

GRAZIELLA RIGUEIRA MOLSKA

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DO EXTRATO DE *Phyllanthus*
amarus Schumach. & Thonn. E DO TRANS-CARIOFILENO NA
HIPERNOCICEPÇÃO NO MODELO DE ENCEFALOMIELITE
AUTOIMUNE EXPERIMENTAL**

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo – Escola Paulista de Medicina
para obtenção do título de Doutor em
Ciências.

SÃO PAULO

2013

GRAZIELLA RIGUEIRA MOLSKA

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DO EXTRATO DE *Phyllanthus*
amarus Schumach. & Thonn. E DO TRANS-CARIOFILENO NA
HIPERNOCICEPÇÃO NO MODELO DE ENCEFALOMIELITE
AUTOIMUNE EXPERIMENTAL**

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo – Escola Paulista de Medicina
para obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Orientador: Elisaldo Luiz de Araújo Carlini

Co-orientador: Alexandre Salgado Basso

SÃO PAULO

2013

Molska, Graziella Rigueira

Efeito da administração oral do extrato de *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn. e do trans-cariofileno na hipernocicepção no modelo de encefalomielite autoimune experimental – São Paulo, 2013.

xxi - 99p.

Tese de doutorado – Universidade Federal de São Paulo / Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia.

Titulo em inglês: Effect of oral administration of *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn. extract and trans-caryophyllene in hypernociception in the experimental autoimmune encephalomyelitis model

1. *Phyllanthus amarus*. 2. Trans-cariofileno. 3. Hipernocicepção. 4. Dor. 5. Encefalomielite autoimune experimental

Esta tese foi realizada no Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, com o apoio financeiro da Associação Fundo de Incentivo à Pesquisa (AFIP), do Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas (CEBRID) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP n° 09/51882-8).

DEDICO este trabalho à minha maravilhosa mãe Valéria Molska e ao meu querido pai de coração Vitor Marques, que sempre me apoiaram em todas as minhas realizações.

Amo vocês incondicionalmente.
Em memória de meu pai Biológico Valter

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar a Deus por ter iluminado meu caminho.

Agradeço à minha amiga Daniele Konh pela colaboração no trabalho, pela disposição, pela presença em muitos momentos importantes e em especial pela amizade.

Agradeço em especial às minhas grandes amigas Pamela Sabioni e Anna Carolina Ramos pelo apoio, pelo carinho, por estarem presentes em momentos especiais.

Agradeço ao Leandro Araujo pela colaboração durante a realização de todo projeto e pela amizade.

Agradeço à todos os funcionários do biotério.

Agradeço à Nereide Garcia da secretaria e à Cristina Jorge da biblioteca por toda atenção dispensada durante estes anos e também pela amizade.

Agradeço às pessoas que fazem parte da secretária da Psicobiologia.

Agradeço à todos os funcionários do CEBRID em especial a Paty a Claudinha e ao Hebert Cervigni.

Agradeço aos meus amigos que mesmo longe sempre me apoiaram para que eu nunca desistisse: Filipe, Fátima, Nátalia e Josiane.

Agradeço ao Dr. Ricardo Machado e à Dra. Beatriz Lorenzo pelas sugestões relacionadas ao andamento e finalização da tese, pela disposição e pela amizade conquistada.

Agradeço aos membros do grupo plantas: Paulo, Ricardo, Fúlvio, Lucas e Julino pela amizade e pelo apoio.

Agradeço à Dra. Giussepina Negri pela realização da fitoquímica do extrato da planta utilizado na tese, pelas discussões produtivas, pelo carinho e pela amizade.

Agradeço à Dra. Monica Andersen pela contribuição durante a realização deste trabalho e pelas sugestões na parte escrita.

Agradeço aos membros do exame de suficiência Dra. Vânia D`Almeida, Dr. Ricardo Machado e Dra. Beatriz Lorenzo, cuja contribuição foi fundamental para melhoria deste trabalho.

Agradeço aos membros da banca de doutorado Dra. Gisele Picolo, Dra. Renata Giorgi, Dr. Reinaldo Nobrega e a Dra. Stela Rates, por aceitarem participar de minha defesa da tese. Pessoas admiráveis pela competência e pelo trabalho.

Agradeço novamente em especial ao Dra. Gisele Picolo por todas as dicas e por toda atenção dispensada durante a realização deste trabalho.

Agradeço à minha colega Nathália Bernardes pelas discussões durante a realização dos experimentos.

Agradeço aos amigos pós-graduandos da Psicobiologia pela amizade e por todos os momentos em que dividimos dúvidas e alegrias nos corredores, em especial ao Carlos Eduardo.

Agradeço à todos os professores e orientadores da Psicobiologia em especial à Deborah Suchecki, à Isabel Quadros, pelo carinho, pela atenção e também pela amizade.

Agradeço ao CEBRID e a AFIP por toda infra-estrutura essencial para realização do trabalho.

Agradeço à FAPESP por todo apoio financeiro para realização deste trabalho.

Agradecimentos Especiais

Agradeço ao meu orientador Dr. Elisaldo Carlini. Foi gratificante em todos aspectos ter ele como orientador, pois além das grandiosas discussões sobre o trabalho, me ensinou sobre a vida. Estes seis anos foram fundamentais para o que me tornei hoje. É um grande exemplo de Professor e Cientista.

Agradeço ao meu co-orientador Alexandre Basso pela colaboração no trabalho, pela paciência e pela disposição.

Agradeço a minha querida mãe por sempre estar presente em todos os momentos desde minha infância, o que me ajudou a chegar onde estou hoje.

Agradeço ao meu pai de coração por me incentivar sempre e acreditar que eu fosse capaz de mais uma das realizações importantes na minha vida.

Agradeço à minha amiga/irmã Lyvia que colaborou com este trabalho. Não somente pelo trabalho em si, mas também pela presença nos momentos importantes, nas dificuldades em minhas realizações.

Agradeço à Viviane Grassmann por todos os momentos em que estive ao meu lado, pelo carinho e por me incentivar a nunca desistir dos meus objetivos. Obrigada por fazer parte da minha vida.

***“Não devemos ter medo das
novas ideias! Elas podem
significar a diferença entre o
triunfo e o fracasso.”***

Napoleon Hill

LISTAS DE ABREVIações

- Δ -9-THC - Δ -9-tetrahydrocannabinol
- APC – Célula apresentadora de Antígeno
- CB₁ – receptor canabinóide tipo 1
- CB₂ – receptor canabinóide tipo 2
- CFA – Adjuvante Completo de Freund
- COX2 – cicloxigenase 2
- EAE – encefalomielite autoimune experimental
- ET-1– endotelina 1
- EHPa – extrato hexânico de *Phyllanthus amarus*
- EM – esclerose múltipla
- EPM – erro padrão da média
- IFN- γ – Interferon- γ
- IL – Interleucina
- Ip – intraperitoneal
- MBP – proteína Básica de Mielina
- MOG – glicoproteína da mielina de oligodendrócitos
- NF- κ B – fator nuclear κ B
- NK – *natural killer*
- OEOg – óleo essencial de *Ocimum gratissimum* L.
- PAG –substância cinzenta periaquedutal
- PBS – Tampão Fosfato Salino
- PLP – Proteína proteolipídica

- PGE2 – prostaglandina E2
- SNC – sistema nervoso central
- Th – T helper
- TNF α – fator de necrose tumoral α
- Treg – T regulatória
- TRPV1 – receptores de potencial transitorio vanilóide 1
- v.o. – via oral

UNIDADES DE MEDIDAS UTILIZADAS

- μl – microlitro
- μg – micrograma
- cm - centímetro
- g - grama
- h - hora
- kg - quilograma
- mg - miligrama
- min – minuto
- ml - mililitro
- $^{\circ}\text{C}$ - graus Celsius
- rpm - rotações por minuto
- seg – segundos

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1: <i>Phyllanthus amarus</i>	5
Figura 2: Estrutura química do trans-cariofileno.....	7
Figura 3: Gaiolas de arame utilizadas para realização da triagem farmacológica inicial.....	25
Figura 4 Aparelho de rota rod.....	26
Figura 5: Placa quente utilizado para avaliar a sensibilidade térmica dos animais..	27
Figura 6: Estrutura das lignanas encontradas, em maior quantidade, no extrato hexânico de <i>Phyllanthus amarus</i>	
Figura 7: Influência do tratamento com EHPa no tempo de permanência sobre a placa aquecida.....	32
Figura 8: Efeito do tratamento oral com extrato hexânico de <i>Phyllanthus amarus</i> nas fases aguda e crônica da nocicepção induzida por formalina na pata de camundongos.....	33
Figura 9: Aparato utilizado no teste de von Frey.....	36
Figura 10: Esquema de tratamento crônico com extrato hexânico de <i>Phyllanthus amarus</i> e testes comportamentais.....	37
Figura 11: Progressão dos sinais clínicos em camundongos com EAE. Os animais receberam uma injeção contendo MOG/CFA + Pertussis (n=12) e os outros grupos CFA + Pertussis (n=10), CFA + PBS (n=9) ou PBS + Pertussis (n=9).....	39
Figura 12: Peso corpóreo em animais com EAE. Os animais receberam uma injeção com MOG + CFA + Pertussis e os outros grupos CFA +Pertussis, CFA + PBS ou PBS + Pertussis.....	40
Figura 13: Intensidade de hipernocicepção mecânica em camundongos (com ou sem EAE).....	42

Figura 14: A) Influência do tratamento com extrato hexânico de <i>Phyllanthus amarus</i> sobre o desenvolvimento da EAE. B) Escore cumulativo.....	44
Figura 15: Peso corpóreo em animais tratados com extrato hexânico de <i>Phyllanthus amarus</i> no modelo de EAE.....	46
Figura 16: Intensidade de hipernocicepção mecânica em camundongos tratados com extrato hexânico de <i>Phyllanthus amarus</i> no modelo de EAE.....	47
Figura 17: Esquema do tratamento crônico com trans-cariofileno e testes comportamentais.....	59
Figura 18: Esquema do tratamento agudo com trans-cariofileno (4 administrações) e com os antagonistas (naloxona e AM630) e teste de von Frey.....	60
Figura 19: Influência do tratamento com trans-cariofileno sobre o desenvolvimento da EAE. A) Os animais foram tratados com as doses de 3, 10 ou 30 mg/kg, e o aparecimento dos sinais clínicos foram avaliados por 26 dias consecutivos. B) somatória dos escores de cada animal (escore cumulativo).....	64
Figura 20: Peso corpóreo em animais tratados com trans-cariofileno no modelo de EAE.....	65
Figura 21: Intensidade de hipernocicepção mecânica em camundongos tratados com trans-cariofileno no modelo de EAE.....	67
Figura 22: Avaliação do efeito anti-hipernociceptivo do tratamento com trans-cariofileno no modelo de EAE. A) Efeito agudo do tratamento com trans-cariofileno (10 mg/kg). B) Efeito do pré-tratamento com naloxona (1 mg/kg).....	68
Figura 22: Avaliação do efeito anti-hipernociceptivo do tratamento com trans-cariofileno no modelo de EAE. C) Efeito agudo do tratamento com trans-cariofileno (10 mg/kg). D) Efeito do pré-tratamento com AM630.....	69
Figura 23: Influência do tratamento agudo com trans-cariofileno sobre o desenvolvimento da EAE.....	70

Figura 24: Proliferação das células T CD4⁺ dos linfonodos drenantes de animais imunizados e tratados com trans-cariofileno ou veículo.....71

Figura 25: Produção de IFN- γ pelas células dos linfonodos drenantes após reestímulo com MOG₃₅₋₅₅ de animais tratados com trans-cariofileno.....72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lignanas identificadas no EHPa através da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.....	30
Tabela 2: Efeito da administração oral aguda do extrato hexânico de <i>Phyllanthus amarus</i> sobre a coordenação motora de camundongos submetidos ao teste de rota rod.....	31
Tabela 3: Medida da coordenação motora de camundongos com EAE submetidos ao teste de rota rod.....	41
Tabela 4: Medida da coordenação motora de camundongos com EAE e tratados com extrato hexânico de <i>Phyllanthus amarus</i> submetidos ao teste de rota rod.....	46
Tabela 5: Avaliação da coordenação motora (rota rod) em camundongos com EAE tratados com trans-cariofileno.....	66

RESUMO

A dor crônica está entre os principais sintomas da esclerose múltipla. São escassas as pesquisas com compostos naturais na busca de tratamentos para os sintomas dessa doença. As plantas pertencentes ao gênero *Phyllanthus* e os agentes canabinóides têm mostrado efeitos positivos sobre a nocicepção e a inflamação. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito antihipernociceptivo de *Phyllanthus amarus* e do trans-cariofileno no modelo de encefalomielite autoimune experimental (EAE). Inicialmente foi feita a análise fitoquímica do extrato hexânico de *Phyllanthus amarus* (EHPa) e as principais lignanas encontradas foram filantina, nirantina e 5-demetoxinirantina. Para todos os experimentos realizados foram utilizados camundongos fêmeas C57BL/6J. Não foram observadas alterações significativas nos testes iniciais (triagem farmacológica e rota rod). A nocicepção foi avaliada pelo teste de placa quente e formalina na pata. Todas as doses de EHPa promoveram efeito antinociceptivo no teste de formalina, em ambas as fases, mas somente a dose de 400 mg/kg aumentou o tempo de permanência dos camundongos sobre a placa aquecida. Na etapa seguinte, a EAE foi induzida por injeção subcutânea com 200 µg do peptídeo de MOG₃₅₋₅₅ dissolvida em CFA. Os animais foram avaliados quanto à hipernocicepção mecânica (von Frey), à coordenação motora, ao peso e ao desenvolvimento da doença. Nenhuma das doses de *Phyllanthus amarus* administradas foi capaz de modificar os parâmetros analisados. Os mesmos experimentos foram realizados em animais com EAE, mas o tratamento com o trans-cariofileno não previniu à redução do peso, às alterações motoras, e nem modificou o desenvolvimento da doença. No entanto, com relação a hipernocicepção, as três doses foram efetivas em aumentar o limiar de nocicepção, a partir do 6º dia após a indução da doença. Quando o mecanismo de ação do trans-cariofileno foi avaliado, o efeito agudo da dose de 10 mg/kg foi bloqueado pela naloxona (antagonista opióide) e pelo AM630 (antagonista canabinóide). A resposta de proliferação e produção de citocina, foi analisada após sete dias de tratamento. Porém, a dose de 10 mg/kg do trans-cariofileno não modificou a proliferação das células T CD4⁺ e nem a produção de IFN-γ. Como conclusão, estes produtos naturais podem atuar de maneira diferente dependendo do modelo empregado e método de extração utilizado. Ainda que o extrato da planta não tenha sido efetivo, o trans-cariofileno foi capaz de reduzir a hipernocicepção induzida na EAE. Os resultados mostram a relevância de estudos com produtos naturais para o emprego em neuropatias dolorosas.

Abstract

Chronic pain is one of the main symptoms of multiple sclerosis. There are few studies employing natural compounds on the search for treatment to symptoms in this disease. Plants that belong to the genus *Phyllanthus* and cannabinoid agents have shown positive effects on nociception and inflammation. This study aimed at evaluating the antihypernociceptive effect of *Phyllanthus amarus* and trans-caryophyllene in the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model. The chemical composition of *Phyllanthus amarus* (HEPa) hexanic extract was analyzed, and the principal lignans found were phyllanthin, niranthin and 5-demethoxyniranthin. For all experiments female C57BL/6J mice were used. No significant changes were found in the pharmacological screening and rota rod test. The nociception was evaluated using the hot plate and the formalin tests. All doses of HEPa promoted antinociceptive effect in the formalin test, in both phases, but only 400 mg/kg increased the time in which the mice remained on the hot plate. In the following step, the EAE was induced by subcutaneous injection of 200 µg of MOG₃₅₋₅₅ emulsified in CFA. Mechanical hypernociception (von Frey), motor coordination (rota rod), body weight and the development of the disease were evaluated. None of the doses was able to change the parameters analyzed. The experiment was repeated using animals with EAE, but the treatment with trans-caryophyllene did not prevent the body weight reduction, the motor changes, nor interfered with the development of the disease. Regarding the hypernociception, the three doses were effective in increasing the nociception threshold starting on the sixth day after the induction of the disease. When the action mechanism of trans-cariophyllene was evaluated, it was found that the acute effect at the dose of 10 mg/kg was blocked by naloxone (opioid antagonist) and by AM630 (cannabinoid antagonist). The T cells proliferation response and cytokine production was analyzed after seven days of treatment. However, trans-caryophyllene, at the dose of 10 mg/kg, did not change the TCD4+ cells proliferation neither IFN-γ production. In conclusion, these natural products can act differently, depending on the model employed and the extraction method used. Although the extract of the plant was not effective, the trans-caryophyllene was able to reduce the hypernociception in the EAE model. The results show the relevance of the studies with natural products in painful neuropathies.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
AGRADECIMENTOS ESPECIAIS	vii
LISTAS DE ABREVIações	ix
UNIDADES DE MEDIDAS UTILIZADAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Esclerose Múltipla	1
1.2. O papel do sistema imunológico na dor	5
1.3. Modelo experimental de encefalomielite	7
1.4. Tratamento atualmente utilizado na EM.....	11
1.5. Plantas medicinais com atividade antinociceptiva e seus princípios ativos Analgésicos naturais	13
1.6. <i>Phyllanthus amarus</i> Schumach & Thonn. (Euphorbiaceae).....	14
1.7. Trans-cariofileno	17
2. JUSTIFICATIVA	19
3. OBJETIVOS	20
4. METODOLOGIA GERAL	21
4.1. Animais	21
4.2. Drogas	21

4.3.	Material Vegetal.....	22
4.4.	Extrato da planta.....	22
5.	ETAPA 1	23
5.1.	Objetivos específicos.....	23
5.2.	Métodos	23
5.2.1.	Análise do extrato por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM).....	23
5.2.2.	Triagem farmacológica inicial.....	24
5.2.3.	Medida da coordenação motora (rota rod).....	25
5.2.4.	Avaliação da ação antinociceptiva.....	26
5.3.	Análise estatística	28
5.4.	Resultados	28
5.4.1.	Análise do extrato usando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM).....	28
5.4.2.	Triagem farmacológica inicial.....	31
5.4.3.	Medida da coordenação motora (rota rod).....	31
5.4.4.	Avaliação da ação antinociceptiva.....	32
6.	ETAPA 2	34
6.1.	Objetivos específicos.....	34
6.2.	Métodos	34
6.2.1.	Indução da EAE.....	34
6.2.2.	Grupos experimentais para implementação do modelo.....	35
6.2.3.	Medida da coordenação motora (rota rod).....	35
6.2.4.	Hipernocicepção mecânica (von Frey eletrônico).....	35

6.3.	Tratamento crônico com EHPa no modelo de EAE.....	37
6.4.	Análise Estatística.....	38
6.5.	Resultados - Teste piloto utilizando animais com EAE.....	38
6.5.1.	Indução da EAE.....	38
6.5.2.	Medida da coordenação motora (rota rod).....	40
6.5.3.	Hipernocicepção mecânica (von Frey eletrônico).....	41
6.6.	Resultados - Tratamento crônico com EHPa no modelo de EAE	43
6.6.1.	Desenvolvimento da EAE.....	43
6.6.2.	Medida da coordenação motora (rota rod).....	46
6.6.3.	Hipernocicepção mecânica (von Frey eletrônico).....	47
6.7.	Discussão das Etapas 1 e 2.....	48
7.	ETAPA 3	58
7.1.	Objetivos específicos.....	58
7.2.	Métodos	58
7.2.1.	Tratamento crônico com trans-cariofileno no modelo da EAE.....	58
7.2.2.	Mecanismo de ação do trans-cariofileno no modelo de EAE.	59
7.2.3.	Análise da resposta imune.....	61
7.2.3.1.	Proliferação celular (citometria de fluxo).....	62
7.2.3.2.	Ensaio imuno-enzimático (ELISA).....	62
7.3.	Análise estatística.....	63
7.4.	Resultados - Tratamento com trans-cariofileno no modelo de EAE.....	63
7.4.1.	Desenvolvimento da EAE.....	63
7.4.2.	Medida da coordenação motora (rota rod).....	65
7.4.3.	Hipernocicepção mecânica (von Frey eletrônico).....	66

7.4.4. Mecanismo de ação do trans-cariofileno no modelo de EAE.	67
7.4.5. Proliferação.....	70
7.4.6. Produção de IFN- γ	71
7.5. Discussão da Etapa 3.....	73
8. CONCLUSÕES GERAIS.....	78
9. REFERÊNCIAS BIBLIGRÁFICAS.....	79
ANEXO 1	99

1. INTRODUÇÃO

1.1. Esclerose Múltipla

A esclerose múltipla (EM) é considerada uma doença autoimune que se caracteriza principalmente pela inflamação crônica desmielinizante do Sistema Nervoso Central (SNC), sendo desencadeada, sobretudo, por linfócitos T auxiliares CD4+ (Alcaro e Papini, 2006; Abbas *et al.*, 2008).

As primeiras descrições foram do neurologista Jean-Martin Charcot em 1868, que relacionou os sintomas da EM com as alterações observadas em amostras *post-mortem*, identificando importantes características histológicas, incluindo a perda de mielina (Murray, 2009). Charcot (1868) enfatizou que a EM era uma entidade clínico-patológica distinta, com lesões disseminadas no tempo e no espaço, que se manifestava clinicamente com exacerbação e períodos de remissão. As principais regiões afetadas eram nervo óptico e medula espinhal.

Estimativas apontam que, atualmente, cerca de 2,5 milhões de pessoas no mundo são acometidas por esta doença (Denisson *et al.*, 2009). As mulheres são mais propensas a desenvolver a doença do que os homens, assim como parentes de indivíduos acometidos (Brassington e Marsh, 1998). Em média a doença surge aos 30 anos de idade, com 70% dos casos aparecendo entre os 20 e 40 anos (O'Connor, 2002). São diversos os sintomas observados, sendo os mais frequentes a fraqueza muscular, ataxia, dor aguda e crônica, fadiga, paralisia, problemas visuais, disfunções intestinais e na bexiga, alterações motoras, sensitivas e cognitivas (Buchanan *et al.*, 2002; Slavin *et al.*, 2010).

Tradicionalmente, são conhecidas quatro formas clínicas de EM: 1- recorrente-remitente, caracterizada pela ocorrência de surtos e remissões

sucessivas; 2- secundária progressiva, que inicialmente é recorrente-remitente tornando-se progressiva; 3- primária progressiva, que evolui de maneira lenta; 4- progressiva com surtos que evolui de forma bem caracterizada (Compston e Coles, 2008).

A etiologia da EM não é ainda bem compreendida, mas sabe-se que a composição celular de infiltrados no tecido cerebral e no líquido cefalorraquidiano inclui linfócitos T CD4+, T CD8+ e macrófagos (Hafler, 2004). Entre os linfócitos T CD4+, as células T *helper* 1 (Th1), essenciais na defesa contra agentes patogênicos intracelulares e que secretam grandes quantidades de interferon γ (IFN- γ), parecem ser as mais relevantes na patogênese da EM (Steinman, 2008). Tem-se ressaltado a participação de células T *helper* 17 (Th17), as quais secretam interleucina 17 (IL-17) e interleucina 22 (IL-22), além de fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6) (Korn, 2008). Estudos mostram que a EM é uma doença cuja susceptibilidade é multifatorial, na qual a predisposição genética une-se a fatores externos e ambientais. Alguns agentes patogênicos, como o herpesvírus humano 6 (Moore e Walfson, 2002), o vírus Epstein-Barr (Serafini *et al.*, 2007) ou bactérias como *Chlamydia pneumoniae* (Sriram *et al.*, 1999), seriam fatores que contribuiriam para o desencadeamento da resposta imunológica relacionada a essa doença. Entretanto, ainda não existem achados bem estabelecidos que comprovem a etiologia infecciosa da EM (Korn, 2008).

Na patogênese da EM, o processo que leva à desmielinização tem início pela ativação de linfócitos T CD4+ (*helper*) periféricos com reatividade à mielina, os quais, em seguida, alcançam o SNC (Ransohoff *et al.*, 2003). Para que ocorra o influxo desses linfócitos, primeiramente a barreira hematoencefálica é rompida devido à presença de citocinas pró-inflamatórias, gerando uma neuroinflamação no

local (Martin *et al.*, 1992). Os linfócitos são auxiliados não somente pela expressão das citocinas pró-inflamatórias, mas também pelas moléculas de adesão e quimiocinas (Ransohoff *et al.*, 2003). As citocinas e, na maior parte das vezes, também as quimiocinas, desempenham uma função importante no estabelecimento e manutenção dos processos autoimunes (McKenzie *et al.*, 2006). As citocinas pró-inflamatórias (IL-17, IFN- γ , IL-23 e TNF- α), e também algumas quimiocinas (IP-10, IL-8), são responsáveis pela ativação das células da glia (microglia e astrócito). Estas células recrutam outras do sistema imunológico que estão presentes no sangue (T CD8+, células B e monócitos), contribuindo diretamente com a lesão e gerando inflamação (Trapp *et al.*, 1998).

Como mencionado anteriormente, os principais linfócitos T *helper* (Th) envolvidos na fisiopatologia da doença são os Th1 e Th17 (Harrington *et al.*, 2005). As células Th1 produzem e liberam IFN- γ , contribuindo para o recrutamento e ativação dos macrófagos que, por sua vez, secretam mediadores inflamatórios como TNF- α (Delgado e Sheremata, 2006). Já as células Th17 produzem e secretam a citocina IL-17, auxiliando assim, na infiltração de neutrófilos e na produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células residentes (glia) (Jadidi-Niaragh e Mirshafiey, 2011). Outra célula importante envolvida na EM é a T reguladora (Treg), relacionada ao controle da gravidade e progressão da doença (Huan *et al.*, 2005).

Em resumo, os eventos relacionados à patogênese da doença se iniciam na periferia, por meio do reconhecimento de epítomos antigênicos pelos linfócitos T CD4+, na presença de moléculas co-estimuladoras e outros sinais pouco definidos. Outros fatores também contribuem com a inflamação local como, a presença de citocinas liberadas pelos linfócitos e por células apresentadoras de antígenos (APC). Além disso, as moléculas de adesão (LFA-1 e VLA-4), presentes no endotélio da

barreira hematoencefálica, facilitam a adesão e entrada das células T através de vasos cerebrais (Flugel *et al.*, 2001; Sospedra e Martin, 2005). Algumas citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , IL-23 e TNF- α) e outros fatores promovem a ativação das células da glia, como astrócitos e microglia (Almolda *et al.*, 2011). Os linfócitos T *naïve* reconhecem derivados antigênicos da mielina apresentados no contexto das moléculas de MHC (complexo principal de histocompatibilidade) pelas APC (Almolda *et al.*, 2011). Na presença de IL-6 e do fator de transformação do crescimento β (TGF- β), as células Th se diferenciam em Th17 (Basso *et al.*, 2009; Glass *et al.*, 2011). As células da glia e os astrócitos, quando ativados, secretam IL-23 e osteopontina, induzindo os linfócitos Th17 a secretarem IL-17 e TNF- α , resultando em danos à bainha de mielina (Hedegaard *et al.*, 2008). Os astrócitos ativados também produzem o fator de ativação de células B (BAFF), relacionado à sobrevivência de células B auto-reativas. Essas células se diferenciam em plasmócitos produtores de anticorpos anti-mielina (Krumbholz *et al.*, 2005). Também são recrutadas outras células imunológicas da periferia, incluindo monócitos e TCD8+, que podem promover danos diretos à bainha de mielina (Skulina *et al.*, 2004). Este ambiente inflamatório acarreta em destruição dos axônios e dos oligodendrócitos, células responsáveis pela remielinização. As células Treg ajudam a suprimir a inflamação por inibirem a atividade dos linfócitos T efetores (Sakaguchi e Powrie, 2007).

