

Evelise Fernandes Pietrovski

**Avaliação da Atividade Antinociceptiva do Extrato
Etanólico e de Princípios Ativos obtidos das Flores
de *Combretum leprosum* Mart.**

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau em Mestre em Farmacologia,
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia,
Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal
do Paraná.

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Adair Roberto Soares Santos

CO-ORIENTADORA:

Prof^a. Dr^a. Maria Consuelo Andrade Marques

CURITIBA

2004

Evelise Fernandes Pietrovski

Avaliação da Atividade Antinociceptiva do Extrato Etanólico e de Princípios Ativos obtidos das Flores de *Combretum leprosum* Mart.

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau em Mestre em Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Adair Roberto Soares Santos

CO-ORIENTADORA:

Prof^a. Dr^a. Maria Consuelo Andrade Marques

CURITIBA

2004

Aos meus pais, Gilberto e Eliane, cujo amor e incentivo possibilitaram a realização deste trabalho.

Às minhas irmãs, Caroline e Louise, que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos desta caminhada.

Agradecimentos

À Universidade Federal do Paraná.

À Universidade Federal de Santa Catarina.

Ao orientador, Prof. Dr. Adair Roberto Soares Santos, e co-orientadora, Prof^a. Dr^a. Maria Consuelo Andrade Marques, pela orientação competente e pela amizade demonstrada em cada ensinamento e conselho durante esta caminhada.

Ao Prof. Dr. Valdir Facundo do Departamento de Química Orgânica da Universidade Federal do Ceará.

À coordenação do Curso de Pós - Graduação em Farmacologia e aos professores da área pelos ensinamentos durante as disciplinas cursadas.

Aos servidores do Departamento de Farmacologia.

Aos colegas do mestrado cuja amizade que se formou permitiu a conquista dessa vitória.

Aos meus colegas de Florianópolis que não mediram esforços em ajudar-me e pelo carinho mesmo estando distantes.

Ao Jefferson Augusto Soletti que esteve ao meu lado, ajudando-me a superar limites e dificuldades.

A todos que contribuíram para a realização desta pesquisa.

“É o conhecimento, e não outra coisa, o que move o homem a realizar as finalidades superiores de sua vida, e é também ele quem o leva pelos caminhos do mundo, buscando-se sempre a si mesmo”.

(Raumsol)

RESUMO

A *Combretum leprosum* (Combretaceae) é usada na medicina popular para o tratamento de hemorragias, cicatrizante e como sedativo sendo amplamente distribuída na região norte do Brasil, onde comumente é conhecida como “cipoaba, mofumbo e mufumbo”. O presente trabalho verificou a possível ação antinociceptiva do extrato etanólico (EECL) e de dois triterpenos obtidos das flores de *Combretum leprosum* em modelos químicos e térmicos de nocicepção em camundongos. O EECL, administrado pela via oral, produziu atividade antinociceptiva significativa e dependente da dose contra os modelos químicos de nocicepção, como nos testes do ácido acético, formalina, capsaicina e glutamato. Além disso, o EECL também aumentou significativamente a latência dos animais no modelo térmico de nocicepção, teste da placa-quente (50°C). A antinocicepção causada pelo EECL foi significativamente reduzida pelo pré-tratamento dos camundongos pela via i.p. com naloxona (antagonista dos receptores opióides), cetanserina (antagonista dos receptores 5-HT_{2A}) e pindolol (antagonista dos receptores 5-HT_{1A/1B} e dos β-adrenoreceptores). Entretanto, o efeito antinociceptivo do EECL não foi alterado pelo tratamento com a L-arginina (precursor do óxido nítrico) e ondansetron (antagonista dos receptores 5-HT₃) e não está associada com efeitos inespecíficos como relaxamento muscular ou sedação. Os triterpenos, 3β,6β,16β-trihidroxilup-20(29)-eno (TTHP) e ácido arjunólico, administrados pela via i.p. ou oral, produziram ação antinociceptiva significativa e dependente da dose da nocicepção induzida pelo glutamato. Além disso, o TTHP causou inibição significativa da nocicepção induzida pela administração intratecal do agonista glutamatérgico ionotrópico (NMDA), sem alterar a resposta nociceptiva induzida pelo agonistas metabotrópico (trans-ACPD) e ionotrópico (AMPA e cainato). Em síntese, estes resultados indicam que o extrato etanólico e seus princípios ativos produzem atividade antinociceptiva dependente da dose em vários modelos de nocicepção química. Por fim, uma interação com o sistema opióide, serotoninérgico (via receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{1A/1B}) e glutamatérgico (via receptores NMDA) parecem estar envolvidos na ação antinociceptiva da *Combretum leprosum*.

Palavras-chave: *Combretum leprosum*, nocicepção, glutamato, serotonina, opióide.

ABSTRACT

Combretum leprosum (Combretaceae) is used in popular medicine for the treatment of hemorrhages, wound healing and as a sedative. It is widely distributed in the North of Brazil, where it is known commonly as "cipoaba, mofumbo and mufumbo". The present study examined the possible antinociceptive action of the ethanolic extract (EECL) and the two triterpenes obtained from the flowers of the *C. leprosum* in chemical and thermal behavioural models of pain in mice. The EECL, given orally, produced a marked and a dose-related antinociception against the chemical models of pain, such as acetic acid, formalin, capsaicin and glutamate tests. In addition, the EECL also caused a significant and marked increase in the latency to respond in the thermal model of pain, hot-plate test at 50°C. The antinociception caused by EECL was significantly attenuated by i.p. treatment with naloxone (opioid receptor antagonist), ketanserin (a 5-HT_{2A} receptor antagonist) and pindolol (a 5-HT_{1A/1B} receptor antagonist and β-adrenoceptor antagonist). In contrast, EECL antinociception was neither affected by i.p. treatment with L-arginine (nitric oxide precursor) and ondansetron (a 5-HT₃ receptor antagonist) nor associated with nonspecific effects such as muscle relaxation or sedation. The triterpenes, 3β,6β,16β-trihydroxylup-20(29)-ene (TTHP) and arjunolic acid, given by i.p. or orally, produced a marked and a dose-related antinociception against glutamate-induced pain. Moreover, TTHP also caused inhibition of the nociception induced by intrathecal administration of an ionotropic glutamate agonist (NMDA), without affecting nociceptive responses induced by metabotropic (trans-ACPD) and ionotropic (AMPA e kainate) agonists. Together, these results indicate that the ethanolic extract and its active compounds produce dose-related antinociception in several models of chemical pain. Finally, an interaction with opioid, serotonergic (i.e. through 5-HT_{2A} and 5-HT_{1A/1B} receptors) and glutamatergic (through NMDA receptors) systems seems to contribute to the mechanisms underlying the antinociceptive action of *C. leprosum*.

Key - words: *Combretum leprosum*, nocicepcion, glutamate, serotonin, opioid.

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| | LISTA DE FIGURAS | 11 |
| | LISTA DE ABREVIATURAS | 12 |
| 1 | INTRODUÇÃO | 14 |
| 1.1. | Produtos naturais | 14 |
| 1.2. | Plantas do gênero <i>Combretum</i> | 16 |
| 1.3. | <i>Combretum leprosum</i> | 18 |
| 1.4. | Mecanismos envolvidos na transmissão da dor..... | 20 |
| 2 | JUSTIFICATIVA | 24 |
| 3 | OBJETIVOS | 25 |
| 3.1. | Objetivo geral | 25 |
| 3.2. | Objetivos específicos | 25 |
| 4 | MATERIAL e MÉTODOS | 26 |
| 4.1. | Animais | 26 |
| 4.2. | Classificação botânica | 26 |
| 4.3. | Análise química | 26 |
| 4.3.1. | Isolamento, purificação e identificação química dos compostos .. | 26 |
| 4.4. | Análise farmacológica | 27 |
| 4.4.1. | Vias de administração | 27 |
| 4.4.2. | Atividade antinociceptiva | 27 |
| 4.4.2.1. | Nocicepção induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético em camundongos | 28 |
| 4.4.2.2. | Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos | 28 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.4.2.3. | Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos | 29 |
| 4.4.2.4. | Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos | 30 |
| 4.4.2.5. | Teste da “Placa Quente” | 30 |
| 4.4.2.6. | Efeito sobre a performance motora no modelo do “Rota-rod” | 31 |
| 4.4.3. | Estudo do possível mecanismo de ação antinociceptivo do EECL e triterpeno | 32 |
| 4.4.3.1. | Participação do sistema opióide | 32 |
| 4.4.3.2. | Participação da via L-arginina-óxido nítrico | 32 |
| 4.4.3.3. | Participação do sistema serotoninérgico | 33 |
| 4.4.3.4. | Participação do sistema glutamatérgico | 33 |
| 4.5. | Drogas e soluções usadas | 34 |
| 4.6. | Análise estatística | 35 |
| 5 | RESULTADOS | 36 |
| 5.1. | Nocicepção induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético em camundongos | 36 |
| 5.2. | Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos | 36 |
| 5.3. | Curva tempo-resposta do EECL no modelo de nocicepção induzido pela formalina | 37 |
| 5.4. | Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos | 38 |
| 5.5. | Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos | 38 |
| 5.6. | Efeito do EECL no teste da placa quente (55 ⁰ C e 50 ⁰ C) em camundongos | 41 |
| 5.7. | Efeito do EECL sobre a performance motora dos animais no modelo do “Rota-rod” | 41 |
| 5.8. | Análise do mecanismo de ação antinociceptiva do EECL e do Triterpeno | 42 |
| 5.8.1. | Participação do sistema opióide | 42 |
| 5.8.2. | Efeito do pré-tratamento com L-arginina | 43 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 5.8.3. | Participação do sistema serotoninérgico | 43 |
| 5.8.4. | Participação do sistema glutamatérgico | 44 |
| 5.8.4.1. | Efeito do EECL administrado por via oral sobre a nocicepção induzida pela administração intratecal de glutamato | 44 |
| 5.8.4.2. | Efeito do triterpeno TTHP na nocicepção induzida pelo glutamato | 45 |
| 5.8.4.3. | Efeito do triterpeno TTHP sobre a nocicepção causada pelos agonistas glutamatérgicos seletivos | 46 |
| 6 | DISCUSSÃO | 47 |
| 7 | CONCLUSÕES | 58 |
| 8 | REFERÊNCIAS | 59 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------|--|----|
| Figura 1: | Partes aéreas da <i>Combretum leprosum</i> (Mufumbo) | 18 |
| Figura 2: | Triterpenos e Flavonóides obtidos do <i>Combretum leprosum</i> | 19 |
| Figura 3: | Efeito do EECL no modelo de nocicepção induzido pelo ácido acético..... | 36 |
| Figura 4: | Efeito do EECL no modelo de nocicepção induzido pela formalina .. | 37 |
| Figura 5: | Curva tempo-resposta do EECL no modelo de nocicepção induzido pela formalina | 37 |
| Figura 6: | Efeito do EECL no modelo de nocicepção induzida pela capsaicina | 38 |
| Figura 7: | Efeito do EECL no modelo de nocicepção induzido pelo glutamato | 38 |
| Figura 8: | Efeito do Triterpeno TTHP (v.o., i.p.) no modelo de nocicepção induzido pelo glutamato..... | 39 |
| Figura 9: | Efeito do Triterpeno TTHP (i.pl, i.t.) no modelo de nocicepção induzido pelo glutamato..... | 40 |
| Figura 10: | Efeito do Ácido arjunólico no modelo de nocicepção induzido pelo glutamato | 40 |
| Figura 11: | Efeito do EECL no teste da placa quente | 41 |
| Figura 12: | Efeito do EECL sobre a performance motora dos animais no modelo do "Rota-rod" | 42 |
| Figura 13: | Participação do sistema opióide | 42 |
| Figura 14: | Efeito do pré-tratamento com L-arginina | 43 |
| Figura 15: | Participação do sistema serotoninérgico | 44 |
| Figura 16: | Efeito do EECL sobre a nocicepção induzida pela administração intratecal de glutamato | 45 |
| Figura 17: | Efeito do triterpeno TTHP na nocicepção induzida pelo glutamato . | 45 |
| Figura 18: | Efeito do triterpeno TTHP sobre a nocicepção causada pelos agonistas glutamatérgicos seletivos | 46 |

LISTA DE ABREVIATURAS

GMPc - guanosina monofosfato cíclico

AMPc - monofosfato cíclico de 3' 5'-adenosina

NOS - sintase do óxido nítrico

INOS - óxido nítrico sintase induzida

COX - ciclooxigenase

OMS - Organização Mundial da Saúde

SNC - sistema nervoso central

PMN - nociceptores polimodais

PAFs - fibras aferentes primárias

NMR - núcleo magno da rafe

NRG - núcleo reticular gigantocelular

BK - bradicinina

5-HT - serotonina

PGs - prostaglandinas

SP - substância P

CEUA - Comitê de Ética do Uso de Animais

TTHP - triterpeno 3 β ,6 β ,16 β - trihidroxilup-20(29)-eno

EECL - extrato etanólico das flores do *Combretum leprosum*

EE - extrato etanólico

v.o. - via oral

p.o. – via oral

i.p. - via intraperitoneal

i.pl. - via intraplantar

s.c. - via subcutânea

i.t. - via intratecal

L-NOARG - N^G -nitro-L-arginina

AAE - aminoácidos excitatórios

trans-ACPD - (1S,3R)-ACPD

AMPA - α -amino-3-hidroxi-5metil-4-isoxazolepropionato

NMDA -N-metil-D-aspartato

DMSO - dimetilsulfóxido

DI₅₀S – dose do extrato ou compostos que reduziram a resposta em 50% em relação ao grupo controle

MIC - concentração mínima inibitória

1 INTRODUÇÃO

1.1. Produtos naturais

A utilização de produtos naturais como matéria-prima para a produção de substâncias com atividade biológica, especialmente os fármacos, tem sido extensamente relatado ao longo dos anos (SIMÕES *et al*, 1999).

A importância histórica das substâncias ativas obtidas de plantas como protótipo para o desenvolvimento de medicamentos, não foi representada apenas pelo surgimento de grupos novos de compostos, mas proporcionou a identificação de uma nova possibilidade de tratamento terapêutico. As opções de intervenções terapêuticas seriam muito escassas, se não fosse a descoberta dessas substâncias ativas provenientes das plantas medicinais (SIMÕES *et al*, 1999).

Desta forma, as plantas medicinais constituem uma fonte renovável de onde podem ser obtidos novos e eficazes medicamentos. A indicação de plantas medicinais aumenta a opção terapêutica, ofertando medicamentos equivalentes, também registrados, com espectros de ação mais adequados e, talvez com indicações terapêuticas complementares às medicações existentes sem substituir os medicamentos já comercializados e registrados (DI STASI, 1995; SIMÕES *et al*, 1999).

É estimado que cerca de 25% de todos os medicamentos modernos são diretamente ou indiretamente derivados de plantas. Outro aspecto importante deve-se ao crescente interesse mundial nos últimos anos do uso de fitofármacos como medicamentos complementares ou alternativos na prevenção ou alívio de muitas doenças. Por exemplo, 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 da Saúde (OMS), devido a pobreza e a 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).

Neste sentido, os produtos naturais têm contribuído fortemente no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas através de seus metabólitos secundários. Estes são conhecidos por atuar de forma direta ou indireta no

organismo podendo inibir ou ativar importantes alvos moleculares e celulares, por exemplo: mediadores inflamatórios (metabólitos do ácido araquidônico, peptídeos, citocinas, aminoácidos excitatórios, entre outros), sobre a produção ou ação de segundos mensageiros (como GMPc, AMPc, proteínas quinases e cálcio, etc.), na expressão e transcrição de fatores como AP-1, NF- κ B, e proto-oncogenes (c-jun, c-fos, and c-myc), e na expressão de moléculas pró-inflamatórias como sintase do óxido nítrico (NOS), ciclooxigenase (COX-2), citocinas (IL-1 β , TNF- α , etc.), neuropeptídeos e proteases (CALIXTO *et al.*, 2003).

Como descrito acima, os produtos naturais podem atuar em vários sistemas do organismo auxiliando, desta forma, na compreensão de mecanismos moleculares ou bioquímicos envolvidos em muitos processos fisiológicos ou fisiopatológicos (CALIXTO *et al.*, 1998).

Todavia, os dados existentes na literatura sobre a atividade biológica de plantas preconizadas pela população, denominadas de Plantas Medicinais, são insuficientes para garantir sua qualidade, eficácia e segurança. Além disso, as plantas contêm milhares de constituintes dos quais alguns apresentam relativa toxicidade, como as plantas citotóxicas utilizadas no tratamento do câncer, os digitálicos e alguns alcalóides, entre outros. Entretanto, os efeitos adversos dos agentes fitoterápicos são menos freqüentes quando comparados com as drogas sintéticas (CALIXTO, 2000).

No Brasil, aproximadamente 84% das drogas atualmente no mercado são importadas e 60% de todas as drogas processadas são consumidas por 23% da população, o que faz com que os remédios caseiros à base de plantas medicinais sejam ainda a principal fonte de medicamentos para a maioria do povo brasileiro. Assim, é inegável que a maioria da população de baixa renda recorre às plantas medicinais para o tratamento dos seus males (ELISABETSKY e WANNMCHER, 1993; ELISABETSKY, 1999).

Desta forma, nos últimos anos, tem-se evidenciado um crescente aumento no estudo de plantas preconizadas pela medicina popular para validar a sua utilização como fitoterápico seguro e eficaz, tendo em vista que o uso popular de uma determinada planta não é suficiente para validá-la como fitoterápico. Desta forma, o emprego de técnicas modernas de farmacologia, bioquímica, toxicologia e de biologia molecular renovou o interesse na procura de novos medicamentos ou de

protótipos de novos fármacos a partir de produtos naturais (SIMÕES, 1999; CALIXTO *et al.*, 2000).

