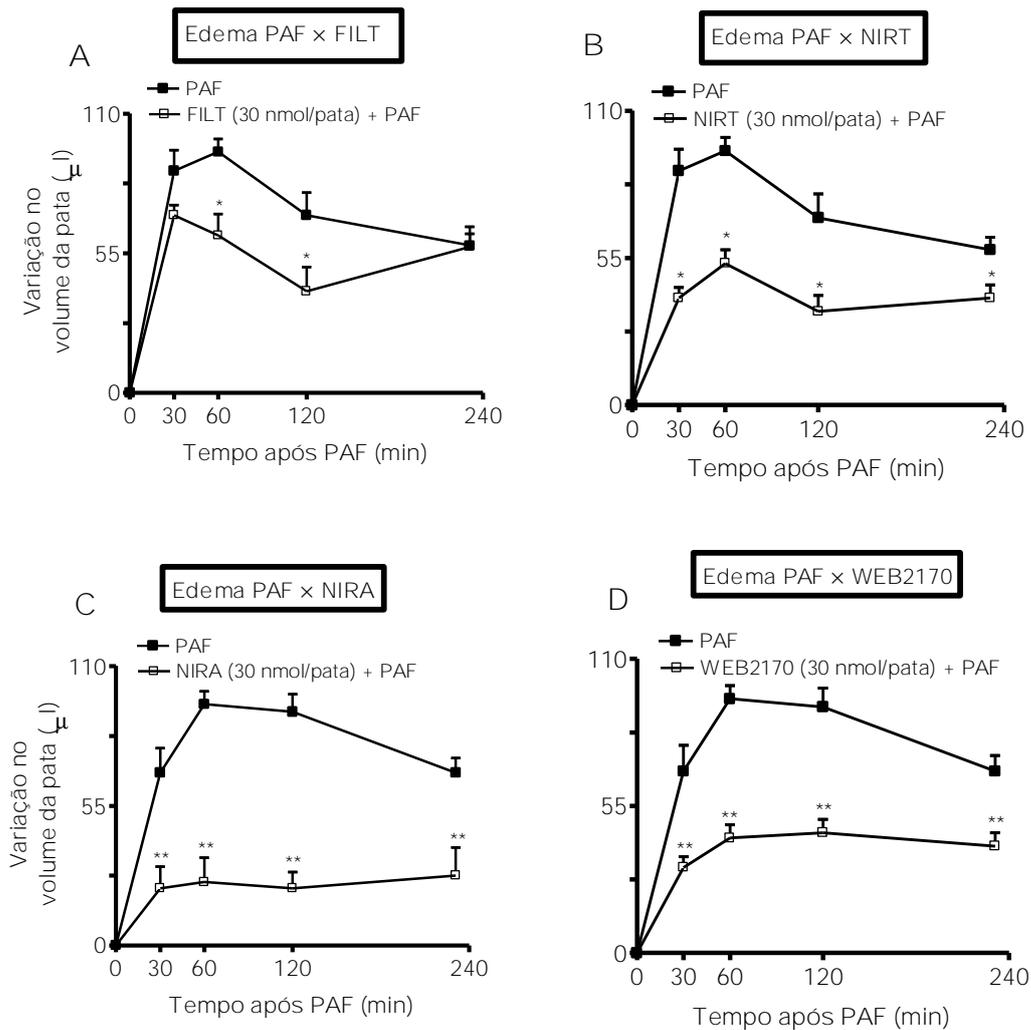


Figura 17. Efeito do tratamento por via intraplantar com a filtetralina (FILT, A), nirtetralina (NIRT, B), nirantina (NIRA, C) e com WEB2170 (C) no edema induzido pela injeção intraplantar de PAF em camundongos. O tratamento dos animais com FILT, NIRT, NIRA ou WEB2170 (todos na dose de 30 nmol/pata) foi realizado concomitantemente com a injeção intraplantar de PAF (3 nmol/pata) e a avaliação do edema foi realizada 30, 60, 120 ou 240 min após a injeção de PAF. Cada ponto representa a média \pm E.P.M. de 5-7 animais. A análise estatística foi realizada comparando todos os grupos experimentais utilizando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste Student-Newman Keuls. *Grupos que diferem estatisticamente do grupo PAF (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Tabela 2 – Efeito do tratamento local com a filtetralina, nirtetralina, nirantina isoladas do *P. amarus*, do WEB2170 ou do BQ-123 sobre o edema induzido pela injeção i.pl. de PAF avaliado 60 min após a injeção do PAF.

TRATAMENTO	DOSE/VIA DE ADMINISTRAÇÃO	INIBIÇÃO DO EDEMA (%)
Filtetralina	30,0 nmol/pata	34,0 ± 8,0*
Nirtetralina	30,0 nmol/pata	42,0 ± 3,0*
Nirantina	30,0 nmol/pata	78,0 ± 5,0**
WEB2170	30,0 nmol (pata)	60,0 ± 3,0**
BQ-123	1,0 nmol/pata	50,0 ± 9,0**

Cada grupo representa a média ± E.P.M. de 4 – 6 animais

*P<0,05, **P<0,01, diferem significativamente do controle (Cg) (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

4.4.2. Efeito do EH e das lignanas isolados do *P. amarus* no ensaio de união específica para o [³H]-PAF em córtex cerebral de camundongos

A Figura 18A demonstra que tanto o EH (30 µg/ml), quanto a FRL (30 µg/ml) ou a nirantina (0,1-30 µM) foram capazes de deslocar a ligação específica do [³H]-PAF em membranas de córtex cerebral de camundongos (Figura 18A). Entretanto, a filtetralina e a nirtetralina (30,0 µM) não foram capazes de alterar a ligação do [³H]-PAF (Figura 18B). O WEB2170 (0,1–10 µM), assim como a nirantina (1–30 µM) deslocaram a união específica do [³H]-PAF de modo dependente da concentração com inibição máxima para o WEB2170 (10 µM) de 97% e para a nirantina (30 µM) de 98% (Figura 18A). O valor médio da CI_{50s} para o WEB2170 foi de 0,3 (0,1-0,5) µM, enquanto que para a nirantina foi de 6,5 (4,3-8,7) µM (Figura 18B).

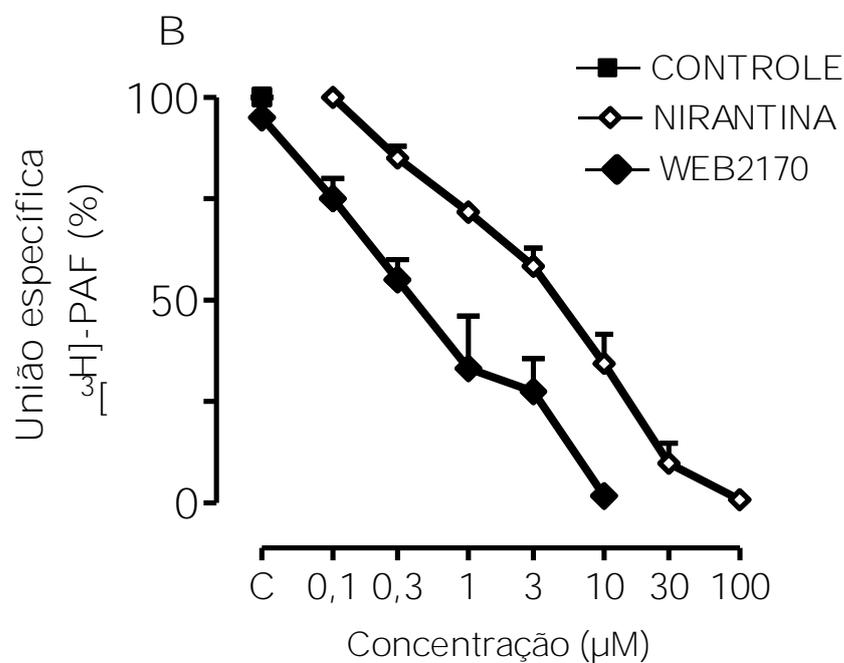
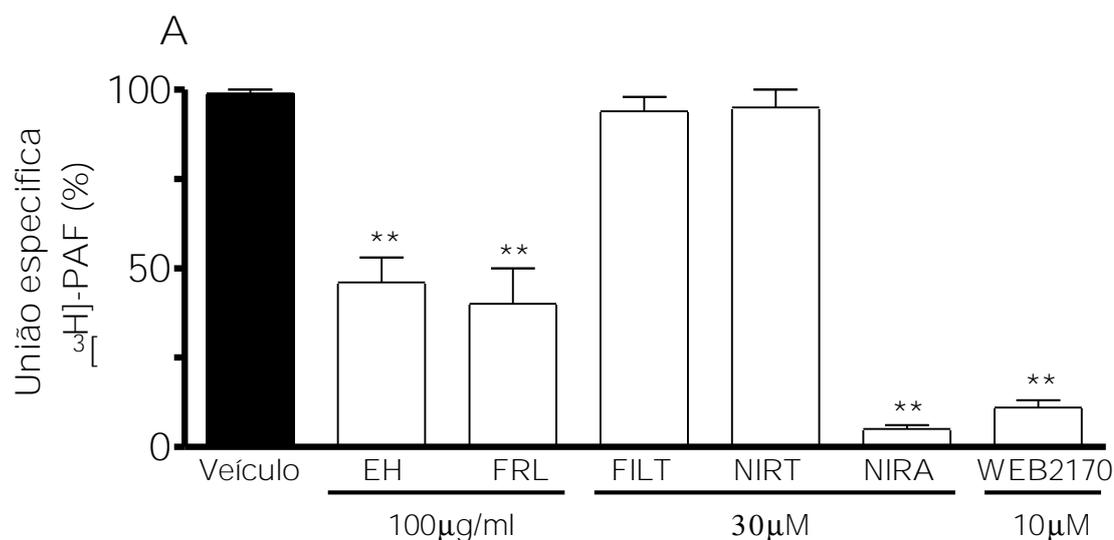


Figura 18. Efeito do extrato hexânico (EH), da fração rica em lignanas (FRL), da filtetralina (FILT), nirtetralina (NIRT), nirantina (NIRA) sobre o ensaio de união específica do ^3H -PAF em preparações de córtex cerebral de camundongos (A) e curva concentração-resposta de inibição para a nirantina ou do WEB2170 sobre ensaio de união específica do ^3H -PAF em preparações de córtex cerebral de camundongos (B). Cada ponto representa a média \pm E.P.M. de 3 experimentos. A análise estatística foi efetuada comparando todos os grupos experimentais utilizando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste Student-Newman Keuls. *Grupos que diferem estatisticamente do grupo controle (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

4.4.3. Efeito da nirantina sobre a pleurisia induzida pelo PAF

A administração intratorácica de PAF (1,9 nmol/cavidade) em camundongos aumentou o extravazamento plasmático na cavidade pleural 30 minutos após a injeção quando comparados aos animais injetados com veículo (Figura 19). A administração intraperitoneal de WEB2170 (1,7 μ mol ou 8 mg/kg) ou o tratamento oral com nirantina (100 μ mol ou 43 mg/kg) reduziu significativamente a exsudação induzida pelo PAF, com inibição de 20 ± 3 % para a nirantina e de 45 ± 5 % para o WEB2170 (Figura 19).