Estimativas apontam a dor, consequência da lesão na EM, como um dos principais sintomas da doença. Este sintoma acomete cerca de 50 a 80% dos pacientes em alguma fase da EM. A dor difere quanto ao tipo e intensidade entre os indivíduos portadores, podendo ser aguda ou crônica (Stenager *et al.*, 1991; O'Connor *et al.*, 2008). Svendsen e colaboradores (2005) demonstraram que a dor

neuropática é uma das mais frequentes em portadores de EM. As regiões mais afetadas, segundo os mesmos autores, são os membros inferiores, costas e membros superiores, respectivamente. Alguns distúrbios motores também são relatados e podem causar dor. Este quadro é descrito como “espamos tônicos dolorosos”, um tipo específico de espasmo que está associado à EM (Rizzo *et al.*, 2004). Dores de cabeça também são relatadas com maior frequência em pacientes com EM, em comparação com a população geral (Kalia e O’Connor, 2005; Hadjimichael *et al.*, 2007). A dor em pacientes com EM pode ter origens diversas, como a inflamação característica da doença, dor neuropática relacionada a lesão do sistema nervoso central, parestesia por lesão de neurônios do gânglio dorsal da medula espinal, dor secundária ocasionada pelos espasmos e dor de origem músculo-esquelética derivada de anormalidade postural (Ehde *et al.*, 2005; Osborne *et al.*, 2007; Nick *et al.*, 2012). Uma das maiores implicações deste quadro doloroso é a redução na qualidade de vida do paciente, por incapacitar e interferir com suas atividades cotidianas.

É importante ressaltar que o sistema imunológico participa de inúmeros mecanismos inflamatórios, relacionados ou não a doenças autoimunes como a EM, desempenhando um papel crucial em diferentes processos dolorosos.

1.2. O papel do sistema imunológico na dor

O sistema imunológico desempenha um papel importante na modulação da dor, não somente em tecidos inflamados, como também nos danos em nervos periféricos e no SNC (Marchand *et al.*, 2005). Os sinais de inflamação incluem migração celular, febre, edema, dor e hiperalgesia. Vários tipos de células são recrutados em condições inflamatórias. Os mastócitos, na pele humana, ao

desgranular, promovem eritemas, que é um marcador de hiperalgesia em resposta ao calor (Drummond, 2004; Chatterjea *et al.*, 2012). Os macrófagos residentes de tecido podem liberar mediadores inflamatórios, como TNF- α e IL-1 β , e também óxido nítrico e prostanoídes. Estes macrófagos residentes ativados marcam um subsequente recrutamento e ativação de outros tipos de células (neutrófilos) no local da inflamação (Segond von Banchet *et al.*, 2009). Os neutrófilos produzem fatores inflamatórios como óxido nítrico, citocinas, quimiocinas e produtos da degradação do ácido araquidônico, como as prostaglandinas E₂ (PGE₂) e o leucotrieno B₄, que estão relacionados aos processos dolorosos (Bennett *et al.*, 1998; Morin *et al.*, 2007).

Outros mediadores como a bradicinina, a serotonina, a IL-6 e quimiocinas (CCL2 e CXCL8) também participam do processo (Xu e Yaksh, 2011). Segundo Roberts e McColl (2004), a terapia com anti-TNF- α alivia a dor em pacientes com desordens autoimunes que inclui artrite reumatóide e psoriática. A dor pode ser induzida por estes mediadores citados, pois muitos agem em terminais nociceptivos que inervam os tecidos inflamados. Esses neurônios podem expressar receptores para TNF- α , IL-1 β , IL-6, bradicinina, prostanóides e histamina (Xu e Yaksh, 2011). Como exemplo, os mediadores inflamatórios induzem a expressão do receptor de bradicinina 1 (B1) em diversas células e estes, bem como, os receptores de bradicinina 2 (B2 - constitutivos), quando ativados pela bradicinina, contribuem indiretamente para hiperalgesia inflamatória (Petersen *et al.*, 1998; Petcu *et al.*, 2008).

A dor neuropática pode ser ocasionada por danos nos nervos periféricos de diversas formas, como no caso da neuropatia na diabetes, no HIV, induzido por drogas ou mesmo eventos traumáticos no nervo (Sindrup e Jensen, 1999). Algumas

células (macrófagos, neutrófilos) que participam da dor inflamatória também estão presentes nas lesões nervosas, e desempenham um papel semelhante ao descrito, pois liberam citocinas e quimiocinas após a injúria (Marchand *et al.*, 2005; Graeber e Christie, 2012). As citocinas IL-1 β e TNF- α parecem estar envolvidas na dor neuropática, podendo agir diretamente em fibras nociceptivas ou aumentar as respostas a estímulos de calor e na alodínia mecânica (Obreja *et al.*, 2002; Nadeau *et al.*, 2011).

Outro tipo de injúria que afeta diretamente o SNC pode estar relacionado a algumas doenças autoimunes, e dentre elas se destaca a EM. Os mecanismos relacionados à inflamação gerada podem sensibilizar os neurônios do corno dorsal da medula, levando a um aumento da sensibilidade dolorosa, característico do quadro precoce da doença (Osterberg *et al.*, 2005; Truini *et al.*, 2012). Existem algumas evidências de que as células T podem produzir e secretar fatores neurotróficos, como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (Stadelmann *et al.*, 2002). Este fator é conhecido por modular a transmissão sináptica e a excitabilidade neuronal, desempenhando um papel na gênese da sensibilização central da dor e hipersensibilidade (Kaftiz *et al.*, 1999). O estudo da dor utilizando modelos animais de EM é recente e tem ajudado a elucidar os mecanismos envolvidos tanto na doença quanto em alguns sintomas.

1.3. Modelo experimental de encefalomielite autoimune

Em 1933, Rivers e colaboradores descreveram um modelo animal que ficou conhecido, posteriormente, como encefalomielite autoimune experimental (EAE). O experimento foi realizado em primatas (não-humanos) com o intuito de compreender os episódios de paralisia que, algumas vezes, acompanhavam a vacinação

(aplicação de múltiplas injeções) e esclarecer a causa de reações neurológicas à certas infecções virais como a varíola. Duas décadas depois, Kabat e colaboradores (1951) foram capazes de induzir a EAE utilizando o adjuvante de Freund combinado com extratos de cérebro, induzindo a doença em macacos rhesus com uma única injeção. A partir destes estudos, houve um progresso constante para induzir a EAE em diferentes espécies. Na década de 50, ratos e cobaias tornaram-se espécies padrão para o estudo da EAE, na qual a resposta à sensibilização com o tecido do SNC foi melhorada com a adição de *Micobacterium tuberculosis*, inativada por calor, ao adjuvante completo de Freund (CFA) (Gold *et al.*, 2006). A adição de toxina pertussis também melhorou a eficiência da indução da EAE (Levine e Sowinski, 1973), por reduzir em número e função as células Treg (auxiliam no controle da doença) (Chen *et al.*, 2006). Desde então, a EAE foi induzida em uma variedade de roedores que reproduzem aspectos específicos da imunopatologia da doença humana (Gold *et al.*, 2006).

Atualmente, a EAE é o modelo animal mais utilizado para o estudo da EM. Em geral, é realizada por meio da imunização com proteínas recombinantes purificadas da mielina ou com peptídeos sintéticos derivados destas proteínas. Os derivados sintéticos mais utilizados para indução da EAE são: a proteína básica da mielina (MBP), proteína proteolípídica (PLP₁₃₉₋₁₅₁), ou glicoproteína da mielina de oligodendrocitos (MOG₃₅₋₅₅). Existem linhagens de animais que respondem especificamente aos peptídeos derivados de proteínas da bainha de mielina injetados, manifestando a EAE de maneira diferente. Os camundongos da linhagem SJL/J desenvolvem a EAE após a imunização com PLP₁₃₉₋₁₅₁, caracterizada por períodos de surto e remissão (Tuohy *et al.*, 1989; Gold *et al.*, 2006). Os ratos da linhagem Lewis e os camundongos B10.PL respondem à imunização com MBP

apresentando uma doença monofásica (Pender *et al.*, 1995; Papenfuss *et al.*, 2004; Gold *et al.*, 2006;). Já o peptídeo MOG₃₅₋₅₅, componente menor da mielina (altamente encefalitogênico) é utilizado para induzir a EAE em camundongos da linhagem C57BL/6J, os quais desenvolvem uma EAE crônica com remissão parcial (Oliver *et al.*, 2003; Stromnes e Goverman, 2006). Após a injeção de MOG₃₅₋₅₅, por exemplo, uma resposta imune inata inicia-se na periferia, devido à injeção do antígeno associado ao CFA desencadeando, posteriormente, um processo inflamatório no SNC (Genain *et al.*, 1999; Costa *et al.*, 2003). Cerca de duas semanas após a imunização, os animais desenvolvem encefalomielite, caracterizada por infiltrados perivasculares compostos por linfócitos e macrófagos no SNC (Abbas *et al.*, 2008). Este modelo é caracterizado por um déficit motor avaliado por meio de uma escala de escores que varia de 0 a 5, de acordo com a gravidade dos sintomas. Para os animais imunizados com a MOG₃₅₋₅₅, o déficit motor aparece cerca 10 dias após a indução da EAE e por volta dos 17º e 19º dias (pico da doença), esses sintomas motores se agravam (podendo ocorrer paralisia total dos membros inferiores) sendo que, após 21 dias os sintomas começam a regredir, e estabilizam. Porém, nem todos os animais imunizados desenvolvem a doença, podendo variar de um experimento para o outro (Stromnes e Goverman, 2006).

Recentemente diferentes pesquisadores demonstraram que o estudo da dor no modelo de EAE pode ser realizado antes do aparecimento dos sinais clínicos, uma vez que, a alteração na sensibilidade dolorosa foi verificada antes das alterações motoras, como paralisia parcial ou total de membros posteriores (Olechowski *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2009; Sloane *et al.*, 2009). Entretanto, um estudo anterior mostrou que os animais com EAE induzida por PLP₁₃₉₋₁₅₁ (camundongos da linhagem SJL/J), apresentaram hipernocicepção térmica

(aumento da sensibilidade à estímulos nociceptivos de calor) na cauda e nas patas durante a fase crônica da doença (Aicher *et al.*, 2004).

No trabalho de Olechowski e colaboradores (2009), a intensidade da dor neuropática foi investigada, durante 30 dias, em camundongos C57BL/6J fêmeas imunizados com o peptídeo MOG₃₅₋₅₅. Os autores verificaram uma alteração na resposta dolorosa (alodínia - resposta a um estímulo não nocivo) avaliada por meio do método de von Frey filamentos do 5° até o 12° dia após a imunização. A partir do 13° dia, os animais apresentaram os sinais motores comprometidos, sintoma característico do modelo.

No mesmo ano, Rodrigues e colaboradores (2009) avaliaram a hipernocicepção mecânica pelo teste de von Frey (eletrônico) em camundongos com EAE. Os animais apresentaram uma resposta de diminuição do limiar de pressão, nas patas posteriores, nos dias 7 e 9 após a indução, ou seja, antes do surgimento dos sinais motores (10° dia). Os autores sugerem que a hipernocicepção verificada pode ser válida para EAE induzida por MOG₃₅₋₅₅ como um modelo para estudos de dor em EM.

Com intuito de verificar algumas diferenças sensoriais entre os dois modelos de EAE citados acima, Lu e colaboradores (2012), induziram EAE em camundongos fêmeas SJL/J com o peptídeo PLP₁₃₉₋₁₅₁, e em fêmeas de C57BL/6J com o peptídeo MOG₃₅₋₅₅. Os autores demonstraram que os animais com a EAE induzida por PLP₁₃₉₋₁₅₁ tinham uma resposta de hipernocicepção térmica no início da indução, no pico da doença, e um aumento da sensibilidade na fase crônica da doença (28 dias). Já as fêmeas com EAE induzida pela MOG₃₅₋₅₅ tiveram sua sensibilidade térmica alterada, com menos intensidade, somente na fase crônica. Quanto à alodínia mecânica, a resposta nos animais SJL-PLP₁₃₉₋₁₅₁ foi alterada somente na fase crônica. Em

contrapartida, as fêmeas de C57-MOG₃₅₋₅₅, desenvolveram alodínia no início e no pico da doença, mas com baixa intensidade. Os autores conseguiram, com o uso do mesmo teste comportamental e período de investigação, comparar o perfil de resposta à estímulos sensoriais em ambos os modelos de EAE. Foi ressaltado por eles que as diferenças encontradas no comportamento de dor nestes dois modelos podem refletir a heterogeneidade da EM em humanos.

O modelo de EAE pode ser uma ferramenta para investigar diferentes alvos terapêuticos para o tratamento dos sintomas relacionados à EM, embora com cuidado em não extrapolar os resultados obtidos no modelo EAE para prever a eficácia dos tratamentos em humanos.

1.4. Tratamentos atualmente utilizados na EM

Assim como para a maioria das doenças autoimunes, não existe cura para EM. Os tratamentos empregados tem o intuito de diminuir a progressão da doença e aliviar os sintomas, possibilitando aos indivíduos uma melhora na qualidade vida.

O tratamento para EM utilizado envolve vários medicamentos como interferon-beta, imunossupressores (azatioprina) e corticosteróides, os quais promovem uma melhora parcial em alguns sintomas e amenizam a progressão da doença. Porém, o uso prolongado pode desencadear uma série de reações adversas (Courtney *et al.*, 2009). Outros medicamentos podem ser utilizados para os sintomas mais específicos, como o baclofeno, diazepam e tizanidine que reduzem os espasmos musculares (O'Connor *et al.*, 2008). Para a dor neuropática são empregados analgésicos opióides, antidepressivos que sejam inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina e anticonvulsivantes (Finnerup *et al.*,

2002; Dworkin *et al.*, 2003; Finnerup *et al.*, 2005; Attal *et al.*, 2006; Solaro *et al.*, 2009).

Atualmente, os agentes canabinóides vêm sendo muito utilizados, incluindo a própria *Cannabis sativa* (maconha). Tanto o extrato bruto quanto o princípio ativo delta 9-tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) presentes na planta mostraram um benefício no tratamento da dor e de disfunções motoras como, por exemplo, na EM e em injúrias medulares (Pertwee, 2005). Estudos têm demonstrado resultados favoráveis com o uso de canabinóides (naturais ou sintéticos) em modelos animais de EAE e humanos portadores de EM (Collin *et al.*, 2007; Kozela *et al.*, 2011; Oreja-Guevara, 2012). O extrato de *Cannabis sativa* e Δ^9 -THC, quando administrados por via oral, melhoraram de maneira significativa a dor, os espasmos e a qualidade do sono em pacientes com EM (Zajicek *et al.*, 2003). Outros autores verificaram que o tratamento com extrato de *Cannabis sativa* promoveu uma melhora significativa no índice de mobilidade, diminuiu a frequência de espasmos e o tremor dos pacientes com EM (Fox *et al.*, 2004; Vaney *et al.*, 2004). Collin e colaboradores (2010), em um estudo duplo-cego com portadores de EM que apresentavam espasticidade, demonstrou que o tratamento com Sativex® (medicamento contendo Δ^9 -THC e canabidiol) reduziu os espasmos desses indivíduos. Em animais, tanto a administração intraperitoneal do extrato de *Cannabis sativa* quanto a administração intravenosa do Sativex® foram efetivas em reduzir o déficit motor e a espasticidade de camundongos doentes (Buccellato *et al.*, 2011; Hilliard *et al.*, 2012). Em conjunto, esses resultados apontam uma relevância para o emprego de produtos naturais no tratamento dos sintomas da EM.

Uma vez que o uso medicinal da *Cannabis sativa* ou de seus derivados não é permitido em muitos países, é importante a realização de estudos com outras

plantas que tenham efeitos positivos em sintomas semelhantes aos da EM. Sendo relevante a tentativa de encontrar alternativas que possam minimizar a dor presente na EM de maneira mais eficaz.

1.5. Plantas medicinais com atividade antinociceptiva e seus princípios ativos

Algumas plantas utilizadas popularmente e alguns dos seus princípios ativos vêm sendo estudados ao longo dos anos e têm demonstrado resultados satisfatórios para processos dolorosos e inflamatórios. Algumas dessas, como o gengibre *Zingiber sp* (gengibre), *Capsicum sp* (pimenta) e a *Artemisia sp* artemísia entre outras utilizadas na medicina popular para tratar diversos sintomas dolorosos, inflamação e espasmos (Lorenzi e Matos, 2002), têm sido empregadas em diferentes modelos de dor (Calixto *et al.*, 2000; Almeida *et al.*, 2001; Garge e Adams 2012). Outras plantas como o *Ocimum gratissimum* L (manjerição), o *Hypericum polyanthemum* (hipérico), a *Cannabis sativa* (maconha) e a *Copaifera multijuga* Hayne (copaíba), também possuem atividade antinociceptiva demonstrada (Rabelo *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2007; Comelli *et al.*, 2009; Haas *et al.*, 2010). Stolz e colaboradores (2012), empregando no estudo um composto isolado de *Hypericum myrianthum*, a uliginosina B, demonstraram efeito na inibição da nocicepção (contorção abdominal e placa aquecida) por estimulação indireta do sistema opióide. Um outro estudo realizado demonstrou que a administração por via oral do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* L. (Lameaceae) e seus princípios ativos isolados, mirceno e eugenol, foram efetivos em aumentar a latência para lambar as patas no teste de placa quente, e reduzir a nocicepção induzida por formalina na fase aguda e crônica (Paula-Freire *et al.*, 2012). Estas atividades antinociceptivas podem ser

atribuídas aos constituintes químicos (princípios ativos) presentes nas plantas citadas acima, os quais podem exercer seu efeito por sinergismo, ou quando extraídos e aplicados, de maneira isolada.

Dentre as diversas plantas utilizadas popularmente no Brasil, ganharam destaque recentemente as espécies listadas como “plantas de interesse” do Sistema Único de Saúde (SUS), a partir da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) a qual foi aprovada em 2006. Esta política visa inserir terapias alternativas e práticas populares como a fitoterapia no SUS e estimula a pesquisa com tais plantas visando à comprovação de seus efeitos e a garantia de segurança com o seu tratamento. A *Phyllanthus amarus*, popularmente chamada de quebra-pedra, é um exemplo de planta utilizada como analgésica (entre outras aplicações) e que consta da lista de interesse da PNPMF (Brasil, 2006).

1.6. *Phyllanthus amarus* Schumach & Thonn. (Euphorbiaceae)

As plantas pertencentes ao gênero *Phyllanthus* são utilizadas na medicina popular para o tratamento de diabetes, herpes, disenteria, icterícia, infecções brônquicas e genitourinárias, assim como afecções renais (Lorenzi e Matos, 2002). Este gênero compreende cerca de 550 a 750 espécies e são popularmente conhecidas como “quebra pedra” devido ao seu uso para cálculos renais (Webster, 1994). Dentre as plantas pertencentes a este gênero, destaca-se a *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn. Esta planta cresce anualmente, medindo de 10 a 60 cm de altura (**Figura 1**) (Calixto *et al.*, 1998; Patel *et al.*, 2011)

Os metabólitos secundários encontrados nesta espécie são flavonóides, triterpenos, óleos voláteis, polifenóis, esteróis e os principais são as lignanas (filantina, hipofilantina, nirantina, filtetralina, nirtetralina, entre outras), que são as

mais estudadas devido às suas atividades biológicas (Huang *et al.*, 2003; Kassuya *et al.*, 2006; Maciel *et al.*, 2007; Krithika *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2009). Diversos efeitos foram descritos para os diferentes extratos de *Phyllanthus amarus*, as quais foram avaliadas tanto *in vitro* como *in vivo*, mostrando efeitos farmacológicos importantes contra hepatites, dor, inflamação, alergias, e vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) (Calixto *et al.*, 1998; Notka *et al.*, 2003). Os extratos aquoso e metanólico de *Phyllanthus amarus* produziram, em camundongos, inibição do edema de pata induzido por carragenina; este efeito foi mantido até 8h após o início do experimento (Raphael e Kuttan, 2003). Resultados semelhantes foram encontrados por Iranloye e colaboradores (2011) com extrato aquoso, que inibiu o edema de pata induzido por carragenina e reduziu a nocicepção na fase inflamatória do teste de formalina. O extrato metanólico também inibiu o edema de pata de ratos, não somente induzido por carragenina, como também pela bradicinina, serotonina e prostaglandina E1 (PGE₁) (Mahat e Patil, 2007). Kassuya e colaboradores (2003) mostraram efeito benéfico utilizando o extrato de partes aéreas de *Phyllanthus amarus* no tratamento da dor de origem inflamatória e neuropática em camundongos no modelo de ligação parcial do nervo ciático. A administração oral do extrato hexânico e de lignanas isoladas de *Phyllanthus amarus*, filtetralina, nirantina e nirtetralina inibiram o edema de pata induzido por carragenina e o influxo de neutrófilos. A nirtetralina e a filtetralina inibiram também o edema induzido pelo fator ativador de plaquetas (PAF) e pela endotelina -1 (ET-1) (Kassuya *et al.*, 2005). Kiemer e colaboradores (2003) demonstraram que tanto o extrato hexânico quanto o etanólico reduziram a expressão de e óxido nítrico sintase (iNOS) da cicloxigenase 2 (COX-2) e inibiram a ativação de NF-κB. Os mesmos extratos também inibiram a

indução IL-1 β , IL-10 e IFN- γ no sangue humano e redução da produção de TNF- α *in vivo*.



Figura 1: *Phyllanthus amarus* (Foto cedida pelo Dr. Benicio Pereira, CPQBA).

Além dos dados que demonstraram um potencial efeito anti-inflamatório e antinociceptivo, outros estudos avaliaram os efeitos tóxicos com diferentes extratos. A toxicidade foi avaliada em animais tratados com o extrato aquoso e hidroalcoólico da planta inteira e não foram observadas diferenças significativas no ganho de peso e no nível de glicose no sangue. Os testes bioquímicos também não revelaram nenhum sinal tóxico. Além disso, não foram encontradas alterações histopatológicas no fígado, rim e pâncreas tanto para o tratamento agudo quanto para o crônico (Lawson-Evi *et al.*, 2008). No entanto, em outro trabalho, a análise histológica realizada com os rins de ratos que receberam o extrato aquoso de *Phyllanthus amarus* por 28 dias indicaram hipertrofia dos vasos sanguíneos, infiltrado de células inflamatórias e diferentes graus de necrose tubular (Andrew e Enogieru, 2011).

Ainda que existam contradições com relação à toxicidade da *Phyllanthus amarus*, os potenciais efeitos biológicos comprovados em conjunto com a sua utilização na medicina tradicional não descartam seus benefícios. Sendo assim, estudos que possam avaliar a atividade desta planta em modelos que mimetizam alguns sintomas de doenças autoimunes, como a EM (dor e déficit motor), são relevantes.

1.7. Trans-cariofileno

Muitas plantas são ricas em óleos essenciais, os quais são compostos aromáticos voláteis, como os terpenos e fenilpropanoides (Pichersky *et al.*, 2006). O trans-cariofileno (**Figura 2**) é um sesquiterpeno (hidrocarboneto de fórmula química $C_{15}H_{24}$) encontrado em grandes quantidades nos óleos essenciais de muitas plantas usadas como condimentos, tais como orégano (*Origanum vulgare* L.), canela (*Cinnamomum spp.*), pimenta preta (*Piper nigrum* L.), e no cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.) (Ghelardini *et al.*, 2001; Mockute *et al.*, 2001; Jayaprakasha *et al.*, 2003; Orav *et al.*, 2004). É encontrado também no óleo essencial da *Cannabis sativa* (Nigam *et al.*, 1965; Malingré *et al.*, 1975), *Ocimum gratissimum* (Silva *et al.*, 1999), *Cordia verbenacea* (Carvalho-Junior *et al.*, 2004) e *Copaifera multijuga* (Gomes *et al.*, 2007), plantas que possuem efeitos analgésicos e anti-inflamatórios reportados na literatura. Estudos recentes demonstraram que o trans-cariofileno possui atividade anti-inflamatória (Fernandes *et al.*, 2007; Medeiros *et al.*, 2007), antinociceptiva (Chavan *et al.*, 2010), anestésica (Ghelardini *et al.*, 2001), ansiolítica (Galdino *et al.*, 2012), antioxidante e hepatoprotetora (Calleja *et al.*, 2013), se mostrou eficaz no tratamento da colite (Cho *et al.*, 2006), além de apresentar efeito anti-espasmódico por bloqueio de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (Pinho-

da-Silva *et al.*, 2012). Gertsch (2008) demonstrou que o trans-cariofileno atua como agonista de receptores canabinóides do tipo 2 (CB₂). Horváth e colaboradores (2012) verificaram que administração de trans-cariofileno melhorou a nefrótoxicidade induzida por cisplatina (antineoplásico), atenuando também o estresse oxidativo e a morte celular. Segundo os autores, este efeito foi mediado através de uma via dependente de receptores CB₂, uma vez que não foi observada esta melhora em animais *knockout* para este receptor.

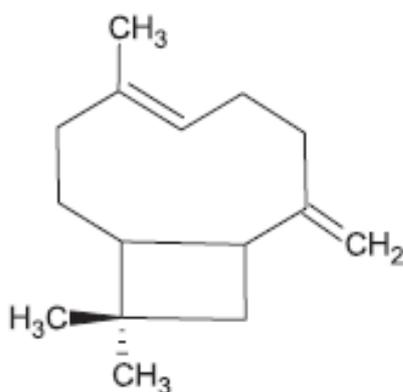


Figura 2: Estrutura química do trans-cariofileno.

A atividade modulatória do sistema canabinóide sobre os processos dolorosos tem sido estudada (Harris *et al.*, 2000; Chapman, 2001). Alguns autores demonstraram que a administração de drogas agonistas canabinóides atenua a dor aguda, inflamatória ou neuropática em diferentes modelos (Martin *et al.*, 1999; Petrosino *et al.*, 2007; Karbarz *et al.*, 2009). Estudos recentes têm relatado a participação dos receptores CB₂ no controle da nocicepção (Malan *et al.*, 2001; Naguib *et al.*, 2008; Kinsey *et al.*, 2011). O trans-cariofileno, como agonista CB₂, tem diversos efeitos biológicos demonstrados, incluindo antinocicepção. Portanto, seria interessante verificar o efeito deste composto sobre a hipernocicepção no modelo de EAE, e também seu papel sobre o desenvolvimento da doença.

2. JUSTIFICATIVA

Sabe-se que a dor está entre as principais manifestações clínicas em indivíduos acometidos pela EM e que, muitas vezes, surge antes de sintomas como o déficit motor e tremores (Osterberg *et al.*, 2005). A procura por novas drogas (sintéticas ou de origem natural) que possam ser utilizadas para o alívio da dor relacionada à EM poderia beneficiar os portadores da doença. O Brasil possui uma grande variedade de plantas com compostos biologicamente ativos, as quais apresentam uma ampla diversidade de metabólitos secundários com diferentes atividades biológicas (Santos, 2001), o que justifica a necessidade de um aprofundamento no conhecimento das suas propriedades farmacológicas. Segundo Maciel e colaboradores (2002), fatores ambientais são responsáveis por modificações nos teores dos constituintes químicos de espécies vegetais como a fertilidade do solo, umidade, radiação solar, vento, temperatura e poluição do solo. Outros fatores como idade da planta e época de coleta também podem promover essas modificações. Estas variáveis estão associadas às discrepâncias sobre eficácia de algumas plantas ou constituintes isolados, os quais podem acarretar em uma grande dificuldade e resistência para a utilização de plantas medicinais na terapêutica. Entretanto, muitos estudos reportaram os efeitos biológicos obtidos com a utilização de plantas, como a *Phyllanthus amarus*, e também de princípios ativos, tais como o transcariofileno. Sendo assim, o conhecimento adquirido com o estudo destas plantas e de princípios ativos, são importantes na investigação sobre a EAE.

3. OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito antihipernociceptivo do extrato hexânico de *Phyllanthus amarus* e do trans-cariofileno no modelo de encefalomielite autoimune experimental.

3.1. Objetivos específicos

Os experimentos foram divididos em etapas:

- Traçar o perfil fitoquímico e farmacológico do extrato hexânico de *Phyllanthus amarus*;
- Avaliar hipernocicepção e a coordenação motora no modelo de EAE após administração do extrato hexânico de *Phyllanthus amarus*;
- Avaliar a hipernocicepção e a coordenação motora no modelo de EAE após tratamento com trans-cariofileno;
- Avaliar a resposta imune adaptativa após tratamento com o trans-cariofileno.

4. METODOLOGIA GERAL

Esta tese foi dividida em 3 etapas: A etapa 1 corresponde ao estudo com a planta (*Phyllanthus amarus*) - análise fitoquímica e testes iniciais, e contendo objetivos, métodos e resultados em animais saudáveis. Na etapa 2, estão descritos o teste piloto e o tratamento com extrato da planta no modelo de EAE. Ao final desta segunda etapa se encontra uma discussão referente a as etapas 1 e 2. A etapa 3 corresponde ao tratamento com o trans-cariofileno, contendo também os objetivos, métodos, resultados (em animais com EAE) seguido de discussão.

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos *inbred* C57BL/6J fêmeas de 6-8 semanas e de 12 semanas provenientes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para a Medicina e Biologia - CEDEME. Os animais foram mantidos em salas sob controle de temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas às 7:00 horas da manhã) com água e comida à vontade. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (CEP 0674/09 – ANEXO 1).

4.2. Drogas

Para a indução da EAE, utilizou-se um peptídeo derivado da glicoproteína da mielina dos oligodendrócitos (MOG₃₅₋₅₅) sintetizado pela Proteimax (São Paulo, Brasil), adjuvante incompleto de Freund (IFA; Sigma St. Louis, EUA), *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (BD Difco, EUA) e também a toxina de *Bordetella pertussis* (Sigma, St. Louis, MO, EUA). O trans-cariofileno foi adquirido da Sigma (St. Louis,

EUA) e diluído em solução estéril de NaCl 0,9 mg/mL (salina) com 1% de Tween 80. A naloxona (Sigma, St. Louis, EUA), antagonista opióide não seletivo, foi diluído em solução estéril de NaCl 0,9 mg/mL (salina), e o AM630 (Sigma, St. Louis, EUA), antagonista canabinóide (CB₂), foi diluído em solução estéril de NaCl 0,9 mg/mL (salina) com Dimetilsufóxido 0,3 mg/mL (DMSO) (Sigma, St. Louis, EUA).

4.3. Material Vegetal

O material botânico foi cultivado e coletado no Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da UNICAMP (Campinas, SP), e sua identificação botânica foi realizada pela Dra. Grady L. Webster (Departamento de botânica, Universidade da Califórnia, Davis, EUA). A exsicata (*Phyllanthus amarus Schumacher & Thonn.*) foi depositada no herbário do Instituto de Biologia da UNICAMP (Campinas, Brasil) com o código UEC 127.411.

4.4. Extrato da planta

O material vegetal seco (2 kg) foi triturado e colocado em sacos feitos com papel filtro. A preparação do extrato foi feita usando 25 g do pó da planta e hexano (250 mL) como solvente, em aparelho Soxhlet. O solvente foi aquecido por uma manta térmica (aproximadamente de 60° C) durante duas horas e 30 minutos. O extrato foi concentrado em rotaevaporador, e seco em banho-maria a 40° C, sendo obtidos 10% de extrato bruto (Jadhav *et al.*, 2009). O extrato foi estocado em frasco vedado e mantido dentro de um dessecador na geladeira.

5. ETAPA 1

Esta etapa foi realizada com intuito de verificar se os constituintes químicos, tais como as lignanas já descritas na literatura (Maciel *et al.*, 2007; Krithika *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2009), seriam encontradas no extrato hexânico de *Phyllanthus amarus* cultivada no CPQBA, assim como confirmar os efeitos antinociceptivos já demonstrados (Santos *et al.*, 1995; Kassuya *et al.*, 2006).

5.1. Objetivos específicos

- Determinar o perfil fitoquímico do extrato hexânico de *Phyllanthus amarus*
- Realizar a triagem farmacológica inicial com administração oral do extrato hexânico de *Phyllanthus amarus*
- Verificar os efeitos antinociceptivos do extrato hexânico da *Phyllanthus amarus* através dos testes de formalina na pata e placa quente.

5.2. Métodos

5.2.1. Análise do extrato por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)

Este procedimento foi realizado pela Dr. Giuseppina Negri, no Departamento de Química da Universidade de São Paulo. O extrato hexânico de *Phyllanthus amarus* (1 µL) foi analisado por CG/EM usando o equipamento da Shimadzu GCMS-QP505A da Central Analítica da USP. O extrato foi diluído na proporção 1:1 com éter etílico antes da análise. Foi utilizada uma coluna capilar BPX5 (5% fenil 95% polisilfenilenesiloxano) (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) e He como gás de arraste com

fluxo de 1 mL min⁻¹. A temperatura do injetor e do detector foi 250 °C. As condições cromatográficas utilizadas para o aquecimento da coluna cromatográfica foram: temperatura inicial 60°C durante 3 minutos; velocidade de aquecimento 6 °C min⁻¹ até 300 °C, permanecendo 20 minutos nesta temperatura. O “split” utilizado foi de 100:1. As condições utilizadas no espectrômetro de massas foram, ionização por impacto de elétrons (EI) com energia de ionização de 70 eV; temperatura da fonte e da interface 250 °C e 280 °C, respectivamente e limite de massas 34 - 600 u. A identificação das lignanas foi feita através dos seus respectivos íons moleculares e principais fragmentos, os quais foram comparados com os dados de lignanas já reportadas para o gênero *Phyllanthus* (Krithika *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2003). Quantidades relativas dos constituintes desse extrato foram assumidas como sendo proporcionais às áreas sob os picos correspondentes no cromatograma obtido.

5.2.2. Triagem farmacológica inicial

Os camundongos foram tratados via oral com extrato hexânico de *Phyllanthus amarus* (EHPa), nas doses 100, 200 ou 400 mg/kg ou apenas veículo (grupo controle - solução aquosa contendo Tween 80 a 1%). Após a administração, os animais foram imediatamente colocados em gaiolas de arame (**Figura 3**) e observados aos 5, 10, 15, 30, 60, 120, 240 minutos e 24 horas, registrando-se as alterações comportamentais identificadas de acordo com protocolo pré-estabelecido (Carlini, 1972; Paula-Freire *et al.*, 2012). Essas são: micção, defecação, “writhes” (contorções abdominais), piloereção, ptose palpebral, atividade motora, tônus muscular, tremores ou convulsões, ataxia, sensibilidade dolorosa, sinais de estereotipa, bocejos, sono, auto-limpeza, lacrimejamento, salivação e qualquer outro sinal relevante. Todos os animais foram eutanasiados, por decaptação, após 24

horas e foi realizada análise macroscópica do fígado, rins e estômago para verificar possíveis sinais tóxicos.



Figura 3: Gaiolas de arame utilizadas para realização da triagem farmacológica inicial (foto – acervo pessoal).

5.2.3. Medida da coordenação motora (rota rod)

A coordenação motora de camundongos foi avaliada por meio do aparelho rota rod, o qual consiste de uma barra giratória, com um diâmetro de 3 cm e comprimento de 60 cm, dividida em 5 compartimentos iguais por discos de 24 cm de diâmetro cada. O sistema ficava elevado a 40 cm do balcão e girava a uma velocidade de 12 rpm (**Figura 4**). Para o teste de coordenação motora, foram pré-selecionados os animais que permaneceram sobre a barra giratória por 60 segundos em uma de três tentativas consecutivas antes da administração do extrato da planta. Esses animais receberam veículo (controle - CTRL) ou EHPa nas doses de 100, 200 ou 400 mg/kg (v.o.). A avaliação foi realizada antes (basal) e aos 30, 60 e 120

minutos após a administração, anotando-se o tempo de permanência máxima em segundos na barra (Marques *et al.*, 2004).



Figura 4: Aparelho de rota rod (fonte - acervo pessoal).

5.2.4. Avaliação da ação antinociceptiva

5.2.4.1. Teste da placa quente

Os animais foram distribuídos em grupos e receberam, por via oral, veículo (controle - CTRL) ou EHPa (mesmas doses mencionadas nos testes anteriores). Um grupo de animais (controle positivo) recebeu morfina na dose de 5 mg/kg (i.p.). Após a administração, os animais foram colocados sobre a placa (Ugo Basile, Biological Research Apparatus Company, Comerio, Itália – **Figura 5**) aquecida a 50°C. O tempo de reação foi definido como a latência para o animal lambar a(s) pata(s) ou saltar da placa, com um tempo máximo de exposição de 60 segundos (Hargraves e Hentall, 2005).



Figura 5: Placa quente utilizado para avaliar a sensibilidade térmica dos animais (foto – acervo pessoal).

5.2.4.2. Teste da formalina na pata

Os animais foram tratados, por via oral, com veículo (controle - CTRL) ou EHPa (mesmas doses mencionadas nos testes anteriores). Um grupo de animais (controle positivo) recebeu morfina na dose de 5 mg/kg, por via intraperitoneal. Uma hora após a administração do extrato ou 30 minutos da morfina, os animais receberam uma injeção intraplantar de formalina 2% (20 μ l/animal). Imediatamente após a injeção, o tempo foi cronometrado avaliando, em segundos, as lambidas na pata injetada durante a fase aguda (5-10 minutos, neste período inicial os nociceptores são ativados pela injeção de formalina gerando uma resposta rápida) e a fase crônica (15-30 minutos, no segundo momento do teste são liberados mediadores inflamatórios devido ao estímulo) do teste (Hunskar e Hole, 1987).

5.3. Análise Estatística

Na análise dos resultados, foram utilizados testes paramétricos considerando a natureza das variáveis estudadas. A Análise de variância (ANOVA de uma via) foi utilizada para análise dos testes de placa quente e formalina na pata. No teste de coordenação motora foi utilizada a ANOVA de medidas repetidas e, quando necessário, foi aplicado o *post hoc* de Newman-Keuls. O nível de significância considerado foi $p < 0,05$. Todos os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM).

5.4. Resultados

5.4.1. Análise do extrato hexânico de *Phyllanthus amarus* usando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM).

Como pode ser visto na **Tabela 1**, as principais lignanas encontradas no extrato hexânico foram filantina, constituinte principal (30%), 5-demetoxinirantina (24%) e nirantina (16%) (**Figura 6**), as quais são do tipo diarilbutano (Wang e Lee, 2005). O espectro de massas destas 3 lignanas apresentou o pico base em m/z 151 ($C_9O_2H_{11}$)⁺, correspondente ao fragmento dimetoxi benzílico (fragmento de dimetoxi benzílico) (Krithika *et al.*, 2009). O espectro de massas da filantina mostrou o íon molecular em m/z 418 ($C_{24}O_6H_{34}$) enquanto que a 5-demetoxinirantina apresentou o íon molecular em m/z 402 ($C_{23}O_6H_{30}$) e a nirantina em m/z 432 ($C_{24}O_7H_{42}$). Fragmentos em m/z 135 (80%) ($C_8O_2H_7$), correspondente ao fragmento metilenedioxi benzeno, e em m/z 166 ($C_9O_3H_{10}$), correspondente ao fragmento metilenedioxi-metoxibenzeno, foram importantes para a identificação da 5-demetoxinirantina e da nirantina, respectivamente. As lignanas do tipo ariltetralina, tais como, filtetralina (m/z 416), lintetralina (m/z 400), urinatetralina (m/z 384),

hipofilantina (m/z 430) e nirtetralina (m/z 430) foram encontrados em pequenas concentrações. Além dessas, uma lignana do tipo tetrahydrofurano (Chang *et al.*, 2003), urinaligrana (m/z 400), também foi detectada em baixas concentrações, junto com 2 lignanas do tipo diarilbutirolactona, a hinokinina e a dextrobursehernina.

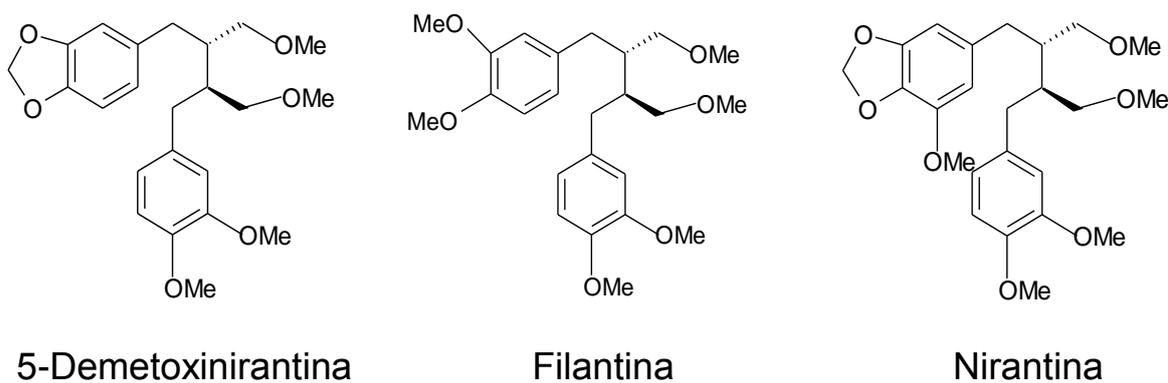


Figura 6: Estrutura das lignanas encontradas em maior quantidade no extrato hexânico de *Phyllanthus amarus*

Tabela 1 – Lignanas identificadas no EHPa através da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

Rt (min)	m/z	Padrão de Fragmentação	Fórmula Molecular	Estrutura	Pico da Área
39,99	402	151 (100), 135 (80), 77 (50), 203 (40), 187 (40), 177 (30), 115 (30), 107 (40), 91 (30)	C ₂₃ O ₆ H ₃₀	5-Demetoxinirantina	24%
40,41	418	151 (100), 203 (40), 177 (30), 107 (30), 386 (20), 203 (40), 189 (40), 177 (30), 121 (30), 107 (30), 91 (30)	C ₂₄ O ₆ H ₃₄	Filantina	31%
40,58	416	151(60), 201 (40), 176 (30), 339 (40), 353 (30), 201 (45), 176 (30), 165 (30), 129 (30), 91 (50)	C ₂₄ O ₆ H ₃₂	Filtetralina	4%
40,65	400	151 (80), 135 (60), 77 (80), 323 (50), 372 (30), 201 (40), 177 (30), 165 (40), 91 (50)	C ₂₃ O ₆ H ₂₈	Lintretalina	2%
40,80	400	323 (50), 305 (40), 253 (40), 208 (30), 151(50), 185 (35), 323 (50), 337 (40),	C ₂₂ O ₇ H ₂₄	Urinaligrana	5%
40,93	384	135 (60), 152 (50), 185 (50), 307 (50), 280 (50), 209 (30), 115 (30)	C ₂₂ O ₆ H ₂₄	Urinatetralina	2%
41,07	430	215 (40), 208 (40), 165 (30), 151 (30), 353 (30), 367 (30), 252 (30)	C ₂₄ O ₇ H ₃₀	Hipofilantina	2%
41,16	430	215 (60), 208 (55), 151 (50), 165 (40), 223 (40), 353 (30)	C ₂₄ O ₇ H ₃₀	Nirtetralina	3%
42,20	432	151 (100), 166 (90), 203 (40), 107 (30), 91 (30), 217 (25)	C ₂₄ O ₇ H ₃₂	Nirantina	16%
42,23	354	135 (100), 165 (30), 77 (50), 115 (30), 105 (40)	C ₂₀ O ₆ H ₁₈	Hinoquinina	2%
42,74	370	151 (100), 135 (60), 77 (60), 107 (40), 91 (40)	C ₂₁ O ₆ H ₂₂	Dextrobusermina	2%

5.4.2. Triagem farmacológica inicial

A administração oral de EHPa não produziu alterações em nenhum dos parâmetros comportamentais analisados, e nem nos órgãos visualizados macroscopicamente em relação ao grupo CTRL. Sendo assim, como não foram observados efeitos que poderiam ser tóxicos, as doses de 100, 200 ou 400 mg/kg administradas foram utilizadas em testes posteriores.

5.4.3. Medida da coordenação motora (rota rod)

Na **Tabela 2** estão representados os tempos de avaliação, após administração das doses de 100, 200 ou 400 mg/kg do EHPa. Nenhuma das 3 doses afetaram a coordenação motora dos animais quando comparadas ao grupo CTRL (1% de Tween 80). Este resultado indica que o extrato da planta nas doses utilizadas não parece exercer efeito neurotóxico.

Tabela 2: Efeito da administração oral aguda do extrato hexânico de *Phyllanthus amarus* sobre a coordenação motora de camundongos submetidos ao teste de rota rod.

Tratamento	Dose (mg/kg)	Tempo de Permanência no Rota Rod (seg.) (Média ± EPM)			
		Intervalos de Observação (min.)			
		Basal	30	60	120
CTRL	-	59,8 ± 0,1	60,0 ± 0	59,1 ± 1	57,5 ± 3
EHPa	100 mg/kg	60,0 ± 0	59,8 ± 0,3	59,8 ± 0,2	60,0 ± 0
EHPa	200 mg/kg	59,7 ± 0,2	60,0 ± 0	59,5 ± 0,1	57,6 ± 2
EHPa	400 mg/kg	57,8 ± 2	60,0 ± 0	59,7 ± 0,3	60,0 ± 0

(ANOVA de medidas repetidas, n.s. n=6/grupo).

5.4.4. Avaliação da ação antinociceptiva

5.4.4.1. Teste da placa quente

No teste de resposta ao estímulo térmico, o tratamento com a dose de 400 mg/kg do EHPa e com a morfina foram efetivos em aumentar o tempo de permanência sobre a placa aquecida quando comparados ao grupo CTRL ($F_{(4,25)} = 9,31, p < 0,001$) (Figura 7).

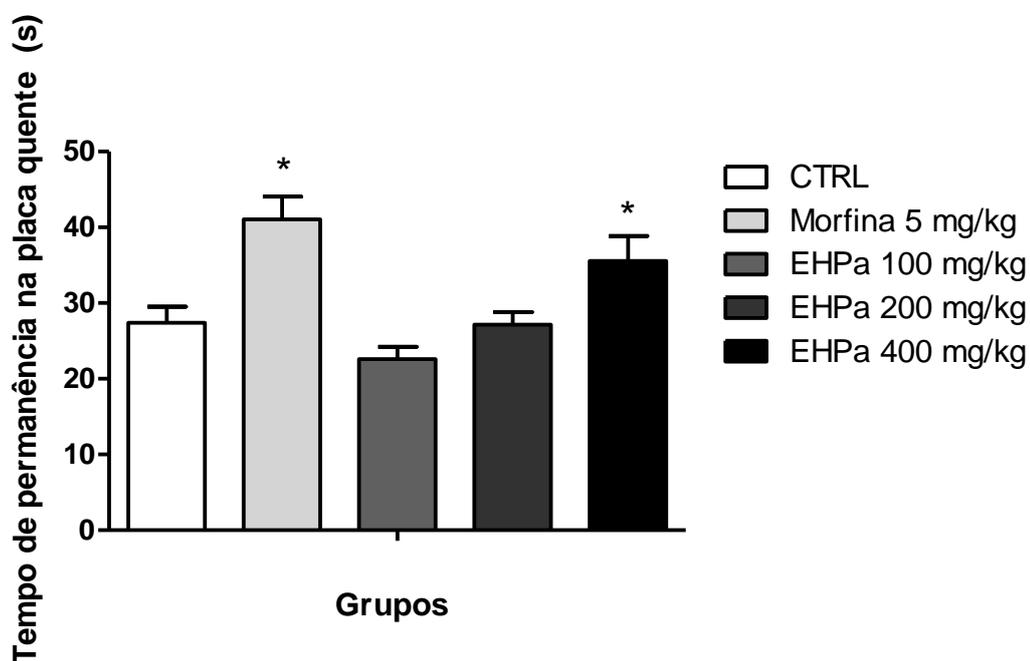


Figura 7: Influência do tratamento com EHPa no tempo de permanência sobre a placa aquecida. Os dados estão representados em Média \pm EPM. *Grupos que diferem do CTRL; (ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls, $p < 0,05$, $n=8$ /grupo).

5.4.4.2. Teste de formalina na pata

A **Figura 8** mostra o efeito do tratamento de EHPa nas doses de 100, 200 ou 400 mg/kg (v.o.), ou morfina (5 mg/kg) por via intraperitoneal. As 3 doses administradas foram efetivas em diminuir o tempo de lambidas na pata injetada na fase aguda ($F_{(4,32)}=7,02$, $p<0,001$) e na fase crônica ($F_{(4,32)}=6,04$, $p<0,001$), assim como a morfina, quando comparadas ao grupo CTRL.

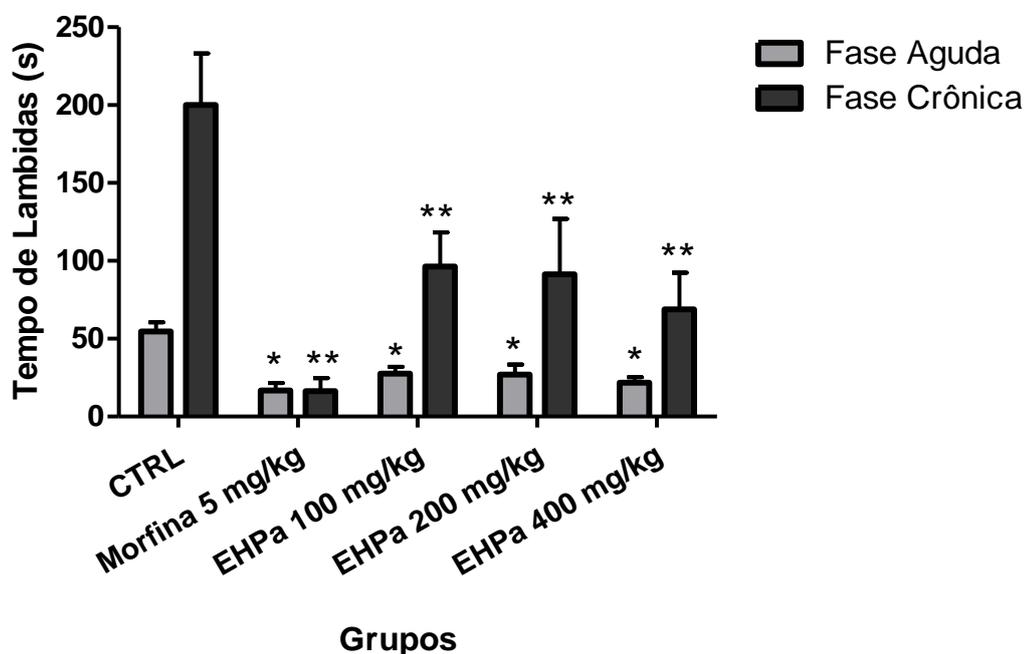


Figura 8: Efeito do tratamento oral com extrato hexânico de *Phyllanthus amarus* nas fases aguda e crônica da nocicepção induzida por formalina na pata de camundongos. Os dados estão representados pela Média \pm EPM. Grupos que diferem estatisticamente do grupo CTRL na fase aguda (* $p<0,001$) e na fase crônica (** $p<0,01$) (Anova de uma via seguida do teste de Newman-Keuls, $n=8$ /grupo).

6. ETAPA 2

Nesta etapa foi feito um teste piloto para implementação do modelo de EAE no laboratório, com a padronização das medidas de hipernocicepção e coordenação motora. Assim que o modelo foi estabelecido, iniciou-se o tratamento com o extrato da planta para verificar sua atividade sobre a hipernocicepção e sobre o desenvolvimento da doença.

6.1. Objetivos específicos

- Realizar o teste piloto para padronizar a medida de hipernocicepção no modelo de EAE.
- Verificar atividade do extrato hexânico de *Phyllanthus amarus* sobre a hipernocicepção no modelo de EAE

6.2. Métodos

6.2.1. Indução da EAE

A EAE foi induzida em camundongos que receberam, por via subcutânea, 200 µg de MOG₃₅₋₅₅ diluída em adjuvante incompleto de Freund (IFA) contendo 5 mg/mL de *M. tuberculosis* (H37Ra, Difco) no flanco. A injeção de 300 ng de toxina de *Bordetella pertussis* (i.p.) foi realizada imediatamente após a indução da EAE e repetida 48 horas depois. Os animais foram acompanhados diariamente por 26 dias consecutivos para avaliar o desenvolvimento da doença de acordo com os seguintes critérios: (0), ausência de sintomas; (1), perda do tônus da cauda; (2), paralisia parcial dos membros posteriores; (3), paralisia total dos membros posteriores; (4), paralisia total dos membros posteriores e parcial dos anteriores; (5), diminuição da

responsividade e morte (Olechowski *et al.*, 2009). Os animais que atingiram grau 4 foram avaliados 2 vezes ao dia, e eutanasiados, por decaptação, na ocorrência de 3 graus 4 consecutivos.

6.2.2. Grupos experimentais para implementação do modelo

O experimento foi realizado com o intuito de implantar o modelo de EAE e padronizar a avaliação da hipernocicepção no laboratório do Departamento de Psicobiologia. Para isso, os animais foram imunizados e passaram por avaliações no von Frey eletrônico (estimulação mecânica) e no rota rod, seguindo os protocolos descritos a seguir. Foram utilizados 4 grupos animais: MOG/CFA + Pertussis (n=12), CFA + Pertussis (n=10), CFA + PBS (n=9), PBS + Pertussis (n=9). O PBS é a solução para diluição da MOG.

6.2.3. Medida da coordenação motora (rota rod)

O aparelho utilizado para avaliação da coordenação motora foi o mesmo descrito nos métodos da Etapa 1. Os camundongos foram treinados por 3 dias consecutivos, antes da indução da EAE, para permanecerem por 120 segundos (tempo máximo) sobre a barra giratória (16 rpm) (modificado de Olechowski *et al.*, 2009). A avaliação foi realizada antes (basal) e após a indução da EAE em dias alternados, anotando-se o tempo de permanência sob a barra giratória.

6.2.4. Hipernocicepção mecânica (von Frey eletrônico)

Os animais foram ambientados em um aparato de madeira e chão gradeado 20 minutos antes de serem avaliados. O von Frey eletrônico é um aparelho composto por um transdutor ligado por um fio a um contador digital que expressa em

gramas (18 g máximo para camundongos) a pressão que é exercida na pata (**Figura 9**). A hipernocicepção mecânica em resposta ao estímulo tátil foi avaliada antes (em ambas as patas) e depois (em patas alternadas) da indução da EAE. Uma pressão crescente foi aplicada no centro da superfície plantar de uma das patas posteriores até que o animal emitisse uma resposta caracterizada “*flinch*” (sacudir a pata), lambida ou retirada brusca da pata estimulada. A medida era realizada quando os animais estavam parados, acordados e com os membros posteriores apoiados sobre o chão gradeado (Cunha *et al.*, 2004). A intensidade da resposta foi quantificada pela variação na pressão exercida na pata estimulada (média de 3 valores). O delta foi calculado pela subtração da média (3 valores) anotada antes da indução da EAE, e observada em dias alternados, a partir do 2º dia após a indução até o 12º dia.

