

Cristina Setim Freitas

**Avaliação dos mecanismos de ação envolvidos na atividade  
antinociceptiva da *Baccharis illinita* DC (Asteraceae)**

**CURITIBA**

**2009**

Cristina Setim Freitas

**Avaliação dos mecanismos de ação envolvidos na atividade antinociceptiva da *Baccharis illinita* DC (Asteraceae)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Consuelo Andrade Marques

**CURITIBA**

**2009**

**“Sábio é aquele que conhece os limites da própria ignorância”**

**Sócrates**

*Dedico essa tese aos meus pais, Regina e Rodrigo,  
que sempre souberam guiar meus passos e sempre me  
proporcionaram plenas condições para atingir meus objetivos.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos e à Prof<sup>ª</sup>. Maria Consuelo Andrade Marques, pela paciência, respeito, ensinamentos e confiança em meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti (Departamento de Química, UFSC), pela realização do estudo químico e fornecimento dos extratos, frações e compostos da *Baccharis ilinita*.

Ao Prof. Dr. Giles Alexander Rae (Departamento de Farmacologia, UFSC), pela oportunidade de realizar os experimentos de western blot e ao Prof. Juliano Ferreira (Departamento de Química, UFSM), pela oportunidade de realizar os experimentos de ligação específica e liberação de glutamato, em seus laboratórios.

Aos professores do Departamento de Farmacologia da UFPR.

Aos colegas e amigos do laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação (UFSC): Maria Fernanda, Cris Baggio, Marina, Débora, Morgana, Ana, Rodrigo, Dani Taga, Daniel, Leidi, Ney, Vini, Fábio, Denise, Alisson, Vanessa, Serginho, Chico, Fran, e também do laboratório 81 (gastro – UFPR): André, Ana e Barbara, pela companhia, amizade, união e ótima convivência.

Aos meus amigos sempre presentes, muito obrigadas a todos, com carinho especial!

A CAPES, pelo auxílio financeiro.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> <i>Baccharis illinita</i> DC.....	21
<b>Figura 2:</b> Via ascendente da nocicepção – primeira conexão.....	26
<b>Figura 3:</b> Via ascendente da nocicepção – tratos aferentes.....	27
<b>Figura 4:</b> Compostos isolados da fração hexânica da <i>Baccharis illinita</i> .....	35
<b>Figura 5:</b> Efeito do extrato hidroacóico (HA), das frações aquosa (FAq), hexânica (FH) e acetato de etila (FAE) da <i>B. illinita</i> administrados por via oral, na nocicepção induzida por ácido acético (0,6%, <i>i.p.</i> ).....	52
<b>Figura 6:</b> Efeito da fração hexânica (FH) e de seus compostos isolados, baurenol, ácido oleanólico e $\alpha$ -espinasterol administrados por via <i>i.p.</i> , na nocicepção induzida por ácido acético (0,6%, <i>i.p.</i> ).....	54
<b>Figura 7:</b> Efeito da fração hexânica (FH) administrada por via oral, na primeira e segunda fase da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina 2,5%.....	55
<b>Figura 8:</b> Efeito da fração hexânica (FH) administrada por via oral, na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato (20 nmol).....	56
<b>Figura 9:</b> Efeito do ácido oleanólico administrado pela via <i>i.p.</i> , co-administrado com o glutamato na pata e administrado pela via oral na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato (20 nmol).....	57
<b>Figura 10:</b> Efeito do $\alpha$ -espinasterol administrado pela via <i>ip</i> , co-administrado com o glutamato na pata e administrado pela via oral na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato (20 nmol).....	58
<b>Figura 11:</b> Efeito da fração hexânica (FH) administrada por via oral, na hiperalgesia térmica, mecânica e edema de pata induzidos pela prostaglandina E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> ), em ratos.....	59
<b>Figura 12:</b> Efeito da fração hexânica (FH) administrada por via oral, na hiperalgesia térmica, mecânica e edema de pata induzidos pela bradicinina (BK), em ratos.....	60
<b>Figura 13:</b> Efeito da fração hexânica (FH) administrada por via oral, sobre a alodínia (filamento 0,4) e hiperalgesia (filamento 2,0) induzida pela constrição parcial do nervo ciático em camundongos.....	62

<b>Figura 14:</b> Efeito da fração hexânica (FH) administrada diariamente por via oral, sobre a alodínia (filamento 0,4) e hiperalgesia (filamento 2,0) induzida pela constrição parcial do nervo ciático em camundongos.....	63
<b>Figura 15:</b> Efeito da fração hexânica (FH) administrada por via oral, sobre a performance motora.....	64
<b>Figura 16:</b> Efeito do pré-tratamento dos animais com naloxona (1 mg/kg, <i>i.p.</i> ) sobre a atividade antinociceptiva da fração hexânica (FH, <i>v.o.</i> ) e morfina (5 mg/kg, <i>s.c.</i> ), no modelo de nocicepção induzida pela injeção de ácido acético 0,6% ( <i>i.p.</i> ) em camundongos.....	65
<b>Figura 17:</b> Efeito da fração hexânica (FH) administrada por via oral, na nocicepção induzida pela injeção intratecal de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ ).....	66
<b>Figura 18:</b> Efeito do ácido oleanólico administrado pela via <i>i.p.</i> , na nocicepção induzida pela injeção intratecal de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ ).....	67
<b>Figura 19:</b> Efeito do $\alpha$ -espinasterol administrado pela via <i>i.p.</i> , na nocicepção induzida pela injeção intratecal de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ ).....	68
<b>Figura 20:</b> Efeito da fração hexânica (FH) administrada por via oral, na nocicepção induzida pela injeção intratecal de AAE.....	69
<b>Figura 21:</b> Efeito do ácido oleanólico administrado por via <i>i.p.</i> , na nocicepção induzida pela injeção intratecal de AAE.....	70
<b>Figura 22:</b> Efeito do $\alpha$ -espinasterol administrado por via <i>i.p.</i> , na nocicepção induzida pela injeção intratecal de AAE.....	71
<b>Figura 23:</b> Efeito do ácido oleanólico e do $\alpha$ -espinasterol administrados por via <i>i.p.</i> , na nocicepção induzida pela injeção intratecal de SP.....	72
<b>Figura 24:</b> Avaliação da degeneração das fibras sensoriais (C e A $\delta$ ), através da redução das respostas oculares relacionadas à aplicação tópica de 10 $\mu$ l de solução de capsaicina (10 mg/ml).....	73
<b>Figura 25:</b> Influência do pré-tratamento neonatal com capsaicina (50 mg/kg, <i>s.c.</i> ), sobre o efeito antinociceptivo do ácido oleanólico e do $\alpha$ -espinasterol no modelo de nocicepção induzida por glutamato.....	74
<b>Figura 26:</b> Efeito do ácido oleanólico e $\alpha$ -espinasterol sobre a união específica (binding) de [ $^3$ H]-L -glutamato (na presença de Na $^+$ ) em membranas de cérebro de camundongos.....	75
<b>Figura 27:</b> Efeito do ácido oleanólico e $\alpha$ -espinasterol sobre a união específica (binding) de [ $^3$ H]-L -glutamato (na ausência de Na $^+$ ) em membranas de cérebro de camundongos.....	75

<b>Figura 28:</b> Efeito do ácido oleanólico e $\alpha$ -espinasterol sobre a liberação de [ <sup>3</sup> H]L-glutamato em sinaptossomas obtidos de cérebros de camundongos.....	76
<b>Figura 29:</b> Efeito do $\alpha$ -espinasterol administrado pela via <i>i.p.</i> , co-administrado com a capsaicina na pata e administrado pela via oral na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina.....	78
<b>Figura 30:</b> Efeito do $\alpha$ -espinasterol administrado pela via <i>i.p.</i> , co-administrado com o cinamaldeído na pata e administrado pela via oral na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído.....	79
<b>Figura 31:</b> Efeito do $\alpha$ -espinasterol administrado pela via <i>i.p.</i> , co-administrado com o mentol na pata e administrado pela via oral na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de mentol.....	81
<b>Figura 32</b> Influência do pré-tratamento com toxina Pertussis sobre o efeito antinociceptivo do $\alpha$ -espinasterol no modelo de nocicepção induzida pelo ácido acético.....	82
<b>Figura 33:</b> Efeito do $\alpha$ -espinasterol administrado pela via <i>i.p.</i> , na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de PMA.....	83
<b>Figura 34:</b> Análise de Western blot mostrando o efeito do $\alpha$ -espinasterol na translocação da PKC $\epsilon$ do citosol para a membrana em resposta a injeção intraplantar de PMA.....	83
<b>Figura 35:</b> Possíveis sítios de ação da <i>Baccharis illinita</i> (BI) com consequente redução na nocicepção.....	103



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AAE</b>	Aminoácidos Excitatórios
<b>AMPA</b>	Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
<b>ASICs</b>	Receptor sensível a ácido
<b>ATP</b>	Trifosfato de Adenosina
<b>BK</b>	Bradicinina
<b>CGRP</b>	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
<b>DI<sub>50</sub></b>	Dose que inibe a resposta em 50%
<b>DMSO</b>	Di-metil Sulfóxido
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>ECL</b>	Reagente quimioluminescente
<b>FAE</b>	Fração Acetato de Etila
<b>FAq</b>	Fração Aquosa
<b>FH</b>	Fração Hexânica
<b>HA</b>	Extrato Hidroalcoólico
<b>HBSS</b>	Solução salina equilibrada de Hanks
<b>HEPES</b>	Ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2'-Etanossulfônico
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1 $\beta$
<b>IL-8</b>	Interleucina 8
<b>I<sub>max</sub></b>	Inibição Máxima
<b>LPS</b>	Lipolissacarídeo da parede celular de <i>Escherichia coli</i>
<b>NK1</b>	Receptor para Neurocinina do tipo 1
<b>NKs</b>	Neurocininas
<b>NMDA</b>	Ácido N-metil-D-aspártico
<b>nNOS</b>	Sintase de óxido nítrico neuronal
<b>NO</b>	Óxido Nítrico
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
<b>PGs</b>	Prostaglandinas
<b>PKA</b>	Proteína Quinase A
<b>PKC</b>	Proteína Quinase C
<b>PLC</b>	Fosfolipase C
<b>PMA</b>	Miristato-Acetato de Forbol
<b>PMSF</b>	Fenilmetilsulfonilfluoreto
<b>PVDF</b>	Membranas de Polivinilideno difluorido
<b>RNAm</b>	Ácido ribonucleico mensageiro

<b>SDS</b>	Dodecil Sulfato de Sódio
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>SP</b>	Substância P
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$
<b>trans-ACPD</b>	Ácido ( $\pm$ )-1-aminociclopentano-trans-1,3-dicarboxílico
<b>TRP</b>	Receptor de Potencial Transitório
<b>TRPA1</b>	Receptor de Potencial Transitório relacionado a Proteína Anquirina 1
<b>TRPM8</b>	Receptor de Potencial Transitório Melastatina 8
<b>TRPV1</b>	Receptor de Potencial Transitório Vanilóide 1
<b>TRPV2</b>	Receptor de Potencial Transitório similar ao Vanilóide 1

## RESUMO

A procura por constituintes ativos de plantas apresenta como possibilidade a descoberta de novas substâncias que atuem em diversos processos patológicos acompanhados de dor. A *Baccharis illinita* DC (Asteraceae) conhecida como “chá-ventura” ou “erva-milagrosa” é uma planta utilizada na medicina popular como antiinflamatória, cicatrizante de pele e mucosas, antiinfeciosa e protetora gástrica. O presente estudo avaliou a atividade antinociceptiva do extrato hidroalcoólico (HA), das frações aquosa (FAq), acetato de etila (FAE), hexânica (FH) e dos compostos obtidos (baurenol, ácido oleanólico e  $\alpha$ -espinasterol) da *B. illinita*, verificando seus possíveis mecanismos de ação antinociceptivo. O HA, FAq, FH, baurenol, ácido oleanólico e  $\alpha$ -espinasterol reduziram de forma dependente da dose a nocicepção visceral induzida pelo ácido acético. Além disso, a FH (*v.o.*) também inibiu a nocicepção induzida pela injeção *i.pl.* de formalina, a hiperalgesia mecânica e térmica induzida pela bradicinina e prostaglandina E<sub>2</sub> em ratos, assim como a alodínia e a hiperalgesia mecânica induzida pela constrição do nervo ciático em camundongos. Entretanto, a antinocicepção provocada pela FH não foi afetada pelo tratamento dos animais com o antagonista opióide (naloxona) e nem foi associada a uma ação sedativa ou relaxante muscular, observado no teste do campo aberto. O tratamento (*v.o.*, *i.p.* ou local) dos animais com a FH, ácido oleanólico e  $\alpha$ -espinasterol também preveniram a nocicepção induzida pela injeção *i.pl.* de glutamato, bem como, a nocicepção induzida pela injeção *i.t.* de AEE e citocinas pró-inflamatórias. Porém, o  $\alpha$ -espinasterol e o ácido oleanólico não inibiram a união específica do [<sup>3</sup>H]-L-glutamato, em meio contendo ou não Na<sup>+</sup>, indicando que esses compostos não interagem com receptores de glutamato e nem com sítios de ligação em sistemas de transporte de glutamato. Além disso, foi demonstrado que as fibras sensoriais do tipo C e A $\delta$  sensíveis a capsaicina estão envolvidas na atividade antinociceptiva promovida pelos compostos. O  $\alpha$ -espinasterol, administrado *v.o.*, *i.p.* ou local, foi capaz de reduzir a nocicepção causada pelos agonistas de receptores TRPV1 (capsaicina), TRPA1 (cinamaldeído) e TRPM8 (mentol). A antinocicepção causada pelo  $\alpha$ -espinasterol no teste do ácido acético foi revertida pelo pré-tratamento dos animais com toxina pertussis (inativador da proteína G<sub>i/o</sub>). O  $\alpha$ -espinasterol foi efetivo em inibir tanto a nocicepção quanto a ativação da PKC $\epsilon$  (através da análise de Western blot) induzida pela injeção *i.pl.* de PMA (ativador da PKC). Em síntese, o presente trabalho demonstrou que a *B. illinita* é uma planta medicinal dotada de atividade antinociceptiva quando avaliada em vários modelos de nocicepção aguda e crônica em roedores. Além disso, os mecanismos de ação antinociceptiva ainda não estão bem esclarecidos, contudo, neste trabalho pode-se demonstrar que a ativação de proteína G<sub>i/o</sub> e a inibição da PKC estão envolvidas na ação antinociceptiva da *B. illinita*.

Palavras-chave: *Baccharis illinita*, antinocicepção,  $\alpha$ -espinasterol, ácido oleanólico e PKC

## ABSTRACT

*Baccharis illinita* DC (Asteraceae) is popularly known as “chá ventura” or “erva milagrosa” and has been used in folk medicine as an anti-inflammatory, for the healing of skin and mucosal wounds, and for its gastroprotective properties. The present study assessed the possible antinociceptive action of the hydroalcoholic extract, fractions and pure compounds obtained from the aerial parts of *B. illinita*. The administration of hydroalcoholic extract (HA), aqueous (FAq), hexanic fraction (FH), baurenol,  $\alpha$ -spinasterol and oleanolic acid reduced in a dose-dependent manner the visceral pain induced by acetic acid. In addition, FH treatment inhibited the formalin induced nociception, the mechanical and thermal hyperalgesia induced by bradykinin and prostaglandin E<sub>2</sub> in rats. The FH also reduced mechanical allodynia and hyperalgesia, evaluated by von Frey monofilament fibers, induced by partial sciatic nerve injury neuropathy. The antinociception caused by the FH in the acetic acid test was not affected by intraperitoneal treatment of mice with naloxone (a non-selective opioid receptor antagonist) and was not associated with nonspecific effects such as muscle relaxation or sedation. In addition, the FH,  $\alpha$ -spinasterol and oleanolic acid prevented nociception induced by glutamate (*i.pl.*) and by NMDA, AMPA, kainite, trans-ACPD, SP, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  injections (*i.t.*), in mice. Binding experiments indicated that  $\alpha$ -spinasterol and oleanolic acid do not interact with glutamate receptors and neither with glutamate uptake/release binding sites. Moreover, our results show that neonatal capsaicin treatment in mice, at a dose known to produce degeneration of most unmyelinated C-fibers in the dorsal roots, reduced the glutamate induced responses. Furthermore, the same treatment of animals with capsaicin significantly modifies the  $\alpha$ -spinasterol and oleanolic acid induced antinociception. Therefore, the capsaicin-sensitive C-fibers seem to play a critical role in the antinociception caused by the compounds. Another interesting data was the inhibition of nociception induced by *i.pl.* injection of capsaicin, cinnamaldehyde and menthol with the *i.p.* pre-administration of  $\alpha$ -spinasterol. The antinociception caused by  $\alpha$ -spinasterol in the acetic acid test was significantly reverted by G<sub>i/o</sub> protein inactivation (pertussis toxin treatment). Finally, the *i.p.* administration of  $\alpha$ -spinasterol reduced the nociception induced by *i.pl.* injection of PMA. Western blot analysis revealed that  $\alpha$ -spinasterol treatment fully prevented PKC $\epsilon$  activation by PMA in mice hindpaw. The precise mechanisms through which *B. illinita* exerts its action are currently under investigation, but the present study showed that *B. illinita* exhibits antinociceptive activity when analyzed in acute and chronic models of nociception. The mechanisms of action involved included G<sub>i/o</sub> protein and inhibition of PKC.

Key-words: *Baccharis illinita*, antinociception,  $\alpha$ -spinasterol, oleanolic acid and PKC

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
1.1 Família Asteraceae e Gênero <i>Baccharis</i> .....	18
1.2 <i>Baccharis illinita</i> DC.....	20
1.3 Dor.....	23
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>30</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
3.1 Objetivo geral.....	31
3.2 Objetivos específicos.....	31
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
4.1 Material botânico.....	33
4.1.1 Coleta e identificação.....	33
4.1.2 Preparação e fracionamento dos extratos.....	33
4.1.3 Isolamento dos compostos.....	34
4.2 Animais.....	35
4.3 Estudo da atividade antinociceptiva.....	36
4.3.1 Contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos.....	36
4.3.2 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina (2,5%), em camundongos.....	36
4.3.3 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos.....	37
4.3.4 Medida da hiperalgesia térmica, mecânica e edema de pata em ratos.....	37
4.3.5 Neuropatia induzida pela constrição parcial do nervo ciático.....	38
4.3.6 Efeito sobre o desempenho motor no teste de atividade locomotora espontânea.....	39
4.4 Estudo do possível mecanismo de ação antinociceptivo.....	40
4.4.1 Participação do sistema opióide.....	40
4.4.2 Participação de citocinas pró-inflamatórias.....	40
4.4.3 Participação do sistema glutamatérgico e da substância P.....	41
4.4.4 Participação das fibras sensíveis à capsaicina.....	42
4.4.5 Estudo da neurotransmissão glutamatérgica.....	43
4.4.5.1 Preparação das membranas.....	43
4.4.5.2 União específica (binding) de [ <sup>3</sup> H]-L-glutamato em membranas de cérebro de camundongos.....	43
4.4.5.3 Preparação de frações sinaptossomais.....	44

4.4.5.4 Liberação de [ <sup>3</sup> H]-L-glutamato, em preparações de cérebros de camundongos.....	45
4.4.6 Participação de receptores TRP (frio e calor).....	45
4.4.6.1 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos.....	45
4.4.6.2 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído em camundongos.....	46
4.4.6.3 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de mentol em camundongos.....	47
4.4.7 Envolvimento da proteína G <sub>1/0</sub> sensível à toxina pertussis.....	47
4.4.8 Participação da proteína quinase C (PKC).....	48
4.4.8.1 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de éster de forbol (PMA) em camundongos.....	48
4.4.8.2 Preparação dos extratos citosólicos e nucleares.....	48
4.4.8.3 Ensaios de Western Blot.....	49
4.4.9 Análise Estatística.....	50
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
5.1 Efeito do extrato hidroalcoólico e frações obtidas do extrato hidroalcoólico da <i>B. illinita</i> sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos.....	51
5.2 Efeito da FH (administrada ip) e seus compostos isolados (baurenol, ácido oleanólico e α-espínasterol) sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos.....	53
5.3 Efeito da FH na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos.....	54
5.4 Efeito da FH na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos.....	55
5.5 Efeito do ácido oleanólico e do α-espínasterol na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos.....	56
5.6 Efeito da fração hexânica (FH) da <i>B. illinita</i> na hiperalgesia mecânica, térmica e edema de pata, após sensibilização com prostaglandina E <sub>2</sub> e bradicinina, em ratos.....	58
5.7 Efeito da FH sobre a dor crônica induzida pela constrição parcial do nervo ciático.....	61

5.8 Efeito da FH sobre o desempenho motor no teste de atividade locomotora espontânea.....	64
5.9 Avaliação da participação do sistema opióide na atividade antinociceptiva da FH.....	65
5.10 Efeitos da FH, do ácido oleanólico e do $\alpha$ -espinasterol sobre a nocicepção causada pela injeção intratecal de citocinas inflamatórias: IL – 1 $\beta$ e TNF - $\alpha$ , em camundongos.....	66
5.11 Efeito da FH, do ácido oleanólico e do $\alpha$ -espinasterol sobre a nocicepção causada pela injeção intratecal de aminoácidos excitatórios (AAE), em camundongos.....	68
5.12 Efeito do ácido oleanólico e do $\alpha$ -espinasterol sobre a nocicepção causada pela injeção intratecal de substância P (SP), em camundongos.....	71
5.13 Verificação da participação das fibras sensíveis à capsaicina no efeito antinociceptivo do ácido oleanólico e do $\alpha$ -espinasterol na nocicepção induzida por glutamato, em camundongos.....	72
5.14 Efeito do ácido oleanólico e do $\alpha$ -espinasterol sobre a união específica (binding) de [ <sup>3</sup> H]-L -glutamato em membranas de cérebro de camundongos.....	74
5.15 Efeito do ácido oleanólico e do $\alpha$ -espinasterol sobre a liberação de [ <sup>3</sup> H]-L -glutamato, em preparações de cérebros de camundongos.....	76
5.16 Efeito do $\alpha$ -espinasterol sobre a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos.....	77
5.17 Efeito do $\alpha$ -espinasterol sobre a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído em camundongos.....	77
5.18 Efeito do $\alpha$ -espinasterol sobre a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de mentol em camundongos.....	80
5.19 Envolvimento da proteína G <sub>i/o</sub> sensível à toxina pertussis.....	82
5.20 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de PMA em camundongos.....	83
5.21 Ensaio de Western Blot.....	84
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>85</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>102</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>104</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A prática da medicina tradicional faz referência a conhecimentos e crenças que incorporam medicamentos naturais a base de plantas, produtos animais, minerais, terapias espirituais, técnicas manuais e atividade física. Essas práticas podem ser aplicadas individualmente ou em combinação para tratar e/ou prevenir diferentes patologias ou manter o bem estar (Chen e Chen, 2004; Huang, 1998). O homem utiliza as plantas medicinais para o tratamento de diversos males desde os tempos imemoriais. Inicialmente utilizadas *in natura*, as plantas passaram a ser utilizadas na forma de infusos ou decoctos e extratos e, por fim, como matéria prima para o isolamento de substâncias farmacologicamente ativas (Anfarmag, 2005).

As plantas e os extratos vegetais foram e continuam sendo de grande relevância na área farmacêutica, tendo em vista a utilização das substâncias ativas isoladas como protótipos para a obtenção de fármacos, para a obtenção de adjuvantes, ou ainda, de medicamentos elaborados exclusivamente à base de extratos vegetais: os medicamentos fitoterápicos (Schenkel et al., 2001).

No segmento industrial, é nítido o ressurgimento do interesse em produtos naturais como fonte de modelos para fármacos e como matéria-prima para desenvolvimento de fitoterápicos (Schenkel et al., 2001). Nos EUA, ocorreu uma expansão marcante desse mercado. Por exemplo, para produtos contendo kava-kava, entre 1997 e 1998, foi registrado um crescimento de 461% e para o hipérico de 190% (Blumenthal et al, 2000). Além disso, foram realizados estudos de farmacoeconomia com matérias-primas vegetais, mostrando seu impacto na melhora da economia de certos países (De Smet et al., 2000).

Segundo Newman (2003), entre o período de 1981 a 2002, foram introduzidos, no mundo inteiro, 877 novos fármacos, sendo que 61% foram obtidos ou baseados em produtos naturais. Em torno do ano 2000 o mercado mundial de fitoterápicos girava em torno de aproximadamente 22 bilhões de dólares/ano. Dentro desta perspectiva, seria de se esperar que o Brasil fosse um país privilegiado, considerando sua extensa e diversificada flora (aproximadamente um terço da flora



mundial). No entanto, nosso país não tem uma atuação destacada no mercado mundial de fitoterápicos, ficando inclusive atrás de países menos desenvolvidos tecnologicamente (Yunes et al., 2001). Nesse sentido, se não forem adotadas políticas de apoio à pesquisa, o Brasil corre o risco de, apesar de possuir a maior biodiversidade mundial, tornar-se importador de matérias-primas vegetais e/ou reprodutor de formulações fitoterápicas, da mesma forma que vem ocorrendo com a produção de medicamentos sintéticos.

As plantas medicinais brasileiras são consideradas altamente promissoras, mas são pouco conhecidas sob qualquer ponto de vista. Além disso, produtos a base de plantas estão sendo consumidos sem que sua eficácia e segurança tenham sido comprovadas. No nosso mercado, a maioria dos produtos é constituída por cápsulas contendo pós de plantas secas e moídas, para os quais não existem comprovações de eficácia e segurança, e algumas vezes nem mesmo tradição de uso (Blumenthal et al., 2000).

Como produto final de uma série de sugestões apresentadas por diferentes segmentos da sociedade, foi estabelecido uma legislação para a área de fitoterápicos (Portaria 6/SVS de 31/1/1995), que definiu claramente que fitoterápico é um medicamento com componentes ativos exclusivamente de origem vegetal, e que deve apresentar comprovação de eficácia, segurança e qualidade. Também determinou prazos para a realização de estudos de eficácia e toxicidade para os produtos já existentes no mercado, estabelecendo bases para uma maior aceitação desses produtos. Essa legislação exerceu um papel educativo importante e foi reformulada, mantendo suas características essenciais (Resolução RDC nº 17 de 24/2/2000). Também importante foi o estabelecimento de uma divisão direcionada especificamente para fitoterápicos no Ministério da Saúde e na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Sem um órgão executivo, o processo não seria completo, qualquer que fosse a legislação estabelecida, pois a legislação por si só não assegura os instrumentos para a melhoria da qualidade dos produtos no mercado.

Outro aspecto importante deve-se ao crescente interesse mundial pelo uso de fitoterápicos como medicamentos complementares ou alternativos na prevenção ou alívio de muitas doenças. Por exemplo, há alguns anos, nos Estados Unidos, 24%

das prescrições médicas utilizam um ou mais princípios ativos derivados de plantas e 2,5% utilizam o seu extrato bruto (Calixto et al., 1998).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), devido à pobreza e falta de acesso aos medicamentos modernos, cerca de 65 a 80% da população mundial que vive em países em desenvolvimento depende essencialmente das plantas medicinais como um primeiro tratamento de saúde (Calixto, 2000).

Entre os adeptos da fitoterapia, é comum a idéia de que as plantas medicinais de uso tradicional já foram testadas e homologadas pelo seu uso prolongado na própria espécie humana. Por isso, seriam medicamentos eficazes e seguros, naturalmente balanceados, sem os efeitos colaterais comuns aos produtos sintéticos, não sendo necessária, portanto, a avaliação exigida para esse tipo de medicamento. A automedicação com plantas medicinais, chegando ao extremo de substituir terapias atualmente bem aceitas, é resultado de uma crença infundada, tendo se tornado uma prática comum nos países em desenvolvimento (Simões, 2000). Nesse sentido, a validação de produtos naturais para a sua utilização como medicamento é uma alternativa necessária também por uma questão social.

### **1.1 Família Asteraceae e Gênero *Baccharis***

A família Asteraceae é o grupo sistemático mais numeroso dentro das Angiospermas, compreendendo cerca de 1.700 gêneros e aproximadamente 24.000 a 30.000 espécies distribuídas por todo o mundo, exceto na Antártida (Katinas et al., 2007). São plantas de aspecto extremamente variado, incluindo principalmente pequenas ervas ou arbustos e raramente árvores (Heywood, 1993). Cerca de 98% dos gêneros da família Asteraceae são constituídos por plantas de pequeno porte, e são encontradas em todos os tipos de habitats, mas principalmente nas regiões tropicais montanhosas na América do Sul (Joly, 1967).

As asteráceas foram reconhecidas por Teofrasto há 300 anos a.C., porém a família foi fundada com o nome de Compositae (*nom. cons. et nom. alt.*) por Giseke

em 1792. O código internacional de nomenclatura botânica (Greuter et al., 2000) também permite o uso do nome Asteraceae Dumortier (*nom. cons.*), nome dado a família em 1822. As contribuições mais importantes para o conhecimento e sistemática da família começam com o francês Henri Cassini através de numerosas publicações durante o período de 1812-1831 que incluem descrições muito detalhadas da morfologia das asteráceas. Cassini também estabeleceu 19 tribos na família (Cassini, 1816). Lessing (1832) reduziu a 8 o número de tribos e De Candolle (1838) a 3. Outro grande contribuinte para o conhecimento da família foi George Bentham (1873), que estabeleceu 13 tribos, que são as tradicionalmente usadas hoje.

Plantas dessa família são extensivamente estudadas quanto a sua composição química e atividade biológica, sendo que algumas têm proporcionado o desenvolvimento de novos fármacos, inseticidas, entre outros (Zomlefer, 1994). Inúmeros trabalhos científicos realizados com espécies da família Asteraceae apresentaram o isolamento de uma variedade de metabólitos secundários com destaque aos flavonóides, alocados como importantes marcadores quimiotaxonômicos (Emerenciano et al., 2001), além de sua reconhecida importância para a medicina, no tratamento e prevenção de várias doenças (Harborne e Willians, 2000).

O gênero *Baccharis* (tribo Astereae) está representado por mais de 500 espécies distribuídas dos Estados Unidos à Argentina, sendo que 90% ocorrem na América do Sul (Malagarriga Heras, 1976; Dupont, 1966). A alta concentração de espécies no Brasil e nos Andes indica que uma dessas áreas é o provável centro de origem desse gênero (Teodoro-Luis, 1955). No Brasil estão descritas 120 espécies de *Baccharis*, com a maior parte delas localizadas na região sudeste do País (Barroso, 1975).

As espécies do gênero *Baccharis* são no geral arbustos como a carqueja, a vassoura ou vassourinha e medem em média de 0,5 a 4,0 m de altura. Apresentam elevado valor sócio-econômico, com ampla dispersão nos estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Rio Grande do Sul, entre outras regiões do país, onde grande número delas é utilizado na medicina popular para controle ou tratamento de várias doenças. São consumidas principalmente na forma de chás

com indicações para males do estômago, fígado, anemias, inflamações, diabetes, doenças na próstata, sendo também descritas como medicamento para o processo de desintoxicação do organismo (Kulkami, 1986; Franco, 1995; Corrêa, 1984).

O estudo de espécies do gênero *Baccharis* tem mostrado grandes avanços devido ao seu reputado uso na medicina caseira na América Latina. Sua fitoquímica destaca a ocorrência de flavonóides, diterpenos e triterpenos, sendo nitidamente observado maior acúmulo de flavonas, flavonóis e de diterpenos labdanos e clerodanos (Emerenciano et al., 1987; Jakupovic et al., 1990).

## **1.2 *Baccharis illinita* DC**

Na flora brasileira é encontrado um grande número de espécies semelhantes, sendo algumas utilizadas na medicina popular, como é o caso da *Baccharis illinita* DC. Esta espécie é encontrada na região subtropical do Brasil e é coletada em ambiente banhado, em uma região tida como uma das mais frias do sul do país.

A *B. illinita* DC, conhecida popularmente no Rio Grande do Sul como “chá-ventura” ou “erva-milagrosa” é uma planta utilizada na medicina popular como antiinflamatória, cicatrizante de pele e mucosas, antiinfeciosa e protetora gástrica (Fig. 1). As partes aéreas (folhas e caule) da planta são empregadas principalmente na forma de chá, ingerido pela via oral e também para lavagens vaginais, em caso de ulceração dessa mucosa. O pó obtido das folhas secas maceradas é amplamente utilizado para a cicatrização de feridas de pele (no homem e em animais) (Baggio et al., 2003).

O nosso grupo de pesquisa pertencente ao Departamento de Farmacologia da UFPR realizou vários estudos com o objetivo de validar algumas das indicações populares da *B. illinita* DC.



**Figura 1:** *Bacharis illinita* DC. Detalhes da folha, ramos e toda a planta em seu ambiente. (Cortesia Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Consuelo Andrade Marques).

Dentre estes estudos, foi demonstrado por Arruda et al. (1999) que os extratos aquosos de flores e de raízes de *B. illinita* reduziram o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. Os extratos aquosos de flores e de caule também reduziram o edema de pata induzido por carragenina em ratos, mas não modificaram o tempo de permanência de camundongos sobre a placa aquecida a 55°C. Esses resultados, apesar de

preliminares, sugerem uma provável ação analgésica e/ou antiinflamatória da *B. illinita*.