1.2. Plantas do gênero *Combretum*.

A família Combretaceae consiste em 18 gêneros, o maior deles constituído pelo gênero *Combretum*, o qual contém cerca de 370 espécies amplamente utilizadas na medicina popular. Este gênero, cuja espécie é mais abundante, está espalhado em várias partes da África (McGAW *et al.*, 2001).

A população do sul da África emprega as plantas pertencentes a família Combretaceae para muitos propósitos medicinais como o tratamento de vários tipos de dor (incluindo as dores abdominais, dor nas costas, dor de ouvido, dor de dente e de cabeça), esquistossomose, tosse, resfriados, conjuntivites, diarreia, dismenorréia, parasitoses intestinais, infertilidade na mulher, lepra, pneumonia, mordida de cobra e escorpião, caxumba, sífilis, febre e fraquezas em geral (WATT e BREYER-BRANDWIJK, 1962; KOKWARO, 1976; GELFAND *et al.*, 1985; HUTCHINGS *et al.*, 1996; VAN WYK *et al.*, 1997; McGAW *et al.*, 2001).

Várias investigações sobre a atividade antimicrobiana dos membros da família Combretaceae tem sido realizadas nos últimos anos. Demonstrou-se que a atividade antibacteriana está presente nas folhas, nos ramos e nos frutos e foram isolados três compostos não identificados com atividade antibacteriana das folhas de *Combretum zeyheri* (BREYTENBACH e MALAN, 1989; McGRAW *et al.*, 2001).

Além disso, foi também demonstrado que a *Combretum erythrophyllum* apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Esta atividade parece ser dependente de flavonóides encontrados nesta planta, entre eles destacam-se a apigenina, genkwanina, 5-hidroxi-7,4-metoxiflavona, rhamnocitrina; kaempferol, quercetina-5,3-dimetiléter e rhamnazinae, entre outros (ALEXANDER *et al.*, 1992; MARTINI e ELOFF, 1998; MARTINI *et al.*, 2004). É importante salientar que todos estes compostos apresentaram atividade significativa contra o *Vibrio cholerae* e *Enterococcus faecalis*, com valores de MIC (mínima concentração inibitória) na faixa de 25-50 µg/ml (MARTINI *et al.*, 2004).

Os flavonóides isolados da *Combretum erythrophyllum* não são potencialmente tóxicos para as células humanas, com exceção do flavonóide 5-hidroxi-7,4-metoxi-flavona. Este composto é potencialmente tóxico para as células

humanas e exibe restrita atividade antioxidante, enquanto que a rhamnocitrina e a rhamnazina apresentam intensa atividade antioxidante. Os flavonóides genkwanina, rhamnocitrina, quercetin-5,3-dimetiléter e rhamnazina apresentaram alta atividade antiinflamatória quando comparados com o ácido mefenâmico (controle positivo) (MARTINI *et al.*, 2004).

Katerere *et al* (2003) mostraram que quatro triterpenos pentacíclicos isolados das folhas da espécie *Combretum imberbe*, dos quais dois são novos glicosídeos derivados do ácido $1\alpha,3\beta,23$ -trihidroxiolean-12-en-29-oico (ácido hidroxiimbérbico), também apresentaram atividade antibacteriana e, particularmente, o ácido imbérbico apresentou potente atividade contra o *Mycobacterium fortuitum* e *Staphylococcus aureus*.

Além disso, foi demonstrada atividade antifúngica de sete espécies da família Combretaceae e sugeriu-se que esta atividade seria devido à presença de taninos e saponinas presentes nos extratos destas espécies de plantas (BABA-MOUSSA *et al.*, 1999).

Outros estudos têm demonstrado a atividade antiinflamatória de algumas espécies deste gênero. Entre estas, destaca-se a *Combretum micranthum* que demonstrou atividade antiinflamatória com o extrato metanólico das folhas, nas doses de 50 e 100 mg/kg, no modelo de edema de pata induzido por carragenina; e também, nas mesmas doses, o extrato inibiu o aumento da permeabilidade vascular induzida pelo ácido acético e na dose de 100 mg/kg inibiu a formação de granuloma em ratos de forma similar a indometacina (5 mg/kg) (OLAJIDE *et al.*, 2003).

Outras espécies que apresentaram alta atividade antiinflamatória foram a *C. apiculatum*, *C. mossambicense*, *C. imberbe* e *C. molle*. Essa última espécie, juntamente com a *C. apiculatum*, também apresenta atividade antibacteriana significativa (McGRAW *et al.*, 2001).

A atividade antimetabólica das plantas do gênero *Combretum* também foi avaliada, sendo que as combretastatinas, isoladas das árvores do *Combretum caffrum*, associadas ao fosfato como pró-drogas, têm sido eficazes quando testadas clinicamente no tratamento de tumores sólidos. Conseqüentemente, esses compostos são mais interessantes do que outros agentes anti-mitóticos e outra vantagem é que também são inibidores da angiogênese. Além disso, a sua eficácia está sendo avaliada no tratamento da retinopatia diabética, que é uma das maiores causas de cegueira (CIRLA e MANN, 2003).

Com a finalidade de avaliar o potencial genotóxico de algumas plantas medicinais do sul da África, Elgorashi *et al* (2003) selecionaram o extrato de 51 plantas medicinais e demonstraram que algumas espécies do gênero *Combretum* apresentam efeito mutagênico e toxicidade. Estes resultados são importantes devido ao uso extensivo destas plantas pela população e mostram a necessidade de mais estudos sobre a segurança e efetividade destas espécies.

Trabalhos fitoquímicos têm sido realizados com o *Combretum* e diferentes espécies do gênero, as quais possuem vários compostos químicos bioativos (MASIKA e AFOLAYAN, 2002). Alguns desses compostos são: cicloartano, damarano e oleananos tripernóides, avonóides, dibenzils aromáticos, estilbenos, fenantrenos, lignanas e aminoácidos os quais são encontrados em várias espécies do gênero *Combretum* (CHOWDHURY e ISLAM, 2004).

1.3. *Combretum leprosum*

A *Combretum leprosum* pertence à família Combretaceae, sendo conhecida popularmente como cipoaba, mofumbo e mufumbo (MATOS, 2003).

A figura 1 mostra a planta *Combretum leprosum*, a qual encontra-se amplamente distribuída na região norte do Brasil e é utilizada popularmente para o tratamento de hemorragias, como sedativo e cicatrizante (LIRA *et al*, 2002; LIRA e SILVEIRA, 2003).



Figura 1. Partes aéreas da *Combretum leprosum* (Mufumbo).
Fonte: Bruening, M. H. (1990).

Facundo *et al* (1993) isolaram alguns compostos presentes na *Combretum leprosum*, sendo um triterpeno inédito identificado como 3 β ,6 β ,16 β -trihidroxilup-20(29)-eno e dois já conhecidos e denominados de ácido arjunólico e ácido móllico,

além de dois flavonóides denominados de 3-o-metilquercetina e 3-o- α -L-rhamnopyranosilquercetrina (quercetrina), conforme apresentado na figura 2.

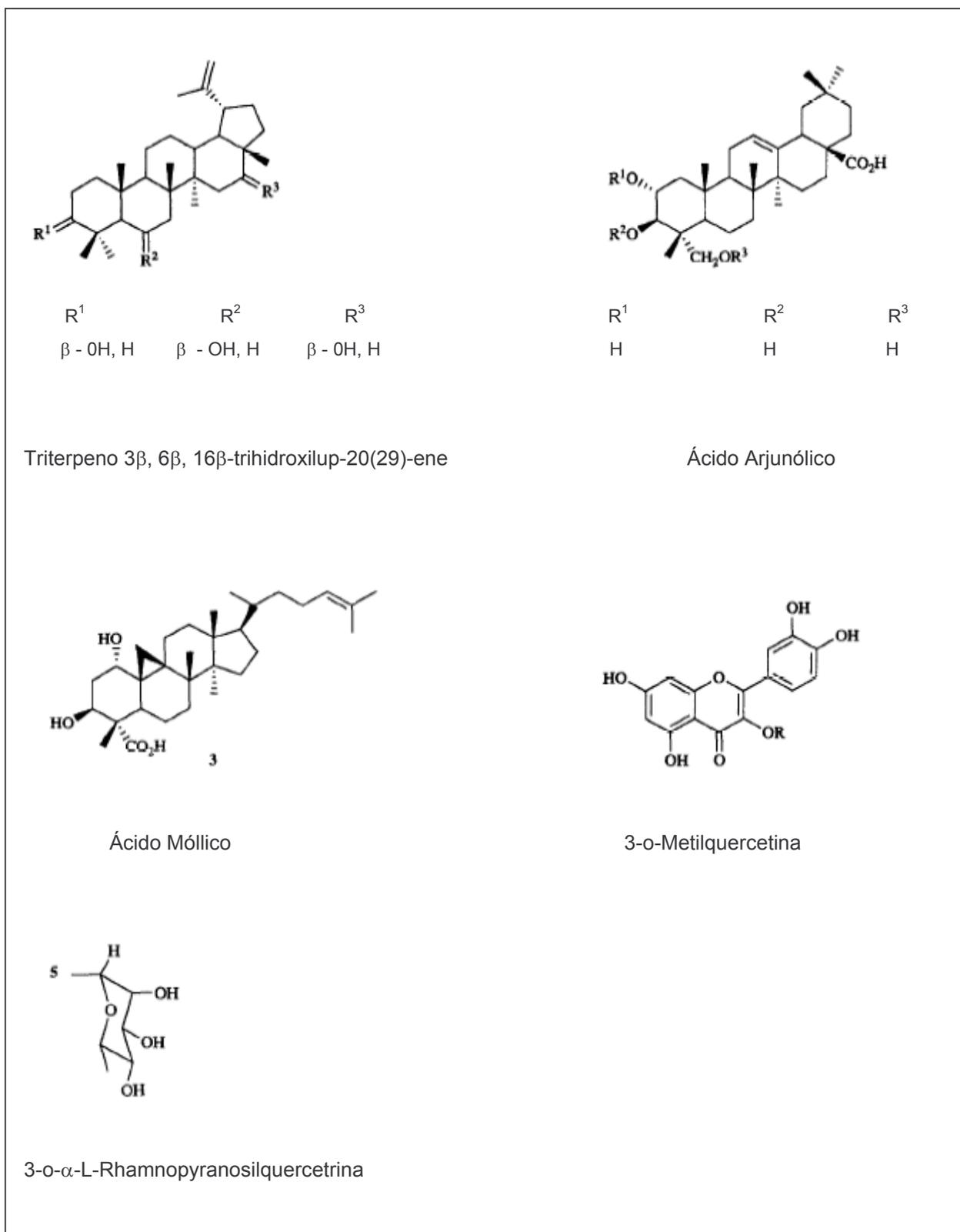


Figura 2. Triterpenos e Flavonóides obtidos do *Combretum leprosum*.
 Fonte: Adaptado de Facundo *et al* (1993).

Estudos preliminares com a *Combretum leprosum* indicam que a planta possui atividade antinociceptiva no teste de imersão da cauda e no teste da formalina. Os resultados mostraram que no teste de imersão da cauda o extrato etanólico apresentou atividade antinociceptiva no primeiro período de observação (30 min) e no teste da formalina o efeito foi observado tanto na primeira fase (0-10 min, dor neurogênica) quanto na segunda fase (20-40 min, dor inflamatória) (LIRA *et al*, 2002).

Além disso, estudos preliminares com as raízes da planta, têm demonstrado que a *Combretum leprosum* e o composto isolado ácido arjunólico apresentam propriedades antiinflamatórias e analgésicas. O ácido arjunólico é o principal composto isolado das raízes e pode ser o princípio ativo responsável pelas atividades observadas no extrato etanólico desta parte da planta. Para a determinação da atividade analgésica e antiinflamatória foram utilizados os seguintes modelos: contorções abdominais induzidas pelo ácido acético e edema de pata induzido pela carragenina (MEDEIROS *et al*, 2003).

1.4. Mecanismos envolvidos na transmissão da dor

A dor é definida pela Associação Internacional para Estudo da Dor como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada com dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal lesão (DICKENSON e BESSON, 1997). É importante salientar que sempre que qualquer tecido estiver lesado, o organismo reage para desencadear o estímulo doloroso como um mecanismo de proteção (GUYTON e HALL, 2002; MILLAN, 1999, 2002).

Entretanto, a dor é uma experiência complexa que não envolve apenas a transdução do estímulo nociceptivo ambiental, mas também cognitivo e emocional processado pelo cérebro (JULIUS e BASBAUM, 2001).

Os receptores da dor 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 e BESSON, 1997).

A dor é usualmente desencadeada pela ativação de nociceptores específicos (dor nociceptiva). Entretanto, ela pode ser resultante de lesão nas fibras sensoriais, ou dano ocasionado no SNC (dor neuropática) (MILLAN, 1999).

Além disso, segundo Dickenson e Besson (1997), algumas alterações podem ocorrer, como o aumento da resposta a um estímulo normalmente doloroso o qual é denominado de hiperalgesia. Esta normalmente é decorrente de importantes mudanças no processo central de sinalização da dor. Outras alterações sensoriais também podem aparecer, entre elas a alodínia que se refere à dor evocada por estímulo inócuo (MILLAN, 1999).

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).

O estímulo doloroso é propagado através de fibras aferentes primárias C ou fibras A- δ . Estas são fibras mielinizadas, que rapidamente conduzem o estímulo. As fibras C são não-mielinizadas e conduzem o estímulo nociceptivo com baixa velocidade; esse grupo é conhecido como nociceptores polimodais C (PMN) (JULIUS e BASBAUM, 2001).

As fibras C e A- δ transferem a informação nociceptiva para a lâmina superficial (lâmina I e II) e para a lâmina profunda (V e VI) no corno dorsal, como também para a lâmina circumcanular (lâmina X). Por outro lado, as fibras A β são fibras de maior calibre, mielinizadas e de rápida condutância e transmitem a informação de estímulos mecânicos inócuos para a lâmina profunda (III-IV) (MILLAN, 2002).

As fibras aferentes primárias (PAFs) podem estimular diretamente neurônios de projeção, os quais retransmitem a mensagem para o cérebro, ou indiretamente enviam a mensagem para outros neurônios de projeção via interneurônios excitatórios. Além disso, as PAFs também podem estimular interneurônios inibitórios os quais interagem com os neurônios de projeção (MILLAN, 2002).

Os nociceptores primários fazem uma sinapse no corno dorsal da medula espinhal com neurônios de segunda ordem, predominantemente na lâmina II (substância gelatinosa) da medula espinhal. Os neurônios de segunda ordem cruzam a medula espinhal para ascender no trato espinotalâmico chegando até suas

fibras terminais localizadas principalmente no tálamo. No tálamo, neurônios de terceira ordem emitem axônios através da cápsula interna ao córtex somatosensor, onde a somatização do estímulo nocivo ocorre, ou emitem axônios ao giro cingulado anterior, onde existe o componente emocional da dor (RUSSO e BROSE, 1998).

Além disso, o trato espinotalâmico parece emitir axônios ao mesencéfalo e a ponte rostral, fazendo sinapses em complexos nucleares, incluindo o núcleo magno da rafe (NMR) e o núcleo reticular gigantocelular (NRG). Ambas as estruturas parecem estar envolvidas na regulação nociceptiva descendente dos neurônios de segunda ordem (RUSSO e BROSE, 1998; BESSON, 1999; MILLAN, 1999).

As vias aferentes da dor são constituídas de diferentes tratos ascendentes que formam dois sistemas filogenéticos distintos. O primeiro, mais antigo, passa através da região medial da medula espinhal, sendo formado pelos tratos: paleoespinotalâmico, espinoreticular, espinomesencefálico, espinoparabrachio-amigdalóide, espinobrachio-hipotalâmico e espinotalâmico. O outro sistema, mais recente, ocupa a região lateral da medula espinhal e consiste no trato neoespinotalâmico, espinocervical e pós-sináptico no corno dorsal (ALMEIDA *et al*, 2004).

As vias descendentes originadas de estruturas cerebrais têm um importante papel na modulação e integração das mensagens nociceptivas no corno dorsal da medula. Vias serotoninérgicas, noradrenérgicas e em menor proporção às vias dopaminérgicas compreendem os maiores componentes dos mecanismos descendentes (MILLAN, 1999).

De fato, vias descendentes também podem modular a nocicepção interagindo com vários elementos neuronais no corno dorsal: (1) terminais das PAFs; (2) neurônios de projeção; (3) interneurônios excitatórios e inibitórios; (4) terminais de outras vias descendentes. É importante mencionar que os neurônios de projeção e interneurônios específicos para a nocicepção, estão predominantemente localizados na lâmina superficial, respondendo somente a estímulos dolorosos, enquanto outros, principalmente na lâmina profunda, são excitados somente por estímulos inócuos (MILLAN, 2002).

Observando os mecanismos envolvidos na transmissão do processo doloroso descrito acima, pode-se afirmar que a dor não é uma sensação uniforme, a qualidade da dor e o início das respostas de proteção são determinados por muitos

fatores dentro da medula espinhal e estruturas do cérebro, envolvidas na integração e modificação da sinalização nociceptiva (DICKENSON e BESSON, 1997).

Neste sentido, existem várias fontes importantes onde os mediadores que participam da resposta nociceptiva são gerados como: tecido lesado, sistema vascular, células imunes, tecidos adjacentes, nervos sensoriais e simpáticos. Esses mediadores atuam em receptores amplamente distribuídos no organismo. Alguns desses receptores são acoplados a proteínas G e induzem a formação de segundos mensageiros. Outros receptores são acoplados a canais iônicos que regulam a permeabilidade e a concentração celular de íons (DICKENSON e BESSON, 1997).

Alguns desses mediadores que estimulam o tipo químico de dor incluem: bradicinina (BK), serotonina (5-HT), histamina, íons potássio, ácidos, acetilcolina e enzimas proteolíticas. Além destas, as prostaglandinas (PGs) e a substância P (SP) acentuam a sensibilidade das terminações da dor (GUYTON e HALL, 2002; MILLAN, 1999, 2002).