4.4.4. Efeito da nirantina sobre o aumento da atividade da MPO induzido pelo PAF

O PAF (3 nmol/pata) induz o aumento da atividade da MPO 2, 3 e 4 h após a injeção i.pl. deste mediador inflamatório, quando comparado aos animais controle (Figura 20A). Duas horas após a co-injeção do PAF, juntamente com o WEB2170 (30 nmol/pata) reduziu significativamente a atividade da MPO (36 ± 6 % de inibição). Da mesma maneira, o co-tratamento com a nirantina (30 nmol/pata) produziu uma inibição significativa na atividade da MPO (53 ± 12 %) (Figura 20A). Similarmente, o tratamento dos animais via i.pl. com o WEB2170 ou a nirantina foram capazes de inibir o aumento da atividade da MPO 3 horas após a injeção de PAF (Figura 20A).

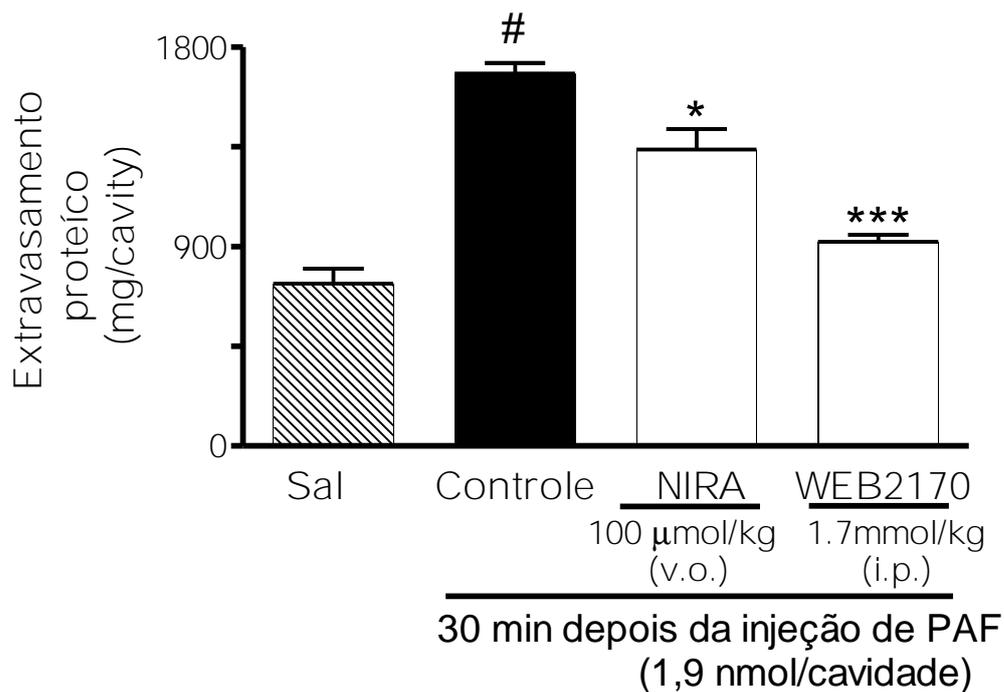


Figura 19. Efeito do tratamento oral com a nirantina (NIRA, 100 μ mol/kg) ou via intraperitoneal com o WEB2170 (1,7 μ mol/kg) sobre o extravasamento protéico induzido pela injeção intratorácica de PAF em camundongos. O tratamento dos animais com nirantina ou com WEB2170 foi realizado 1 hora antes da aplicação intratorácica de PAF (1,9 nmol/cavidade). Para a avaliação do extravasamento protéico os animais foram sacrificados após 30 minutos. Cada ponto representa a média \pm E.P.M. de 6 animais. A análise estatística foi realizada comparando todos os grupos experimentais utilizando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste Student-Newman Keuls. *Grupos que diferem estatisticamente do grupo PAF (* p <0,05, ** p <0,01).

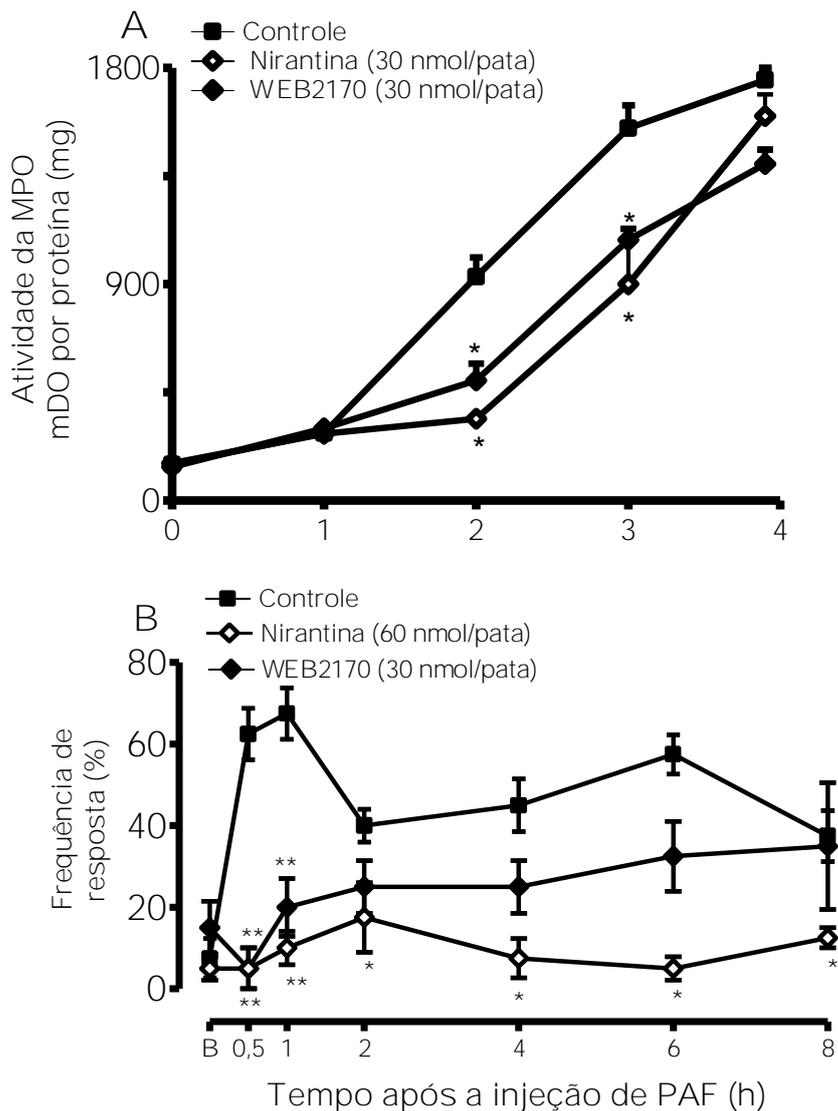


Figura 20. Efeito do tratamento intraplantar com nirantina (30 nmol/pata) ou com o WEB2170 (30 nmol/pata) sobre o aumento da atividade da MPO induzido pela injeção intraplantar de PAF em camundongos (A) e efeito do tratamento intraplantar com a nirantina (60 nmol/pata) ou com o WEB2170 (30 nmol/pata) sobre a alodínia mecânica induzida pela injeção intraplantar de PAF em ratos (B). Grupos distintos de animais foram co-tratados com injeção do PAF (3 nmol/pata) com a NIRA (30 nmol/pata), o WEB2170 (30 nmol/pata) ou o veículo. Após 1, 2, 3 e 4 horas da injeção do PAF, os diferentes grupos de animais foram sacrificados para a coleta de material para a dosagem da atividade da MPO. Para a avaliação da alodínia mecânica (B), o tratamento dos animais com NIRA ou com WEB2170 foi realizado concomitantemente com a injeção de PAF (10 nmol/pata) na pata dos ratos. Os animais apresentavam alodínia mecânica após 0,5, 1, 2, 4, 6 e 8 h após injeção intraplantar de PAF. Cada ponto representa a média \pm E.P.M. de 5-7 animais. A análise estatística foi executada comparando todos os grupos experimentais utilizando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste Student-Newman Keuls. *Grupos que diferem estatisticamente do grupo PAF (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). Após o tratamento com controle, o grupo tratado com veículo diferiu do grupo que recebeu PBS na pata.

4.4.5. Efeito da nirantina sobre a alodínia induzida pelo PAF

A injeção i.pl. de PAF (10 nmol) na pata de ratos produziu alodínia mecânica com duração maior que 8 h após a injeção, quando comparado com o grupo de animais que recebeu somente veículo i.pl. (Figura 20B). O tratamento local com o WEB2170 (30 nmol/pata) reduziu a alodínia induzida pela injeção intraplantar de PAF com inibição máxima de $91\pm 9\%$, 30 min após a injeção do lipídeo. Inibição similar foi verificada nos animais tratados por via oral com a nirantina (60,0 nmol/pata), com inibição máxima de $96\pm 4\%$ observada 30 min após da injeção de PAF. Ao contrário do WEB2170, a nirantina causou inibição da alodínia até 6 h após a sua administração (Figura 20B).