Tada et al. (2000) demonstraram que o extrato aquoso de caule e folhas de *B. illinita* apresentou atividade anticonvulsivante, mas não modificou os resultados obtidos no teste do cilindro giratório (“rota rod”) em camundongos. Este resultado descarta a possibilidade de que a redução nas contorções abdominais esteja relacionada com a redução da atividade motora dos animais. No entanto, a atividade anticonvulsivante poderia contribuir para a ação antinociceptiva, já que os anticonvulsivantes são grupos heterogêneos de drogas utilizadas para alívio da dor neuropática de diversas causas, através da redução da hiperexcitabilidade neuronal (Turan et al, 2004).

Em estudos posteriores, observou-se que o extrato aquoso de caule da *B. illinita* não modificou o extravasamento de proteínas, sugerindo que sua ação anti edematogênica esteja relacionada a uma diminuição da vasodilatação. Este mesmo extrato reduziu a migração de neutrófilos induzida pelo LPS, sendo que esta atividade pode estar envolvida com uma possível redução na liberação de fatores quimiotáticos pelos macrófagos. O extrato aquoso de caule não modificou a resposta febril em ratos (Hara, 2001).

Em outro estudo realizado com diferentes extratos desta planta, Baggio et al. (2003) demonstraram que o extrato hidroalcoólico obtidos de caule e folhas possui atividade antiulcerogênica em ratos ao proteger a mucosa gástrica contra lesões induzidas por etanol 70% e estresse (contenção e frio). O extrato aquoso de flores da *B. illinita* também protegeu a mucosa gástrica de ratos, mas apenas contra lesões induzidas por etanol. Já o extrato aquoso das raízes protegeu a mucosa gástrica contra lesões induzidas por etanol 70%, estresse (contenção e frio) e pelo antiinflamatório não esteroideal (indometacina), além de reduzir o volume e a acidez do conteúdo gástrico secretado em 4 horas de ligadura do piloro.

Em 2004, Verdi et al., realizaram o primeiro estudo fitoquímico da *B. illinita*. Pela primeira vez no gênero *Baccharis*, foi descrita a presença das metoxiflavonas nobiletina, tangeterina e 2’metoxicrisina e dos ent-caurenos ácido 15- $\beta$ -senecioiloxi-ent-caur-16-en-19-óico e ácido 17-hidroxi-entcaur-15-en-19-óico.

Boller (2007) demonstrou que o extrato hidroalcoólico das partes aéreas da *B. illinita* (HA) apresenta efeito antiinflamatório e antiedematogênico quando administrado topicamente, previne a resposta de hipersensibilidade tardia, o que sugere uma possível ação através da inibição da síntese de citocinas, e parece possuir atividade antiprurritogênica. Além disso, alguns compostos isolados (ácido kaurenóico, ácido oleanólico,  $\alpha$ -spinasterol e baurenol) também apresentaram efeito antiedematogênico.

Recentemente, Freitas et al. (2008), sugeriram que a ação antiulcerogênica da *B. illinita*, envolvia a inibição da bomba de prótons  $H^+/K^+$  ATP-ase.

Assim, todos os estudos realizados até o momento e descritos acima reforçam o interesse na continuação da validação das atividades referidas popularmente, além da investigação dos mecanismos que estão envolvidos nesses efeitos.

### 1.3 Dor

A integridade de todos os organismos vivos é garantida através da interação de dois sistemas altamente especializados: o sistema imune e o sistema nervoso central (SNC), no qual o cérebro tem a habilidade de detectar e recordar uma agressão. Considerando que em condições fisiológicas as atividades do sistema imune nunca atingem a consciência, a dor alerta imediatamente o organismo sobre a presença de um estímulo agressor. Apesar dos sistemas imune e sensorial (nociceptivo) parecerem ter evoluído separadamente, é evidente que durante a evolução, vias de comunicações mútuas foram desenvolvidas para compartilhar moléculas de sinalização e mecanismos de receptores (Besedovsky et al., 1986).

A dor foi conceituada, em 1986, pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como uma “experiência sensorial e emocional desagradável a qual está associada a lesões reais ou potenciais ou descrita em termos de tais lesões”. Portanto a dor possui, dentre outros, um caráter subjetivo. Cada indivíduo aprende a

utilizar este termo através de suas experiências. Este conceito não admite uma relação direta entre lesão tecidual e dor e enfatiza o aspecto da subjetividade na interpretação do fenômeno doloroso (Loeser e Melzack 1999; Merskey, 1991).

Os receptores da dor (nociceptores) na pele e em outros tecidos estão presentes em terminações nervosas livres sensíveis a estímulos dolorosos. A atividade no nociceptor e a via nociceptiva e outros processos neurofisiológicos induzidos pelo estímulo doloroso é chamado de nocicepção (Dickenson, 1997). Enquanto que a dor representa uma percepção subjetiva com uma dimensão psicológica, a nocicepção consiste na recepção dos estímulos pelos nociceptores que codificam sinais para fornecer informações ao SNC da existência da lesão. Portanto, dor seria o termo mais apropriado para o homem, enquanto que nocicepção seria mais indicado para animais experimentais (Wall e Melzack, 1999; Julius e Basbaum, 2001).

A sensação de dor nos alerta para uma real ou provável lesão e desencadeia respostas apropriadas para proteger o organismo. Contudo, freqüentemente a dor torna-se crônica e debilitante em substituição a sua função de atuar como um sistema de aviso. A transição para a fase crônica envolve mudanças na medula espinhal e encéfalo, mas ocorre modulação significativa nos locais onde as mensagens da dor são iniciadas no nível do primeiro neurônio sensorial (Julius e Basbaum, 2001).

Muitos passos podem ser identificados no processamento neural dos sinais nocivos que levam a experiência de dor. O primeiro, na seqüência dos eventos que originam o fenômeno doloroso é a transdução, ou seja, a transformação dos estímulos agressivos em potenciais de ação que, das fibras nervosas periféricas, são transmitidos para o SNC (Besson e Perl, 1969). As fibras nociceptivas aferentes são neurônios tipicamente pseudounipolares, com terminações periféricas e centrais. Neurotransmissores que são produzidos dentro do corpo celular (por exemplo, no gânglio da raiz dorsal) são liberados por terminações das fibras nervosas tanto periféricas quanto centrais. Dessa forma, estes neurotransmissores participam na produção do sinal doloroso periféricamente, bem como na promoção de eventos que levam as percepções centrais (Schmelz e Petersen, 2001).



A dor pode resultar da ativação de nociceptores periféricos e da liberação de neurotransmissores, bem como pela diminuição no limiar da resposta da fibra nociceptiva e nociceptores circundantes (nociceptores de sensibilização). Além disso, nociceptores silenciosos, os quais normalmente não são ativos, são recrutados após algum dano tecidual e pode então, responder a uma variedade de estímulos (Meyer et al., 1991; Handwerker et al., 1991). Uma vez ativados, estes nociceptores previamente silenciosos se tornam sensibilizados e respondem a estímulos nocivos de forma mais intensa (o mesmo estímulo produz mais dor) (Vanderah, 2007). O aumento da sensibilidade a dor é denominado de hiperalgesia. Esta, normalmente é decorrente de importantes mudanças inicialmente no processo periférico e posteriormente, no processo central de sinalização da dor. Outras alterações sensoriais também podem aparecer, entre elas a alodínia, que é a dor frente a um estímulo não lesivo. A alodínia é mediada pela ativação periférica de receptores táteis que ganham acesso ao processamento nociceptivo central (Loeser e Treede, 2008).

O segundo estágio no processamento dos sinais nociceptivos é a transmissão. Os nociceptores têm seus corpos celulares no gânglio da raiz dorsal e terminam nas camadas superficiais do corno dorsal da medula espinhal, onde são retransmitidas mensagens através da liberação de mediadores como: glutamato, substância P (SP) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (Jeftinija et al., 1991; Lawson et al., 1997; Lawson et al., 2002). A informação do estímulo nocivo é transmitida principalmente através de dois diferentes tipos de neurônios nociceptivos aferentes primários, que conduzem o estímulo em diferentes velocidades.

As fibras A $\delta$  são pouco mielinizadas e podem ser divididas em duas classes principais, onde se diferenciam pela temperatura de ativação. As fibras A $\delta$  do tipo I são ativadas por temperaturas inferiores à 53°C, enquanto que as do tipo II são ativadas por temperaturas inferiores à 43°C. A condução da informação nociceptiva que ocorre via fibras A $\delta$  é transmitida numa velocidade entre 12 e 30 m/s (Millan 1999; Wall and Melzack 1999; Julius and Basbaum 2001). As fibras C, também conhecidas como fibras polimodais, por transmitirem estímulos mecânicos, térmicos e químicos, conduzem a uma velocidade muito mais lenta em relação às outras

fibras nociceptivas, em torno de 0,5 a 2 m/s em virtude de não possuírem bainha de mielina (Pleuvry and Lauretti 1996; Millan 1999; Julius and Basbaum 2001). Estas fibras aferentes fazem sinapse em um neurônio de segunda ordem na camada superficial da medula espinhal (Fig.2). O neurônio de segunda ordem cruza a medula espinhal até o lado contralateral e ascende pelo trato espinotalâmico até alcançar o tálamo. No tálamo neurônios de terceira ordem são ativados, levando a informação do estímulo doloroso até o córtex somatossensorial, onde ocorre a percepção da dor (Fig.3) (Vanderah, 2007).

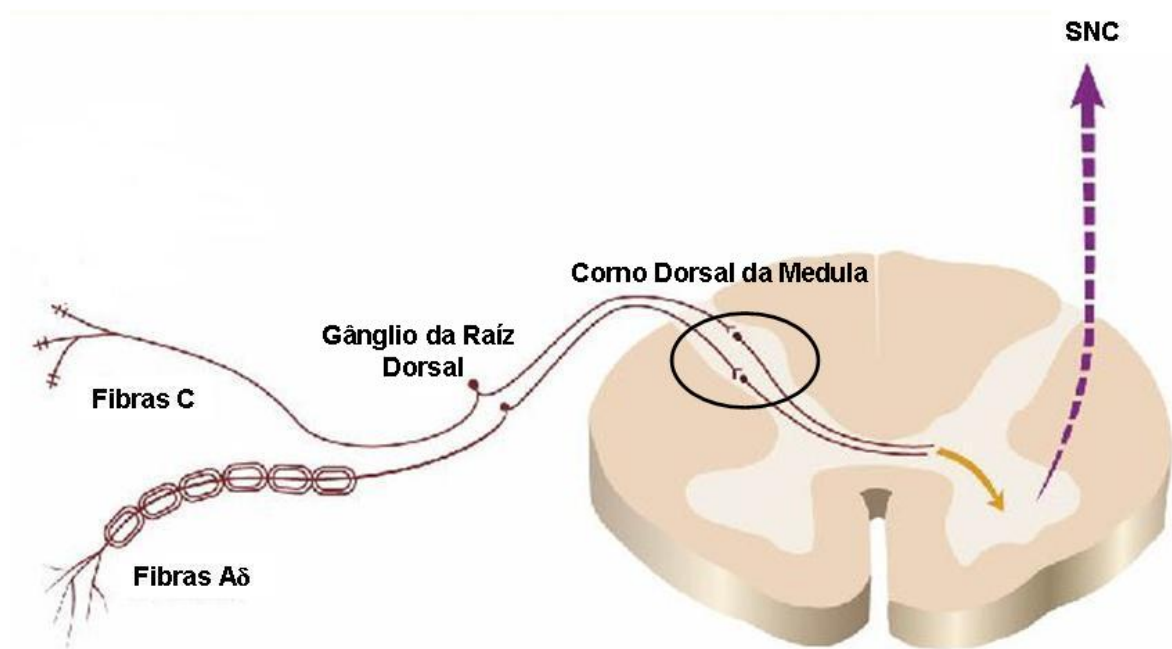


Figura 2: Via ascendente da nocicepção – primeira conexão. Os axônios das fibras aferentes primárias (C e A $\delta$ ) que inervam as regiões periféricas transmitem o impulso nociceptivo até as lâminas do corno dorsal da medula.

As células de segunda ordem no corno dorsal da medula espinhal também têm a capacidade de modificar os padrões de resposta no caso de uma descarga sustentada das fibras aferentes (como poderia ocorrer no estabelecimento de uma lesão). Nestas circunstâncias, os neurônios de segunda ordem se tornam

sensibilizados e isso é chamado de sensibilização central que também contribui aos fenômenos de hiperalgesia e alodínia (La Motte et al., 1991).

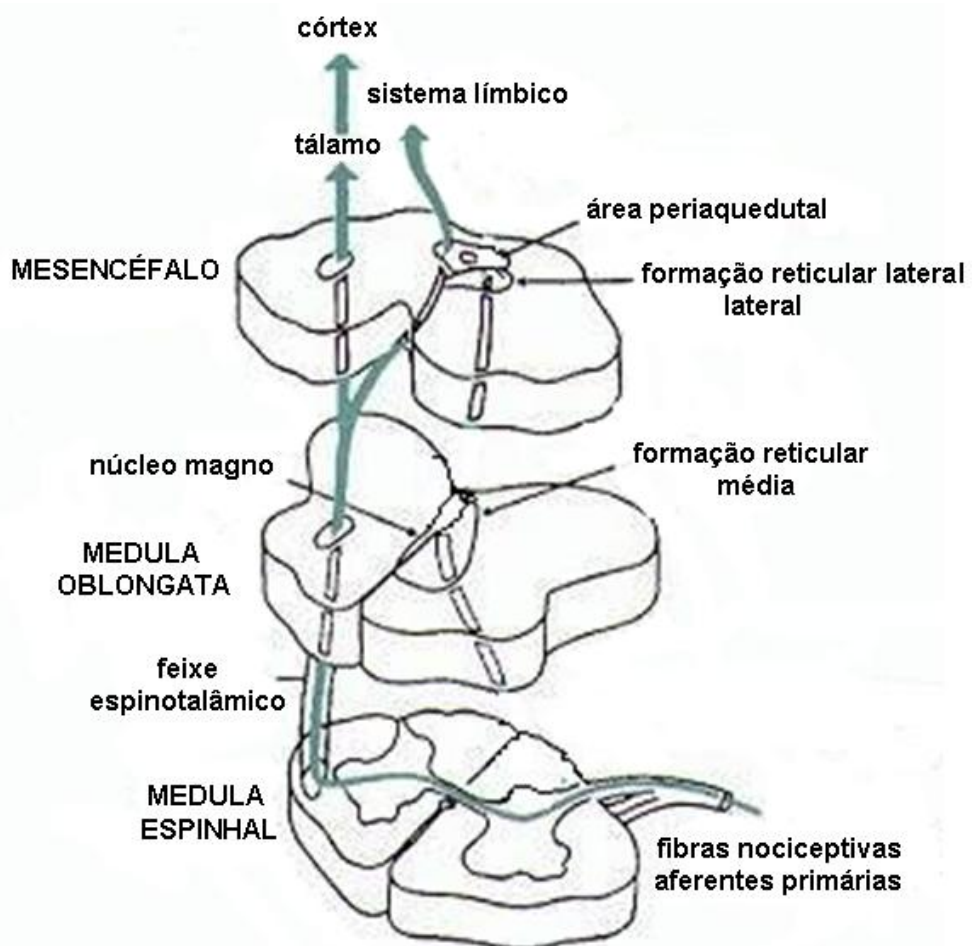


Figura 3: Via ascendente da nociceção (em cinza). Tratos aferentes que partem do corno dorsal e conduzem a informação aos centros de processamento cerebrais.

Quando as fibras nociceptivas aferentes chegam ao corno dorsal da medula espinhal, elas transmitem o sinal originado na periferia através da liberação de neurotransmissores específicos que estão associados com a dor. Um dos neurotransmissores mais importantes é o glutamato, que pode interagir com receptores de aminoácidos excitatórios do tipo NMDA (N-metil-D-aspartato) e não NMDA. Outro importante transmissor associado a transmissão da dor é a substância

P (SP), que interage com receptores da família das taquicininas (acoplados a proteína G) (Vanderah, 2007).

Dentre os estímulos nocivos que podem promover a ativação dos nociceptores para centros de processamento da dor na coluna dorsal e no cérebro, destacam-se os de natureza térmica (Caterina, 1997). Assim, quando a pele é aquecida ou resfriada para temperaturas fora da zona neutra (31-36° C), sensações de calor ou frio surgem a partir da ativação de receptores de calor ou frio. A habilidade de sentir o frio e o calor reside em neurônios especializados do sistema nervoso periférico que detectam as mudanças na temperatura ambiente em uma faixa bastante ampla. Esse processo é iniciado quando um estímulo de frio ou calor excita as fibras nervosas sensoriais que projetam da raiz dorsal ou gânglio trigeminal, que inervam as regiões do tronco e cabeça, respectivamente. Esses neurônios aferentes convertem estímulos térmicos em sinais eletroquímicos e transferem a informação sensorial para centros integrantes na coluna dorsal e cérebro (McKemy et al., 2002). Os corpos celulares desses neurônios termossensoriais estão concentrados nos gânglios localizados na coluna vertebral e no crânio, e suas projeções estendem-se a longas distâncias, até os tecidos periféricos (Story et al., 2003).

Desta forma, aumentos ou reduções maiores na temperatura da pele podem ser diferenciadas normalmente como dor devido ao calor ou frio, sendo mediada por ativação de nociceptores específicos (Beise et al., 1998). O calor nocivo é detectado por neurônios sensoriais que respondem com um limiar moderado de 43° C ou com um limiar alto de 52° C. A compreensão da transdução sensorial em termos de seus mecanismos moleculares está avançando rápido devido à descoberta e caracterização funcional dos canais TRP (do inglês: *transient receptor potential*; receptores de potencial transitório). Nos processos de dor, os canais mais estudados e conhecidos são os TRPV1 ou receptor vanilóide 1 (VR1) e o TRPV2 ou receptor similar ao vanilóide 1 (VRL-1) para o calor e o TRPM8 (melastatina) e TRPA1 (relacionado à proteína anquirina) para o frio (revisado por Cortright et al., 2007; Venkatachalam e Montell, 2007; Levine e Alessandri-Haber, 2007).

A clonagem molecular do TRPV1 (vanilóide) representou um marco na biologia molecular da percepção térmica de estímulos nocivos que,

subseqüentemente, incentivou a descoberta da base molecular das sensações térmicas de frio (Montiel et al., 2004). O TRPV1 é um canal catiônico não seletivo excitatório presente nos neurônios sensoriais, ativado por temperaturas acima de 43 °C e pela capsaicina, o composto pungente das pimentas vermelhas. O TRPV1 contribui para a sensibilidade ao calor e é essencial ao desenvolvimento da hipersensibilidade térmica após lesão tecidual. Um canal iônico relacionado, VRL-1, não responde à capsaicina, mas é ativado por temperaturas acima de 50° C (McKemy et al, 2002).

Suto e Gotoh (1999) observaram um aumento do cálcio intracelular em células que expressam o receptor TRPM8, após serem submetidas ao frio na faixa de temperatura entre 10-23° C. TRPM8 é um canal catiônico não seletivo de membrana ativado por baixas temperaturas. A permeabilidade iônica do TRPM8 é similar à de outros canais TRP, que são permeáveis a cátions mono e divalentes. A observação de que células expressando o TRPM8 são ativadas pelo mentol reforça a idéia do receptor funcionar como canal sensível ao frio *in vivo*. Além disso, o TRPM8 foi encontrado especificamente em neurônios do gânglio da raiz dorsal, principalmente em células não mielinizadas e de pequeno diâmetro, que correspondem ao perfil de fibras sensoriais do tipo C polimodais (Reid e Flonta, 2001; Peier et al., 2002).

Story et al. (2003) descreveram o canal TRPA1, que é ativado a 17 °C e não é ativado pelo mentol. O TRPA1 pertence à terceira subfamília de TRP que mostra ter papel importante na detecção da temperatura. Como outros canais termossensíveis, o TRPA1 é um canal catiônico não seletivo, ativado a 17 °C, que se aproxima do limiar de frio nocivo para humanos (15 °C). O TRPA1 é especificamente expresso em neurônios sensoriais somáticos. Dentro dessa população, TRPA1 não foi encontrado em neurônios que expressam TRPM8 (Davis e Pope, 2002).

A modulação é o terceiro aspecto do processamento do estímulo nocivo. Este evento representa alterações que ocorrem no sistema nervoso em resposta a estímulos nocivos e permitem que sinais nocivos recebidos no corno dorsal da medula espinhal sejam seletivamente inibidos, modificando assim a transmissão do sinal para centros superiores. O sistema de modulação endógeno da dor consiste de inter-neurônios bem definidos dentro das camadas superficiais da medula espinhal e

tratos neuronais descendentes, que podem inibir a transmissão do sinal de dor (Yaksh, 2006).

Mesmo com tantos conhecimentos a cerca da dor, pela sua natureza, é difícil de determinar, investigar, conduzir e tratar este sintoma que acompanha inúmeras doenças (Tracey e Mantyh, 2007).

## 2 JUSTIFICATIVA

A procura por constituintes ativos de plantas representa um grande potencial para a descoberta de substâncias que atuem em processos patológicos acompanhados de dor.

A dor está presente em mais de 70% dos pacientes que buscam os consultórios brasileiros por motivos diversos, sendo a razão de consultas médicas em um terço dos casos. Esse argumento enfatiza a importância da busca de elementos que permitam uma melhor abordagem da dor aguda e crônica (Rocha et al., 2007).

Atualmente, o desenvolvimento de fitoterápicos tem recebido muita atenção tanto por parte da comunidade científica, quanto pelas indústrias farmacêuticas. Apesar da grande aceitação e seu extenso uso terapêutico pela população em geral, principalmente a de baixa renda, as plantas medicinais têm sido pouco avaliadas cientificamente, sendo necessários, estudos mais detalhados no sentido de verificar e assegurar sua qualidade, segurança e eficácia.

O gênero *Baccharis* por sua ampla distribuição geográfica e grande variedade de espécies, associado ao notável destaque na medicina popular no Brasil e em outros países da América do Sul, apresenta estudos de atividade biológica reduzidos. Em função das atividades farmacológicas mencionadas na medicina popular e dos resultados preliminares obtidos até o momento no Departamento de Farmacologia da UFPR, associado ao grande potencial em metabólitos secundários

da *B. illinita*, a continuidade das pesquisas com esta planta podem fornecer perspectiva favorável para a maior compreensão dos efeitos farmacológicos e também para o desenvolvimento de um fitoterápico.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Através do fracionamento biomonitorado e do isolamento de compostos ativos presentes no extrato hidroalcoólico de *Baccharis illinita*, o objetivo deste trabalho foi avaliar a sua atividade antinociceptiva, bem como seus possíveis mecanismos de ação.

#### 3.2 Objetivos específicos

1. Monitorar o fracionamento do extrato hidroalcoólico da *B. illinita*, avaliando a atividade antinociceptiva (das frações e compostos isolados) através do modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético;

2. Avaliar a ação antinociceptiva da fração mais ativa (FH: fração hexânica) da *B. illinita* e dos compostos isolados da FH (baurenol,  $\alpha$ -espinasterol e ácido oleanólico) em modelos de nocicepção química (testes do ácido acético, formalina, glutamato, entre outros) em camundongos;

3. Verificar a atividade da FH em modelos de hiperalgesia térmica e mecânica e edema de pata após sensibilização com diferentes agentes flogísticos;

4. Avaliar o possível efeito da FH sobre a alodínia mecânica no modelo de neuropatia induzida pela ligadura parcial do nervo ciático em camundongos;
5. Investigar, com o emprego de técnicas farmacológicas *in vivo*, os possíveis mecanismos envolvidos nas ações antinociceptivas (da FH e de seus compostos isolados) através da utilização de agonistas e antagonistas;
6. Avaliar a participação de citocinas pró-inflamatórias na atividade antinociceptiva da FH e seus compostos isolados;
7. Verificar a participação das fibras C sensíveis à capsaicina na ação antinociceptiva do  $\alpha$ -espinasterol e do ácido oleanólico;
8. Investigar a possível participação do sistema glutamatérgico na nocicepção promovida pelo  $\alpha$ -espinasterol e pelo ácido oleanólico, utilizando técnicas bioquímicas de ligação específica (binding) para avaliar a interação com receptores e transportadores do neurotransmissor e sinaptossomas de cérebro de camundongos para verificar alterações na liberação de glutamato;
9. Verificar a participação de receptores TRP (frio e calor) na atividade antinociceptiva do  $\alpha$ -espinasterol;
10. Verificar a participação da proteína  $G_{i/o}$  sensível à toxina pertussis na ação antinociceptiva do  $\alpha$ -espinasterol;
11. Analisar a atividade do  $\alpha$ -espinasterol sobre a PKC, através de técnicas *in vivo* e *in vitro* (western blot).



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material botânico

#### 4.1.1 Coleta e identificação

A *B. illinita* DC foi coletada na região do município de Vacaria (RS) em julho/agosto de 2005. Um exemplar da planta foi depositado no Herbário do Departamento de Botânica da UFPR com o número UPCB 17944. A coleta e identificação da espécie foram realizadas pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elide Pereira dos Santos do Departamento de Botânica da UFPR.

#### 4.1.2 Preparação e fracionamento dos extratos

As partes aéreas (folhas e galhos finos) de *B. illinita* foram secas, moídas (7.628 g) e maceradas em etanol (75%) por 24 h (2 vezes) e mais 7 dias. Os extratos foram reunidos, concentrados em rotaevaporador a temperatura controlada resultando em 590 g de extrato bruto seco, o que equivale a 7,7% de rendimento.

O extrato bruto hidroalcoólico (HÁ: 354 g) foi re-dissolvido em uma solução hidroalcoólica (20% de etanol em água destilada) e particionado em hexano (5 vezes) e acetato de etila (5 vezes). Após a evaporação dos solventes obteve se três frações: Fração Hexânica (FH: 26,5 g) 7,48%, Fração Acetato de Etila (FAE: 238 g) 67,23% e Fração Aquosa (FAq: 89,5 g) 25,28%.

#### 4.1.3 Isolamento dos compostos

As frações foram testadas em relação à atividade antinociceptiva. A fração hexânica (maior atividade; 22,5g) foi submetida a um re-fracionamento, em coluna cromatográfica de sílica gel (malha de 70-230; *i.d* 5 x 14 cm) e gradiente de eluição contendo misturas de Hexano-Acetato de Etila e Acetato de Etila-Etanol de 100:0 to 0:100. Foram coletadas 99 frações (100 ml) e combinadas com base em seus perfis cromatográficos (cromatografia de camada delgada). Frações combinadas: 25-27 (sistema de solvente: Hexano-Acetato de Etila, 85:15, v:v), 31-35 (sistema de solvente: hexano-Acetato de Etila, 75:25, v:v) e 36-56 (sistema de solvente: Hexano-Acetato de Etila, 75:25 until 60:40, v:v). Estas frações foram recristalizadas em acetona dando origem ao baurenol (81,6 mg),  $\alpha$ -espinasterol (95,5 mg) e ácido oleanólico (156,8 mg). A presença dos compostos foi determinada através da utilização de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massa. Os espectros obtidos através dessa metodologia para os compostos baurenol,  $\alpha$ -espinasterol e ácido oleanólico (Fig. 4) foram comparados com espectros obtidos em outros trabalhos e estão de acordo com os publicados anteriormente (Mahato e Kundu, 1994; Garg e Nes, 1984). As estruturas químicas foram confirmadas através de cromatografia gasosa, co-eluída com padrões obtidos previamente (Moreira et al., 2003; Meotti et al., 2006).

A preparação dos extratos, frações e isolamento dos compostos foi realizada no laboratório do Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti, Departamento de Química da UFSC.

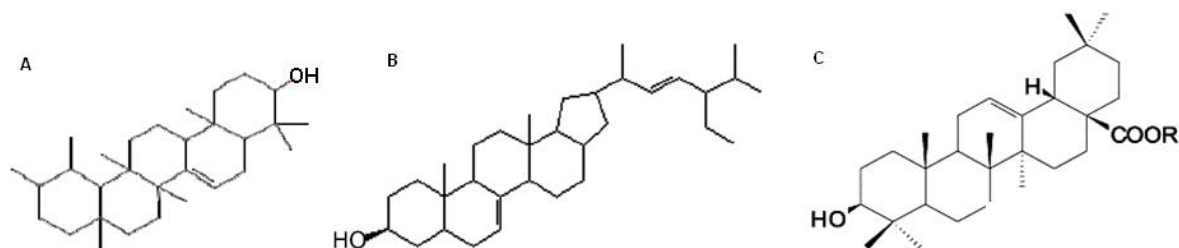


Figura 4: Compostos isolados da fração hexânica da *Baccharis illinita*. A: Baurenol, B:  $\alpha$ -spinasterol e C: ácido oleanólico. A presença dos compostos foi determinada através da utilização de cromatografia a gás ligada à espectrometria de massa

## 4.2 Animais

Foram utilizados ratos Wistar (180 a 220 g) e camundongos Swiss (25 a 35 g), machos, fornecidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR e do Biotério Central da UFSC. Os animais foram mantidos em temperatura constante ( $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), ciclo claro-escuro de 12 horas e tratados com água e ração *ad libitum*. Os animais utilizados nos modelos de nocicepção permaneceram no laboratório por um período de adaptação antes da realização dos experimentos. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da UFPR, sob o número 137.

### 4.3 Estudo da atividade antinociceptiva

#### 4.3.1 Contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos

Os animais foram tratados com o extrato hidroalcolico (HA 30 - 1000 mg/kg), fração acetato de etila (FAE 100 - 600 mg/kg), fração aquosa (FAq 100 - 600 mg/kg), fração hexânica (FH 30 - 300 mg/kg) pela via oral. A FH também foi administrada pela via *i.p.* (3 - 30 mg/kg), assim como seus compostos isolados: ácido oleanólico (0,00001 - 1 mg/kg), baurenol (0,1 - 10 mg/kg) e  $\alpha$ -espinasterol (0,1 - 10 mg/kg). Após 60 min (*v.o.*) ou 30 min (*i.p.*) os animais receberam uma injeção intraperitoneal de 450  $\mu$ l de ácido acético (0,6%). Os grupos controles receberam veículo (10 ml/kg, *v.o.* ou *i.p.*). Após a injeção do ácido acético os camundongos foram colocados em funis de vidros individuais, e o número de contorções abdominais foi quantificado cumulativamente durante um período de 20 min. As contorções abdominais consistem na contração da musculatura abdominal juntamente com a extensão de uma das patas posteriores de acordo com o método descrito anteriormente (Collier et al., 1968; Santos et al., 1999 a; Le Bars et al., 2001).

#### 4.3.2 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina (2,5%) em camundongos

O modelo de nocicepção induzida pela formalina permite avaliar dois tipos distintos de nocicepção: a de origem neurogênica (estimulação direta das fibras nociceptivas) e a de origem inflamatória (caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios) (Hunnskaar e Hole, 1987, Tjølsen et al., 1992). A metodologia utilizada foi essencialmente à mesma descrita por Santos e Calixto (1997). Os animais utilizados foram individualmente ambientados em funis de vidro. Um volume de 20  $\mu$ l de solução de formalina 2,5% foi injetado intraplantarmente (*i.pl.*) na superfície

ventral da pata direita do animal, sendo individualmente observado o tempo que os animais permaneceram lambendo ou mordendo a pata injetada de 0-5 min (fase neurogênica) e de 15-30 min (fase inflamatória) após a injeção da formalina. Os animais receberam a FH (300 - 1000 mg/kg, *v.o.*) 60 min antes da administração da formalina.

#### 4.3.3 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos

Como o sistema glutamatérgico é um dos mais importantes envolvidos na modulação da nocicepção e da antinocicepção, tanto em nível periférico quanto central, analisamos a atividade da FH e seus compostos isolados no modelo de nocicepção induzida pelo glutamato (Beirith et al., 2002).

Após os tratamentos com a FH (30 - 600 mg/kg, *v.o.*), ácido oleanólico (0,1 - 10 mg/kg, *i.p.*; 1 mg/kg, *v.o.* e 10 - 30  $\mu$ g/pata, *i.pl.*) e  $\alpha$ -espinasterol (0,1 - 3 mg/kg, *i.p.*; 30 mg/kg, *v.o.* e 10 - 30  $\mu$ g/pata, *i.pl.*), os animais receberam 20  $\mu$ l de solução de glutamato tamponado (20  $\mu$ mol/pata) por via intraplantar na pata traseira direita. Após, os animais foram colocados individualmente em funis de vidro transparentes, sendo que o tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada foi cronometrado por um período de 15 min e considerado como um índice de nocicepção. Os animais controle receberam igual volume de veículo utilizado para diluir a fração e seus compostos.

#### 4.3.4 Medida da hiperalgesia térmica, mecânica e edema de pata em ratos

O limiar nociceptivo (grunhido ou retirada da pata) foi realizado com a aplicação de pressão crescente ou temperatura no dorso das patas de ratos controle ou que foram sensibilizados com substâncias hiperalgésicas, utilizando os métodos

descritos por Randall e Selitto (1957) e Hargreaves et al. (1988), com pequenas modificações. O peso no analgesímetro varia de 0 a 750 g e o limiar nociceptivo foi expresso como carga tolerada (em g). Para o limiar nociceptivo térmico os ratos foram habituados ao ambiente aproximadamente 10 min antes do teste. As latências de retirada da pata foram registradas automaticamente com luz fotossensível. O tempo de corte para o experimento foi de 20 s para evitar dano do tecido. Os animais foram tratados com a FH na dose de 300 mg/kg ou veículo (grupo controle) pela via oral, 1 h antes de receber prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub> 10 nmol/pata) e bradicinina (BK 3,2 nmol/pata) em um volume de 100 µl. Um grupo de animais recebeu salina no lugar dos agentes hiperalgésicos (grupo salina). Após 30 min foram determinadas as medidas de hiperalgesia mecânica e térmica como descritas acima. Após a determinação das medidas as patas sensibilizadas e contralaterais foram coletadas e pesadas para a medida do edema de pata. Os resultados de edema estão representados como delta da pata edemaciada e contralateral.