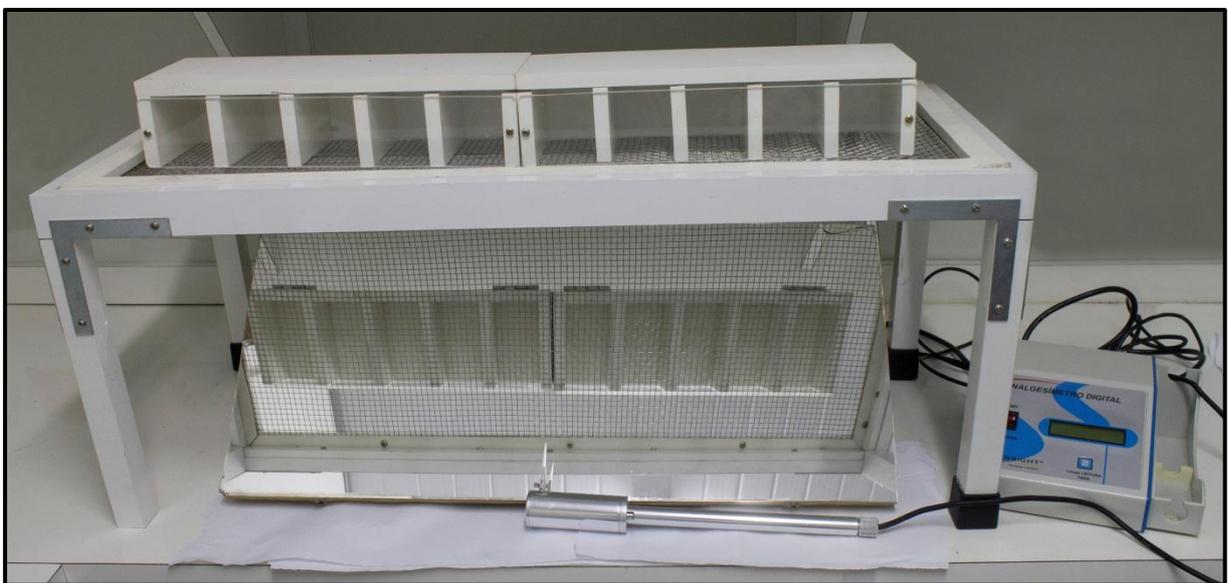


Figura 9: Aparato utilizado no teste de von Frey (foto – acervo pessoal).

6.3. Tratamento crônico com EHPa no modelo de EAE

Após padronizar o modelo de EAE, a medida de hipernociceção e da coordenação motora, foi realizado um experimento com o intuito de avaliar a atividade do EHPa neste modelo. O tratamento com o extrato da planta em estudo teve início no dia da indução da doença e duração de 26 dias consecutivos. Os camundongos receberam EHPa diluído em água com 1% de Tween 80, nas doses de 100, 200 ou 400 mg/kg (v.o.). Dois grupos de animais foram tratados com o veículo e chamados de EAE (doente) e de CTRL (não doente). O desenvolvimento da EAE foi acompanhado a partir do 8º dia da indução da doença e, diariamente após esse período. O peso corpóreo dos animais foi avaliado a cada 4 dias, e a coordenação motora e hipernociceção (1 hora após administração dos tratamentos) foram verificadas a cada 2 dias. Estes testes comportamentais foram interrompidos no 12º dia, pois alguns animais apresentavam sinais clínicos (doença) em todos grupos, o que não permitiu a continuidade das avaliações. Porém, a observação dos sinais clínicos continuou e, ao final dos 26 dias, os animais foram eutanasiados por decapitação (**Figura 10**).

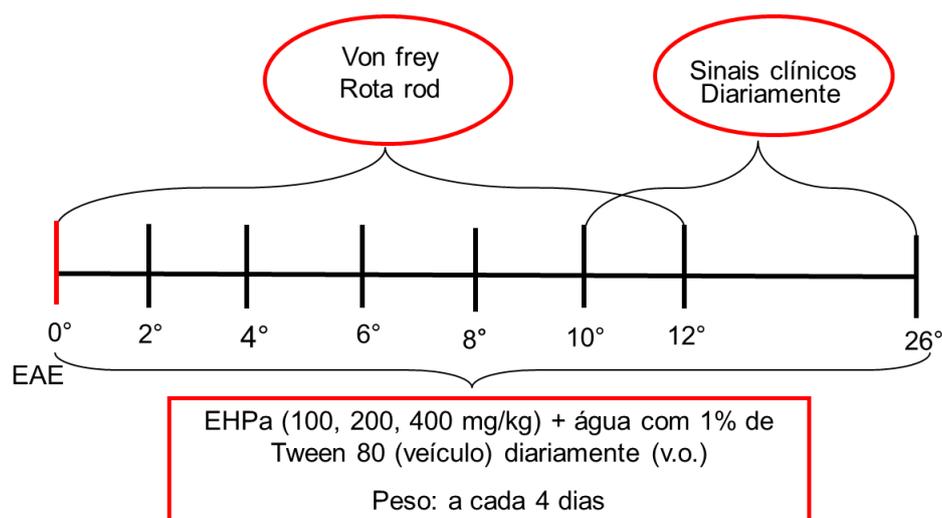


Figura 10: Esquema de tratamento crônico com extrato hexânico de *Phyllanthus amarus* e testes comportamentais.

6.4. Análise Estatística

Na análise dos resultados, testes paramétricos e não paramétricos foram utilizados, levando-se em consideração a natureza das variáveis estudadas. Para a análise dos resultados do experimento piloto (von Frey, rota rod e peso) foi utilizada Análise de Variância (ANOVA de medidas repetidas) seguida de Newman-Keuls quando necessário. Os resultados do tratamento com EHPa foram analisados pelos testes Kruskal-Wallis e Friedman seguido de Wilcoxon para o teste de coordenação motora (rota rod). O desenvolvimento da doença foi analisado empregando o teste de Kruskal-Wallis, e após a somatória dos escores de cada um deles por ANOVA de uma via. Para a hipernocicepção mecânica e peso corpóreo foi utilizado ANOVA de medidas repetidas seguido de Newman-Keuls, quando necessário. O nível de significância considerado foi $p < 0,05$. Todos os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM).

6.5. Resultados - Implementação utilizando animais com EAE

6.5.1. Indução da EAE

Neste experimento piloto, os animais que receberam a injeção contendo MOG/CFA + Pertussis desenvolveram os sinais clínicos, como perda do tônus da cauda, a partir do 10º dia após a indução da EAE. Entre o 14º e o 19º dias, aproximadamente 75% dos camundongos estavam no pico da doença, sendo que os membros inferiores estavam parcial ou totalmente paralisados. A partir do 21º, dia houve diminuição destes sinais clínicos, os quais permaneceram em regressão até o último dia da avaliação. Estes sinais não foram observados nos outros grupos que receberam CFA + Pertussis, CFA+ PBS e PBS + Pertussis, uma vez que, para o

desenvolvimento da EAE é necessário, neste caso, a injeção completa contendo a MOG (**Figura 11**).

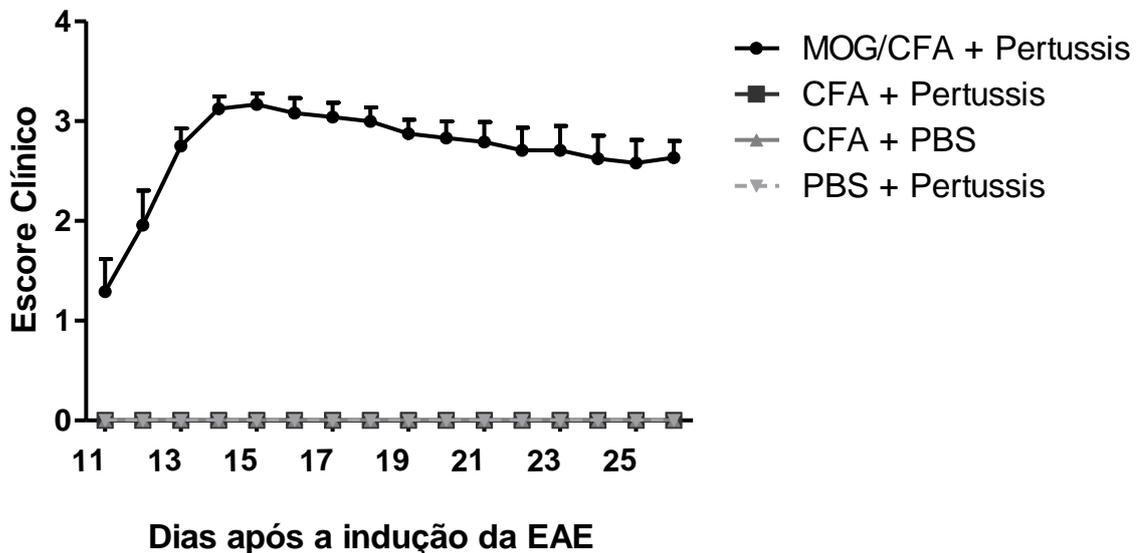


Figura 11: Progressão dos sinais clínicos em camundongos com EAE. Os animais receberam uma injeção contendo MOG/CFA + Pertussis (n=12) e os outros grupos CFA + Pertussis (n=10), CFA + PBS (n=9) ou PBS + Pertussis (n=9). Estes três últimos grupos não desenvolveram a doença, e estão representados no eixo x (escore zero). Os dados estão representados pela média \pm EPM.

Como observado na **Figura 12**, os animais também foram pesados a cada 4 dias a partir da indução. O grupo que recebeu a injeção com a MOG diferiu estatisticamente dos outros grupos, apresentando uma redução do peso observada nos 16º e 20º dias, correspondentes ao pico da EAE ($F_{(18, 216)} = 2,37$, $p < 0,001$).

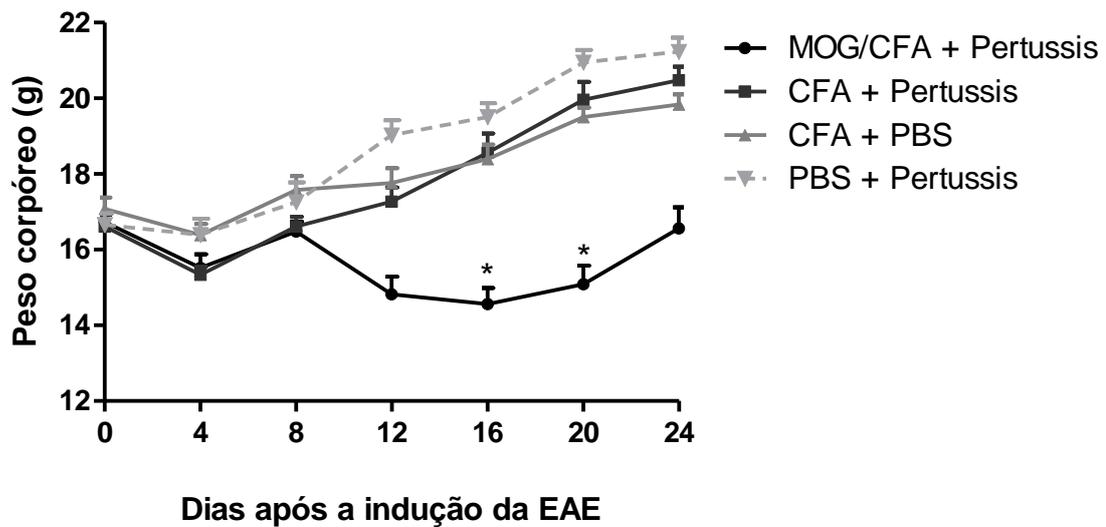


Figura 12: Peso corpóreo em animais com EAE. Os animais receberam uma injeção com MOG + CFA + Pertussis e os outros grupos CFA + Pertussis, CFA + PBS ou PBS + Pertussis. Os dados estão representados pela Média \pm EPM. O grupo de animais com MOG + CFA + Pertussis difere dos demais grupos nos dias 16 e 20 após a indução. (ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida de Newman-Keuls, * $p < 0,05$, $n = 9-12$ /grupo).

6.5.2. Medida da coordenação motora (rota rod)

Os animais que receberam a MOG/CFA + Pertussis tiveram um prejuízo significativo na coordenação motora ($F_{(3, 31)} = 4,21$, $p < 0,01$). Este prejuízo foi visto no 12º dia após a indução da EAE, quando comparado aos grupos CFA + Pertussis, CFA + PBS e PBS + Pertussis (**Tabela 3**).

Tabela 3: Medida da coordenação motora de camundongos com EAE submetidos ao teste de rota rod.

Grupos	Tempo de Permanência no Rota Rod (seg)						
	(Média ± EPM)						
	Intervalo de observação (dias)						
	Basal	2° dia	4° dia	6° dia	8° dia	10° dia	12° dia
MOG/CFA+P	119,1±0,8	110,4±4,4	109,6±4,3	114,7±3,9	114,1±4,3	93,8±11,1	45,7±13,9*
CFA+P	120,0±0	114,4±3,1	103,5±7,3	110,8±5,1	110,9±6,2	110,9±5,1	117,6±1,9
CFA+PBS	118,2±1,8	112,3±5,0	116,5±2,3	108,6±6,2	119,3±0,6	120,0±0	117,3±2,6
PBS+P	120,0±0	112,1±5,2	108,2±8,4	118,7±1,2	120,0±0	112,1±6,3	119,3±0,6

(ANOVA de medidas repetidas seguida de Newman-Keuls * $p < 0,05$, MOG/CFA+Pertussis vs CFA + Pertussis, CFA + PBS e PBS + Pertussis).

6.5.3. Hipernocicepção mecânica (von Frey eletrônico)

O teste piloto teve o intuito de avaliar a hipernocicepção mecânica em camundongos que receberam a MOG/CFA + Pertussis. A intensidade de hipernocicepção da pata estimulada no grupo que desenvolveu a EAE foi aumentada significativamente quando comparado aos grupos CFA + Pertussis, CFA + PBS ou PBS + Pertussis ($F_{(15, 150)} = 4,26$, $p < 0,01$), evidenciando assim, a hipernocicepção relacionada à doença a partir do 6° dia após a indução (**Figura 13**).

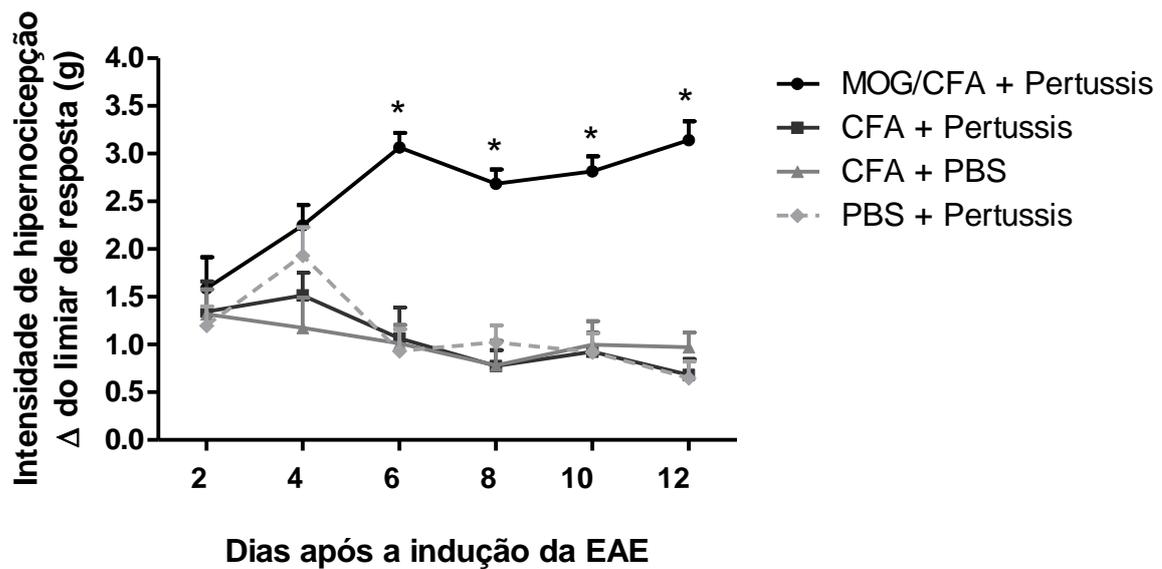


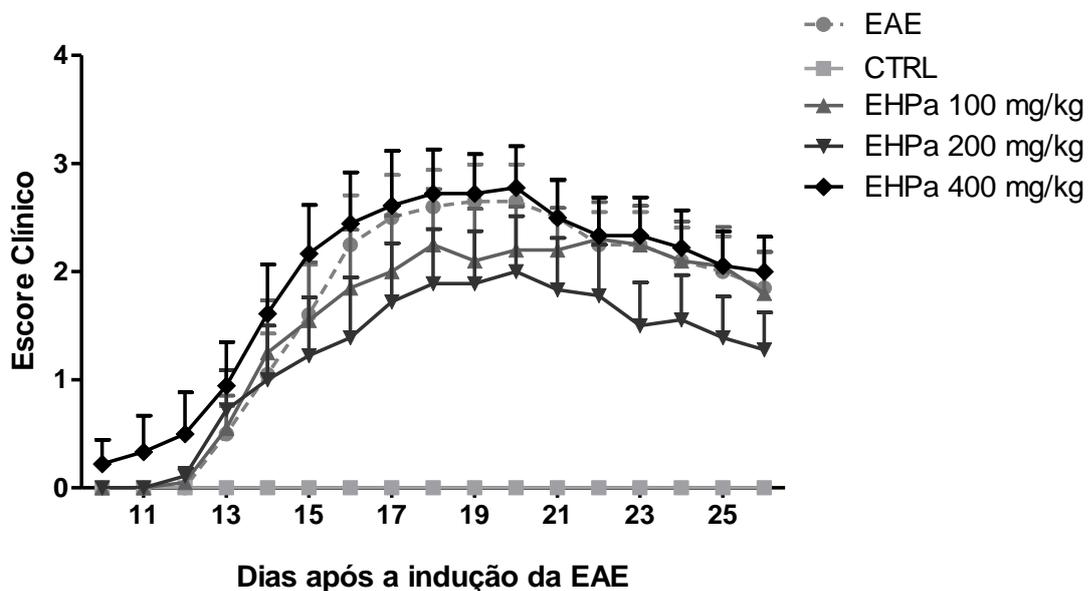
Figura 13: Intensidade de hipernociceção mecânica em camundongos (com ou sem EAE). O limiar de hipernociceção foi avaliado entre o 2° e o 12° dias em animais que receberam uma injeção com MOG/CFA + Pertussis, CFA + Pertussis, CFA + PBS ou PBS + Pertussis. Os dados estão representados pela Média \pm EPM. O grupo que recebeu MOG + CFA + Pertussis diferiu estatisticamente dos demais grupos do 6° ao 12° dia. (ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida de Newman-Keuls, * $p < 0,05$, $n = 9-12$ /grupo).

6.6. Resultados - Tratamento crônico com EHPa no modelo de EAE

6.6.1. Desenvolvimento da EAE

Nos animais que a EAE foi induzida, os primeiros sinais clínicos apareceram a partir do 12° dia, como a perda do tônus da cauda. O pico da doença foi observado em torno do 18° dia, quando cerca de 70% dos animais do grupo EAE apresentaram paralisia parcial ou total dos membros inferiores. Estes sinais também foram observados em 60% dos animais tratados com as doses de 100 ou 400 mg/kg e 40% dos animais tratados com a dose de 200 mg/kg. Por volta do 21° dia, os animais começaram a se recuperar. O grupo CTRL (não doente) não foi incluído na análise estatística, uma vez que animais que não receberam a injeção composta por MOG₃₅₋₅₅ não desenvolveram a doença, apresentando escore 0. Como mostrado na **Figura 14 A**, os grupos tratados com o extrato da planta não foram estatisticamente diferentes do grupo EAE com relação ao desenvolvimento da doença (resultado estatístico somente do 18° dia) ($H_{(3, N=29)}=2,08, p<0,554$). Os escores da doença foram somados (escore cumulativo), e não houve diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo EAE ($F_{(3, 34)}=0,90, p<0,449$) (**Figura 14 B**).

A



B

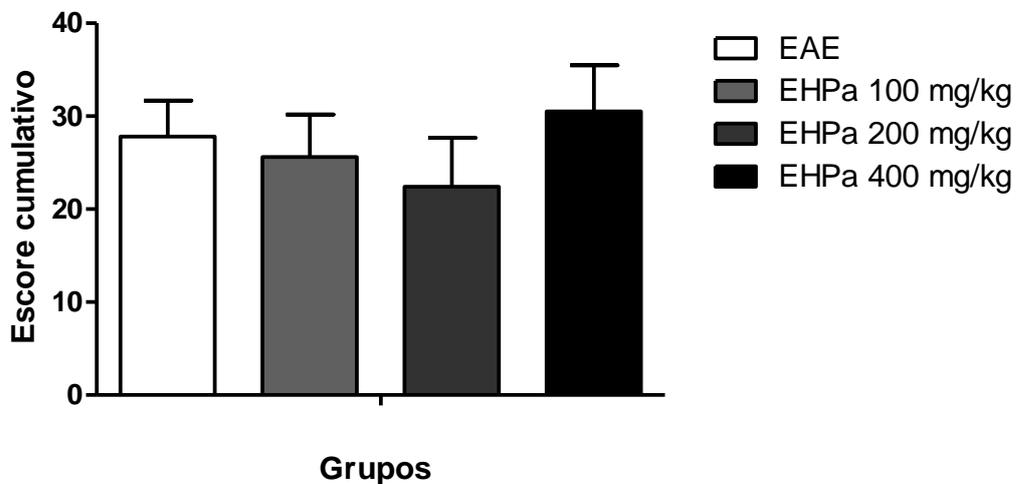


Figura 14: (A) Influência do tratamento com extrato hexânico de *Phyllanthus amarus* sobre o desenvolvimento da EAE. (B) Escore cumulativo. Os animais foram tratados com as doses de 100, 200 e 400 mg/kg, e o aparecimento dos sinais clínicos foram observados durante 26 dias consecutivos. Os dados estão representados em média \pm EPM. (Kruskal-Wallis e ANOVA de uma via n.s., n=9-10/grupo).

O peso destes animais foi verificado a cada 4 dias, e primeiramente foi realizada uma comparação somente entre os grupos EAE e CTRL, e foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa somente entre os dias 20 e 24 após a indução da EAE ($F_{(6,108)}=20,08$, $p<0,001$). Sendo assim, enquanto o grupo CTRL teve seu peso aumentado o grupo EAE perdeu peso. Uma segunda análise foi realizada incluindo todos os grupos na comparação, e nenhum dos grupos tratados diferiram estatisticamente do grupo EAE (**Figura 15**).

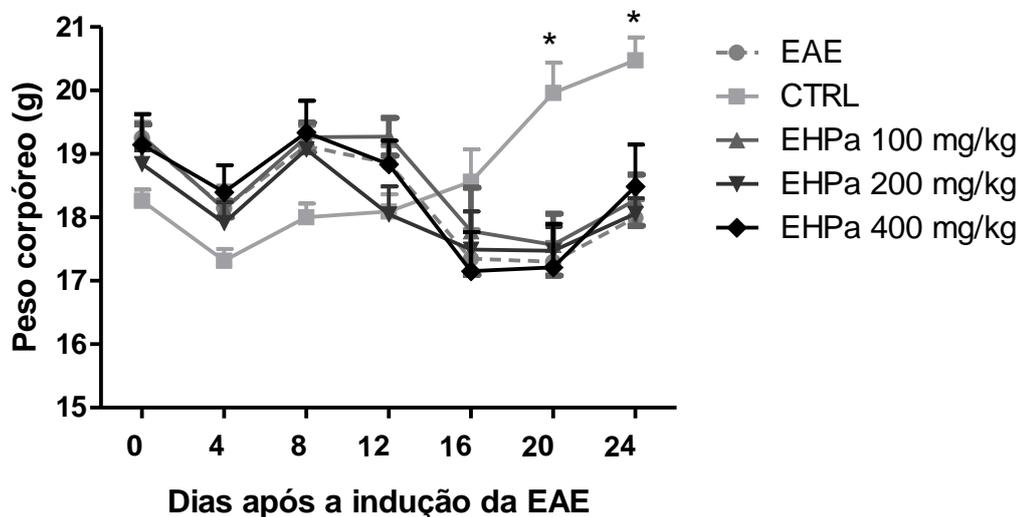


Figura 15: Peso corpóreo em animais tratados com extrato hexânico de *Phyllanthus amarus* no modelo de EAE. Os dados estão representados pela Média \pm EPM. O grupo EAE difere do grupo CTRL no 20° e 24° dias. Nenhum dos grupos tratados (doses de 100, 200 ou 400 mg/kg) diferiram do grupo EAE (ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida de Newman-Keuls, $*p<0,05$, $n=9-10$ /grupo).

6.6.2. Medida da coordenação motora (rota rod)

A coordenação motora dos animais foi avaliada a partir do 2° dia até o 12° dia após a indução da EAE (**Tabela 4**). Para verificar a validade do teste para esse modelo, foi realizada uma comparação entre os grupos EAE e CTRL, e foi encontrada uma diferença significativa entre estes grupos no 12° dia. A comparação intragrupos revelou diferença estatística entre as medidas basais e as do 12° dia para os grupos com EAE, tratados com EHPa nas doses de 100, 200 ou 400 mg/kg e com veículo. Foi realizada uma segunda análise incluindo todos os grupos, que demonstrou que os animais com EAE tratados com as três diferentes doses da planta e o veículo diferem estatisticamente no 12° dia do grupo CTRL. Esta diminuição no tempo de permanência sobre a barra é um dado importante, pois demonstra que os animais começam a apresentar comprometimento motor.

Tabela 4: Medida da coordenação motora de camundongos com EAE e tratados com extrato hexânico de *Phyllanthus amarus* submetidos ao teste de rota rod.

Grupo	Tempo de Permanência no Rota Rod (seg)						
	(Média ± EPM)						
	Intervalo de observação (dias)						
	Basal	2° dia	4° dia	6° dia	8° dia	10° dia	12° dia
EAE	119,5±1	120,0±0	113,9±6	114,0±5	110,0±7	117,8±2	73,9±15 ^{#*}
CTRL	120,0±0	114,4±3	110,3±5	114,4±3	110,9±6	117,3±3	120±0
100mg/kg	119,7±1	107,5±9	116,0±4	115,7±4	119,7±1	117,4±3	71,5±18 ^{#*}
200mg/kg	119,6±1	108,6±6	120,0±0	113,8±6	119,6±1	113,1±7	72,3±19 ^{#*}
400mg/kg	119,5±1	116,4±4	106,6±7	111,9±5	108,0±8	88,2±14	60,7±18 ^{#*}

(Fridman e Wilcoxon, * $p < 0,05$; Kruskal-Wallis e Mann-whitney, * $p < 0,05$).

6.6.3. Hipernociceção mecânica (von Frey eletrônico)

Os animais foram avaliados a cada 2 dias, a partir do 2º dia até o 12º dia. O teste foi interrompido no 12º dia devido aos sinais clínicos observados, que poderiam comprometer a avaliação da hipernociceção, uma vez que alguns animais estavam doentes. Foi realizada uma comparação entre os grupos tratados, EAE e CTRL, e foi encontrada diferença somente em relação ao grupo CTRL ($F_{(4, 43)}=9,06$, $p<0,001$) Não houve interação entre fator tempo e grupo ($F_{(24, 258)}=1,00$, $p<0,47$) (Figura 16).