*4.5. Mecanismo de ação de outros mediadores sobre as respostas antiinflamatórias dos EH e FRL obtidos de *P. amarus**

4.5.1. Efeito no edema induzido por outros mediadores inflamatórios

O edema de pata induzido pela BK foi significativamente reduzido pelo tratamento com o EH (100 mg/kg, v.o.) com inibição significativa de $31\pm 7\%$, ou pela FRL (100 mg/kg, v.o.) com inibição de $50\pm 6\%$. Entretanto, o EH ou a FRL (100 mg/kg, v.o.) não foram capazes de reduzir significativamente o edema induzido pela histamina ou pela substância P (Tabela 3).

4.5.2. Efeito no ensaio de união específica para [³H]-BK em córtex cerebral de camundongos

A Figura 21 demonstra que tanto o EH quanto a FRL (300,0 µg/ml) não foram capazes de deslocar a ligação específica do [³H]-BK nas membranas de íleo de ratos.

Tabela 3 – Efeito do tratamento com EH ou FRL obtidas de *P. amarus*, sobre o edema induzido pela injeção intraplantar de bradicinina (BK), histamina ou substância P (SP)

TRATAMENTO	INIBIÇÃO MÁXIMA (%)		
	EDEMA INDUZIDO PELA BK	EDEMA INDUZIDO PELA HISTAMINA	EDEMA INDUZIDO PELA SP
EH (100 mg/kg, v.o.)	31 ± 7*	5 ± 2	23 ± 10
FRL (100 mg/kg, v.o.)	50 ± 6*	7 ± 1	20 ± 8

Cada grupo representa a média ± E.P.M. de 4 – 6 animais

*P<0,05, diferem significativamente do controle (BK, histamina ou SP) (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

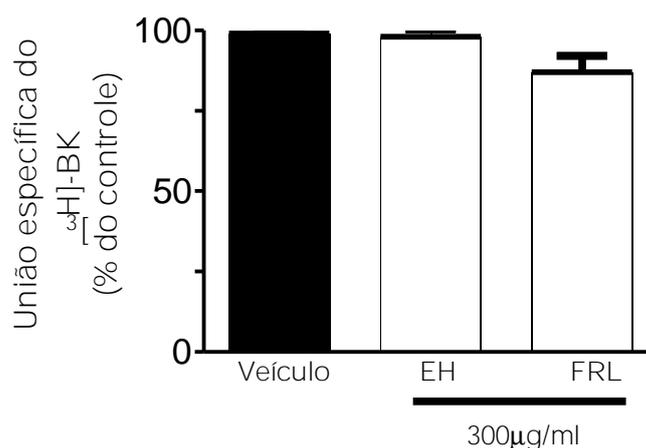


Figura 21. Efeito do extrato hexânico (EH) ou da fração rica em lignanas (FRL) obtidos do *P. amarus* sobre a união específica para [³H]-BK em preparações de íleo de rato. Cada ponto representa a média ± E.P.M. de 3 experimentos. A análise estatística foi feita comparando todos os grupos experimentais utilizando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste Student-Newman Keuls.

5. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que o tratamento prolongado por via oral com o EH do *P. amarus* reduziu de maneira significativa a alodínia mecânica persistente causada pela neuropatia ou pela administração intraplantar de CFA. Além disto, o EH e as frações F2 ou F3 foram efetivos em inibir significativamente a alodínia mecânica causada pela carragenina, a nocicepção espontânea induzida pela formalina (ambas fases) ou pela capsaicina em camundongos. Este estudo demonstrou também que o EH e a FRL foram eficientes em inibir o edema de longa duração induzido pelo CFA, bem como o edema agudo induzido pela Cg. Os resultados do presente estudo são relevantes uma vez que o *P. amarus* pertence a um gênero de plantas amplamente utilizadas na medicina popular tanto no Brasil, como em muitos outros países, embora relativamente poucos estudos científicos validem a maioria das indicações do uso popular desta planta. Assim, poucas substâncias com propriedades anti-nociceptivas e antiinflamatórias foram, até o presente, isoladas e identificadas nas plantas deste subgênero.

Atualmente, várias doenças ainda permanecem com sua etiologia desconhecida ou apresentam múltiplos fatores que contribuem para a permanência da doença no organismo. Algumas dessas doenças podem apresentar um caráter inflamatório e/ou doloroso persistente, sendo tratadas com a utilização de alguns medicamentos classicamente utilizados na inflamação e/ou dor como os AINES, corticosteróides, opióides, e derivados, na tentativa de melhorar a sintomatologia geral do paciente (GUPTA e DUBOIS, 2002). Assim, a descoberta de novas substâncias com atividade analgésica

e/ou antiinflamatória é ainda um aspecto altamente desejável e de enorme importância para a utilização clínica. Várias evidências demonstram que um grande número de medicamentos utilizados terapêuticamente é derivado direta ou indiretamente de produtos naturais, especialmente de plantas superiores, sendo uma fonte inesgotável de possibilidades para a descoberta de novos medicamentos (KOEHN e CARTER, 2005). Entretanto, várias dificuldades são encontradas por aqueles que desejam estudar as ações das plantas medicinais em sistema biológico, como por exemplo, a escolha de modelos experimentais, obtenção de extratos padronizados, dificuldade de obtenção e isolamento e identificação das substâncias ativas. Além disso, muitas doenças estão associadas a múltiplos fatores, dificultando a escolha de um alvo específico para o estudo (COOKSON, 2004).

Estudos anteriores realizados em nosso laboratório demonstraram que extratos obtidos das folhas do *Phyllanthus sp*, inclusive do *P. amarus*, apresentaram propriedades anti-nociceptivas em vários modelos experimentais (CALIXTO *et al.*, 1998; SANTOS *et al.*, 2000). Foi também descrito anteriormente que o extrato hidroalcoólico do *P. amarus* apresentava ação anti-nociceptiva em modelos de nocicepção induzida pela formalina, capsaicina ou por contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (SANTOS *et al.*, 2000). O presente estudo evidencia que, além de suas ações anti-nociceptivas em modelos experimentais de dor, o EH de *P. amarus* apresentou também ações antialodínicas em modelo de alodínia mecânica persistente causada por neuropatia ou pela administração intraplantar de CFA. Este estudo demonstrou que as frações F2 ou F3 parecem estar correlacionadas com as ações anti-nociceptivas do EH. Além do EH e da fração F3 inibirem significativamente os

modelos experimentais de dor, resultados deste trabalho demonstraram que o EH e a fração F3 foram efetivos em deslocar o ensaio da união de [³H]-RTX de sítios específicos de ligação provavelmente do receptor vanilóide (TRPV1) em membranas de medula espinhal de ratos. Apesar da existência de inúmeros alvos relevantes para o estudo do possível mecanismo anti-nociceptivo dos extratos do *Phyllanthus sp*, nossos estudos foram direcionados inicialmente para investigação do possível envolvimento na modulação do receptor TRPV1. Várias substâncias de origem natural são ligantes do TRPV1, como capsaicina (*Capsicum sp*), a RTX (*Euphorbia resinifera*), os capsaicinóides (capsiato, piperina, eugenol), produtos do gengibre (shogaol, gingerol, zingerona, paradol), ácidos graxos (ácido ricinoléico), canabinóides e dialdeídos insaturados (cinamodial, cinamosmolideo) (STERNER e SZALLASI, 1999; CALIXTO *et al.*, 2005). Ademais, o receptor TRPV1 está envolvido em processos dolorosos e tanto a capsaicina como a RTX podem causar pungência, inflamação neurogênica e diminuição da temperatura corporal em modelos animais (SZALLASI e BLUMBERG, 1989). Além do envolvimento do receptor TRPV1 na dor, este receptor desempenha um importante papel na inflamação ou estados inflamatórios, pois alguns mediadores inflamatórios podem modular este receptor como a bradicinina, PGs, ATP, NGF e glutamato. Por fim, a própria capsaicina é utilizada clinicamente para o tratamento de diversas doenças incluindo a hiper-reflexia ou hipersensibilidade da bexiga urinária, 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, 1999). Embora tenhamos testado alguns compostos isolados presentes na fração F3 do *P.*

amarus, como lignanas, o ácido linoléico e o ácido esteárico (resultados não mostrados), nenhum destes compostos parece ser responsável pela ação anti-nociceptiva do EH ou da fração F3. Estes compostos apresentaram pouca ou nenhuma ação *in vitro* ou *in vivo*, quando comparadas às ações do EH ou da fração F3 (resultados não mostrados). Assim, sugere-se que o EH e a fração F3 poderiam apresentar seus efeitos anti-nociceptivos provavelmente por conterem substâncias que modulem o funcionamento do receptor TRPV1 e estudos estão sendo realizados na tentativa de encontrar as substâncias responsáveis por estas ações.

Além disso, o EH apresentou pronunciado efeito antiinflamatório, inibindo não somente o edema, mas também a migração de neutrófilos avaliada indiretamente através da atividade da enzima MPO. Neste último aspecto, nossos resultados estão de acordo com os descritos na literatura, os quais demonstraram recentemente através de estudos *in vitro*, evidências de uma atividade antiinflamatória para o extrato de *P. amarus* (KIEMER *et al.*, 2003). Além disso, um efeito antiedematogênico foi descrito para o extrato de *P. amarus* quando analisado no modelo de edema causado pela injeção i.pl. de Cg em ratos (RAPHAEL e KUTTAN, 2003). A possível ação antiinflamatória dos constituintes químicos presentes nesta planta vem sendo demonstrada, porém o(s) princípio(s) ativo(s) responsável (is) pelas ações anti-nociceptivas e antiinflamatórias ainda não haviam sido estudados.