Entre esses mediadores, o aminoácido glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central de mamíferos que permite a entrada do sinal nociceptivo para a medula espinhal e é encontrado nos terminais nervosos dos neurônios nociceptivos espinhais (WESTLUND *et al.*, 1992; BROMAN e ADAHL, 1994, VALLANO, 1998).

O glutamato pode ativar tanto receptores glutamatérgicos ionotrópicos (GluR_is), dos quais incluem os receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-izoxazolepropionato (AMPA) e cainato, quanto receptores glutamatérgicos metabotrópicos (GluR_ms), que são acoplados a proteína G. Oito subtipos de receptores metabotrópicos foram clonados e denominados GluR_ms 1-8, sendo classificados em diferentes grupos: grupo I (GluR_ms 1 e 5) que levam a estimulação da fosfolipase C, II (GluR_ms 2 e 3) e III (GluR_ms 4, 5, 6, 7 e 8) que inibem a atividade da adenilato ciclase (GAVIRAGHI, 2000).

Uma família de receptores de glutamato corresponde aos receptores ativados pelo N-metil-D-aspartato (NMDA), um análogo ao glutamato. Estes receptores (NR1, NR2A, NR2B, NR2C e NR2D) são coletivamente definidos como receptores NMDA (DANBOLT, 2000). Evidências experimentais sugerem que o receptor NMDA está envolvido na sensibilização central e na hiperalgesia secundária (DRAY *et al.*, 1994; MILLAN, 1999).

2 JUSTIFICATIVA

A procura por constituintes bioativos de plantas superiores apresenta como possibilidade à descoberta de compostos que atuam em processos inflamatórios acompanhados de dor. O uso de extratos, padronizados e de comprovada ação, poderia beneficiar a população carente devido ao menor custo, ao mesmo tempo em que proporcionariam a descoberta de novos compostos de interesse terapêutico ou de protótipos que possibilitariam a síntese de moléculas com potencial interesse pelas indústrias farmacêuticas.

Neste sentido, o presente estudo se justifica tendo em vista que estudos pré-clínicos prévios sugerem que o extrato da *Combretum leprosum* apresenta atividade antinociceptiva, justificando sua utilização na medicina popular. Contudo, estudos adicionais são necessários para confirmar a importante atividade antinociceptiva da *C. leprosum*, bem como para analisar os possíveis mecanismos de ação responsáveis pelo seu efeito antinociceptivo.

3 OBJETIVOS

3.1. Geral:

Avaliar a possível atividade antinociceptiva do extrato etanólico e de princípios ativos obtidos das flores da *Combretum leprosum* em camundongos.

3.2. Específicos:

✓ Verificar o efeito antinociceptivo do extrato etanólico obtido das flores da *Combretum leprosum* em modelos de nocicepção química (testes do ácido acético, formalina, capsaicina e glutamato) e térmica (modelo da placa quente) em camundongos.

✓ Verificar o efeito dos princípios ativos (ácido arjunólico e triterpeno) isolados da *Combretum leprosum* sobre a nocicepção química induzida pelo glutamato.

✓ Verificar o efeito da *Combretum leprosum* sobre a performance motora dos camundongos.

✓ Verificar, com o emprego de técnicas farmacológicas “in vivo”, o(s) possível (is) mecanismo(s) envolvido(s) no(s) efeito(s) antinociceptivo(s) da *Combretum leprosum* através da utilização de agonistas e antagonistas seletivos de vários receptores que modulam a nocicepção.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss adultos (18 a 35g) de ambos os sexos, distribuídos aleatoriamente entre os grupos, provenientes do Biotério Central do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná e do Biotério Central do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina.

Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética do Uso de Animais (CEUA) da UFPR (protocolo nº 23075.6597/2004 - 52/085). Os animais foram mantidos em temperatura constante ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), com umidade relativa do ar entre 30% e 70%, ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas das 7h às 19h) e tratados com água e ração *ad libitum*. Permaneceram no laboratório por um período de adaptação de pelo menos 1h antes da realização dos experimentos, os quais foram conduzidos entre 8 e 17h à temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$. O número de animais e a intensidade do estímulo nocivo utilizado foram o mínimo necessário para demonstrar os efeitos do tratamento com as drogas.

Os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas internacionais para o estudo com os animais de laboratório (ZIMMERNANN, 1983).

4.2. Classificação botânica da planta estudada

A *Combretum leprosum* foi coletada em Cocalzinho-Viçosa, Estado do Ceará, Brasil, em maio de 2001, e identificada pelo Prof. Afrânio Fernandes (Universidade Federal do Ceará). Um exemplar da espécie (n. 12446) foi depositado no Herbário Prisco Bezerra no Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará.

4.3. Análise química

4.3.1. Isolamento, purificação e identificação química dos compostos.

Os compostos foram isolados e identificados pelo grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Valdir Facundo do Departamento de Química Orgânica da Universidade Federal do Ceará. As flores secas e trituradas foram submetidas à extração com etanol a temperatura ambiente (três extrações sucessivas utilizando 5

litros de etanol em cada extração). Foi feita a destilação do solvente sob pressão reduzida fornecendo 58,30g de extrato.

Parte do extrato etanólico (32,00g) foi submetida a um fracionamento em coluna filtrante, utilizando como adsorvente sílica gel e hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol como fase eluente, obtendo-se desta forma os respectivos eluatos.

O eluato clorofórmio foi submetido a uma cromatografia em coluna de sílica utilizando-se como fase fixa gel H (artigo 7761) da Merck e como fase móvel uma mistura de hexano e acetato de etila, em polaridade crescente. Em quatro frações (27-30), extraídas com hexano:acetato de etila (30:70) observou-se a presença de precipitado branco, o qual, por meio de recristalização em éter etílico foi possível purificar uma substância que foi identificada por métodos químicos e espectroscópicos apropriados como sendo o triterpeno $3\beta,6\beta,16\beta$ -trihidroxilup-20(29)-eno (TTHP) e o ácido arjunólico (FACUNDO *et al.*, 2003).

4.4. Análise farmacológica

4.4.1. Vias de administração: Com o objetivo de evidenciar uma ação antinociceptiva sistêmica, o extrato etanólico das flores de *Combretum leprosum* (EECL) foi administrado pela via oral e os compostos (triterpeno TTHP e ácido arjunólico) foram administrados tanto pela via oral quanto pela intraperitoneal. Os animais foram pré-tratados pela via oral e intraperitoneal, com diferentes doses do extrato ou compostos, 60 e 30 min antes do agente irritante, respectivamente. Além disso, foi observado o possível efeito antinociceptivo do triterpeno TTHP, tanto periférico (administrado em associação com o agente irritante) quanto central (administrado pela via intratecal).

4.4.2. A atividade antinociceptiva do EECL e dos compostos isolados foi avaliada através da utilização dos modelos de nocicepção induzidos pelo ácido acético (0,8%, 0,1 ml/10g), formalina (2,5%, 20 μ l/pata), glutamato (10 μ mol/pata), capsaicina (1,6 μ g/pata) e placa-quente ($50\pm 1^{\circ}\text{C}$) em camundongos (SANTOS *et al.*, 1999; BEIRITH *et al.*, 2002).

4.4.2.1. Teste das contorções abdominais induzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético em camundongos.

Verificou-se o efeito antinociceptivo do EECL no teste das contorções abdominais, que embora seja um modelo de nocicepção simples e pouco específico, permite avaliar a atividade antinociceptiva de várias substâncias que atuam tanto em nível central quanto periférico. A resposta nociceptiva foi induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético (0,8%) diluído em solução salina (0,9%). 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; BENTLEY *et al.*, 1981).

Grupos de animais foram pré-tratados por via oral com o EECL (10, 30, 100, 300 e 1000 mg/kg), 1h antes da injeção do ácido acético. O grupo controle recebeu o mesmo volume do veículo (10 ml/kg) utilizado para diluir o extrato. 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 20min. A atividade antinociceptiva foi determinada tomando-se como base a inibição do número das contorções abdominais dos animais pré-tratados com o extrato comparado com o número das contorções abdominais dos animais controles (veículo).

4.4.2.2. Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos.

Para confirmação do efeito antinociceptivo do EECL foi utilizado o teste de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina. Este modelo é mais específico que o teste de contorções abdominais, permitindo avaliar dois tipos de dor: a dor de origem neurogênica (estimulação direta dos neurônios nociceptivos) e a dor inflamatória (caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios). Os animais receberam 20 μ l de formalina a 2,5% (0,92% de formaldeído) na região plantar da pata posterior direita. Logo após a injeção da formalina os animais foram colocados individualmente dentro de um funil de vidro, ao lado de um espelho para facilitar a observação. Após, foi cronometrado durante 30min o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com formalina, sendo esse

período considerado como indicativo de dor. Esse modelo permite evidenciar duas fases de sensibilidade dolorosa: a primeira fase que ocorre durante os primeiros 5 min após a injeção da formalina (nocicepção de origem neurogênica) e a segunda fase que ocorre entre 15 a 30min após a formalina, representando a resposta tônica à dor, acompanhada de uma resposta inflamatória relacionada à liberação de mediadores inflamatórios (HUNSKAAR e HOLE, 1987).

Grupos de animais foram tratados com o EECL (10, 30, 100 e 300 mg/kg), 1 h antes da injeção da formalina. Os animais controles receberam igual volume do veículo utilizado para diluir o extrato.

4.4.2.3. Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos.

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

Os animais foram colocados individualmente dentro de um funil de vidro transparente por um período de adaptação de, no mínimo, 20min. Após, cada animal recebeu intraplantarmente 20 μ l de solução de capsaicina (1,6 μ g/pata) na pata posterior direita, sendo que o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com capsaicina foi cronometrado por um período de 5min e considerado como indicativo de nocicepção. Grupos de animais foram tratados com o EECL (10, 30, 100, 300 e 1000 mg/kg) 1h antes da injeção da capsaicina. Os animais controles receberam igual volume dos veículos utilizado para diluir o extrato (SAKURADA *et al.*, 1992; 1993).

4.4.2.4. Nociceção induzida pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos.

Para testar se os aminoácidos excitatórios estão envolvidos no efeito antinociceptivo do EECL, o extrato foi administrado por via oral e analisado na nociceção induzida pelo glutamato (BEIRITH *et al.*, 2002).

Os animais receberam 20 μ l de solução de glutamato (10 μ mol/pata) dissolvido em salina na superfície plantar da pata traseira direita. Após, os animais foram colocados individualmente em funis de vidro, e o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada foi cronometrado por um período de 15min. O tempo de lambedura e mordida da pata foi considerado como um indicativo de nociceção.

Grupos de animais foram tratados com o EECL (10, 30, 100 e 300 mg/kg) por via oral, com o TTHP (1, 3, 10 e 30 mg/kg) por via oral e intraperitoneal e com o ácido arjunólico (3, 10, 30 e 100 mg/kg) por via intraperitoneal antes da injeção de glutamato. Os animais controle receberam igual volume de veículos utilizado para diluir o extrato e compostos.

Com o objetivo de evidenciar uma ação periférica do triterpeno TTHP na nociceção induzida pelo glutamato, grupos de animais foram tratados com o TTHP (3-30 μ g/pata), em associação com o irritante, e após foi observado o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com glutamato. Além disso, também observou um possível efeito central do triterpeno TTHP, sendo que o mesmo foi administrado via intratecal (10-300 μ g/sítio), como descrito anteriormente por Hylden e Wilcox (1980), 15min antes da injeção de glutamato. Para isto os animais foram imobilizados manualmente, e uma agulha conectada a uma microseringa de 50 μ l, foi inserida através da pele entre as vértebras L₅ e L₆ dentro do espaço subdural, para a administração de um volume de 5 μ L da solução contendo o TTHP ou veículo.

4.4.2.5. Teste da "Placa-Quente".

A atividade antinociceptiva do EECL foi analisada no teste da placa quente, que é um modelo de dor muito sensível para drogas que atuam centralmente como a morfina e seus derivados. Para isso, os animais foram colocados dentro de um

cilindro de acrílico sobre uma superfície de uma placa de metal previamente aquecida a $50\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $55\pm 1^{\circ}\text{C}$ utilizando-se o aparelho de placa quente (Ugo Basile, Model-DS 37). O tempo em segundos que o animal levou para lambe, morder ou levantar as patas dianteiras sobre a placa previamente aquecida, foi cronometrado e considerado como indicativo de efeito nociceptivo conforme descrito anteriormente (EDDY e LEIMBACK, 1953).

Cada animal foi selecionado conforme sua reatividade ao modelo, sendo desprezados aqueles que permaneceram acima de 15 ou 8s na placa aquecida sem reagir ao estímulo térmico na temperatura de $50\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $55\pm 1^{\circ}\text{C}$, respectivamente. O tempo máximo permitido de permanência dos animais no aparelho de placa quente foi de 30s para evitar danos teciduais aos animais, o qual foi considerado como índice total de analgesia.

Os animais foram pré-tratados 1h antes do experimento com o EECL (10, 30, 100 e 300 mg/kg) ou 15min antes com o fentanil (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, s.c., utilizado como controle positivo). O tempo de permanência dos animais na placa quente foi convertido em dados percentuais, sendo utilizada a seguinte fórmula: percentagem de efeito máximo (PEM)= $\frac{\text{TF (tempo final)} - \text{TI (tempo inicial)}}{30 - \text{TI (tempo inicial)}}$ (adaptada de AANONSEN e WILCOX, 1987).

4.4.2.6. Efeito sobre a performance motora no modelo do “Rota-rod”.

Com o objetivo de evidenciar o possível efeito depressor do EECL sobre o SNC ou periférico foi empregado o teste do “Rota-rod”, que analisa a performance motora do animal (DUHAM e MIYA, 1957).

O aparelho é constituído de uma barra de 2,5 cm de diâmetro, localizada a 25 cm de altura, subdividida em 6 compartimentos que giram a 22 r.p.m. Os animais foram selecionados em sessões de 1min de duração, 24h antes da administração dos tratamentos, sendo escolhidos aqueles que permaneceram na barra giratória por esse período. No dia do teste, os animais foram pré-tratados 1h antes do experimento com o EECL (10, 30, 100 e 300 mg/kg) ou 30min antes com o diazepam (2 mg/kg, i.p., utilizado como controle positivo). O resultado foi expresso pelo tempo que os animais permaneceram sobre o aparelho. O tempo de corte

usado foi de 1min. Entretanto, quando ocorria queda dos animais do aparelho eram feitas três reconduções, no máximo, à barra com um tempo de corte de 3min.

4.4.3. Estudo do possível mecanismo de ação antinociceptivo do EECL e triterpeno TTHP.

Nesta etapa do trabalho procuramos analisar o(s) possível(eis) mecanismos de ação envolvido(s) na atividade antinociceptiva causada pelo EECL ou triterpeno TTHP. Com esta finalidade, analisou-se o possível envolvimento com o sistema opióide, serotoninérgico, nitrérgico entre outros de acordo com o método descrito por Santos *et al.* (1999) e Mendes *et al.* (2000). Para isso, foram realizados ensaios farmacológicos “in vivo” utilizando vários agonistas e antagonistas específicos ou inibidores enzimáticos e o tratamento posterior com o EECL e o triterpeno TTHP. A reversão ou não do efeito antinociceptivo foi analisada na nocicepção induzida pelo glutamato.

4.4.3.1. Participação do sistema opióide.

Com o objetivo de avaliar a participação do sistema opióide sobre o efeito antinociceptivo do EECL, grupos distintos de animais foram pré-tratados com antagonista opióide não seletivo, naloxona (1 mg/kg, i.p.) 15 min antes da administração do EECL (100 mg/kg, v.o.) ou de morfina (5 mg/kg, s.c.), utilizada como controle positivo. Decorridos 1h ou 30min após a administração do EECL ou da morfina respectivamente, foi avaliado o efeito desse tratamento em relação a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato. Os grupos utilizados como controle foram tratados com o EECL (100 mg/kg, v.o.), veículo (utilizado para diluir o extrato), morfina (5 mg/kg, s.c.) ou naloxona (1 mg/kg, i.p.), 60 e 30min antes da injeção de glutamato.

4.4.3.2. Participação da via L-arginina-óxido nítrico.

Para avaliar a possível participação da via da L-arginina-óxido nítrico no efeito antinociceptivo causado pelo EECL, os animais foram pré-tratados com o precursor do óxido nítrico, a L-arginina (600 mg/kg, i.p.), e após 15min receberam o EECL (100

mg/kg, v.o.) ou N^G -nitro-L-arginina (L-NOARG, 75 mg/kg, i.p., inibidor da enzima óxido nítrico sintase) (SANTOS *et al.*, 1995b; VAZ *et al.*, 1996; BEIRITH *et al.*, 1998).

Decorridos 1h ou 30min após o tratamento com o EECL ou L-NOARG respectivamente, os animais foram analisados na nocicepção induzida pela injeção de glutamato. Os animais controles foram tratados com o EECL (100 mg/kg, v.o., 1h antes), veículo (v.o., 1h antes), L-arginina (600 mg/kg, i.p., 30 min antes) ou L-NOARG (75 mg/kg, i.p., 30 min antes) antes da injeção de glutamato.

4.4.3.3. Participação do sistema serotoninérgico.

Visando investigar a possível participação do sistema serotoninérgico no efeito antinociceptivo causado pelo EECL, os camundongos foram pré-tratados com pindolol (1 mg/kg, i.p., antagonista 5-HT_{1A/1B} e antagonista dos β -adrenoreceptores), cetanserina (0,3 mg/kg, i.p., antagonista preferencial do receptor 5-HT_{2A}) e ondansetron (0,5 mg/kg, i.p., antagonista do receptor 5-HT₃). Transcorridos 15min após o último tratamento, os animais foram tratados com o EECL (100 mg/kg, v.o.) ou veículo (v.o.) e após 1h foram analisados na nocicepção induzida pelo glutamato. Os animais controles foram tratados com: EECL (100 mg/kg, v.o., 1h antes), veículo (10 ml/kg, i.p., 1h antes), pindolol (1 mg/kg, i.p., 30 min antes), cetanserina (0,3 mg/kg, i.p., 30 min antes) ou ondansetron (0,5 mg/kg, i.p., 30 min antes) antes da injeção de glutamato.