#### 4.3.5 Neuropatia induzida pela constrição parcial do nervo ciático

O possível efeito da FH sobre a dor neuropática foi avaliado no modelo de neuropatia induzida pela constrição parcial do nervo ciático em camundongos. Os animais foram previamente anestesiados com injeção intraperitoneal de uma mistura contendo cetamina 100 mg/kg e xilazina 5 mg/kg. A anestesia foi mantida com anestésico inalatório isoflurano (1-2% em 100% de O<sub>2</sub>) e após a verificação da anestesia, foi realizada uma incisão no membro inferior direito para a exposição do nervo ciático, que foi dissecado das veias e dos tecidos aderentes de acordo com o método descrito para ratos (Seltzer et al., 1990) e adaptado para camundongos (Malmberg e Basbaum, 1998). Após o procedimento descrito, aproximadamente 1/2 a 2/3 do nervo ciático foi amarrado com o auxílio do fio de sutura (Ethicon, Cardiovascular, 7.0 Prolone) que também foi utilizado para suturar a fáscia; já a epiderme foi suturada com o fio 4.0 (Ethicon, Cardiovascular, Ethibond). A dor neuropática foi avaliada do 7° ao 19° dia após a ligadura do nervo ciático com os filamentos de Von Frey (0,4 e 2 g). O método consiste na aplicação do filamento sob

a região plantar da pata que sofreu a constrição. A resposta nociceptiva foi expressa como a porcentagem de retirada da pata a 10 estímulos induzidos pelo filamento de Von Frey, com intervalos de 1 min entre cada aplicação. No 7° dia os animais foram avaliados 1, 2, 4, 6 e 24 h após a administração da FH (300 mg/kg, v.o.), e nos dias subsequentes a avaliação foi realizada 1 h após o tratamento, sendo que do 14° ao 16° dias todos os grupos receberam apenas veículo. Dois grupos de animais: um operado e outro que passou pelo procedimento cirúrgico sem sofrer a constrição (grupo falso operado ou sham), receberam apenas veículo (10 ml/kg, v.o.) e foram utilizados como parâmetro de comparação ao grupo operado e tratado com a FH. Do 17° ao 19° dia após a constrição do nervo, os animais voltaram a receber a FH para a verificação de desenvolvimento de tolerância após tratamento crônico de 7 dias.

#### 4.3.6 Efeito sobre o desempenho motor no teste de atividade locomotora espontânea

O desempenho motor foi avaliado no aparato de campo aberto, que consiste de uma arena circular de madeira com 97 cm de diâmetro e 32,5 cm de altura, pintada de branco. O fundo desta arena é dividido por meio de círculo concêntrico, em três partes, que por sua vez são subdivididos através de segmentos de retas em dezenove partes aproximadamente iguais. Este aparelho foi construído de acordo com o sugerido por Broadhurst em 1960.

Os camundongos foram colocados individualmente no centro da arena e observados por um período de 5 min. Entre as observações de cada animal o campo aberto foi limpo com solução de hidroalcoólica a 10%. Cada unidade de locomoção corresponde ao ato do animal penetrar com as quatro patas em uma das divisões do chão da arena. A soma dessas unidades é registrada como frequência de locomoção. Os animais foram tratados por via oral com a FH nas doses de 300 e 600 mg/kg, 1 h antes do teste ou somente com o veículo (10 ml/kg) (controle).

## 4.4 Estudo do possível mecanismo de ação antinociceptivo

### 4.4.1 Participação do sistema opióide

A fim de avaliar a possível participação do sistema opióide no efeito antinociceptivo da FH, os camundongos foram pré-tratados com naloxona (antagonista não seletivo de receptores opióides, 1 mg/kg, *i.p.*) ou salina (10 ml/kg, *i.p.*) e após 20 min os animais receberam a FH (300 mg/kg, *v.o.*), morfina (agonista não seletivo de receptores opióides, 5 mg/kg, *s.c.*) ou salina (10 ml/kg, *v.o.*). A resposta nociceptiva foi avaliada no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético 60, 30 e 60 min após a administração da FH, morfina ou salina, respectivamente.

### 4.4.2 Participação de citocinas pró-inflamatórias

Pelo menos duas citocinas parecem estar bem envolvidas na dor e inflamação, a IL-1 $\beta$  e o TNF $\alpha$ . Tanto a IL-1 $\beta$  quanto o TNF- $\alpha$  contribuem diretamente com a formação da hiperalgesia e alodínia (Fröde, 2000, Ferreira et al., 1988; Davis e Perkins, 1994, Cunha e Ferreira, 2003, Coutaux et al., 2005). Baseando-se nestes dados decidiu-se avaliar o efeito antinociceptivo da FH e seus compostos isolados na nocicepção induzida pela administração intratecal destas citocinas. Camundongos foram tratados com salina (grupo controle - 10 ml/kg), FH (300 mg/kg, *v.o.*), ácido oleanólico (0,3 - 10 mg/kg, *i.p.*) e  $\alpha$ -espinasterol (1 - 10 mg/kg, *i.p.*) e após 60 min (*v.o.*) ou 30 min (*i.p.*) receberam injeção intratecal de interleucina (IL-1 $\beta$  - 1pg/sítio) ou do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$  - 0,1 pg/sítio). As injeções foram administradas nos animais acordados conforme o método descrito por Hylden e Wilcox, 1980. Os animais foram imobilizados manualmente e uma agulha conectada a uma microseringa de 25  $\mu$ l, foi inserida através da pele entre as vértebras L<sub>5</sub> e L<sub>6</sub>,



no espaço subdural. A resposta nociceptiva foi ocasionada pela administração intratecal no volume de 5  $\mu$ l dos aminoácidos excitatórios e SP diluídos em solução salina. Após a injeção das citocinas, os animais foram colocados individualmente em funis de vidro, e a resposta nociceptiva caracterizada pelo tempo que os animais permaneceram lambendo e/ou mordendo os membros posteriores (patas posteriores, abdômen e cauda) foi quantificada por um período de 15 min e considerado como índice de nocicepção, conforme descrito previamente por Choi et al (2003) com pequenas modificações (Meotti et al, 2007).

#### 4.4.3 Participação do sistema glutamatérgico e da substância P

Com o objetivo de evidenciar se a atividade antinociceptiva da *B. illinita* depende da estimulação do sistema nervoso central, aminoácidos excitatórios (AAE) e substância P (SP) foram administrados intratecalmente.

O procedimento utilizado foi similar ao descrito previamente por Scheidt et al. (2002) e Gadotti et al. (2006). Após tricotomia da região dorsal do animal, foi realizada a administração intratecal de AMPA (agonista seletivo de receptores ionotrópicos glutamatérgicos do subtipo AMPA, 135 pmol/sítio), NMDA (agonista seletivo de receptores ionotrópicos glutamatérgicos do subtipo NMDA, 450 pmol/sítio), Cainato (agonista seletivo de receptores ionotrópicos glutamatérgicos do subtipo Cainato, 110 pmol/sítio), trans-ACPD (agonista de receptores glutamatérgicos metabotrópicos do grupo I e II, 50 nmol/sítio) e SP (agonista preferencial de receptores NK1, 100 pmol/sítio). As injeções foram administradas nos animais acordados conforme o método descrito por Hylden e Wilcox, 1980. Os camundongos foram imobilizados manualmente e uma agulha conectada a uma microseringa de 25  $\mu$ l, foi inserida através da pele entre as vértebras L<sub>5</sub> e L<sub>6</sub>, no espaço subdural. A resposta nociceptiva foi ocasionada pela administração intratecal no volume de 5  $\mu$ l dos aminoácidos excitatórios e SP diluídos em solução salina. O tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo os membros inferiores (patas posteriores, cauda e abdômen) foi cronometrado dentro do tempo

padronizado para cada AAE (NMDA: 5 min, AMPA: 1 min, Cainato: 4 min, trans-ACPD: 15 min e SP: 6 min, após sua administração) e considerado como índice de nocicepção. O tratamento com a FH (300 mg/kg, *v.o.*), ácido oleanólico (0,3 - 30 mg/kg, *i.p.*) e  $\alpha$ -espinasterol (0,03 - 30 mg/kg, *i.p.*) foi realizado 60 min (*v.o.*) ou 30 min (*i.p.*) antes da injeção intratecal.

#### 4.4.4 Participação das fibras sensíveis à capsaicina

Com a finalidade de verificar a participação dos neurônios sensoriais sensíveis a capsaicina (fibras C e A $\delta$ ) na ação antinociceptiva do ácido oleanólico e do  $\alpha$ -espinasterol, grupos de camundongos foram pré-tratados no segundo dia de vida com capsaicina (50 mg/kg, *s.c.*) com o objetivo de induzir uma degeneração irreversível dos neurônios aferentes primários de pequeno diâmetro, especialmente das fibras C (Holzer 1991; Beirith et al., 2003). Outro grupo de animais recebeu também no 2° dia de vida, pela mesma via o mesmo volume do veículo usado para dissolver a capsaicina (10% etanol em salina). Dois meses após o tratamento com capsaicina, os animais foram selecionados através do teste de limpeza dos olhos (eye wiping), anteriormente descrito por Amann et al. (1995) em ratos, com pequenas modificações para camundongos, onde os animais receberam 10  $\mu$ l de solução de capsaicina (10  $\mu$ g/ml) e durante 1 min foi contado o número de vezes que o animal conduziu a pata dianteira até o olho inoculado com capsaicina. Após a seleção dos animais, avaliou-se a ação antinociceptiva do ácido oleanólico (3 mg/kg, *i.p.*) e do  $\alpha$ -espinasterol (1 mg/kg, *i.p.*) frente a nocicepção causada pelo glutamato, já descrita anteriormente.

#### 4.4.5 Estudo da neurotransmissão glutamatérgica

##### 4.4.5.1 Preparação das membranas

A preparação das membranas foi realizado de acordo com o protocolo descrito anteriormente por Emanuelli et al. (1998). Camundongos Swiss foram mortos por decapitação e tiveram seus cérebros (exceto cerebelo) dissecados, pesados e homogeneizados em 20 volumes (ml/g de tecido) de uma solução contendo sacarose (320 mM)/Tris-HCl (10 mM)/MgCl<sub>2</sub> (1 mM) e pH 7,4. O homogeneizado foi centrifugado a 1.000 x g durante 15 min. O sobrenadante (S1) dessa centrifugação foi separado e mantido em gelo. O precipitado foi ressuspensão no mesmo volume de tampão utilizado inicialmente e centrifugado novamente a 1.000 x g durante 15 min. O sobrenadante obtido dessa centrifugação foi misturado a S1 e o precipitado foi desprezado e a mistura centrifugada a 27.000 x g durante 15 min. O precipitado resultante foi ressuspensão em 20 volumes de tampão Tris/HCl 1 mM (pH 7,4) e centrifugado novamente a 27.000 x g durante 15 min (Souza e Ramirez, 1991), sendo que esse procedimento foi repetido três vezes. O precipitado resultante da terceira lavagem foi ressuspensão em tampão Tris/HCl 10 mM (pH 7,4) de forma a obter uma concentração protéica em torno de 1 a 2 mg/ml de proteína a ser utilizado no ensaio de ligação específica.

##### 4.4.5.2 União específica (binding) de [<sup>3</sup>H]-L-glutamato em membranas de cérebro de camundongos

Os ensaios de união específica ("binding") de [<sup>3</sup>H]-L-glutamato, dependente ou independente de sódio, foram realizados em triplicata em um volume total de 0,5 ml contendo 0,1 ml de membrana (0,2-0,3 mg de proteína), tampão Tris/HCl 50 mM (pH 7,4) e 40 nM de ligante radioativo ([<sup>3</sup>H]glutamato, 53 Ci/mmol) de acordo com

Rao e Murthy (1993) e Sinhorin et al. (2003), na presença e na ausência de ácido oleanólico e  $\alpha$ -espinasterol (1–100  $\mu$ M) ou veículo (DMSO 0,5 ou 5%). A união específica dependente de sódio foi realizada com o mesmo meio de incubação descrito acima, porém contendo 150 mM de acetado de sódio. Após 30 min de incubação a 30 °C as amostras foram filtradas a vácuo, os filtros foram lavados com 20 ml de tampão tris/acetato 10 mM gelado, bem secados e colocados em frascos próprios (vials) contendo líquido de cintilação para posterior determinação da radioatividade em cintilador beta por 2 min. A união específica foi calculada como a porcentagem dos valores de união ('binding') total. Os resultados estão expressos como a média de três experimentos independentes, sempre realizados em triplicata. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976), usando-se albumina bovina sérica como padrão.

#### 4.4.5.3 Preparação de frações sinaptossomais

Os animais (camundongos) foram mortos por decapitação, o cérebro sem o cerebelo foi rapidamente removido, pesado e a preparação sinaptossomal foi obtida através de gradientes isotônicos descontínuos de Percoll/ sacarose a 4 °C, como previamente descrito por Dunkley et al. (1988). Rapidamente, foram feitos homogenatos do cérebro (10%, peso/volume) em 5 mM HEPES e 320 mM sacarose (pH 7.4), centrifugado duas vezes a 800  $\times g$  por 10 min para produzir um "*pellet*" (P1) e um sobrenadante (S1). P1 foi descartado e S1 foi submetido a um gradiente de densidade de solução de Percoll 16, 10, 7.5 % e centrifugado a 24,000  $\times g$  por 10 min. As frações sinaptossomais foram isoladas, suspendidas e homogeneizadas em tampão Krebs (pH 7.4), contendo em mM: 145 NaCl, 5 KCl, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.3 MgSO<sub>4</sub>, 20 HEPES, 10 glicose e 1.2 CaCl<sub>2</sub> e então centrifugado a 15,000  $\times g$  por 10 min. O sobrenadante foi removido e o "*pellet*" ressuspenso em tampão Krebs. A fração sinaptossomal usada continha aproximadamente 1 mg de proteína/ml. As preparações de sinaptossomas foram então utilizadas para os ensaios de liberação de glutamato (Nagy et al., 1986)

#### 4.4.5.4 Liberação de [<sup>3</sup>H]-L-glutamato em sinaptossomas de cérebros de camundongos

Foi realizada a captação por 15 min a 35° C na presença de [<sup>3</sup>H]-L-glutamato (concentração final, 500 nM) e alíquotas de 1 mg de proteína de sinaptossomas. A captação foi interrompida por centrifugação a 13.000 x g por 1 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em tampão HBSS sem glutamato e novamente centrifugado. O procedimento anterior foi repetido por mais três vezes com o intuito de retirar todo o neurotransmissor que não tenha sido captado. Por fim, os sinaptossomas foram incubados a 35° C por 1 min, em condições despolarizantes (na presença de KCl 40 mM). O efluxo foi imediatamente finalizado por centrifugação por 1 min a 16.000 x g. Os sobrenadantes obtidos foram avaliados para a radioatividade por cintilação líquida. A quantidade de [<sup>3</sup>H]-L-glutamato liberada (no sobrenadante) foi calculada como uma porcentagem da quantidade total de radioatividade. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976), usando-se albumina bovina sérica como padrão.

#### 4.4.6 Participação de receptores TRP (frio e calor)

##### 4.4.6.1 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos

Com o objetivo de avaliar a participação dos receptores TRPV1 (calor nocivo) na atividade antinociceptiva promovida pela FH e  $\alpha$ -espinasterol, foram realizados experimentos de nocicepção induzida pela injeção de capsaicina (agonista de receptor TRPV1), de acordo com os dados descritos anteriormente por Santos e Calixto (1997). Após o tratamento com a FH (300 mg/kg, *v.o.*) e  $\alpha$ -espinasterol (1 - 30 mg/kg, *i.p.*; 30 mg/kg, *v.o.* e 1 - 30  $\mu$ g/pata, *i.pl.*), os animais receberam 20  $\mu$ l de

solução de capsaicina (1,6 µg/pata, *i.pl.*) na pata traseira direita. Após, os animais foram colocados individualmente em funis de vidro transparentes, sendo que o tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada foi cronometrado por um período de 5 min e considerado como um índice de nocicepção. Os animais controle receberam igual volume de veículo utilizado para diluir o composto. O agente nociceptivo foi injetado 30 min após tratamento *i.p.*, 60 min após tratamento *v.o.* e no mesmo momento do tratamento *i.pl.*

#### 4.4.6.2 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído em camundongos

A fim de verificar a participação dos receptores TRPA1 (frio nocivo) na antinocicepção promovida pela FH e  $\alpha$ -espinasterol, foi realizado o modelo de nocicepção induzida por cinamaldeído (agonista de receptores TRPA1), modificado do modelo descrito por Andrade et al. (2008). Após o tratamento com a FH (300 mg/kg, *v.o.*) e  $\alpha$ -espinasterol (3 - 30 mg/kg, *i.p.*; 30 mg/kg, *v.o.* e 30 µg/pata, *i.pl.*), os animais receberam 20 µl de solução de cinamaldeído (10 nmol/pata, *i.pl.*) na pata traseira direita. Após, os animais foram colocados individualmente em funis de vidro transparentes, sendo que o tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada foi cronometrado por um período de 5 min e considerado como um índice de nocicepção. Os animais controle receberam igual volume de veículo utilizado para diluir o composto. O agente nociceptivo foi injetado 30 min após tratamento *i.p.*, 60 min após tratamento *v.o.* e no mesmo momento do tratamento *i.pl.*

#### 4.4.6.3 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de mentol em camundongos

Para avaliar a participação de receptores TRPM8 (frio não nocivo) na atividade antinociceptiva da FH e do  $\alpha$ -espinasterol, foram realizados experimentos de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de mentol (agonista de receptores TRPM8) (dados não publicados). Após o tratamento com a FH (300 mg/kg, *v.o.*) e  $\alpha$ -espinasterol (0,1 - 10 mg/kg, *i.p.*; 10 mg/kg, *v.o.* e 3 - 30  $\mu$ g/pata, *i.pl.*), os animais receberam 20  $\mu$ l de solução de mentol (1%, *i.pl.*) na pata traseira direita. Após, os animais foram colocados individualmente em funis de vidro transparentes, sendo que o tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada foi cronometrado por um período de 20 min e considerado como um índice de nocicepção. Os animais controle receberam igual volume de veículo utilizado para diluir o composto. O agente nociceptivo foi injetado 30 min após tratamento *i.p.*, 60 min após tratamento *v.o.* e no mesmo momento do tratamento *i.pl.*.

#### 4.4.7 Envolvimento da proteína $G_{i/o}$ sensível à toxina pertussis

Com a intenção de verificar participação da proteína  $G_{i/o}$  na ação antinociceptiva do  $\alpha$ -espinasterol, animais foram pré-tratados com toxina pertussis, substância capaz de causar ribosilação e conseqüente inativação da subunidade catalítica da proteína  $G_{i/o}$ . O procedimento foi similar ao descrito por Santos et al. (1999 b), com algumas modificações. Camundongos foram pré-tratados com toxina pertussis (1  $\mu$ g/sítio, *i.t.*) ou solução salina (5  $\mu$ l/site, *i.t.*), 7 dias antes da administração do  $\alpha$ -espinasterol (10 mg/kg, *i.p.*), morfina (2,5 mg/kg, *s.c.*), utilizada como controle positivo ou veículo (10 ml/kg, *i.p.*), depois de 30 min os animais foram avaliados no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. O número de contorções abdominais foi cumulativamente quantificado durante um período de 20 min como descrito anteriormente.

#### 4.4.8 Participação da proteína quinase C (PKC)

##### 4.4.8.1 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de miristato-acetato de forbol (PMA) em camundongos

A fim de verificar se o  $\alpha$ -espinasterol altera a nocicepção induzida pelo PMA (ativador da PKC) em camundongos, foram realizados os experimentos como previamente descrito por Ferreira et al. (2005), com algumas modificações. Os animais foram pré-tratados com o  $\alpha$ -espinasterol (3 - 30 mg/kg, *i.p.*) ou veículo (10 ml/kg, *i.p.*) e 30 min após, os animais receberam 20  $\mu$ l de PMA (500 pmol/pata) na superfície ventral da pata direita. Após a administração do PMA, os animais foram colocados em funis de vidro e observados por um período de 15 a 45 min, a quantidade de tempo em que o animal ficou lambendo ou mordendo a pata injetada foi cronometrado e considerado com indicativo de nocicepção.

##### 4.4.8.2 Preparação dos extratos citosólicos e nucleares

A fim de verificar se o  $\alpha$ -espinasterol promove atividade antinociceptiva através da alteração da ativação da PKC $\epsilon$ , a superfície ventral da pata foi coletada após 15 min da administração intraplantar de PMA (animais tratados com salina, animais tratados com  $\alpha$ -espinasterol e também de animais não manipulados: naive). Em seguida, as amostras foram homogeneizadas com processador de tecidos (*Tissue tearor*, Biospec Products, INC., OK, EUA) em tampão de lise A gelado [Tampão A: HEPES 10 mM (pH 7,9), contendo: 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de KCl, 0,5 mM de fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF), 0,5 mM de ditioneitol (DTT), 50 mM de NaF, 2 mM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1,5  $\mu$ g/ml de inibidor de tripsina, 7  $\mu$ g/ml de pepstatina A, 5  $\mu$ g/ml de leupeptina e 10  $\mu$ g/ml de aprotinina, incubadas em gelo por 15 min e centrifugadas a 14.000 rpm, 60 min, 4 °C. O sobrenadante resultante coletado



correspondeu ao extrato citosólico. Para obtenção das proteínas de membrana, o pellet foi re-suspenso em tampão de lise A contendo 1% de triton-X 100, homogeneizado e centrifugado a 14.000 rpm, 30 min, 4 °C. O sobrenadante obtido foi coletado como extrato rico em membrana. A concentração de proteínas das amostras foi determinada utilizando o reagente de Bradford (Bio-Rad *Protein Assay Kit*) segundo recomendações do fabricante. As frações celulares foram armazenadas em freezer a -70 °C até o momento do uso.

#### 4.4.8.3 Ensaio de Western Blot

Aproximadamente 50 µg de proteínas foram misturadas com tampão de amostra 5 vezes concentrado (Tris-HCl 150 mM, pH 6,8, contendo: β-mercaptoetanol 15%, SDS 6%, azul de bromofenol 0,3%), fervidas por 5 min e separadas por eletroforese em gel de poli-acrilamida a 10%). Em seguida, as proteínas presentes no gel foram eletrotransferidas para membranas de polivinilideno difluorido (PVDF). Para bloquear sítios de ligação inespecífica do anticorpo, as membranas foram incubadas “*overnight*” em solução de TBS-T, contendo leite desnatado (5%) a 4 °C, lavadas em tampão TBS-T e então incubadas overnight com os anticorpos primários anti-PKCε (Santa Cruz Biotech. Inc., CA, USA) ou beta-tubulina (controle). A visualização das proteínas foi realizada utilizando anticorpo secundário específico conjugado a peroxidase e as bandas imunorreativas foram visualizadas usando-se kit de aumento de quimioluminescência (ECL, Amersham Pharmacia Biotech.) e filme radiográfico, segundo recomendações do fabricante.

#### 4.4.9 Análise Estatística

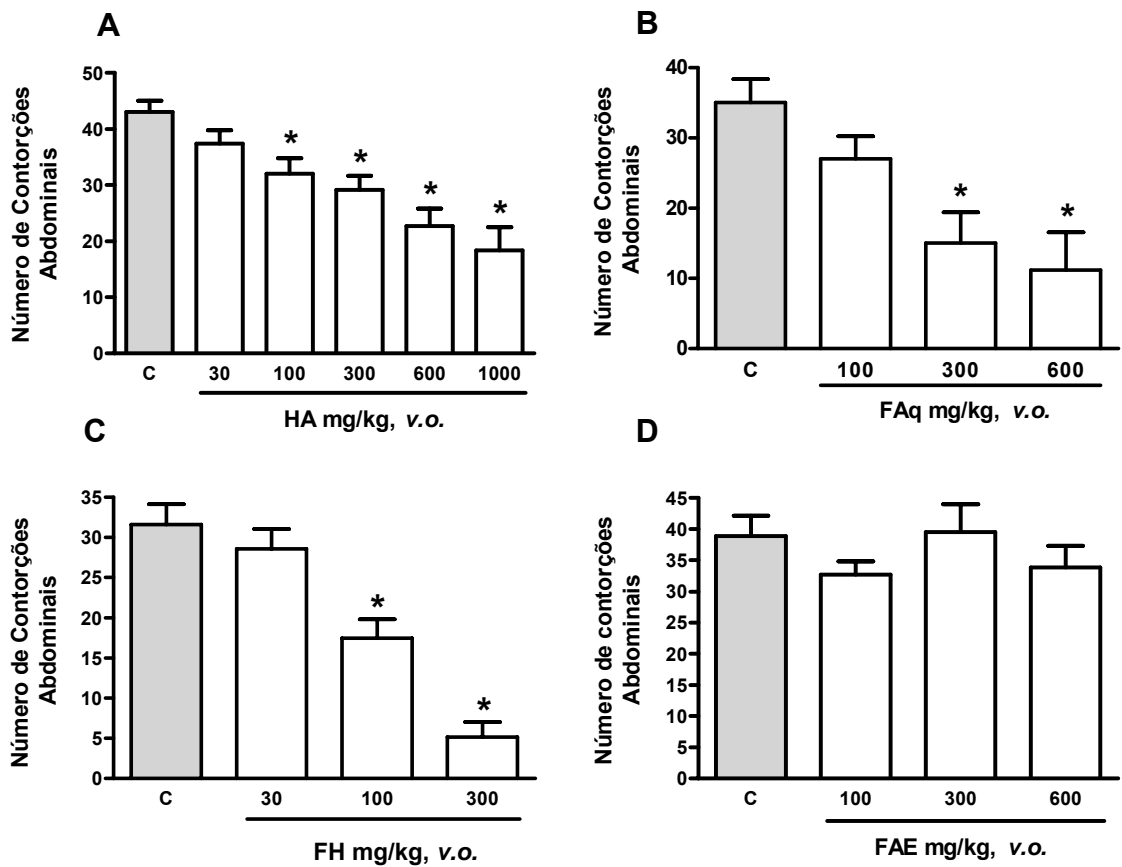
Os resultados estão apresentados como media  $\pm$  erro padrão da media (EPM), exceto os valores de  $DI_{50}$  (doses de extrato, frações e compostos isolados que reduziram as respostas nociceptivas em 50% em relação ao grupo controle), as quais estão apresentadas como médias geométricas acompanhadas de seus respectivos limites de confiança em nível de 95%. Os valores de  $DI_{50}$  foram obtidos através do método de regressão não-linear utilizando-se o software Graph Pad Prism (2005, San Diego, CA) versão 4.03. Para os dados paramétricos, a significância estatística dos diferentes grupos foi determinada por ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Newman-Keuls. Para a análise de dois grupos independentes, a diferença estatística foi determinada através do teste *t* de Student. Os dados do tratamento da FH ao longo do tempo (constricção do nervo ciático) foram analisados utilizando ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni. Em todos os casos, foi considerada diferença significativa quando  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Efeito do extrato hidroalcoólico e frações obtidas do extrato hidroalcoólico da *B. illinita* sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos

A administração oral do extrato hidroalcoólico (HA: 100 - 1000 mg/kg) inibiu o número de contorções abdominais induzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético em camundongos com inibição de  $57 \pm 10\%$  e  $DI_{50} = 726,6$  (381,9 – 1382,0) mg/kg (Fig. 5 A).

O número de contorções abdominais induzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético também foi reduzido após a administração oral da fração aquosa (FAq: 100 - 600 mg/kg) com inibição de  $72 \pm 7\%$  e  $DI_{50} = 285,0$  (165,0 – 495,0) mg/kg. Já a fração hexânica (FH: 30 – 300 mg/kg) inibiu o número de contorções abdominais em  $84 \pm 6\%$  e  $DI_{50} = 113,5$  (85,5 – 150,5) mg/kg, quando administrada pela via oral. A administração oral da fração acetato de etila (FAE: 100 - 600 mg/kg) não alterou o número de contorções abdominais induzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético (Fig. 5 B - D).

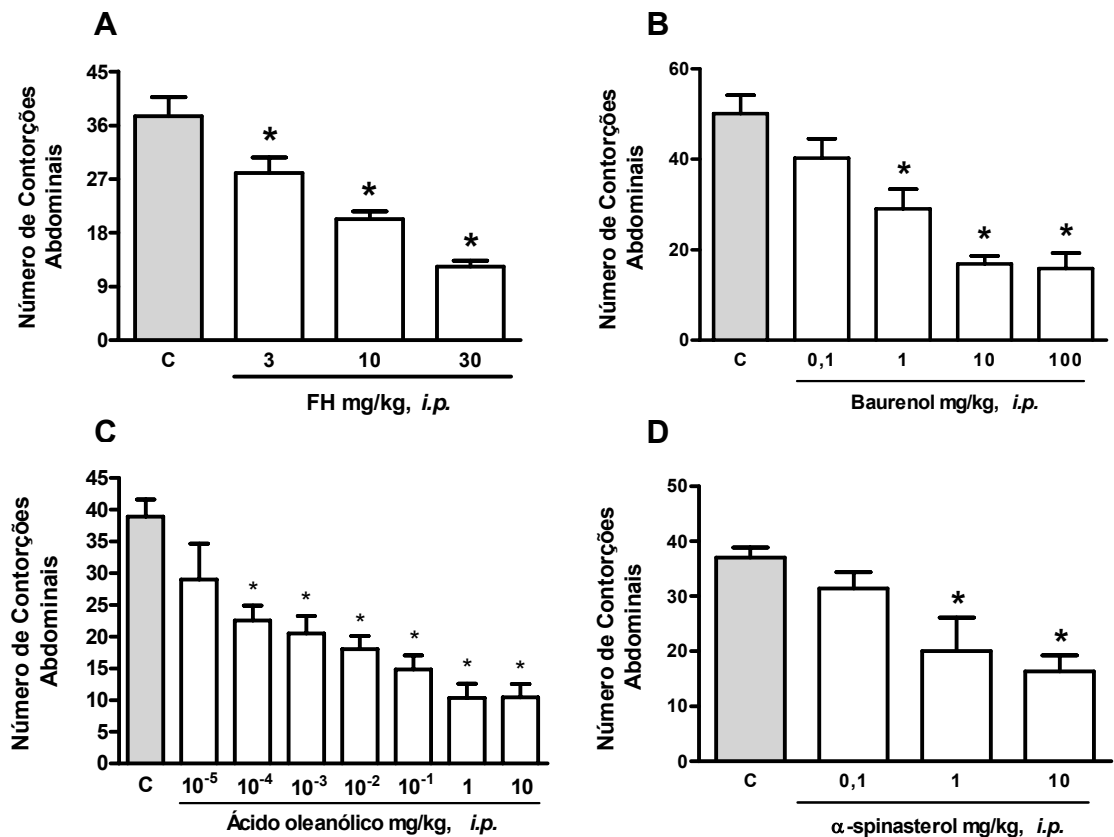


**Figura 5:** Efeito do extrato hidroacoólico (HA, A), das frações aquosa (FAq, B), hexânica (FH, C) e acetato de etila (FAE, D) da *B. illinita* administrados por via oral, na nocicepção induzida por ácido acético (0,6%, *i.p.*). Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão das médias ( $n= 6$  a  $8$ ). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman Keuls. Diferente do grupo controle para \*  $p < 0,05$ .

## **5.2 Efeito da FH (administrada ip) e seus compostos isolados (baurenol, ácido oleanólico e $\alpha$ -espinasterol) sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos**

Considerando que a FH foi a fração mais potente, ela foi selecionada para o isolamento dos compostos ativos. Assim, a fração original (FH) administrada pela via intraperitoneal (3 - 30 mg/kg) foi capaz de reduzir de maneira dependente da dose a nocicepção induzida pelo ácido acético, com  $DI_{50}$  de 12,2 (9,0 – 16,4) mg/kg e inibição de  $67 \pm 3\%$  (Fig. 6 A).

Já os compostos isolados da FH e identificados como ácido oleanólico (0,00001 - 1 mg/kg), baurenol (0,1 - 10 mg/kg) e  $\alpha$ -espinasterol (0,1 - 10 mg/kg), administrados pela via intraperitoneal, foram capazes de reduzir de maneira dependente da dose o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, com  $DI_{50}$  de 0,0015 (0,0003 – 0,008), 3,2 (1,0 – 10,0) e 4,5 (1,7–12,3) mg/kg e inibição de  $73 \pm 6\%$ ,  $66 \pm 4\%$  e  $56 \pm 8\%$ , respectivamente. É importante destacar que o baurenol, o  $\alpha$ -espinasterol e o ácido oleanólico foram cerca de 4, 3 e 1000 vezes mais potentes que a FH, respectivamente (Fig. 6 B - D).