O fracionamento do EH do *P. amarus* originou algumas frações com diferentes perfis cromatográficos. Classes de metabólitos secundários com atividade antiinflamatória e/ou anti-nociceptiva poderiam estar presentes nestas frações. Dentre estas classes, as lignanas são especialmente importantes em

função das diversas atividades biológicas a elas atribuídas e também por inibirem parâmetros inflamatórios (LEE *et al.*, 2003; KÜPELI *et al.*, 2003; MACRAE e TOWERS, 1984, GOTTLIEB, 1991). Desta forma, algumas frações do EH, inclusive a FRL, foram testados em modelos experimentais de nocicepção e de inflamação, com o objetivo de identificar e de isolar o(s) princípio(s) ativo(s) responsável(is) por esses efeitos.

A administração por via oral e prolongada de 100 mg/kg da FRL obtida do *P. amarus* resultou em inibição significativa e duradoura do edema de pata, exibindo um perfil de resposta semelhante ao observado para o EH desta planta no modelo de inflamação persistente induzido pelo CFA. Desta forma, podemos sugerir que a ação antiinflamatória do EH observada neste modelo poderia estar relacionada, pelo menos em parte, à presença das lignanas, também contidas na FRL. De maneira interessante, a FRL não apresentou atividade inibitória em relação à alodínia mecânica induzida pelo CFA. Dessa forma, é possível sugerir que a atividade anti-nociceptiva presente no EH do *P. amarus* observada no modelo de indução da alodínia mecânica pela injeção i.pl. de Cg ou pelo CFA parece derivar da presença de outros constituintes químicos ainda não identificados presentes no extrato, como demonstrado para as frações F2 ou F3. Apesar da FRL inibir significativamente a segunda fase da formalina, esta ação parece derivar da propriedade antiinflamatória da FRL, uma vez que várias substâncias antiinflamatórias clássicas, como a indometacina, naproxeno, dexametasona, hidrocortisona, induzem inibição significativa da segunda fase da nocicepção induzida pela formalina (HUNSKAAR e HOLE, 1987). Assim, a propriedade anti-nociceptiva da FRL, no modelo de nocicepção induzido pela formalina, parece estar relacionada

diretamente ao fato desta fração inibir a inflamação, não parecendo estar envolvida em mecanismos que exercem efeitos diretos no nociceptor.

Corroborando os resultados sobre a inibição do edema prolongado induzido pela injeção i.pl. de CFA pelo EH, a administração da FRL pela via oral (60 min antes) também foi capaz de inibir significativamente o edema induzido pela injeção i.pl. de Cg. Assim, o fracionamento do EH do *P. amarus* originou frações que inibiram a nocicepção (F2 ou F3), bem como aquelas que inibiram o edema induzido pela Cg (F1 ou FRL). Portanto, devido à possibilidade de isolamento e a purificação de lignanas presentes na FRL e também pelo importante efeito inibitório obtido sob o edema induzido pela injeção i.pl. de CFA ou de Cg observado em nossos resultados, resolvemos explorar as ações antiinflamatórias da FRL, bem como das lignanas purificadas do *P. amarus*.

As lignanas obtidas da FRL do *P. amarus* foram: filtetralina, nirtetralina, nirantina, hipofilantina e filantina. Como citado anteriormente na Introdução, hipofilantina e filantina foram isoladas e identificadas por SOMANABANDHU *et al.* (1993), enquanto que a filtetralina, nirtetralina e nirantina haviam sido isoladas por ANJANEYU *et al.* (1973). Nossos estudos demonstram que a hipofilantina e filantina são as lignanas que se apresentaram maior concentração nesta planta, quando comparadas com os demais presentes no *P. amarus*. Entretanto, no presente estudo, nem a filantina e tampouco a hipofilantina apresentaram ações antiinflamatórias quando avaliadas sobre o edema induzido pela Cg e por isso não foram testadas nos demais modelos.

A Cg é uma mistura de polissacarídeos derivados de algas marinhas, sendo um dos irritantes não-específicos mais amplamente utilizados para a

indução e o estudo da inflamação e para o desenvolvimento de drogas com ação antiinflamatória. Existem várias evidências experimentais indicando que o amplo mecanismo de ação da Cg neste modelo envolve a ativação do sistema complemento, produção de IL-1 β (DRELON *et al.*, 1994), liberação de PAF (HWANG e LAM, 1986), liberação de histamina, serotonina, BK, prostanóides (DI ROSA e SORRENTINO, 1970), além da produção de NO, bem como da ativação e aumento da expressão de várias enzimas cujo os produtos são pró-inflamatórios, como por exemplo a COX-2 e a iNOS (POSADAS *et al.*, 2004). Por estas e outras ações, uma das características marcantes da Cg é a sua capacidade de aumentar o influxo de neutrófilos para o sítio inflamatório. O pré-tratamento dos animais com a aspirina ou com a DEX (compostos antiinflamatórios conhecidos e usados no presente estudo como controles positivos) foi capaz de inibir em maior ou menor grau as respostas inflamatórias induzidas pela Cg. Nossos resultados demonstraram que a administração oral de EH, FRL, bem como das lignanas purificadas de *P. amarus* (filtetralina, nirtetralina ou nirantina) causaram pronunciado efeito antiinflamatório na inflamação induzida pela injeção i.pl. de Cg. Assim, o presente trabalho mostra pela primeira vez que as lignanas filtetralina, nirtetralina e nirantina podem ser os princípios ativos mais relevantes ou responsáveis pela atividade antiinflamatória presente no *P. amarus*.

Na fase inicial do processo inflamatório, os neutrófilos são reconhecidamente um dos principais componentes celulares presentes no sítio inflamatório. Estas células podem migrar para o sítio inflamado e liberar enzimas proteolíticas, espécies reativas de oxigênio, proteínas catiônicas e outros mediadores pró-inflamatórios (LAWRENCE *et al.*, 2002). O aumento da

atividade da MPO é um importante indicativo da progressão do processo inflamatório (DE YOUNG *et al.*, 1989). De acordo com nossos resultados, conforme já descrito na literatura (PINHEIRO e CALIXTO, 2002), a DEX foi eficaz em inibir o influxo de neutrófilos para a pata inflamada. Da mesma forma, tanto os extratos, como as lignanas purificadas do *P. amarus* filtetralina, nirtetralina e nirantina inibiram significativamente a atividade da enzima MPO no modelo de edema induzido pela injeção i.pl. de Cg, confirmando assim suas ações antiinflamatórias.

Após um estímulo nocivo, vários tipos celulares presentes no tecido produzem e/ou liberam citocinas pró-inflamatórias. A citocina IL-1 β pode ser produzida por células dendríticas, melanócitos, fibroblastos ou leucócitos (GRONE *et al.*, 2002). Esta citocina é responsável pela indução de moléculas de adesão, liberação de outras citocinas e expressão da COX-2, entre outras proteínas pró-inflamatórias (MURPHY *et al.*, 2000). Conseqüentemente, a inibição do efeito da IL-1 β nas patas de camundongos poderia reduzir o edema e a migração de neutrófilos causada pela injeção i.pl. de Cg. Dados da literatura demonstram que compostos que interferem com a síntese, liberação e/ou com as ações da IL-1 β apresentam relevante efeito antiinflamatório (OLUYOMI *et al.*, 1995; GRAHAM *et al.*, 1997; PINHEIRO e CALIXTO, 2002). O presente estudo demonstra ainda, que o EH, FRL ou a lignana nirtetralina isolados do *P. amarus*, administrados por via oral, foram capazes de reduzir de maneira significativa os níveis locais de IL-1 β após injeção i.pl. de Cg. O tratamento com as lignanas purificadas também diminuiu a atividade da MPO na pata inflamada. Assim, a provável causa da queda dos níveis de IL-1 β observada na pata inflamada após o tratamento com produtos de *P. amarus*,

poderia estar associada com a inibição na migração de neutrófilos ou mesmo a produção de IL-1 β em macrófagos residentes, causada por estes tratamentos.

A busca pelo esclarecimento do mecanismo de ação antiinflamatória dos extratos do *P. amarus* levou KIEMER *et al.* (2003) à realização de experimentos em células de fígado de rato, em macrófagos RAW 264,7, e no plasma humano ou de camundongos. Este mesmo estudo revelou que as ações antiinflamatórias dos extratos de *P. amarus* em cultura de células pode ser, pelo menos em parte, conseqüência de uma ação inibitória dos princípios ativos presentes no *P. amarus* sobre a expressão das enzimas COX-2 e iNOS *in vitro*. Este efeito ocorre pela inibição do fator transcricional nuclear- κ B. Diferentemente, nossos dados mostram que os tratamentos por via oral de camundongos com extratos ou com as lignanas obtidas do *P. amarus* não foram capazes de prevenir de maneira significativa o aumento da expressão da enzima COX-2 induzida pela injeção i.pl. de Cg *in vivo*. Para a realização do ensaio do *Western blot* para a enzima COX-2, foram utilizadas doses de extratos e lignanas que foram capazes de inibir o edema induzido pela injeção i.pl. de Cg, a atividade MPO, bem como o aumento dos níveis de IL-1 β . Entretanto, não podemos desconsiderar que a administração oral de doses mais elevadas dos extratos ou lignanas de *P. amarus* talvez possam inibir a expressão da COX-2 *in vivo*.

Vários mediadores inflamatórios liberados pela Cg podem contribuir para a manutenção e a amplificação do processo inflamatório. A identificação de substâncias capazes de interagir com alvos moleculares responsáveis pela amplificação do processo inflamatório constitui um campo de pesquisa bastante interessante. Desta forma, este constitui o principal objetivo no estudo de

compostos naturais com possível atividade antiinflamatória. Nossos resultados demonstraram que o tratamento por via oral com o EH ou com a FRL na dose de 100 mg/kg inibiu significativamente o edema induzido pela injeção i.pl. de ET-1, PAF ou BK. Estes resultados sugerem a existência de substâncias que estariam interagindo direta ou indiretamente com os receptores e/ou ações do PAF, ET-1 ou BK, reduzindo assim suas ações inflamatórias.

A descoberta de substâncias que antagonizam o receptor e/ou ação para a ET-1 ou para o receptor para o PAF parece ser uma estratégia válida para tratar doenças de origem inflamatória (EVANGELOU, 1994). A utilização de antagonistas seletivos para a ET-1, por exemplo, é capaz de inibir a migração de neutrófilos e também inibir a produção de IL-1 β em modelo experimental de peritonite em camundongos (GETTING *et al.*, 2004) ou de colite em ratos (PADOL *et al.*, 2000). O primeiro antagonista de receptor para ET-1 aprovado pela “Food and Drug Administration” foi o bosentan (Tracleer™) para o tratamento da hipertensão arterial pulmonar (para revisão ver: NAEIJE *et al.*, 2005). Recentemente, o Xinlay™ (atrasentan), outro antagonista de receptor para a ET-1, da Abbott foi submetido à aprovação na “Food and Drug Administration” como nova promessa para o tratamento do câncer de próstata (para revisão ver: BERRY e EISENBERGER, 2005, HERMANN *et al.*, 2006). Em humanos, tanto a injeção intradérmica quanto endovenosa de ET-1 induz respostas dolorosas (FERREIRA *et al.*, 1989; DAHLOF *et al.*, 1990). A injeção i.pl. de ET-1 em camundongos induz uma resposta comportamental nociceptiva *per se* caracterizada pelo ato de lambem a pata (PIOVEZAN *et al.*, 2000; MENENDEZ *et al.*, 2003) associada à formação de edema (PIOVEZAN *et al.*, 2000), sendo estas respostas dependentes exclusivamente da ativação de

receptores do tipo ET_A (PIOVEZAN *et al.*, 2000). A administração oral (10 µmol/kg) ou local (0,1-1 nmol/pata) das lignanas filtetralina ou nirtetralina, mas não da nirantina, foi efetiva em inibir de maneira significativa o edema induzido pela injeção i.pl. de ET-1. É interessante comentar ainda que o estudo de HUSSAIN *et al.* (1995) demonstrou que a nirtetralina isolada do *P. niruri* apresentava seletividade para induzir o deslocamento da [¹²⁵I]-ET-1 de sítios específicos de ligação em membranas de células CHO que expressavam o receptor ET_A humano, mas não aquelas de células que expressavam ET_B. Apesar destas lignanas ligarem-se ao receptor para ET-1 (ET_A), não haviam, até aquele momento, estudos farmacológicos avaliando suas atividades biológicas *in vivo*, o que desestimulou a continuidade desses estudos. Contrariamente, o presente estudo demonstra que o antagonista de receptor ET_A, o BQ-123, e também a lignana nirtetralina, causaram pronunciada redução do edema e nocicepção induzido pela ET-1, bem como do edema de pata induzido pela Cg ou pelo PAF. Adicionalmente, o fato da nirtetralina deslocar o ensaio a [¹²⁵I]-ET-1 de sítios específicos de ligação evidencia um possível antagonismo sobre o receptor ET_A. Isto poderia explicar o efeito inibitório da nirtetralina sobre a inflamação induzida pela injeção i.pl de Cg, tendo em vista que a Cg induz liberação de ET-1 na pata posterior do rato (BERTELLI *et al.*, 1992). Entretanto, é pouco provável que a filtetralina exerça um antagonismo seletivo em receptores ET_A, uma vez que sua injeção i.pl. não causou inibição da nocicepção induzida pela injeção i.pl. de ET-1. Apesar de nossos resultados avançarem substancialmente a respeito do provável mecanismo pelos quais esses compostos exercem seus efeitos antiinflamatórios, o mecanismo preciso de ação da filtetralina permanece ainda inconclusivo. Porém, para a nirtetralina,

o antagonismo para receptor ET_A parece ser o mecanismo mais provável para suas ações antiinflamatórias.

Numerosas substâncias de origem natural e sintética administradas por via oral têm demonstrado ação anti-PAF em diferentes modelos experimentais. Muitas destas substâncias são lignanas oriundas de plantas como: kadsurenona, o primeiro antagonista competitivo descoberto para receptor de PAF, isolada da planta *Piper futokadsurae*; yangambina, lignana isolada da planta *Ocotea duckei* (JESUS-MORAIS *et al.*, 2000); magnone A and B, isoladas da planta *Magnolia fargesii* (JUNG *et al.*, 1998); dentre outras. Assim, o PAF tornou-se um importante alvo para nossos estudos, pois é um mediador lipídico que desempenha importante papel na regulação de vários estados inflamatórios. Foi demonstrado que o PAF contribui para o aparecimento de alodínia e hiperalgesia em roedores (BONNET *et al.*, 1981; DALLOB *et al.*, 1987; MORITA *et al.*, 2004). O fato de que o EH, a FRL e as lignanas isoladas de *P. amarus* (filtetralina, nirtetralina ou nirantina) inibiram o edema induzido pela injeção i.pl. de PAF não implica necessariamente em um mecanismo direto de interação via receptor de PAF. Foi demonstrado que o PAF pode induzir a liberação de outras substâncias envolvidas no processo inflamatório (JANCAR *et al.*, 1987). Antagonistas do receptor para o PAF, como o WEB2170, são capazes de inibir o edema induzido pelo PAF ou mesmo por outros agentes inflamatórios, como a Cg (HENRIQUES *et al.*, 1990). Assim, o EH, a FRL e as lignanas poderiam estar agindo diretamente no receptor do PAF, ou mesmo interferindo com a liberação e/ou ação de outros agentes inflamatórios liberados após a injeção i.pl. de PAF.

Algumas evidências adicionais obtidas no presente estudo parecem relacionar a ação dos compostos isolados do *P. amarus* diretamente ao receptor de PAF. Assim sendo, evidencia-se que o EH, a FRL e a lignana nirantina foram eficazes em causar deslocamento do [³H]-PAF de sítios específicos em membranas de córtex de camundongo. Estes resultados deixam claro que a nirantina se comporta como um antagonista do receptor de PAF, apresentando um perfil de inibição semelhante ao exercido pelo WEB2170 no edema induzido pela Cg e pelo PAF. Todavia, essa lignana foi cerca de 5 vezes mais potente que o WEB2170 em inibir as ações inflamatórias do PAF no edema de pata em camundongos e seu efeito foi muito mais prolongado. Por outro lado, ela foi cerca de 21 vezes menos potente em deslocar a união específica do [³H]-PAF em preparações de córtex cerebral de camundongos. Além disso, o WEB2170 e também a lignana nirantina quando administrados pela via i.pl. não inibiram o edema induzido pela ET-1, demonstrando certo grau seletividade *in vivo*. Para o teste de seletividade *in vitro* para o receptor de PAF, adotamos ensaios de união específica para receptores de glicocorticóide (resultados não mostrados). Para ambos, a concentração de 30 µM de nirantina, que desloca 85% da união específica de [³H]-PAF em membranas de córtex cerebral de camundongos, não foi capaz de alterar significativamente a ligação dos radioligantes em seus respectivos receptores para glicocorticóides (resultados não mostrados). Em relação à fildetralina ou à nirtetralina, o mecanismo de ação não parece envolver o bloqueio direto do receptor para PAF, uma vez que elas não alteraram o ensaio de união do [³H]-PAF em sítios específicos. No caso da nirtetralina, obteve-se inibição significativa do edema induzido pela injeção i.pl. de PAF, tanto quando

ela foi administrada via oral quanto pela via i.pl. Na Tabela 2 pode-se verificar que além do antagonista para o receptor do PAF, o antagonista para receptor de ET-1, o BQ-123, inibiu significativamente o edema induzido por PAF. Alguns trabalhos demonstram que o PAF pode causar a liberação de outros mediadores inflamatórios (JANCAR *et al.*, 1987). Assim, o fato da nirtetralina inibir as ações do PAF pode estar relacionado a um mecanismo indireto de ação e não diretamente sobre o receptor de PAF.

Ademais, alguns trabalhos evidenciam a possibilidade da existência de mais de um receptor para o PAF (HERBERT *et al.*, 1997). Esta hipótese, juntamente com a variabilidade entre espécies, poderia explicar porque alguns antagonistas para o receptor de PAF não conseguem ter o mesmo perfil de atividade de outros. Um exemplo foi reportado pelo trabalho de HENRIQUES *et al.* (1990), onde o WEB2086 não apresentou nenhum efeito em inibir as ações exsudativas bem como a migração celular, induzidas pelo PAF ou pela Cg na pleura de camundongos. Por outro lado, o WEB2170 inibiu efetivamente o extravasamento plasmático induzido pelo PAF após uma hora da injeção (HENRIQUES *et al.*, 1990). De maneira similar ao WEB2170, a nirantina administrada via oral foi capaz de antagonizar as ações de extravasamento plasmático induzido pelo PAF na pleura, mas não de inibir a migração leucocitária (Figura 17).

As cininas são outro grupo de mediadores implicados nas respostas nociceptivas e inflamatórias que avaliamos no presente trabalho. Estes peptídeos têm sido amplamente estudados durante os últimos anos, e a participação destes nos processos fisiopatológicos é cada vez mais evidenciada, especialmente na inflamação e na indução da nocicepção

(CALIXTO *et al.*, 2000, 2004). Tanto o EH como a FRL causaram inibição pronunciada do edema de pata induzido pela injeção i.pl. de BK. Entretanto, ambos o EH e a FRL (300 μ M) falharam em deslocar a união específica da [³H]-BK em membranas de íleo de rato (Figura 19). Estes resultados excluem a participação direta destes extratos e/ou compostos de interagirem com o receptor B₂ para a BK. A ação antiedematogênica destes extratos poderia derivar de ação indireta em outros receptores e/ou vias transducionais, uma vez que as ações inflamatórias da BK envolvem a liberação de outros mediadores inflamatórios.

Os resultados do presente estudo demonstram ainda que os extratos bem como as lignanas isoladas do *P. amarus* podem interferir com diversas vias e/ou receptores envolvidos no processo inflamatório e/ou nociceptivo. Entretanto, para cada lignana que deriva destes extratos parece haver interação com mecanismos de ação distinta no processo inflamatório.