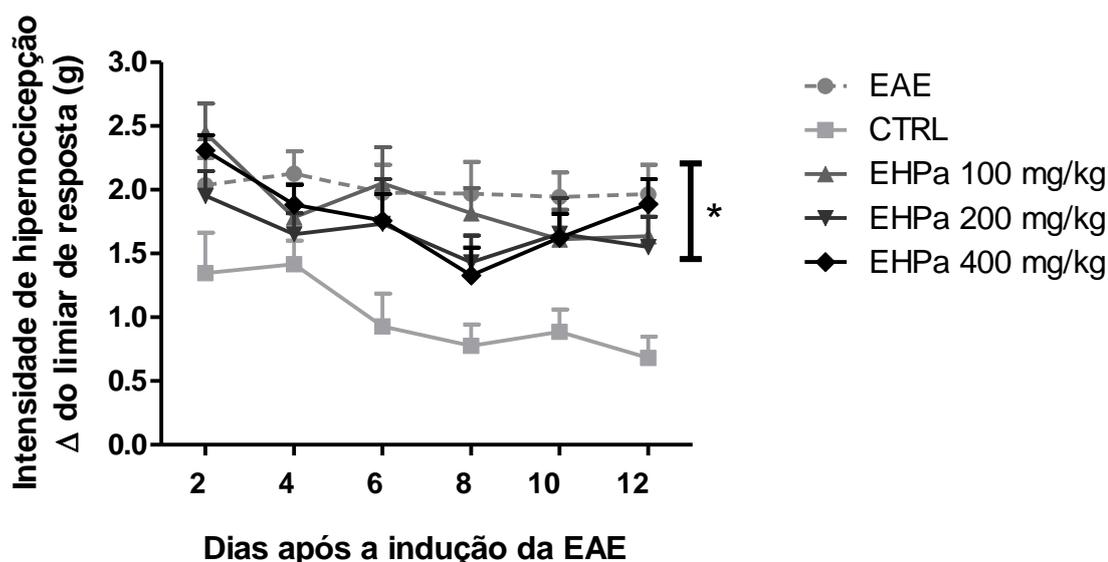


Figura 16: Intensidade de hipernociceção mecânica em camundongos tratados com extrato hexânico de *Phyllanthus amarus* no modelo de EAE. A resposta de hipernociceção foi avaliada entre o 2º e o 12º, a cada 2 dias. Os dados estão representados pela Média \pm EPM. * Grupos tratados com EHPa (100, 200 ou 400 mg/kg) e grupo EAE estatisticamente diferente do grupo CTRL (ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida de Newman-Keuls, $p<0,01$, $n=9-10$ /grupo).

6.7. Discussão das Etapas 1 e 2

Nas últimas décadas, as plantas medicinais vêm sendo utilizadas em diversas pesquisas, com base no uso popular, nos constituintes químicos, e também no perfil de atividades biológicas já descritas. Estudos experimentais têm demonstrado que diferentes plantas medicinais apresentam atividade antinociceptiva e anti-inflamatória, dentre elas a *Ipomoea pes-caprae* (salsa-da-praia), *Persea americana* (abacate), *Pothomorphe umbellata* (caapeba), *Phyllanthus amarus* (quebra-pedra) e *Copaifera multijuga* (copaíba) (Souza *et al.*, 2000; Adeyemi *et al.*, 2002; Kassuya *et al.*, 2003; Perazzo *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2007). Os efeitos biológicos exercidos por estas plantas se devem à presença de compostos ativos que podem agir por sinergismo ou individualmente, quando isolados. As plantas pertencentes ao gênero *Phyllanthus* possuem perfil fitoquímico traçado e alguns estudos atribuem a sua atividade às lignanas (Kiemer *et al.*, 2003; Kassuya *et al.*, 2006).

Apesar dos principais constituintes do extrato hexânico já terem sido reportados, a análise do extrato é importante, porque podem ocorrer variações na composição química de uma planta, devido às mudanças climáticas, condições do solo, época de coleta e condições de cultivo (Maciel *et al.*, 2002). Neste estudo, a extração com hexano foi escolhida porque este solvente apolar pode extrair uma quantidade elevada de lignanas, composto preferencialmente extraído com este solvente e relacionado com as atividades anti-inflamatória, antinociceptiva, anti-alodínica e anti-edematogênica comprovada em vários estudos com modelos animais (Kassuya *et al.*, 2003; Krithika *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2009; Chouhan e Singh, 2011). Como esperado, a análise fitoquímica do extrato hexânico de *Phyllanthus amarus* (EHPa) realizada no presente estudo mostrou a presença de lignanas, tais como filantina, nirantina, hipofilantina, filtetralina e 5-demetoxinirantina.

Todas essas lignanas já foram descritas na literatura para essa espécie (Kassuya *et al.*, 2006; Khatoon *et al.*, 2006). Os dados obtidos por espectrometria de massas foram comparados com os dados da literatura (Chang *et al.*, 2003; Elfahmi *et al.*, 2006; Krithika *et al.*, 2009) e dentre as lignanas encontradas no extrato hexânico, as principais foram identificadas como filantina, 5-demetoxinirantina e nirantina. Em um estudo realizado por Tripathi e colaboradores (2006), filantina e hipofilantina foram as principais lignanas encontradas em espécies de *Phyllanthus*, especialmente em *Phyllanthus amarus*, que também foram verificadas neste estudo. De acordo com Krithika e colaboradores (2009), a filantina é a lignana que apresenta maior atividade biológica, sendo a principal lignana obtida das partes aéreas de *Phyllanthus amarus*. Lignanas do tipo diarilbutirolactona, tais como, hinoquinina e dextroburselhernina, foram encontradas na espécie *Phyllanthus urinaria* (Wang and Lee, 2005) e também foram encontradas em pequenas concentrações neste extrato hexânico. Com exceção das lignanas do tipo diarilbutirolactona, as demais lignanas já foram reportadas nesta espécie de *Phyllanthus*.

As lignanas isoladas de muitas plantas parecem ser responsáveis por algumas atividades biológicas, tais como o antagonismo do receptor de endotelina - 1 (ET-1), inibição do fator nuclear Kappa B (NFκB), inibição da óxido nítrico sintase (iNOS) e ciclooxigenase (COX 2) (Hussain *et al.*, 1995; Hwang *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003). Esses achados citados acima podem esclarecer, em partes, as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória da *Phyllanthus amarus*, e foram confirmados por Kiemer e colaboradores (2003), mostrando que o extrato hexânico da planta inibe iNOS, COX 2 e TNF-α, além de atenuar a ativação do NFκB.

Com a finalidade de observar os sinais produzidos pela administração aguda, camundongos receberam 3 diferentes doses do extrato hexânico de *Phyllanthus*

amarus (EPHa) (v.o.). Na triagem farmacológica inicial, apenas qualitativa, não foram observadas alterações nos parâmetros comportamentais (tremor, convulsão, defecação, ambulação, piloereção) ou avaliados na análise macroscópica dos órgãos. Estes resultados corroboram com os estudos que indicam baixa toxicidade aguda com administração de diferentes extratos (aquoso e hidroalcoólico) de *Phyllanthus amarus* (Lawson-Evi *et al.*, 2008). É importante ressaltar que os resultados obtidos neste teste representam uma impressão do provável efeito da planta (teste subjetivo), porém é essencial para o direcionamento da pesquisa (Carlini, 1972; Paula-Freire *et al.*, 2012).

Outro parâmetro que pode ser utilizado para indicar alguma alteração que possa comprometer o estudo é a avaliação da coordenação motora dos animais, avaliada pelo teste de rota rod. Se a planta em questão apresentar atividade neurotóxica ou acarretar em relaxamento muscular, este teste, junto aos dados da triagem farmacológica, auxilia na escolha das doses a ser utilizadas nas avaliações nociceptivas, de modo que as mesmas não interfiram com os resultados (Dunham e Miya, 1957).

Os animais submetidos ao teste para avaliar o efeito da planta sobre a coordenação motora (rota rod) não apresentaram um prejuízo motor após o tratamento com EHPa. No trabalho de Kassuya e colaboradores (2003) foram descritos dados semelhantes, no qual as doses de 100 e 200 mg/kg do extrato hexânico de *Phyllanthus amarus*, administradas por via oral também não interferiram com a coordenação dos animais submetidos ao teste.

Com relação à avaliação antinociceptiva, somente a dose de 400 mg/kg do EHPa foi capaz de elevar o tempo de permanência sobre a placa aquecida a 50 °C. Os dados obtidos neste estudo contradizem os resultados encontrados por Gorski e

colaboradores (1993), os quais relatam que o tratamento com extrato hidroalcoólico de algumas plantas do gênero *Phyllanthus* (500 mg/kg, v.o.) não modificou a resposta nociceptiva ao estímulo térmico no teste de *tail-flick*. Além disso, outro estudo realizado com diferentes espécies de *Phyllanthus* (100 mg/kg, i.p.) também demonstrou inefetividade dos extratos metanólicos no teste de *tail-flick* (Santos *et al.*, 1994). Em contraste com o teste da placa quente, que consiste de um comportamento complexo (lamber da pata traseira, por exemplo), o estímulo nocivo do *tail-flick* produz uma resposta nociceptiva simples, um reflexo de retirada da cauda do calor (reflexo mediado pela medula) (Bannon e Malmberg, 2007). Embora as plantas possam pertencer ao mesmo gênero, existe uma diferença com relação à extração utilizada nos estudos citados acima, o que pode ter contribuído com os efeitos encontrados. Os achados relatam, em sua maioria, eficácia em modelos de nocicepção que envolvam também a inflamação (Santos *et al.*, 1995; Catapan *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2000).

No teste de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina, todas as doses de *Phyllanthus amarus* foram capazes de inibir a fase aguda do teste e reduzir a nocicepção na fase crônica. Este teste possui duas fases distintas, uma aguda na qual a resposta é causada pela ativação do nociceptores, e a fase crônica mediada por uma inflamação periférica podendo ser atenuada por drogas antiinflamatórias (Hunskar e Hole, 1987). O fato do extrato ser eficaz em ambas as sugere que sua ação possa ser tanto antinociceptiva quanto antiinflamatória. Corroborando os resultados de Santos e colaboradores (2000) que demonstraram que o extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus amarus*, incluindo outras espécies, foi capaz de inibir ambas as fases da nocicepção neste modelo, evidenciando assim, um efeito antinociceptivo e antiinflamtório.

Após a confirmação do efeito do EHPa sobre a nocicepção, foi realizado um experimento com o modelo de EAE para a padronização da medida de hipernocicepção. Os animais receberam a injeção de MOG/CFA + Pertussis para indução da EAE, e foram submetidos ao teste de von Frey a partir do 2º dia após a indução. A sensibilidade ao estímulo mecânico estava aumentada a partir 6º dia, permanecendo até o 12º dia após a indução da doença, sendo que os primeiros sinais clínicos (perda do tônus da cauda) apareceram 10 dias após a injeção de MOG₃₅₋₅₅. Diversos estudos trazem resultados semelhantes aos observados, os quais relatam alterações na resposta aos estímulos no von Frey a partir do 4º ou 5º dia após a indução da EAE, sendo que o teste foi interrompido no 12º dia. Os autores destes trabalhos também verificaram o aparecimento dos sinais clínicos a partir do 10º após a indução (Rodrigues *et al.*, 2009; Olechowski *et al.*, 2009; Teixeira, 2012; Yuan *et al.*, 2012). Além disso, Thibault e colaboradores (2011) relataram que os animais com EAE apresentaram alterações nas respostas sensoriais, como hipernocicepção mecânica e alodínia térmica (frio ou calor). Por outro lado, utilizando 2 modelos de EAE, um induzido pela MOG₃₅₋₅₅ (EAE crônica com remissão parcial) em camundongos da linhagem C57BL/6J e outro por PLP₁₃₉₋₁₅₁ (surto e remissão) em camundongos da linhagem SJL/J, os autores recentemente mostraram algumas diferenças no perfil de respostas a estímulos sensoriais nociceptivos (Lu *et al.*, 2012). Na EAE induzida por PLP₁₃₉₋₁₅₁, a alteração na resposta hipernociceptiva (von Frey filamentos) foi observada somente na fase crônica (após 28 dias). Já nos animais que receberam a MOG₃₅₋₅₅ esta alteração foi verificada no início dos sintomas da doença (após 10º dia da indução) e no pico da doença (17º dia), mas não na fase crônica (Lu *et al.*, 2012). Não houve diferença na hipernocicepção logo após a indução da EAE, como geralmente é descrito em

outros trabalhos. Porém, os autores utilizaram uma escala de escore diferente da empregada no presente estudo. No trabalho de Lu e colaboradores (2012), o escore 4 corresponde a ataxia de marcha e, pelos resultados demonstrados por eles, os animais não atingiram um escore que indicaria paralisia parcial ou total dos membros posteriores. É provável que este aumento no limiar de hipernocicepção encontrado no pico da EAE relatada por estes autores seja decorrente desta diferença. Ainda que existam algumas diferenças metodológicas e divergências nos resultados, as pesquisas concordam no ponto de que é possível o estudo de nocicepção nos modelos de EAE, contribuindo assim para a compreensão de mecanismos envolvidos nesta mediação e com isso poder propor novos tratamentos.

A coordenação motora destes animais com EAE também foi avaliada do 2º ao 12º dia após a indução. O prejuízo motor foi observado somente no grupo que recebeu MOG/CFA + Pertussis a partir do 12º dia, o que não ocorreu com os camundongos que receberam CFA + Pertussis, CFA + PBS ou PBS + Pertussis. Esta falta de coordenação motora evidente no teste acompanha o aparecimento dos sintomas clínicos, auxiliando na confirmação de um prejuízo que poderia comprometer as respostas em outros testes, como no von Frey (Lynch *et al.*, 2008; Olechowski *et al.*, 2009).

A diminuição do peso corpóreo foi verificada no decorrer do desenvolvimento da doença apenas para os camundongos com a EAE. Estes achados corroboram os resultados de outros estudos, que demonstram que animais com EAE perdem peso no início (quatro dias) e na fase de pico da doença (16 a 20 dias) (De Paula *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2009).

Uma vez que o modelo de EAE e a medida de hipernocicepção foram padronizados, a etapa seguinte foi a realização de um experimento em que os animais foram tratados com EHPa, avaliados no von Frey e no rota rod após a indução da EAE. Com relação à coordenação motora e o peso corpóreo dos animais, não houve diferença estatística entre os animais tratados e aqueles do grupo EAE (doente). O tratamento com o EPHa não foi capaz de prevenir o prejuízo motor e nem a redução do peso. Porém, o modelo funcionou, pois foi descrito na literatura que os animais que não recebem a injeção com a MOG₃₅₋₅₅ (CTRL) não apresentam prejuízo motor, e ganham peso corpóreo durante o experimento (Rodrigues *et al.*, 2009).

Conforme descrito anteriormente, as plantas do gênero *Phyllanthus* apresentam efeito antinociceptivo em diferentes modelos. No entanto, nenhuma das doses de *Phyllanthus amarus* empregada no presente estudo foi capaz de reduzir a hipernocicepção mecânica relacionada à EAE. Em contrapartida, Kassuya e colaboradores (2006), utilizando um modelo de dor neuropática induzido por constrição parcial do nervo ciático, demonstraram uma diminuição no limiar de alodínia quando os animais receberam o tratamento oral com extrato hexânico de *Phyllanthus amarus*. Embora o modelo de constrição do ciático seja considerado ferramenta de estudo da dor neuropática, possui alguns mecanismos de respostas dolorosas diferentes das observadas na EAE. No modelo de EAE utilizado no presente trabalho, ocorre o envolvimento direto do sistema imunológico e respostas mediadas pela inflamação crônica com desmielinização central, em que células não neuronais como a micróglia, macrófagos, astrócitos e células T fazem parte da geração e manutenção da sensibilização central e da dor neuropática (Olechowski *et al.*, 2009). Além disso, Olechowski e colaboradores (2010) descreveram que ocorre

um déficit nos transportadores de glutamato em camundongos com EAE, o que poderia elevar o nível extracelular desse neurotransmissor contribuindo para aumentar a sensibilidade dolorosa. Já no modelo de constrição crônica do nervo ciático, a dor neuropática é gerada por lesão mecânica, acarretando no recrutamento de algumas células do sistema imunológico como, macrófagos, neutrófilos e linfócitos, que liberam mediadores inflamatórios (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e prostaglandinas) que irão agir localmente (Sud *et al.*, 2008). Com a evolução da dor neuropática, a via de transmissão dolorosa também será sensibilizada por estes mediadores (Sud *et al.*, 2008). Um estudo mostrou que o extrato hexânico de *Phyllanthus amarus*, em um modelo de inflamação, inibiu a produção de óxido nítrico e prostaglandina E₂, e ativou vias de NF- κ B e das interleucinas IL-1 β e IL-10, além de reduzir a quantidade de TNF α (Kierner *et al.*, 2003). Outros trabalhos também evidenciaram que animais tratados com extrato hexânico de *Phyllanthus amarus* apresentaram redução do edema de pata e inibição de IL-1 β e bradicinina, assim como a inibição da alodinia induzida por constrição crônica do nervo ciático (Kassuya *et al.*, 2003, 2005). É importante notar que as lignanas encontrados no EHPa possuem estruturas semelhantes. No entanto, foi demonstrado que esta semelhança não reflete em uma atividade biológica comum. Assim, somente a nirtetralina foi capaz de deslocar a endotelina-1 do seu receptor, sendo que a filantina se mostrou ineficaz para isto (Hussain *et al.*, 1995). As lignanas presentes no EHPa não foram quantificadas neste trabalho. A percentagem de área do pico obtida no cromatograma indica a filantina, a nirantina e a 5-demetoxinirantina como os constituintes principais, predominando a filantina. Deve ser considerado que a filtetralina, a nirtretalina e a nirantina, quando administradas isoladamente e por injeção intraplantar, promoveram efeito anti-inflamatório marcante (Kassuya *et al.*,

2006). O falta de efeito do extrato observada no presente trabalho pode estar relacionada ao fato de que a filltetralina, nirtretalina e nirantina estavam misturadas com outras lignanas, além de seu baixo teor encontrado. Por outro lado, foi relatado também que a filantina, hipofilantina, filtetralina e nirantina do extrato metanólico de *Phyllanthus niruri* L. apresentou baixa biodisponibilidade quando administrado em animais saudáveis (Murugaiyah e Chan, 2007). Também foi demonstrado por Mali e colaboradores (2011) que o extrato aquoso de *Phyllanthus amarus*, padronizado em 2,5% de filantina e hipofilantina possui atividade anti-artrite induzida pelo CFA, reduzindo a hipernocicepção mecânica avaliada pelos testes de Randall e Selito e von Frey filamentos. Esses efeitos citados acima não foram observados no presente estudo. Todos os mecanismos anteriormente descritos podem estar envolvidos na inibição da nocicepção e inflamação exercidas pela *Phyllanthus amarus*, mas provavelmente, não são os mesmos mecanismos e mediadores envolvidos na hipernocicepção no modelo de EAE.

O tratamento com EHPa não foi capaz de interferir com o curso da EAE. Não foram encontrados dados na literatura sobre o efeito das plantas pertencentes ao gênero *Phyllanthus*, no modelo de EAE. Porém, em um estudo realizado com o extrato aquoso de *Phyllanthus niruri*, foi evidenciado um aumento na proliferação de linfócitos T e B e na produção de IFN- γ (cultura de esplenócitos de camundongos) (Nworu *et al.*, 2010). Além disso, também foi relatado que a nirantina, uma lignana isolada da *Phyllanthus amarus*, induziu uma diferenciação de linfócitos, polarizando a resposta para Th1 com aumento de secreção de IFN- γ exibindo assim uma atividade microbicida em cultura (Chowdhury *et al.*, 2012). Ainda que nestes estudos as células T efetoras produtoras de INF- γ (que são células patogênicas na EAE) estejam aumentadas, não é possível inferir que o mesmo ocorreria no presente

estudo. Como não foram observadas mudanças no desenvolvimento da EAE, a atividade do EHPa sobre a proliferação dos linfócitos e a produção de IFN- γ não foi investigada.

Outros estudos envolvendo diferentes métodos de extração poderiam ser realizados, os quais extrairiam diferentes compostos, que não as lignanas, que talvez fossem capazes de agir sobre a hipernocicepção por meio de outros mecanismos no modelo de encefalomielite autoimune experimental.

7. ETAPA 3

A ideia inicial desta etapa era utilizar o óleo de copaíba (*Copaifera multijuga*) que possui efeitos analgésicos já descritos mas, devido as dificuldades burocráticas (CGEN e IBAMA) para conseguir o material biológico, optou-se por substituí-lo por um dos seus constituintes majoritários, o trans-cariofileno. Como este composto já vem sendo empregado em outros estudos do nosso grupo, não foi necessária a realização de teses preliminares. Portanto, esta etapa foi realizada com intuito de verificar o efeito do tratamento com trans-cariofileno na hipernocicepção no modelo de encefalomielite autoimune experimental (EAE) e seu possível mecanismo de ação.

7.1. Objetivos específicos:

- Avaliar o efeito do tratamento crônico com trans-cariofileno na hipernocicepção no modelo de EAE
- Verificar se os sistemas canabinóide e opióide participam desse efeito
- Avaliar a resposta imune adaptativa por meio da proliferação das células T CD4⁺ e produção de IFN- γ

7.2. Métodos

7.2.1. Tratamento crônico com trans-cariofileno no modelo da EAE

Para a realização do presente experimento, foi seguido o protocolo descrito anteriormente, no qual a EAE foi induzida com a MOG₃₅₋₅₅ e a hipernocicepção e coordenação motora foram avaliadas. Os animais receberam trans-cariofileno diluído em água com 1% de Tween 80, nas doses de 3, 10 ou 30 mg/kg (v.o.), logo

após a indução da EAE, e durante os 26 dias consecutivos. O desenvolvimento da EAE foi acompanhado diariamente a partir do aparecimento do primeiro sinal clínico, a partir 10º dia. O peso dos animais foi verificado a cada 4 dias e a coordenação motora e a hipernocicepção foram avaliadas a cada 2 dias, cerca de 60 minutos após o tratamento. Essas avaliações comportamentais foram interrompidas no 12º dia, devido ao desenvolvimento da doença, impossibilitando a continuidade destes testes. No 26º dia os animais foram eutanasiados por decapitação (**Figura 17**).

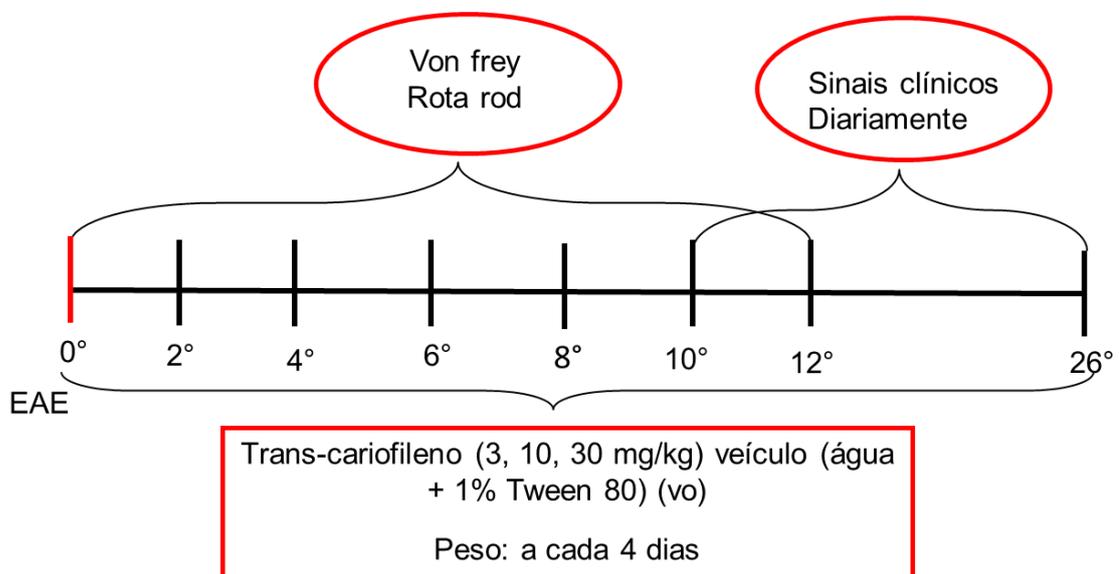


Figura 17: Esquema do tratamento crônico com trans-cariofileno e testes comportamentais.

7.2.2. Mecanismo de ação do trans-cariofileno no modelo de EAE

O objetivo deste experimento foi investigar o mecanismo de ação pelo qual o trans-cariofileno reduz a hipernocicepção no modelo da EAE. Uma vez que as 3 doses administradas foram efetivas em diminuir a hipernocicepção, foi escolhida a dose intermediária (10 mg/kg). No 6º dia após a indução da EAE, os animais foram tratados com veículo (grupo EAE, v.o., n=12), ou trans-cariofileno (grupo TRANS 10 mg/kg, v.o., n=12). No 8º dia, esses animais foram redistribuídos em 4 grupos: 1)

EAE veículo + salina, 2) EAE veículo + naloxona, 3) TRANS + salina e 4) TRANS + naloxona. O tratamento com naloxona (1 mg/kg, i.p.) ou salina (0,1 mL/g) foi feito 30 minutos antes do tratamento com trans-cariofileno ou veículo (v.o.); Sessenta minutos após a administração oral, foi feita a avaliação no teste de von Frey. No 10º dia foi repetido o tratamento nos mesmos grupos que no 6º dia para verificar se não haveria um efeito residual da naloxona administrada no 8º dia. No 12º dia, os animais que haviam recebido naloxona no 8º dia receberam AM630 (1 mg/kg, ip) ou veículo (salina com DMSO 3%) 30 minutos antes de receberem trans-cariofileno ou veículo (água com Tween 80). Após 60 minutos, eles foram novamente avaliados no teste de von Frey. Para verificar o desenvolvimento da doença, esses animais foram observados por 26 dias consecutivos, a partir do 10º dia após a indução da doença (Figura 18).

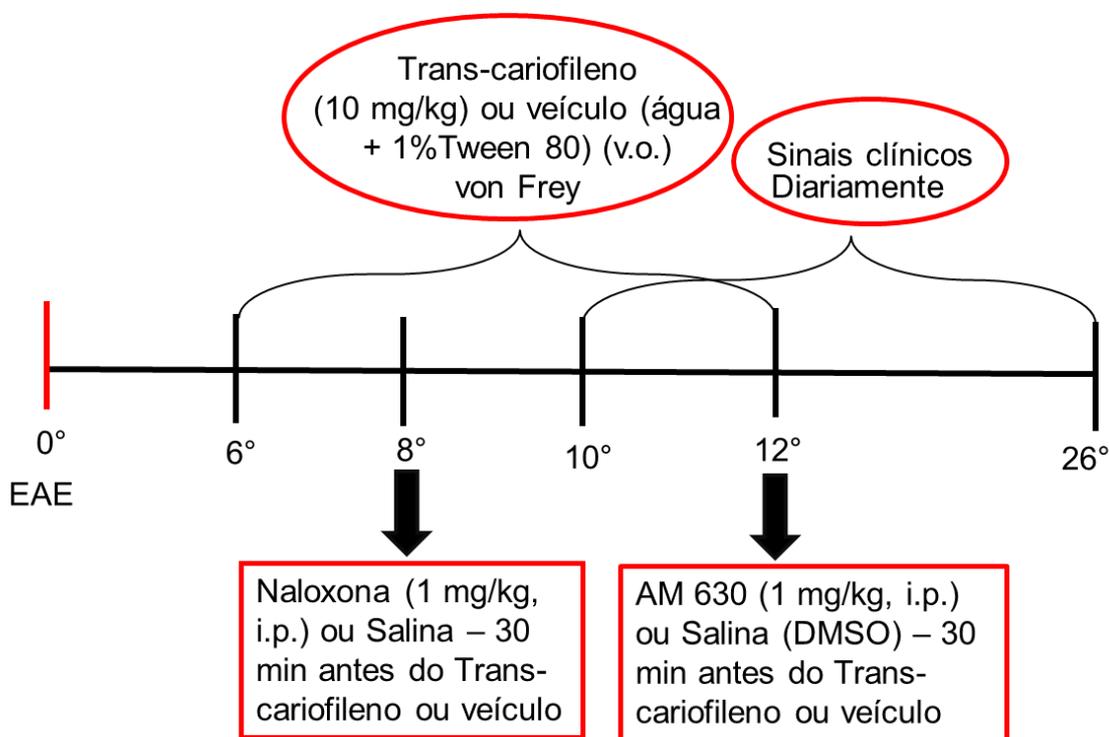


Figura 18: Esquema do tratamento agudo com trans-cariofileno (4 administrações) e com os antagonistas (naloxona e AM630) e teste de von Frey.