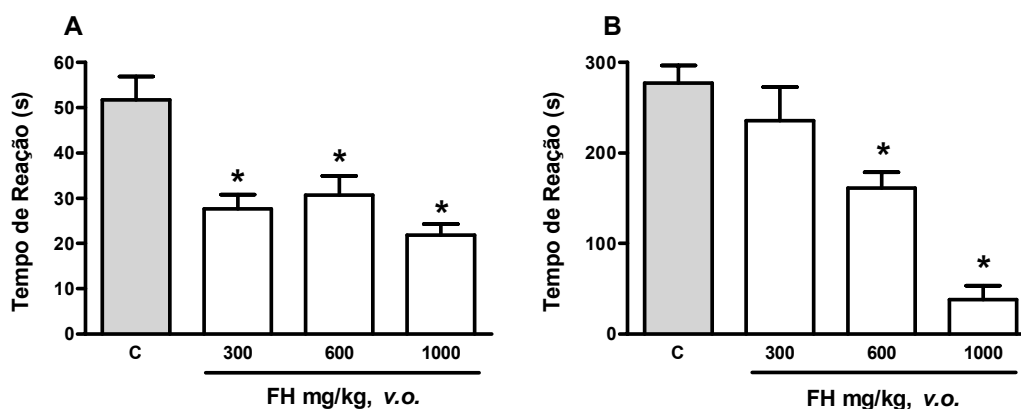


**Figura 6:** Efeito da fração hexânica (FH, A) e de seus compostos isolados, baurenol (B), ácido oleanólico (C) e  $\alpha$ -espinasterol (D) administrados por via *i.p.*, na nocicepção induzida por ácido acético (0,6%, *i.p.*). Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão das médias (n= 6 a 8). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman Keuls. Diferente do grupo controle para \*  $p < 0,05$ .

### 5.3 Efeito da FH na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos

Os resultados apresentados na Figura 7 (A - B) mostram que a FH (300 - 1000 mg/kg, *v.o.*) foi capaz de inibir tanto a fase neurogênica (1<sup>a</sup> fase: 0 - 5 min) quanto a fase inflamatória (2<sup>a</sup> fase: 15 - 30 min) da nocicepção induzida pela formalina. Porém seus efeitos foram mais pronunciados na segunda fase deste modelo. As  $DI_{50s}$  calculadas foram aproximadamente 300 e 573,0 (408,6 - 804,2)

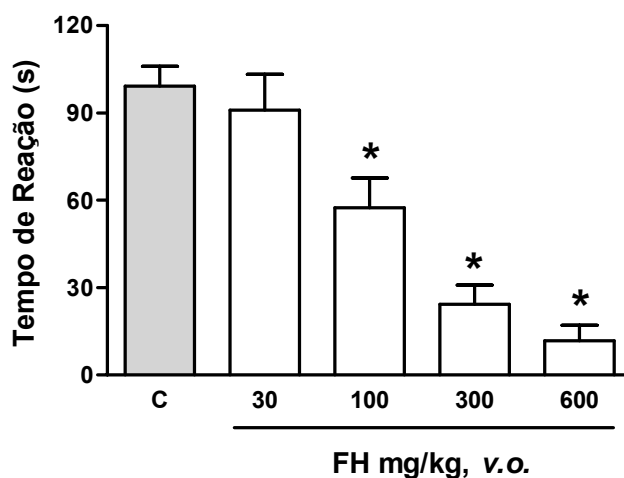
mg/kg e inibição de  $60 \pm 5\%$  e  $86 \pm 6\%$ , respectivamente para a primeira e segunda fase.



**Figura 7:** Efeito da fração hexânica (FH) administrada por via oral, na primeira (A) e segunda (B) fase da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina 2,5%. Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão das médias (n= 6 a 8). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman Keuls. Diferente do grupo controle para \*  $p < 0,05$ .

#### 5.4 Efeito da FH na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos

A FH (30 - 600 mg/kg, v.o.) também foi capaz de inibir de forma significativa e dependente da dose a nocicepção induzida pela injeção *i.pl.* de glutamato (20  $\mu$ mol/pata), com uma  $DI_{50}$  de 131,5 (88,6 – 195,3) mg/kg e inibição de  $88 \pm 5\%$  na maior dose testada (Fig. 8).

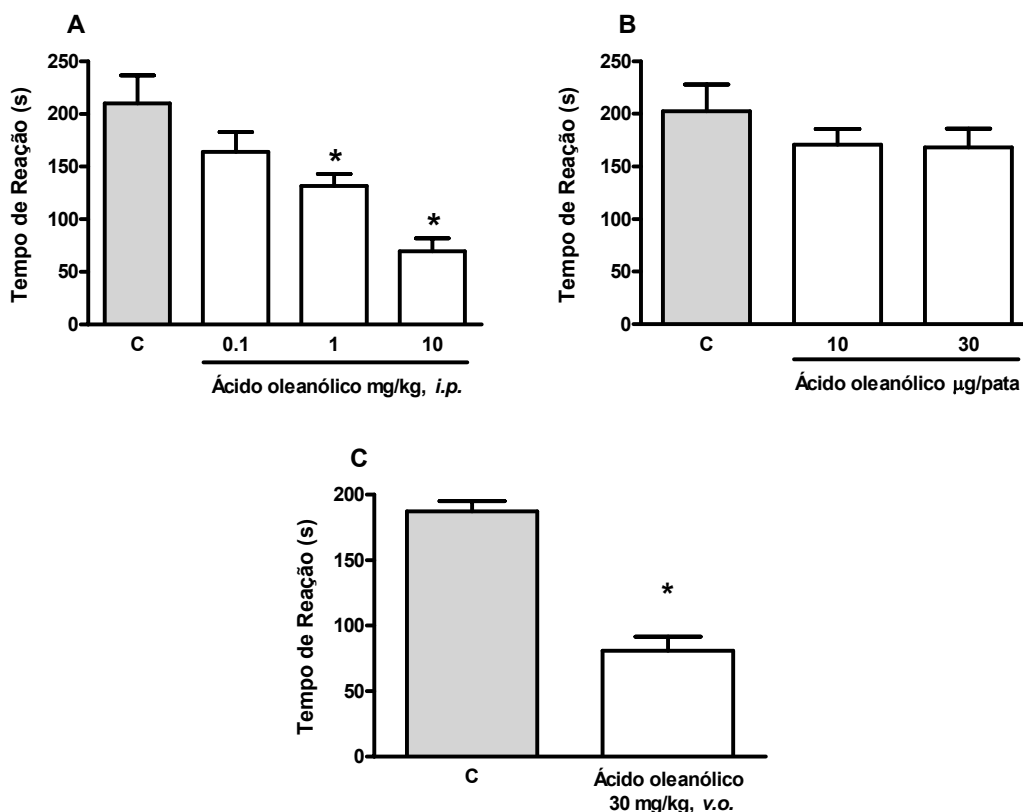


**Figura 8:** Efeito da fração hexânica (FH) administrada por via oral, na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato (20 nmol). Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão das médias ( $n= 8$  a  $10$ ). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman Keuls. Diferente do grupo controle para \*  $p < 0,05$ .

### 5.5 Efeito do ácido oleanólico e do $\alpha$ -espinasterol na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos

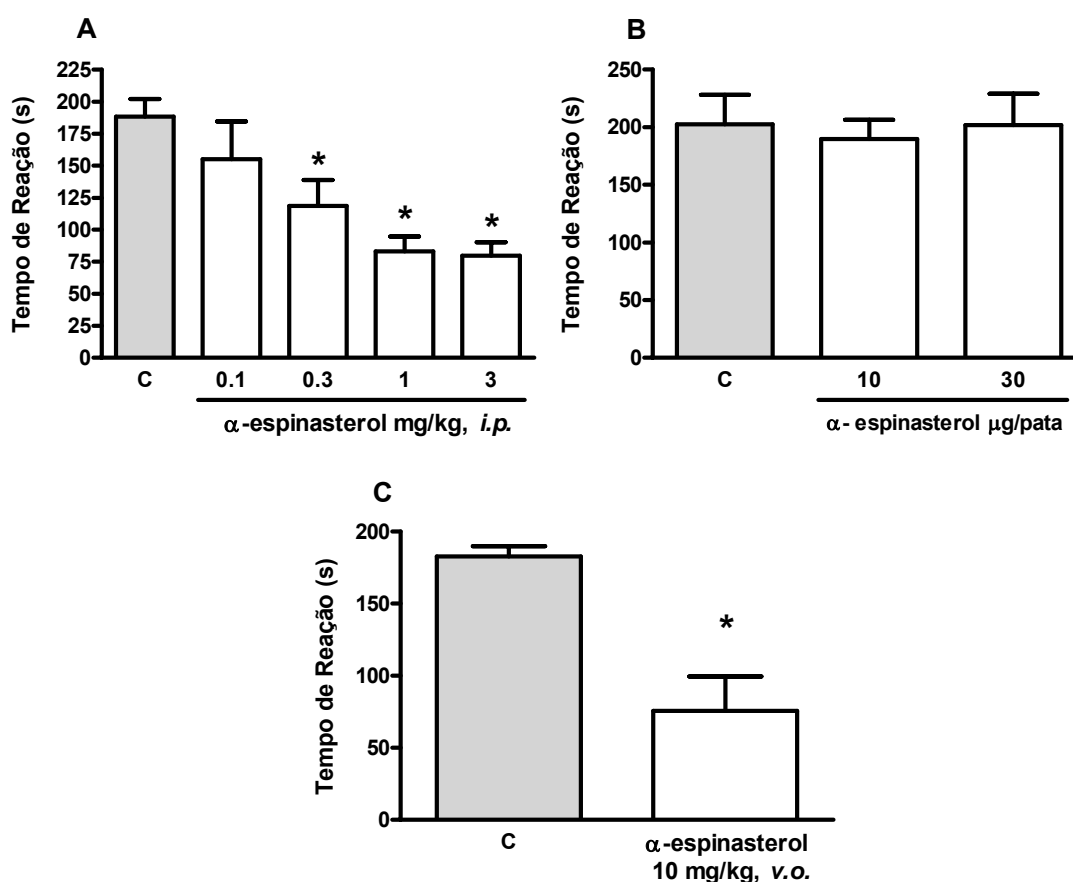
Os resultados apresentados na Figura 9 (A) mostram que o ácido oleanólico (0,1 - 10 mg/kg), quando administrado pela via *i.p.*, também causou uma inibição significativa e dependente da dose da nocicepção induzida pela injeção *i.pl.* de glutamato, com  $DI_{50} = 2,5$  (0,7 - 8, 3) mg/kg e inibição de  $67 \pm 6\%$ . Já a administração local do ácido oleanólico (10 - 30  $\mu$ g/pata) juntamente com o glutamato não alterou a resposta nociceptiva promovida pelo glutamato (Fig. 9 B). Quando o ácido oleanólico foi administrado pela via oral em uma dose aproximadamente 10 vezes maior que o valor da  $DI_{50}$  calculada para a via *i.p.* (30 mg/kg), também foi observada uma inibição de  $57 \pm 6\%$  da resposta nociceptiva induzida pelo glutamato (Fig. 9 C).





**Figura 9:** Efeito do ácido oleanólico administrado pela via *i.p.* (A), co-administrado com o glutamato na pata (B) e administrado pela via oral (C) na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato (20 nmol). Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão das médias ( $n = 8$  a  $10$ ). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman Keuls. Para o grupo tratado pela via oral, a comparação entre os grupos foi realizada através do teste *t* de Student. Diferente do grupo controle para \*  $p < 0,05$ .

O  $\alpha$ -espinasterol (0,1 – 3 mg/kg, *i.p.*) também inibiu de forma dependente da dose a nocicepção promovida pela injeção de glutamato, com  $DI_{50}$  de 0,9 (0,3 - 2,6) mg/kg e inibição de  $56 \pm 6\%$ . Quando administrado juntamente com o glutamato, o  $\alpha$ -espinasterol (10 - 30  $\mu$ g/pata) não alterou a nocicepção causada pelo glutamato. Da mesma forma que o ácido oleanólico, a administração do  $\alpha$ -espinasterol pela via oral em uma dose aproximadamente 10 vezes maior que o valor da  $DI_{50}$  calculada para a via *i.p.* (10 mg/kg), inibiu a resposta nociceptiva induzida pelo glutamato em  $59 \pm 13\%$  (Fig. 10 A - C).

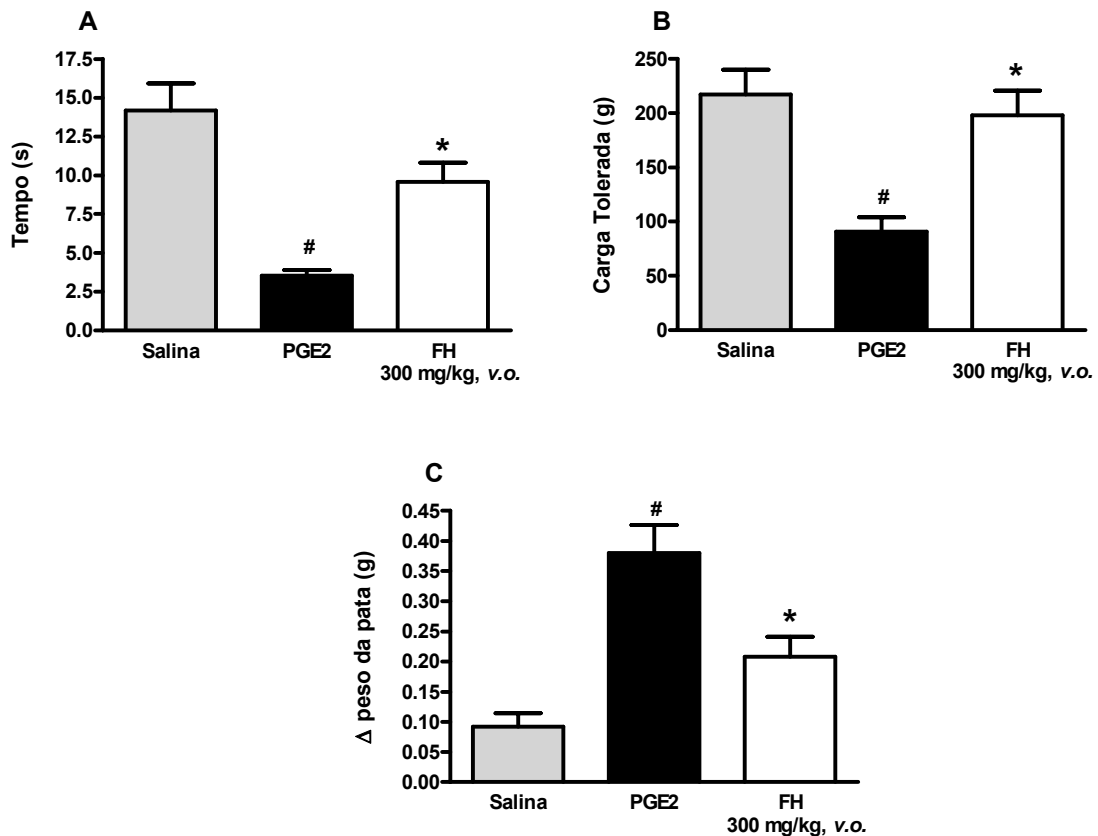


**Figura 10:** Efeito do  $\alpha$ -espinasterol administrado pela via *i.p.* (A), co-administrado com o glutamato na pata (B) e administrado pela via oral (C) na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato (20 nmol). Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão das médias ( $n = 8$  a  $10$ ). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman Keuls. Para o grupo tratado pela via oral, a comparação entre os grupos foi realizada através do teste *t* de Student. Diferente do grupo controle para \*  $p < 0,05$ .

### 5.6 Efeito da fração hexânica (FH) da *B. illinita* na hiperalgesia mecânica, térmica e edema de pata, após injeção intraplantar de prostaglandina $E_2$ e bradicinina em ratos

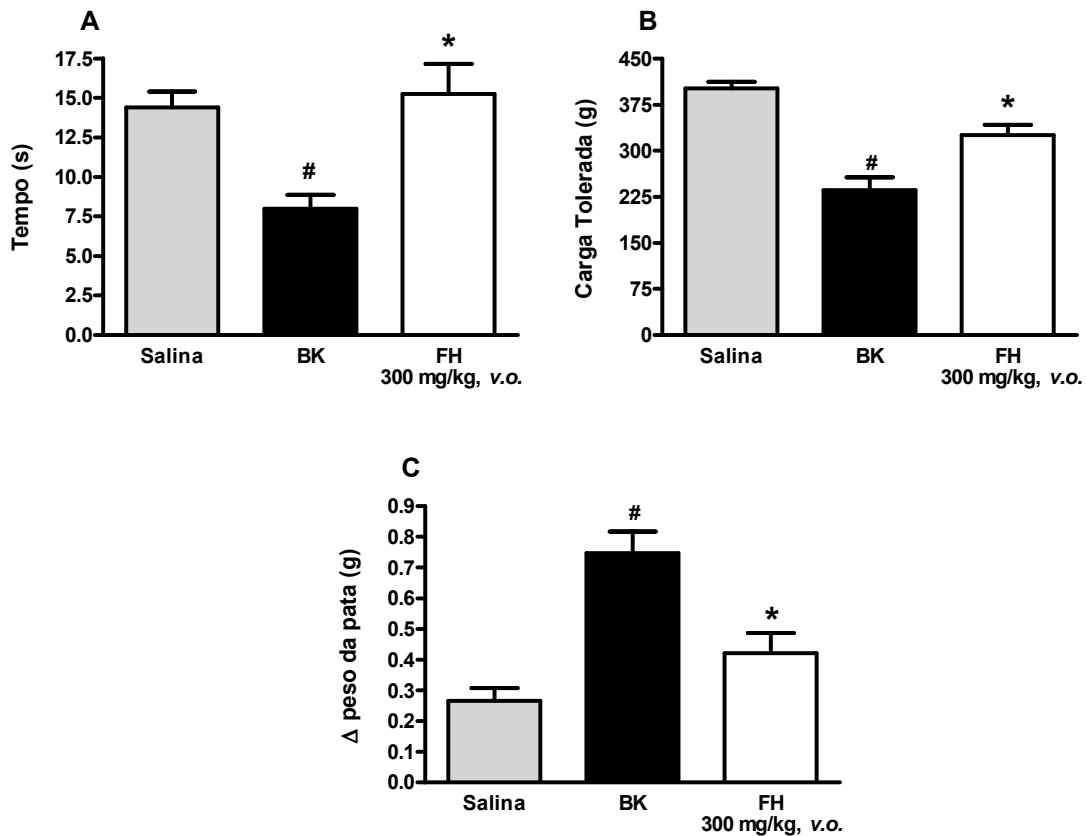
No modelo de hiperalgesia mecânica descrito por Randall e Sellito, A FH (300 mg/kg) administrada pela via oral, foi capaz de reverter de forma significativa a hiperalgesia mecânica (inibição de  $84 \pm 10\%$ ) e térmica (inibição de  $57 \pm 9\%$ )

induzido pela injeção intraplantar de PGE<sub>2</sub> e avaliados no modelo de Randall e Sellito e Hargreaves, respectivamente, bem como o edema de pata induzido pela PGE<sub>2</sub>, com inibição de  $45 \pm 4\%$  (Fig. 11 A - C).



**Figura 11:** Efeito da fração hexânica (FH) administrada por via oral, na hiperalgesia térmica (A), mecânica (B) e edema de pata (C) induzidos pela prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), em ratos. Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão das médias (n= 6). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman Keuls. Diferente do grupo controle PGE<sub>2</sub> para \* p < 0,05. Diferente do grupo salina para # p < 0,05.

Na figura 12 (A - C) demonstra que a FH (300 mg/kg) administrada pela via oral, também reverteu a hiperalgesia mecânica (inibição de  $54 \pm 6\%$ ) e térmica (inibição de 100%) induzido pela injeção intraplantar de BK e avaliados no modelo de Randall e Sellito e Hargreaves, respectivamente, bem como o edema de pata induzido pela BK, com inibição de  $44 \pm 7\%$ .

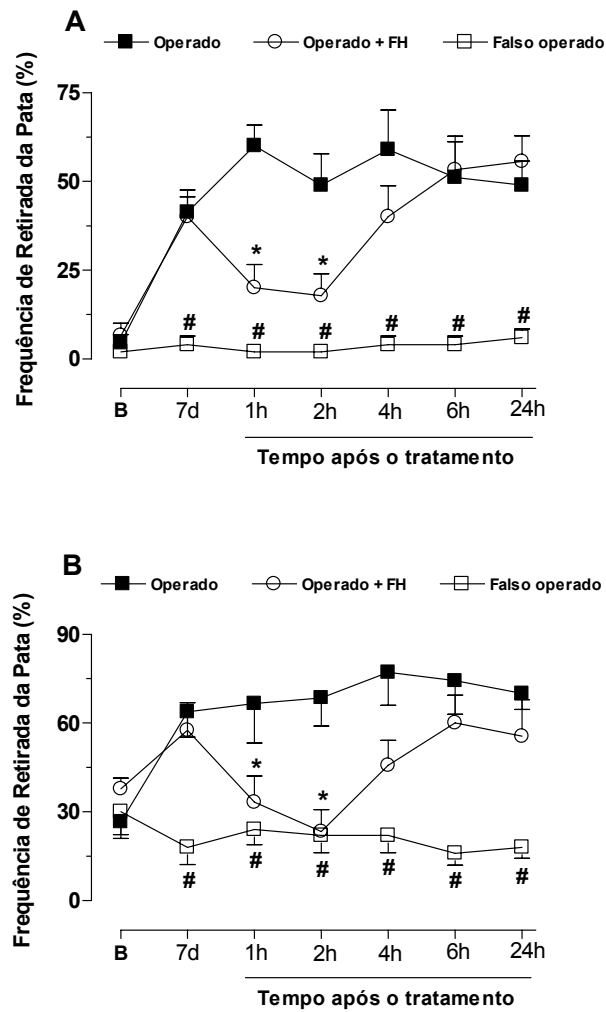


**Figura 12:** Efeito da fração hexânica (FH) administrada por via oral, na hiperalgesia térmica (A), mecânica (B) e edema de pata (C) induzidos pela bradicinina (BK), em ratos. Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão das médias ( $n=6$ ). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman Keuls. Diferente do grupo controle BK para \*  $p < 0,05$ . Diferente do grupo salina para #  $p < 0,05$ .

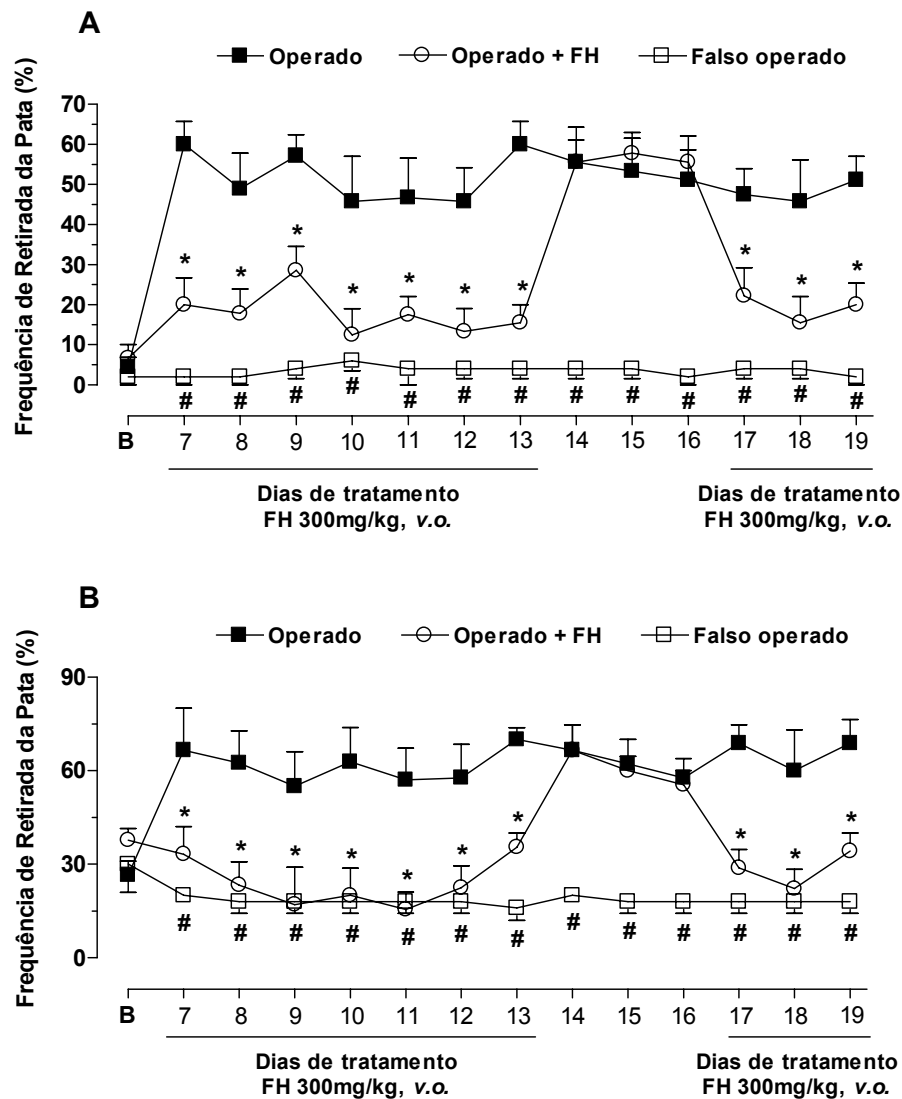
### **5.7 Efeito da FH na dor crônica induzida pela constrição parcial do nervo ciático**

O tratamento agudo com a FH (300 mg/kg, *v.o.*) diminuiu significativamente a alodínia e a hiperalgesia mecânica avaliada através dos filamentos de Von Frey (0.4 e 2.0, respectivamente) na pata dos animais operados, sendo que seu efeito máximo ocorreu 2 h (inibição de  $64 \pm 13\%$  para o filamento de 0,4 e inibição de  $85 \pm 7\%$  para o filamento de 2,0) após a administração da FH (Fig. 13 A - B).

Quando administrada diariamente por um período de 7 dias, a FH (300 mg/kg, *v.o.*), demonstrou ser efetiva em reduzir a alodínia (com inibições entre  $50 \pm 10$  e  $74 \pm 7\%$ ) e a hiperalgesia mecânica (com inibições de  $68 \pm 11$  a  $96 \pm 4\%$ ) avaliadas 2 h após a sua administração, sendo que o seu efeito foi mais pronunciado na hiperalgesia mecânica. Além disso, a interrupção do tratamento com a FH do 8º ao 10º dia não afetou a sua eficácia nos dias subseqüentes (Fig. 14 A - B).



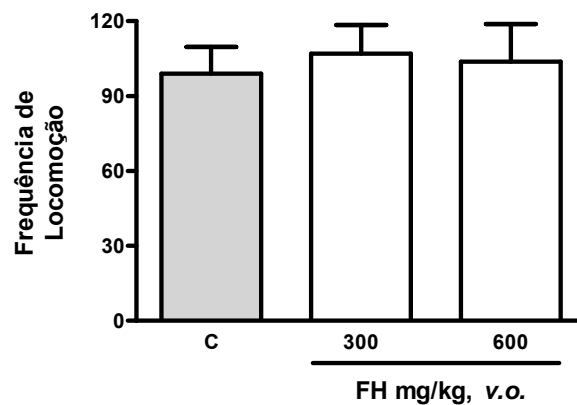
**Figura 13:** Efeito da fração hexânica (FH) administrada por via oral, sobre a alodínia (A: filamento 0,4) e hiperalgesia (B: filamento 2,0) induzida pela constrição parcial do nervo ciático em camundongos. O grupo B representa o limiar dos animais antes de serem submetidos à cirurgia e o grupo 7d representa o limiar medido 7 dias após a cirurgia sem que os animais tivessem recebido tratamento. A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA de duas vias) seguida do teste de Bonferroni. Diferente do grupo controle para  $p < 0,05$ , sendo que # representa a diferença entre o grupo operado e falso operado; \* representa a diferença entre o grupo operado e operado + FH.



**Figura 14:** Efeito da fração hexânica (FH) administrada diariamente por via oral, sobre a alodínia (A: filamento 0,4) e hiperalgesia (B: filamento 2,0) induzida pela constrição parcial do nervo ciático em camundongos. O grupo B representa o limiar dos animais antes de serem submetidos à cirurgia e o grupo 7d representa o limiar medido 7 dias após a cirurgia sem que os animais tivessem recebido tratamento. A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA de duas vias) seguida do teste de Bonferroni. Diferente do grupo controle para  $p < 0,05$ , sendo que # representa a diferença entre o grupo operado e sham; \* representa a diferença entre o grupo operado e operado + FH.

## 5.8 Efeito da FH sobre o desempenho motor no teste de atividade locomotora espontânea

A Figura 15 demonstra que o tratamento com a FH (300 e 600 mg/kg), doses que apresentaram significativo efeito antinociceptivo nos modelos de nocicepção química anteriormente mostrada, não foi capaz de causar mudança significativa sobre a atividade locomotora dos animais quando avaliados durante 5 min no teste do campo-aberto, em comparação ao grupo controle, que corresponde aos animais tratados somente com o veículo (salina).

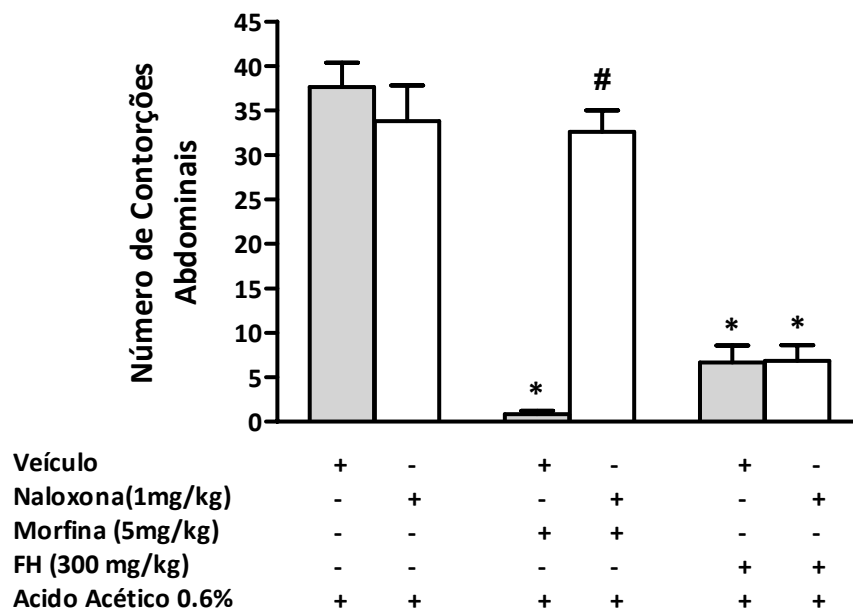


**Figura 15:** Efeito da fração hexânica (FH) administrada por via oral, sobre o desempenho motor. Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão das médias (n= 8 a 10). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni.



## 5.9 Avaliação da participação do sistema opióide na atividade antinociceptiva da FH

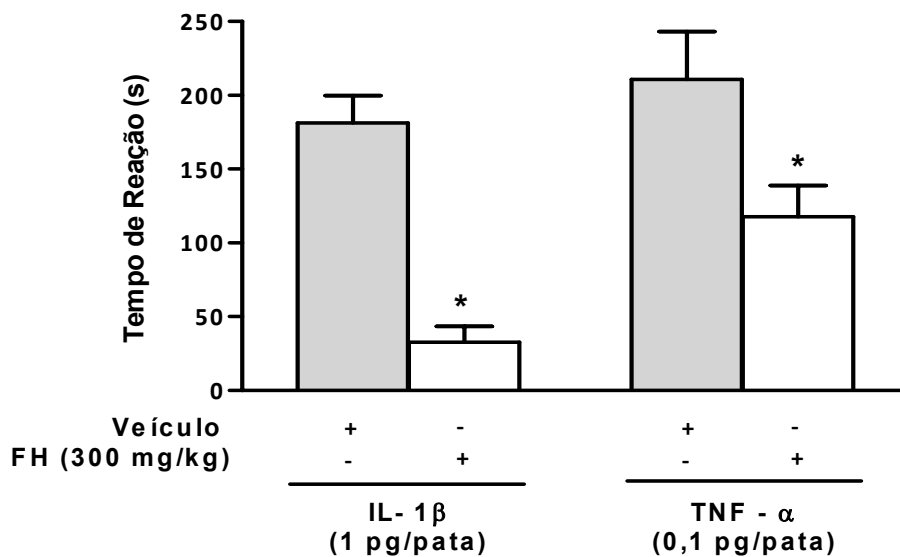
Os resultados apresentados na Figura 16 demonstram que o pré-tratamento dos animais com naloxona (1 mg/kg, *i.p.*, antagonista de receptores opióides), administrado 20 min antes da morfina, salina ou da FH foi capaz de reverter completamente o efeito antinociceptivo causado pela morfina (5 mg/kg, *s.c.*) no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. Porém, nas mesmas condições, a naloxona não foi capaz de reverter a antinociceptção causada pela FH (300 mg/kg, *v.o.*).



**Figura 16:** Efeito do pré-tratamento dos animais com naloxona (1 mg/kg, *i.p.*) sobre a atividade antinociceptiva da fração hexânica (FH, *v.o.*) e morfina (5 mg/kg, *s.c.*), no modelo de nocicepção induzida pela injeção de ácido acético 0,6% (*ip*) em camundongos. Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão das médias ( $n= 6$ ). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman Keuls. Diferente do grupo controle para \*  $p < 0,05$  e diferente do grupo morfina para #  $p < 0,05$ .