A nirtetralina parece apresentar efeitos antiinflamatórios através da inibição do receptor de PAF uma vez que esta lignana apresenta perfil antiinflamatório semelhante ao WEB2170 (antagonista seletivo do receptor para o PAF) e ainda desloca a união específica de [³H]-PAF. Em relação à nirtetralina, o mecanismo de ação mais provável é o antagonismo do receptor ET-1, tendo em vista que ela foi efetiva deslocar a união específica para [¹²⁵I]-ET-1 (HUSSAIN *et al.*, 1995), além de ter apresentado perfil antiinflamatório semelhante ao antagonista BQ-123 (presente estudo). Para a firtetralina, o mecanismo exato de ação permanece indeterminado.

Em resumo, os resultados do presente estudo evidenciam que os extratos, frações e as lignanas, especialmente a nirtetralina, firtetralina e

nirantina isolados de *P. amarus* apresentam ações antiinflamatória tanto em modelos experimentais de inflamação aguda como crônica. Em relação ao efeito antiinflamatório, este pode ser atribuído, pelo menos em parte, à presença no EH das lignanas nirtetralina, filtetralina e nirantina envolvendo a inibição de mediadores inflamatórios como BK, ET-1 ou PAF. Além disso, nossos dados demonstram que a lignana nirtetralina administrada in vivo antagonizou de maneira expressiva as respostas inflamatórias e nociceptivas causadas pela ET-1. No entanto, no caso da nirtetralina o principal alvo de ação parece ser o receptor de PAF. Em relação à dor, o EH, a fração F2 e a F3 demonstraram efeitos anti-nociceptivos em modelos experimentais de dor. Entretanto, os resultados evidenciam que os compostos que apresentam ações anti-nociceptivas estão presentes nas F2 e F3 e o mecanismo de ação analgésica destes compostos poderia estar relacionado com a modulação do receptor TRPV1. Estes resultados sugerem que os extratos do *P. amarus* possuem composto(s) capaz(es) de se ligar em receptores TRPV1, sendo de grande importância para perspectiva do estudo dos compostos derivados de *P. amarus* na nocicepção.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adcock IM, Cosio B, Tsaprouni L, Barnes PJ, Ito K (2005). Redox regulation of histone deacetylases and glucocorticoid-mediated inhibition of the inflammatory response. *Antioxid Redox Signal* 7(1-2):144-52.
- Anjaneyulu ASR, Rao KJ, Row LR, Subrahmanyam C, (1973). Crystalline Constituents of Euphorbiaceae - XII. Isolation and Structural Elucidation of three New Lignans from Leaves of *Phyllanthus niruri* Linn. *Tetrahedron* 29(10):1291-1298.
- Asha VV, Akhila S, Wills PJ, Subramoniam A (2004). Further studies on the antihepatotoxic activity of *Phyllanthus maderaspatensis* Linn. *Ethnopharmacol* 92(1):67-70.
- Bacchi EM (1984). Farmacognosia de algumas espécies de *Phyllanthus* conhecidas como quebra-pedras. *An. Farm. Quím* 24(1,2):39-44.
- Barnes PJ, Adcock I (1993). Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci* 14(12):436-41.
- Barros ME, Schor N, Boim MA (2003). Effects of an aqueous extract from *Phyllanthus niruri* on calcium oxalate crystallization *in vitro*. *Urol Res* 30(6):374-9.
- Berry W, Eisenberger M (2005). Achieving Treatment Goals for Hormone-Refractory Prostate Cancer with Chemotherapy. *The Oncologist* 10(3):30–39.
- Bertelli A, Clerico A, Chicca A, Giovannini L, Gorio A, Romano MA (1992). Role of endothelin-1 in carrageenin-induced inflammation. *Int J Tissue React* 14(5):225-30.

- Besson JM (1999). The neurobiology of pain. *Lancet* 353:1610-1615.
- Bombardier C (2002). An evidence-based evaluation of the gastrointestinal safety of coxibs. *Am J Cardiol* 89(6A):3D-9D.
- Bonnet J, Loiseau AM, Orvoen M, Bessin P (1981). Platelet-activating factor acether (PAF-acether) involvement in acute inflammatory and pain processes. *Agents Actions* 11:559-62.
- Bortolanza LB, Ferreira J, Hess SC, Delle Monache, F, Yunes RA, Calixto JB (2002). Anti-allodynic action of the tormentic acid, a triterpene isolated from plant, against neuropathic and inflammatory persistent pain in mice. *Eur J Pharmacol* 25:203-208.
- Boyton RJ, Openshaw PJ (2002). Pulmonary defences to acute respiratory infection. *Br Med Bull* 61:1-12.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54.
- Broche F, Tellado JM (2001). Defense mechanisms of the peritoneal cavity. *Curr Opin Crit Care* 7(2):105-16.
- Calixto JB, Beirith A, Ferreira J, Santos ARS, Filho VC, Yunes RA (2000). Naturally occurring antinociceptive substances from plants. *Phytother Res* 14(6):401-18.
- Calixto JB, Kassuya CAL, André E, Ferreira J (2005). Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. *Pharmacol Ther* 106(2): 179-208.

- Calixto JB, Medeiros R, Fernandes ES, Ferreira J, Cabrini DA, Campos MM (2004). Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. *Br J Pharmacol* 143(7):803-18.
- Calixto JB, Santos AR, Cechinel Filho V, Yunes RA (1998). A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. *Med Res Rev* 18:225–258
- Campos AH, Schor N (1999). *Phyllanthus niruri* inhibits calcium oxalate endocytosis by renal tubular cells: its role in urolithiasis. *Nephron* 81(4):393-7.
- Carr DB, Goudas LC (1999). Acute pain. *Lancet* 353 (9169): 2051-8.
- Cechinel Filho V, Santos AR, De Campos RO, Miguel OG, Yunes RA, Ferrari F, Messana I, Calixto JB (1996). Chemical and pharmacological studies of *Phyllanthus caroliniensis* in mice. *J Pharm Pharmacol* 48(12):1231-6.
- Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh T (1994) Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 53:55-63.
- Cheng HY, Pitcher GM, Laviolette SR, Whishaw IQ, Tong KI, Kockeritz LK, Wada T, Joza NA, Crackower M, Goncalves J, Sarosi I, Woodget JR, Oliveira-dos-Santos AJ, Ikura M, van der Kooy D, Salter MW, Penninger JM (2002). DREAM is a critical transcriptional repressor for pain modulation. *Cell* 108(1):31-43.
- Cho M, Park J, Jang YP, Kim YC, Kim SG (2002). Potent inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase expression by dibenzylbutyrolactone lignans through inhibition of I-kappa B alpha phosphorylation and of p65 nuclear translocation in macrophages. *International immunopharmacology* 2(1):105-116.

- Cookson W (2004). The immunogenetics of asthma and eczema: a new focus on the epithelium. *Nat Rev Immunol* 4(12):978-88.
- Craig AD (2003). Interoception: the sense of the physiological condition of the body. *Curr Opin Neurobiol* 13:500-505.
- Da Silva MJ, De Sales MF (2004). O gênero *Phyllanthus* L. (Phyllanthaceae - Euphorbiaceae Juss.) no bioma Caatinga do estado de Pernambuco – Brasil. *Rodriguésia* 55 (84):101-126.
- Dahlof B, Gustafsson D, Gustafsson D, Hedner T, Jern S, Hansson L (1990). Regional haemodynamic effects of endothelin-1 in rat and man: unexpected adverse reaction. *J Hypertens* 8(9):811-7.
- Dahlof B, Gustafsson D, Hedner D, Jerns S, Hansson L (1990). Regional hemodynamic effects of endothelin-1 in rat and man: unexpected adverse reactions. *J Hypert* 8:811–17.
- Dallob A, Guindon Y, Goldenberg MM (1987). Pharmacological evidence for a role of lipoxigenase products in platelet-activating factor (PAF)-induced hyperalgesia. *Biochem Pharmacol* 36(19):3201-4.
- De Young LM, Kheifets JB, Ballaron SJ, Young JM (1989). Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions* 26:335-341.
- De-Melo JD, Tonussi CR, D'orléans-Juste P, Rae GA (1998). Articular nociception induced by endothelin-1, carrageenan and LPS in naive and previously inflamed knee-joints of the rat: inhibition by endothelin receptor antagonists. *Pain* 77:261–70.

- Di Rosa M, Sorrentino L (1970). Some pharmacodynamic properties of carrageenin in the rat. *Br J Pharmacol* 38(1):214-20.
- Dias MA, Campos AH, Cechinel Filho V, Yunes RA, Calixto JB (1995). Analysis of the mechanisms underlying the contractile response induced by the hydroalcoholic extract of *Phyllanthus urinaria* in the guinea-pig urinary bladder *in-vitro*. *J Pharm Pharmacol* 47(10):846-51.
- Dixon WJ (1991). Staircase bioassay: the up-and-down method. *Neurosci Biobehav Rev* 15(1):47-50.
- Dray A, Perkins MN (1997). Kinins and pain. In: Farmer SG (ed). *The Handbook of Immunopharmacology. The kinin system*. Londres: Academic Press, 157-172.
- Drelon E, Gillet P, Muller N, Terlain B, Netter P (1994). Anti-inflammatory properties of IL-1 in carrageenan-induced paw oedema. *Agents Actions* 41(1-2):50-2.
- Evangelou AM (1994). Platelet-activating factor (PAF): implications for coronary heart and vascular diseases. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 50(1):1-28.
- Farnsworth NR, Akerele O, Bingel AS, Soejarto DD, Guo Z (1985). Medicinal plants in therapy. *Bull World Health Organ* 63(6):965-81.
- Ferreira SH, Romitelli M, de Nucci G (1989). Endothelin-1 participation in overt and inflammatory pain. *J Cardiovasc Pharmacol* 13 (5):S220-2.
- Ferreira SH, Zanin T, Lorenzetti BB, de Souza MZ, Medeiros MC, Leme JG (1978). Increased vascular permeability, oedema and hyperalgesia caused by carrageenin in the rat's paw proceedings. *Agents Actions* 8(1-2):159.