4.4.3.4. Participação do sistema glutamatérgico.

A fim de obter informações adicionais sobre a possibilidade dos aminoácidos excitatórios (AAE) estarem envolvidos no mecanismo antinociceptivo do EECL e do triterpeno TTHP foi avaliada a atividade antinociceptiva do EECL (100 mg/kg, v.o.) e do triterpeno TTHP (10 e 30 μ g/sítio, administrado i.t. em associação com os agonistas) sobre a nocicepção direcionada à região dorso/caudal causada pelos agonistas seletivos de receptores glutamatérgicos em camundongos. As injeções foram realizadas em animais conscientes, a fim de eliminar a possível interferência de anestésicos, de acordo com o método descrito por Hylden e Wilcox (1980).

Os animais foram imobilizados manualmente e uma agulha conectada a uma microseringa de 50 μ l, foi inserida através da pele entre as vértebras L₅ e L₆ dentro

do espaço subdural, para a administração de um volume de 5 μ L das drogas ou veículo. A resposta nociceptiva foi induzida pelo trans-ACPD (agonista dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos, 50 nmol/sítio, i.t.) (BOXALL *et al.*, 1998), AMPA (agonista seletivo de receptores AMPA, 135 nmol/site, i.t.) (BRAMBILLA *et al.*, 1996), glutamato (175 nmol/sítio, i.t.), cainato (agonista seletivo de receptores de cainato, 110 pmol/sítio, i.t.) ou N-metil-D-aspartato (agonista seletivo de receptores NMDA, 450 pmol/sítio, i.t.) (URCA e RAIGORODSKY, 1998).

A injeção intratecal dos AAE causa uma reação comportamental de nocicepção direcionada a região dorso/caudal. A reação nociceptiva foi definida como o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo os membros posteriores (patas posteriores, cauda e abdômen) que foi cronometrado no período apropriado para cada droga, como descrito na literatura: glutamato: 3 min; NMDA: 5 min; AMPA: 1 min; cainato: 4 min e trans-ACPD: 15 min (URCA e RAIGORODSKY, 1988; SAKURADA *et al.*, 1992; BRAMBILLA *et al.*, 1996; BOXALL *et al.*, 1998; SCHEIDT *et al.*, 2002).

4.5. Drogas e soluções usadas

Os experimentos realizados utilizaram as seguintes drogas e soluções: ácido acético, formalina e hidrocloreto ou hidrobrometo de morfina (Merck AG, Darmstadt, Alemanha); N^G-nitro-L-arginina (L-NOARG), L-arginina, glutamato, capsaicina, diazepam, fentanil, cainato, substância P, trans-ACPD e pindolol (Sigma Chemical CO., St Luis, MO, EUA); hidrocloreto de naloxona (Research Biochemicals International, Natick, MA, EUA); AMPA e NMDA (Tocris Cookson, Bristol, UK); tartarato de cetanserina (Tocris Cookson Inc., Ellisville, USA); hidrocloreto de ondansetron (Cristália, São Paulo, Brasil).

Os demais reagentes e sais utilizados foram de alto grau de pureza analítica e procedência Merck.

O ácido arjunólico e o triterpeno TTHP foram isolados das flores do *Combretum leprosum* pelo Departamento de Química Orgânica da Universidade Federal do Ceará, Brasil, como descrito anteriormente (FACUNDO *et al.*, 1993).

O EECL e os compostos foram dissolvidos em salina contendo tween 80 e DMSO. A capsaicina foi dissolvida em etanol absoluto e carbonato de sódio (0,5%). A concentração final de etanol, tween 80 e DMSO não excederam a 5%, de modo a

não influenciar no efeito causado pelo extrato e compostos. As demais drogas foram diluídas em salina.

4.6. Análise estatística

Os resultados são apresentados como a média + erro padrão da média, exceto as DI_{50} s (dose do extrato ou compostos que reduziram a resposta em 50% em relação ao grupo controle), que são apresentadas como médias geométricas acompanhadas de seus respectivos limites de confiança, em nível de 95%. As análises estatísticas dos resultados foram realizadas por meio de análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de múltipla comparação utilizando-se o método de Newman Kuels, quando apropriado. Valores de $P < 0,05$ foram considerados como indicativos de significância. As DI_{50} s foram estimadas a partir de experimentos individuais utilizando o método de regressão linear através do programa “Graph Pad Prism”.

5 RESULTADOS

5.1. Nocicepção induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético em camundongos.

Os resultados apresentados na Figura 3 mostram que o EECL administrado por via oral (10 - 1000 mg/kg) causou inibição dependente da dose das contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético em camundongos. O valor médio da DI_{50} (juntamente com seus intervalos de confiança de 95%) foi 131,9 (91,8 – 189,6) mg/kg e inibição de $88 \pm 9\%$ na dose de 1000 mg/kg.

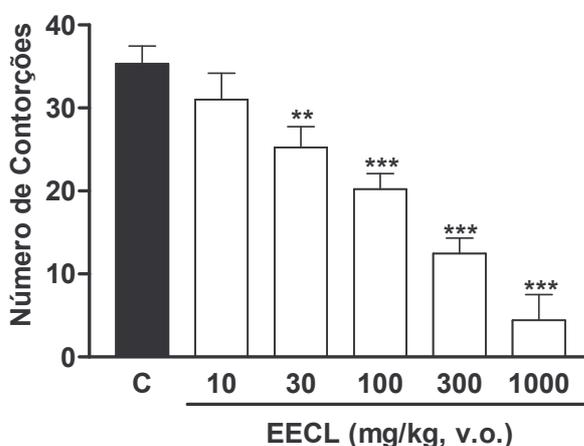


Figura 3. Efeito antinociceptivo do EECL, administrado 1h antes pela via oral, em relação às contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético (0,8%) em camundongos. Cada grupo representa a média do número de contorções de 8 a 12 animais, e as linhas verticais, indicam os E.P.M. Difere significativamente do controle (C), **P < 0,01; ***P < 0,001.

5.2. Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos.

Os resultados apresentados na Figura 4 mostram que o EECL administrado por via oral (10, 30, 100 e 300 mg/kg) causou inibição significativa de ambas as fases da nocicepção induzida pela formalina, sendo, contudo, mais efetivo em relação à segunda fase deste modelo. As DI_{50} s calculadas foram ~ 300 e $88,8$ (59,9 – 131,5) mg/kg e inibição de 45 ± 4 e $75 \pm 6\%$ para a dose de 300 mg/kg, respectivamente, para a primeira e segunda fase da nocicepção induzida pela formalina.

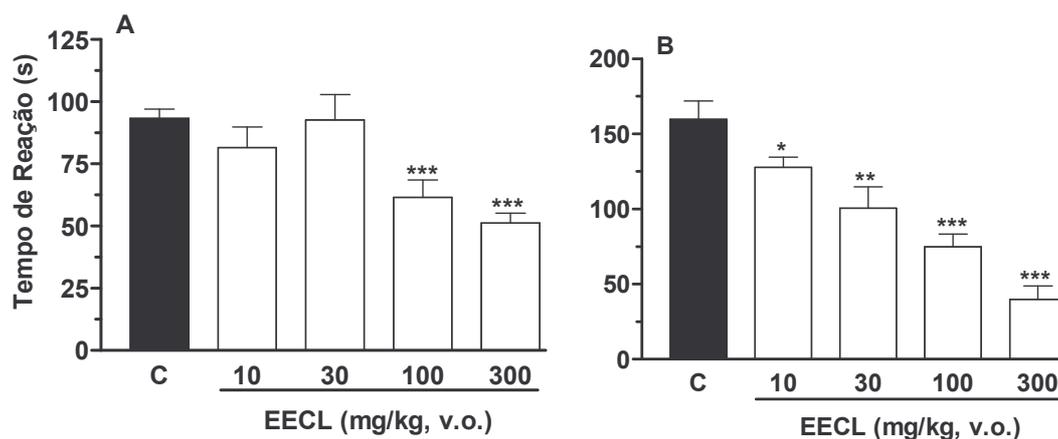


Figura 4. Efeito antinociceptivo do EECL, administrado 1h antes por via oral, em relação à primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela formalina. Cada grupo representa a média do tempo de reação de 8 a 12 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do controle (C), * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

5.3. Curva tempo-resposta do EECL no modelo de nocicepção induzido pela formalina.

Os dados apresentados na Figura 5 confirmam os resultados anteriores que o EECL, administrado na dose de 100 mg/kg, v.o., foi capaz de inibir de forma parcial, porém significativa, a nocicepção neurogênica somente até 1h após sua administração. Contudo, indicam também que o efeito antinociceptivo da EECL foi mais duradouro e pronunciado em relação a nocicepção inflamatória induzida pela formalina, sendo que seu efeito durou de forma significativa de 1 a 6h após a sua administração.

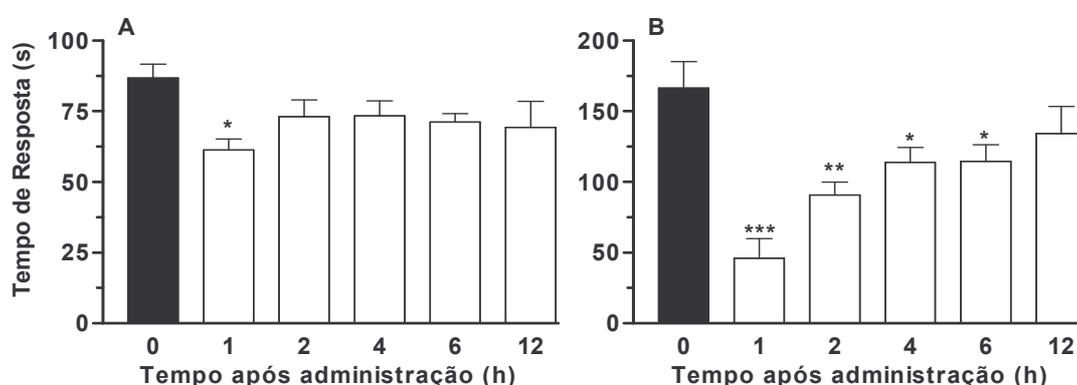


Figura 5. Efeito antinociceptivo tempo-resposta do EECL, administrado por via oral, em relação à primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela formalina em camundongos. Cada grupo representa a média do tempo de reação de 8 a 12 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do controle (C), * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

5.4. Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos.

O tratamento dos animais com o EECL (10 – 1000 mg/kg, v.o.) causou redução significativa e dependente da dose da nocicepção neurogênica induzida pela injeção intraplantar de capsaicina (1,6 µg/pata). A DI_{50} calculada foi de 160,5 (105,0 – 245,2) mg/kg e a inibição de $91 \pm 2\%$ na dose de 1000 mg/kg (Figura 6).

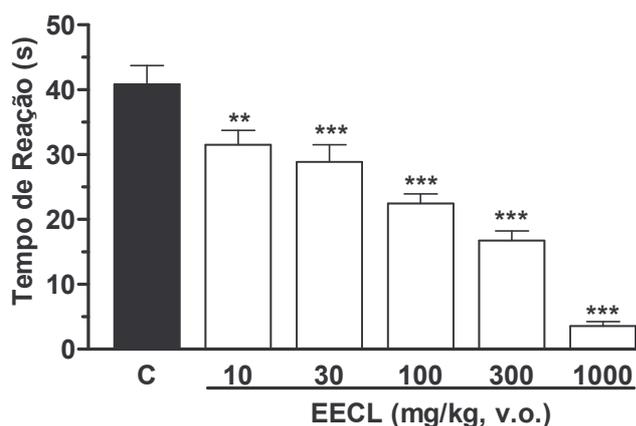


Figura 6. Efeito antinociceptivo do EECL, administrado 1h antes por via oral, em relação a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina (1,6 µg/pata) em camundongos. Cada grupo representa a média do tempo de reação de 8 a 12 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do controle (C), **P < 0,01, ***P < 0,001.

5.5. Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos.

Os resultados apresentados na Figura 7 mostram que o EECL (10, 30, 100 e 300 mg/kg, v.o.) causou inibição significativa e dependente da dose da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato (10 µmol/pata), com DI_{50} de 38,3 (29,9 – 70,2) mg/kg e inibição de $74 \pm 6\%$ na dose de 300 mg/kg.

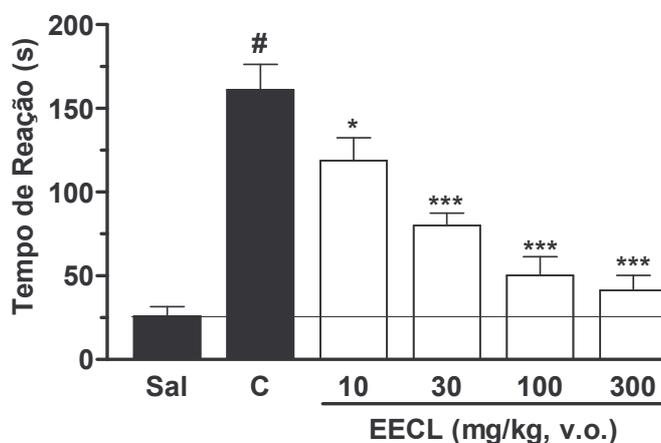


Figura 7. Efeito antinociceptivo do EECL, administrado 1 h antes por via oral, em relação a nocicepção induzida pelo glutamato (10 µmol/pata) em camundongos. Cada grupo representa a média do tempo de reação de 8 a 12 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do controle (C), *P < 0,05; ***P < 0,001. Difere significativamente do grupo controle (C), #P < 0,01 quando comparado com o grupo pré-tratado com salina (SAL).

Os resultados apresentados na Figura 8 (A e B) mostram que o triterpeno TTHP (1, 3, 10 e 30 mg/kg), administrado pela via oral ou pela via intraperitoneal, foi capaz de inibir de maneira significativa e dependente da dose a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato (10 μ mol/pata). A DI_{50} calculada foi 5,5 (3,7 – 7,9) e 7,9 (6,4 – 9,8) mg/kg com inibição de 78 ± 6 e $79\pm 6\%$ na dose de 30 mg/kg para a via i.p. ou oral, respectivamente. Além disso, pode-se observar que o triterpeno TTHP foi 4,8 a 6,9 vezes mais potente que o EECL em relação a nocicepção causada pelo glutamato. Outro aspecto interessante é que o triterpeno TTHP apresentou potência e eficácia semelhante, tanto administrado pela via i.p., quanto pela via oral, indicando que o mesmo apresenta uma boa biodisponibilidade, o que é importante para um futuro fármaco com atividade analgésica.

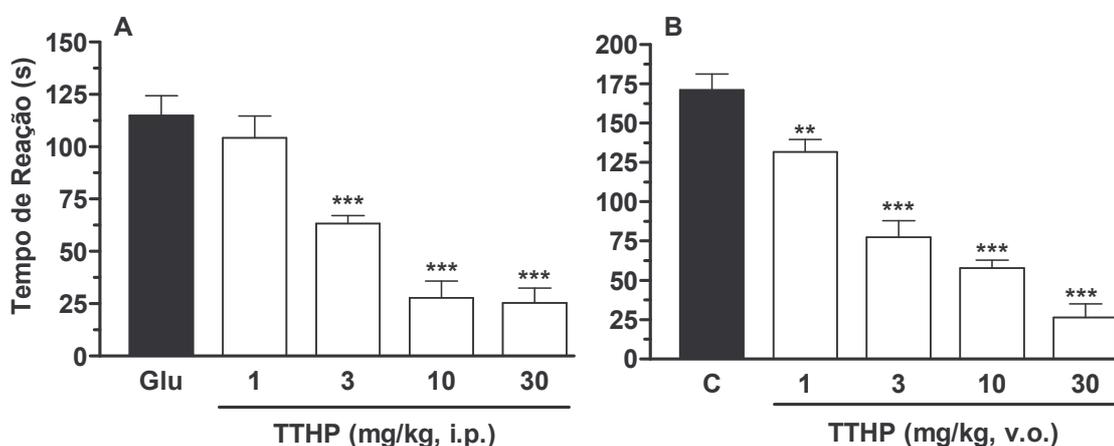


Figura 8. Efeito antinociceptivo do triterpeno TTHP administrado por via intraperitoneal (A, 30 min antes) e oral (B, 1h antes) em relação a nocicepção induzida pelo glutamato (10 μ mol/pata) em camundongos. Cada grupo representa a média do tempo de reação de 8 a 12 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do controle (C), **P < 0,01; ***P<0,001.

Os resultados apresentados na Figura 9 (A e B) mostram que o triterpeno TTHP (3-300 μ g/sítio), administrado periféricamente pela via intraplantar (em associação com o irritante) ou centralmente pela via i.t., também foi capaz de inibir de maneira significativa e dependente da dose a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato (10 μ mol/pata). A DI_{50} calculada foi 15,7 (12,2–20,2) e 107,1 (65,9–173,8) μ g/sítio e a inibição máxima foi de 82 ± 4 e $77\pm 8\%$ para a via intraplantar e intratecal, respectivamente. Além disso, pode-se observar que o TTHP administrado periféricamente (via intraplantar) foi 6,8 vezes mais potente que a via central (intratecal) na nocicepção causada pelo glutamato. Outro aspecto

interessante é que a eficácia do triterpeno TTHP na nocicepção do glutamato foi semelhante independente da via de administração utilizada, confirmando que o mesmo apresenta uma boa biodisponibilidade.

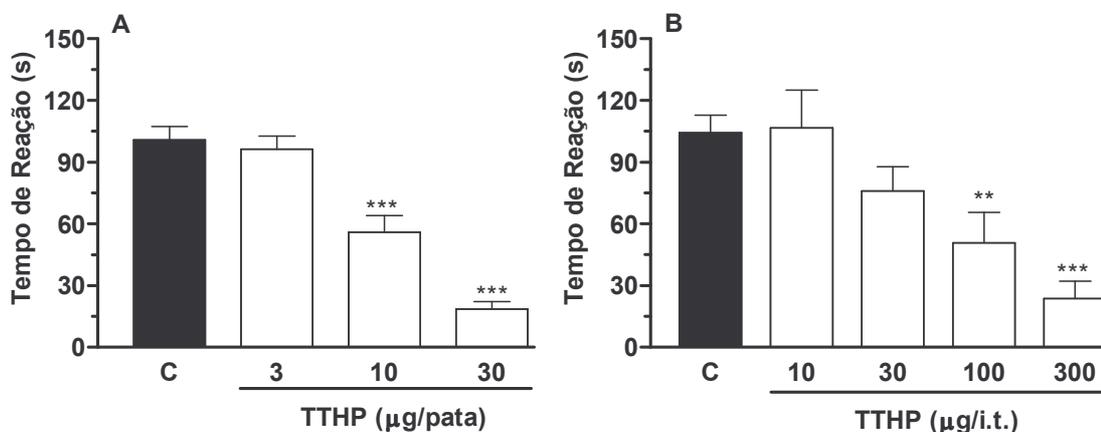


Figura 9. Efeito antinociceptivo do triterpeno TTHP administrado por via intraplantar (em associação com o irritante) (A) e administrado 15 min antes por via intratecal (B) em relação a nocicepção induzida pelo glutamato (10 $\mu\text{mol/pata}$) em camundongos. Cada grupo representa a média do tempo de reação de 4 a 8 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do controle (C), ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Os resultados apresentados na Figura 10 mostram que o ácido arjunólico (3, 10, 30 e 100 mg/kg, i.p.), também causou inibição significativa e dependente da dose da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato (10 $\mu\text{mol/pata}$). A DI_{50} calculada foi 14,6 (10,9 – 19,5) mg/Kg e inibição de $73 \pm 6\%$ na dose de 100 mg/kg.

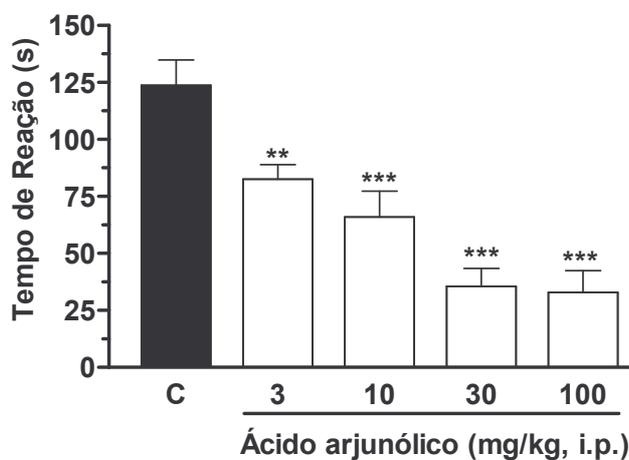


Figura 10. Efeito antinociceptivo do ácido arjunólico, administrado 30min antes por via intraperitoneal, em relação a nocicepção induzida pelo glutamato (10 $\mu\text{mol/pata}$) em camundongos. Cada grupo representa a média do tempo de reação de 4 a 6 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do controle (C), ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

5.6. Efeito do EECL no teste da placa quente em camundongos.

Os resultados apresentados na Figura 11 (A) mostram que o EECL (10, 30, 100 e 300 mg/kg, v.o.) não foi capaz de alterar de forma significativa a latência ao estímulo térmico quando analisado no teste da placa quente à temperatura de 55^oC. Ao contrário, o tratamento com fentanil (agonista opióide, 100 µg/kg, s.c.) causou significativo aumento da latência dos animais quando avaliada nesse modelo. Contudo, os dados da Figura 11 (B) mostram claramente que o EECL (10, 30, 100 e 300 mg/kg, v.o.) e o Fentanil (100 µg/kg, s.c.) aumentaram de forma significativa a latência ao estímulo térmico quando analisados no teste da placa quente à temperatura de 50^oC.

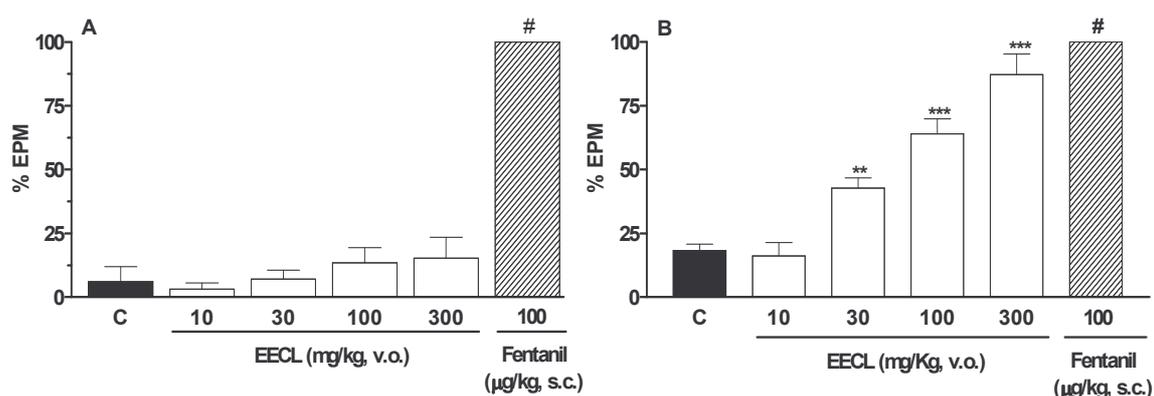


Figura 11. Influência do EECL, administrado 1h antes por via oral, ou do fentanil, administrado 15min antes pela via subcutânea, na latência ao estímulo térmico no teste da placa quente a temperatura de 55^oC (painel A) e 50^oC (painel B) em camundongos. Cada grupo representa a média do tempo de permanência de 8 a 12 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do controle (C), **P<0,01; ***P<0,001; #P < 0,001.

5.7. Efeito do EECL sobre a performance motora dos animais no modelo do “Rota-rod”.

Os resultados apresentados na Figura 12 mostram que o tratamento com o EECL (10, 30, 100 e 300 mg/kg, v.o.) não alterou significativamente o desempenho e nem o tempo de permanência dos camundongos no aparelho “Rota-rod” quando comparado com o grupo controle (tratados somente com o veículo). Entretanto, o tratamento dos animais com o diazepam (2,0 mg/kg, i.p.) alterou o desempenho e reduziu o tempo de permanência dos animais no aparelho “Rota-rod” quando comparado ao grupo controle.

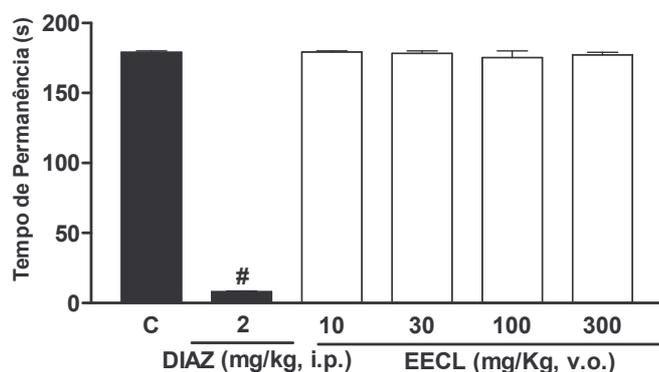


Figura 12. Efeito do EECL, administrado 1h antes por via oral, e do diazepam (DIAZ), administrado 30 min antes pela via intraperitoneal, sobre a performance motora dos animais no aparelho do “Rota-rod”. Cada grupo representa a média do tempo de permanência de 8 a 12 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do controle (C), #P<0,001.

5.8. Análise do mecanismo de ação antinociceptiva do EECL e do triterpeno TTHP.

5.8.1. Participação do sistema opióide.

Os resultados apresentados na Figura 13 demonstram que o pré-tratamento dos animais com naloxona (1 mg/kg, i.p., antagonista opióide não seletivo) causou reversão completa do efeito antinociceptivo induzido pela administração de morfina (5 mg/kg, s.c., agonista opióide não seletivo) e pelo EECL (100 mg/kg, v.o.) quando analisada em relação à nocicepção induzida pelo glutamato.

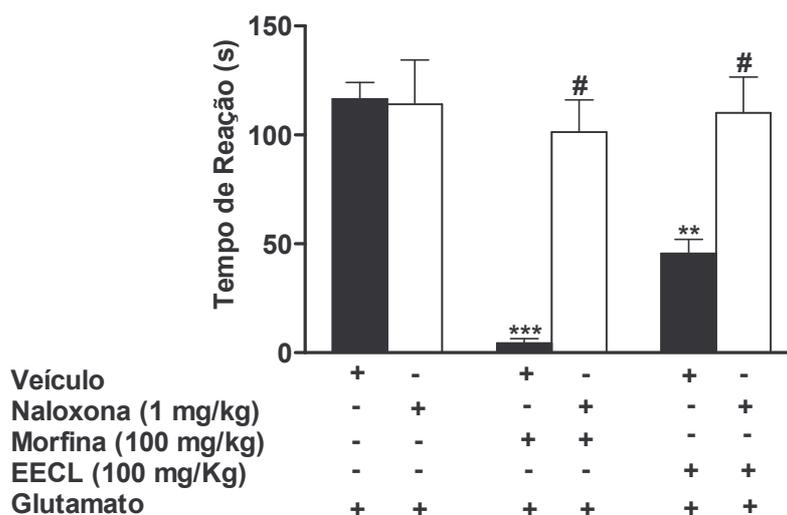


Figura 13. Influência do pré-tratamento de camundongos com naloxona (1 mg/kg), sobre o efeito antinociceptivo causado pelo EECL (100 mg/kg, v.o.) ou morfina (5 mg/kg, s.c.) na nocicepção induzida pelo glutamato (10 μ mol/pata). Cada grupo representa a média do tempo de reação de 8 a 12 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do grupo veículo (barras cheias), **P < 0,01. #P < 0,01 quando comparado com o grupo pré-tratado com naloxona mais agonistas (EECL ou morfina).

5.8.2. Efeito do pré-tratamento com L-arginina.

Os resultados apresentados na Figura 14 mostram que o pré-tratamento dos animais com L-arginina (substrato da sintase do óxido nítrico, 600 mg/kg, i.p.) reverteu completamente a ação antinociceptiva causado pela administração do inibidor da sintase o óxido nítrico, L-NOARG (75 mg/kg, i.p.). No entanto, o mesmo tratamento com L-arginina não interferiu de maneira significativa com a atividade antinociceptiva produzida pelo EECL (100 mg/kg, v.o.) quando analisado em relação à nocicepção induzida pela injeção do glutamato.

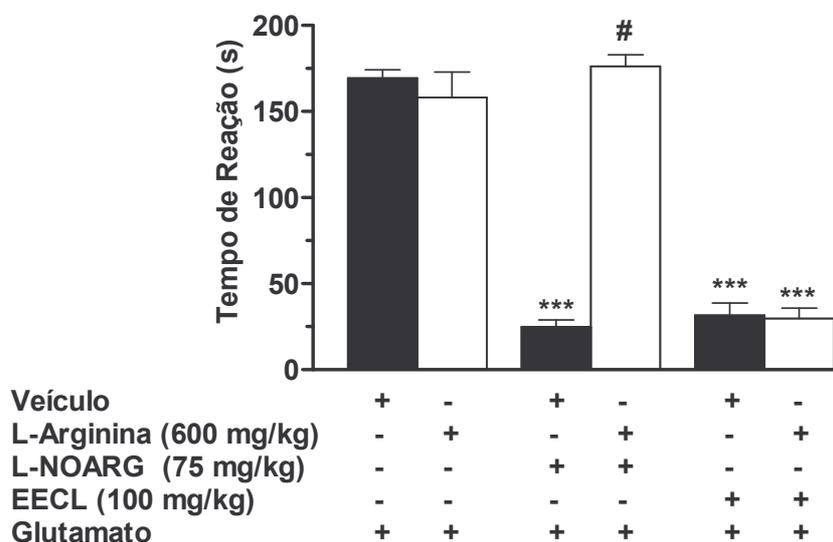


Figura 14. Influência do pré-tratamento dos camundongos com L-arginina (600 mg/kg) sobre o efeito antinociceptivo causado pelo EECL (100 mg/kg, v.o.) ou L-NOARG (75 mg/kg, i.p.) em relação a nocicepção induzida pelo glutamato (10 μ mol/pata). Cada grupo representa a média do tempo de reação de 8 a 12 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do grupo veículo (barras cheias), **P < 0,01. #P < 0,01 quando comparado com o grupo pré-tratado com L-arginina mais agonistas (EECL ou L-NOARG).

5.8.3. Participação do sistema serotoninérgico.

O pré-tratamento dos animais com cetanserina (antagonista do receptor 5HT_{2A}; 0,3 mg/kg, i.p.) e pindolol (antagonista serotoninérgico 5-HT_{1A/1B} e antagonista dos β -adrenoreceptores; 1 mg/kg, i.p.), mas não com o ondansetron (antagonista do receptor 5HT₃; 0,5 mg/kg, i.p.), alterou de maneira significativa a ação

antinociceptiva causada pelo EECL (100 mg/kg, v.o.) em relação à nocicepção causada pela injeção de glutamato (Figura 15).

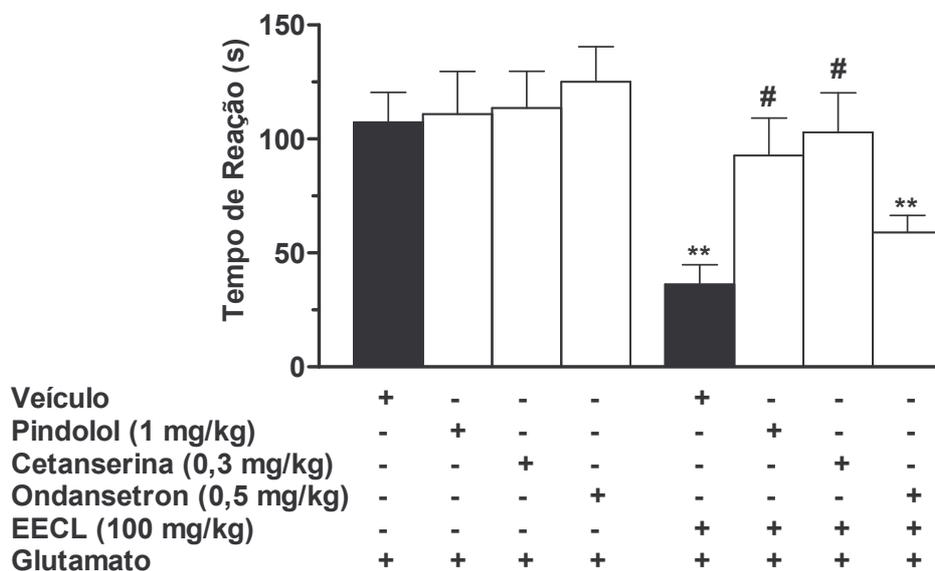


Figura 15. Influência do pré-tratamento de camundongos com o pindolol (1 mg/kg), administrado 30 min antes pela via intraperitoneal; cetanserina (0,3 mg/kg), administrada 30min antes pela via intraperitoneal; ou ondansetron (0,5 mg/kg), administrado 30min antes pela via intraperitoneal, sobre o efeito antinociceptivo causado pelo EECL (100 mg/kg), administrado 1h antes, em relação à nocicepção induzida pelo glutamato (10 μ mol/pata). Cada grupo representa a média do tempo de reação de 8 a 12 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do grupo veículo (barras cheias), **P<0,01. #P < 0,01 quando comparado com o grupo pré-tratado com antagonista mais EECL.

5.8.4. Participação do sistema glutamatérgico

5.8.4.1. Efeito do EECL administrado por via oral sobre a nocicepção induzida pela administração intratecal de glutamato

Os resultados apresentados na Figura 16 mostram que o EECL (100 mg/kg, v.o.) causou parcial inibição, porém não significativa, da nocicepção induzida pela injeção intratecal de glutamato (175 nmol, i.t.).

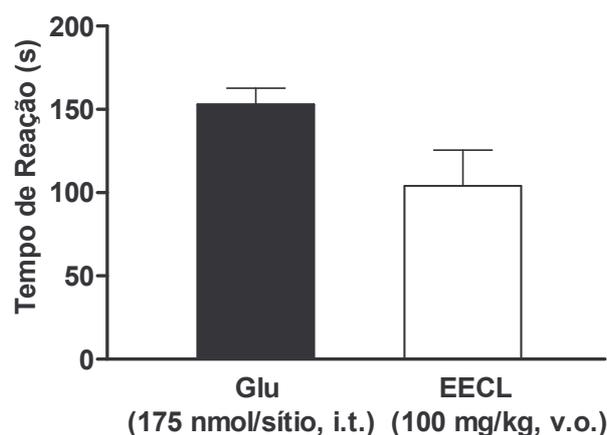


Figura 16. Efeito antinociceptivo do EECL (100 mg/kg, v.o.), administrado 1h antes por via oral, em relação a nocicepção induzida pela injeção i.t. de glutamato (175 nmol). Cada grupo representa a média do tempo de reação de 8 a 12 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Não difere significativamente do grupo glutamato (barra cheia).

5.8.4.2. Efeito do triterpeno TTHP na nocicepção induzida pelo glutamato.

Os resultados apresentados na Figura 17 mostram que o triterpeno TTHP (10 e 30 μ g/sítio, co-administrado pela via intratecal com glutamato) foi capaz de reduzir de maneira significativa a nocicepção causada pela administração intratecal de glutamato (175 nmol, i.t.). A inibição máxima da nocicepção observada para a dose de 10 e 30 μ g/sítio foi de 34 ± 8 e $46\pm 6\%$, respectivamente.

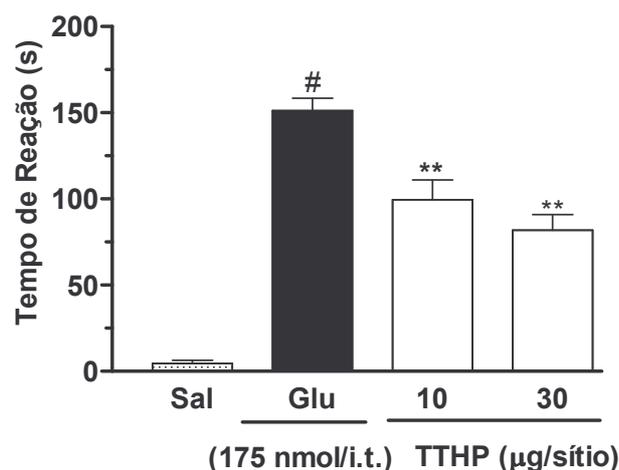


Figura 17. Efeito do triterpeno TTHP co-administrado em relação a nocicepção induzida pela injeção i.t. de glutamato (175 nmol) em camundongos. Cada grupo representa a média do tempo de reação de 4 a 6 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do grupo salina $\#P<0,01$, $**P<0,01$ em relação ao grupo glutamato (barra cheia).

5.8.4.3. Efeito do triterpeno TTHP sobre a nocicepção causada pelos agonistas glutamatérgicos seletivos.

A Figura 18 mostra que o triterpeno TTHP (30 $\mu\text{g/sítio}$), co-administrado com os agonistas glutamatérgicos, foi capaz de reduzir de forma significativa a nocicepção causada pelo NMDA (450 pmol, i.t.), além da induzida pelo glutamato (175 nmol, i.t.), com inibição de $78 \pm 8\%$ e $46 \pm 6\%$, respectivamente. No entanto, o TTHP nas mesmas condições não alterou a resposta nociceptiva induzida pelo AMPA (135 pmol, i.t.) e Cainato (110 pmol, i.t.), reduziu parcialmente, porém não significativamente, a nocicepção causada pelo agonista metabotrópico trans-ACPD (50 nmol, i.t.) com inibição de $34 \pm 13\%$.

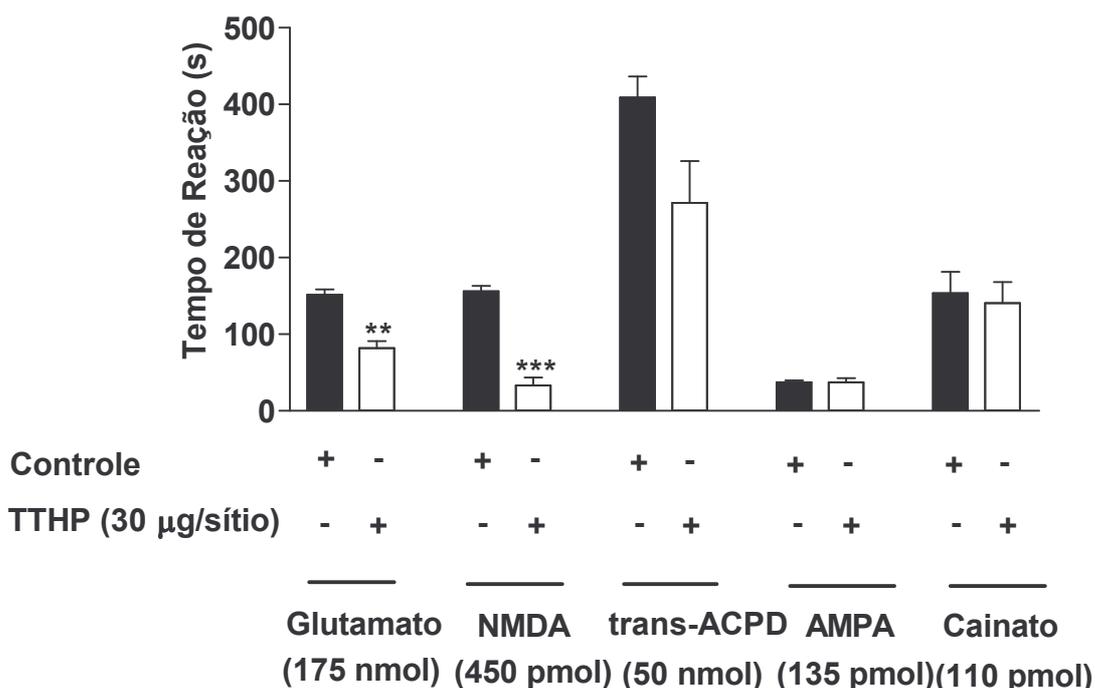


Figura 18. Efeito do triterpeno TTHP co-administrado na nocicepção induzida pela injeção intratecal de glutamato (175 nmol), NMDA (450 pmol), trans-ACPD (50 nmol), AMPA (135 pmol) e cainato (110 pmol) em camundongos. Cada grupo representa a média do tempo de reação de 8 a 12 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente dos grupos tratados com os agonistas seletivos (barras cheias), ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

6 DISCUSSÃO

A *Combretum leprosum*, popularmente conhecida como mufumbo, é amplamente distribuída na região norte do Brasil sendo utilizada pela população no tratamento de hemorragias e como sedativo. Estudos preliminares sugerem que essa planta possui atividade antinociceptiva suscitando o interesse na continuidade da investigação das propriedades farmacológicas e também do mecanismo de ação envolvido no efeito antinociceptivo da *Combretum leprosum* (MEDEIROS *et al*, 2003; LIRA *et al*, 2002).

Neste sentido, os resultados obtidos no presente estudo confirmam e estendem os dados da literatura e mostram claramente que o extrato e os triterpenos (triterpeno TTHP e o ácido arjunólico) obtidos das flores da *Combretum leprosum*, são dotados de importante atividade antinociceptiva, quando administrados por via sistêmica, intraplantar e espinhal em diferentes modelos de nocicepção de origem neurogênica e inflamatória em camundongos. Além disso, o extrato apresentou expressiva atividade antinociceptiva quando analisado na nocicepção térmica avaliada no teste da placa quente.

Os experimentos realizados com agonistas e antagonistas farmacológicos sugerem que a antinocicepção causada pelo extrato ou triterpeno TTHP obtido da *C. leprosum* está provavelmente relacionada com uma interação com os sistemas opióide, serotoninérgico (via receptor 5-HT₃ e 5-HT_{1A/1B}) e glutamatérgico (via receptores ionotrópicos do tipo NMDA), sem envolver a via L-arginina-óxido nítrico e efeitos relaxantes musculares ou sedativos sobre o sistema nervoso central e/ou periférico.

Atualmente, o interesse para o uso clínico de novas substâncias com atividade analgésicas utilizadas principalmente para o tratamento de vários tipos de dor (tanto de origem neurogênica quanto inflamatória), vem aumentando significativamente. Vários modelos de nocicepção em animais de laboratórios podem ser utilizados para verificar atividade analgésica de extratos e compostos. No entanto, de uma maneira geral, esses modelos possuem características próprias que devem ser consideradas, tais como simplicidade, reprodutibilidade e validade dos resultados obtidos e principalmente, a possibilidade de serem correlacionados com estudos clínicos (DICKENSON e BESSON, 1997).

Dentre os modelos de nocicepção utilizados neste trabalho, o teste das contorções abdominais induzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético é um modelo relativamente simples e com pouca especificidade, mas de fácil observação, rápido e com boa sensibilidade a várias drogas analgésicas e antiinflamatórias não esteroidais, bem como a drogas semelhantes à morfina e outros analgésicos que atuam centralmente. Além disso, os resultados obtidos com as várias classes de drogas analgésicas neste modelo mostram boa correlação com a ação analgésica encontrada em outros modelos pré-clínicos, bem como em estudos clínicos (KOSTER *et al.*, 1959; BLANE, 1967; BLUMBERG *et al.*, 1965; SIEGMUND *et al.*, 1957 a, b).

Foi postulado por Whittle (1964) que o ácido acético atua indiretamente causando a liberação de mediadores endógenos envolvidos na modulação da nocicepção, incluindo a bradicinina, serotonina, histamina e as prostaglandinas.

Além disso, recentemente Ribeiro *et al.* (2000) mostraram que a nocicepção induzida pelo ácido acético depende da liberação de citocinas, como a IL-1 β , TNF- α e a IL-8, a partir de macrófagos e basófilos residentes na cavidade abdominal, e que em conjunto com outros mediadores podem induzir a nocicepção característica observada nesse modelo.

Utilizando esse teste foi possível demonstrar, pela primeira vez, que o EECL administrado por via oral produziu inibição quase que completa e dependente da dose do número das contorções abdominais provocadas pelo ácido acético. Esses resultados indicam, portanto, que o efeito antinociceptivo causado pelo EECL pode ser decorrente da inibição direta ou indireta da liberação de mediadores pró-inflamatórios induzido pelo ácido acético, ou mesmo modulando centralmente a transmissão nociceptiva deste modelo.

A atividade antinociceptiva do EECL foi confirmada na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos. Esse modelo descrito inicialmente em gatos e em ratos por Dubuisson e Dennis (1977), vem desde então, sendo sistematicamente empregado para o estudo de drogas analgésicas (HUNSKAAR *et al.*, 1985; HUNSKAAR e HOLE, 1987; ROSLAND, 1991; CORRÊA e CALIXTO, 1993; SANTOS e CALIXTO, 1997a; SEGUIN *et al.*, 1995).

O modelo de nocicepção da formalina consiste na injeção intraplantar de solução de formaldeído na pata posterior do animal, a qual desencadeia intensa nocicepção por estimulação direta dos nociceptores. A nocicepção causada pela

injeção intraplantar de formalina é caracterizada por vigorosas lambidas, mordidas e batidas na pata injetada com o irritante. A maioria dos estudos realizados com esse modelo utiliza roedores, predominantemente ratos e camundongos. Este teste é caracterizado por apresentar duas fases distintas de nocicepção, que parecem envolver diferentes mediadores (DUBUISSON e DENNIS, 1977; HUNSKAAR *et al.*, 1985; HUNSKAAR e HOLE, 1987; ROSLAND, 1991; CORRÊA e CALIXTO, 1993; SANTOS e CALIXTO, 1997a; SEGUIN *et al.*, 1995), além de ser considerado atualmente o modelo que mais se aproxima da dor clínica (TJOLSEN e HOLE, 1997).

A primeira fase da nocicepção inicia-se imediatamente após a injeção da formalina, estendendo-se pelos primeiros 5min, o que se acredita ser devido à estimulação química direta dos nociceptores (DUBUISSON e DENNIS, 1977; HUNSKAAR *et al.*, 1985), predominantemente das fibras aferentes do tipo C e, em parte, as do tipo A δ (HEAPY *et al.*, 1987) e esta associada à liberação de aminoácidos excitatórios, óxido nítrico e substância P, entre outros.

A segunda fase desse modelo ocorre entre 15 - 30min após a injeção de formalina e está relacionada principalmente com a liberação de vários mediadores pró-inflamatórios como a bradicinina, histamina, prostaglandinas e serotonina, entre outros (HUNSKAAR e HOLE, 1987; CORRÊA e CALIXTO, 1993; SANTOS e CALIXTO, 1997a; SEGUIN *et al.*, 1995; TJOLSEN e HOLE, 1997).

Os resultados do presente estudo confirmam os dados da literatura descritos por Lira *et al* (2002) e demonstram que, quando avaliado no teste da formalina, o EECL administrado via oral causou atividade antinociceptiva máxima em 1h (referencial para os demais pré-tratamento), sendo significativa em até 6h após sua administração, em relação a segunda fase da nocicepção induzida pela formalina.

Além disso, os nossos dados também demonstram que o EECL, administrado por via oral, produziu significativo efeito antinociceptivo de forma dose dependente em relação a ambas as fases da nocicepção induzida pela formalina, sendo, contudo mais efetivo em relação à segunda fase desse modelo. Dessa forma, os resultados no teste da formalina realmente reforçam a hipótese que esta planta é dotada de importante atividade antinociceptiva e/ou antiinflamatória.

No presente estudo procurou-se analisar também a possível ação antinociceptiva do EECL na nocicepção neurogênica induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos. Sakurada *et al.* (1992) foram os primeiros a demonstrar que a injeção intraplantar de capsaicina na pata posterior de

camundongos causa vigorosa nocicepção, caracterizadas por lambidas e mordidas na pata injetadas, sendo esse efeito relacionado com a nocicepção de origem neurogênica.

A capsaicina é uma amina neurotóxica extraída da pimenta vermelha que, quando aplicada na pele ou injetada em animais, produz irritação caracterizada por reação dolorosa e subsequente dessensibilização para a dor induzida quimicamente (JANCSÓ *et al.*, 1981).

Estudos demonstraram que a capsaicina atua através da ativação de receptores específicos, que foram denominados de receptores vanilóides do tipo 1 (VR1). Esses receptores estão presente principalmente nos gânglios da raiz dorsal da medula espinhal e no gânglio do trigêmio (CATERINA *et al.*, 1997).

Estudos de biologia molecular demonstraram que os receptores vanilóides estão acoplados a um canal iônico permeável a cátions mono e divalentes (ordem de permeabilidade: cálcio>magnésio>sódio~potássio~césio), que, quando ativado, produz despolarização e excitação dos neurônios levando à liberação de neuropeptídeos como a substância P, neurocinina A e neurocinina B, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e somatostatina, entre outros (GAMSE *et al.*, 1979; 1981; LEMBECK, 1988; SZOLCSANYI, 1985; SANTOS e CALIXTO, 1997a, b; CATERINA *et al.*, 1997; OH *et al.*, 1996; SZALLASI e BLUMBERG, 1999).

Levando-se em considerações estes relatos, o presente estudo demonstra que o EECL, administrado pela via oral, foi capaz de inibir de maneira dependente da dose, a nocicepção neurogênica causada pela capsaicina, abrindo, portanto novas perspectivas para a utilização terapêutica do EECL nestes tipos de dores.

Atualmente, está bem estabelecido que dentre os diversos neurotransmissores que estão envolvidos nos modelos de nocicepção acima citados, os aminoácidos excitatórios (glutamato e aspartato) apresentam papel relevante no processo de sensibilização do corno dorsal da medula espinhal, uma vez que a estimulação das fibras aferentes primárias induz a liberação desses transmissores nesse local (MILLAN, 1999; 2002).

Outros estudos mostram que os aminoácidos excitatórios, quando injetados por via intraplantar ou intratecal, promovem um comportamento nociceptivo (BEIRITH *et al.*, 2002; AANONSEN e WILCOX, 1987).

Neste estudo, foi demonstrado também que o EECL reduz de maneira dependente da dose a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato em

camundongos. O glutamato é o neurotransmissor encontrado em maior concentração nas sinapses excitatórias no cérebro de mamíferos e possui um papel fisiológico (memória e aprendizado) e patológico (doenças neurodegenerativas e na dor aguda e crônica). Entretanto, apresenta uma importância mais relevante nas condições crônicas que envolvem a patogênese da dor neuropática (GAVIRAGHI, 2000).

Este modelo de nocicepção aparentemente atua através de receptores periféricos, via interação com receptores NMDA e receptores não-NMDA por um mecanismo que depende da ativação da via L-arginina-óxido nítrico (BEIRITH *et al.*, 2002).

Um grande número de evidências sugere que há excesso de aminoácidos excitatórios, principalmente glutamato, após uma lesão na medula espinhal ou após certos processos inflamatórios, sugerindo que os aminoácidos excitatórios têm um papel relevante na transmissão sensorial (BEIRITH, 2002).

Estes resultados fornecem indícios de que a antinocicepção do EECL pode estar relacionado, pelo menos em parte, com uma modulação direta ou indireta sobre os aminoácidos excitatórios.

Estudos fitoquímicos realizados com o *Combretum leprosum* por Facundo *et al.* (1993) permitiram o isolamento e a identificação de um triterpeno ainda inédito na literatura que foi denominado de 3 β ,6 β ,16 β -trihidroxilup-20(29)-eno (TTHP), além do ácido arjunólico. A estrutura química do TTHP foi também determinada através de cristalografia de raios-X, confirmando que se tratava de um triterpeno realmente inédito na literatura.

Desta forma, utilizando-se o modelo de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato, pode-se observar que os triterpenos (TTHP e o ácido arjunólico) isolados foram efetivos em reduzir de forma dose dependente a nocicepção característica deste modelo de nocicepção. Além disso, os nossos dados também indicam que o triterpeno TTHP e o ácido arjunólico foram cerca de 2,6 a 6,9 vezes mais potente que o EECL.

Outro aspecto importante do presente estudo foi o fato que o TTHP apresentou a mesma eficácia e potência, tanto administrado via i.p. quanto pela via oral, sugerindo que este triterpeno apresenta uma boa biodisponibilidade, o que torna este composto importante para um futuro fármaco com atividade analgésica.

Administrado tanto periféricamente (via intraplantar) quanto centralmente (via intratecal), o TTHP também foi capaz de inibir, de maneira dependente da dose, a

nocicepção causada pelo glutamato. Estes dados claramente indicam que o triterpeno TTHP apresenta importante efeito antinociceptivo tanto em nível periférico quanto central.

A fim de obter informações adicionais sobre a possibilidade dos aminoácidos excitatórios estarem envolvidos no mecanismo antinociceptivo do EECL ou do triterpeno TTHP, a atividade antinociceptiva do EECL ou do triterpeno TTHP foi avaliada sobre o comportamento nociceptivo causado pela injeção intratecal de glutamato, NMDA e trans-ACPD em camundongos.

Como mostrado na literatura, a injeção intratecal de glutamato, trans-ACPD e NMDA causa reação comportamental de nocicepção dirigida à região caudal. Esta reação nociceptiva é definida como um único movimento de cabeça direcionada a parte posterior do corpo mordendo ou lambendo os membros posteriores (patas posteriores, cauda e abdômen), que resulta em contato do focinho do animal com o membro alvo (FERREIRA *et al.*, 1999; BOXALL *et al.*, 1998; URCA e RAIGORODSKY, 1988).

Utilizando este modelo, o EECL, administrado oralmente, inibiu parcialmente, mas de forma não significativa à resposta nociceptiva induzida pela injeção intratecal de glutamato.

Além disso, os nossos dados também mostram que o triterpeno TTHP foi capaz de inibir a nocicepção causada pelo glutamato, sugerindo, portanto que o sistema glutamatérgico realmente está envolvido na antinocicepção causada pelo EECL e pelo triterpeno.

Por outro lado, o triterpeno TTHP administrado centralmente (via intratecal) foi capaz de inibir a nocicepção causada pelo NMDA, mas não aquela causada pelo trans-ACPD, AMPA e cainato. Estes resultados sugerem que a ação antinociceptiva produzida pelo EECL e pelo triterpeno TTHP depende, pelo menos em parte, de uma interação com receptores ionotrópicos glutamatérgicos sensíveis ao agonista NMDA.

A análise conjunta dos resultados obtidos com o EECL e os triterpenos isolados da *Combretum leprosum*, nos modelos de nocicepção induzida pelo ácido acético, formalina, capsaicina e glutamato, indicam que essa planta e seus constituintes apresentam potencial terapêutico para o desenvolvimento de fármacos analgésicos, tanto no que se refere ao controle da nocicepção de origem neurogênica como inflamatória.

Considerando que a nocicepção de origem neurogênica é muito complexa, e que até o momento não há alternativas terapêuticas satisfatórias para seu tratamento, esses resultados pode abrir novas perspectivas para o desenvolvimento de novas moléculas com potencial interesse terapêutico no tratamento da dor (MACFARLANE *et al.*, 1997; FÜRST, 1999; MILLAN, 1999).

Outro aspecto importante analisado no presente trabalho foi à possibilidade do EECL em produzir antinocicepção em modelos de nocicepção que utilizam estímulos nocivos térmicos, como é o caso do modelo da placa quente. Este modelo foi descrito inicialmente por Woolfe e Macdonald (1944) e posteriormente modificado por Eddy e Leimback (1953), sendo bastante sensível para drogas que atuam em nível central. Além disso, este teste pode determinar hiperalgesia térmica, bem como servir como ferramenta para pesquisa de drogas analgésicas e anti-hiperalgésicas (CARTER, 1991; HWANG e WILCOX, 1987; WOOLFE e MACDONALD, 1944).

O teste da placa quente caracteriza-se por produzir uma resposta rápida ao estímulo nocivo, mediada pela ativação dos nociceptores (fibras C e A δ), conduzindo o impulso ao corno dorsal da medula espinhal e posteriormente a centros corticais, sendo que a resposta é proporcional à frequência e classe de fibras responsáveis pela mensagem (DICKENSON e BESSON, 1997). Estas fibras são estimuladas após a ativação dos receptores vanilóides, entre outros, especificamente o tipo VR-1 (limiar de ativação = 43⁰C) e VRL-1 (limiar de ativação = 52⁰C), que são responsáveis pela resposta a aumento na temperatura, sendo que os receptores VRL-1 são mais importantes na mediação da resposta a estímulos térmicos nocivos (JULIUS e BASBAUM, 2001).

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que o EECL foi também efetivo em aumentar significativamente e de maneira dependente da dose a latência dos animais na nocicepção térmica quando analisada no teste da placa quente mantido a temperatura de 50⁰C, contudo, quando a temperatura foi elevada a 55⁰C o EECL foi destituído de efeito antinociceptivo.

É importante mencionar que as doses efetivas no teste da placa quente, a 50⁰ C, foram semelhantes aquelas necessárias para produzir importante e eficaz atividade antinociceptiva em modelos de nocicepção química, como o teste da formalina, capsaicina e glutamato em camundongos. Além disso, pode - se observar no presente trabalho que o agonista opióide, fentanil, foi efetivo em aumentar a latência dos animais na nocicepção térmica independente da temperatura utilizada. Isso talvez seja

reflexo da diferença considerável dos estímulos, da integração e complexidade das respostas a diferentes temperaturas (JULIUS e BASBAUM, 2001).

Também é importante ressaltar que o resultado positivo no teste da placa quente sugere uma importante participação de mecanismos supra-espinhais na mediação da atividade antinociceptiva demonstrada pelo EECL.

Um fator importante a ser descartado quanto a uma possível resposta antinociceptiva ser falsa - positiva nos ensaios nociceptivos discutidos anteriormente, é a possibilidade de drogas em induzir alterações motoras ou efeitos inespecíficos. Neste sentido, a maior fonte de erros em estudos sobre drogas que interferem na transmissão da resposta nociceptiva tanto em nível periférico como central (mecanismos espinal ou supra-espinal) é a modificação na performance motora do animal (MILLAN, 1999; 2002).

Por esse motivo é importante avaliar a atividade de drogas potencialmente analgésicas quanto à ocorrência de incoordenação motora. Nossos resultados demonstraram que o EECL não apresenta efeitos inespecíficos nas doses utilizadas para produzir antinocicepção nos modelos de nocicepção tanto térmica quanto química, uma vez que o EECL não foi capaz de alterar significativamente o tempo de queda e de permanência dos animais, quando avaliados no teste do "Rota-rod" (DUHAM e MIYA, 1957; ROSLAND *et al.*, 1990).

Os resultados obtidos nestes diferentes modelos de indução de nocicepção sugerem que o EECL possa atuar por interferir no processamento central de impulsos nociceptivos, ou intervir nos mecanismos descendentes que controlam a transmissão. Por este motivo, o segundo objetivo do nosso trabalho foi analisar através de estudos "in vivo" alguns dos mecanismos pelos quais o EECL poderia estar promovendo seu efeito antinociceptivo. Para tal, foi utilizado o modelo de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos; tendo em vista, que o EECL e os triterpenos isolados mostraram-se efetivos em produzir marcada atividade antinociceptiva neste modelo.

O primeiro mecanismo a ser estudado foi aquele relacionado aos receptores opióides. Este mecanismo é claramente importante, pois é efetivo em reduzir a nocicepção induzida nos métodos utilizados acima (SANTOS *et al.*, 1999, MENDES *et al.*, 2000).

Além disso, os receptores opióides (μ , κ e δ) estão localizados em vários níveis da transmissão da nocicepção, sendo responsáveis por ações antinociceptivas diretas e indiretas dos agonistas opióides (FURST, 1999; MILLAN, 1999; 2002).

Nos experimentos realizados neste trabalho, observa-se que a morfina (agonista opióide) aplicada por via subcutânea apresentou atividade antinociceptiva pronunciada na nocicepção causada pelo glutamato e que o tratamento prévio dos animais com naloxona, antagonista opióide não seletivo, reverteu completamente a antinocicepção induzida pela morfina. Os nossos dados também mostram claramente que a naloxona, nas mesmas condições que foi eficaz em reverter à ação da morfina, reverteu de forma significativa a atividade antinociceptiva causado pelo EECL na nocicepção causada pelo glutamato.

Esses resultados permitem sugerir que o sistema opióide parece estar envolvido na mediação da atividade antinociceptiva do EECL. Entretanto, estudos adicionais são necessários para indicar qual o tipo de receptor que esta participando neste efeito, bem como, se o efeito antinociceptivo do EECL é direto no receptor ou indiretamente via liberação de opióide endógenos.

Investigou-se também a participação da via L-arginina-óxido nítrico na antinocicepção produzida pelo EECL, tendo em vista que esta via exerce um papel importante na modulação da nocicepção (HALEY *et al.*, 1992; SNYDER, 1992; YAKSH e RUDY, 1977; FERREIRA *et al.*, 1999).

Estudos demonstraram que a L-N^G-nitro-arginina metil éster (inibidor da sintase do óxido nítrico), administrada sistêmica ou centralmente, causou importante efeito antinociceptivo em relação a ambas as fases da dor induzida pela formalina, além de ter causado inibição da hiperalgesia induzida por agonistas de receptores de NMDA (N-metil-D-aspartato) (MOORE *et al.* 1991; KITTO *et al.*, 1992).

Além disso, a L-N^G-nitro-arginina metil éster deprimiu a facilitação do reflexo nociceptivo e reduziu a resposta em neurônios dorsais da medula após estimulação mecânica e térmica (VERGE *et al.*, 1992; CODERRE e YASHPAL, 1994; MOORE *et al.*, 1991; YAKSH e RUDY, 1977; YAMAMOTO *et al.*, 1993).

Recentemente, Beirith *et al.* (2002) também demonstraram que a nocicepção causada pelo glutamato envolve a participação do óxido nítrico, e que a L-N^G-nitro-arginina (L-NOARG) foi efetiva em reduzir a nocicepção induzida pelo glutamato.

Os resultados obtidos no presente estudo confirmam essas observações e demonstram que a administração sistêmica de L-NOARG causou pronunciada redução

da nocicepção causada pelo glutamato, sendo esse efeito seletivamente revertido pela injeção de L-arginina, substrato para a sintase do óxido nítrico. Entretanto, o tratamento dos animais com L-arginina não reverteu o efeito antinociceptivo causado pelo EECL, sugerindo que a via da L-arginina-óxido nítrico não participa no efeito antinociceptivo do EECL.

Estudos descritos na literatura demonstraram que o sistema serotoninérgico está intimamente envolvido no mecanismo da regulação da transmissão da informação nociceptiva no sistema nervoso central (BASBAUM e FIELDS, 1984; FIELDS *et al.*, 1991; LIPP, 1991; YAKSH, 1985; MILLAN, 1997; 1999; BESSON, 1999; DRAY, 1997).

Assim, um grande número de drogas vem sendo utilizado para o tratamento de dores crônicas, destacando-se principalmente os antidepressivos tricíclicos (WALSH, 1983; VENTAFRIDDA *et al.*, 1990; MAGNI, 1991; MILLAN, 1999; BESSON, 1999).

No presente estudo, os nossos resultados também demonstram que a cetanserina (antagonista 5-HT₂) e o pindolol (antagonista 5-HT_{1A/1B} e dos β-adrenoceptores) reverteram quase que completamente à ação antinociceptiva causada pelo EECL. Entretanto, o ondasetron (antagonista serotoninérgico 5-HT₃) não reverteu à ação antinociceptiva causada pelo EECL.

Diante dos resultados descritos acima, não se pode destacar também a possibilidade de que a o EECL possa estar induzindo a liberação de serotonina endógena e conseqüentemente ela esteja contribuindo com seu importante efeito antinociceptivo de uma forma direta (atuando nos receptores serotoninérgicos) ou indireta liberando outros mediadores endógenos controladores da transmissão nociceptiva, como por exemplo, os opióides (MILLAN, 2002).

Desta forma, esses resultados parecem indicar que o EECL interage com o sistema serotoninérgico (via receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{1A/1B}) e estudos adicionais são necessários para indicar que a ação antinociceptiva do EECL é direta nos receptores serotoninérgicos ou indireta via liberação de serotonina endógena.

Considerando o fato de que vários tipos de dores crônicas são tratadas clinicamente com antidepressivos, segundo Besson (1999) e Millan (1997; 1999) e que o sistema serotoninérgico parece contribuir com o importante efeito antinociceptivo do EECL, esses estudos abrem novas possibilidades de aproveitamento do EECL para o estudo de sua possível atividade antidepressiva.

Em síntese, os resultados apresentados neste trabalho, confirmam e estendem os dados descritos na literatura e indicam que o EECL, e os triterpenos, obtidos da *Combretum leprosum*, apresentam importante efeito antinociceptivo na nocicepção química induzida pelo ácido acético, formalina, capsaicina e glutamato em camundongos. Além disso, os nossos resultados também demonstraram que a ação antinociceptiva causada pelo EECL é particularmente interessante, tendo em vista que ele parece interagir com o sistema opióide, serotoninérgico e glutamatérgico e que a ação antinociceptiva causada pelo TTHP parece ser dependente de uma interação com os receptores ionotrópicos glutamatérgicos do tipo NMDA.

Contudo, estudos eletrofisiológicos adicionais e de biologia molecular são ainda necessários para a confirmação do preciso mecanismo de ação desse composto.

Além disso, conforme discutido acima, não pode ser completamente descartada a possibilidade do EECL e dos outros compostos estarem interagindo com outras vias e sistemas envolvidos no controle da transmissão nociceptiva.

Analisados em conjunto, esses resultados permitem sugerir que o EECL compartilha alguns dos mecanismos comuns já descritos para a morfina. Contudo, existem várias discrepâncias apresentadas que podem ser explicadas pela falta de especificidade do EECL no sistema opióide.

Esses resultados são muito interessantes, considerando ser a morfina, ainda nos dias de hoje a droga de escolha para o tratamento das dores relacionadas a várias patologias crônicas, incluindo alguns tipos de câncer, apesar dos seus efeitos adversos como a dependência, tolerância e depressão respiratória (MÉNARD *et al.*, 1995; OSSIPOV *et al.*, 1997).

Desta forma, os resultados obtidos no presente trabalho, fornecem a base farmacológica da utilização da planta *Combretum leprosum* na medicina popular, e mostram claramente o potencial desta planta e de seus compostos para o desenvolvimento de novas drogas analgésicas.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo confirmam e estendem os dados descritos na literatura e mostram claramente que o EECL e os triterpenos, TTHP e ácido arjunólico, obtidos das flores do *Combretum leprosum* apresentaram uma importante ação antinociceptiva, tanto na nocicepção de origem neurogênica e inflamatória, avaliada em camundongos.

Os mecanismos envolvidos nas ações do extrato e dos compostos não estão completamente esclarecidos, contudo foi demonstrado que a ação antinociceptiva causada pelo EECL é particularmente interessante, tendo em vista que ele parece interagir com o sistema opióide, serotoninérgico e glutamatérgico e que a ação antinociceptiva causada pelo TTHP parece interagir com os receptores NMDA. Neste sentido, no presente estudo foram obtidos avanços significativos acerca do mecanismo de ação da *Combretum leprosum*, o que tornam o extrato e seus princípios ativos atraentes para o aproveitamento e desenvolvimento de novos produtos com potencial ação antinociceptiva.

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

8 REFERÊNCIAS

AANONSEN, L. M e WILCOX, G. L. Nociceptive action of excitatory amino acids in the mouse: effects of spinally administered opioids, phencyclidine and *sigma* agonists. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 243, p. 9-19, 1987.

ALEXANDER, D. M.; BHANA, N.; BHIKA, K. H.; ROGERS, C. B. Antimicrobial testing of selected plant extracts from *Combretum* species. **S. Afr. J. Sci.**, v. 88, p. 342–344, 1992.

ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Res.**, v. 1000, p. 40-56, 2004.

BABA-MOUSSA, F.; AKPAGANA, K.; BOUCHET, P. Antifungal activities of seven West African Combretaceae used in traditional medicine. **J. Ethnopharmacol.**, v. 66, p. 335–338, 1999.

BASBAUM, A. L. e FIELDS, H. L. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathway and endorphin circuitry. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 7, p. 309-338, 1984.

BEIRITH, A.; SANTOS, A. R. S.; RODRIGUES, A. L. S.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; CALIXTO, J. B. Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyrone in formalin, capsaicin and glutamate tests. Study of supraspinal of the mechanism of action. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 345, p. 233-245, 1998.

BEIRITH, A.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Res.**, v. 924, p. 219-228, 2002.

BENTLEY, G. A.; NEWTON, S. H.; STARR, J. Evidence for an action of morphine and enkephalin on sensory nerve endings in the mouse peritoneum. **Br. J. Pharmacol.**, v. 73, p. 325-333, 1981.

BESSON, J. M. The neurobiology of pain. **Lancet**, v. 353, p.1610-1615, 1999.

BLANE, G. F. Blockade of bradykinin induced nociception in the rat as a test for analgesic drugs with particular reference to morphine antagonists. **J. Pharmacol.**, v. 19, p. 367-373, 1967.

BLUMBERG, H.; WOLF, P. S.; DAYTON, H. B. Use of the writhing test for evaluating analgesic activity of narcotic antagonists. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 118, p. 763-766, 1965.

BOXALL, S. J.; BERTHELE, A.; TOLLE, T. R.; ZIEGLGANSBERGER, W.; URBAN, L. mGluR activation reveals a tonic NMDA component in inflammatory hyperalgesia. **Neuroreport.**, v. 9, p. 1201–1203, 1998.

BRAMBILLA, A.; PRUDENTINO, A.; GRIPPA, N.; BORSINI, F. Pharmacological characterization of AMPA-induced biting behaviour in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 305, p. 115–117, 1996.

BREYTENBACH, J. C. e MALAN, S. F. Pharmacochemical properties of *Combretum zeyheri*. **S. Afr. J. Sci.**, v. 85, p. 372–374, 1989.

BROMAN, J. e ADAHL, F. Evidence for vesicular storage of glutamate in primary afferent terminals. **Neuroreport.**, v. 5, p. 1801-1804, 1994.

BRUENING, M. H., 1990. **Mufumbo**. Disponível em <www.ib.usp.br/jandaira/plantas1.htm>. Acesso em: 25 mar. 2004.

CALIXO, J.B.; SANTOS, A.R.S.; CECHINEL FILHO, V. & YUNES, R.A. A review of the plants of the genus *pyllanthus*: Their Chemistry, Pharmacology and Therapeutic potential. **Med. Res. Rev.** v.8, p.225 – 228, 1998.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CALIXTO, J. B.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. Anti-Inflammatory Compounds of Plant Origin. Part I. Action on Arachidonic Acid pathway, Nitric Oxide and Nuclear Factor κ B (NF- κ B). **Planta Medica**, v. 69, p. 1-12, 2003.

CARTER, R. B. Differentiating analgesic and non-analgesic drug activities on rat hot plate: effect of behavioral endpoint. **Pain**, v. 47, p. 211-220, 1991.

CATERINA, M. J.; SCHUMACHER, M. A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T.A.; LEVINE, J. D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, p.816-824, 1997.