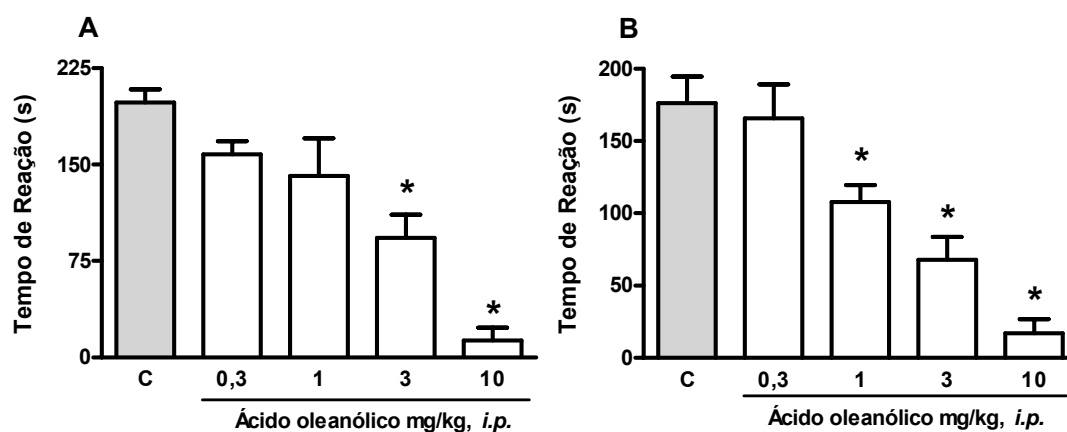
### 5.10 Efeitos da FH, do ácido oleanólico e do $\alpha$ -espinasterol sobre a nocicepção causada pela injeção intratecal de citocinas inflamatórias: IL - 1 $\beta$ e TNF - $\alpha$ , em camundongos

A administração da FH (300 mg/kg) pela via oral foi capaz de inibir a nocicepção induzida pela injeção intratecal das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , com inibições de  $82 \pm 6$  e  $44 \pm 10\%$ , respectivamente (Fig.17).



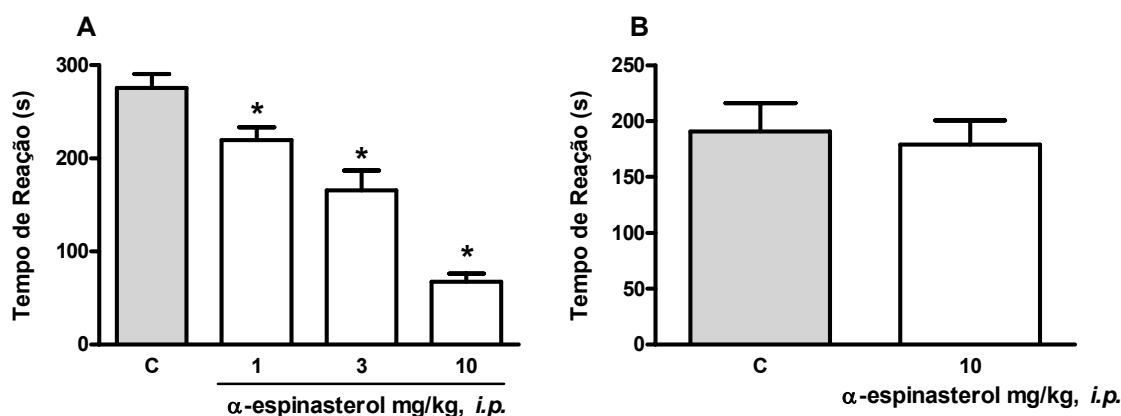
**Figura 17:** Efeito da fração hexânica (FH) administrada por via oral, na nocicepção induzida pela injeção intratecal de citocinas pró-inflamatórias (A: TNF- $\alpha$  e B: IL-1 $\beta$ ). Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão das médias (n= 8 a 10). A comparação entre os grupos foi realizada através do teste do teste  $t$  de Student. Diferente do grupo controle para \*  $p < 0,05$ .

Já a administração intraperitoneal do ácido oleanólico (0,3 a 10 mg/kg) inibiu a nocicepção induzida pela injeção intratecal de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  com DI<sub>50</sub> de 2,2 (1,2 - 3,8) e 1,8 (1,2 - 2,7) mg/kg e inibições de 93  $\pm$  5 e 90  $\pm$  5%, respectivamente (Fig.18 A e B).



**Figura 18:** Efeito do ácido oleanólico administrado pela via *i.p.*, na nocicepção induzida pela injeção intratecal de citocinas pró-inflamatórias (A: TNF- $\alpha$  e B: IL-1 $\beta$ ). Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão das médias (n= 8 a 10). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman Keuls. Diferente do grupo controle para \*  $p < 0,05$ .

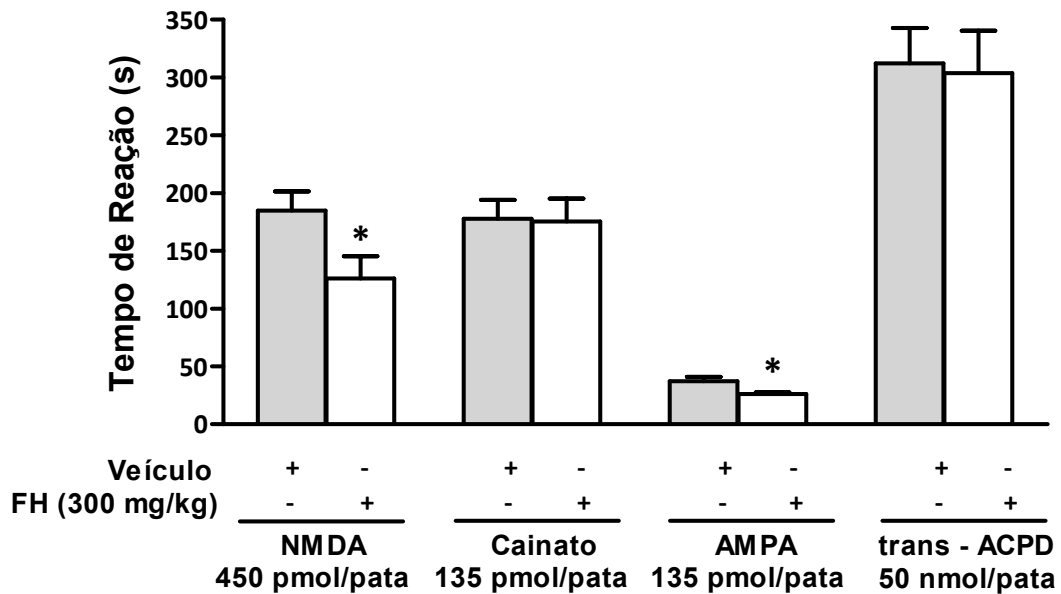
O  $\alpha$ -espinasterol (0,3 a 10 mg/kg) administrado pela via intraperitoneal também foi capaz de inibir a nocicepção induzida pela injeção intratecal de TNF- $\alpha$  com DI<sub>50</sub> de 3,9 (2,9 - 5,4) mg/kg e inibição de 76  $\pm$  3%. Porém, não inibiu a nocicepção induzida pela injeção intratecal de IL-1 $\beta$  (Fig. 19 A e B).



**Figura 19:** Efeito do  $\alpha$ -espinaesterol administrado pela via *i.p.*, na nocicepção induzida pela injeção intratecal de citocinas pró-inflamatórias (A: TNF- $\alpha$  e B: IL-1 $\beta$ ). Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão das médias ( $n= 8$  a  $10$ ). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman Keuls. Diferente do grupo controle para \*  $p < 0,05$ . Para comparação entre 2 grupos (gráfico B) foi utilizado o teste *t* de Student.

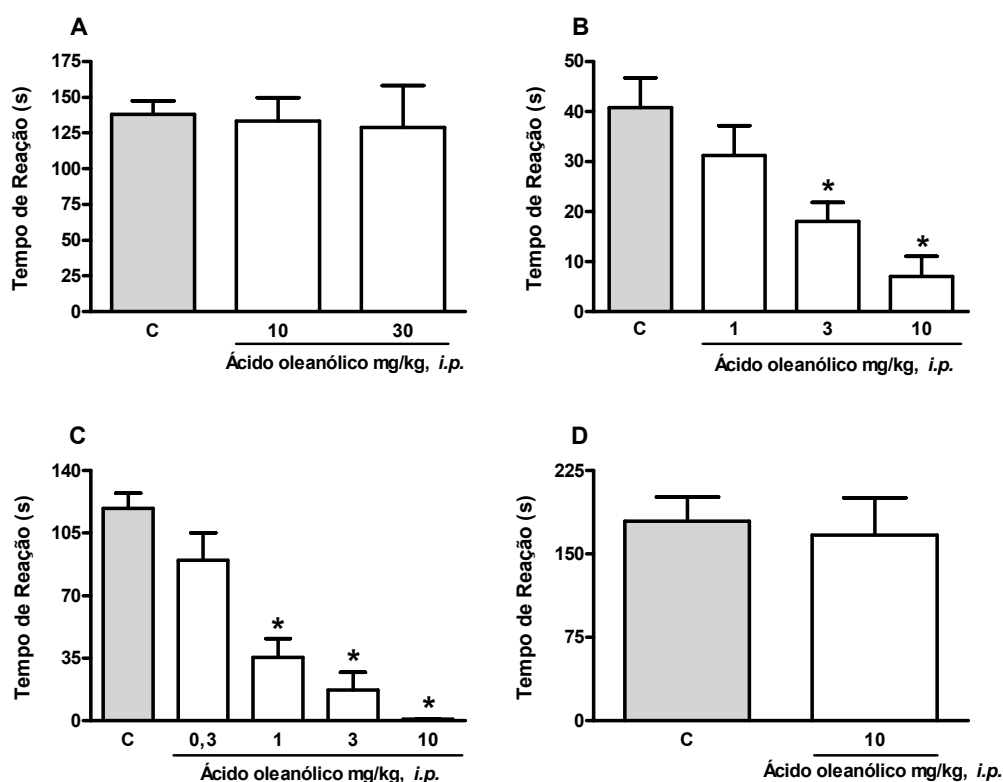
### 5.11 Efeito da FH, do ácido oleanólico e do $\alpha$ -espinaesterol sobre a nocicepção causada pela injeção intratecal de aminoácidos excitatórios (AAE) em camundongos

A FH (300 mg/kg), administrada oralmente, foi capaz de inibir parcialmente a nocicepção induzida pela injeção intratecal dos agonistas de receptores ionotrópicos glutamatérgicos NMDA e AMPA em  $32 \pm 10$  e  $30 \pm 4\%$ , respectivamente. No entanto, o mesmo tratamento com a FH não foi capaz de inibir a nocicepção induzida pela injeção intratecal de cainato (agonista de receptor ionotrópico glutamatérgico) e trans-ACPD (agonista de receptor metabotrópico glutamatérgico) (Fig. 20).



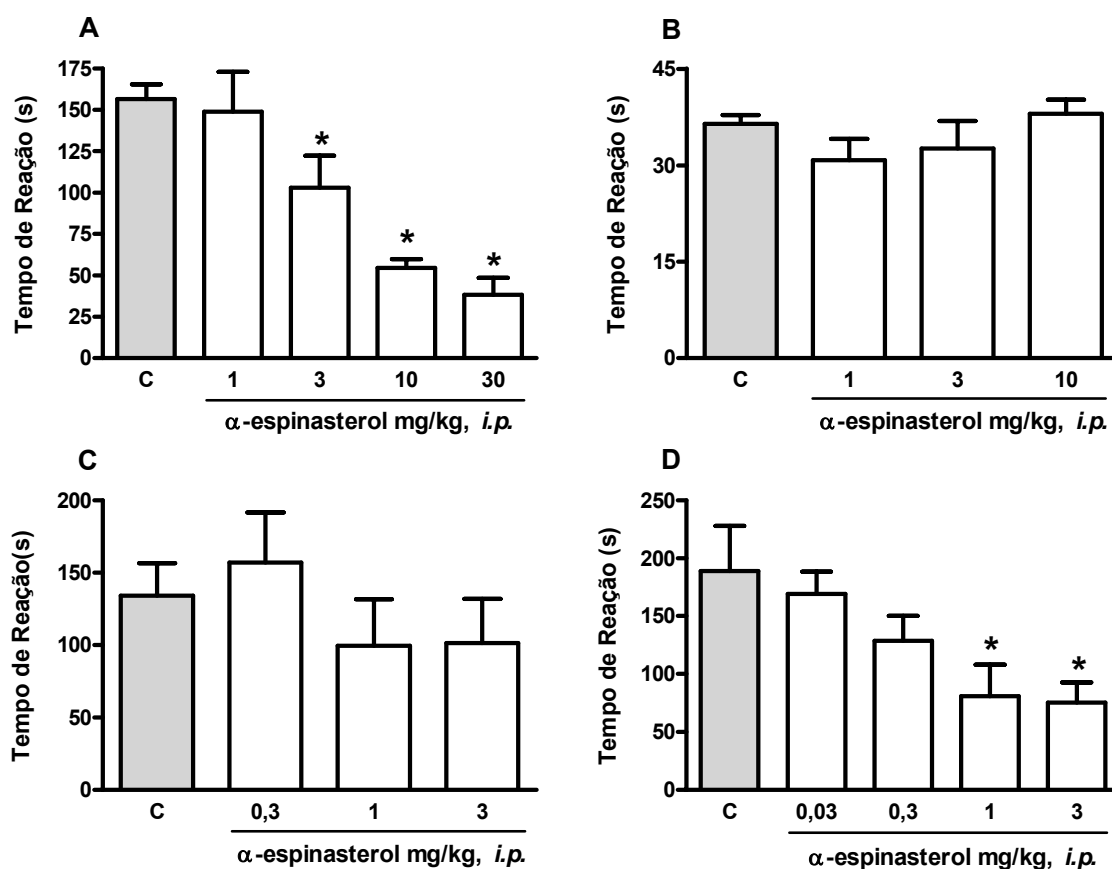
**Figura 20:** Efeito da fração hexânica (FH) administrada por via oral, na nocicepção induzida pela injeção intratecal de AAE (NMDA, cainato, AMPA e trans-ACPD). Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão das médias ( $n= 8$  a  $10$ ). A comparação entre os grupos foi realizada através do teste  $t$  de Student. Diferente do grupo controle para \*  $p < 0,05$ .

Os dados apresentados na Figura 21 (A - D) demonstram que a administração intraperitoneal do ácido oleanólico (0,3 a 10 mg/kg) foi capaz de inibir de forma dependente da dose a nocicepção induzida pela injeção intratecal de AMPA e cainato, com  $DI_{50}$  de 2,5 (1,4 - 4,5) e 0,6 (0,4 - 0,9) mg/kg e inibições de  $83 \pm 10$  e  $99 \pm 1\%$ , respectivamente. No entanto, o mesmo tratamento dos animais com o ácido oleanólico (0,3 a 10 mg/kg) não foi capaz de inibir a nocicepção induzida pela injeção intratecal de NMDA e trans-ACPD.



**Figura 21:** Efeito do ácido oleanólico administrado por via *i.p.*, na nocicepção induzida pela injeção intratecal de AAE (A: NMDA, B: AMPA, C: cainato e D: trans-ACPD). Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão das médias ( $n=8$  a  $10$ ). A comparação entre os grupos foi realizada através do teste de Newman Keuls. Diferente do grupo controle para \*  $p < 0,05$ . Para comparação entre 2 grupos (gráfico D) foi utilizado o teste *t* de Student.

Já o  $\alpha$ -espinasterol (0,3 a 10 mg/kg), administrado intraperitonealmente, foi capaz de inibir a nocicepção induzida pela injeção intratecal de NMDA e trans-ACPD, com  $DI_{50}$  de 6,6 (3,7 - 11,8) e 1,5 (0,5 - 3,9) mg/kg e inibições de  $76 \pm 7$  e  $60 \pm 9\%$ , respectivamente. Porém, o mesmo tratamento dos animais com o  $\alpha$ -espinasterol (0,3 a 10 mg/kg) não inibiu a nocicepção induzida pela injeção intratecal de cainato e AMPA (Fig. 22 A - D).

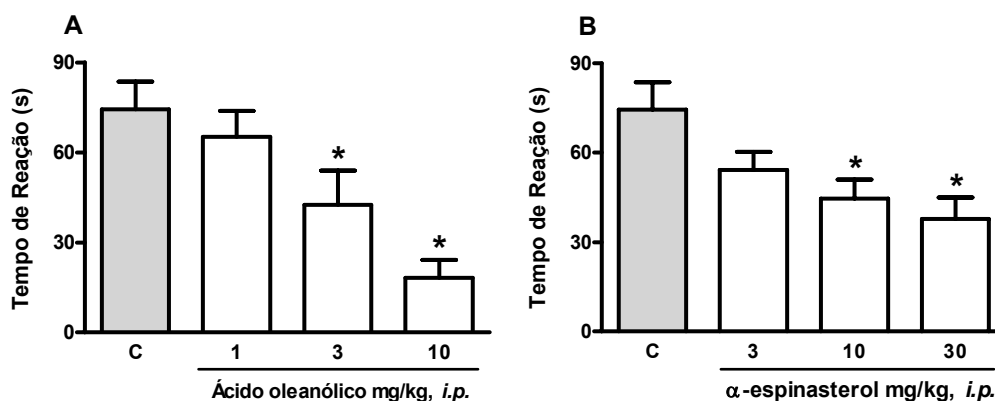


**Figura 22:** Efeito do  $\alpha$ -espinaesterol administrado por via *i.p.*, na nociceção induzida pela injeção intratecal de AAE (A: NMDA, B: AMPA, C: cainato e D: trans-ACPD). Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão das médias (n= 8 a 10). A comparação entre os grupos foi realizada através do teste de Newman Keuls. Diferente do grupo controle para \*  $p < 0,05$ .

### 5.12 Efeito do ácido oleanólico e do $\alpha$ -espinaesterol sobre a nociceção causada pela injeção intratecal de substância P (SP) em camundongos

Os dados apresentados na Figura 23 (A e B) demonstram que o tratamento dos animais com o ácido oleanólico (1 a 10 mg/kg) ou com o  $\alpha$ -espinaesterol (3 a 30 mg/kg), administrado pela via intraperitoneal, foi capaz de reduzir significativamente a nociceção causada pela injeção intratecal de SP. As  $DI_{50}$ s calculadas para o

ácido oleanólico e  $\alpha$ -espinasterol foram  $3,9 (2,2 - 7,0)$  e  $\sim 30$  mg/kg e inibições de  $76 \pm 8$  e  $49 \pm 10\%$ , respectivamente.

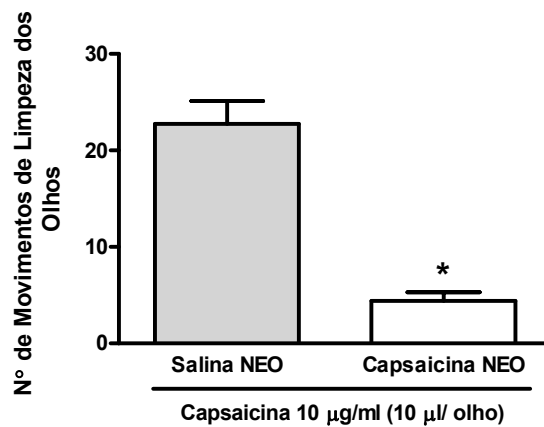


**Figura 23:** Efeito do ácido oleanólico (A) e do  $\alpha$ -espinasterol (B) administrados por via *i.p.*, na nocicepção induzida pela injeção intratecal de SP. Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão das médias ( $n= 8$  a  $10$ ). A comparação entre os grupos foi realizada através do teste de Newman Keuls. Diferente do grupo controle para \*  $p < 0,05$ .

### 5.13 Avaliação da participação das fibras sensíveis à capsaicina no efeito antinociceptivo do ácido oleanólico e do $\alpha$ -espinasterol na nocicepção induzida por glutamato em camundongos

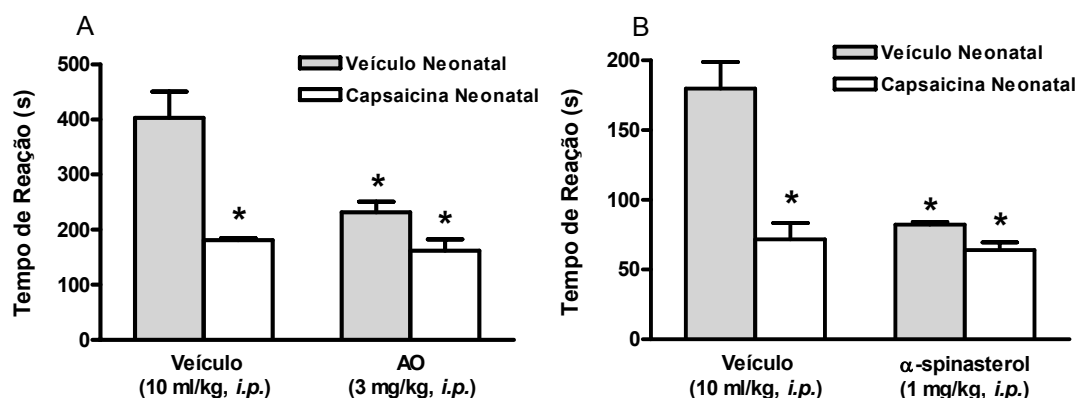
O tratamento neonatal dos animais com capsaicina ( $50$  mg/kg, *s.c.*), foi capaz de produzir uma degeneração da maior parte das fibras sensoriais (C e  $A\delta$ ). O sucesso do tratamento neonatal com capsaicina foi confirmado através da redução das respostas oculares ( $81 \pm 4\%$ ) relacionadas à aplicação tópica de  $10$   $\mu$ l de solução de capsaicina ( $10$   $\mu$ g/ml) (Fig. 24).





**Figura 24:** Avaliação da degeneração das fibras sensoriais (C e A $\delta$ ), através da redução das respostas oculares relacionadas à aplicação tópica de 10 $\mu$ l de solução de capsaicina (10 mg/ml). Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão das médias (n= 8 a 10). A comparação entre os grupos foi realizada através do teste *t* de Student. Diferente do grupo controle para \* p < 0,05.

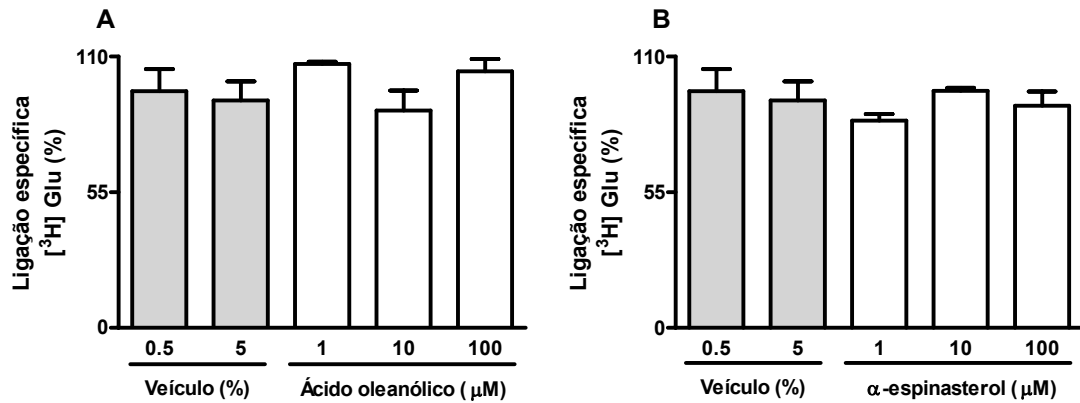
Além disso, o tratamento neonatal com capsaicina foi capaz de reduzir de forma significativa a nocicepção causada pelo glutamato quando comparado com os animais tratados com veículo (grupo controle). A administração de ácido oleanólico (3 mg/kg, *i.p.*) e  $\alpha$ -espinasterol (1 mg/kg, *i.p.*) reduziu a nocicepção causada pelo glutamato, em animais controle (que receberam salina no período neonatal) com inibições de 55  $\pm$  1 e 60  $\pm$  6%, respectivamente. Porém, em animais com as fibras degeneradas pela capsaicina, o ácido oleanólico e  $\alpha$ -espinasterol causaram inibições parciais de 10  $\pm$  7 e 11  $\pm$  8% da nocicepção induzida pelo glutamato, respectivamente, sugerindo que seu efeito depende da integridade das fibras sensíveis a capsaicina (Fig. 25 A e B).



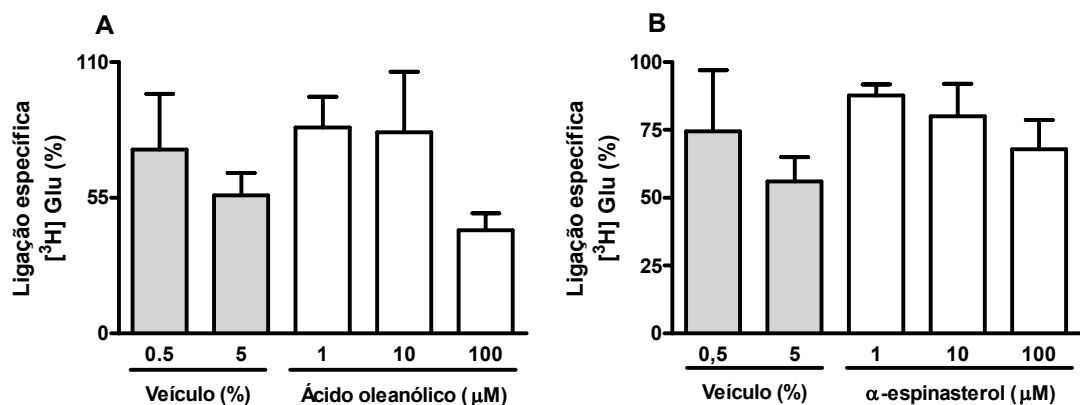
**Figura 25:** Influência do pré-tratamento neonatal com capsaicina (50 mg/kg, s.c.), sobre o efeito antinociceptivo do ácido oleanólico (A) e do  $\alpha$ -espinasterol (B) no modelo de nociceção induzida por glutamato. Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão das médias (n= 8 a 10). A comparação entre os grupos foi realizada através do teste de Newman Keuls. Diferente do grupo controle para \*  $p < 0,05$ .

#### 5.14 Efeito do ácido oleanólico e do $\alpha$ -espinasterol sobre a união específica (binding) de [ $^3$ H]-L -glutamato em membranas de cérebro de camundongos

Os dados apresentados nas Figuras 26 e 27 demonstram que o ácido oleanólico e o  $\alpha$ -espinasterol (1 - 100  $\mu$ M) não foram capazes de alterar a união específica (binding) do [ $^3$ H]-L-glutamato em membranas de cérebro de camundongo, incubadas em meio contendo  $\text{Na}^+$  (Fig. 26 A e B) ou sem  $\text{Na}^+$  (Fig. 27 A e B), quando comparados aos seus respectivos controles (veículo DMSO 0,5 e 5%).



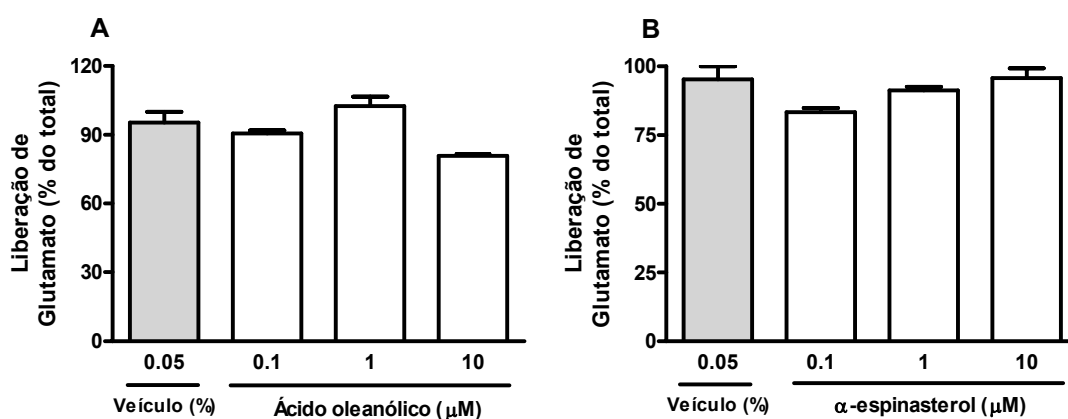
**Figura 26:** Efeito do ácido oleanólico (A) e  $\alpha$ -espinaesterol (B) sobre a união específica (binding) de [<sup>3</sup>H]-L-glutamato (na presença de Na<sup>+</sup>) em membranas de cérebro de camundongos. Cada barra representa a média de 3 a 4 experimentos independentes realizados em triplicata, e as linhas verticais representam o erro padrão das médias. A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA).



**Figura 27:** Efeito do ácido oleanólico (A) e  $\alpha$ -espinaesterol (B) sobre a união específica (binding) de [<sup>3</sup>H]-L-glutamato (na ausência de Na<sup>+</sup>) em membranas de cérebro de camundongos. Cada barra representa a média de 3 a 4 experimentos independentes realizados em triplicata, e as linhas verticais representam o erro padrão das médias. A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA).

### 5.15 Efeito do ácido oleanólico e do $\alpha$ -espinasterol sobre a liberação de [ $^3\text{H}$ ]-L - glutamato em preparações de cérebros de camundongos

O ácido oleanólico e  $\alpha$ -espinasterol (0,1 - 10  $\mu\text{M}$ ) não alteraram a liberação de [ $^3\text{H}$ ]-L-glutamato em sinaptossomas obtidos de cérebro de camundongos (Fig. 28 A e B).



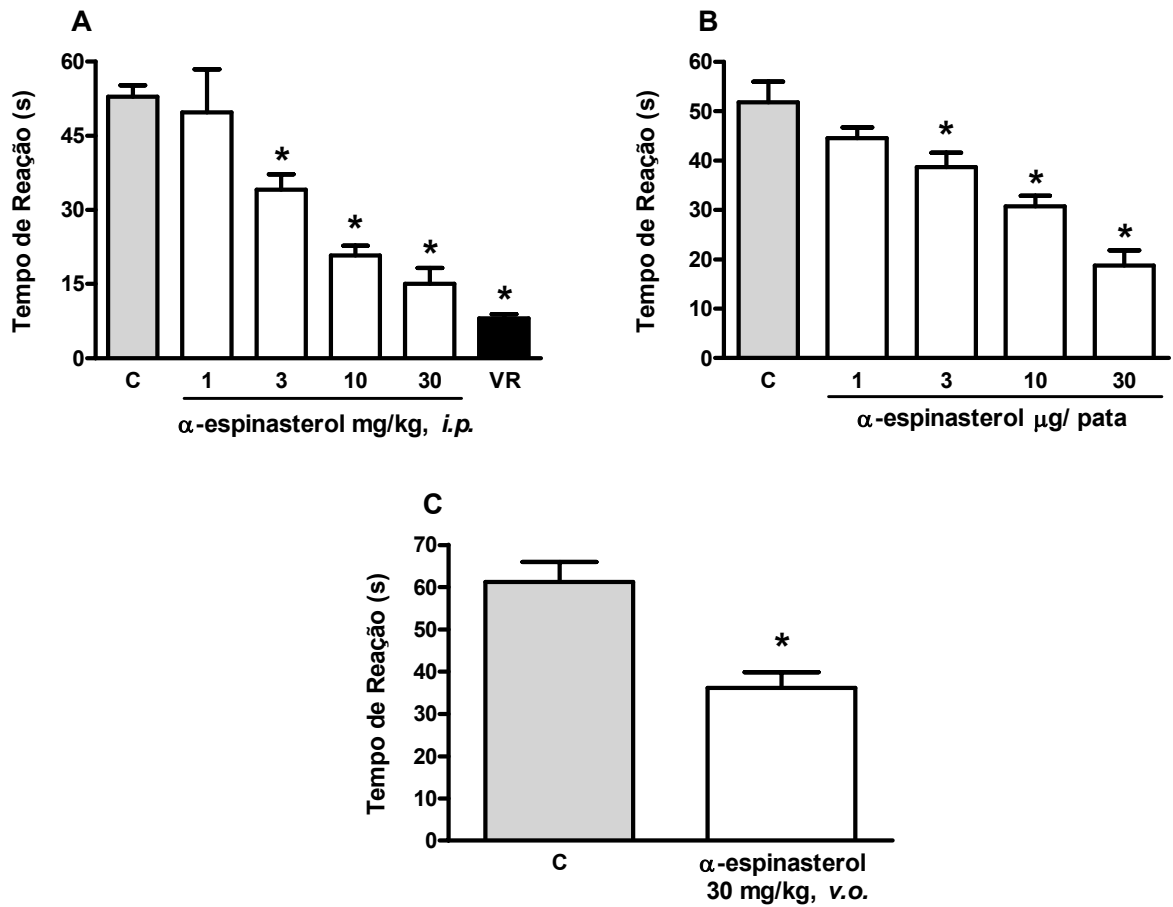
**Figura 28:** Efeito do ácido oleanólico (A) e  $\alpha$ -espinasterol (B) sobre a liberação de [ $^3\text{H}$ ]-L - glutamato em sinaptossomas obtidos de cérebros de camundongos. Cada barra representa a média de 3 experimentos independentes realizados em triplicata e as linhas verticais representam o erro padrão das médias. A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA).

### **5.16 Efeito do $\alpha$ -espinasterol sobre a nociceção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos**

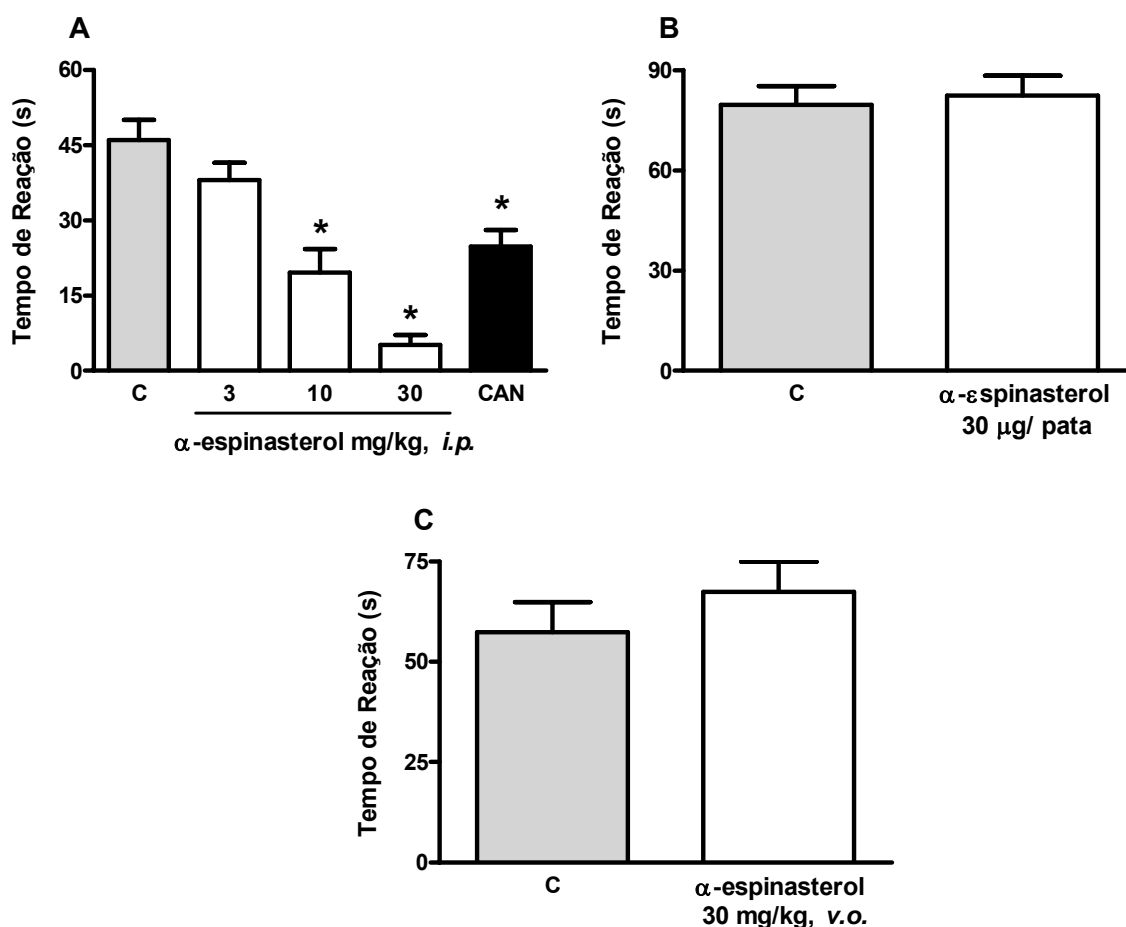
Os dados apresentados na Figura 29 A demonstram que o  $\alpha$ -espinasterol (1 - 30 mg/kg), administrado intraperitonealmente, foi capaz de reduzir a nociceção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina, com  $DI_{50}$  de 7,2 (3,9 - 13,2) mg/kg e inibição de  $72 \pm 6\%$ . Além disso, o tratamento dos animais com o vermelho de rutênio (3 mg/kg, *i.p.*), antagonista não seletivo para receptores TRP, utilizado como controle positivo também inibiu a resposta nociceptiva causada pela capsaicina em  $85 \pm 2\%$ . Já o  $\alpha$ -espinasterol (1 - 30  $\mu$ g/pata), administrado em associação com a capsaicina, também reduziu de forma dependente da dose a resposta nociceptiva induzida pela capsaicina, com  $DI_{50}$  de 15,0 (10,4 - 21,6)  $\mu$ g/pata e inibição de  $64 \pm 6\%$  (Fig. 29 B). O  $\alpha$ -espinasterol, administrado pela via oral, na maior dose utilizada pela via intraperitoneal (30 mg/kg), também foi capaz de inibir em  $41 \pm 6\%$  a resposta nociceptiva induzida pela capsaicina (Fig. 29 C).

### **5.17 Efeito do $\alpha$ -espinasterol sobre a nociceção induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído em camundongos**

O  $\alpha$ -espinasterol (3 - 30 mg/kg), administrado via intraperitoneal, reduziu a resposta nociceptiva induzida pelo cinamaldeído com  $DI_{50}$  de 8,2 (5,7 - 11,9) mg/kg e inibição de  $89 \pm 4\%$ . A cânfora (50  $\mu$ mol/kg, *s.c.*), antagonista de receptores TRPA1, utilizada como controle positivo causou  $46 \pm 7\%$  de inibição da resposta nociceptiva induzida pelo cinamaldeído (Fig. 30 A). Já o  $\alpha$ -espinasterol (30  $\mu$ g/pata), administrado em associação com o cinamaldeído, não foi capaz de alterar a resposta nociceptiva causada pelo cinamaldeído (Fig. 30 B). Da mesma forma, a administração do  $\alpha$ -espinasterol pela via oral, na maior dose utilizada pela via intraperitoneal (30 mg/kg), também não alterou a resposta nociceptiva promovida pela injeção de cinamaldeído (Fig. 30 C).



**Figura 29:** Efeito do  $\alpha$ -espinaesterol administrado pela via *i.p.* (A), co-administrado com a capsaicina na pata (B) e administrado pela via oral (C) na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina. Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão das médias ( $n= 8$  a  $10$ ). O grupo controle positivo está representado pelo tratamento com vermelho de rutênio (VR: 3 mg/kg, *i.p.*). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman Keuls. Para o grupo tratado pela via oral, a comparação entre os grupos foi realizada através do teste *t* de Student. Diferente do grupo controle para \*  $p < 0,05$ .

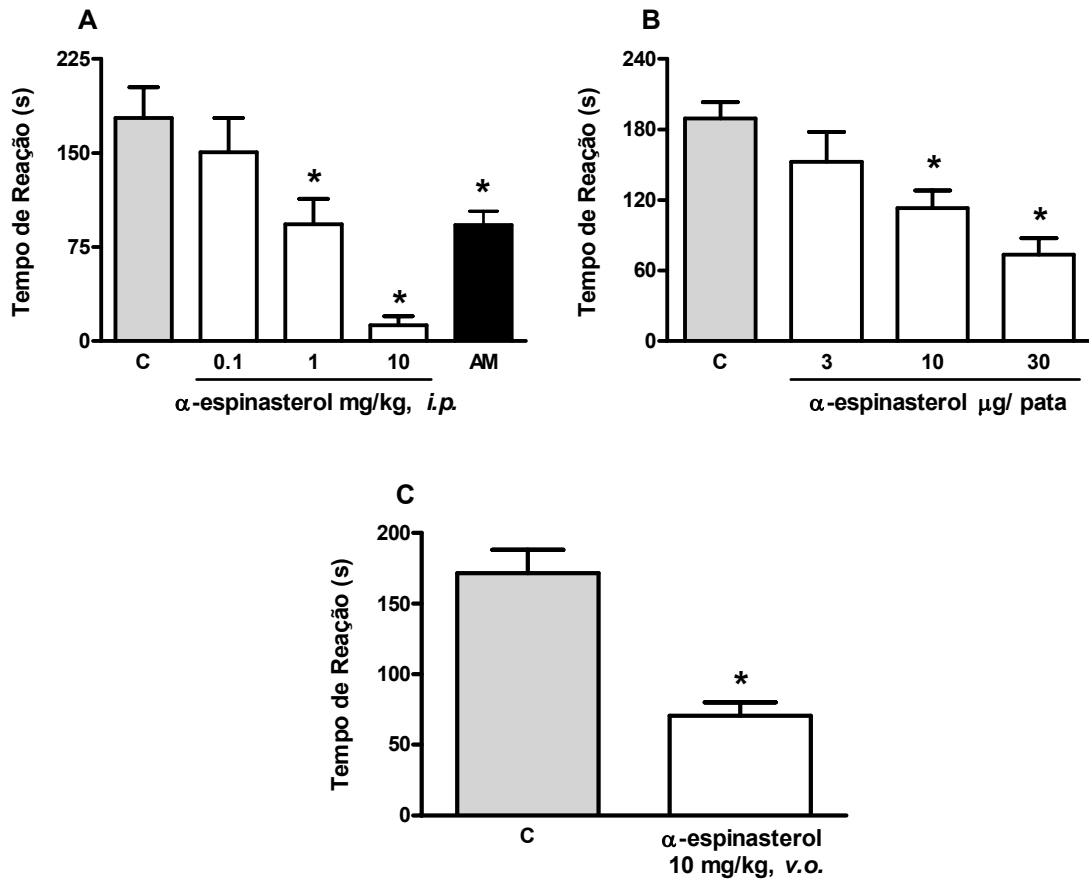


**Figura 30:** Efeito do  $\alpha$ -espinaesterol administrado pela via *i.p.* (A), co-administrado com o cinamaldeído na pata (B) e administrado pela via oral (C) na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído. Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão das médias (n= 8 a 10). O grupo controle positivo está representado pelo tratamento com cânfora (CAN: 50  $\mu$ mol/kg, *s.c.*). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman Keuls. Para os grupos co-administrado e tratado pela via oral, a comparação entre os grupos foi realizada através do teste *t* de Student. Diferente do grupo controle para \*  $p < 0,05$ .

### 5.18 Efeito do $\alpha$ -espinasterol sobre a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de mentol em camundongos

O  $\alpha$ -espinasterol (0,1 - 10 mg/kg), administrado pela via intraperitoneal, reduziu de maneira dependente da dose a nocicepção causada pela injeção intraplantar de mentol, com  $DI_{50}$  de 0,9 (0,4 - 2,4) mg/kg e inibição de  $93 \pm 4\%$ . A amilorida (10 mg/kg, *i.p.*), inibidor de canais de  $Na^+$  e antagonista de receptores TRPA1, utilizado como controle positivo, causou  $48 \pm 6\%$  de inibição da resposta nociceptiva induzida pelo mentol (Fig. 31 A). Da mesma forma, o  $\alpha$ -espinasterol (3 – 30  $\mu$ g/pata), administrado em associação com o mentol, reduziu a resposta nociceptiva causada pelo mentol com  $DI_{50}$  de 16,9 (8,2 - 34,8)  $\mu$ g/pata e inibição de  $61 \pm 8\%$  (Fig. 31 B). O  $\alpha$ -espinasterol, administrado pela via oral, na maior dose utilizada via intraperitoneal (10 mg/kg), também foi capaz de inibir em  $59 \pm 5\%$  a nocicepção induzida pelo mentol (Fig. 31 C).

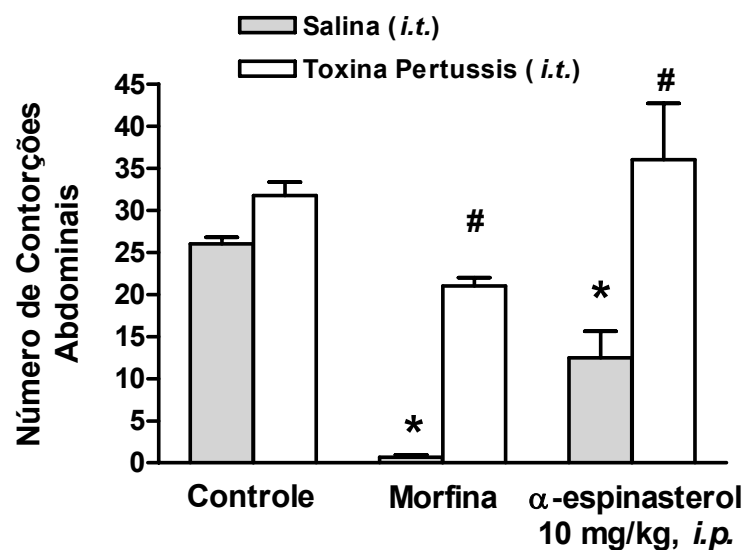




**Figura 31:** Efeito do  $\alpha$ -espinaesterol administrado pela via *i.p.* (A), co-administrado com o mentol na pata (B) e administrado pela via oral (C) na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de mentol. Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão das médias ( $n = 8$  a  $10$ ). O grupo controle positivo está representado pelo tratamento com amilorida (AM:  $10$  mg/kg, *i.p.*). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman Keuls. Para o grupo tratado pela via oral, a comparação entre os grupos foi realizada através do teste *t* de Student. Diferente do grupo controle para \*  $p < 0,05$ .

### 5.19 Envolvimento da proteína $G_{i/o}$ sensível à toxina pertussis

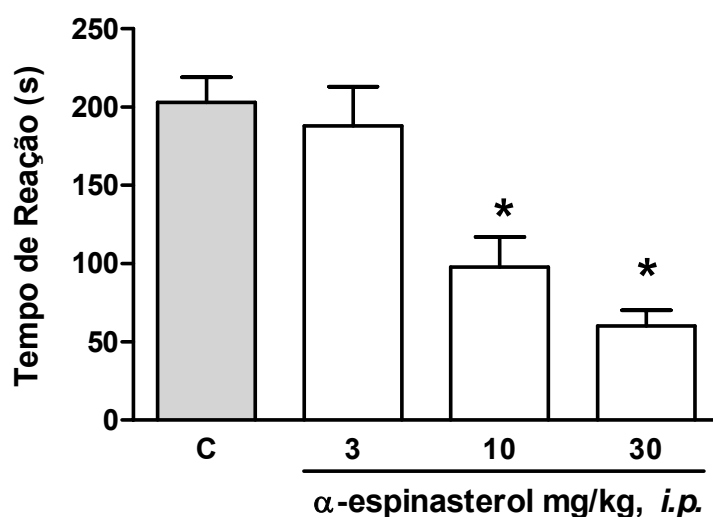
O pré-tratamento dos animais com toxina pertussis (1  $\mu\text{g}$ / *i.t.*, 7 dias antes do experimento), a qual é capaz de produzir a inativação da proteína  $G_{i/o}$ , não promoveu nenhuma alteração significativa na resposta nociceptiva induzida pelo ácido acético. Todavia, o mesmo tratamento com a toxina pertussis foi capaz de causar significativa reversão dos efeitos antinociceptivos causados pelo  $\alpha$ -espinasterol (10 mg/kg, *i.p.*) e pela morfina (2,5 mg/kg, *s.c.*, utilizada como controle positivo) no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (Fig. 32).



**Figura 32:** Influência do pré-tratamento com toxina Pertussis sobre o efeito antinociceptivo do  $\alpha$ -espinasterol no modelo de nocicepção induzida pelo ácido acético. Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão das médias (n= 8 a 10). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman Keuls. Diferente dos grupos controle (veículo e toxina Pertussis) para \*  $p < 0,05$  e diferente dos grupos dos animais tratados apenas com morfina e  $\alpha$ -espinasterol para #  $p < 0,05$ .

## 5.20 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de PMA em camundongos

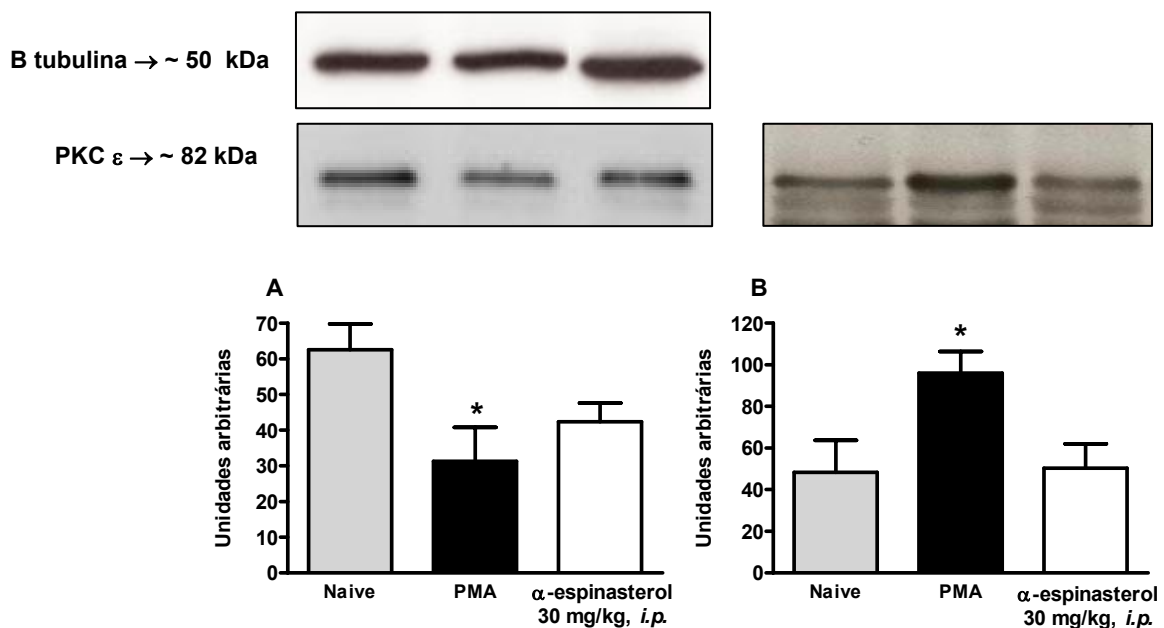
O resultado apresentado na Figura 33 mostra que a administração intraperitoneal de  $\alpha$ -espinasterol nas doses de 10 e 30 mg/kg, foi capaz de promover uma inibição dependente da dose da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de PMA, com  $DI_{50}$  de 13,3 (8.0 - 21.9) mg/kg com inibição de  $70 \pm 5\%$ .



**Figura 33:** Efeito do  $\alpha$ -espinasterol administrado pela via *i.p.*, na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de PMA. Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão das médias ( $n= 6$  a  $8$ ). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman Keuls. Diferente do grupo controle para \*  $p < 0,05$ .

## 5.21 Ensaios de Western Blot

Os dados apresentados na Figura 34 confirmam a participação da via da PKC sobre o efeito antinociceptivo do  $\alpha$ -espinasterol através de análises de Western blot. A injeção de PMA (500 pmol/pata) foi capaz de ativar a PKC $\epsilon$ , como indicado pela sua translocação do citosol para a membrana em tecidos que receberam PMA, a qual foi significativamente inibida pelo pré-tratamento dos animais com o  $\alpha$ -espinasterol (30 mg/kg, *i.p.*) (Fig. 34, A e B).



**Figura 34:** Análise de Western blot mostrando o efeito do  $\alpha$ -espinasterol na translocação da PKC $\epsilon$  do citosol (A) para a membrana (B) em resposta a injeção intraplantar de PMA. Os níveis de PKC $\epsilon$  citosólicos e da membrana foram determinados usando-se anticorpos específicos. O grupo Naive representa o grupo de animais que não foram manipulados. A comparação entre os grupos ( $n = 6$  a  $8$ ) foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman Keuls. Diferente do grupo controle para \*  $p < 0,05$ .

## 6 DISCUSSÃO

O mercado de produtos fitoterápicos continua crescendo no mundo inteiro. Entretanto, o aumento no número de medicamentos disponíveis à população não é proporcional à qualidade dos mesmos. Os parâmetros de controle de qualidade variam de espécie para espécie e podem ser encontrados nas monografias contidas nas farmacopéias. O que dificulta o trabalho é a ausência de padrões para muitas plantas e de monografias farmacopeicas (Farias, 2001).

O controle de qualidade de um produto envolve várias etapas que vão desde a obtenção da matéria-prima, passando por todo o processo de produção, culminando com a análise do produto final (Bacchi, 1996 e Farias, 2001). Segundo Farias (2001), a qualidade da matéria-prima não garante a eficácia do produto, mas é fator determinante da mesma.

O Brasil é o país de maior biodiversidade do mundo (Calixto, 2000), possui uma infinidade de plantas com fins medicinais e dentre elas está a *Baccharis illinita* DC, que apresenta importantes atividades farmacológicas, referidas popularmente e algumas delas já validadas cientificamente através de ensaios pré-clínicos. Assim, as indicações populares e os dados obtidos anteriormente por Arruda et al (1999) e Tada et al (2000) motivaram os estudos a cerca do potencial antinociceptivo da *B. illinita*.

No presente trabalho foi realizado um estudo fitoquímico que permitiu confirmar que a extração hidroalcoólica das partes aéreas da *B. illinita*, a qual fornece o extrato hidroalcoólico (HA), realmente é dotada de atividade antinociceptiva (analgésica) no teste de nocicepção visceral induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético (contorções abdominais).

A proposta inicial do trabalho foi realizar um bio-monitoramento para o isolamento de compostos. O monitoramento da constituição química vegetal é necessário para garantir a ação farmacológica e a qualidade no desenvolvimento de um produto, durante todo o processamento. Para isso, frequentemente se utiliza a

substância ou o grupo de substâncias responsáveis pela atividade farmacológica (Paula, 1997).

O estabelecimento e a manutenção da qualidade de produtos farmacêuticos de origem vegetal apresentam grandes problemas ligados à insuficiência de dados fitoquímicos sobre muitas matérias-primas vegetais, bem como o desconhecimento das substâncias responsáveis pelas atividades terapêuticas relatadas.

Para tanto, o HA foi particionado com solventes de polaridades bastante distintas, como o acetato de etila (maior polaridade) e o hexano (característica apolar). As frações obtidas (acetato de etila, FAE; hexânica, FH e aquosa, FAq) foram testadas no modelo experimental de contorções abdominais, da mesma forma que foi realizado com o HA. Assim, foi demonstrado que o HA, a FAq e a FH foram capazes de inibir o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, sendo que a FH foi cerca de 4,2 e 1,8 vezes mais potente que o HA e a FAq, respectivamente. A FAE não apresentou atividade no modelo experimental empregado.

Com a avaliação dos resultados obtidos anteriormente, procurou-se investigar através de processos de purificação e da análise farmacológica, os princípios ativos e os prováveis mecanismos de ação antinociceptiva da fração hexânica (FH), que se mostrou mais ativa. Dessa forma, foi realizado o estudo fitoquímico da FH através de um re-fracionamento em coluna cromatográfica de onde várias novas frações foram obtidas. Após um estudo do perfil cromatográfico (cromatografia de camada delgada) estas frações foram combinadas, recristalizadas e deram origem aos compostos baurenol,  $\alpha$ -espinasterol e ácido oleanólico.

Todos os compostos isolados da FH foram testados no modelo de nocicepção induzida pelo ácido acético e apresentaram atividade antinociceptiva, sendo mais potentes que a fração de origem. Assim, o baurenol,  $\alpha$ -espinasterol e ácido oleanólico foram cerca de 4, 3 e 1000 vezes, respectivamente, mais potentes que a FH, quando administrada pela via intraperitoneal.

O ácido oleanólico foi aproximadamente 230 e 300 vezes mais potente que o baurenol e que o  $\alpha$ -espinasterol, respectivamente. O principal dado desse estudo foi

a demonstração de que o ácido oleanólico, foi o composto mais potente e efetivo em inibir as contorções abdominais, sugerindo que o ácido oleanólico é um composto muito importante para a atividade da FH

Os dados obtidos e descritos até então, sugerem que o efeito antinociceptivo do extrato e das frações possa estar relacionado à inibição da produção de mediadores pró-inflamatórios induzidos pelo ácido acético. Isto porque o teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético é descrito como um modelo para avaliar a dor visceral de origem inflamatória, com pouca especificidade, mas boa sensibilidade, podendo ser considerado uma ferramenta para avaliação da atividade analgésica e antiinflamatória de novos produtos (Le Bars et al., 2001). Além disso, a presença do ácido acético na cavidade peritoneal provoca uma irritação local e desencadeia a liberação de vários mediadores como a bradicinina (BK), SP e prostaglandinas (PGs), bem como algumas citocinas como IL-1 $\beta$  (Ikeda et al, 2001).

Ribeiro et al. (2000) demonstraram que a resposta nociceptiva induzida pelo ácido acético ocorre devido a liberação de citocinas, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-8 de macrófagos residentes peritoneais e mastócitos. Recentemente, Feng et al. (2003) demonstrou que a injeção intraperitoneal de ácido acético induz um aumento da concentração de glutamato e aspartato no líquido cerebrospinal.

Para descartar a possibilidade de que a inibição do comportamento nociceptivo promovido pela FH poderia ocorrer através da redução da atividade locomotora, foi realizado o teste do campo aberto e observou-se que a administração da FH nas maiores doses utilizadas nos testes de nocicepção não foi capaz de comprometer o desempenho motor dos animais, descartando, assim, a hipótese de que a redução do número de contorções abdominais esteja relacionada a um prejuízo motor induzido pela administração da fração.

Além disso, o presente estudo sugere que o sistema opióide também não está envolvido na ação antinociceptiva da FH. Esta conclusão vem do fato de que o pré-tratamento dos animais com naloxona, um antagonista não seletivo de receptores opióides, administrado em uma dose que não altera o número de contorções

abdominais induzidas pelo ácido acético, inibe completamente o efeito antinociceptivo causado pela morfina, mas não interfere no efeito produzido pela FH.

Como o modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético é considerado um teste de baixa especificidade, a FH também foi testada em outros modelos de nocicepção aguda e crônica para a confirmação da atividade antinociceptiva.

Assim, o modelo de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina foi utilizado tendo em vista que ele é interessante porque apresenta duas fases: a fase neurogênica e a fase inflamatória. A nocicepção neurogênica é causada pela ativação direta dos terminais nervosos e a nocicepção inflamatória é mediada pela combinação da sensibilização periférica e da medula espinal (Tjølsen et al., 1992). Já está bem descrito que a injeção intraplantar de formalina em roedores produz um aumento da concentração de diferentes mediadores a nível espinal, como AEE, PGE<sub>2</sub>, óxido nítrico (NO), taquicinas e cininas assim como outros peptídeos (Santos et al., 1998; Tjølsen et al., 1992; Malmberg e Yaksh, 1995). Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a FH inibiu as 2 fases da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina, o que confirma que a FH realmente é dotada de atividade antinociceptiva e sugere que ela possa atuar modulando a transmissão nociceptiva através da alteração dos mediadores citados acima.

A dor aguda, como as dos modelos utilizados até o momento, tem função biológica de preservação, de integridade e defesa, pois denota uma lesão ou iminência de lesão tecidual. Por outro lado, a dor crônica é uma das principais causas de incapacidade e afastamento do trabalho, perda de funcionalidade e da qualidade de vida. Apesar dos avanços nas diversas áreas de conhecimentos relacionadas à dor, como epidemiologia, fisiopatologia e terapêutica, os resultados dos tratamentos como prevenção das recorrências ainda não são satisfatórios (Yeng e Teixeira, 2004). Sabe-se que a dor crônica é causada por múltiplos fatores, incluindo a lesão de nervos. Dentro desse contexto, torna-se relevante o estudo da FH em um modelo experimental de dor crônica, como a constrição parcial no nervo ciático.



Dessa forma, foi analisado o possível efeito antinociceptivo da FH na dor neuropática (constricção parcial do nervo ciático), tendo em vista que ela envolve tanto os mediadores químicos que participam da nocicepção neurogênica quanto da inflamatória. De fato, os nossos resultados mostram que a FH administrada uma vez ao dia, durante 7 dias, reduziu significativamente a alodínia e a hiperalgesia mecânica induzida pela constricção parcial do nervo ciático. Este efeito foi evidente durante todo o tratamento. Contudo, quando o tratamento foi interrompido por 3 dias, a alodínia e hiperalgesia mecânica foram restabelecidas. Após esse intervalo, o tratamento dos animais com a FH foi reiniciado e observou-se que o mesmo foi capaz de reduzir a alodínia e a hiperalgesia mecânica semelhante ao tratamento agudo, indicando que a FH parece não apresentar efeito cumulativo nem induzir tolerância.

As sensações de dor estão normalmente relacionadas à ativação de neurônios aferentes primários não mielinizados (fibras C) ou pouco mielinizados (fibras A), que são normalmente silenciosos na ausência de estimulação, e respondem melhor aos estímulos que são potencialmente nocivos. Entretanto, após a lesão no nervo periférico, estes neurônios tornam-se anormalmente sensíveis e desenvolvem atividade espontânea patológica (Baron, 2006). A atividade espontânea ectópica seguida pela lesão do nervo é produzida pelo aumento na expressão de RNAm para canais de sódio dependentes de voltagem em neurônios aferentes primários. De fato, após a lesão do nervo periférico, grupos de canais de sódio se acumulam não apenas no local da lesão do nervo, mas também dentro do gânglio da raiz dorsal próximo à lesão (Hains et al., 2004). Contudo, os dados obtidos no presente estudo não permitem avaliar a possível ação da FH sobre os canais de sódio operados por voltagem.

Da mesma forma, canais de cálcio voltagem dependente do tipo N, localizados pré-sinápticamente no terminal de nociceptores aferentes primários têm também um importante papel na sensibilização central, através da facilitação de liberação de glutamato e SP. Estes canais são super expressos depois da lesão do nervo periférico (Luo et al., 2001).

Após a lesão de um nervo, como realizado no presente estudo ou em processos patológicos dolorosos, a hiperalgesia, que é aumento da sensibilidade a dor, é muitas vezes observada.

A atividade da FH também foi avaliada na hiperalgesia térmica, mecânica e edema de pata induzidos por diferentes agentes hiperalgésicos. Como observado anteriormente, a injeção de ácido acético intraperitoneal e de formalina na pata provoca a liberação de muitos mediadores relacionados com a reação inflamatória, como citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , PGs, BK, que são responsáveis pelo processo de inflamação tecidual e pela sensibilização de nociceptores, que leva a hiperalgesia (Millan, 1999; Loeser e Treede, 2008). Já foi observado que a injeção de BK e PGE<sub>2</sub> na pata de ratos causa hiperalgesia, tanto em modelos térmicos quanto mecânicos (Lucena et al., 2007). A FH inibiu a formação de edema e reverteu a hiperalgesia mecânica e térmica induzida pela PGE<sub>2</sub> e BK. Alguns estudos sugerem que a hiperalgesia induzida pela PGE<sub>2</sub> poderia ser mediada pela modulação da corrente de canais iônicos e ativação direta de PKA (Portanova et al., 1996; Malmberg et al., 1997; Khasar et al., 1999a). Já a hiperalgesia mediada pela BK parece estar associada a sensibilização periférica através da ativação de PKC e receptores TRPV1, modulando a liberação de vários mediadores (Szallasi e Blumberg, 1993; Ferreira et al., 2004). A partir desses resultados, pode-se sugerir que um dos mecanismos pelo qual a FH possa promover a diminuição da sensação dolorosa, seja através da inibição da ativação dessas proteínas, já que dados da literatura mostram que a nocicepção promovida pela formalina e pelo ácido acético são sensíveis a inibidores ou a deleção gênica da PKA e/ou da PKC (Malmberg et al., 1997; Khasar et al., 1999b).

Até o momento, pode-se observar claramente que o fracionamento além de purificar o material vegetal, também aumentou a sua eficácia, em relação a atividade antinociceptiva. Além disso, foi demonstrado que a FH também teve atividade antinociceptiva em outros modelos experimentais tanto de dor aguda quanto de dor crônica.

Através do estudo fitoquímico foi possível isolar o baurenol e o  $\alpha$ -espinasterol da FH, os quais apresentaram um menor rendimento em relação ao ácido

oleanólico. Contudo, é importante mencionar que até o momento não foram encontrados dados na literatura quanto às atividades antinociceptiva e antiinflamatória do baurenol, provalmente devido ao seu baixo rendimento, assim sendo os estudos das potenciais atividades do baurenol devido a pouca quantidade do composto serão realizados futuramente. O ácido oleanólico, por apresentar um maior rendimento e também por ser mais potente e eficaz foi escolhido para a continuidade do estudo do mecanismo de ação. Mesmo com rendimento mais baixo, houve o interesse pelo andamento dos estudos com o  $\alpha$ -espinasterol, visto que Meotti et al. (2005) demonstraram a atividade antinociceptiva do  $\alpha$ -espinasterol isolado da *Polygala sabulosa* no modelo de contorções abdominais com resultados semelhantes aos obtidos no presente trabalho. Ribas et al. (2008) também obtiveram resultados significativos em relação a inibição da resposta nociceptiva induzida pela injeção intraplantar de glutamato, após tratamento com  $\alpha$ -espinasterol isolado de *P. sabulosa* (*i.p.*).

Como os modelos utilizados para a avaliação da atividade da FH envolvem a participação de AEE, citocinas como a IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , peptídeos como a SP, canais iônicos, proteínas quinases, entre outros, a próxima etapa desse trabalho foi avaliar se na atividade antinociceptiva promovida pela FH e pelo  $\alpha$ -espinasterol e ácido oleanólico estariam envolvidos os mediadores e canais acima descritos.