- Filep JG, Fournier A, Foldes-Filep E (1995). Acute pro-inflammatory actions of endothelin-1 in the guinea-pig lung: involvement of ETA and ETB receptors. *Br J Pharmacol* 115(2):227-36.
- FitzGerald GA (2003). COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease. *Nat Rev Drug Discov* 2(11):879-90.
- Fitzgerald GA (2004). Coxibs and cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 351(17):1709-11.
- Flower RJ, Rothwell NJ (1994). Lipocortin-1: cellular mechanisms and clinical relevance. *Trends Pharmacol Sci* 15(3):71-6.
- Freitas AM, Schor N, Boim MA (2002). The effect of *Phyllanthus niruri* on urinary inhibitors of calcium oxalate crystallization and other factors associated with renal stone formation. *Bju International* 89(9):829-834.
- Furst S (1999). Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. *Brain Res Bull* 48(2):129-41.
- Getting, S. J., Di Filippo C, Lam CW, Rossi F, D'Amico, M (2004). Investigation into the potential anti-inflammatory effects of endothelin antagonists in a murine model of experimental monosodium urate peritonitis. *J Pharmacol Exp Ther* 310(1):90-7.
- Gilroy DW, Lawrence T, Peretti M, Rossi AG (2004). Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 3(5):401-16.
- Gorski F, Correa CR, Filho VC, Yunes RA, Calixto JB (1993). Potent antinociceptive activity of a hydroalcoholic extract of *Phyllanthus corcovadensis*. *J Pharm Pharmacol* 45(12):1046-9.
- Gottlieb OR (1991). The rational search for natural neolignans. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86(2):25-9.

- Graham MF, Willey A, Zhu YN, Yager DR, Sugerman HJ, Diegelmann RF (1997). Corticosteroids repress the interleukin 1 beta-induced secretion of collagenase in human intestinal smooth muscle cells. *Gastroenterology* 113(6):1924-9.
- Grone A, Fonfara S, Baumgartner W (2002). Cell type-dependent cytokine expression after canine distemper virus infection. *Viral Immunol* 15(3):493-505.
- Gupta RA, Dubois RN (2001). Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat Rev Cancer* 1(1):11-21.
- Hansson GK (2005). Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 352(16):1685-95.
- Henriques MG, Silva PM, Martins MA, Flores CA, Cunha FQ, Assreuy-Filho J, Cordeiro RS (1987). Mouse paw edema. A new model for inflammation? *Braz J Med Biol Res* 20(2):243-9.
- Henriques MG, Weg VB, Martins MA, Silva PM, Fernandes PD, Cordeiro RS, Vargaftig BB (1990). Differential inhibition by two hexazepine PAF antagonists of acute inflammation in the mouse. *Br J Pharmacol* 99:164-8.
- Herbert JM, Castro-Faria-Neto HC, Barbosa-Filho JM, Cordeiro RS, Tibirica E (1997). Pharmacological evidence for the putative existence of two different subtypes of PAF receptors on platelets and leukocytes; studies with yangambin. *J Lipid Mediat Cell Signal* 17(1):1-14.
- Herrmann E, Bogemann M, Bierer S, Eltze E, Hertle L, Wulfig C (2006). The endothelin axis in urologic tumors: mechanisms of tumor biology and therapeutic implications. *Expert Rev Anticancer Ther* 6(1):73-81.

- Hunnskaar S, Fasmer OB, Hole K (1985). Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesia. *J Neurosci Meth* 14:69-76.
- Hunnskaar S, Hole K (1987). The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 30:103-114.
- Hunt SP, Mantyh PW (2001). The molecular dynamics of pain control. *Nat Rev Neurosci* 2:83-91.
- Hussain R, Dickey J, Rosser MP, Matson JA, Kozlowski MR, Brittain RJ, Webb ML, Rose PM, Fernandes P (1995). A novel class of non-peptidic endothelin antagonists isolated from the medicinal herb *Phyllanthus niruri*. *Journal of natural products* 58(10):1515-1520.
- Hwang BY, Lee JH, Jung HS, Kim KS, Nam JB, Hong YS, Paik SG, Lee JJ (2003). Sauchinone, a lignan from *Saururus chinensis*, suppresses iNOS expression through the inhibition of transactivation activity of RelA of NF-kappaB. *Planta Med* 69(12):1096-101.
- Hwang SB, Lam MH (1986). Species difference in the specific receptors of platelet activating factor. *Biochem Pharmacol* 35(24):4511-8.
- Iadarola JM, Caudle RM (1997). Good pain, bad pain. *Science* 278:239-40.
- Ishii S, Shimizu T (2000). Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. *Prog Lipid Res* 39:41-82.
- Jancar S, Braquet P, Sirois P (1987). Interactions of arachidonic acid metabolites and platelet activating factor and mechanism of action in hypersensitivity reactions. *Braz J Med Biol Res* 20:487-94.
- Jesus-Morais CM, Assis EF, Cordeiro RS, Barbosa-filho JM, Lima WT, Silva ZL, Bozza PT, Castro-Faria-Neto HC (2000). Yangambin, a lignan obtained from

- Ocotea duckei, differentiates putative PAF receptor subtypes in the gastrointestinal tract of rats. *Planta Med* 66(3):211-6.
- Jung KY, Kim DS, Oh SR, Park SH, Lee IS, Lee JJ, Shin DH, Lee HK (1998). Magnone A and B, novel anti-PAF tetrahydrofuran lignans from the flower buds of *Magnolia fargesii*. *J Nat Prod* 61:808-11.
- Kalisch PA (1975). An overview of research on the history of leprosy. Part 1. From Celsus to Simpson, Circa. 1 A.D. Part 2. From Virchow to Moller-Christense, 1845-1973. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 43(2):129-44.
- Kato MJ (2001). Global phytochemistry: the Brazilian approach. *Phytochemistry* 57(5):621-3.
- Kiemer AK, Hartung T, Huber C, Vollmar AM (2003). *Phyllanthus amarus* has anti-inflammatory potential by inhibition of iNOS, COX-2, and cytokines via the NF-kappaB pathway. *J Hepatol* 38:289–297.
- Klemmp P, Warner TD, Hohlfeld T, Corder R, Vane JR (1995). Endothelin-1 mediates *ex vivo* coronary vasoconstriction caused by exogenous cytokine.. *Proc Natl Acad Sci* 92:2691–5.
- Koehn, F. E. and G. T. Carter (2005). The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 4(3):206-20.
- Küpeli E, Erdemoglu N, Yesilada E, Sener B (2003). Anti-inflammatory and antinociceptive activity of taxoids and lignans from the heartwood of *Taxus baccata* L. *J Ethnopharmacol* 89(2-3):265-70.
- Lanetti R, Freure RB, Costa, J (1980). Contribuição ao estudo farmacognóstico dos quebra-pedras. *Bol Rodolpho albino* 1(2):38-47.

- Lawrence T, Willoughby DA, Gilroy DW (2002). Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 2(10):787-95.
- Leal RB, Cordova FM, Herd L, Bobrovskaya L, Dunkley PR (2002). Lead-stimulated p38MAPK-dependent Hsp27 phosphorylation. *Toxicol Appl Pharmacol* 178(1):44-51.
- Lee AK, Sung SH, Kim YC, Kim SG (2003). Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF-alpha and COX-2 expression by sauchinone effects on I-kappaBalpha phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. *Br J Pharmacol* 139(1):11-20.
- Levine JD, Taiwo Y (1994). Inflammatory Pain. In: Wall PD, Melzack R - *Textbook of Pain*, 3 rd Ed, Edinburgh, Churchill Livingstone, 45-56.
- Levy C, Seeff LD, Lindor KD (2004). Use of herbal supplements for chronic liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2(11):947-56.
- MacRae WD, Towers GHN (1984). Biological activities of lignans. *Phytochemistry* 23:1207-1220.
- Malmberg AB, Basbaum AI (1998). Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. *Pain* 76: 215-222.
- Manning DC, Vavrek R, Stewart JM, Snyder SH (1986). Two bradykinin binding sites with picomolar affinities. *J Pharmacol Exp Ther* 237(2):504-12.
- Marcheselli VL, Rossowska MJ, Domingo MT, Braquet P, Bazan NG (1990). Distinct platelet-activating factor binding sites in synaptic endings and in intracellular membranes of rat cerebral cortex. *J Biol Chem* 265:9140-5.

- Menendez L, Lastra A, Hidalgo A, Baamonde A (2003). Nociceptive reaction and thermal hyperalgesia induced by local ET-1 in mice: a behavioral and Fos study. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 367(1): 28-34.
- Merlos M, Gomez LA, Vericat L, Garcia-Rafanell J, Forn J (1990). Comparative study of the effect of CV-6209, a specific PAF-antagonist, on rat paw edema caused by different phlogogen agents. *Pharmacology* 40(4):211-7.
- Millan MJ (1999). The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 57: 1-164.
- Morita K, Morioka N, Abdin J, Kitayama S, Nakata Y, Dohi T (2004). Development of tactile allodynia and thermal hyperalgesia by intrathecally administered platelet-activating factor in mice. *Pain* 111:351-9.
- Munro JM (1993). Endothelial-leukocyte adhesive interactions in inflammatory diseases. *Eur Heart J* 14(K):72-7.
- Murphy JE, Robert C, Kupper TS (2000). Interleukin-1 and cutaneous inflammation: a crucial link between innate and acquired immunity. *J Invest Dermatol* 114(3): 602-8.
- Naeije R (2005). Pulmonary Hypertension and Right Heart Failure in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proc Am Thorac Soc* 2:20–22.
- Notka F, Meier GR, Wagner F (2003). Inhibition of wild-type human immunodeficiency virus and reverse transcriptase inhibitor-resistant variants by *Phyllanthus amarus*. *Antiviral Res* 58(2):175-86.
- Oluyomi AO, Nguyen H, Towbin H, Dawson J, Vosbeck K (1995). Differential effects of prednisolone and indomethacin on zymosan-induced inflammation in a modified murine tissue-chamber model. *Inflamm Res* 44(8):350-6.