7.2.3. Análise da resposta imune

Para os experimentos de análise da resposta imune *ex vivo*, os animais foram imunizados conforme o procedimento já descrito. Contudo, a injeção foi feita nas patas traseiras e a toxina de *Bordetella pertussis* não foi injetada. Estes animais foram distribuídos em 2 grupos com 4 camundongos em cada, e receberam somente a dose de 10 mg/kg do trans-cariofileno ou veículo durante 7 dias consecutivos. Sete dias após a imunização, os linfonodos drenantes foram coletados e colocados em 5 ml de Hanks com soro fetal bovino a 10% em tubos falcon de 15 ml. Os linfonodos foram macerados no *cell strainer* (70 µm acoplado a um tubo falcon com 50 mL), com o embolo de uma seringa de 3 ml. As células dos linfonodos (poplíteo e inguinal) foram lavadas com solução de Hanks e centrifugadas a 1500 rpm por 5 min a 4°C, em seguida ressuspensas em PBS e transferidas para tubos de 15 ml. Logo após foi retirada uma alíquota, corada com azul de Tripán e as células foram contadas em câmara de Neubauer. As células foram lavadas com RPMI 1640 (Gibco-BRL) suplementado com β-Mercapetanol 62,5 µM (Sigma # 01496DK), aminoácidos não essenciais (BioWhittaker™ #13-114E), Piruvato de sódio 1 mM (Gibco® #11360-070), 50 unidades/ml penicilina e 50 µg/ml streptomicina (PenStrep Gibco® 15070-063), L-glutamina 200 mM (GlutaMax Gibco® #35050-061), Mem Vitamin Solution 100 µg/mL (Gibco® #11120-052). As amostras foram incubadas em gelo por 5 minutos, em seguida foram centrifugadas e ressuspensas em RPMI completo. Em seguida, o volume das amostras foi ajustado com meio de cultura e plaqueado 3×10^5 células/poços (240 µl/poço) em placas de 96 poços com fundo em U. As células dos linfonodos drenantes foram reestimuladas em cultura com peptídeo de MOG₃₅₋₅₅ nas concentrações de 10 ou 100 µg/ml (Basso *et al.*, 2008). As células ficaram em cultura por 48 horas e as concentrações de citocinas

presentes nos sobrenadantes foram avaliadas pelo método de ELISA; a proliferação das células foi verificada por citometria de fluxo.

7.2.3.1. Proliferação celular (citometria de fluxo)

As células dos linfonodos drenantes foram marcadas com o corante Cell Proliferation Dye por 15 minutos em estufa com CO₂ 5% a 37°C, lavadas em meio de cultura e cultivadas em meio RPMI completo na presença de 10 ou 100 µg/ml de MOG₃₅₋₅₅, em triplicata ou apenas com meio de cultura (SEM EST), em duplicata, para a ativação de células T antígeno-específicas por 72 horas. As células foram marcadas com anti-mouse CD4 conjugado com PE (ficoeritrina), lavadas e ressuspensas em PBS. A proliferação de células T CD4⁺ foi avaliada por meio da análise da diluição do corante de proliferação eFlour 670 (eBioscience) na citometria de fluxo (Pope *et al.*, 1996).

7.2.3.2. Ensaio imuno-enzimático (ELISA)

As concentrações de INF-γ foram dosadas no sobrenadante de cultura das células dos linfonodos drenantes, reestimuladas com MOG₃₅₋₅₅ nas concentrações de 10 e 100 µg/mL, em triplicata ou apenas com meio de cultura (SEM EST), em duplicata. As alíquotas do sobrenadante foram adicionadas em placas de 96 poços sensibilizadas com anticorpos específicos do kit comercial de INF-γ (eBioscience, San Diego, CA, USA). As concentrações das citocinas foram determinadas por um leitor de densidade óptica (450 nm), utilizando curvas padrões de acordo com as instruções do fabricante.

7.3. Análise estatística

Na análise dos resultados, testes paramétricos e não paramétricos foram utilizados, levando-se em consideração a natureza das variáveis estudadas. Kruskal-Wallis e Friedman seguido de Wilcoxon quando necessário foram empregados para comparar a resposta dos animais no teste de coordenação motora (rota-rod) e no desenvolvimento da doença. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para avaliar a produção de citocina e a proliferação de linfócitos. Os demais resultados foram avaliados através da análise de variância ANOVA de medidas repetidas. Os dados do desenvolvimento da doença também foram analisados (após a somatória dos escores) e os do mecanismo de ação por ANOVA de uma via ou teste *t*-Student. O nível de significância considerado foi $p < 0,05$. Todos os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM).

7.4. Resultados - Tratamento com trans-cariofileno no modelo de EAE

7.4.1. Desenvolvimento da EAE

O primeiro sinal de desenvolvimento da doença, como perda do tônus da cauda, apareceu no 10º dia após a indução da EAE. No 18º dia (pico da doença) 75% dos animais do grupo controle apresentavam paralisia parcial ou total dos membros inferiores. Para os grupos tratados, esses sintomas foram observados em 62% dos animais que receberam a dose 3 mg/kg, em 50% para a dose de 10 mg/kg e 57% para a dose de 30 mg/kg. A administração repetida do trans-cariofileno nas doses de 3, 10 ou 30 mg/kg não foi capaz de modificar o desenvolvimento da EAE ($H_{(3, N=31)} = 0,17, p < 0,99$) (representação estatística do 18º dia) (**Figura 19 A**). Os dados também estão representados pela somatória dos escores clínicos (representa

Com relação ao peso dos animais, avaliado a cada 4 dias, o tratamento com trans-cariofileno não preveniu a diminuição ($F_{(6,162)}=6,02$, $p<0,001$) do peso observado durante o desenvolvimento da doença quando comparado à medida basal (**Figura 20**).

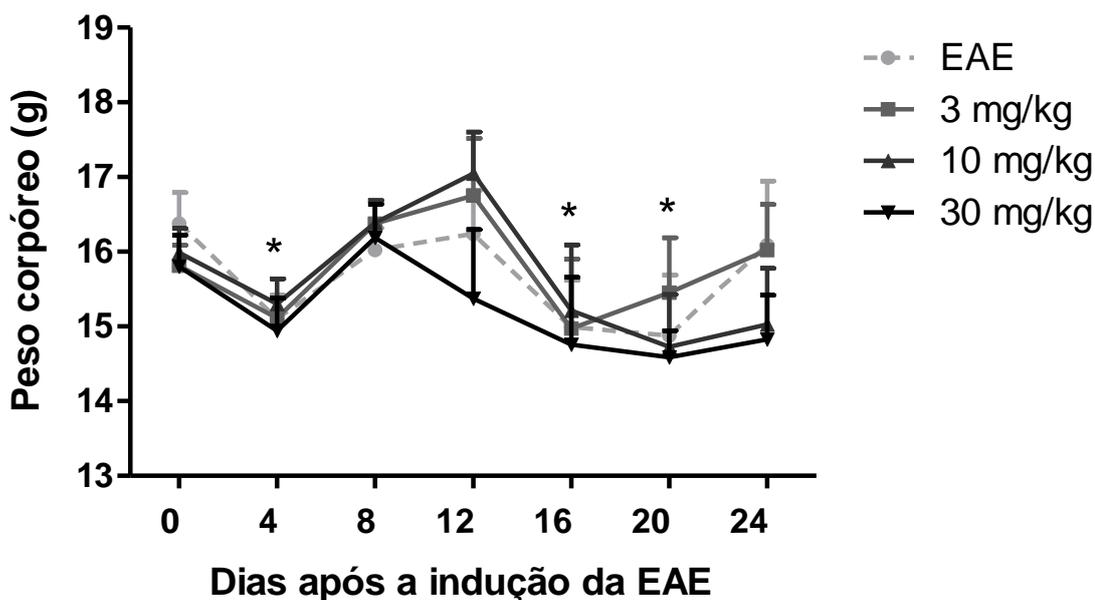


Figura 20: Peso corpóreo em animais tratados com trans-cariofileno no modelo de EAE. Os dados estão representados pela Média \pm EPM. *Diferença em relação a medida basal (ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida de Newman-Keuls, $p<0,05$, $n=7-8$ /grupo).

7.4.2. Medida da coordenação motora (rota rod)

A coordenação motora foi avaliada em dias alternados, e o teste foi interrompido no 12º dia, pois alguns animais já estavam doentes. O desempenho motor, dentro do mesmo grupo, foi reduzido ao longo dos dias (**Tabela 5**). A diferença foi encontrada no 10º e 12º dias, em relação à medida basal (Friedman ($N=8,df=6$)= $17,81$, $p<0,006$) para o grupo CTRL, e entre o basal e o 12º dia para os

animais tratados com a dose de 3 mg/kg (Friedman (N=8,df=6)=16,06, $p<0,01$) e 30 mg/kg (Friedman (N=8,df=6)=12,28, $p<0,05$). Não houve diferença estatística entre os grupos tratados com o trans-cariofileno quando comparados ao grupo CTRL (Kruskal-Wallis, $H_{(3, N=31)}= 0,57$, $p<0,90$). O tratamento não foi capaz de modificar a coordenação motora.

Tabela 5: Avaliação da coordenação motora (rota rod) em camundongos com EAE tratados com trans-cariofileno.

Grupos	Tempo de Permanência no Rota Rod (seg)						
	(Média ± EPM)						
	Intervalo de Observação (dias)						
	Basal	2° dia	4° dia	6° dia	8° dia	10° dia	12° dia
EAE	116,8±3,1	106,5±6,7	115,8±2,8	116,5±3,5	103,5±5,1	85,5±11,5*	64,7±19,3*
3 mg/kg	115,6±4,3	111,6±5,6	105,7±5,4	115,3±4,6	105,1±6,1	96,3±10,2	62,9±15,5*
10 mg/kg	118,1±1,8	115,7±4,2	113,1±4,5	110,3±5,1	108,5±5,6	97,1±12,1	83,8±16,7
30 mg/kg	114,3±3,7	106,8±6,4	106,8±7,1	110,0±6,7	116,1±3,8	82,4±19,5	56,5±19,8*

(Kruskal-Wallis n.s.; Friedman seguido de Wilcoxon * diferença intra-grupo, $p<0,05$, n=7-8).

7.4.3. Hipernocicepção mecânica (von Frey eletrônico)

A avaliação da hipernocicepção foi realizada a cada 2 dias, e no 12° dia foi feita a última medida, uma vez que alguns animais já apresentavam sinais de desenvolvimento da doença. Todos os grupos tratados com trans-cariofileno, nas 3 doses empregadas, diferiram estatisticamente do grupo EAE a partir do 6° dia, até o 12° dia ($F_{(15, 135)}= 3,61$, $p<0,001$) (**Figura 21**). Não houve diferença entre as doses de trans-cariofileno, ou seja, todas parecem atenuar de maneira semelhante a hipernocicepção induzida pela EAE.

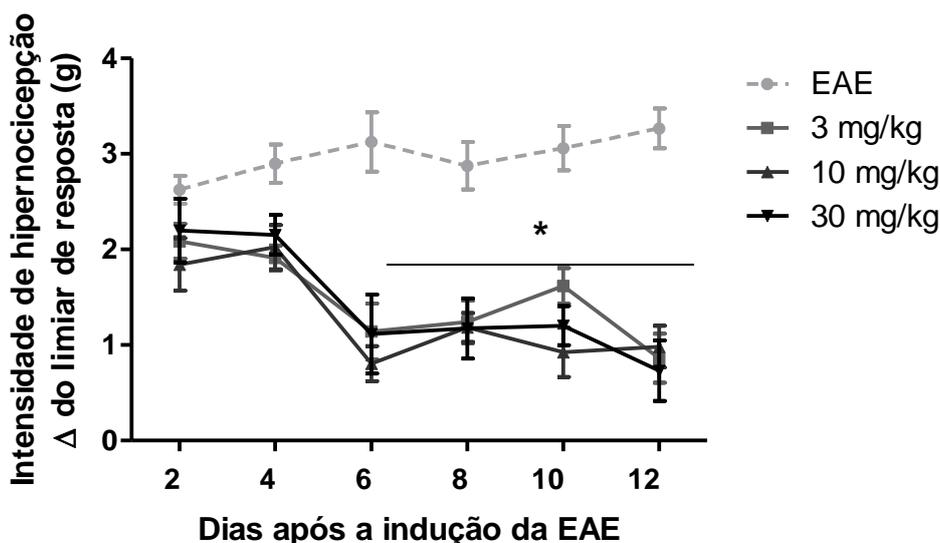


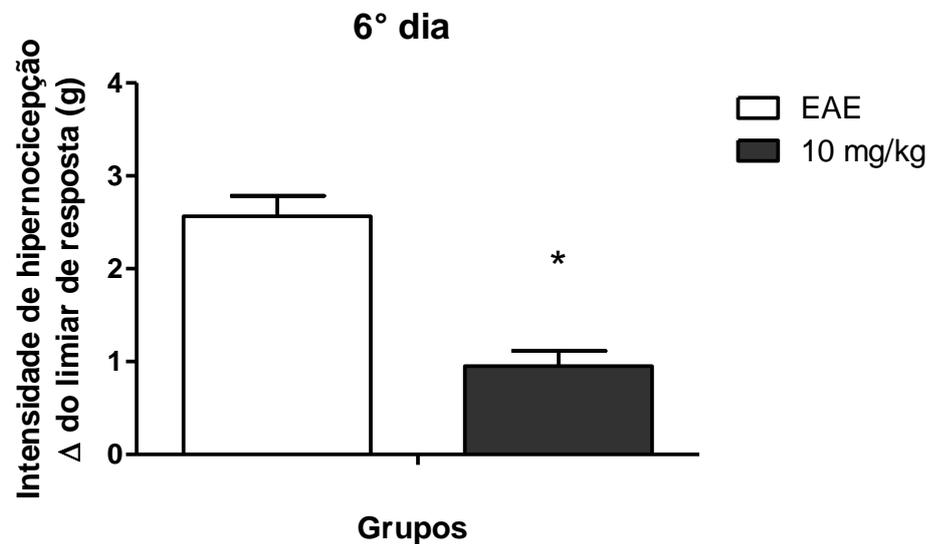
Figura 21: Intensidade de hipernociceção mecânica em camundongos tratados com trans-cariofileno no modelo de EAE. Os dados estão representados pela Média \pm EPM. *grupos tratados com trans-cariofileno estatisticamente diferente do grupo CTRL. (Anova de medidas repetidas seguida de Newman-Keuls, $p < 0,05$, $n = 7-8$ /grupo).

7.4.4. Mecanismo de ação do trans-cariofileno no modelo de EAE

A administração aguda do trans-cariofileno na dose de 10 mg/kg, no 6º dia se mostrou eficaz em reduzir a hipernociceção quando comparado aos animais do grupo EAE (veículo) ($t = 9,01$, $p < 0,001$) (**Figura 22 A**). Esse efeito foi revertido pela administração do antagonista opióide, naloxona, no 8º dia após a indução da EAE ($F_{(3, 23)} = 18,45$, $p < 0,001$) (**Figura 22 B**). No 10º dia, foi observado o efeito do trans-cariofileno sobre a hipernociceção, mostrando que não houve efeito residual da naloxona administrada no 8º dia ($F_{(1, 24)} = 54,47$, $p < 0,001$) (**Figura 22 C**). O efeito do trans-cariofileno também foi inibido no 12º dia quando os animais receberam um antagonista canabinóide, o AM630 ($F_{(3, 23)} = 19,38$, $p < 0,001$) (**Figura 22 D**). O fato dessas duas drogas antagonistas terem bloqueado o efeito anti-hipernociceptivo do

trans-cariofileno, sugere que sua ação possa ser mediada pelo sistema opióide e canabinóide.

A



B

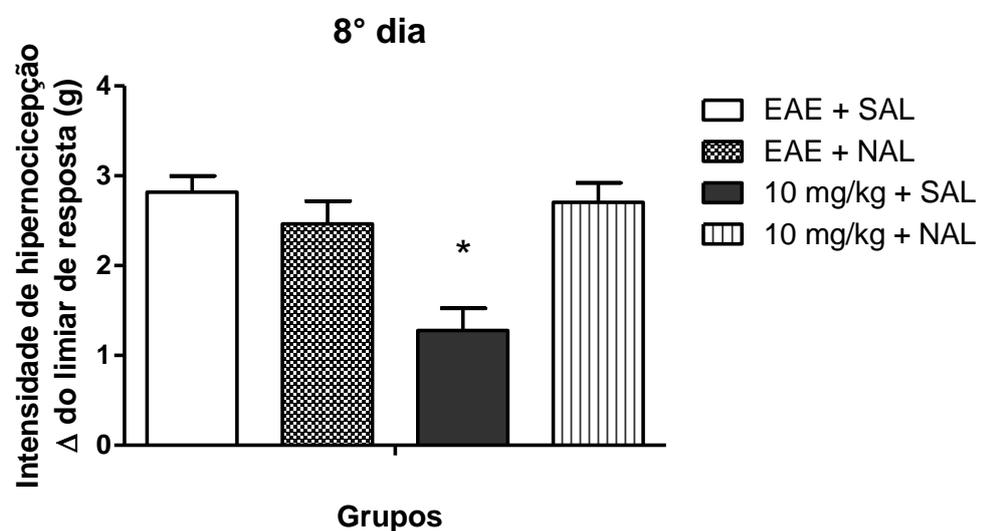
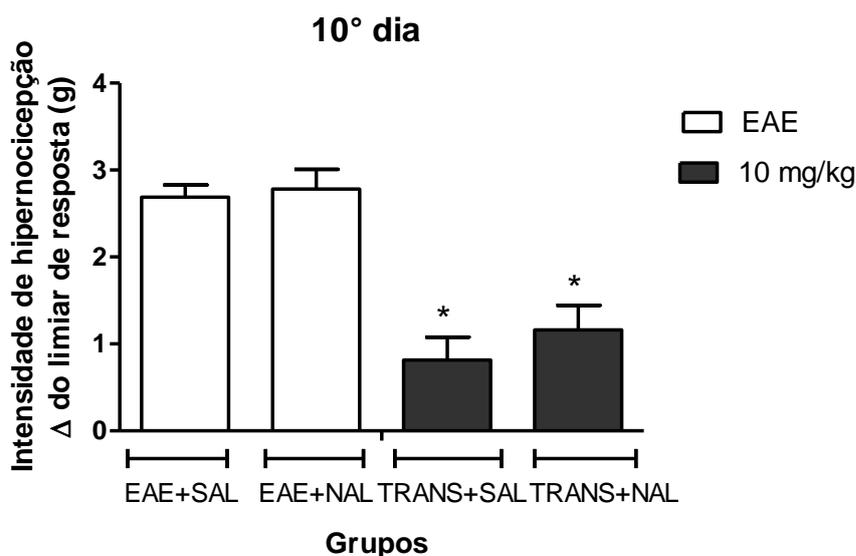


Figura 22: Avaliação do efeito anti-hipernociceptivo do tratamento com trans-cariofileno no modelo de EAE. **A)** Efeito agudo do tratamento com trans-cariofileno (10 mg/kg). **B)** Efeito do pré-tratamento com naloxona (1 mg/kg). Os dados estão representados pela Média \pm EPM. *grupo tratado com trans-cariofileno estatisticamente diferente dos outros grupos. (teste *t*-Student e ANOVA de uma via $p < 0,05$, $n = 12$ ou 6 /grupo).

C



D

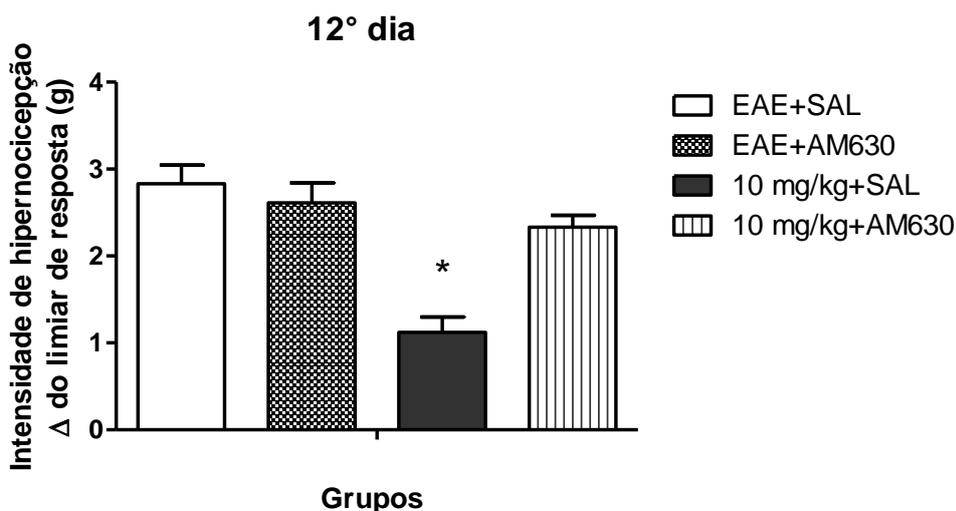


Figura 22: Avaliação do efeito anti-hipernociceptivo do tratamento com trans-cariofileno no modelo de EAE. **C)** Efeito agudo do tratamento com trans-cariofileno (10 mg/kg). **D)** Efeito do pré-tratamento com AM630. Os dados estão representados pela Média \pm EPM. *grupo tratado com trans-cariofileno estatisticamente diferente dos outros grupos (ANOVA de uma via $p < 0,05$, $n = 12$ ou 6 /grupo).

Com relação ao desenvolvimento da doença, os primeiros sinais clínicos foram observados a partir do 12° dia após a indução da EAE. No 19° dia, cerca de 75% dos animais do grupo EAE e 55% do grupo tratado com trans-cariofileno

estavam com os membros posteriores parcial ou totalmente paralisados (pico da doença). O tratamento intercalado (4 administrações) com trans-cariofileno na dose de 10 mg/kg não foi capaz de modificar o desenvolvimento da doença quando comparado ao grupo EAE (Mann-Whitney $p < 0,40$), como ilustra a **Figura 23**.

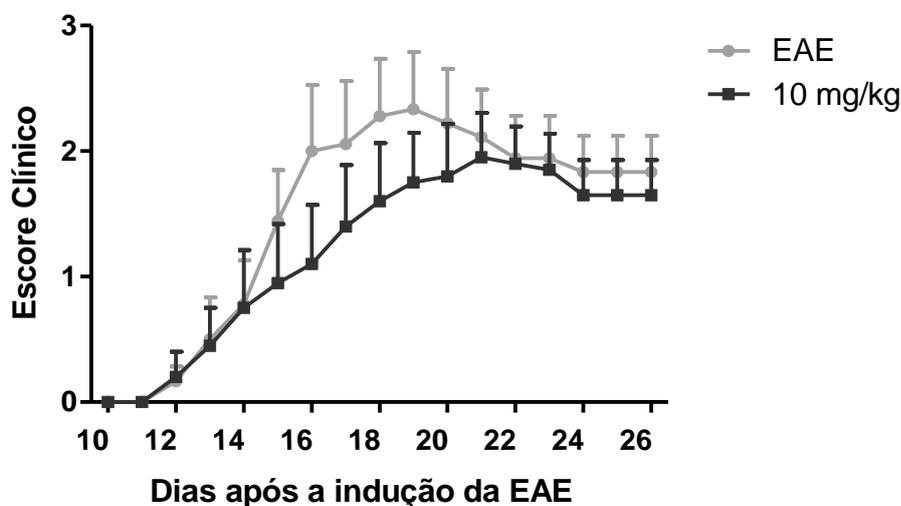


Figura 23: Influência do tratamento agudo com trans-cariofileno sobre o desenvolvimento da EAE. Os animais receberam 4 administrações agudas do trans-cariofileno (10 mg/kg), e o aparecimento dos sinais clínicos foi avaliado até o 26º dia. Os dados estão representados em Média \pm EPM (Mann-Whitney n.s., $n=12$ /grupo).

7.4.5. Proliferação

As células dos linfonodos drenantes de animais imunizados foram marcadas com corante de proliferação e reestimuladas *in vitro* com o peptídeo MOG₃₅₋₅₅. Na análise dos resultados, observou-se que não houve diferença significativa na porcentagem de células que proliferaram nos animais tratados com trans-cariofileno em relação aos animais controle (Mann-Whitney $p < 0,88$) (**Figura 24**).

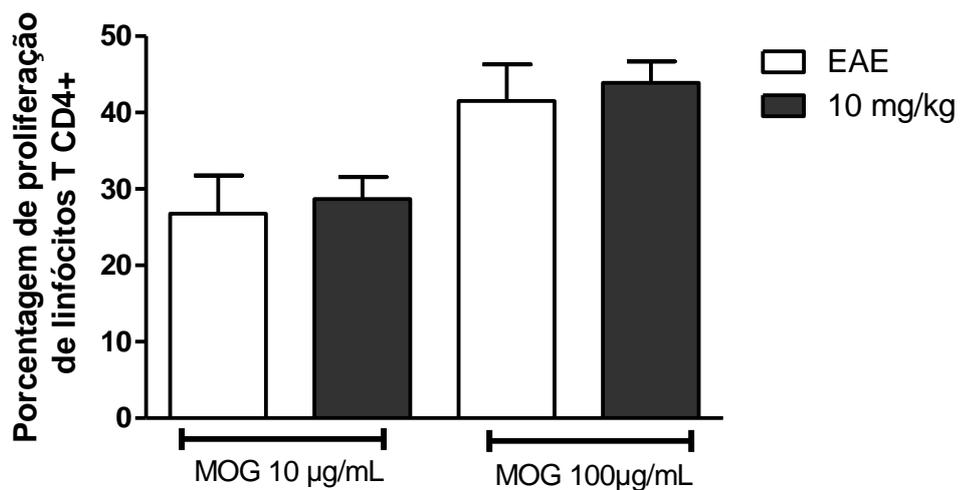


Figura 24: Proliferação das células T CD4⁺ dos linfonodos drenantes de animais imunizados e tratados com trans-cariofileno ou veículo. Os dados estão representados pela Média ± EPM (Mann-Witney n.s., n=4/grupo).

7.4.6. Produção de IFN- γ

A produção de IFN- γ foi quantificada no sobrenadante das células reestimuladas com o peptídeo MOG₃₅₋₅₅ *in vitro*. A produção de IFN- γ pelas células dos animais tratados com trans-cariofileno foi semelhante àquela observada nas células do grupo EAE (Mann-Whitney $p < 0,68$) (**Figura 25**).