Para verificar a participação de AEE, foi utilizado o modelo de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato. Neste modelo a FH administrada pela via oral, o ácido oleanólico e o  $\alpha$ -espinasterol, quando administrados pela via *i.p.* apresentaram importante atividade antinociceptiva, reduzindo de forma significativa e dependente da dose a nocicepção provocada pelo glutamato. Os dois compostos, quando administrados pela via oral, em uma dose 10 vezes maior que a  $DI_{50}$  calculada para a via *i.p.*, também inibiram, em torno de 50%, a resposta nociceptiva do glutamato. Porém, quando foram co-administrados com o glutamato pela via intraplantar, o  $\alpha$ -espinasterol e o ácido oleanólico não foram capazes de alterar a resposta nociceptiva do glutamato, sugerindo que esses compostos não promovem seus efeitos quando administrados periféricamente.

Os aminoácidos excitatórios, como o glutamato, são encontrados primariamente em fibras sensoriais do tipo C e estão envolvidos na transmissão da informação nociceptiva da periferia até regiões supraespinhais (Beirith et al., 2002; Beirith et al., 2003). Os receptores para o glutamato (GluRs) são responsáveis por mediar a maior parte da neurotransmissão excitatória no SNC de mamíferos. GluRs estão divididos em duas classes principais, receptores ionotrópicos e metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos (iGluRs) incluem canais iônicos que são permeáveis a cátions e são subdivididos em três grupos: AMPA, kainato e NMDA (Ozawa et al., 1998). Os receptores metabotrópicos (mGluRs) são acoplados a proteína G e operam através da liberação de segundos mensageiros no citoplasma ou por alterar a atividade de canais iônicos através da interação das subunidades intracelulares da proteína G (Meldrum, 2000). Dessa forma, a inibição do comportamento nociceptivo pela FH e seus compostos sugere que a mesma possa interferir na transmissão da resposta nociceptiva através de vias glutamatérgicas.

Para verificar a participação dos diferentes receptores para o glutamato na atividade antinociceptiva da FH e dos compostos, foi realizado o modelo de nocicepção causada pela injeção intratecal de agonistas seletivos para os receptores de glutamato em camundongos. Para tanto, foi utilizado o NMDA (agonista seletivo de receptores ionotrópicos NMDA), o AMPA (agonista seletivo de receptores ionotrópicos AMPA), o kainato (agonista seletivo de receptores ionotrópicos kainato) e o trans-ACPD (agonista de receptores metabotrópicos de glutamato). A administração intratecal de AAE promove comportamentos nociceptivos espontâneos como mordidas e lambidas dos membros posteriores (contato do focinho do animal com o membro) e elevação de uma das patas traseiras (Osborne e Coderre, 2003). A avaliação do comportamento nociceptivo após injeção intratecal é um método empregado para estudar a transmissão nociceptiva em roedores. A injeção intratecal de agonistas glutamatérgicos, cininas e citocinas sensibiliza diretamente o neurônio na medula espinhal, e como consequência, o comportamento de dor é iniciado imediatamente após a injeção dos mediadores (Choi et al., 2003; Hylden and Wilcox, 1980).

Nesse modelo a FH quando administrada oralmente, inibiu a nocicepção causada pelo NMDA e AMPA, contudo, sem interferir na nocicepção promovida pelo

cainato e trans-ACPD. Cada composto apresentou um perfil diferente quando comparados com a FH e entre eles. O  $\alpha$ -espinasterol inibiu a nocicepção induzida pela injeção de NMDA e trans-ACPD; já o ácido oleanólico inibiu a nocicepção induzida pela injeção de AMPA e cainato.

Com os resultados obtidos pode-se sugerir que tanto a FH, quanto o  $\alpha$ -espinasterol e o ácido oleanólico possam atuar como antagonistas de receptores glutamatérgicos, sendo que a FH e o ácido oleanólico inibiram o comportamento nociceptivo promovido por agonistas de receptores ionotrópicos e o  $\alpha$ -espinasterol também inibiu o efeito promovido pelo agonista de receptores metabotrópicos, sugerindo que os compostos estejam atuando de forma diferenciada no sistema glutamatérgico. Provavelmente a quantidade desses compostos presentes na FH pode ser responsável pela diferença observada na atividade estudada.

De fato, drogas capazes de bloquear tanto a via dos receptores ionotrópicos como a via dos receptores metabotrópicos para o glutamato, exibem efeitos antinociceptivos em várias espécies animais, incluindo os seres humanos (Neugebauer, 2002).

O principal mecanismo pelo qual agonistas de receptores para o glutamato causam dor ou neurotoxicidade inclui liberação de  $Ca^{2+}$  intracelular, ativação de mediadores celulares e abertura de canais iônicos (Millan, 1999; Lipton and Rosenberg, 1994). Assim, os mecanismos moleculares envolvidos na sensibilização dos neurônios na medula espinhal incluem o aumento da produção de NO, atividade da PKC e influxo de  $Ca^{2+}$  (Ji and Strichartz, 2004; Liu et al., 1997). Dessa forma, a estimulação promovida pelo glutamato pode resultar em uma cadeia de ações com outros mediadores (como por exemplo: SP e citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), que atuam sinergicamente na excitação dos neurônios (Sakurada et al., 1996; Millan, 1999; Bernardino et al., 2005; Liu et al., 1997).

Nesse estudo também foi observada a inibição da nocicepção promovida pela injeção intratecal de SP após tratamento com  $\alpha$ -espinasterol e ácido oleanólico, sugerindo que o efeito antinociceptivo de ambos os compostos pode estar associado com a sinalização dependente da SP. A SP pertence ao grupo das neurocininas (NKs), pequenos peptídeos que estão altamente distribuídos no SNC e SNP. A SP

participa da transmissão da informação nociceptiva na medula espinhal, através da sua ligação com receptores do tipo NK1 (Mantyh, 2002). De fato, o comportamento indicativo de dor que pode ser observado após a administração espinhal da SP é potencializado pela co-administração de NMDA (Mjellem et al., 1992). Existem dados da literatura que mostram que receptores NMDA pré-sinápticos, localizados no terminal de fibras nociceptivas de pequeno diâmetro, facilitam e prolongam a transmissão de mensagens nociceptivas, através da liberação de SP e glutamato (Liu et al., 1997). Com base nesses dados, pode se especular que o  $\alpha$ -espinasterol, atuando em receptores NMDA da medula espinhal, poderia reduzir o comportamento nociceptivo induzido pela SP.

Para comprovar a hipótese de que a ação promovida pelos compostos  $\alpha$ -espinasterol e ácido oleanólico poderia envolver os receptores glutamatérgicos, foram realizados experimentos de união específica (“*binding*”) com [ $^3$ H]-L-glutamato. Porém, o  $\alpha$ -espinasterol e o ácido oleanólico não inibiram a união específica do [ $^3$ H]-L-glutamato, em meio contendo ou não  $\text{Na}^+$ , indicando que esses compostos não interagem com receptores de glutamato e nem com sítios de ligação em sistemas de transporte de glutamato, já que o experimento realizado em meio contendo  $\text{Na}^+$  identifica a ligação do composto com transportadores de glutamato.

Entretanto, a falta de efeito observado no experimento de união específica dependente de  $\text{Na}^+$ , não implica na falta de efeito dos compostos na liberação do aminoácido, mesmo porque, estudos de “*binding*” não abordam diretamente atividade funcional, mas identificam sítios específicos de ação. Nesse sentido, foram realizados experimentos de liberação de [ $^3$ H]-L-glutamato em sinaptossomas de cérebro de camundongos, mas também não foram observados efeitos inibitórios na liberação de glutamato induzida por KCl. Esses resultados descartam a possibilidade da ação direta dos compostos em receptores de glutamato e também sobre a liberação de glutamato do neurônio para a fenda sináptica. Entretanto, não se pode descartar a hipótese de que os compostos atuem inibindo algum ponto da cascata de sinalização glutamatérgica.

Também se pode sugerir que a FH e seus compostos podem atuar de forma indireta, na via glutamatérgica, já que os experimentos de ligação específica descartaram a hipótese da ação direta em receptores para o glutamato.

Alguns estudos evidenciam que aminoácidos excitatórios são liberados na medula espinhal ou na pata do animal em processos inflamatórios (Beirith et al., 2002). Citocinas como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  são muito importantes nos processos inflamatórios e participam da transmissão nociceptiva (Ikeda et al., 2001; Vanegas e Schaible, 2001). A administração intratecal dessas citocinas promove comportamento nociceptivo semelhante aos provocados pela administração intratecal de AAE. A administração da FH,  $\alpha$ -espinasterol e ácido oleanólico foi capaz de inibir a nocicepção induzida pela injeção intratecal das citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ .

Estudos mais recentes demonstram que a IL-1 $\beta$  modula a expressão do receptor AMPA em alguns neurônios do sistema nervoso central (Lai et al., 2006). Existem também algumas evidências de que existe uma interação recíproca entre receptores NMDA e de IL-1 $\beta$  (Hagan et al., 1996). Outros estudos mostram uma inter-relação dos receptores de TNF- $\alpha$  e receptores AMPA em desordens neuronais que envolvem o processo inflamatório (Choi, 1994). Dessa forma, se a produção de citocinas como a IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$  for inibida, podem ser observadas alterações na via glutamatérgica. Dentro deste contexto, pode-se sugerir ainda, que a FH, o  $\alpha$ -espinasterol e o ácido oleanólico possam inibir, de alguma forma, a produção de citocinas pró-inflamatórias e assim, interferir com a nocicepção induzida pelo glutamato.

Além da possível participação das citocinas pró-inflamatórias na modulação de alguns receptores glutamatérgicos no SNC (Lai et al., 2006; Hagan et al., 1996; Choi, 1994), que poderiam afetar de forma inibitória a via glutamatérgica, Meotti et al. (2007) demonstraram que o comportamento nociceptivo induzido pela injeção de IL-1  $\beta$  and TNF-  $\alpha$  também está associado com a fosforilação da p38 MAP quinase (p38MAPK). Durante o processo nociceptivo e inflamatório, IL-1  $\beta$  and TNF-  $\alpha$  ativam p38MAPK. A fosforilação dessa proteína gera uma resposta positiva na dor e na inflamação porque ativa fatores transcripcionais que regulam o gene responsável pela transcrição de citocinas pró-inflamatórias (Ji e Strichartz, 2004; Kaminska, 2005; Ji e Woolf, 2001; Widmann et al., 1999).

Dessa forma, inibidores da p38MAPK diminuem a dor e inflamação neuropática, por reduzirem a síntese dessas citocinas (Ji and Strichartz, 2004; Kaminska, 2005; Inoue et al., 2004). A fosforilação de p38MAPK aumenta as respostas nociceptivas e inflamatórias também em níveis pós-transcricionais, através da fosforilação de receptores, canais iônicos, proteínas quinases e aumento da atividade de fosfolipases (Ji and Strichartz, 2004; Ji and Woolf, 2001). Conseqüentemente, a fosforilação da p38MAPK pode modificar a excitabilidade da membrana e contribuir para a transmissão da dor. Dentro deste contexto, sugere-se que a FH e os compostos possam inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias e/ou a fosforilação de quinases e assim, interferir com a nocicepção induzida pelo glutamato.

Já há algum tempo tem sido demonstrado que a percepção e condução do sinal nociceptivo até o corno da medula espinhal, como já visto, é função das fibras aferentes primárias, principalmente as do tipo C e A (Hunt and Mantyh 2001; Julius and Basbaum 2001). Neste sentido, nossos resultados mostram que o tratamento neonatal dos animais com capsaicina, em dose conhecida por produzir a degeneração da maioria destas fibras, inibiu significativamente a nocicepção induzida pelo glutamato. No entanto, o mesmo tratamento dos animais com capsaicina foi capaz de modificar a antinocicepção causada pelo  $\alpha$ -espinasterol e ácido oleanólico. Com isso, podemos sugerir que as fibras sensoriais do tipo C e A $\delta$  sensíveis a capsaicina, parecem estar envolvidas na antinocicepção causada pelos compostos.

Após verificar que as fibras sensoriais do tipo C e A $\delta$  sensíveis a capsaicina tem importância na atividade antinociceptiva promovida pelos 2 compostos, o próximo passo foi avaliar a atividade do  $\alpha$ -espinasterol sobre receptores que estão expressos nessas fibras e também são importantes na condução dos estímulos nociceptivos relacionados com frio e calor, os receptores TRP.

Os membros da família de receptores de potencial transitório (TRP) estão envolvidos em vários processos fisiológicos e patológicos (Bautista et al., 2006). O receptor vanilóide (TRPV1) é expresso principalmente em neurônios sensoriais periféricos (fibras C e A $\delta$ ) e é ativado por diferentes estímulos dolorosos, incluindo



prótons, calor, alguns mediadores lipídicos e compostos vanilóides como a capsaicina, princípio pungente da pimenta vermelha (Caterina et al., 1997; Tominaga et al., 1998, Zygmund et al., 1999; Hwang et al., 2000). O TRPV1 está envolvido na nocicepção, contribuindo tanto na integração como na detecção de estímulos químicos e térmicos (Caterina et al., 2000). O receptor TRPA1 foi caracterizado como um termoreceptor de frio nocivo (Story et al., 2003). É seletivamente expresso em fibras sensoriais peptidérgicas que também expressam TRPV1, o que explica seu possível papel no processo nociceptivo (Bautista et al., 2005; Story et al., 2003). Recentemente, Freitas et al. (dados ainda não publicados) mostraram que a ativação dos receptores TRPM8, através da injeção intraplantar de mentol, promove dor espontânea em camundongos.

Os experimentos que avaliam a participação dos receptores TRP foram realizados apenas com o  $\alpha$ -espinasterol, visto que existem diversos trabalhos publicados que referenciam as atividades antinociceptiva e antiinflamatória do ácido oleanólico. Dentre eles podemos citar os estudos de Maia et al. (2006a) onde foi demonstrado a inibição da nocicepção visceral induzida pelo óleo de mostarda (agonista TRPA1) com a sugestão da participação do sistema opióide. Outro estudo do mesmo grupo (Maia et al., 2006b) mostrou o potencial antinociceptivo do ácido oleanólico, administrado pela via oral, na nocicepção induzida pela capsaicina (agonista TRPV1), sugerindo a participação do sistema opióide, produção de NO e ativação de canais de  $K^+$  sensíveis a ATP na sua atividade.

Dessa forma, a atividade antinociceptiva do  $\alpha$ -espinasterol foi avaliada no modelo de nocicepção induzida pela administração intraplantar de capsaicina (agonista TRPV1), cinamaldeído (agonista TRPA1) e mentol (agonista TRPM8) em camundongos. Dentro deste contexto, o  $\alpha$ -espinasterol, administrado pelas vias *i.p.*, *v.o.* e co-administrado, foi capaz de reduzir a nocicepção causada pela capsaicina. Esses resultados corroboram com a hipótese de que o  $\alpha$ -espinasterol atua em receptores (ou em suas vias de transdução) presentes em fibras sensoriais sensíveis a capsaicina. Beirith et al. (2003) relatou que o tratamento neonatal com capsaicina inibiu as respostas nociceptivas induzidas pelo glutamato. Confirmando o conceito de que neuropeptídeos liberados de fibras aferentes sensíveis a capsaicina apresentam um importante papel na nocicepção induzida pelo glutamato injetado

intraplantar. Outros autores relatam que o tratamento com capsaicina no período neonatal bloqueou em 50% a resposta nociceptiva induzida pela administração intratecal de NMDA (Lovinger and Weight, 1988).

Além disso, o  $\alpha$ -espinasterol inibiu a nocicepção promovida pela injeção intraplantar de cinamaldeído, mas apenas quando administrado por via *i.p.*, sugerindo que o  $\alpha$ -espinasterol não produza seus efeitos antinociceptivos contra o cinamaldeído através de uma ação local. Sabe-se que o cinamaldeído é o principal constituinte isolado do óleo da canela (~ 70%) (Calixto et al., 2005). Alguns estudos demonstraram que o cinamaldeído ativa o receptor TRPA1 provocando sensações de dor através da ativação de fibras C, mas não pelas fibras A (Bandell et al., 2004; Kobayashi et al., 2005; Nagata et al., 2005). Também já foi demonstrado que o receptor TRPA1 é ativado pela BK de forma independente do receptor de BK, sendo que a sensibilização pela BK ocorre através dos sistemas de sinalização das proteínas PKC e PKA (Bandell et al., 2004; Wang et al., 2008).

Outro resultado interessante foi a inibição da nocicepção espontânea produzida pelo mentol, após tratamento pelas vias oral, *i.p.* e co-administração com  $\alpha$ -espinasterol. O mentol é um terpeno cíclico presente no gênero *Mentha*, dando as essas plantas cheiro e sabor, característicos (Patel et al., 2007). O mentol induz sensação de refrescância através da ativação de terminais nervosos periféricos, servindo como agonista de receptores TRPM8 (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002). Já foi observado que o mentol pode induzir sensações nociceptivas de queimação, ardor ou formigamento (Green, 1992; Dessirier et al., 2001; Wasner et al., 2004; Green, 2005). Em um estudo mais recente, foi demonstrado que o mentol aplicado topicamente pode induzir hiperalgesia ao frio (Namer et al., 2005).

A avaliação geral de todos os dados obtidos sugere que a atividade antinociceptiva da *B. illinita* possa ocorrer através da interação de seus compostos em vias de sinalização que são comuns aos sistemas que foram estudados, já que foi observado efeito antinociceptivo frente a diferentes estímulos, como glutamato, ativadores de TRPs, citocinas, entre outros.

Muitas substâncias que apresentam atividade antinociceptiva atuam em receptores que tem sua atividade mediada pela proteína  $G_{i/o}$ . Um exemplo são

alguns receptores metabotrópicos do glutamato que atuam na transmissão nociceptiva através da ativação da proteína  $G_{i/o}$ . Para avaliar a provável participação dos receptores que podem ser encontrados nas fibras aferentes sensíveis à capsaicina e que são acoplados à proteína  $G_{i/o}$  na atividade antinociceptiva do  $\alpha$ -espinasterol, utilizou-se o pré-tratamento com toxina Pertussis. A participação dos receptores acoplados às proteínas  $G_{i/o}$  foi confirmada, pois os animais pré-tratados com toxina Pertussis não sofreram antinocicepção após administração de  $\alpha$ -espinasterol no modelo de ácido acético.

A toxina Pertussis tem sido utilizada como uma ferramenta para caracterizar o envolvimento de proteínas G heteroméricas na sinalização intracelular. Essa toxina cataliza a ribosilação do ADP de um resíduo de cisteína na posição 4 da região carboxi-terminal da subunidade alfa de proteínas da família  $G_i$ . Esta alteração causa inativação da proteína  $G_{i/o}$ , impedindo o acoplamento desta proteína com receptores metabotrópicos (Fields and Casey 1997). Desta forma, fármacos que dependem deste acoplamento para a transdução do sinal, tornam-se inativos mesmo ligando-se ao seu receptor específico. Um exemplo clássico de mecanismo operado pela proteína  $G_{i/o}$  é a morfina, que foi utilizada como controle positivo em nosso experimento (Fields and Casey 1997; Santos et al. 1999a). A ativação da proteína  $G_{i/o}$  está associada ao bloqueio dos canais de cálcio-voltagem-dependente e ativação dos canais de potássio, resultando em hiperpolarização da membrana neuronal, processo que inibe o disparo do potencial de ação da célula e conseqüentemente inibe a transmissão nociceptiva (Pertwee 1999; Schultz and Gross 2001; Savinainen and Laitinen 2004).

Outra possibilidade seria a participação da PKC, já que essa proteína esta envolvida em várias vias de sinalização, incluindo a via glutamatérgica, via dos receptores TRPs, canais iônicos, PGs, BK, SP entre outros (Velázquez et al., 2007).

Para avaliar a participação da PKC na atividade antinociceptiva do  $\alpha$ -espinasterol, realizou-se o modelo de nocicepção induzida pelo PMA. O PMA (miristato-acetato de forbol) liga-se a vários tipos de PKCs ( $\alpha$ ,  $\beta$  I – II,  $\gamma$ ,  $\delta$  I – III,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$  I – II,  $\zeta$ ,  $\lambda$ ) e estimula a atividade catalítica da quinase (Newton, 2001; Ferreira et al., 2005). A ativação da PKC leva ao comportamento nociceptivo avaliado até 45

min após a injeção intraplantar. Foi observada a redução da nocicepção após a injeção *i.p.* de  $\alpha$ -espinasterol, sugerindo a participação da PKC nesse efeito.

Para que a PKC se torne ativa, é necessário que ocorra a sua translocação do citosol para a membrana celular onde irá desempenhar o seu papel. Dessa forma, a quantidade de PKC encontrada na membrana celular em comparação com a encontrada no citosol vem sendo utilizada como indicativo da sua ativação (Cesare et al., 1999). Para comprovar que a inibição da nocicepção causada pelo PMA está realmente envolvida com a ativação da PKC $\epsilon$ , foi realizada a análise de sua ativação através de western blot.

Sendo assim, foi demonstrado que a administração intraplantar de PMA promove a ativação da PKC $\epsilon$ , observada pela sua translocação do citosol para a membrana celular. O  $\alpha$ -espinasterol foi capaz de reverter essa translocação, sendo que a menor parte da PKC $\epsilon$  estava localizada na membrana celular após o tratamento com o  $\alpha$ -espinasterol, demonstrando a inibição da translocação.

A inibição da translocação da PKC explica em grande parte a atividade antinociceptiva promovida pela *B. illinita* e seus compostos isolados, principalmente o  $\alpha$ -espinasterol. Uma das principais vias pela qual a PKC $\epsilon$  modula a nocicepção é através da ativação dos receptores TRPV1. TRPV1 são ativados com altas temperaturas, mas depois de um dano tecidual, TRPV1 conduz corrente a baixas temperaturas, acarretando em hiperalgesia. Este efeito se deve a fosforilação do receptor pela PKC $\epsilon$ , fazendo com que se abra o poro do canal e haja o influxo de cátions mesmo em temperaturas mais baixas (Bhave et al., 2003; Velázquez et al., 2007).

A PKC desempenha um papel muito importante na sensibilização periférica e central; é ativada na fibra aferente primária por várias substâncias que são liberadas em resposta a um dano tecidual. Estas substâncias incluem BK, PGs, citocinas, ATP, entre outras. Os receptores para esses mediadores, ao final de sua cascata de sinalização, ativam as PKCs. A PKC ativada pode aumentar o fluxo de cátions dentro do terminal nervoso através de receptores TRPV1, receptores sensíveis a ácido (ASICs) e canais de sódio sensíveis a tetrodotoxina. Receptores pré-sinápticos ligados a proteína G e receptores de tirosina quinase (como os receptores para

citocinas) sinalizam através de fosfolipase C (PLC) para ativar PKC. Em consequência, é observado o aumento do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro do terminal pré-sináptico através da fosforilação de canais de sódio dependentes de voltagem. PKC também é ativada nos neurônios do corno da medula espinhal, após ativação de receptores acoplados a proteína G. Uma variedade de proteínas G estão envolvidas na ativação da PKC, incluindo receptores NK1 (para SP), receptores metabotrópicos para o glutamato e receptores para o CGRP. A PKC ativada fosforila subunidades dos receptores NMDA para o glutamato, aumentando assim, a sua atividade (Velázquez et al., 2007).

O mecanismo de ação para a atividade antinociceptiva promovida pela *B. illinita* ainda não está totalmente elucidado, sendo necessário o desenvolvimento de novos estudos. Contudo, pode-se sugerir um importante papel da PKC na atividade antinociceptiva estudada no presente trabalho.

O conjunto de resultados descritos permite sugerir que a *B. illinita* pode se tornar um potencial fitoterápico para o tratamento de processos patológicos que envolvem a dor. É importante destacar, que o ácido oleanólico pode ser utilizado como marcador químico no controle de qualidade durante o processamento de um fitoterápico a base de *B. illinita*, porque além de apresentar um rendimento razoável durante o isolamento, tem conservadas as suas atividades terapêuticas. O  $\alpha$ -espinasterol, assim como o ácido oleanólico, seguramente são importantes para a atividade antinociceptiva da *B. illinita*, porém, constituintes majoritários (mais típicos) são preferencialmente escolhidos para esse tipo de controle.

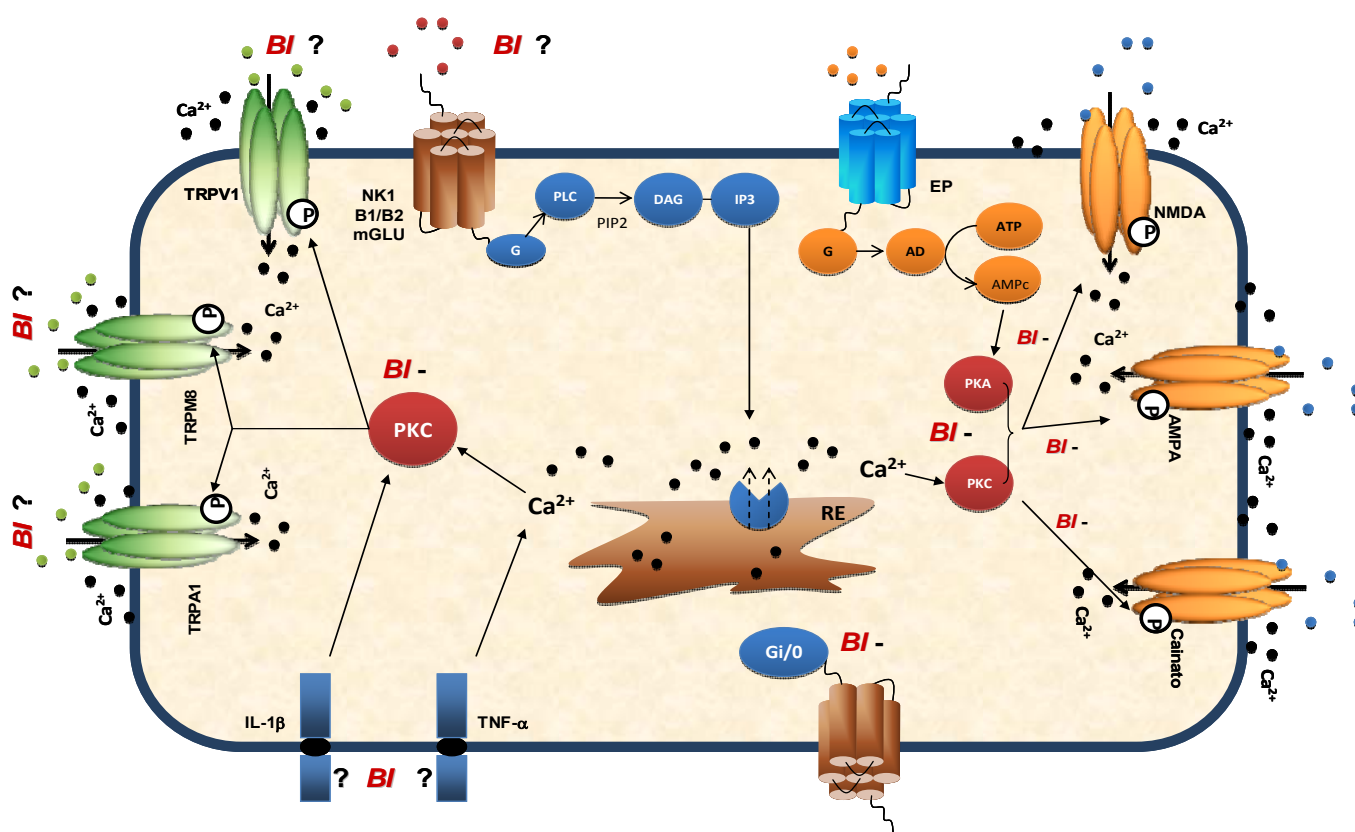
## 7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados nesta tese, pode-se concluir que:

- A administração oral do HA de *B. illinita* promoveu antinocicepção no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético;
- O fracionamento do HA não modificou a atividade antinociceptiva, sendo que as frações (FH e FAq) apresentaram maior potência quando comparadas ao extrato de origem (HA);
- A fração mais ativa (FH) foi utilizada para o isolamento de compostos, também promoveu efeito antinociceptivo no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético e seu efeito não foi relacionado com uma possível ação sedativa e nem com o sistema opióide;
- A administração oral da FH foi capaz de prevenir a nocicepção induzida pela injeção *i.pl.* de formalina, diminuir o efeito hiperalgésico induzido pela PGE<sub>2</sub> e BK e reduzir a reduziu a alodínia e a hiperalgesia mecânica causada pela ligadura parcial do nervo ciático;
- A FH deu origem a 3 compostos (baurenol,  $\alpha$ -espinasterol e ácido oleanólico) que apresentaram atividade antinociceptiva no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, sendo que o ácido oleanólico foi o composto com maior eficácia e potência;
- A administração da FH (*v.o.*), do ácido oleanólico e do  $\alpha$ -espinasterol (*i.p.*) foi capaz de prevenir a nocicepção induzida pela injeção *i.pl.* glutamato e a nocicepção induzida pela injeção *i.t.* de AAE (com diferentes perfis) e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ );
- O ácido oleanólico e o  $\alpha$ -espinasterol não alteram a ligação específica [<sup>3</sup>H]-L-glutamato e a liberação de [<sup>3</sup>H]-L-glutamato de sinaptossomas;
- A administração do  $\alpha$ -espinasterol (*v.o.*, *i.p.* e *i.pl.*) foi capaz de inibir a nocicepção induzida pela injeção *i.pl.* de capsaicina, cinamaldeído e mentol;

- Os mecanismos de ação envolvidos na ação antinociceptiva da *B. illinita* parecem envolver: neurotransmissão dependente de fibras sensoriais sensíveis a capsaicina, ativação de mecanismos dependentes da proteína Gi/o e inibição da PKC.

De uma forma geral, os resultados obtidos no presente estudo confirmam os dados obtidos anteriormente e mostram claramente que os compostos isolados das partes aéreas da *Baccharis illinita* DC apresentaram uma importante ação antinociceptiva, especialmente em relação à dor aguda e crônica. Os prováveis sítios para a ação da planta e/ou seus compostos são mostrados na figura 35.



**Figura 35:** Possíveis sítios de ação da *Baccharis illinita* (BI) com consequente redução na nocicepção. IL-1 $\beta$  (receptor para interleucina 1 $\beta$ ); TNF- $\alpha$  (receptor para o fator de necrose tumoral  $\alpha$ ); NK-1 (receptor para neurocinina 1); mGLU (receptor metabotrópico para o glutamato); Gi/o (proteína Gi/o); TRPV1 (receptor de potencial transitório sensível ao calor lesivo e a capsaicina); TRPA1 (receptor de potencial transitório sensível ao frio lesivo; agonista: cinamaldeído); TRPM8 (receptor de potencial transitório sensível ao frio não lesivo; agonista: mentol); PKC (proteína quinase C); PKA (proteína quinase A).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amann, R.; Schuligoi, R.; Holzer, P.; Donnerer, J. The non-peptide NK1 receptor antagonist SR140333 produces long-lasting inhibition of neurogenic inflammation, but does not influence acute chemo- or thermnociception in rats. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**. 352: 201-220, 1995.
- Andrade, E.L.; Luiz, A.P.; Ferreira, J.; Calixto, J.B. Pronociceptive response elicited by TRPA1 receptor activation in mice. **Neuroscience**. 152: 511-520, 2008.
- ANFRAMAG - Associação Nacional de Farmacêuticos Magistrais. **Fitoterapia Magistral**. Um guia prático para a manipulação de fitoterápicos. Publicações Anfarmac: São Paulo, 2005.
- Arruda, A.M.S.; Elias, G.L.; Lagos, J.B.; Kiel, C.; Nobell, I.S.; Mansilla, N.C.; Lapa, A.J. Efeitos farmacológicos de extratos brutos de *Baccharis illinita* DC. **XIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**, Caxambu, Minas Gerais. Livro de Resumos, p. 296, 1999
- Bacchi, E.M. Controle de qualidade de fitoterápicos. *In*: Stasi, L.C. (Ed). **Plantas medicinais: arte e ciência um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista, 169-86, 1996.
- Baggio, C.H.; Freitas, C.S.; Rieck, L.; Marques, M.C.A. Gastroprotective effects of a crude extract of *Baccharis illinita* DC in rats. **Pharmacological Research**. 47: 93-98, 2003.
- Bandell, M.; Story, G.M.; Hwang, S.W.; Viswanath, V.; Eid, S.R.; Petrus, M.J.; Earley, T.J.; Patapoutian, A. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. **Neuron**. 41:849-857, 2004.
- Baron, R. Mechanisms of Disease: neuropathic pain - a clinical perspective. **Nature Clinical Practice. Neurology**. 2: 95-106, 2006.
- Barroso, G.M. **Rodriguésia, Revista do Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. 28: 3, 1975.
- Bautista, D.M.; Jordt, S.E.; Nikai, T.; Tsuruda, P.R.; Read, A.J.; Poblete, J.; Yamoah, E.N.; Basbaum, A.I.; Julius, D. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. **Cell**. 124:1269-1282, 2006.
- Bautista, D.M.; Movahed, P.; Hinman, A.; Axelsson, H.E.; Sterner, O.; Hogestatt, E.D.; Julius, D.; Jordt, S.E.; Zygmunt, P.M. Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 102:12248-12252, 2005.
- Beirith, A.; Santos, A.R.S.; Calixto, J.B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Research**. 924(2): 219-228, 2002.
- Beirith, A.; Santos, A.R.S.; Calixto, J.B. The role of neuropeptides and capsaicin-sensitive fibres in glutamate-induced nociception and paw oedema in mice. **Brain Research**. 969 (1-2):110-116, 2003.



Beise, R.D.; Cartens, E.K. Psychophysical study of stinging pain evoked by brief freezing of superficial skin and ensuing short-lasting changes in sensations of cool and cold pain. **Pain**, 74: 275-286, 1998.

Bentham, G. Compositae. *In*: Bentham, G.; Hooker, J. D. (Eds.), **Genera Plantarum**, vol. 2. Lovell Reeve, London, 1873.

Bernardino, L.; Xapelli, S.; Silva, A.P.; Jakobsen, B.; Poulsen, F.R.; Oliveira, C.R. et al. Modulator effects of interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  on AMPA-induced excitotoxicity in mouse organotypic hippocampal slice cultures. **Journal of Neuroscience**. 25: 6734–6744, 2005.

Besedovsky, H.; Del Rey, A.; Sorkin, E.; Dinarello, C.A. Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. **Science**. 233:652–654, 1986.

Besson, P.; Perl, E.R. Responses of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. **Journal of Neurophysiology**. 32:1025-1043, 1969.

Bhave, G.; Hu, H.J.; Glauner, K.S.; Zhu, W.; Wang, H.; Brasier, D.J.; Oxford, G.S.; Gereau, R.W. Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 100 (21): 12480-12485, 2003.

Blumenthal, M.; Goldberg, A.; Brinckmann, J. **Herbal medicine - Expanded Comission and Monographs**. Austin: American Botanical Council, 2000.

Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. 72: 248–254, 1976.

Broadhurst, P.L. Experiments in psychogenetics. *In*: Eisenk, H.J. (Ed). **Experiments in Personality**. Routledge and Kegan Paul, London, 1960.

Calixto, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 33: 179-189, 2000.

Calixto, J.B.; Kassuya, C.A.L.; André, E.; Ferreira, J. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. **Pharmacology & Therapeutics**. 106:179-208, 2005.

Calixto, J.B.; Santos, A.R.S.; Cechinel Filho, V.; Yunes, R.A. A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology and therapeutic potencial. **Medicinal Research Reviews**. 8: 225-228, 1998.

Cassini, H. Quatrième memoire sur le famille des synantherées, contenant l'analyse de l'ovaire et de ses accesoirs. **Journal of Physical Chemistry and History Natural Arts**. 85: 5-21, 1816.

Caterina, M.J.; Leffler, A.; Malmberg, A.B.; Martin, W.J.; Trafton, J.; Petersen-Zeit, K.R.; Koltzenburg, M.; Basbaum, A.I.; Julius, D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. **Science**. 288: 306-313, 2000.

Caterina, M.J.; Schumacher, M.A.; Tominaga, M.; Rosen, T.A.; Levine, J.D.; Julius, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**. 389: 816-24, 1997.

Cesare, P.; Dekker, L.V.; Sardini, A.; Parker, P.J.; McNaughton, P.A. Specific involvement of PKC-epsilon in sensitization of the neuronal response to painful heat. **Neuron**. 23: 617-24, 1999.

Chen, J.; Chen, T. **Chinese Medical Herbology and Pharmacology**. City of Industry, EUA: Art of Medicine. PressCity of Industry, EUA, 2004.

Choi, D.W. Glutamate receptors and the induction of escitotoxic death. **Progress in Brain Research**. 100: 47-51, 1994.

Choi, S.S.; Han, K.J.; Lee, J.K.; Lee, H.K.; Han, E.J.; Kim, D.H., et al. Antinociceptive mechanisms of orally administered decursinol in the mouse. **Life Sciences**. 73:471-485, 2003.

Collier, H.O.J.; Dinneen, L.C.; Johnson, C.A.; Schneider, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**. 32: 295-310, 1968.

Corrêa, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, v. 1-6, 1984.

Cortright, D.N.; Krause, J.E.; Broom, D.C. TRP channels and pain. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1772: 978-988, 2007.

Coutaux, A.; Adam, F.; Willer, J.C.; Le Bars, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint, bone, spine : revue du rhumatisme**. 72: 359-371, 2005.

Cunha F.Q.; Ferreira, S.H. Peripheral hyperalgesic cytokines. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. 521: 22-39, 2003.

Davis A.J.; Perkins M.N. The involvement of bradykinin B1 and B2 receptor mechanisms in cytokine-induced mechanical hyperalgesia in the rat. **British Journal of Pharmacology**. 113: 63-68, 1994.

Davis, K.D.; Pope, G.E. Noxious cold evokes multiple multiple sensations with distinct time courses. **Pain**. 98: 179-185, 2002.

De Candolle, A.P. 1838. **Prodromus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis**. vol. 7. Paris.

De Smet, P.A.G.M.; Bonsel, G.; Van Der Kuy, A.; Hekster, Y.A.; Pronk, M.H.; Brorens, M.J.A.; Lockfeer, J.H.M.; Nuijten, M.J.C. Introduction to the pharmacoeconomics of herbal medicines. **Pharmacoeconomics**. 18: 1-7, 2000.

Dessirier, J.M.; O'Mahony, M.; Carstens, E. Oral irritant properties of menthol: sensitizing and desensitizing effects of repeated application and cross-desensitization to nicotine. **Physiology & Behavior**. 73: 25-36, 2001.

Dickenson, A. Mechanisms of central hypersensitivity: excitatory amino acids mechanisms and their control. In: Besson, M.J.; Dickenson, A. **The pharmacology of pain**. Springer-Verlag, Berlin. p.21-41, 1997.

Dunkley, P.R.; Heath, J.W.; Harrison, S.M.; Jarvie, P.E.; Glenfield, P.J.; Rostas, J.A. A rapid Percoll gradient procedure for isolation of synaptosomes directly from an S1 fraction: homogeneity and morphology of subcellular fractions. **Brain Research**. 441: 59-71, 1988.

Dupont, P. **Bulletin de la Société Scientifique de Bretagne**. 41: 141, 1966.

Emanuelli, T.; Antunes, V.F.; Souza, D.O. Characterisation of L-[3H]glutamate binding to fresh and frozen crude plasma membranes isolated from cerebral cortex of adult rats. **Biochemistry and Molecular Biology International**. 44:1265-1272, 1998.

Emerenciano, V. P.; Ferreira, Z. S.; Kaplan, M. A. C.; Gottlieb, O. R. A chemosystematic analysis of tribes of asteraceae involving sesquiterpene lactones and flavonoids. **Phytochemistry**. 26: 3103-3115, 1987.

Emerenciano, V.P.; Militão, J.S.L.T.; Campos, C.C.; Romo, P.; Kaplan, M.A.C.; Zambon, M.; Brant, A.J.C. Flavonoids as chemotaxonomic markers for Asteraceae. **Biochemical Systematics and Ecology**. 29: 947-957, 2001.

Farias, M.R. Avaliação da qualidade de matérias primas vegetais. In: Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G. et al. (orgs.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Santa Catarina: Editora da UFSC: 199 – 222, 2001.

Feng, Y.; Cui, M.; Willis, W. Gabapentin markedly reduces acetic acid-induced visceral nociception. **Anesthesiology**. 98:729-733, 2003.

Ferreira, J.; da Silva, G.L.; Calixto, J.B. Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B2 kinin receptor activation in mice. **British Journal of Pharmacology**. 141: 787-794, 2004.

Ferreira, J.; Trichês, K.M.; Medeiros, R.; Calixto, J.B. Mechanisms involved in the nociception produced by peripheral protein kinase c activation in mice. **Pain**. 117: 171-181, 2005.

Fields, T.A.; Casey, P.J. Signalling functions and biochemical properties of pertussis toxinresistant G-proteins. **The Biochemical Journal**. 321: 561-571, 1997.

Franco, I.J. **Ervas e plantas: a medicina dos simples**. 5 Ed. Imprimax: Chapecó, 1995.

Freitas, C.S.; Baggio, C.H.; Finau, J.; Anginoni, M.; Pizzolatti, M.G.; Santos, A.R.S.; Marques, M.C.A. Inhibition of H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase in the gastroprotective effect of *Baccharis illinita* DC. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 60: 1105-1110, 2008.

Fröde, T.S. Mecanismos envolvidos nas respostas inflamatórias no modelo da pleurisia induzida pela carragenina e alguns mediadores, em camundongos. **Tese de Doutorado**. Centro de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Santa Catarina, 2000.

Gadotti, V.M.; Tibola, D.; Paszcuk, A.F.; Rodrigues, A.L.; Calixto, J.B.; Santos, A.R.S. Contribution of spinal glutamatergic receptors to the antinociception caused by agmatine in mice. **Brain Research**. 1093: 116-122, 2006.

Garg, V.K.; Nes, W.R. Studies on the C-24 configurations of  $\alpha^7$ -sterols in the seeds of *Cucurbita maxima*. **Phytochemistry**. 23: 2919-2923, 1984.

Giseke, P.D. **Praelectiones in ordines naturales plantarum**. Hamburgo, Alemanha, 1792.

Green, B.G. Lingual heat and cold sensitivity following exposure to capsaicin or menthol. **Chemical Senses**. 30 (suppl. 1): 201-202, 2005.

Green, B.G. The sensory effects of l-menthol on human skin. **Somatosensory & Motor Research** 9: 235-244, 1992.

Greuter, W.J.; Mcneill, F.R.; Barrie, H.M.; Burdet, V.; Demoulin, T.S.; Filgueiras, D.H.; Nicolson, P.C.; Silva, J.E.; Skog, P.; Trehane, N.J.; Turland, D. L. **International Code of Botanical Nomenclature** (St. Louis Code), 2000. Adopted by the Sixteenth International Botanical Congress, St. Louis, Missouri, July-August 1999. Regnum Vegetabile 138. Koeltz Scientific Books, Königstein.

Hagan, P.; Poole, S.; Bristow, A.F.; Tilders, F.; Silverstein, F.S. Intracerebral NMDA injection stimulates production of interleukin  $\beta$ 1 in perinatal rat brain. **Journal of Neurochemistry**. 67: 2215-2218, 1996.

Hains, B.C., Saab, C.Y., Klein, J.P., Craner, M.J., Waxman, S.G. Altered sodium channel expression in second-order spinal sensory neurons contributes to pain after peripheral nerve injury. **Journal of Neuroscience**. 24: 4832-4839, 2004.

Handwerker, H.O.; Kilo, S.; Reeh, P.W. Unresponsive afferent nerve fibers in the sural nerve of the rat. **The Journal of Physiology**. 435: 229-242, 1991.

Hara, M. Avaliação das atividades analgésica, antipirética e antiinflamatória do extrato aquoso do caule de *Baccharis illinita* DC. **Monografia de Especialização**. Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, 2001.

Harborne, J.B.; Willians, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**. 55: 481-504, 2000.

Hargreaves, K.; Dubner, R.; Brown, F.; Flores, C.; Joris, J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. **Pain**. 32: 77-88, 1988.

Heywood, V.H. Asteraceae. In: Heywood, V. H. **Flowering plants of the world**, Oxford University Press: New York, 1993.

Holzer, P. Capsaicin as a tool for studying sensory neuron functions. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. 298: 3-16, 1991.

Huang, K. **The Pharmacology of Chinese Herbs**, 2 Ed. Boca Raton, EUA: CRC Press, 1998.

Hunskar, S.; Fasmer, O.B.; Hole, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **Journal of Neuroscience Methods**. 14: 69-73, 1985.

Hunt, S.P.; Mantyh, P.W. The molecular dynamics of pain control. **Nature Reviews. Neuroscience**. 2: 83-91, 2001.

Hwang, S.W.; Cho, H.; Kwak, J.; Lee, S.Y.; Kang, C.J.; Jung, J.; Cho, S.; Min, K.H.; Suh, Y.G.; Kim, D.; Oh, U. Direct activation of capsaicin receptor by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 97: 6155-6160, 2000.

Hylden, J.L.; Wilcox, G.L. Intrathecal morphine in mice: a new technique. **European Journal of Pharmacology**. 67: 313-316, 1980.

Ikeda, Y.; Ueno, A.; Naraba, H.; Oh-Ishi, S. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Science**. 69: 2911-2919, 2001.

Inoue, K.; Tsuda, M.; Koizumi, S. ATP- and adenosinemediated signalling in the central nervous system: chronic pain and microglia: involvement of the ATP receptor P2X4. **Journal of Pharmacological Sciences**. 94: 112-114, 2004.

Jakupovic, J.; Schuster, A.; Ganzer, U.; Bohlmann, F.; Boldt, P.E. Sesqui- and diterpenes from *Baccharis* species. **Phytochemistry**. 29: 2217-2222, 1990.

Jeftinija, S.; Jeftinija, K.; Liu, F.; Skilling, S.R.; Smullin, D.H.; Larson, A.A. Excitatory amino acids are released from rat primary afferent neurons in vitro. **Neuroscience Letters**. 125:191-194, 1991.

Ji, R.R.; Strichartz, G. Cell signaling and the genesis of neuropathic pain. **Science**. 252: 1-19, 2004.

Ji, R.R.; Woolf, C.J. Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. **Neurobiology of disease**. 8: 1-10, 2001.

Joly, A.B. **Botânica: introdução a taxonomia vegetal**. 7ed. Cia Editora Nacional: São Paulo, 1967.

Julius, D.; Basbaum, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**. 413: 203-210, 2001.

Kaminska, B. MAPK signaling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy- from molecular mechanisms to therapeutic benefits. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1754: 253-262, 2005.

Katinas, L.; Gutiérrez, D.G.; Grossi, M.A.; Crisci, J.V. Panorama de la familia Asteraceae (= Compositae) en la Republica Argentina. **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**. 42: 113-129, 2007.

Khasar, S.G.; Lin, Y.H.; Martin, A.; Dadgar, J.; McMahon, T.; Wang, D.; Hundle, B.; Aley, K.O.; Isenberg, W.; McCarter, G.; Green, P.G.; Hodge, C.W.; Levine, J.D.; Messing, R.O. A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase C epsilon mutant mice. **Neuron**. 24: 253-260, 1999 b.

Khasar, S.G.; McCarter, G.; Levine, J.D. Epinephrine produces a beta-adrenergic receptor-mediated mechanical hyperalgesia and in vitro sensitization of rat nociceptors. **Journal of Neurophysiology**. 81: 1104-1112, 1999 a.

Kobayashi, K.; Fukuoka, T.; Obata, K.; Yamanaka, H.; Daí, Y.; Tokunaga, A.; Noguchi, K. Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with adelta/c-fibers and colocalization with trk receptors. **Journal of Comparative Neurology**. 493: 596-606, 2005.

Kulkarni, S.K.; Mehta, A.K.; Kunchandy, J. Anti-inflammatory actions of clonidine, guanfacine and B-HT 920 against various inflammagen-induced acute paw oedema in rats. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie**. 279: 324-334, 1986 *In*: Korbes, C.V. **Manual de plantas medicinais**. 48ed. Grafit: Francisco Beltrão, 1995.

Lai, A.Y.; Swayze, R.D.; Hussein, A.; Song, C. Interleukin-1 beta modulates AMPA receptor expression and phosphorylation in hippocampal neurons. **Journal of Neuroimmunology**. 175: 97-106, 2006.

LaMotte, R.H.; Shain, C.N.; Simone, D.A.; Tsai, E.F. Neurogenic hyperalgesia: psychophysical studies of underlying mechanisms. **Journal of Neurophysiology**. 66:190-211. 1991

Lawson, S.N.; Crepps, B.A.; Perl, E.R. Calcitonin gene related peptide immunoreactivity and afferent receptive properties of dorsal root ganglion neurons in guinea-pigs. **Journal of Physiology**. 540: 989-1002, 2002.

Lawson, S.N.; Crepps, B.A.; Perl, E.R. Relationship of substance p to afferent characteristics of dorsal root ganglion neurons in guinea-pigs. **Journal of Physiology**. 505: 177-191, 1997.

Le Bars, D.; Gozariu, M.; Cadden, S.W. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews**. 53: 597-652, 2001.

Lessing, C. F. **Synopsis Generum Compositarum**. Duncker & Humblot, Berlin, 1832.

Levine, J.D.; Alessandri-Haber, N. TRP channels: targets for the relief of pain. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1772: 989-1003, 2007.

Lipton, S.A.; Rosenberg, P.A. Mechanisms of disease. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurological disorders. **New England Journal of Medicine**. 330: 613-622, 1994.

Liu, H.; Mantyh, P.W.; Basbaum, A.I. NMDA-receptor regulation of substance P release from primary afferent nociceptors. **Nature**. 386: 721-724, 1997.

Loeser, J.D.; Melzack, R. Pain: an overview. **Lancet**. 353: 1607-1609, 1999.

Loeser, J.D.; Treede, R.D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**. 137: 473-477, 2008

Lovinger, D.M.; Weight, F.F. Glutamate induces a depolarization of adult rat dorsal root ganglion neurons that is mediated predominantly by NMDA receptors. **Neuroscience Letters**. 94: 314-320, 1988.

Lucena, G.M.; Franco, J.L.; Ribas, C.M.; Azevedo, M.S.; Meotti, F.C.; Gadotti, V.M.; Dafre, A.L.; Santos, A.R.S.; Farina, M. Cipura paludosa extract prevents methyl mercury-induced neurotoxicity in mice. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**. 101: 127-131, 2007.

Luo, Z.D.; Chaplan, S.R.; Higuera, E.S.; Sorkin, L.S.; Stauderman, K.A.; Williams, M.E.; Yaksh, T.L. Upregulation of dorsal root ganglion (alpha)2(delta) calcium channel subunit and its correlation with allodynia in spinal nerve-injured rats. **Journal Neuroscience**. 21: 1868-1875, 2001.

Mahato, S.B.; Kundu, A.P. <sup>13</sup>C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids – a compilation and some salient features. **Phytochemistry**. 37: 1517-1575, 1994.

Maia, J.L.; Lima-Junior, R.C.; David, J.P.; David, J.M.; Santos, F.A.; Rao, V.S. Oleanolic acid, a pentacyclic triterpene attenuates the mustard oil induced colonic nociception in mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. 29: 82-85, 2006 a.

Maia, J.L.; Lima-Junior, R.C.; Melo, C.M.; David, J.P.; David, J.M.; Campos, A.R.; Santos, F.A.; Rao, V.S. Oleanolic acid, a pentacyclic triterpene attenuates capsaicin-induced nociception in mice: possible mechanisms. **Pharmacological Research**. 54: 282-286, 2006 b.

Malagarriga Heras, R. D. P. **Memorias de la Sociedad de Ciencias Naturales**. v.23, p. 129, 1976.

Malcangio, M.; Fernandes, K.; Tomlinson, D.R. NMDA receptor activation modulates evoked release of substance P from rat spinal cord. **British Journal of Pharmacology**. 125: 1625-1626, 1998.

Malmberg, A.B.; Basbaum, A.I. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioural and neuroanatomical correlates. **Pain**. 76: 215-22, 1998.

Malmberg, A.B.; Brandon, E.P.; Idzerda, R.L.; Liu, H.; McKnight, G.S.; Basbaum, A.I. Diminished inflammation and nociceptive pain with preservation of neuropathic pain in mice with a targeted mutation of the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. **Journal Neuroscience**. 17: 7462-7470, 1997.

Malmberg, A.B.; Yaksh, T.L. Cyclooxygenase inhibition and the spinal release of prostaglandin E2 and amino acids evoked by paw formalin injection: a microdialysis study in unanesthetized rats. **The Journal Neuroscience**. 15: 2768-2776, 1995.

Mantyh, P.W. Neurobiology of substance P and the NK1 receptor. **Journal of Clinical Psychiatry**. 63 ( Suppl 11): 6-10, 2002.

McKemy, D. D.; Neuhausser, W. M.; Julius, D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. **Nature**. 416: 52-58, 2002.

Meldrum, B.S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **Journal of Nutrition**. 130: 1007-1015, 2000.

Meotti, F.C.; Ardenghi, J.V.; Pretto, J.B.; Souza, M.M.; Moura, J.A.; Cunha Júnior, A.; Soldi, C.; Pizzolatti, M.G.; Santos, A.R.S. Antinociceptive properties of coumarins, steroid and dihydrostyryl-2-pyrones from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 58: 107-112, 2006.

Meotti, F.C.; Posser, T.; Missau, F.C.; Pizzolatti, M.G.; Leal, R.B.; Santos, A.R.S. Involvement of p38MAPK on the antinociceptive action of myricitrin in mice. **Biochemical Pharmacology**. 74: 924-931, 2007.

- Merskey, H. The definition of pain. **European Journal of Psychiatry**. 6:153-159, 1991.
- Meyer, R.A.; Davis, K.D.; Cohen, R.H.; Treede, R.D.; Campbell, J.N. Mechanically insensitive afferents (MIAs) in cutaneous nerves of monkey. **Brain Research**. 561: 252-261, 1991.
- Millan, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**. 57: 1-164, 1999.
- Mjellem, N.; Lund, A.; Eide, P.K.; Storkson, R.; Tjølsen, A. The role of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> receptors in spinal nociceptive transmission and in the modulation of NMDA induced behaviour. **Neuroreport**. 3: 1061-1064, 1992.
- Montiel, A. F.; Martínez, C. G.; Palao, C. M.; Sanz, N.G.; Carvajal, A. F.; Ballester, G. F.; Cases, R. P. Molecular architecture of the vanilloid receptor. **European Journal of Biochemistry**. 271: 1820-1826, 2004.
- Moreira, F.P.M.; Coutinho, V.; Montanher, A.B.P.; Caro, M.S.P.; Brighente, I.M.C.; Pizzolatti, M.G.; Monache, F.D. Flavonoids and triterpenes from *Baccharis pseudotenuifolia*: bioactivity on *Artemia salina*. **Química Nova**. 26: 309-311, 2003.
- Nagata, K.; Duggan, A.; Kumar, G.; García-Añoveros, J. Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. **Journal Neuroscience**. 25: 4052-4061, 2005.
- Nagy, A.K.; Shuster, T.A.; Delgado-Escueta, A.V. Ecto-ATPase of mammalian synaptosomes: identification and enzymic characterization. **Journal of Neurochemistry**. 47: 976-986, 1986.
- Namer B, Seifert F, Handwerker HO, Maihofner C. TRPA1 and TRPM8 activation in humans: effects of cinnamaldehyde and menthol. **Neuroreport**. 16, 955-959, 2005.
- Neugebauer V. Metabotropic glutamate receptors-important modulators of nociception and pain behavior. **Pain**. 98:1-8, 2002.
- Newman, D.J.; Cragg, G.M.; Snader, K.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. **Journal of Natural Products**. 66: 1022-1037, 2003.
- Newton, A.C. Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. **Chemical Reviews**. 101: 2353-2364, 2001.
- Osborne, M.G.; Coderre, T.J. Nociceptive effects of intrathecal administration of sulphur-containing amino acids. **Behavioural brain research**. 144: 105-110, 2003.
- Ozawa, S., Kamiya, H., Tsuzuki, K., Glutamate receptors in mammalian central nervous system. **Progress in Neurobiology**. 54: 581-618, 1998.
- Patel, T.; Ishiuj, Y.; Yosipovitch, G. Menthol: a refreshing look at this ancient compound. **Journal of the American Academy of Dermatology**. 57: 873-878, 2007.
- Paula, I. C. Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato seco nebulizado de *Achyrocline satureoides* (Lam.) DC. Compositae – marcela. **Dissertação de Mestrado**. Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1997.



Peier, A. M.; Moqrich, A.; Hergarden, A. C.; Reeve, A. J.; Andersson, D. A.; Story, G.M.; Earley, T. J.; Dragni, I.; McIntyre, P.; Bevan, S.; Patapoutian, A. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. **Cell**. 108: 705-715, 2002.

Pertwee, R.G. Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. **Current Medicinal Chemistry**. 6: 635-664, 1999.

Pleuvry, B.J.; Lauretti, G.R. Biochemical aspects of chronic pain and its relationship to treatment. **Pharmacology & Therapeutics**. 71: 313-324, 1996.

Portanova, J.P.; Zhang, Y.; Anderson, G.D.; Hauser, S.D.; Masferrer, J.L.; Seibert, K.; Gregory, S.A.; Isakson, P.C. Selective neutralization of prostaglandin E2 blocks inflammation, hyperalgesia, and interleukin 6 production in vivo. **Journal of Experimental Medicine**. 184: 883-891, 1996.

Randall L.O.; Selitto, J.J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie**. 111: 409-419, 1957.

Rao, R; Murthy, R.K. Characteristics of [<sup>3</sup>H] glutamate binding sites in rat cerebellum. **Biochemistry and Molecular Biology International**. 30: 861-866, 1993.

Reid, G.; Flonta, M.L. Cold current in thermoreceptive neurons. **Nature**. 413: 480, 2001.

Ribas, C.M.; Meotti, F.C.; Nascimento, F.P.; Jacques, A.V.; Dafre, A.L.; Rodrigues, A.L.; Farina, M.; Soldi, C.; Mendes, B.G.; Pizzolatti, M.G.; Santos, A.R.S. Antinociceptive effect of the *Polygala sabulosa* hydroalcoholic extract in mice: evidence for the involvement of glutamatergic receptors and cytokine pathways **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**. 103: 43-47, 2008.

Ribeiro, R.A.; Vale, M.L.; Thomazzi, S.M.; Paschoalato, A.B.P.; Poole, S.; Ferreira, S.H.; Cunha, F.Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**. 387:111-118, 2000.

Rocha, A.P.C.; Kraychete, D.C.; Lemonica, L.; Carvalho, L.R.; Barros, G.A.M.; Garcia, J.B.S.; Sakata, R.K. Dor: aspectos atuais da sensibilização periférica e central. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. 57: 94-105, 2007

Sakurada, T.; Sugiyama, A.; Sakurada, C.; Tanno, K.; Sakurada, S.; Kisara, K.; Hara, A.; Abiko, Y. Involvement of nitric oxide in spinally mediated capsaicin- and glutamate-induced behavioural responses in the mouse. **Neurochemistry International**. 29: 271-278, 1996.

Santos, A.R.S.; Calixto, J.B. Further evidence for the involvement of tachylinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neuropeptides**. 31: 382-389, 1997.

Santos, A.R.S.; De Campos, R.O.; Miguel, O.G.; Cechinel-Filho, V.; Yunes, R.A.; Calixto, J.B. The involvement of K<sup>+</sup> channels and Gi/o protein in the antinociceptive action of the gallic acid ethyl ester. **European Journal of Pharmacology**. 379:7-17, 1999b.

Santos, A.R.S.; Miguel, O.G.; Yunes, R.A.; Calixto, J.B. Antinociceptive properties of the new alkaloid, cis-8, 10-di-N-propyllobelidiol hydrochloride dehydrate isolated from *Siphocampylus verticillatus*: evidence for the mechanism of action. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 289:417-426, 1999 a.

Santos, A.R.S.; Vedana, E.M.; De Freitas, G.A. Antinociceptive effect of meloxicam, in neurogenic and inflammatory nociceptive models in mice. **Inflammation Research**. 47: 302-307, 1998.

Savinainen, J.R.; Laitinen, J.T. Detection of cannabinoid CB1, adenosine A1, muscarinic acetylcholine, and GABA(B) receptor-dependent G protein activity in transducin-deactivated membranes and autoradiography sections of rat retina. **Cellular and Molecular Neurobiology**. 24: 243-256, 2004.

Scheidt, C.; Santos, A.R.S.; Ferreira, J.; Malheiros, A.; Cechinel-Filho, V.; Yunes, R.A.; Calixto, J.B. Evidence for the involvement of glutamatergic receptors in the antinociception caused in mice by the sesquiterpene drimaniol, **Neuropharmacology**. 43: 340-347, 2002.

Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Petrovick, P.R. Produtos de vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora Universidade UFRGS / Editora da UFSC. Capítulo 15. p. 301-332, 2001.

Schmelz, M.; Petersen, L.J. Neurogenic inflammation in human and rodent skin. **News in Physiological Sciences**. 16: 33-37, 2001.

Schultz, J.E.; Gross, G.J. Opioids and cardioprotection. **Pharmacology & Therapeutics**. 89 (2): 123-137, 2001.

Seltzer, Z.; Dubner, R.; Shir, Y. A novel behavioural model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial nerve injury. **Pain**. 43: 205-18, 1990.

Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. 2 ed., Porto Alegre/Florianópolis, Editora da UFRGS/UFSC, 2000.

Sinhorin, V.D.; Carpes, M.J.; Roehrs, C.; Zimmer, M.F.; Sauzem, P.D.; Rubin, M.A.; Correia, C.R.; Mello, C.F. D,L-cis-2,3-Pyrrolidine dicarboxylate alters [3H]-L-glutamate binding and induces convulsions in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 76: 295-299, 2003.

Souza, D.O.; Ramírez, G. Effects of guanine nucleotides on kainic acid binding and on adenylate cyclase in chick optic tectum and cerebellum. **Journal of Molecular Neuroscience**. 3: 39-45, 1991.

Story, G. M.; Peier, A. M.; Reeve, A. J.; Eid, S. R.; Mosbacher, J.; Hricik, T. R.; Earley, T. J.; Hergarden, A. C.; Andersson, D. A.; Hwang, S. W.; McIntyre, P.; Jegla, T.; Bevan, S. Patapoutian, A. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. **Cell**. 112: 819-829, 2003.

Suto, K.; Gotoh, H. Calcium signaling in cold cells studied in cultured dorsal root neurons. **Neuroscience**. 92: 1131-1135, 1999.

Szallasi, A.; Blumberg, P.M. Mechanisms and therapeutic potential of vanilloids (capsaicin-like molecules). **Advances in Pharmacology**. 24: 123-155, 1993.

Tada, H. U.; Turra, K.; Santos, R.; Marques, M.C.A.; Rieck, L. *Baccharis illinita* DC (EAB) stem and leaves raw aqueous extract activity on central nervous system of mice. **XVI Latinamerican Congress of Pharmacology**, Águas de Lindóia, São Paulo. Livro de Resumos, p. 234, 2000.

Teodoro-Luis, I. **Contr. Inst. Geobiol.** (Brasil), 5: 1, 1955.

Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, Roland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**. 51: 5-17, 1992.

Tominaga, M.; Caterina, M.J.; Malmberg, A.B.; Rosen, T.A.; Gilbert, H., Skinner, K.; Raumann, B.E.; Basbaum, A.I.; Julius, D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. **Neuron**. 21: 531-543, 1998.

Tracey, I.; Mantyh, P.W. The cerebral signature for pain perception and its modulation. **Neuron**. 55: 377-391, 2007.

Turan, A.; Karamanlio, B.; Memis, D. et al. The analgesic effects of Gabapentina after total abdominal hysterectomy. **Anesthesia and Analgesia**. 98: 1370-1373, 2004.

Vanderah, T.W. Pathophysiology of Pain. **Medical Clinics of North America**. 91: 1-12, 2007.

Vanegas, H.; Schaible, H.G. Prostaglandins and cyclooxygenases in spinal cord. **Progress in Neurobiology**. 64: 327-363, 2001.

Velázquez, K.T.; Mohammad, H.; Sweitzer, S.M. Protein kinase C in pain: Involvement of multiple isoforms. **Pharmacological Research**. 55: 578-589, 2007.

Venkatachalam, K.; Montell, C. TRP channels. **Annual Review of Biochemistry**. 76: 387-417, 2007.

Verdi, L.G., Brighente, I.M.C., Schripsema, J., Braz Filho, R., Pizzolatti, M.G. Kaurene diterpenes and flavonoids from *Baccharis illinita* flowers. **Biochemical Systematics and Ecology**. 32: 837-840, 2004.

Wall, P.D.; Melzack, R. **Textbook of pain**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1999.

Wang, S.; Dai, Y.; Fukuoka, T.; Yamanaka, H.; Kobayashi, K.; Obata, K.; Cui, X.; Tominaga, M.; Noguchi, K. Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain. **Brain**. 131: 1241-1251, 2008.

Wasner, G.; Schattschneider, J.; Binder, A.; Baron, R. Topical menthol – a human model for cold pain by activation and sensitization of C nociceptors. **Brain**. 127: 1159-1161, 2004.

Widmann, C.; Gibson, S.; Jarpe, M.B.; Johnson, G.L. Mitogen activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. **Physiological Reviews**. 79: 143-180, 1999.

Yaksh, T.L. Central pharmacology of nociceptive transmission. *In*: Wall, P.D.; Melzack, R. (Eds). **Textbook of Pain**. 5 Ed. Edinburgo, RU: Elsevier Churchill Livingstone: 371-414, 2006.

Yeng, L.T.; Teixeira, M.J. Tratamento multidisciplinar dos doentes com dor crônica. **Prática Hospitalar**. 35, 2004.

Yunes, R. A.; Pedrosa, R. C.; Filho, V. C. Fármacos e Fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento da Indústria de Fitoterápicos e Fitofármacos no Brasil. **Química Nova**. 24: 147-152, 2001.

Zomlefer, W. B. **Guide to flowering plant families**. Chapel Hill & London: Carolina, USA, 1994.

Zygmunt, P.M.; Petersson, J.; Andersson, D.A.; Chuang, H.; Sorgard, M.; Di Marzo, V.; Julius, D.; Hogestatt, E.D. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. **Nature**. 400: 452-457, 1999.