- Padol I, Huang JQ, Hogaboam CM, Hunt RH (2000). Therapeutic effects of the endothelin receptor antagonist Ro 48-5695 in the TNBS/DNBS rat model of colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 12(3):257-65.
- Park KA, Vasko MR (2005). Lipid mediators of sensitivity in sensory neurons. *Trends Pharmacol Sci* 26(11):571-7.
- Paulino N (1996). Análise farmacológica do extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus urinaria* e de seus constituintes sobre a traquéia isolada de cobaia. Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do título de Mestre.
- Paulino N, Cechinel Filho V, Pizzolatti MG, Yunes RA, Calixto JB (1996). Mechanisms involved in the contractile responses induced by the hydroalcoholic extract of *Phyllanthus urinaria* on the guinea pig isolated trachea: evidence for participation of tachykinins and influx of extracellular Ca²⁺ sensitive to ruthenium red. *Gen Pharmacol* 27(5):795-802.
- Pinheiro RM, Calixto JB (2002). Effect of the selective COX-2 inhibitors, celecoxib and rofecoxib in rat acute models of inflammation. *Inflamm Res* 51(12):603-10.
- Piovezan AP, D'Orleans-Juste P, Souza GE, Rae GA (2000). Endothelin-1-induced ET(A) receptor-mediated nociception, hyperalgesia and oedema in the mouse hind-paw: modulation by simultaneous ET(B) receptor activation. *Br J Pharmacol* 129(5):961-8.
- Posadas I, Bucci M, Roviezzo F, Rossi A, Parente L, Sautebin L, Cirino G (2004). Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *Br J Pharmacol* 142(2):331-8.

- Rae GA, Henriques MGMO (1998). Endothelins in inflammation. (In: Said, S, ed) Pro-inflammatory and Anti-inflammatory Peptides Marcel and Dekker Inc.: New York (pp) 163–202.
- Raffa RB, Jacoby HI (1991). Endothelin-1, -2 and -3 directly and big-endothelin-1 indirectly elicit an abdominal constriction response in mice. Life Sci 48: PL85–PL90.
- Rajeshkumar NV, Joy KL, Kuttan G, Ramsewak RS, Fair MG, Kuttan R (2002). Antitumour and anticarcinogenic activity of *Phyllanthus amarus* extract. J Ethnopharmacol 81(1):17-22.
- Rang HP, Bevan S, Dray A (1994). Nociceptive peripheral neurons: cellular properties, In: Wall PD, Melzack R. Textbook of Pain, 3rd Ed, Edinburgh, Churchill Livingstone, 57-78.
- Raphael KR, Kuttan R (2003). Inhibition of experimental gastric lesion and inflammation by *Phyllanthus amarus* extract. J Ethnopharmacol 87:193–197.
- Rates SMK (2001). Plants as sources of drugs. Toxicol, Oxford 39:603-13.
- Row LR, Srinivasulu C, Smith M, Subba Rao GSR (1964). New lignans from *Phyllanthus niruri*. Tetrahedron letters 23-24:1557-67.
- Russo CM, Brose WG (1998). Chronic pain. Annu Rev Med 49:123-133.
- Safayhi H, Sailer ER (1997). Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes. Planta Med 63(6):487-93.
- Sakurada T, Katsumata, K, Tan-No K, Sakurada S, Kisara K (1992). The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. Neuropharmacology 31:1279-1285.

- Sampson AP (2000). The role of eosinophils and neutrophils in inflammation. *Clin Exp Allergy* 30(1):22-7.
- Santos AR, De Campos RO, Miguel OG, Filho VC, Siani AC, Yunes RA, Calixto JB (2000). Antinociceptive properties of extracts of new species of plants of the genus *Phyllanthus* (Euphorbiaceae). *J Ethnopharmacol* 72:229-38.
- Santos AR, Filho VC, Yunes RA, Calixto JB (1995a). Analysis of the mechanisms underlying the antinociceptive effect of the extracts of plants from the genus *Phyllanthus*. *Gen Pharmacol* 26(7):1499-506.
- Santos AR, Niero R, Filho VC, Yunes RA, Pizzolatti MG, Delle Monache F, Calixto JB (1995b). Antinociceptive properties of steroids isolated from *Phyllanthus corcovadensis* in mice. *Planta Med* 61(4):329-32.
- Santos DR (1990). Chá de quebra-pedra (*Phyllanthus niruri*) na litíase urinária em humanos e ratos. Tese apresentada ao curso de à Escola Paulista de Medicina para obtenção do título de Doutor. São Paulo.
- Satyanarayan P, Subrahmayan P, Viswanathan KN, Ward RS (1988). New seco and hydroxy-lignans from *Phyllanthus niruri*. *J Nat Prod* 51:44-9.
- Schiffrin EL (2005). Vascular endothelin in hypertension. *Vascul Pharmacol* 43(1):19-29.
- Seltzer Z, Dubner R, Shir Y (1990). A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 43:205-18.
- Shead A, Vickery K, Pajkos A, Medhurst R, Freiman J, Dixon R, Cossart Y (1992). Effects of *Phyllanthus* plant extracts on duck hepatitis B virus *in vitro* and *in vivo*. *Antiviral Res* 18:127-38.

- Sibille Y, Reynolds HY (1990). Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am Rev Respir Dis* 141(2):471-501.
- Siebeck M, Schorr M, Spannagl E, Lehner M, Fritz H, Cheronis JC, Whalley ET (1998). B1 kinin receptor activity in pigs is associated with pre-existing infection. *Immunopharmacology* 40(1):49-55.
- Simões CMO (2003). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre-RS, Editora da UFSC e UFRGS. 3^a. ed.
- Singh B, Agrawal PK, Thakur RS (1989). A New Lignan and a new neolignan from *Phyllanthus niruri*. *J Nat Prod* 52:48-51.
- Somanabandhu A, Nitayangkura S, Mahidol C, Ruchirawat S, Likhitwitayawuid K, Shieh HL, Chai H, Pezzuto JM, Cordell GA (1993). ¹H- and ¹³C-nmr assignments of phyllanthin and hypophyllanthin: lignans that enhance cytotoxic responses with cultured multidrug-resistant cells. *J Nat Prod* 56(2): 233-9.
- Spector WG (1956). The mediation of altered capillary permeability in acute inflammation. *J Pathol Bact* 72:367-80.
- Springer TA (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76(2):301-14
- Sterner O, Szallasi A (1999). Novel natural vanilloid receptor agonists: new therapeutic targets for drugs development. *Trends Pharmacol Sci* 20:459-65.
- Syamasundar KV, Singh B, Thakur RS, Husain A, Kiso Y, Hikino H (1985). Series on liver-protective drugs. Antihepatotoxic principles of *Phyllanthus niruri* herbs. *J Ethnopharmacology* 14 (1):41-4.

- Szallasi A, Biró T, Modarres S, Garlaschelli L, Peterson M, Klusch A, Vidari G, Jonassohn M, De Rosa S, Sterner O, Blumberg MP, Krause EJ (1998). Dialdehyde sesquiterpenes and other terpenoids as vanilloids. *Eur J Pharmacol* 356:81-89.
- Szallasi A, Blumberg PM (1999). Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacological Rev* 51:159-212.
- Szallasi A, Blumberg PM (1989). Resiniferatoxin, a phorbol-related diterpene, acts as an ultrapotent analog of capsaicin, the irritant constituent in red pepper. *Neuroscience* 30:515-20.
- Torres DSC, Cordeiro I, Giulietti AM (2003). O gênero *Phyllanthus* L. (Euphorbiaceae) na chapada diamantina, Bahia, Brasil. *Acta bot bras* 17(2):265-78.
- Trowbridge HO, Emling RC (1996). Mediadores químicos da resposta vascular. In: *Inflamação uma revisão do processo*. Quitesence Publishing Co. Inc., São Paulo, 27-42, 172.
- Unander DW, Webster GL, Blumberg BS (1990). Records of usage or assays in *Phyllanthus* (Euphorbiaceae). I. Subgenera *Isocladus*, *Kirganelia*, *Cicca* and *Emblica*. *J Ethnopharmacol* 30:233-264.
- Unander DW, Webster GL, Blumberg BS (1992). Usage and bioassays in *Phyllanthus* (Euphorbiaceae): a compilation. III. The subgenera *Eriococcus*, *Conami*, *Gomphidium*, *Botryanthus*, *Xylophylla* and *Phyllanthodendron*, and a complete list of the species cited in the three-part series. *J Ethnopharmacol* 36(2):103-12.

- Unander DW, Webster GL, Blumberg BS (1995). Usage and bioassays in *Phyllanthus* (Euphorbiaceae). IV. Clustering of antiviral uses and other effects. *J Ethnopharmacol* 45:1–18.
- Vane JR (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* 231:232-5.
- Vane JR, Botting RM (1998). Mechanism of action of antiinflammatory drugs. *Int J Tissue React* 20:3-15.
- Wahl SM, Feldman GM, McCarthy JB (1996). Regulation of leukocyte adhesion and signaling in inflammation and disease. *J Leukoc Biol* 59(6):789-96.
- Watkins LR, Maier SF (2002). Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states. *Physiol Rev* 82:981-1011.
- Weber C (2003). Novel mechanistic concepts for the control of leukocyte transmigration: specialization of integrins, chemokines, and junctional molecules. *J Mol Med* 81(1):4-19.
- Williams TJ (1983). Interactions between prostaglandins, leukotrienes and other mediators of inflammation. *Br Med Bull* 39(3):239-42.
- Wood JN, Docherty R (1997). Chemical activators of sensory neurons. *Ann. Rev. Physiol* 59:57-82.

7. ANEXOS

- Kassuya CAL, Silvestre AA, Rehder VL, Calixto JB. Anti-allodynic and anti-oedematogenic properties of the extract and lignans from *Phyllanthus amarus* in models of persistent inflammatory and neuropathic pain. *Eur J Pharmacol.* 2003, 478:145-153.
- Kassuya CAL, Leite, DFP, de Melo, LV, Rehder VL, Calixto JB. Anti-inflammatory properties of extract, fraction and lignans isolated from *Phyllanthus amarus*. *Planta Medica*, 2005, 71 (8): 721-6.
- Kassuya CAL, Silvestre A, Menezes-de-Lima Jr. O, Marotta DM, Rehder VLG, Calixto JB. Antiinflammatory and antiallodynic actions of the lignan niranthin isolated from *Phyllanthus amarus*. Evidence for interaction with platelet activating factor. Manuscrito submetido à publicação.