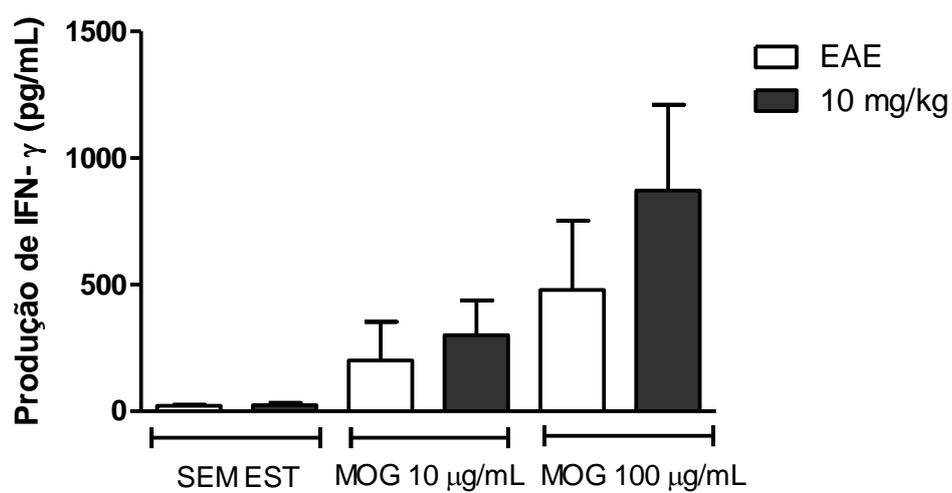


Figura 25: Produção de IFN- γ pelas células dos linfonodos drenantes após reestímulo com MOG₃₅₋₅₅ de animais tratados com trans-cariofileno. Os dados estão representados pela Média \pm EPM (Mann-Witney n.s., n=4/grupo).

7.5. Discussão da Etapa 3

Estudos têm demonstrado que plantas medicinais ricas em óleos essenciais contendo em sua composição terpenos, apresentam efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório em modelos animais (Fernandes *et al.*, 2007; Gomes *et al.*, 2007). No presente trabalho o trans-cariofileno, um sesquiterpeno, reduziu a hipernocicepção no modelo de EAE, tanto aguda como cronicamente. Foi demonstrado por Chavan e colaboradores (2010) que o óxido de cariofileno, um terpeno isolado da casca da *Annona squamosa* L. (Annonaceae) (fruta-do-conde), possui atividade antinociceptiva central e periférica, e também efeito anti-inflamatório. Além disso, o trans-cariofileno mostrou-se capaz de reduzir as citocinas, TNF- α , IL-1 β e IFN- γ em um modelo experimental de colite induzida por dextran sulfato de sódio, e esse efeito anti-inflamatório foi revertido pela administração (i.p.) de um antagonista (AM630) de receptores CB₂ (Bento *et al.*, 2011). Esses dados em conjunto sugerem que o trans-cariofileno possa atuar diminuindo a inflamação e conseqüentemente atenuando a nocicepção.

Foi demonstrado por Gertsch e colaboradores (2008), através da técnica de “*binding*”, que o trans-cariofileno é um agonista de receptores CB₂. Estes receptores estão acoplados a proteína Gi, que inibe a adenilato ciclase e estimula a atividade da proteína-quinase ativada por mitógeno (MAP quinase) (Di Marzo *et al.*, 2004). Apesar de conhecidas as atividades analgésicas exercidas pelos agonistas não seletivos de receptores canabinóides, também existem evidências que apoiam o uso de agonistas seletivos de CB₂ para o tratamento da dor (Guindon e Hohmam, 2008). No estudo de Malan e colaboradores (2001), a administração de um agonista (AM1241) específico de receptores CB₂ reduziu a nocicepção induzida por estímulo térmico (teste de Hargreaves) em ratos. Yamamoto e colaboradores (2008) também

verificaram a participação central dos receptores CB₂ por injeção intratecal (JWH-133) no modelo de constrição parcial do nervo ciático. Além disso, foi evidenciada uma ação antinociceptiva exercida pelo agonista seletivo (AM1241), sugerindo que a ativação do CB₂ contribui com antinocicepção via canabinóide (Ibrahim *et al.*, 2006). Dados do nosso laboratório demonstram que o pré-tratamento com antagonista CB₂ (AM630), no modelo de constrição crônica do nervo ciático bloqueia o efeito anti-hipernociceptivo, ao estímulo térmico (placa aquecida), exercido pelo trans-cariofileno (dados não publicados). No presente estudo, este antagonista canabinóide também foi capaz de bloquear o efeito anti-hipernociceptivo exercido pelo trans-cariofileno na dose de 10 mg/kg. Estes dados corroboram os descritos acima, indicando a participação da via canabinóide na modulação da hipernocicepção, especialmente pelos receptores CB₂.

Conforme mencionado anteriormente, dados da literatura apontam os canabinóides como potenciais moduladores da nocicepção, uma vez que drogas agonistas interferem com a transmissão nociceptiva (Harris *et al.*, 2000; Chapman, 2001). A distribuição dos receptores canabinóides tipo 1 (CB₁) centrais já é bem descrita, já os CB₂ têm sido associados com sua presença periférica (Compton *et al.*, 1993). Foi relatada a presença de CB₂ em diversas regiões do sistema nervoso central de ratos, tais como o cerebelo e o hipocampo (Suarez *et al.*, 2008, 2009), córtex, amígdala (Van Sickle *et al.*, 2005), tálamo e substância cinzenta periaquedutal (PAG), embora em quantidades menores que os CB₁ (Gong *et al.*, 2006). A expressão de CB₂ em locais de processamento e modulação da nocicepção, como a PAG e o tálamo sugere que este receptor possa modular a neurotransmissão nociceptiva, direta ou indiretamente (Gong *et al.*, 2006). Foi evidenciado por Jhaveri e colaboradores (2008) que os receptores CB₂ têm um

papel funcional na modulação de repostas nos neurônios do tálamo em condições de dor neuropática. A medula espinhal e o gânglio da raiz dorsal são regiões centrais que expressam CB₂ em neuropatias dolorosas (Zhang *et al.*, 2003; Wotherspoon *et al.*, 2005), e estes receptores também podem ser encontrados em algumas células não-neuronais, como células da glia (astrócitos e microglia) e endoteliais (Brusco *et al.*, 2008a, 2008b; Chin *et al.*, 2008). A expressão dos receptores CB₂ nas células da glia parece estar relacionada à processos neuroinflamatórios e neurodegenerativos (Zhang *et al.*, 2003; Ashton *et al.*, 2007). Neste contexto, as drogas agonistas poderiam auxiliar no controle da inflamação em doenças como a esclerose múltipla (EM) (Carrier *et al.*, 2005). A administração de agonistas canabinóides sintéticos (WIN-55,212,-2 e JWH-015) em animais com encefalomielite autoimune experimental (EAE), melhorou o déficit neurológico, reduziu a ativação da microglia e diminuiu a infiltração de linfócitos T (Arévalo-Martín *et al.*, 2003). Vale ressaltar que o sistema canabinóide interage com o sistema opioide provavelmente por modulação indireta, uma vez que agonistas seletivos de CB₂, como o AM1241, promovem a liberação de precursores de β-endorfinas pelos queratinócitos, que ativam receptores μ opioides, levando à antinocicepção (Ibrahim *et al.*, 2006). Outra fonte de liberação de β-endorfinas, são as células do sistema imunológico (Stein *et al.*, 1990), e os receptores CB₂ estão presentes em várias células deste sistema tais como células B, NK, monócitos/macrófagos, neutrófilos e linfócitos T (Galie`gue *et al.*, 1995). Os canabinóides também parecem induzir a síntese e liberação de agonistas opioides endógenos que poderiam potencializar a antinocicepção como, por exemplo, a dinorfina na medula espinhal (Houser *et al.*, 2000; Cichewicz e McCarthy, 2003). No presente trabalho foi demonstrado que a administração de naloxona, um antagonista opióide, inibiu o efeito anti-

hipernociceptivo do trans-cariofileno. Estes resultados corroboram os descritos acima sugerindo a participação do sistema opioide no mecanismo de redução da hipernocicepção exercido por este princípio ativo. Contudo, também existem evidências da participação de receptores adrenérgicos do tipo α -2 na antinocicepção mediada por canabinóides. Lichtman e Martin (1991) mostraram que a administração intratecal de iombina, antagonista de receptores adrenérgicos α -2, bloqueia o efeito antinociceptivo exercido pelo Δ^9 -THC (sistêmico).

Embora o trans-cariofileno tenha exercido um papel importante na redução da hipernocicepção, a administração deste composto não interferiu com o desenvolvimento da EAE, o peso ou a coordenação motora; bem como, não foi capaz de reduzir a proliferação dos linfócitos T CD4+ e nem a produção da citocina IFN- γ . São escassos os trabalhos da literatura que descrevem a interação do trans-cariofileno com células do sistema imunológico e seu papel sobre a produção e liberação de citocinas. Bento e colaboradores (2011) encontraram uma redução de IFN- γ em animais com colite induzida por dextran sulfato de sódio e tratados com a dose de 50 mg/kg do trans-cariofileno. Talvez esta diferença se deva ao fato da dose empregada no presente estudo ser menor (10 mg/kg) e também aos mecanismos imunológicos envolvidos nos dois modelos serem diferentes. As respostas na colite induzida pelo dextran estão relacionadas à participação principalmente das células da imunidade inata, como os macrófagos, secretando TNF- α , embora os linfócitos T estejam presentes em menor quantidade (Ohakawara *et al.*, 2008). Já no modelo de EAE, a resposta é mediada especialmente pelas células da imunidade adaptativa, como os linfócitos T, que irão secretar IFN- γ , uma das citocinas responsáveis pela neuroinflamação na doença, mas também ocorre a participação de outras células imunes que migram para o SNC (monócitos/macrófagos) (Gold *et al.*, 2006).

Ainda, se o tratamento fosse capaz de prevenir o desenvolvimento da doença, consequentemente a hipernocicepção também poderia ser afetada. Segundo Olechowski e colaboradores (2009) a hipernocicepção no modelo de EAE é decorrente de uma série de alterações, como o aumento e ativação de células da glia (microglia e astrócitos) e células do sistema imunológico (linfócitos T, B e monócitos) que auxiliam na geração e manutenção da dor neuropática. Outro mecanismo seria pela diminuição dos transportadores de glutamato com consequente aumento deste neurotransmissor, gerando excitotoxicidade e sensibilização da via de transmissão dolorosa (Olechowski *et al.*, 2010). Além disso, foi demonstrado por Lisi e colaboradores (2012) que a administração de rapamicina (antibiótico, imunossupressor e anti-tumoral) inibe a dor neuropática por diminuição do infiltrado de células T no sistema nervoso central e da liberação de citocinas pró-inflamatórias em camundongos. Uma vez que esta redução de ativação das células T, de células da glia, e menor produção e liberação de citocinas poderia evitar um dano axonal, ou morte dos oligodendrócitos que é observado no modelo de EAE.

8. CONCLUSÕES GERAIS

- O extrato hexânico de *Phyllanthus amarus* contém as lignanas filantina, 5-demetoxinirantina e niratina, conforme descrito na literatura. As doses empregadas nos testes iniciais não promoveram alterações comportamentais marcantes nos testes iniciais.
- Somente a dose de 400 mg/kg foi eficaz na redução da nocicepção gerada por estímulos térmicos. Porém, o tratamento com as 3 doses do extrato foi capaz de reduzir a nocicepção tanto na fase aguda quanto na crônica no teste de formalina na pata. De forma não dependente de dose.
- O extrato rico em lignanas não foi capaz de interferir com o curso da doença, com a coordenação motora ou com a perda de peso, tampouco exerceu atividade anti-hipernociceptiva no modelo usado neste estudo.
- Os resultados do presente estudo demonstraram que o trans-cariofileno possui uma atividade anti-hipernociceptiva relevante, e parece exercer sua ação por modulação dos sistemas canabinóide e opioide, sugerindo que este composto pode ser benéfico no tratamento da dor neuropática relacionada a esclerose múltipla

REFERÊNCIAS

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Doenças causadas por respostas imunológicas: hipersensibilidade e auto-imunidade. In: *Imunologia celular e molecular*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.
- Adeyemi OO, Okpo SO, Ogunti OO. Analgesic and anti-inflammatory effects of the aqueous extract of leaves of *Persea americana* Mill (Lauraceae) *Fitoterapia* 2002; 73: 375–380.
- Aicher SA, Silverman MB, Winkler CW, Bebo Jr BF. Hyperalgesia in an animal model of multiple sclerosis. *Pain* 2004; 110: 560-570.
- Alcaro MC, Papini AM. Contribution of peptides to multiple sclerosis research. *Biopolymers* 2006; 84: 349-367.
- Almeida RN, Navarro DS, Barbosa-Filho JM. Plants with central analgesic activity. *Phytomedicine* 2001; 84: 310-322.
- Almolda B, Gonzalez B, Castellano B. Antigen presentation in EAE: role of microglia, macrophages and dendritic cells. *Front Biosci* 2011; 16: 1157-1171.
- Andrew EO, Enogieru A. Effects of oral administration of *Phyllanthus amarus* leaf extract on the kidneys of adult Wistar rats – a histological study. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 2011; 8: 307-311.
- Arévalo-Martín A, Vela JM, Molina-Holgado E, Borrell J, Guaza C. Therapeutic action of cannabinoids in a murine model of multiple sclerosis. *Neuroscience* 2003; 23: 2511-2516.
- Ashton JC, Rahman RM, Nair SM, Sutherland BA, Glass M, Appleton I. Cerebral hypoxia-ischemia and middle cerebral artery occlusion induce expression of the cannabinoid CB2 receptor in the brain. *Neurosci Lett* 2007; 412: 114-117.
- Attal N, Cruccu G, Haanpa“a” M, Hansson P, Jensen TS, Nurmikko T, *et al.* EFNS guidelines on pharmacological treatment of neuropathic pain. *Eur J Neurol* 2006; 13: 1153-1169.

- Basso AS, Frenkel, Quintana FJ, Costa-Pinto FA, Petrovic-Stojkovic S, Puckett L, *et al.* Reversal of axonal loss and disability in a mouse model of progressive multiple sclerosis. *J Clin Invest* 2008; 118: 1532-1543.
- Basso AS, Cheroutre H, Mucida D. More stories on Th17 cells. *Cell Res* 2009; 19: 399-411.
- Bennett G, al-Rashed S, Hoult JR, Brain SD. Nerve growth factor induced hyperalgesia in the rat hind paw is dependent on circulating neutrophils. *Pain* 1998; 77: 315–322.
- Bannon AW, Malmberg AB. Models of Nociception: Hot-Plate, Tail-Flick, and Formalin Test in Rodents *Curr Protoc Neurosci* 2007; 41: 8.9.1-8.9.16.
- Bento AF, Marcon R, Dutra RC, Claudino RF, Cola M, Leite DF, *et al.* β -Caryophyllene inhibits dextran sulfate sodium-induced colitis in mice through CB2 receptor activation and PPAR γ pathway. *Am J Pathol* 2011; 178: 1153-1166.
- Bolles RC, Fanselow MS. Endorphins and behavior. *Annu Rev Psychol* 1982; 33; 87-101.
- Brasil 2006. Presidência da República. *Decreto n° 5813 de 22 de junho de 2006*. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. DOU. Poder Executivo, Brasília, DF, 23 de junho 2006.
- Brassington JC, Marsh NV. Neuropsychological aspects of multiple sclerosis. *Neuropsychol Rev* 1998; 8: 43-77.
- Brusco A, Tagliaferro PA, Saez T, Onaivi ES. Ultra structural localization of neuronal brain CB2 cannabinoid receptors. *Ann NY Acad Sci* 2008a; 1139: 450-457.
- Brusco A, Tagliaferro PA, Saez T, Onaivi ES. Postsynaptic localization of CB2 cannabinoid receptors in the rat hippocampus. *Synapse* 2008b; 62: 944-949.
- Buccellato E, Carretta D, Utan A, Cavina C, Speroni E, Grassi G, *et al.* Acute and chronic cannabinoid extracts administration affects motor function in a CREAE model of multiple sclerosis. *J Ethnopharmacol* 2011; 3: 1033-1038.

- Calleja MA, Vieites JM, Montero-Meterdez T, Torres MI, Faus MJ, Gil A, *et al.* The antioxidant effect of β -caryophyllene protects rat liver from carbon tetrachloride-induced fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation. *B J Nutr* 2013; 109: 394-401.
- Catapan E, Otuki MF, Viana AM, Yunes RA, Bresciani LF, Ferreira J, *et al.* Pharmacological activity and chemical composition of callus culture extracts from species of *Phyllanthus*. *Pharmazie* 2000; 12: 945-956.
- Carrier EJ, Patel S, Hillard CJ. Endocannabinoids in neuroimmunology and stress. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2005; 4: 657-665.
- Carlini EA. "Screening" farmacológico de plantas brasileiras. *Rev Bras Biol* 1972; 32: 265-274.
- Carvalho-Junior PM, Rodrigues RFO, Sawaya ACHF, Marques MOM, Shimizu MT. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* DC. *J Ethnopharmacol* 2004; 95: 297-301.
- Calixto JB, Santos ARS, Cechinel-Filho V, Yunes RA. A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology, and therapeutic potencial. *Med Res Rev* 1998; 18: 225-258.
- Calixto JB, Beirith A, Ferreira J, Santos AR, Filho VC, Yunes RA. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. *Phytother Res* 2000; 14: 401-418.
- Chang CC, Lien YC, Karin CS, Liu C, Lee SS. Lignans from *Phyllanthus urinaria*. *Phytochemistry* 2003; 63: 825-833.
- Charcot JM. Histologie de la sclerose en plaques. *Gazette des hopitaux* 1868; 41: 554-555.
- Chatterjea D, Wetzel A, Mack M, Engblon C, Allen J, Mora-Solano C, *et al.* Mast cell degranulation mediates compound 48/80-induced hyperalgesia in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 425: 237-243.
- Chavan MJ, Wakte PS, Shinde DB. Analgesic and anti-inflammatory activity of Caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. *Phytomedicine* 2010; 17: 149-151.

- Chapman V. Functional changes in the inhibitory effect of spinal cannabinoid (CB) receptor activation in nerve injured rats. *Neuropharmacol* 2001; 41: 870-877.
- Chen X, Winkler-Pickett RT, Carbonetti NH, Ortaldo JR, Oppenheim JJ, Hoqard OMZ. Pertussis toxin as an adjuvant suppresses the number and function of CD4+CD25+ T regulatory cells. *Eur J Immunol* 2006; 36, 671-680.
- Chin CL, Tovcimak AE, Hradil VP, Seifert TR, Hollingsworth PR, Chadran P. Differential effects of cannabinoid receptor agonists on regional brain activity using pharmacological MRI. *Br J Pharmacol* 2008; 153: 367-379.
- Cho JY, Chang HJ, Lee SK, Kim HJ, Hwang JK, Chun HS. Amelioration of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice by oral administration of beta-caryophyllene, a sesquiterpene. *Life Sci* 2006; 80: 932-939.
- Chouhan HS, Singh SK. Phytochemical analysis, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Phyllanthus simplex*. *J Ethnopharmacol* 2011; 137: 1337-1344.
- Chowdhury S, Mukherjee T, Mukhopadhyay R, Mukherjee B, Sengupta S, Chattopadhyay S. The lignan niranthin poisons *Leishmania donovani* topoisomerase IB and favours a Th1 immune response in mice. *Embo Mol Med* 2012; 4: 1126-1143.
- Cichewicz DL, McCarthy EA. Antinociceptive synergy between D9tetrahydrocannabinol and opioids after oral administration. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003; 304: 1010-1015.
- Collin C, Davies P, Mutiboko IK, Ratcliffe S; Sativex Spasticity in MS Study Group. Randomized controlled trial of cannabis-based medicine in spasticity caused by multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2007; 14: 290-296.
- Collin C, Ehler E, Waberszinek G, Alsindi Z, Davies P, Powell K. A double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group study of Sativex, in subjects with symptoms of spasticity due to multiple sclerosis. *Neurol Res* 2010; 35: 451-459.
- Comelli F, Bettoni I, Colleoni M, Giagnoni G, Costa B. Beneficial effects of a Cannabis sativa extract treatment on diabetes-induced neuropathy and oxidative stress. *Phytother Res* 2009; 12: 1678-1684.
- Compston A, Coles A. Multiple Sclerosis. *Lancet* 2008; 372: 1502-1517.

- Compton DR, Rice KC, De Costa BR, Razdan RK, Melvin LS, Johnson MR, *et al.* Cannabinoid structure-activity relationships: correlation of receptor binding in vivo activities. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 265: 218-226.
- Costa O, Divoux D, Ischenko A, Tron F, Fontaine M. Optimization of an animal model of encephalomyelitis autoimmune experimental achieved with a multiple MOG 35-55 in C57BL/6/J strain of mice. *J Autoimmun* 2003; 20: 51-61.
- Courtney AM, Treadaway K, Remington G, Frohman E. Multiple Sclerosis. *Med Clin N Am* 2009; 93: 451-476.
- CunhaTM, Verri Jr WA, Vivancos GG, Moreira IF, Reis S, Parada CA, *et al.* An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. *Braz J Med Biol Rev* 2004; 37: 401-407.
- Delgado S, Sheremata WA. The role of CD4+ T-cells in the development of MS. *Neurol Res* 2006; 28: 245-249.
- Denisson L, Moss-Morris R, Chalder T. A review of psychological correlates of adjustment in patients with multiple sclerosis. *Clin Psychol Rev* 2009; 29: 141-153.
- Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3: 771–784.
- Drummond PD. The effect of cutaneous mast cell degranulation on sensitivity to heat. *Inflamm Res* 2004; 53: 309–315.
- Dunham NW, Miya TS. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc* 1957; 46: 208-209.
- Dworkin RH, Backonja M, Rowbotham MC, Allen RR, Argoff CR, Bennett GJ, *et al.* Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. *Arch Neurol* 2003; 60: 1524-1534.
- Elfahmi BS, Koulman A, Hackl T, Bos R, Kayser O, Woerdenbag HJ, *et al.* Lignans from cell suspension cultures of *Phyllanthus niruri*, an Indonesian medicinal plant. *J Nat Prod* 2006; 69: 55-58.

- Fernandes ES, Passos GF, Medeiros R, da Cunha FM, Ferreira J, Campos MM, *et al.* Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-transcaryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *Eur J Pharmacol* 2007; 569: 228-236.
- Finnerup NB, Gottrup H, Jensen TS. Anticonvulsants in central pain. *Expert Opin Pharmacother* 2002; 3: 1411-1420.
- Finnerup NB, Otto M, Jensen TS, Sindrup SH. Algorithm for neuropathic pain treatment: an evidence based proposal. *Pain* 2005; 118: 289-305.
- Flugel A, Berkowicz T, Ritter T, Labeur M, Jenne DE, Li Z, *et al.* Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunity* 2001; 14:54-60
- Fox P, Bain PG, Glickman S, Carroll C, Zajicek J. The effect of cannabis on tremor in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 2004; 62: 1105-1109.
- Galdino PM, Nascimento MV, Florentino IF, Fajemiroye JO, Chaibub BA, de Paula JR, *et al.* The anxiolytic-like effect of an essential oil derived from *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil. leaves and its major component, β -caryophyllene, in male mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2012; 38: 276-284.
- Galie`gue S, Mary S, Marchand J, Dussosoy D, Carrie`re D, Carayon P, *et al.* Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem* 1995; 232: 54-61.
- Garg G, Adams JD. Treatment of Neuropathic pain with plants medicines. *Chin J Integr Med* 2012; 18: 565-570.
- Genain CP, Canella B, Hauser SL, Raine CS. Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nature Med* 1999; 5: 170-175.
- Gertsch J, Leonti M, Raduner S, Racz I, Chen JZ, Xie XQ, *et al.* Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. *PNAS* 2008; 26: 9099-9104.
- Ghelardini C, Galeotti N, Mazzanti G. Local anesthetic activity of monoterpenes and phenylpropanes of essential oils. *Planta Med* 2001; 67: 564-566.

- Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* 2010; 140: 918-934.
- Gold R, Linington C, Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 2006; 129: 1953-1971.
- Gomes NM, Rezende CM, Fontes SP, Matheus ME, Fernandes PD. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. *J Ethnopharmacol* 2007; 109: 486-492.
- Gong JP, Onaivi ES, Ishiguro H, Liu QR, Tagliaferro PA, Brusco A, *et al.* Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res* 2006; 1071: 10–23.
- Gorski F, Corrêa CR, Cechinel-Filho V, Yunes RA, Calixto JB. Potente antinociceptive activity of a hydroalcoholic extract of *Phyllanthus corcovadensis*. *J Pharm Pharmacol* 1993; 45: 1046-1049.
- Graeber MB, Christie MJ. Multiple mechanisms of microglia: A gatekeeper's contribution to pain states. *Exp Neurol* 2012; 234: 255-261.
- Guindon J, Hohmann AG. Cannabinoid CB2 receptors: a therapeutic target for the treatment of inflammatory and neuropathic pain. *Br J Pharmacol* 2008; 153: 319-334.
- Haas JS, Viana AF, Heckler AP, von Poser GL, Rates SM. The antinociceptive effect of a benzopyran (HP1) isolated from *Hypericum polyanthemum* in mice hot-plate test is blocked by naloxone. *Planta Med* 2010; 76: 1419-1423.
- Hadjimichael O, Kerns RD, Rizzo MA, Cutter G, Vollmer T. Persistent pain and uncomfortable sensations in persons with multiple sclerosis. *Pain* 2007; 127: 35-41
- Hafler DA. Multiple sclerosis. *J Clin Invest* 2004; 113: 788-794.
- Hargraves WA, Hentall ID. Analgesic effects of dietary caloric restriction in adult mice. *Pain* 2005; 114: 455-461.
- Harris J, Drew LJ, Chapman V. Spinal anandamide inhibits nociceptive transmission via cannabinoid receptor activation *in vivo*. *Neuroreport* 2000; 11: 2817-2819.

- Hedegaard CJ, Krakauer M, Bendtzen K, Sorensen PS, Sellebjerg F, Nielsen CH. The effect of beta-interferon therapy on myelin basic protein-elicited CD4+ T cell proliferation and cytokine production in multiple sclerosis. *Clin Immunol* 2008; 129: 80-89.
- Hilliard A, Stott C, Wrigth S, Guy G, Pryce G, Al-Izki S, *et al.* Evaluation of the effects of sativex (THC bds: CB: bds) on inhibition of spasticity in a chronic relapsing experimental allergic autoimmune encephalomyelitis: a model of multiple sclerosis. *ISRN Neurol* 2012; 802649. doi: 10.5402/2012/802649.
- Horváth B, Mukhopadhyay P, Kechrid M, Patel V, Tanchian G, Wink DA, *et al.* β -Caryophyllene ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity in a cannabinoid 2 receptor-dependent manner. *Free Radic Biol Med* 2012; 52: 1325-1333.
- Houser SJ, Eads M, Embrey JP, Welch SP. Dynorphin B and spinal analgesia: induction of antinociception by the cannabinoids CP55,940, Delta(9)-THC and anandamide. *Brain Res* 2000; 857: 337-342.
- Huan J, Culbertson N, Spencer L, Bartholomew R, Burrows GG, Chou YK, *et al.* Decreased FOXP3 levels in multiple sclerosis patients. *J Neurosci Res* 2005; 81: 45-52.
- Huang RL, Huang YL, Ou JC, Chen CC, Hsu FL, Chang C. Screening of 25 compounds isolated from *Phyllanthus* species for anti-human hepatitis B virus in vitro. *Phytother Res* 2003; 17: 449-453.
- Hunskar S, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 1987; 30: 103-114.
- Hussain R, Dickey J, Rosser MP, Matson JA, Kozlowski MR, Brittain RJ, *et al.* A novel class of non-peptidic endothelin antagonists isolated from the medicinal herb *Phyllanthus niruri*. *J Nat Prod* 1995; 58: 1515-1520.
- Hwang BY, Lee JH, Jung HS, Kim KS, Nam JB, Hong YS, *et al.* Sauchinone, a lignan from *Saururus chinensis*, suppresses iNOS expression through the inhibition of transactivation activity of RelA of NF kappa B. *Planta Med* 2003; 69: 1096-1101.
- Ibrahim MM, Rude ML, Stagg NJ, Mata HP, Lai J, Vanderah TW, *et al.* CB2 cannabinoid receptor mediation of antinociception. *Pain* 2006; 122: 36-42.