CHOWDHURY, R. e ISLAM, N. Ahydroxylated mansumbin-28-oic acid from *Combretum coccineum*. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 32, p. 443-445, 2004.

CIRLA, A. e MANN, J. Combretastatins: from natural products to drug discovery. **Nat. Prod. Rep.**, v. 20, p. 558-564, 2003.

CODERRE, T. J. e YASHPAL, K. Intracellular messengers contributing to persistent nociception and hyperalgesia induced by L-glutamate and substance P in the rat formalin pain model. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 6, p. 1328-1334, 1994

COLLIER, H. O. J.; DINNEEN, L. C.; JOHNSON, C. A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **Br. J. Pharmacol. Chemother.**, v. 32, p. 295-310, 1968.

CORRÊA, C. R. e CALIXTO, J. B. Evidence for participation of B₁ and B₂ kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in mouse. **Br. J. Pharmacol.**, v. 110, p.193-198, 1993.

DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. **Prog. Neurobiol.**, v. 65, p. 1-105, 2000.

DICKENSON, A. e BESSON, J. M. **The Pharmacology of Pain**. Berlin: Springer, 1997.

Di STASI, L. C. **Plantas Medicinais: Arte e Ciência**. São Paulo: ed. UNESP, 1995.

DRAY, A. Peripheral mediators of pain. *In: The Pharmacology of Pain* (Dickenson, A. and Besson, J. M.). Berlin: Springer, p. 21-41, 1997.

DUBUISSON, D. e DENNIS, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, v. 4, p. 161-174, 1977.

DUHAM, N. W. e MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **J. Amer. Pharm. Assoc.**, v. 46, p. 208-209, 1957.

EDDY, N. B. e LEIMBACK, D. Synthetic analgesics II. Dithienylbutenyl and dithienylbutylamines. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 107, p. 385-393, 1953.

ELGORASHI, E. E.; TAYLOR, J. L.; MAES, A.; van STADEN, J.; DE KIMPE, N.; VERSCHAEVE, L. Screening of medicinal plants used in South African traditional medicine for genotoxic effects. **Toxicol. Lett.**, v. 143, p. 195 - 207, 2003.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. *In: Farmacognosia: da planta ao medicamento*/Organizado por Simões, C.M.O. *et al.* Porto Alegre/Florianópolis: ed. Universidade/UFRGS/ed. Da UFSC, p. 87-99, 1999.

ELISABETSKY, E., WANNMACHER, L. The status of ethnopharmacology in Brazil. **J. Ethnopharmacol.**, v. 38, p. 137-143, 1993.

FACUNDO V. A.; ANDRADE, C. H. S.; SILVEIRA, E. R.; BRAZ-FILHO, R.; HUFFORD, C. D. Triterpenes and Flavonoids from *Combretum leprosum*. **Phytochemistry**, v. 32, p. 411-415, 1993.

FERREIRA, J.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. The role of systemic, spinal and supraspinal L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway in thermal hyperalgesia caused by

intrathecal injection of glutamate in mice. **Neuropharmacology**, v. 38, p. 835-842, 1999.

FIELDS, H. L.; HEINRICHER, M. M.; MASON, P. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 14, p. 219-245, 1991.

FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Res. Bull.**, v. 48, p. 129-141, 1999.

GAMSE, R.; MOLNAR, A.; LEMBECK, F. Substance P release from spinal cord slices by capsaicin. **Life Sci.**, v. 25, p. 629-636, 1979.

GAMSE, R.; LACKNER, D.; GAMSE, G.; LEEMAN, S. E. Effect of capsaicin pretreatment on capsaicin-evoked release of immunoreactive somatostatin and substance P from primary afferent neurons. **Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.** v. 316, p. 38-41, 1981.

GAVIRAGHI, G. Excitatory amino acids receptors. **Pharm. Acta. Helv.**, v. 74, p. 219-220, 2000.

GELFAND, M.; MAVI, S.; DRUMMOND, R. B.; NDEMERA, B. **The Traditional Medical Practitioner in Zimbabwe**. Harare: Editora Mambo Press, 1985.

GUYTON, A. C. e HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

HALEY, J. E.; DICKENSON, A. H.; SCHACHTER, M. Electrophysiological evidence for a role of nitric oxide in prolonged chemical nociception in rat. **Neuropharmacology**, v. 31, p. 51-58, 1992.

HEAPY, C. G.; JAMIESON, A.; RUSSELL, N. J. W. Afferent C-fibre and A delta activity in models of inflammation. **Br. J. Pharmacol.**, v. 90, p. 164, 1987.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O. B.; HOLE, K. Formalin test in mice, auseful technique for evaluating mild analgesia. **J. Neurosci. Meth.**, v. 14, p. 69-76, 1985.

HUNSKAAR, S. e HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, p. 103-114, 1987.

HUTCHINGS, A.; SCOTT, A. H.; LEWIS, G.; CUNNINGHAM, A. B. **Zulu Medicinal Plants: An Inventory**. Pietermaritzburg: University of Natal Press, 1996.

HWANG, A. S. e WILCOX, G. L. Analgesic properties of intrathecally administered heterocyclic antidepressants. **Pain**, v. 28, p. 343-355, 1987.

HYLDEN, J. K. L. e WILCOX, G. L. Intrathecal morphine in mice: A new technique. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 67, p. 313-316, 1980.

JANCSÓ, G.; HOKFELT, T.; LUNDBERG, J. M.; KIRALY, E.; HALASZ, N.; NILSSON, G.; TERENIUS, L.; REHFELD, J.; STEINBUSCH, H.; VERHOFSTAD, A.; ELDE, R.; SAID, S.; BROWN, M. Immunohistochemical studies on the effects of capsaicin on spinal and medullary peptide and monoamine neurons using antisera to substance P, gastrin CCK, somatostatin, VIP, enkephalin, neurotensin and 5-HT. **J. Neurocytol.**, v. 10, p. 963-980, 1981.

JULIUS, D. e BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, p. 203-210, 2001.

KATERERE, D. R.; GRAY, A. I.; NASH, R. J.; WAIGH, R. D. Antimicrobial activity of pentacyclic triterpenes isolated from African Combretaceae. **Phytochemistry**, v. 63, p. 81-88, 2003.

KITTO, K. F.; HALEY, J. E.; WILCOX, G. L. Involvement of nitric oxide in spinally mediated hyperalgesia in the mouse. **Neurosci. Lett.**, v. 148, p. 1-5, 1992.

KOKWARO, O. **Medicinal Plants of East Africa**. Nairobi: East African Literature, 1976.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Fed. Proc.**, v.18, p. 412, 1959.

LEMBECK, F. The 1988 Ulf von Euler Lecture. Substance P: from extract to excitement. **Acta Physiol. Scand.**, v. 133, p. 435-454, 1988.

LIPP, J. Possible mechanisms of morphine analgesia. **Clin. Neuropharmacol.**, v. 14, p.131-147, 1991.

LIRA, S. R. D.; ALMEIDA, R. N.; ALMEIDA, F. R. C.; OLIVEIRA, F. S.; DUARTE, J. C. Preliminary Studies on the Analgesic Properties of the Ethanol extract of *Combretum Leprosum*. **Pharm. Biol**, v. 40, p. 213-215, 2002.

LIRA, S. G. e SILVEIRA, E. R., 2003. **Constituintes Químicos Fixos e Voláteis de *Combretum laxum* (Combretaceae)**. Disponível em <<http://www.sbgq.org.br/ranteriores/23/resumos/0763-1/>>. Acesso em: 04 fev. 2003.

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

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

MARTINI, N. e ELOFF, J. N. The preliminary isolation of several antibacterial compounds from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). **J. Ethnopharmacol.**, v. 62, p. 255–263, 1998.

MARTINI, N. D.; KATERERE, D. R.; ELOFF, J. N. Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). **J. Ethnopharmacol.**, v. 93, p. 207–212, 2004.

MASIKA, P. J. e AFOLAYAN, A. J. Antimicrobial activity of some plants used for the treatment of livestock disease in the Eastern Cape, South Africa. **J. Ethnopharmacol.**, v. 83, p. 129-134, 2002.

MATOS, F. J. A., 2003. **Plantas Medicinais do Ceará**. Disponível em: <<http://umbuzeiro.cnip.org.br/db/medic/taxa/377.shtml>>. Acesso em: 04 fev. 2003.

McGAW, L. J.; RABE, T.; SPARG, S. G.; JAGER, A. K.; ELOFF, J. N.; van STADEN, J. An investigation on the biological activity of *Combretum* species. **J. Ethnopharmacol.**, v. 75, p. 45-50, 2001.

MEDEIROS, C. M.; CARVALHO, A. T.; FACUNDO, V. A.; REZENDE, C. M.; PINTO, A. C.; MIRANDA, A. L. P. Activity analgesic and anti-inflammatory of the Ethanolic Extract of the Root the *Combretum leprosum*, Mart. **XXXV Congresso Brasileiro de Farmacologia**, p.134, 2003.

MÉNARD, D. P.; VAN ROSSUM, D.; KAR, S.; JOLICOEUR, F. B.; JHAMANDAS, K.; QUIRION, R. Tolerance to the antinociceptive properties of morphine in the rat spinal cord: Alteration of calcitonin gene-related peptide-like immunostaining and receptor binding sites. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 273, p. 887-894, 1995.

MENDES, G. L.; SANTOS, A. R. S.; CAMPOS, M. M.; TRATSK, K. S.; YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V.; CALIXTO, J. B. Anti-hyperalgesic properties of the extract and of the main sesquiterpene polygodal isolated from the barks of *Drymis winteri* (Winteraceae). **Life Sci.**, v. 63, p. 369-381, 1998.

MENDES, G. L.; SANTOS, A. R. S.; MALHEIROS, A.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Assessment of mechanisms involved in antinociception caused by sesquiterpene polygodial. **J. Pharma. Exp. Ther.**, v. 292, p. 164–172, 2000.

MILLAN, M. J. The role of descending noradrenergic and serotonergic pathways in the modulation of nociception: Focus on receptor multiplicity. *In: The pharmacology of pain* (Dickenson, A. e Besson, J. M.). Berlin: Springer, p. 385-446, 1997.

MILLAN, M. J. The Induction of Pain: An Integrative Review. **Prog. Neurobiol.**, v. 57, p. 1-164, 1999.

MILLAN, M. J. Descending Control of Pain. **Prog. Neurobiol.**, v.57, p. 355-474, 2002.

MOORE, P. K.; OLUYOMI, A. O.; BABBEDGE, R. C.; WALLACE, P.; HART, S. L. L- N^G -nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. **Br. J. Pharmacol.**, v. 102, p. 198-202, 1991.

OH, U.; HWANG, S. W.; KIM, D. Capsaicin activates a nonselective cation channel in cultured neonatal rat dorsal root ganglion neurons. **J. Neurosci.**, v. 15, p. 1659-1667, 1996.

OLAJIDE, O. A.; MAKINDE, J. M.; OKPAKO, D. T. Evaluation of the antiinflammatory property of the extract of *Combretum micranthum* G. Don. (Combretaceae). **Inflammopharmacology**, v. 11, p. 293-298, 2003.

OSSIPOV, M. H.; MALAN JÚNIOR., T. P.; LAI, J.; PORRECA, F. Opioid pharmacology of acute and chronic pain. *In: The pharmacology of pain* (Dickenson, A. e Besson, J. M.). Berlin: Springer, p. 305-334, 1997.

RIBEIRO, R. A.; VALE, M. L.; THOMAZZI, S. M.; PASCHOALATO, A. B. P.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 387, p.111-118, 2000.

ROSLAND, J. H.; HUNSKAAR, S.; HOLE, K. Diazepam attenuates morphine antinociception test dependently in mice. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 66, p. 382-386, 1990.

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

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

SAKURADA, T.; TAN-NO, K.; YAMADA, T.; SAKURADA, S.; KISARA, K. Phosphoramidon potentiates mammalian tachykinin-induced biting, licking and scratching behaviour in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 37, p. 779-783, 1990.

SAKURADA, T.; KATSUMATA, K.; TAN-NO, K.; SAKURADA, S.; KISARA, K. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. **Neuropharmacology**, v. 31, p.1279-1285, 1992.

SAKURADA, T.; KATSUMATA, K.; YOGO, H.; TAN-NO, K.; SAKURADA, S.; KISARA, K. Antinociception induced by CP 96,345, a non-peptide NK-1 receptor antagonist, in the mouse formalin and capsaicin tests. **Neurosc. Lett.**, v. 151, 142-145, 1993.

SANTOS, A. R. S. e CALIXTO, J. B. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neuropeptides**, v. 31, p. 381-389, 1997a.

SANTOS, A. R. S. e CALIXTO, J. B. Ruthenium red and capsazepine antinociceptive effect in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neurosc. Lett.**, v. 235, p. 73-76, 1997b.

SANTOS, A. R. S.; CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Further studies on the antinociceptive action of the hydroalcoholic extracts from plants of the genus *Phyllanthus*. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 47, p. 66-71, 1995a.

SANTOS, A. R. S.; CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Analysis of the mechanisms underlying the antinociceptive effect of the extracts of plants from the genus *Phyllanthus*. **Gen. Pharmacol.**, v. 26, p. 1499-1506, 1995b.

SANTOS, A. R. S.; MIGUEL, O. G.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Antinociceptive properties of the new alkaloid, cis-8,10-Di-N-propyllobelidiol hydrochloride dihydrate isolated from *Siphocampylus verticillatus*: evidence for the mechanism of action. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 289, p. 417-426, 1999.

SCHEIDT, C.; SANTOS, A. R.; 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**, v. 43, p. 340-347, 2002.

SEGUIN, L.; MAROUILLE-GIRARDON, L.; MILLAN, M. J. Antinociceptive profiles of non-peptidergic neurokinin-1 and neurokinin-2 receptor antagonists, a comparison to other classes of antinociceptive agent. **Pain**, v. 61, p. 325-343, 1995.

SIEGMUND, E. A.; CADMUS, R. A.; LU, G. A method for evaluating both non-narcotic and narcotic analgesics. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 95, p. 729-731, 1957a.

SIEGMUND, E. A.; CADMUS, R. A.; LU, G. Screening analgesics, including aspirin-type compound, based upon the antagonism of chemically induced "writhing" in mice. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 119, p. 184-193, 1957b.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Universidade Federal de Santa Catarina e Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Editora da Universidade e Editora da UFSC, 1999.

SNYDER, S. H. Nitric oxide: First in a new class of neurotransmitters. **Science**, v. 257, p. 494-496, 1992.

SZALLASI, A. e BLUMBERG, P. M. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. **Pharmacol. Rev.**, v. 51, p.159-211, 1999.

SZOLCSÁNYI, J. Sensory receptors and the antinociceptive effects of capsaicin. In: HAKANSON, R.; SUNDLER, F. **Tachykinin Antagonists**. p. 45-56. Amsterdam: Elsevier, 1985.

TJOLSEN, A.; BERGE, O. G.; HUNSKAAR, S.; ROLAND, J. H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, p. 5-17, 1992.

TJOLSEN, A. e HOLE, K. Animals models of analgesia. *In: The pharmacology of pain* (ed. Dickenson, A. e Besson, J. M.). p. 1-20. Berlin: Springer, 1997.

URCA, G. e RAIGORODSKY, G. Behavioral classification of excitatory amino acid receptors in mouse spinal cord. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 153, p. 211–220, 1988.

VALLANO, M.L. Developmental aspects of NMDA receptor function. **Crit. Rev. Neurobiology**, v. 12, p. 177-204, 1998.

VAN WYK, B. E.; VAN OUDTSHOORN, B.; GERICKE, N. **Medicinal Plants of South Africa**. Pretoria: Editora Briza Publications, 1997.

VAZ, Z. R.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Antinociceptive action of 2-(4-Bromobenzoyl)-3-Methyl-4,6-Dimethoxy Benzofuran, a novel Xanthoxyline derivative on chemical and thermal models of nociception in mice. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 278, p. 304-312, 1996.

VENTAFRIDDA, V.; BIANCHI, M.; RIPAMONTI, C.; SACERDOTE, P.; DE CONNO, F.; ZECCA, E.; PANERAI, A. E. Studies on the effects of antidepressant drugs on the antinociceptive action of morphine and on plasma morphine in rats and man. **Pain**, v. 43, p. 155-162, 1990.

VERGE, V. M.; XU, X. J.; WIESENFELD-HALLIN, Z.; HÖKFELT, T. Marked increase in nitric oxide synthase mRNA in rat dorsal root ganglia after peripheral axotomy. In situ hybridization and functional studies. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p.11617-11621, 1992.

WALSH, T.D. Antidepressants in chronic pain. **Clin. Neuropharmacol.**, v. 6, p. 271-295, 1983.

WATT, J. M. e BREYER-BRANDWIJK, M. G. **The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa**. Londres: Editora Livingstone, 1962.

WESTLUND, K.N.; CARLTON, S.M.; ZHANG, D.; WILLIS, W.D. Glutamate-immunoreactive terminals synapse on primate spinothalamic tract cells. **J. Comp. Neurol.**, v. 322, p. 519-527, 1992.

WHITTLE, B. A. Release of a kinin by intraperitoneal injection of chemical agents in mice. **Int. J. Neuropharmacol.**, v. 3, p. 369-378, 1964.

WOOLFE, G. e MACDONALD, A. D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol). **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 80, p. 300-307, 1944.

YAKSH, T. L. Pharmacology of spinal adrenergic system with modulate spinal nociceptive processing. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.22, p. 845-858, 1985.

YAKSH, T. L. e RUDY, T. A. Studies on the direct spinal action of narcotics on the production of analgesia in the rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 202, p. 411-428, 1977.

YAMAMOTO, T.; SHIMOYAMA, N.; MIZUGUCHI, T. Nitric oxide synthase inhibitor blocks spinal sensitization induced by formalin injection into the rat paw. **Anesth. Analg.**, v. 77, p. 886-890, 1993.

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