- Iranloye BO, Owoyele VB, Kelani OR, Olaleye SB. Analgesic activity of aqueous leaf extracts of *Phyllanthus amarus*. *African J Medic and Med Sci* 2011; 40: 47-50.
- Jadhav D, Rekha BN, Gogate PR, Rathod VK. Extraction of vanillin from vanilla pods: A comparison study of conventional soxhlet and ultrasound assisted extraction. *J Food Eng* 2009; 93: 421-426.
- Jadidi-Niaragh F, Mirshafiey A. Th17 cell, the new player of neuroinflammatory process in multiple sclerosis. *Scand J Immunol* 2011; 74: 1-13.
- Jayaprakasha GK, Jagan Mohan Rao L, Sakariah KK. Volatile constituents from *Cinnamomum zeylanicum* fruit stalks and their antioxidant activities. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 4344-4348.
- Jhaveri MD, Elmes SJ, Richardson D, Barrett DA, Kendall DA, Mason R, *et al.* Evidence for a novel functional role of cannabinoid CB(2) receptors in the thalamus of neuropathic pain rats. *Eur J Neurosci* 2008; 27: 1722-1730.
- Kabat EA, Wolf A, Bezer AE, Murray JP. Studies on acute disseminated encephalomyelitis produced experimentally in rhesus monkeys. *J Exp Med* 1951; 93: 615-633.
- Kafitz KW, Rose CR, Thoenen H, Konnerth A. Neurotrophin-evoked rapid excitation through TrkB receptors. *Nature* 1999; 401: 918-921.
- Kalia LV, O'Connor PW. Severity of chronic pain and its relationship to quality of life in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2005; 11: 322-732.
- Karbarz MJ, Luo L, Chang L, Tham C, Palmer JA, Wilson SJ. Biochemical and biological properties of 4-(3-phenyl-[1,2,4] thiadiazol-5-yl)-piperazine-1-carboxylic acid phenylamide, a mechanism-based inhibitor of fatty acid amide hydrolase. *Anesth Analg* 2009; 108: 316-329.
- Kassuya CAL, Silvestre AA, Rehderb VLG, 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 DF, de Mello LV, Rehder VL, Calixto JB. Anti-inflammatory properties of extracts, fractions and lignans isolated from *Phyllanthus amarus*. *Planta Med* 2005; 71: 721-726.
- Kassuya CAL, Silvestre AA, Menezes-de-Lima O Jr, Marotta DM, Rehder VL, Calixto JB. Antiinflammatory and antiallodynic actions of the lignan niranthin isolated from *Phyllanthus amarus*. Evidence for interaction with platelet activating factor receptor. *Eur J Pharmacol* 2006; 54: 182-188.
- Kawasaki Y, Zhang L, Cheng JK, Ji RR. Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. *J Neurosci* 2008; 28: 5189-5194.
- Kiemer AK, Hartung T, Huber C, Vollmar AM. *Phyllanthus amarus* has antiinflammatory potential by inhibition of iNOS, COX-2, and cytokines via the NF-kB pathway. *J Hepatol* 2003; 38: 289-297.
- Kinsey SG, Mahadevan A, Zhao B, Sun H, Naidu PS, Raj K, *et al*. The CB2 cannabinoid receptor-selective agonist O-3223 reduces pain and inflammation without apparent cannabinoid behavioral effects. *Neuropharmacol* 2011; 60: 244-251.
- Korn T. Pathophysiology of multiple sclerosis. *J Neurol* 2008; 255: 2-6.
- Kozela E, Lev N, Kaushansky N, Eilam R, Rimmerman N, Levy R, *et al*. Cannabidiol inhibits pathogenic T cells, decreases spinal microglial activation and ameliorates multiple sclerosis-like disease in C57BL/6 mice. *Br J Pharmacol* 2011; 163: 1507-1519.
- Krithika R, Mohankumar R, Verma RJ, Shrivastav PS, Mohamad IL, Gunasekaran P, *et al*. Isolation, characterization and antioxidative effect of phyllanthin against CCl4-induced toxicity in HepG2 cell line. *Chem Biol Interac* 2009; 181, 351-358.
- Krumbholz M, Theil D, Derfuss T, Rosenwald A, Schrader F, Monoranu CM, *et al*. BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma. *J Exp Med* 2005; 201: 195-200.

- Lawson-Evi P, Eklu-Gadegbeku K, Agbonon A, Aklirikokou K, Moukha SE, Creppy E, *et al.* Toxicological assessment on extracts of *Phyllanthus amarus* Schum & Thonn. *Scientific Research and Essay* 2008; 3: 410-415.
- Lee AK, Sung SH, Kim YC, Kim SG. Inhibition of lipopolysaccharide inducible nitric oxide synthase, TNF-alpha and COX-2 expression by sauchinone effects on IkappaBalpha phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. *Br J Pharmacol* 2003; 139:11-20.
- Levine S, Sowinski R. Experimental allergic encephalomyelitis in inbred and outbred mice. *J Immunol* 1973; 110: 139-143.
- Lichtman AH, Martin BR. Cannabinoid-induced antinociception is mediated by a spinal alpha 2-noradrenergic mechanism. *Brain Res* 1991; 559: 309-314.
- Lisi L, Navarra P, Cirocchi R, Sharp A, Stigliano E, Feinstein DL, *et al.* Rapamycin reduces clinical signs and neuropathic pain a chronic model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2012; 243: 43-51.
- Lu J, Kurejova M, Wirotanseng LN, Linker RA, Kuner R, Tappe-Theodor A. Pain in experimental autoimmune encephalitis: a comparative study between different mouse models. *J Neuroinflammation* 2012; 9: 233.
- Lorenzi H, Matos FJA. *Plantas Mediciniais no Brasil nativas e exóticas*. São Paulo: Instituto Plantarum; 2002. p. 512.
- Lynch JL, Gallus NJ, Ericson ME, Beitz AJ. Analysis of nociception, sex and peripheral nerve innervation in the TMEV animal model of multiple sclerosis. *Pain* 2008; 136: 293-304.
- Maciel MAM, Pinto AC, Veiga-Júnior VF. Plantas Mediciniais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quim Nova* 2002; 25: 429-438.
- Mahat MA, Patil BM. Evaluation of antiinflammatory activity of methanol extract of *Phyllanthus amarus* in experimental animal models. *Indian J Pharm Sci* 2007; 69: 33-36.
- Malan TPJr, Ibrahim MM, Deng H, Liu Q, Mata HP, Vanderah T, *et al.* CB2 cannabinoid receptor mediated peripheral antinociception. *Pain* 2001; 9: 239-245.

- Mali SM, Sinnathambi A, Kapase CU, Subhash L, Bodhankar SL, Mahadik KR. Anti-arthritic activity of standardised extract of *Phyllanthus amarus* in Freund's complete adjuvant induced arthritis. *Biomed Agind Pathol* 2011; 1: 185-190.
- Malingré T, Hendriks H, Batterman S, Bos R, Visser J. The essential oil of *Cannabis sativa*. *Planta Med* 1975; 28: 56-61.
- Marchand F, Grist J, Bradbury EJ, McMahon SB. Role of microglia in spinal cord injury pain in rats. *Intl Assoc. Study Pain Abstr* 2005; 136-265.
- Marques LC, Galvão SMP, Espínola E, Dias RF, Mattei R, Oliveira MG, et al. Psychopharmacological assessment of *Pfaffia glomerata* roots (extract BNT-08) in rodents. *Phytother Res* 2004; 18: 566-572.
- Martin WJ, Coffin PO, Attias E, Balinsky M, Tsou K, Walker JM. Anatomical basis for cannabinoid-induced antinociception as revealed by intracerebral microinjections. *Brain Res* 1999; 822: 237-242.
- Martin R, McFarland HF, McFarlin DE. Immunological aspects of demyelinating diseases. *Annu Rev Immunol* 1992; 10: 153-187.
- McKenzie BS, Kastelein RA, Cua DJ. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol* 2006; 27: 17-23.
- Medeiros R, Passos GF, Vitor CE, Koepp J, Mazzuco TL, Pianowski LF, et al. Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. *Br J Pharmacol* 2007; 151: 618-627.
- Mockute D, Bernotiene G, Judzentiene A. The essential oil of *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* growing wild in vilnius district (Lithuania). *Phytochemistry* 2001; 57: 65-69.
- Moore FGA, Walfson C. Human herpes virus 6 and multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2002; 106: 63-83.

- Morin N, Owolabi SA, Harty MW, Papa EF, Tracy Jr TF, Shaw SK et al. Neutrophils invade lumbar dorsal root ganglia after chronic constriction injury of the sciatic nerve. *J Neuroimmunol* 2007; 184:164–71.
- Murray TJ. The history of multiple sclerosis: the changing frame of the disease over the centuries. *J Neurol Sci* 2009; 277: S3-S8.
- Murugaiyah V, Chan KL. Analysis of lignans from *Phyllanthus niruri* L. in plasma using a simple HPLC method with fluorescence detection and its application in a pharmacokinetic study. *J Chromatogr B* 2007; 852: 138-144
- Nadeau S, Filali M, Zhang J, Kerr BJ, Rivest S, Soulet D, et al. Functional recovery after peripheral nerve injury is dependent on the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF: implications for neuropathic pain. *J Neurosci* 2011; 31:12533-12542.
- Naguib M, Diaz P, Xu JJ, Astruc-Diaz F, Craig S, Vivas-Mejia P, et al. MDA7: a novel selective agonist for CB2 receptors that prevents allodynia in rat neuropathic pain models. *British J Pharmacol* 2008; 155: 1104-1116.
- Nigam MC, Handa KL, Nigam IC, Levi L. Essential oils and their constituents XXIX. I the essential oil of marihuana: composition of genuine Indian *Cannabis sativa* L. *Can J Chem* 1965; 43: 3372-3376.
- Notka F, Meier GR, Wagner F. Inhibition of wild-type human immunodeficiency virus and reverse transcriptase inhibitor-resistant variants by *Phyllanthus amarus*. *Antiviral Res* 2003; 58: 175-86.
- Obreja O, Rathee PK, Lips KS, Distler C, Kress M. IL-1 β potentiates heat-activated currents in rat sensory neurons: involvement of IL-1RI, tyrosine kinase, and protein kinase C. *FASEB J* 2002; 16: 1497-1503.
- O'Connor, P. Key issues in the diagnosis and treatment of multiple sclerosis: an overview. *Neurology* 2002; 5: 1-33.
- O'Connor AB, Schwid SR, Herrmann DN, Markman, Dworkin RH. Pain associated with multiple sclerosis: Systematic review and proposed classification. *Pain* 2008; 137: 96-111.

- Ohakawara T, Mitsuyama K, Takeda H, Asaka M, Fujiyama Y, Nishihira J. Lack of macrophage migration inhibitory factor suppresses innate. *Scand J Gastroenterol* 2008; 43: 1497-1504.
- Olechowski CJ, Truong JJ, Kerr BJ. Neuropathic pain behaviours in a chronic relapsing model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Pain* 2009; 141: 156-164.
- Olechowski CJ, Parmar A, Miller B, Stephen J, Tenorio G, Tran K, et al. A diminished response to formalin simulation reveals a role for the glutamate transporters in the altered pain sensitivity of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Pain* 2010; 149: 565-572
- Oliver AR, Lyon GM, Ruddle NH. Rat and human myelin oligodendrocyte glycoproteins induce experimental autoimmune encephalomyelitis by different mechanisms in C57BL/6 mice. *J Immunol* 171 2003; 462-468.
- Orav A, Stulova I, Kailas T, Müürisepp M. Effect of storage on the essential oil composition of *Piper nigrum* L. fruits of different ripening states. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 2582-2586.
- Oreja-Guevara C. Clinical efficacy and effectiveness of Sativex, a combined cannabinoid medicine, in multiplesclerosis-related spasticity. *Rev Neurother* 2012; 12: 3-8.
- Osterberg A, Boivie J, Thuomas KA. Central pain in multiple sclerosis – prevalence and clinical characteristics. *Eur J Pain* 2005; 9: 531-542.
- Papenfuss TL, Rogers JC, Gienapp I, Yurrita M, McClain M, Damico N, et al. Sex differences in experimental autoimmune encephalomyelitis in multiple murine strains. *J Neuroimmunol* 2004; 150: 59-69.
- Paula-Freire LIG, Andersen ML, Molska GR, Kohn DO, Carlini ELA. Evaluation of the antinociceptive activity of *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae) essential oil and its isolated active principles in mice. *Phytother Res* 2013; 27: 1220-1224.

- Pender MP, Tabi Z, Nguyen KB, McCombe PA. The proximal peripheral nervous system is a major site of demyelination in experimental autoimmune encephalomyelitis induced in the Lewis rat by a myelin basic protein-specific T cell clone. *Acta Neuropathol* 1995; 89: 527-53.
- Perazzo FF, Souza GHB, Lopes W, Cardoso LGV, Carvalho JCT, Dhammika Nanayakkara NP, *et al.* Anti-inflammatory and analgesic properties of water– ethanolic extract from *Pothomorphe umbellate* (Piperaceae) aerial parts. *J Ethnopharmacol* 2005; 99: 215-220.
- Petcu M, Dias JP, Ongali B, Thibault G, Neugebauer W, Couture R. Role of kinin B₁ and B₂ receptors in a rat model of neuropathic pain. *Int Immunopharmacol* 2008; 8: 188-196.
- Petersen M, Eckert AS, Segond von Banchet G, Heppelmann B, Klusch A, Kniffki KD. Plasticity in the expression of bradykinin binding sites in sensory neurons after mechanical nerve injury. *Neuroscience* 1998; 83: 949-959.
- Pertwee R. *Cannabis sativa* L.: An overview of its pharmacology and possible therapeutics uses. In: Carlini EA, Rodrigues E, Galduróz JCF. *Cannabis sativa* L. e substâncias canabinóides em medicina. 1° ed. São Paulo: CEBRID – Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas; 2005.p.14–34.
- Pertwee R. Cannabinoids and Multiple Sclerosis. *Mol Neurobiol* 2007; 36: 45–59.
- Petrosino S, Palazzo E, de Novellis V, Bisogno T, Rossi F, Maione S, *et al.* Changes in spinal and supraspinal endocannabinoid levels in neuropathic rats. *Neuropharmacol* 2007; 52: 415-422.
- Pichersky E, Noel JP, Dudareva N. Biosynthesis of plant volatiles: Nature’s diversity and ingenuity. *Science* 2006; 311: 808–811.
- Pinho-da-Silva L, Mendes-Maia PV, Teófilo TMNG, Barbosa R, Ceccatto VM, Coelho-de-Souza AN, *et al.* Trans-Caryophyllene, a natural sesquiterpene, causes tracheal smooth muscle relaxation through blockade of voltage-dependent Ca²⁺ channels. *Molecules* 2012; 17: 11965-11977.

- Pope JG, Karpus WJ, VanderLugt C, Miller SD. Flow cytometric and functional analyses of central nervous system-infiltrating cells in SJL/J mice with Theiler's virus-induced demyelinating disease. Evidence for a CD4+ T cell-mediated pathology. *J Immunol* 1996; 156: 4050-4058.
- Pryce G, Baker D. Control of spasticity in a multiple sclerosis model is mediated by CB1, not CB2, cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol* 2007; 150: 519-525.
- Rabelo M, Souza EP, Soares PM, Miranda AV, Matos FJ, Criddle DN. Antinociceptive properties of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. (Labiatae) in mice. *Braz J Med Biol Res* 2003; 4: 521-524.
- Raphael KR, Kuttan R. Inhibition of experimental gastric lesion and inflammation by *Phyllanthus amarus* extract. *J Ethnopharmacol* 2003; 87: 193-197.
- Ransohoff RM, Kivisakk P, Kidd G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 569-581.
- Rivers TM, Sprunt DH, Berry MD. Observations on attempts acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *J Exp Med* 1933; 58: 39-53.
- Rizzo MA, Hadjimichael OC, Preiningerova J, Vollmer TL. Prevalence and treatment of spasticity reported by multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 2004; 10: 589-95.
- Roberts L, McColl GJ. Tumour necrosis factor inhibitors: risks and benefits in patients with rheumatoid arthritis. *Intern Med J* 2004; 34: 687-693.
- Rodrigues DH, Sachs D, Teixeira AL. Mechanical hypernociception in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Arq Neuropsiquiatr* 2009; 67: 78-81.
- Sakaguchi S, Powrie F. Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. *Science* 2007; 317: 627-629.
- Santos AR, Filho VC, Niero R, Viana AM, Moreno FN, Campos MM, et al. Analgesic effects of culture extracts from selected species of *Phyllanthus* in mice. *J Pharm Pharmacol* 1994; 46: 755-759.

- Santos AR, Filho VC, Yunes RA, Calixto JB. Analysis of the mechanisms underlying the antinociceptive effect of the extracts of plants from the genus *Phyllanthus*. 1995; 26: 1499-1506.
- Santos ARS, De Campos ROP, Miguel OG, Cechinel-Filho V, Siani AC, Yunes RA, *et al.* Antinociceptive properties of extracts of new species of plants of the genus *Phyllanthus* (Euphorbiaceae). *J Ethnopharmacol* 2000; 72: 229-238.
- Santos RI. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia da planta ao medicamento. 3º ed. Porto Alegre: Editora da UFSC e UFRGS; 2001. p. 333-365.
- Serafini B, Rosicarelli B, Franciotta D, Magliozzi R, Reynolds R, Cinque P, *et al.* Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *J Exp Med* 2007; 204: 2899-2912.
- Segond von Banchet G, Boettger MK, Fischer N, Gajda M, Bräuer R, Schaible HG. Experimental arthritis causes tumor necrosis factor-alpha-dependent infiltration of macrophages into rat dorsal root ganglia which correlates with pain-related behavior. *Pain* 2009; 145:151-9.
- Silva MG, Craveiro AA., Matos FJA, Machado MIL, Alencar JW. Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves. *Fitoterapia* 1999; 70: 32-34.
- Sindrup SH, Jensen TS. Efficacy of pharmacological treatments of neuropathic pain: an update and effect related to mechanism of drug action. *Pain* 1999; 83: 389-400.
- Singh M, Tiwari N, Shanker K, Verma RK, Gupta AK, Gupta MM. Two new lignans from *Phyllanthus amarus*. *J Asian Nat Prod Res* 2009; 11: 562-568.
- Skulina C, Schmidt S, Dornmair K, Babbe H, Roers A, Rajewsky K, *et al.* Multiple sclerosis: brain-infiltrating CD8+ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood. *PNAS* 2004; 101: 2428-2433.
- Slavin A, Kelly-Modis L, Labadia M, Ryan K, Brown ML. Pathogenic mechanism and experimental models of multiple sclerosis. *Autoimmunity* 2010; 43: 504-513.

- Sloane E, Ledebor A, Seibert W, Leinwand L, Milligan ED, Van Dam AM. Anti-inflammatory cytokine gene therapy decreases sensory and motor dysfunction in experimental Multiple Sclerosis: MOG-EAE behavioral and anatomical symptom treatment with cytokine gene therapy. *Brain Behav Immun* 2009; 23: 92-100.
- Solaro C, Boehmker M, Tanganelli P. Pregabalin for treating paroxysmal painful symptoms in multiple sclerosis: a pilot study. *J Neurol* 2009; 256:1773-1774.
- Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 2005 23: 683-747.
- Stolz ED, Viana AF, Hasse DR, von Poser GL, do Rego JC, Rates SM. Uliginosin B presents antinociceptive effect mediated by dopaminergic and opioid systems in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2012; 39: 80-87.
- Souza MM, Madeira A, Berti C, Krogh R, Yunes RA, Cechinel-Filho V. Antinociceptive properties of the methanolic extract obtained from *Ipomoea pescaprae* (L.). *J Ethnopharmacol* 2000; 69: 85–90.
- Sriram S, Stratton CW, Yao S, Tharp A, Ding L, Bannan JD, *et al.* Chlamydia pneumoniae infection of the central nervous system in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1999; 46: 6-14.
- Stadelmann C, Kerschensteiner M, Misgeld T, Bruck W, Hohlfeld R, Lassmann H. BDNF and gp145trkB in multiple sclerosis brain lesions: neuroprotective interactions between immune and neuronal cells? *Brain* 2002; 125: 75-85.
- Stenager E, Knudsen L, Jensen K. Acute and chronic pain syndromes in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 1991; 84:197–200.
- Stein C, Hassan AH, Przewtocki R, Gramsch C, Peter K, Herz A. Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation. *PNAS* 1990; 87: 5935-5939.
- Steinman L. Nuanced roles of cytokines in three major human brain disorders. *J Clin Invest* 2008; 118: 3557-3563.

- Stromnes IM, Goverman JM. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc* 2006; 1: 1810-1819.
- Suarez J, Bermudez-Silva FJ, Mackie K, Ledent C, Zimmer A, Cravatt BF, *et al.* Immunohistochemical description of the endogenous cannabinoid system in the rat cerebellum and functionally related nuclei. *J Comp Neurol* 2008; 509: 400-421.
- Suarez J, Llorente R, Romero-Zerbo SY, Mateos B, Bermúdez-Silva FJ, de Fonseca FR, *et al.* Early maternal deprivation induces gender-dependent changes on the expression of hippocampal CB1 and CB2 cannabinoid receptors of neonatal rats. *Hippocampus* 2009; 19: 623–632.
- Sud R, Spengler RN, Nader ND, Ignatowski TA. Antinociception occurs with a reversal in alpha(2)-adrenoceptor regulation of TNF production by peripheral monocytes/macrophages from pro-to anti-inflammatory. *Eur J Pharmacol* 2008; 588: 217-231.
- Svendsen KB, Jensen TS, Hansen HJ, Bach FW. Sensory function and quality of life in patients with multiple sclerosis and pain. *Pain* 2005;114: 473–81.
- Teixeira NB. Avaliação do efeito da crotoxina na dor e nos sinais clínicos de animais portadores de encefalomielite autoimune experimental, um modelo animal de esclerose múltipla. Dissertação de Mestrado. São Paulo: Instituto Butantan. 2012. 81 p.
- Thibault K, Calvino B, Pezet S. Characterisation of sensory abnormalities observed in an animal model of multiple sclerosis: a behavioural and pharmacological study. *Eur J Pain* 2011; 3: 1-16.
- Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mörk S, Bö L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 1998; 338: 278-285.
- Tripathi AK, Verma Rk, Gupta AK, Gupta MM, Khanuja SPS. Quantitative determination of phyllanthin and hypophyllanthin in *Phyllanthus* species by performance thin layer chromatography. *Phytochem Anal* 2006; 17: 394-397.
- Truini A, Galeotti F, La Cesa S, Di Rezze S, Biasiotta A, Di Stefano G, *et al.* Mechanisms of pain in multiple sclerosis: a combined clinical and neurophysiological study. *Pain* 2012; 153: 2048-2054.

- Tuohy VK, Lu Z, Sobel RA, Laursen RA, Lees MB. Identification of an encephalitogenic determinant of myelin proteolipid protein for SJL mice. *J Immunol* 1989; 14, 1523-1527.
- Vaney C, Heinzl-Gutenbrunner M, Jobin P, Tschopp F, Gattlen B, Hagen U, *et al.* Efficacy, safety and tolerability of an orally administered cannabis extract in the treatment of spasticity in patients with multiple sclerosis: a randomized, doubleblind, placebo-controlled, crossover study. *Mult Scler* 2004; 10: 417-424.
- Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, *et al.* Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* 2005; 310: 329-332.
- Xu Q, Yaksh TL. A brief comparison of the pathophysiology of inflammatory versus neuropathic pain. *Curr Opin Anaesthesiol* 2011; 24: 400-407.
- Wang CY, Lee SS. Analysis and identification of lignans in *Phyllanthus urinaria* by HPLC-SPE-NMR. *Phytochem Anal* 2005; 16: 120-126.
- Webster GL. Systematics of the Euphorbiaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 1994; 81: 1-144.
- Wotherspoon G, Fox A, McIntyre P, Colley S, Bevan S, Winter J. Peripheral nerve injury induces cannabinoid receptor 2 protein expression in rat sensory neurons. *Neuroscience* 2005; 135: 235-245.
- Yuan S, Shi Y, Tang SJ. Wnt signaling in pathogenesis of multiple sclerosis associated chronic pain. *J Neuroimmune Pharmacol* 2012; 7: 904-913.
- Zajicek J, Fox P, Sanders H, Wright D, Vickery J, Nunn A, *et al.* Cannabinoids for treatment of spasticity and other symptoms related to multiple sclerosis (CAMS study): multicentre randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2003; 362: 1517– 1526.
- Zhang J, Hoffert C, Vu HK, Groblewski T, Ahmad S, O'Donnell D. Induction of CB2 receptor expression in the rat spinal cord of neuropathic but not inflammatory chronic pain models. *Eur J Neurosci* 2003; 17: 2750–2754.



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO/HOSPITAL SÃO PAULO

Data: 20/11/2011 07:22:12
Página: 1/2
U = 2000

São Paulo, 19 de Junho de 2009
CEP 0674/09

Ilmo(s). Sr(a):
Pesquisador(a) Elísaldo Lutz de Araújo Carlini
Co-Investigadores: Graziela Rigueira Moiska, Alexandre Salgado Basso;
Disciplina/Departamento Psicobiologia da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
Patrocinador CAPES

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado:
'AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIALODÍNICO DO ÓLEO DE Copalifera multijuga Hayne (Leguminosaeae) E DO EXTRATO DE Phyllanthus amarus Schumach. & Thonn. (Euphorbiaceae) EM UM MODELO DE ENCEFALOMIELEITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL'

CARACTERÍSTICA DO ESTUDO: Estudo experimental crônico de modelo de encefalomielite autoimune em camundongos com tratamento de plantas medicinais

OBJETIVOS: Avaliar o efeito antialodínico das plantas medicinais no modelo de encefalomielite autoimune em camundongos

RESUMO: Serão utilizados camundongos C57BL/6J fêmeas de 8-12 semanas, provenientes do CEDEME da Unifesp. O projeto será dividido em 3 etapas: Inicialmente será realizada uma triagem farmacológica para verificar a ocorrência de efeitos tóxicos e avaliação da coordenação motora. A seguir, serão realizados testes para detectar o efeito antinocepcivo (placa quente e o teste de formalina na pata). Para avaliação de atividade antialodínica, camundongos serão imunizados por via subcutânea no flanco com 200 microgramas de glicoproteína da mielina dos oligodendrócitos dissolvida em adjuvante completo de Freund contendo 5mg/ml de M. tuberculosis. Esses animais serão avaliados antes e após a imunização quanto à alodínia mecânica pelo teste de Von Frey e hiperalgesia térmica na placa quente. Será verificado também o efeito das plantas sobre o desenvolvimento da resposta autoimune adaptativa pela proliferação de células T e produção de citocinas frente estímulo antígeno específico.

FUNDAMENTAÇÃO RACIONAL: A procura por novas drogas, sintéticas ou de origem natural, que possam ser utilizadas no tratamento da esclerose múltipla e que também atuem sobre o quadro doloroso da doença, trata portanto, um grande benefício aos portadores da doença. Uma vez que já foram descritas atividades antinocepciva e antiinflamatória para o extrato de Phyllanthus amarus e para o óleo da Copaliba em modelos animais, é de grande relevância o emprego dessas plantas no estudo para comprovar um efeito antialodínico, é também uma possível ação moduladora sobre o sistema imunológico no modelo de encefalomielite autoimune experimental

MATERIAL E METODO: Descritos os procedimentos experimentais de domínio da equipe e realizados em locais com infra-estrutura adequada

DETALHAMENTO FINANCEIRA: Sem financiamento externo R\$ 5334,00

CRONOGRAMA: 36 meses

OBJETIVO ACADÊMICO: Doutorado

PRIMEIRO RELATÓRIO PREVISTO PARA: 24/06/2010, os demais relatórios deverão ser entregues ao CEP anualmente até o término do estudo

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU e APROVOU o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Omar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo