

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THAÍS BOLOGNESI

EFICÁCIA PRÉ-CLÍNICA DO EXTRATO DOS RIZOMAS DE *Petasites hybridus* EM
MODELOS EXPERIMENTAIS UTILIZANDO SUBSTÂNCIAS INDUTORAS DE
MIGRÂNEA E DE NOCICEPÇÃO EM CAMUNDONGOS

CURITIBA

2021

THAÍS BOLOGNESI

EFICÁCIA PRÉ-CLÍNICA DO EXTRATO DOS RIZOMAS DE *Petasites hybridus* EM
MODELOS EXPERIMENTAIS UTILIZANDO SUBSTÂNCIAS INDUTORAS DE
MIGRÂNEA E DE NOCICEPÇÃO EM CAMUNDONGOS

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Fernanda de Paula Werner

CURITIBA

2021

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Bolognesi, Thaís.

Eficácia pré-clínica do extrato dos rizomas de *Petasites hybridus* em modelos experimentais utilizando substâncias indutoras de migrânea e de nocicepção em camundongos. / Thaís Bolognesi. – Curitiba, 2021.
70 f. : il.

Orientadora: Maria Fernanda de Paula Werner.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Inflamação. 2. Asteraceae. 3. Dor de cabeça. 4. Cabeça - Doenças. I. Título. II. Werner, Maria Fernanda de Paula. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (20. ed.) 616.8491



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FARMACOLOGIA -
40001016038P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **THAÍS BOLOGNESI** intitulada: **EFICÁCIA PRÉ-CLÍNICA DO EXTRATO DOS RIZOMAS DE *Petasites hybridus* EM MODELOS EXPERIMENTAIS UTILIZANDO SUBSTÂNCIAS INDUTORAS DE MIGRÂNEA E DE NOCICEPÇÃO EM CAMUNDONGOS**, sob orientação da Profa. Dra. MARIA FERNANDA DE PAULA WERNER, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 26 de Março de 2021.

Assinatura Eletrônica

26/03/2021 17:23:28.0

MARIA FERNANDA DE PAULA WERNER

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

26/03/2021 16:03:11.0

SARA MARCHESAN DE OLIVEIRA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA)

Assinatura Eletrônica

29/03/2021 14:56:49.0

GABRIELA TREVISAN DOS SANTOS

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA)

Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531990 - Tel: (0xx41)3361-1693 - E-mail: pgfarmacologia@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 85310

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 85310

AGRADECIMENTOS

Obrigada: aos meus pais, Elizabeth e Marcus, pelo apoio incondicional e pela maior demonstração de empatia que conheci dada pela minha mãe; aos meus irmãos, Bruno e Vinícius, pelos ouvidos e trocas de experiência; ao meu marido Fabrício, que me acompanhou, em alguns casos literalmente, com muita paciência e muita compreensão, deixando minha vida mais fácil sempre quando possível; aos meus amigos, como sempre, pela amizade, especialmente ao Felipe por me orientar desde quando comecei a estudar para esta empreitada; a minha equipe, meus pares e companhia, que suportaram minhas ausências durante essa jornada, em especial a Gislaine; ao pessoal do laboratório pelos conselhos, auxílios (obrigada André por cuidar tão bem dos meus animais) e discussões; a minha orientadora, Maria Fernanda, que aceitou minhas condições nem sempre favoráveis, dedicando horas aleatórias para minha orientação; e, finalmente, Universidade e demais professores do programa, sem os quais não seria possível a realização desse projeto.

Nunca tenha certeza de nada, porque a sabedoria começa com a dúvida.

Sigmund Freud

RESUMO

Petasites hybridus (Asteraceae), popularmente conhecido como butterbur tem sido usado para tratar dores de cabeça, febre, tosse, asma, feridas na pele e, mais recentemente, para a profilaxia da migrânea. As hipóteses para explicar o efeito anti-migrânea ainda não foram estudadas profundamente. Assim, as respostas nociceptivas faciais induzidas por substâncias indutoras de migrânea como histamina, PGE₂, agonistas dos receptores TRPV1 (capsaicina), TRPV4 (GSK 1016790A) e TRPA1 (cinamaldeído), nitroglicerina e CGRP, foram usados para investigar os efeitos antinociceptivos do extrato dos rizomas de *Petasites hybridus* (PHE) em camundongos Swiss machos (CEUA-BIO – UFPR n° 1299). Da mesma forma, foram empregados o modelo de formalina orofacial, teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético e de inflamação induzida pela injeção intraplantar de carragenina. O pré-tratamento oral com PHE 20 e 40 mg/kg inibiu apenas a nocicepção facial induzida pelo cinamaldeído. Entretanto, a alodinia mecânica periorbital (PMA) induzida por agentes indutores de migrânea como histamina, GSK 1016790A, nitroglicerina, cinamaldeído e CGRP foram significativamente prevenidas pelo PHE. Além disso, o PHE nas doses de 10, 20 e 40 mg/kg reduziu o comportamento de *rubbing* facial em ambas as fases neurogênica e inflamatória do teste de formalina, diminuiu as contorções abdominais, o extravasamento plasmático e a migração total de leucócitos para o peritônio no modelo do ácido acético, bem como inibiu a alodinia mecânica e o edema de pata induzidos pela carragenina. O estudo de toxicidade oral de doses repetidas por 14 dias com PHE nas doses de 50, 300 e 2000 mg/kg não revelou mudanças relacionados ao peso corporal e mortalidade. Contudo, foram observados aumento do peso do fígado, nos níveis plasmáticos de fosfatase alcalina e de ureia, efeitos que precisam ser melhor investigados. A redução da PMA promovida pelo PHE poderia explicar o efeito anti-migrânea do PHE, o qual parece envolver a modulação da sinalização do óxido nítrico, do receptor TRPA1 e do CGRP. Além disso, o PHE promoveu efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios em modelos agudos, adicionando novas evidências e mecanismos para o uso de *Petasites hybridus* no manejo da dor.

Palavras-chave: *Petasites hybridus*; butterbur; migrânea; nocicepção; inflamação; CGRP

ABSTRACT

Petasites hybridus (Asteraceae), commonly known as butterbur has been used to treat headache, fever, cough, asthma, skin wounds and, most recently, for migraine prophylaxis. The hypotheses to explain the anti-migraine effect remains unclear. Thus, nociceptive facial responses induced by histamine, PGE₂, TRPV1 (capsaicin), TRPV4 (GSK 1016790A) and TRPA1 (cinnamaldehyde) agonists, nitroglycerin and CGRP, and orofacial formalin model, acetic acid-induced writhing test, and intraplantar carrageenan-induced inflammation were used to investigate the antinociceptive effects of *Petasites hybridus* rhizome extract (PHE, ~ 15% of petasines) in male Swiss mice (CARE/BIO - UFPR, protocol 1299/19). The oral pretreatment with PHE at 20 and 40 mg/kg prevented only cinnamaldehyde-induced facial nociception. However, periorbital mechanical allodynia (PMA) induced by migraine provoking agents such as histamine, GSK 1016790A, nitroglycerin, cinnamaldehyde and CGRP were significantly prevented by PHE. Moreover, PHE at 10, 20 and 40 mg/kg reduced the face rubbing behavior in both neurogenic and inflammatory phases of formalin test, decreased the abdominal constrictions, plasmatic extravasation and total leukocytes migration in the acetic acid model, and also inhibited carrageenan-induced hindpaw mechanical allodynia and paw edema. The 14-day repeated-dose oral toxicity study with PHE at 50, 300 and 2000 mg/kg reveals unremarkable findings related to body weight and mortality. However, increased liver weight, plasma levels of alkaline phosphatase and urea were observed, effects that need to be further investigated. The reduction in PMA promoted by PHE could explain the anti-migraine effect of PHE, which seems to involve modulation of nitric oxide signaling, the TRPA1 receptor, and CGRP. The reduction of PMA promoted by PHE reinforce the anti-migraine action of butterbur mainly through the modulation of nitric oxide, TRPA1 and CGRP signaling. Furthermore, our data also demonstrated that PHE display peripheral antinociceptive and anti-inflammatory effects in acute mice models, adding new evidence and mechanisms for the use of *Petasites hybridus* for pain management.

Keywords: *Petasites hybridus*; butterbur; migraine; nociception, inflammation; CGRP.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fases dos ataques de migrânea.....	19
Figura 2 – Da esquerda para a direita: folhas, flores e partes subterrâneas da espécie <i>Petasites hybridus</i>	25
Figura 3 - Sesquiterpenos e respectivos metabólitos da espécie <i>Petasites hybridus</i>	28
Figura 4 - Alcaloides pirrolizidínicos senecionina e integerimina.....	30

Artigo Científico

Fig. 1. Effect of PHE oral administration on the spontaneous nociceptive behavior (A and C) and periorbital mechanical allodynia (PMA) (B and D) evoked by periorbital (p.orb., 10 µl/site) injection of histamine (A and B) or PGE2 (C and D).....	44
Fig. 2. Effect of PHE oral administration on the spontaneous nociceptive behavior (A and C) and periorbital mechanical allodynia (PMA) (B and D) evoked by periorbital (p.orb., 10 µl/site) injection of capsaicin (A and B) or GSK 1016790A (C and D).....	45
Fig. 3. Effect of PHE oral administration on the periorbital mechanical allodynia (PMA) evoked by nitroglycerin (10 mg/kg, i.p.) injection..	46
Fig. 4. Effect of PHE oral administration on the spontaneous nociceptive behavior (A and C) and periorbital mechanical allodynia (PMA) (B and D) evoked by periorbital (p.orb., 10 µL/site) injection of cinamaldehyde (A and B) or CGRP (C and D)	47
Fig. 5. Antinociceptive effect of oral administration of PHE in the orofacial formalin test. Mice were pretreated with vehicle (V), diclofenac (Diclo: 10 mg/kg, i.p.) or PHE (10, 20 and 40 mg/kg, p.o.) 1h before the 2.5% formalin-induced nociception (20 µL/i.pl.).....	48
Fig. 6. Effect of oral administration of PHE on abdominal constriction (A), Evans blue leakage (B) and leukocyte infiltration (C) induced by acetic acid..	49
Fig. 7. Effect of PHE oral administration on mechanical allodynia (A) and paw edema (B) induced by carrageenan.....	50
Fig. 8. Toxicological parameters of mice after administration of PHE daily for 14 days. Effect of PHE at 50, 300 and 2000 mg/kg on on body weight (A), organs relative weights (B) and serum biochemistry data (C).....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tratamentos farmacológicos empregados na migrânea	24
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 PROCESSAMENTO DA DOR E DA NOCICEPÇÃO	16
1.2 MIGRÂNEA	17
1.2.1 Fases da Migrânea	18
1.2.2 Tratamentos Farmacológicos para a Migrânea	23
1.3 PLANTA MEDICINAL: <i>PETASITES HYBRIDUS</i>	25
1.3.1 Toxicidade Relacionada aos Alcaloides Pirrolizidínicos	29
2 JUSTIFICATIVA DO TRABALHO	30
3 OBJETIVOS	31
3.1 OBJETIVO GERAL	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS (ARTIGO CIENTÍFICO)	31
4 MATERIAIS	32
4.1 ANIMAIS	32
4.2 MATERIAL BOTÂNICO: EXTRATO DE <i>PETASITES HYBRIDUS</i>	32
4.2.1 Justificativa da Dose Utilizada	33
5 ARTIGO CIENTÍFICO	34
6 CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS	64

ARTIGO CIENTÍFICO

***Petasites hybridus* rhizome extract prevents periorbital mechanical allodynia induced by migraine-provoking substances and promotes antinociceptive and anti-inflammatory effects in acute pain models in mice**

Graphical abstract	35
Abstract	36
1 Introduction	37
2 Experimental procedure	39
2.1 Drugs and reagents	39
2.2 Animals	39
2.3 <i>Petasites hybridus</i> rhizome extract and dose conversion between humans and mice	39
2.4 Facial nociceptive responses and periorbital mechanical allodynia	40
2.5 Peripheral inflammatory pain models	41

2.5.1 Nociception induced by orofacial formalin	41
2.5.2 Abdominal constriction, peritoneal capillary permeability and leukocyte infiltration induced by acetic acid.....	41
2.5.3 Carrageenan-induced mechanical allodynia and paw edema	41
2.6 Fourteen-day repeated-dose toxicity study.....	42
2.7 Etatistical analysis	42
3 Results	43
3.1 Acute facial nociceptive test and periorbital mechanical allodynia	43
3.2 Nociception induced by orofacial formalin	48
3.3 Abdominal constriction, peritoneal capillary permeability and leukocyte infiltration induced by acetic acid	49
3.4 Carrageenan-induced allodynia response and edema in the mouse paw	50
3.5 Acute oral toxicity of repeated doses.....	51
4 Discussion	52
References	58

1 INTRODUÇÃO

1.1 PROCESSAMENTO DA DOR E DA NOCICEPÇÃO

Ainda que a dor e a nocicepção tenham definições distintas, elas ocorrem de forma coexistentes. A principal diferença entre as definições é que a dor envolve um componente afetivo negativo (Sneddon, 2018). A percepção da dor é de extrema importância para a manutenção do bem-estar e, por vezes, da sobrevivência. O processo de detectar estímulos nocivos fornece proteção adequada frente a condições associadas a uma lesão tecidual real ou potencial, as quais podem representar ameaça à vida. Quando os mecanismos de percepção de dor são alterados, a utilidade como sistema de alerta agudo perde sua função e a hipersensibilidade leva a dor crônica e debilitante (Basbaum *et al.*, 2009).

A nocicepção é o processo pelo qual estímulos nocivos térmicos, mecânicos ou químicos são detectados pelas fibras nervosas periféricas (nociceptores). Anatomicamente, os corpos celulares dos nociceptores são situados no gânglio da raiz dorsal (GRD), localizado lateralmente à medula espinhal, enquanto seus axônios projetam-se nos tecidos periféricos. Na face, o gânglio trigeminal, análogo ao GRD, é o responsável pela percepção de estímulos faciais. Ao contrário de outras estruturas neuronais, os nociceptores são estimulados ao atingir a faixa nociva, dando a eles a capacidade seletiva de responder especificamente a estímulos potencialmente prejudiciais. Os nociceptores podem ser divididos entre os que medeiam a dor aguda e bem localizada e aqueles que transmitem a dor lenta e não localizada. A transmissão da dor lenta se dá através de fibras A δ levemente mielinizadas e de diâmetro médio, enquanto a da dor crônica ocorre por fibras C não mielinizadas de pequeno diâmetro (Sneddon, 2018). É interessante destacar que as fibras aferentes primárias possuem uma distinção morfológica que as torna aptas a enviar e receber mensagens de ambas as extremidades, e não somente de forma unidirecional, da periferia para a medula espinhal (Yam *et al.*, 2018).

A sensibilização de nociceptores, decorrente dos processos nociceptivos (Sneddon, 2018), pode resultar em alodinia, em que estímulos normalmente inócuos, como um toque sutil ou calor não nocivo, passam a ser percebidos como dolorosos, (Jensen & Finnerup, 2014). A alodinia pode ser mecânica, apresentando-se resposta de dor a leve toque ou térmica (Cohen & Mao, 2014). A sensibilização pode também resultar em hiperalgesia, em que estímulos percebidos como dor, passam a apresentar maior intensidade (Jensen & Finnerup, 2014). A hiperalgesia

pode ser primária ou secundária. Na primária a sensibilização de nociceptores periféricos é resultado da lesão tecidual, ao contrário da secundária em que a sensibilização do sistema nervoso central (SNC) não está diretamente relacionada a lesão tecidual (Cohen & Mao, 2014).

A transmissão dos estímulos nociceptivos se dá por geração de potenciais de ação, em que os canais de sódio, potássio e cálcio são cruciais, além de desempenharem um papel fundamental na liberação de neurotransmissores dos terminais dos nociceptores centrais ou periféricos, levando ao processo de geração de dor e de inflamação neurogênica. A inflamação neurogênica refere-se ao processo pelo qual ocorre a liberação periférica de neuropeptídeos, tais como o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e substância P (SP), os quais induzem vasodilatação e extravasamento de proteínas plasmáticas. Nota-se que o terminal nociceptor periférico responde a estímulos nocivos ambientais (calor, frio e estimulação mecânica), enquanto o terminal central está sujeito a uma série de moléculas endógenas que regulam a sensibilidade (Basbaum *et al.*, 2009).

1.2 MIGRÂNEA

A migrânea, caracterizada por intensa dor de cabeça acompanhada por sintomas desagradáveis, é considerada uma doença neurológica debilitante, com alto impacto pessoal e socioeconômico, segundo a Classificação Internacional de Desordens de Dor de Cabeça, 3ª edição (ICHD-3) (Andreou & Edvinsson, 2019).

O estudo de Carga Global de Doenças, Lesões e Fatores de Risco (GBD), estimou que em 2016, 1,04 bilhões de pessoas apresentaram migrânea, sendo mais prevalente em mulheres entre 15 e 46 anos (proporção de 3:1 em relação aos homens). Esses dados, colocam a migrânea como a enfermidade de 6ª maior prevalência dentre 328 doenças estimadas pela GBD. Conforme previamente mencionado, a migrânea promove um quadro debilitante, afetando principalmente mulheres jovens e de meia-idade, colocando-a no ranking entre as 10 principais causas de incapacidade (Stovner *et al.*, 2018).

De acordo com a ICHD-3, a migrânea se divide em dois principais tipos: com e sem aura, sendo que a principal diferença entre elas é a presença de sintomas neurológicos focais e transitórios, comumente precedentes a dor de cabeça, nas migrâneas com aura (Olesen, 2018).

As dores de cabeça da migrânea possuem características específicas que as diferem de outros tipos de cefaleia, dentre elas: localização unilateral; duração de 4 a 72 horas; dor de intensidade moderada à grave, dor pulsante; associação com náusea, vômito e fonofobia ou fotofobia. A migrânea pode também ser precedida por sintomas de aura (Ha & Gonzalez, 2019), manifestando-se com sintomas visuais como escotomas (pontos pretos) e cintilações (pontos brilhantes), parestesia (formigamento) ou dormência, disartria (transtornos da articulação da fala) ou fraqueza (Rajapakse & Davenport, 2019). As crises podem ser desencadeadas por gatilhos, que são específicos para cada paciente. No entanto, alguns desses gatilhos são semelhantes entre os pacientes migranosos, como estresse, álcool, odores particulares, chocolate, vinho tinto e glutamato monossódico (Ha & Gonzalez, 2019).

Os quadros crônicos, cujos pacientes apresentam, no mínimo, 15 episódios em um período de 3 meses, são incomuns, afetando cerca de 1 a 5% dos pacientes (Ha & Gonzalez, 2019). Crianças e adolescentes de todas as idades também são afetadas com migrânea. Estima-se que 3 a 7% dessa população seja afetada com sintomas e severidade muito variados (Pothmann & Danesch, 2005).

1.2.1 Fases da Migrânea

Os ataques de migrânea podem ser divididos em 4 diferentes fases, cada uma com características sintomáticas específicas. São elas: (1) fase premonitória, prévia a dor de cabeça. Nesta fase os pacientes apresentam bocejos, sede, sonolência, desejo alimentar, dificuldades cognitivas, mudanças de humor e alterações na frequência urinária; (2) fase com presença de sintomas neurológicos transitórios, sendo a alteração visual o sintoma mais típico desta fase, também denominada aura; (3) fase da dor de cabeça propriamente dita, cuja maioria dos pacientes apresenta dor localizada, podendo ser piorada por movimento e acompanhada por sensibilidade a estímulos sensoriais e náusea; e (4) fase *postdrome*, em que os pacientes apresentam problemas de compreensão e concentração, cansaço e rigidez do pescoço. As fases supracitadas estão ilustradas da figura 1 (Andreou & Edvinsson, 2019; Goadsby & Holland, 2019), sendo as particularidades de cada uma delas apresentadas na sequência.

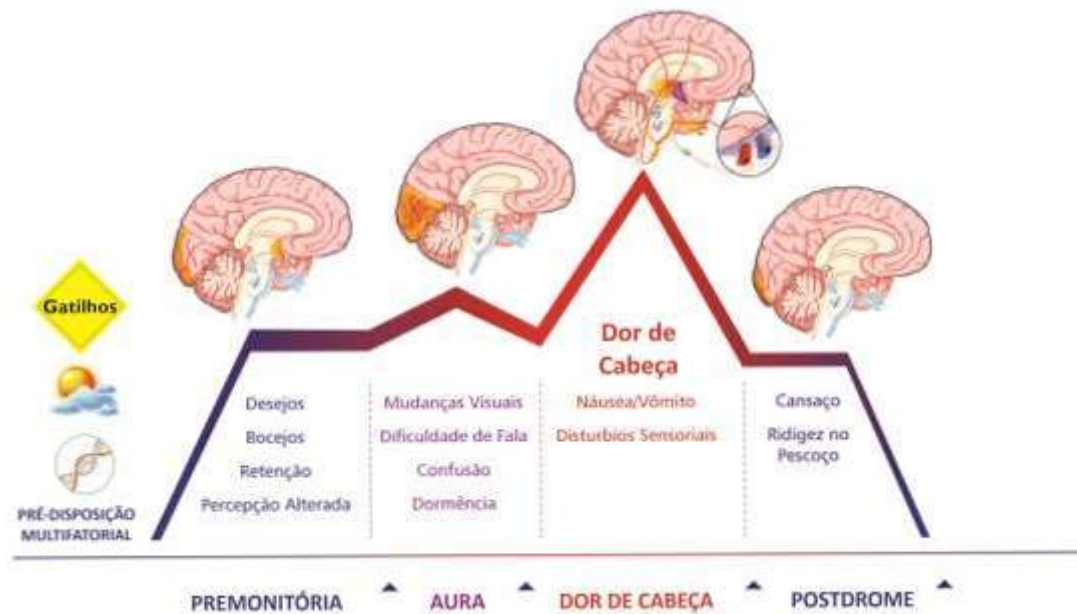


Figura 1 - Fases dos ataques de migrânea. Fonte: adaptado de Andreou & Edvinsson (2019).

(1) Fase Premonitória: as manifestações sintomáticas dessa fase podem ocorrer horas, ou até mesmo dias, antes do ataque propriamente dito (Goadsby & Holland, 2019). A característica rítmica dos ataques sugere o envolvimento das áreas hipotalâmicas, que podem ter sua função resumidamente em “organizar os ritmos circadiano, manter a homeostase e regular a excitação” (Andreou & Edvinsson, 2019).

Como previamente mencionando, os sintomas dessa fase abrangem alterações de humor, bocejos, fadiga, desejos alimentares e hipersensibilidade a estímulos externos (Rainero et al., 2020). Os sintomas presentes nessa fase, especialmente os relacionados com o sono e a alimentação, estão estritamente associados com funções homeostáticas, sendo o distúrbio dessas funções gatilhos comuns para a migrânea. Algumas evidências sugerem um possível envolvimento da região posterior do hipotálamo, em que se encontram circuitos relacionados com a transição entre o sono e o despertar, no desencadeamento da migrânea (Andreou & Edvinsson, 2019). Segundo Goadsby & Holland, (2019), o envolvimento hipotalâmico na migrânea está bem estabelecido, sendo ativado durante a fase premonitória. Estudos de neuroimagem por tomografia e ressonância magnética, mostraram o envolvimento hipotalâmico durante a fase premonitória do ataque. Ademais, funções autonômicas como náuseas, alterações alimentares e hipersensibilidade a estímulos internos, conectadas pelo hipotálamo a outras áreas

do cérebro, são significativamente prejudicadas em todas as fases, sendo, portanto, uma possível elucidação para as alterações autonômicas (Rainero et al., 2020).

Ainda, considerando a presença de bocejos na fase premonitória, a via dopaminérgica também parece estar relacionada à fisiopatologia da migrânea (Andreou & Edvinsson, 2019).

(2) Fase de Aura: é comum em cerca de 15 a 20% dos pacientes. Acredita-se ser resultado da depressão de propagação cortical (Andreou & Edvinsson, 2019) caracterizada por depressão lenta (3 mm/min) que propaga uma onda de despolarização neuronal, seguida de inibição de atividade cortical por até 30 minutos. Associa-se a depressão com efluxo de íons potássio dos neurônios para os espaços intersticiais, e influxo de íons sódio e cálcio, além da liberação de glutamato (Rainero et al., 2020). No entanto, ainda não é claro como a referida depressão é ativada nos pacientes com aura (Andreou & Edvinsson, 2019).

(3) Fase da Cefaleia: a característica pulsante da dor nesta fase denota o envolvimento da ativação do sistema trigeminovascular que transmite estímulos nociceptivos das meninges para as áreas centrais do cérebro, como núcleos do tronco cerebral, hipotálamo, tálamo e córtex. A ativação antidrômica leva a liberação de peptídeos pró-inflamatórios, como o CGRP, um neuropeptídeo com 37 aminoácidos codificado pelo mesmo gene que o hormônio calcitonina, com potencial vasodilatador pronunciado e potencializador da transmissão glutamatérgica. O fato do envolvimento de sensibilização central e periférica podem explicar os sintomas de exacerbação da dor com atividade física e a alodinia (Rainero et al., 2020).

Quase todos os tecidos cranianos da cabeça e da face, sejam em estruturas intra ou extracranianas, são inervados por aferentes do nervo trigêmeo provenientes do interior do gânglio trigeminal. Dentre as 3 divisões do nervo, mandibular, oftálmico e maxilar, a oftálmica é considerada a de maior importância na migrânea, devido a distribuição dolorosa ao redor da região periorbital (Goadsby & Holland, 2019).

É sabido que a dor de cabeça sentida durante um ataque de migrânea é notada nas estruturas intracranianas, como a dura-máter e os vasos sanguíneos cerebrais, e decorre da ativação da via trigeminotalâmica ascendente. A ativação nociceptiva das fibras dessa via é conhecida como “ativação trigeminovascular”. As referidas estruturas intracranianas são especialmente inervadas por nociceptores, como fibras C não mielinizadas e fibras A δ mielinizadas, cujos corpos celulares

estão situados no gânglio do trigêmeo (Andreou & Edvinsson, 2019). O CGRP, substância P e neurocinina A, são alguns dos principais neurotransmissores expressos pelo nervo do trigêmeo (Goadsby & Holland, 2019).

Uma vez que a via é ativada, as fibras trigeminais transmitem informações sensoriais das estruturas intracranianas aos neurônios de segunda ordem no complexo trigeminocervical, que por sua vez retransmitem a neurônios de terceira ordem, no tálamo contralateral. A partir daí as informações são processadas nas áreas corticais superiores. Estudos com pacientes com migrânea mostraram alterações conectivas entre o tálamo e as áreas corticais moduladoras da dor durante ataques espontâneos de migrânea. Além disso, o tálamo está associado ao desenvolvimento de sintomas da migrânea, como hipersensibilidade a estímulos visuais, sensibilidade auditiva e alodinia não craniana. No entanto, o meio pelo qual a disfunção hipotalâmica pode ativar a via trigeminotalâmica ascendente é ainda desconhecido (Andreou & Edvinsson, 2019).

Outro fator amplamente associado à migrânea são as mudanças vasculares, que outrora foram consideradas como o principal mecanismo relacionado a dores de cabeça na migrânea. Em diversos estudos a dilatação intracraniana das artérias cerebrais pode ser observada durante um ataque, no entanto, a dilatação por si só não explica a cefaleia, tendo em vista que outras situações enfermas, como hipotensão, provocam a dilatação arterial craniana sem provocar ataques de migrânea (Andreou & Edvinsson, 2019). A hipótese de que a origem das dores de cabeça da migrânea era decorrente da dilatação dos vasos cerebrais, foi contestada por um ensaio que avaliou a dilatação arterial extracraniana de pacientes durante ataques espontâneos através de angiografia por ressonância magnética. A avaliação da ressonância dos indivíduos da pesquisa não revelou dilatação das artérias, indicando que a vasodilatação possa estar associada a ativação e sensibilização do trigêmeo ao invés da indução das dores de cabeça diretamente. Em contraponto, a indução da migrânea pelo peptídeo relacionado ao CGRP está associada à dilatação das artérias extra e intracerebrais. A provável explicação para essas discrepâncias pode estar nas diferenças entre os ataques espontâneos e induzidos ou ainda, na diferença entre o início da migrânea e a execução do exame de ressonância (Ashina et al., 2017).

A importância fundamental do envolvimento do sistema trigeminal na fase de cefaleia dos ataques de migrânea é sustentada por diferentes evidências, uma vez

que as estruturas responsáveis pela transmissão de estímulos dolorosos durante um ataque de migrânea são altamente inervadas por fibras do trigêmeo. Apesar dos mecanismos precisos envolvidos na dor e no ataque da migrânea não serem conhecidos, o CGRP, liberado após a ativação de nociceptores peptidérgicos trigeminais, merece destaque. Um dos eventos marcantes promovido pelo CGRP é a vasodilatação das artérias meníngeas, tanto de roedores quanto de humanos, dado que mimetiza parte dos eventos neuroquímicos que ocorrem na migrânea (Edvinsson, 2015; Dux *et al.*, 2016). Alguns modelos de ensaios clínicos de migrânea, que fazem uso do CGRP mostraram dilatação extracraniana em indivíduos saudáveis. O fato da administração prévia de BIBN4096BS74, um antagonista do receptor do CGRP, evitar a dilatação, corrobora com o achado prévio. O exame de angiografia por ressonância magnética, indicou a vasodilatação da artéria meníngea média, sendo a lateralidade da cefaleia correspondente ao lado da dilatação (Ashina *et al.*, 2017). Além disso, sabe-se que durante os ataques os níveis de CGRP estão elevados e amostras sanguíneas de pacientes com migrânea indicam que a origem do neuropeptídeo é o nervo do trigêmeo. Ademais, substâncias como o CGRP e a histamina, que não atravessam a barreira hematoencefálica, podem desencadear um ataque em pacientes migranosos, o que não ocorre em pacientes saudáveis, sugerindo a sensibilização do sistema trigeminal na migrânea (Andreou & Edvinsson, 2019).

Com base em estudos em animais, foi observado que receptores de potencial transitório (TRP), mais especificamente TRPA1, TRPV1 e TRPV4, são expressos em neurônios nociceptivos sensoriais que inervam as meninges (Veldhuis, *et al.*, 2014). Sendo assim, os TRPs também têm sido relacionados à migrânea, especialmente porque de forma complementar, a ativação dos TRPs promove a liberação de CGRP de terminações nervosas sensoriais.

Ensaios clínicos com infusão de nitroglicerina, mostraram dilatação das artérias extra e intracerebrais em paciente saudáveis, com pico de dilatação da artéria cerebral em 10 a 15 minutos após o início da infusão, e maior dilatação arterial cerebral em pacientes com migrânea comparados a pacientes saudáveis. Ataques migranosos induzidos por nitroglicerina, têm sido associados a reatividade cerebrovascular do CO₂ de forma similar as migrâneas espontâneas com aura (Ashina *et al.*, 2017).

Em uma revisão de Ashina *et al.*, (2017), os autores concluíram que “a vasodilatação parece estar envolvida na indução da migrânea, mas a migrânea pode ocorrer sem vasodilatação, e vasodilatação pode também ocorrer sem induzir migrânea”.

(4) Fase *Postdrome*: essa é a fase menos compreendida da migrânea, talvez por ser a menos estudada, apesar de aproximadamente 80% dos pacientes relatarem ao menos um sintoma incapacitante após a fase de cefaleia (Andreou & Edvinsson, 2019). Imagens funcionais revelaram redução generalizada do fluxo sanguíneo nessa fase, podendo ser uma explicação para os diversos sintomas presentes, sendo os mais habituais: cansaço, fraqueza, dificuldades cognitivas, sintomas gastrointestinais e alterações de humor (Rainero *et al.*, 2020).

1.2.2 Tratamentos Farmacológicos para a Migrânea

No tratamento da migrânea, os objetivos primários incluem o alívio das dores e a redução da frequência dos ataques. Comumente, os protocolos indicam o uso de analgésicos, de triptanos e de medicações profiláticas, como anticonvulsivantes, antidepressivos, medicamentos cardiovasculares (Daniel & Mauskop, 2016) e mais recentemente, anticorpos monoclonais anti-CGRP, uma vez que ensaios clínicos demonstraram sua eficácia e segurança. Um dos medicamentos desta classe, Erenumab, foi aprovado em 2018 pela *Food and Drug Administration* (FDA) como tratamento preventivo da migrânea. Além dos anticorpos, há novos tratamentos com antagonistas do receptor CGRP (Schwedt, 2018). Grande parte dos pacientes não têm resposta adequada ao tratamento ou não cumprem as terapias farmacológicas preventivas (Daniel & Mauskop, 2016).

Segundo as Diretrizes da *European Federation of Neurological Societies* (EFNS), recomenda-se alguns tratamentos medicamentosos para o tratamento da migrânea, tais como analgésicos, antieméticos, alcaloides do ergot e triptanos. Os analgésicos são as drogas de primeira escolha para os ataques brandos a moderados. Recomenda-se, a fim de prevenir o uso excessivo de drogas, a restrição do uso de analgésico isolados por 15 dias e em combinação por 10 dias ao mês. O uso de antieméticos é indicado na presença potencial de náuseas e de êmese. As evidências para o uso dos alcaloides do ergot (tartarato de ergotamina e dihidroergotamina) são limitadas, e deve ser restrita a pacientes com ataques prolongados ou recorrência frequente. Os triptanos são eficazes para uso nos

ataques de migrânea (por no máximo 9 dias em um mês), contudo, não são eficazes na fase de aura (Evers *et al.*, 2009).

Aconselha-se o tratamento profilático nos casos em que há prejuízo na qualidade de vida do paciente; ocorrência de quatro ou mais ataques por mês; resposta ineficaz aos fármacos de tratamento agudo; e subtipos específicos de migrânea (hemiplégica, com auras frequentes, muito longas ou desconfortáveis; e pacientes com histórico de infarto migratório) (Evers *et al.*, 2009; Ha & Gonzalez, 2019); De acordo com os guias da *American Headache Society* e *American Academy of Neurology*, as classes com evidências de eficácia para esse tratamento são: betabloqueadores, anticonvulsivantes e antidepressivos (Ha & Gonzalez, 2019) Como observado, a maioria dos medicamentos empregados no tratamento preventivo, foram desenvolvidos para outros propósitos, sendo os anticorpos monoclonais anti-CGRP desenvolvidos especificamente para a prevenção da migrânea (Schwedt, 2018). Em sua maioria, o tratamento profilático pode levar até 6 meses para atingir o efeito máximo, podendo haver melhora entre 6 a 8 semanas. O tratamento é considerado bem-sucedido quando o paciente apresenta redução de 50% dos ataques, redução significativa na duração dos ataques ou ainda uma resposta melhor ao tratamento agudo (Ha & Gonzalez, 2019). A tabela 1 resume os fármacos orais indicados para o tratamento da migrânea.

Tabela 1 - Tratamentos farmacológicos empregados na migrânea

CLASSE	SUBSTÂNCIA
Anti-inflamatórios não esteroidais	Ácido acetilsalicílico (ASS), ibuprofeno, diclofenaco, ácido tolfenâmico
Analgésicos	Paracetamol, dipirona, fenazona
Triptanos	Sumatriptano, Zolmitriptano, Naratriptano, Rizatriptano, Eletriptano, Almotriptano, Frovatriptano
Anti-hipertensivos	Metoprolol, Propranolol, Timolol, Nadolol, Atenolol, candesartana, linisopril, verapamil
Antidepressivos	Amitriptilina, venlafaxina
Anticonvulsivante	Valproato, gabapentina, topiramato
Toxina botulínica	OnabotulinumtoxinA (Botox®)
Anticorpo Monoclonal CGRP	Erenumab
Terapia Complementar*	<i>Petasites hybridus</i> (rizomas)

*recomendação como terapia complementar por ser classificado como suplemento alimentar (nutracêutico) nos Estados Unidos da América

Fonte: Evers *et al.* (2009); Schwedt (2018); Ha & Gonzalez (2019)

É importante mencionar que existem evidências clínicas favoráveis à profilaxia da migrânea com o uso de extrato das partes subterrâneas (raízes e rizomas) de *Petasites hybridus* (butterbur), sendo inclusive recomendado como tratamento de primeira linha por alguns especialistas, como consta no relatório do subcomitê de padrões de qualidade da *American Academy of Neurology* e *American Headache Society*, que classifica as evidências de butterbur como nível A (Holland *et al.*, 2012) e também no artigo elaborado por Ha & Gonzalez (2019).

1.3 PLANTA MEDICINAL: *Petasites hybridus*

A espécie *Petasites hybridus* (L.) P. Gaertn., B. Mey. & Scherb, conhecida popularmente como butterbur, é uma planta herbácea perene, pertencente à família Asteraceae, nativa da Europa, partes da Ásia e América do Norte, que floresce em solo úmido e pantanoso (Danesch & Rittinghausen, 2003; Diener, Rahlfs & Danesch, 2004; Benemei *et al.*, 2017). A planta possui rizoma horizontal rastejante, flores lilás e folhas felpudas largas que podem atingir quase um metro de diâmetro. A característica do tamanho das folhas deu origem ao seu nome botânico. *Petasites* é uma palavra derivada do grego “petasos” que faz alusão a chapéu de abas largas. O nome comum butterbur, também rememora as características das folhas, pois eram usadas para embrulhar manteiga em dias quentes. Outros nomes comuns, menos usuais, podem ser utilizados para referenciar *Petasites hybridus*: pestwurz (em alemão), blatterdock, bog rhubarb (ruibarbo do pântano), butter-dock (Sutherland & Sweet, 2010), exwort, flapperdock, langwort, *Petasites* e umbrela plant (planta guarda-chuva) (Utterback *et al.*, 2014).



Figura 2 – Da esquerda para a direita: folhas, flores e partes subterrâneas da espécie *Petasites hybridus*. Fonte: Haratym & Weryszko-Chmielewska, (2012); Soleimani *et al.*, (2015); Rajapakse & Davenport, (2019).

O *Petasites hybridus* tem sido utilizado, por centenas de anos, para fins medicinais variados. Aparentemente, o médico, farmacologista e botânico grego Dioscorides foi o primeiro a descrever o uso medicinal em 65 a.C. Relatos da idade média descrevem seu uso para o tratamento de febre e da peste bubônica. No século 17, foi empregado por via oral para o tratamento da tosse e da asma e topicamente para o tratamento de lesões cutâneas. Publicações posteriores reportam o uso terapêutico em doenças pulmonares, espasmos do trato urogenital e distúrbios gastrointestinais. Depois que Karl Bucher demonstrou a atividade antiespasmódica de um extrato de *Petasites hybridus* em cobaias, em 1951, o uso da planta passou a ser ainda mais difundido. Atualmente os extratos são utilizados, principalmente, para a profilaxia da migrânea, rinite alérgica e asma (Sutherland & Sweet, 2010).

Estudos não clínicos demonstraram a atividade anti-inflamatória do *Petasites hybridus*. Modelos *in vitro* revelaram que extratos etanólicos da raiz e das folhas inibiram a produção de leucotrienos, com eficácia semelhante ao inibidor oralmente ativo da lipoxigenase (zileuton), utilizado no tratamento da asma (Thomet *et al.*, 2001). Foi também evidenciado a redução da ativação de mastócitos, resultando, consequentemente, na diminuição de leucotrienos e de histamina, promovida pela petasina e seus análogos. A inibição da ciclo-oxigenase 2 (COX-2) foi observada com extrato de rizomas de *Petasites hybridus*, independente do conteúdo de petasina, indicando possível presença de outro(s) constituinte(s) potencialmente ativo(s) (Fiebich *et al.*, 2005).

Em um ensaio *in vitro*, foi observado que o extrato metanólico isolado das folhas de *Petasites hybridus* inibiu a atividade da fosfolipase A2 α em plaquetas isoladas de suínos. Os autores sugeriram que este mecanismo de ação pode ser benéfico em condições dolorosas e inflamatórias, como no caso da artrite (Arnold *et al.*, 2015).

Recentemente, Mihajlov-Krstev *et al.* (2020) investigaram os efeitos de óleos essenciais das folhas e dos rizomas de *Petasites hybridus* subsp. *ochroleucus*, planta nativa da península balcânica. Os autores observaram que ambos apresentaram efeito antioxidante (DPPH) e atividade anticolinesterásica (plasma humano) em ensaios *in vitro*. Além disso, o óleo essencial do rizoma, aplicado topicamente nas concentrações de 10 e 20%, foi mais potente que o das folhas em

reduzir o edema de pata induzido pela carragenina em ratos (Mihajilov-Krstev *et al.*, 2020).

Além do extrato de *Petasites hybridus*, os compostos isolados petasina, neopetasina, isopetasina, S-petasina, e iso-S-petasina foram capazes de bloquear canais de cálcio do tipo Cav2.1 *in vitro*. Os autores atribuíram que este efeito farmacológico foi mediado pela combinação de isoformas das petasinas. O bloqueio de canais de cálcio voltagem-dependentes pré-sinápticos e consequente diminuição da liberação de neurotransmissores é uma das hipóteses para explicar a redução da migrânea do extrato de *Petasites hybridus* (Horak *et al.*, 2009).

Empregando metodologias *in vitro* e *in vivo*, Benemei e colaboradores (2017) adicionaram um novo e importante mecanismo de ação para explicar o efeito antimigranoso do *Petasites hybridus*. Sabe-se que os neurônios sensoriais primários que expressam o TRPA1 estão envolvidos na sinalização do estímulo doloroso ao cérebro, bem como liberação neuropeptídeos (SP e CGRP) que medeiam a inflamação neurogênica vascular. Utilizando isopetasina comercial, os autores observaram que a contração da musculatura lisa da bexiga, o comportamento nociceptivo de *rubbing* facial e o aumento do fluxo sanguíneo da dura-máter estimulados com agonistas TRPA1 (acroleína ou alil isotiocianato) foram significativamente reduzidos. Os autores sugeriram que o sesquiterpeno isopetasina, isômero conjugado da petasina, atua como um agonista parcial dos receptores TRPA1, promovendo a dessensibilização e consequente redução da liberação do CGRP, considerado o principal mediador da migrânea (Benemei *et al.*, 2017).

A atividade farmacológica dos extratos de *Petasites hybridus* tem sido atribuída aos sesquiterpenos (terpenos com 15 carbonos) presentes nas folhas e nas partes subterrâneas do butterbur (Sutherland & Sweet, 2010), em especial as petasinas (petasina e seus isômeros isopetasina e neopetasina).

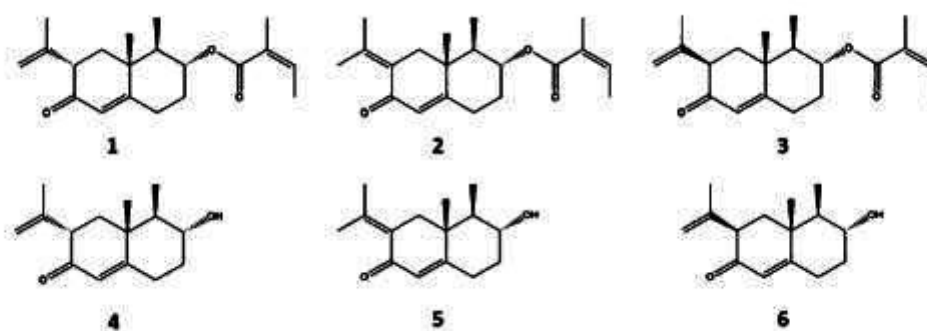


Figura 3 - Sesquiterpenos e respectivos metabólitos da espécie *Petasites hybridus*. (1) petasina; (2) isopetasina e (3) neopetasina, sendo (1) e (2) comumente selecionadas como marcadores analíticos e seus principais metabólitos: (4) petasol, (5) isopetasol e (6) neopetasol. Fonte: Disch *et al.*, (2018).

Além disso, foram encontrados outros constituintes em menor proporção, como óleos voláteis, flavonoides (isoquercetina, astragalina e quercetina), mucilagem, taninos e alcaloides pirrolizidínicos (Disch *et al.*, 2018).

Evidências clínicas favoráveis à profilaxia da migrânea têm sido obtidas com o uso de preparações equivalentes a, no mínimo, 15% de petasinas (Grossmann & Schmidramsl, 2001; Lipton *et al.*, 2004; Pothmann & Danesch, 2005; Sangermani & Boncimino, 2017). A petasina e a isopetasina, entre os muitos compostos contidos no *P. hybridus*, são apontadas como principais responsáveis pela ação do extrato (Benemei *et al.*, 2017).

Em um estudo randomizado, duplo cego, controlado por placebo, 60 pacientes, homens e mulheres, de 18 a 60 anos, receberam uma dose diária de 100 mg de extrato das partes subterrâneas (rizomas e raízes) de *Petasites hybridus* (Petadolex®, Weber & Weber) ou placebo, por 12 semanas. No grupo tratado, houve redução estatisticamente significativa na frequência média mensal dos ataques de migrânea e na taxa de resposta (melhoria na frequência da migrânea) quando comparado com placebo, indicando a eficácia do butterbur na profilaxia da migrânea (Diener, Rahlfs & Danesch, 2004)

De acordo com o levantamento de Ha & Gonzalez (2019), o extrato de *Petasites hybridus*, é efetivo para o tratamento da profilaxia da migrânea, nas doses diárias de 100 a 150 mg (50 a 75 mg, duas vezes ao dia).

O artigo intitulado “*Petasites hybridus* root (butterbur) is an effective preventive treatment for migraine” descreve ensaio randomizado, duplo-cego, comparando 2 doses de extrato das partes subterrâneas de *Petasites hybridus*, com mínimo de 15% de petasinas, e placebo. Ao todo, foram recrutados 245 pacientes

com migrânea, com idade entre 18 e 65 anos. Os grupos tratados receberam cápsulas de 50 e 75 mg de extrato, duas vezes ao dia, ou seja, tratamento diário com 100 e 150 mg, durante 4 meses. A dose de 150 mg ao dia mostrou-se mais efetiva na redução da frequência de ataques quando comparado com o grupo placebo, dando suporte para a eficácia do extrato (Lipton *et al.*, 2004). Apesar de não ter sido observada diferença significativa entre os grupos tratados com 100 mg/dia e placebo, os autores destacaram que um estudo prévio contradiz estes achados (Grossmann & Schmidramsl, 2001; Diener, Rahlfs & Danesch, 2004; Lipton *et al.*, 2004)

Em outro ensaio clínico realizado com 108 crianças e adolescentes, de 6 a 17 anos, empregando doses diárias entre 50 a 150 mg de extrato de rizomas de *Petasites hybridus* (Petadolex®), sendo a dosagem diária definida conforme a idade, foi reforçada a eficácia do tratamento profilático com o extrato na redução da migrânea em crianças e adolescentes (Pothmann & Danesch, 2005).

Existem vários estudos indicando o potencial de extratos de *Petasites hybridus* para o tratamento da migrânea e de doenças como a asma, contudo, até o momento poucos são os estudos explorando outros efeitos da planta.

O conjunto dos efeitos biológicos apresentados por diferentes estudos empregando extratos de *Petasites hybridus* ainda não permitem sugerir um possível efeito na dor inflamatória, visto que até o momento, somente estudos *in vitro* ou avaliando o efeito *in vivo* na inibição de leucotrienos foram avaliados.

1.3.1 Toxicidade Relacionada aos Alcaloides Pirrolizidínicos

O *Petasites hybridus* é conhecida por conter um grupo de constituintes, os alcaloides pirrolizidínicos, que possuem propriedades hepatotóxicas. No mercado estadunidense, o butterbur é comercializado também como suplemento alimentar, cujo processo de registro, frente à *Food and Drug Administration* (FDA), é menos rigoroso, ocasionando possibilidade de circulação de produtos com quantidades desconhecidas de alcaloides pirrolizidínicos (Danesch & Rittinghausen, 2003).

A presença de alcaloides pirrolizidínicos em extratos não processados de butterbur, especialmente senecionina e integerimina, é um ponto de preocupação em relação à sua segurança. Em humanos foi demonstrado potencial hepatotóxico desses alcaloides e em animais foi evidenciado atividade carcinogênica. Comercialmente, com destaque para o Petadolex®, existem apresentações com

preparação especial do extrato com remoção dos alcaloides pirrolizidínicos a níveis inferiores de 0,08 ppm (Danesch & Rittinghausen, 2003; Sutherland & Sweet, 2010).

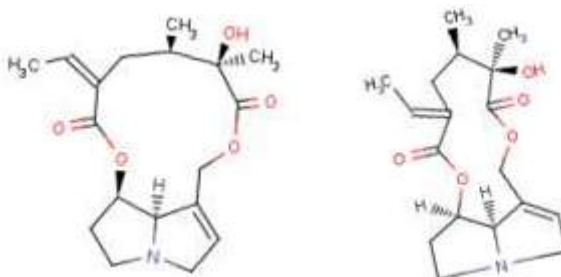


Figura 4 - Alcaloides pirrolizidínicos senecionina e integerimina. Fonte: (Wildi *et al.*, 1998).

Danesch & Rittinghausen (2003) avaliaram os resultados de estudos não clínicos (toxicidade aguda, subcrônica, crônica e mutagenicidade), de estudos clínicos, de estudos de vigilância pós-comercialização e de farmacovigilância, do extrato especial do rizoma de *Petasites hybridus*, padronizado em, no mínimo, 15% de petasinas, com teor abaixo de 0,08 ppm de alcaloides pirrolizidínicos. Os autores concluíram que o extrato é seguro para o tratamento em humanos. No entanto, assim como qualquer tratamento farmacológico, os pacientes dos estudos clínicos reportaram a presença de eventos adversos, sendo portanto, passíveis de observação durante o uso com Petasites. Os eventos adversos relatados com maior frequência foram distúrbios gastrointestinais, dentre eles eructação, gosto amargo, náuseas e dor abdominal. Também foram reportadas reações de hipersensibilidade, dor de cabeça e leve elevação transitória de enzimas hepáticas, essa sem significância clínica. Os eventos reportados foram todos leves e autolimitados (Grossmann & Schmidramsl, 2001; Lipton *et al.*, 2004; Pothmann & Danesch, 2005).

2 JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

No Brasil, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos foi criada em 2006 pelo Decreto 5.813. O objetivo do Programa é “garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional”. Uma das propostas do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que detalha as ações da Política, por meio da Portaria Interministerial nº 2.960/2008, é a inserção de fitoterápicos seguros,

eficazes e de qualidade como opções de terapia à população brasileira (Brasil, 2006; Brasil, 2008).

Além disso, o tratamento profilático da migrânea não é administrado na maior parte dos pacientes que se enquadram nos critérios para o referido tratamento (Kumar & Kadian, 2020). Desta forma, o uso do extrato de *Petasites hybridus*, poderia representar uma alternativa fitoterápica ao tratamento antimigranoso em consonância com a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Para tal, a compreensão dos efeitos do extrato em questão, ainda não completamente elucidado, torna-se relevante para abarcar pacientes que não respondem as terapias clássicas, denotando a relevância do trabalho realizado.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do extrato dos rizomas de *Petasites hybridus* (PHE) administrado por via oral em modelos utilizando substâncias indutoras de migrânea aplicadas na região periorbital e em modelos de nocicepção inflamatória em camundongos, explorando os possíveis mecanismos de ação envolvidos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS (ARTIGO CIENTÍFICO)

1. Avaliar o efeito do pré-tratamento oral com PHE na nocicepção (*rubbing*) e na alodinia mecânica induzidas pela administração periorbital, ou via intraperitoneal no caso da nitroglicerina, dos seguintes mediadores:
 - i. Histamina
 - ii. Prostaglandina E₂
 - iii. Capsaicina
 - iv. GSK 1016790A
 - v. Nitroglicerina
 - vi. Cinamaldeído
 - vii. CGRP
2. Avaliar o efeito promovido pelo pré-tratamento oral com PHE no teste de formalina orofacial;
3. Avaliar o efeito promovido pelo pré-tratamento oral com PHE no modelo de nocicepção visceral induzida pelo ácido acético, avaliando as contorções abdominais, o extravasamento plasmático e a infiltração de leucócitos;

4. Avaliar o efeito promovido pelo pré-tratamento oral com PHE na hiperalgesia mecânica e no edema de pata induzidos pela administração intraplantar de carragenina;
5. Avaliar a toxicidade aguda após a administração oral com PHE durante 14 dias.

4 MATERIAIS

4.1 ANIMAIS

Os experimentos foram conduzidos com camundongos Swiss machos (25-35 g) provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Uma vez retirados do biotério, os animais foram mantidos em salas de aclimação do Laboratório de Farmacologia do Trato Gastrointestinal e Dor, no Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná, em temperatura (22 ± 2 °C) e umidade controlada (60-80%), ciclo claro/escuro de 12 h, com livre acesso à ração e à água. Ressalta-se que os animais foram utilizados somente uma vez em cada experimento.

As atividades envolvendo animais do presente estudo, foram realizadas em conformidade com as orientações para os cuidados com animais de laboratório (National Research Council, 2011) e considerações éticas com os protocolos experimentais aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal do Paraná (Certificado CEUA-BIO – UFPR nº 1299).

4.2 MATERIAL BOTÂNICO: EXTRATO DE *Petasites hybridus*

O extrato das partes subterrâneas de *Petasites hybridus* foi utilizado para os ensaios. Trata-se de um extrato lipofílico, extraído com solvente supercrítico dióxido de carbono empregado para eliminar os alcaloides pirrolizidínicos, padronizado em, no mínimo, 15% de petasinas (petasina e isopetasina). Conforme previamente mencionado, o extrato passa por um processo de remoção de alcaloides pirrolizidínicos, chegando a níveis inferiores de 0,01 ppm, sendo este o limite de detecção, podendo desta forma, ser considerado “PA free” (Anderson & Borlak, 2019). O material foi fornecido através de parceria com a indústria farmacêutica Herbarium Laboratório Botânico Ltda, situada em Colombo-Paraná.

4.2.1 Justificativa da Dose Utilizada

Para extrapolação da dose em animais, foram utilizadas referências de estudos clínicos do extrato das partes subterrâneas de *Petasites hybridus*, padronizado em, no mínimo, 15% de petasinas (isopetasina e petasina), conforme elucidado no item 1.2 MATERIAL BOTÂNICO: *Petasites hybridus*. Em suma, a posologia indicada na prevenção da migrânea nos ensaios clínicos é de 50 a 75 mg, duas vezes ao dia. Para o uso pediátrico, recomenda-se a dose inicial de 50 mg por dia, devendo a dose ser adequada conforme a idade. Desta forma, a dose diária estaria entre 50 a 150 mg (Grossmann & Schmidramsl, 2001; Lipton *et al.*, 2004; Pothmann & Danesch, 2005).

Para conversão das doses usadas em humanos para camundongos, utilizou-se a abordagem de escala alométrica de acordo com Nair & Jacob (2016), considerando a dose média de 100 mg/dia e o peso médio de um adulto pesando 60 kg. Assim, a dose diária por quilo seria de 1,67 mg.

A escala alométrica baseia-se na área da superfície corporal, considerando que há características anatômicas, fisiológicas e bioquímicas específicas em cada espécie. Assim, a escala fornece uma abordagem empírica para transação de doses de animais para humanos, e vice-versa, considerando as possíveis diferenças farmacocinéticas associadas a especificidade das espécies (Nair & Jacob, 2016). A referida escala orienta que a dose em humanos (1,67 mg/kg/dia) seja multiplicada por 12,3, obtendo-se assim uma dose de aproximadamente 20 mg/kg. Com base nesta dose, as doses foram extrapoladas para menos e para mais. Portanto, as doses utilizadas neste estudo em camundongos foram de 10, 20 e 40 mg/kg.

5 ARTIGO CIENTÍFICO

***Petasites hybridus* rhizome extract prevents periorbital mechanical allodynia induced by migraine-provoking substances and promotes antinociceptive and anti-inflammatory effects in acute pain models in mice**



Thaís Bolognesi¹, André Felipe Naidek¹, Francesco De Logu², Romina Nassini², Pierangelo Geppetti², Olair Carlos Beltrame³, Maria Fernanda de Paula Werner^{1*}

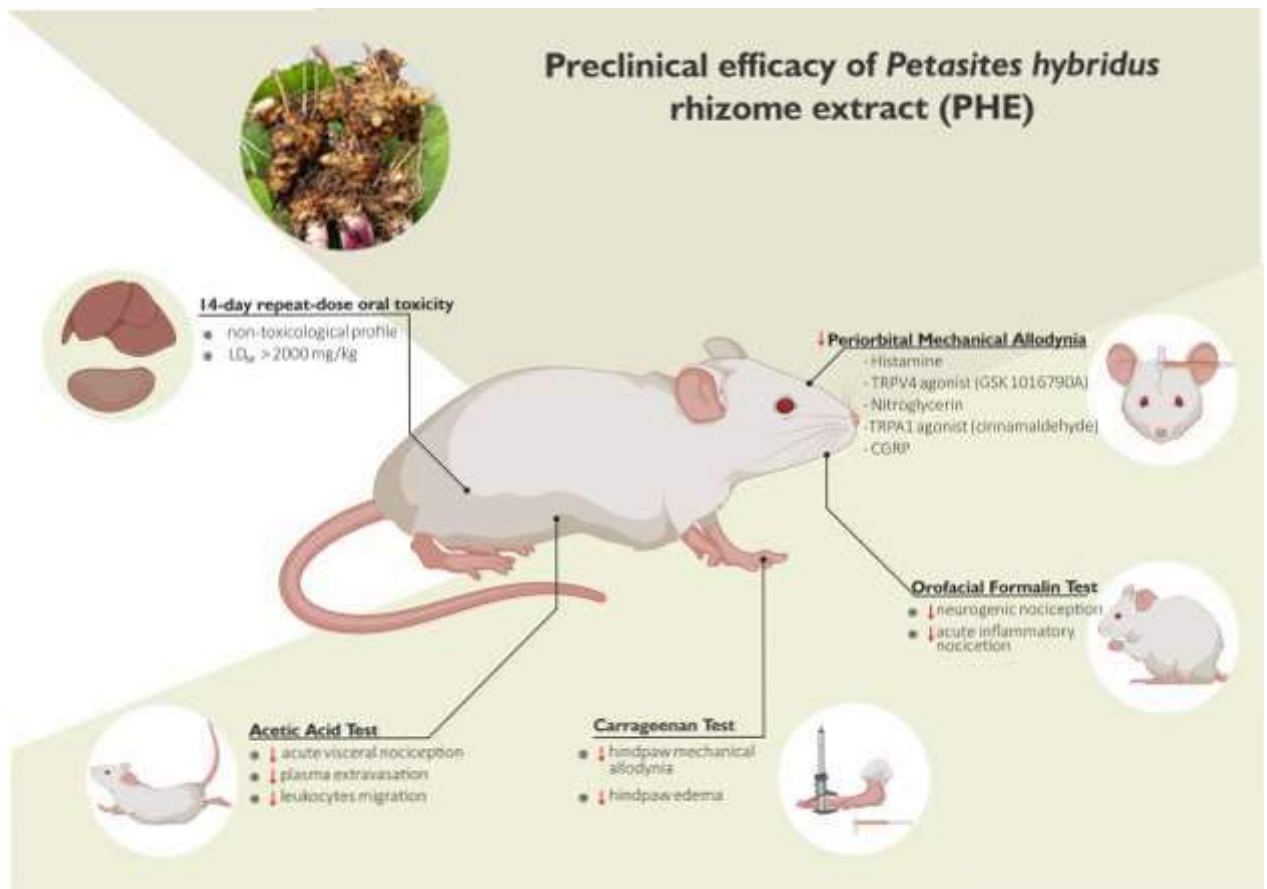
¹Department of Pharmacology, Sector of Biological Sciences, Federal University of Parana, Curitiba, PR, Brazil

²Department of Health Sciences, Section of Clinical Pharmacology and Oncology, University of Florence, Florence, Italy

³Department of Veterinary Medicine, Federal University of Parana, Curitiba, PR, Brazil

*Corresponding author: Federal University of Parana, (UFPR), Biological Science Sector, Department of Pharmacology, PO Box 19031, Curitiba, PR, 81531-980, Brazil. Tel.: +55 41 3361-1721, e-mail: mfernanda.werner@ufpr.br (M.F.P. Werner)

Graphical abstract



Abstract

Petasites hybridus ("butterbur"), has been used to treat headache, cough, asthma, skin wounds and for migraine prophylaxis. The hypotheses to explain the anti-migraine effect remains unclear. Thus, nociceptive facial responses induced by histamine, PGE₂, TRPV1 (capsaicin), TRPV4 (GSK 1016790A) and TRPA1 (cinnamaldehyde) agonists, nitroglycerin and CGRP, and orofacial formalin model, acetic acid-induced writhing test, and intraplantar carrageenan-induced inflammation were used to investigate the antinociceptive effects of *Petasites hybridus* rhizome extract (PHE, ~ 15% of petasines). The oral pretreatment with PHE 20 and 40 mg/kg prevented only cinnamaldehyde-induced nociception. However, periorbital mechanical allodynia (PMA) induced by migraine provoking agents such as histamine, GSK 1016790A, nitroglycerin, cinnamaldehyde and CGRP were significantly prevented by PHE. Moreover, PHE at 10, 20 and 40 mg/kg reduced the face rubbing behavior in both neurogenic and inflammatory phases of formalin test, decreased the abdominal constrictions, plasmatic extravasation and total leukocytes migration in the acetic acid model, and also inhibited carrageenan-induced mechanical allodynia and paw edema. The 14-day repeated-dose oral toxicity study with PHE (50, 300 and 2000 mg/kg) reveals unremarkable findings related to body weight, mortality, organ weight and serum biochemistry, except for a slight increase of liver weight and alkaline phosphatase and urea levels. The reduction of PMA promoted by PHE reinforce the anti-migraine action of butterbur mainly through the modulation of nitric oxide, TRPA1 and CGRP signaling. Furthermore, our data also demonstrated that PHE display peripheral antinociceptive and anti-inflammatory effects in acute mice models, adding new evidence and mechanisms for use of *Petasites hybridus* in pain management.

Keywords: *Petasites hybridus*; butterbur; migraine; nociception, inflammation; CGRP.

1 introduction

According to the *International Classification of Headache Disorders*, 3rd edition (ICHD-3), migraine is considering a disabling neurological disorder, feature by unilateral intense headache associated with other unpleasant symptoms, such as nausea, vomiting, photophobia, phonophobia, allodynia and pain on movement, among others (Olesen, 2018; Andreou and Edvinsson, 2019). The Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study 2016 pointed out that migraine and other headache disorders are in the midst of the most prevalent disorders worldwide. Migraine is the sixth most prevalent disease/injury and one of the main causes of disability. It is estimated that 1.04 billion individuals have migraine, being a public health problem in both sexes and all ages (Stovner *et al.*, 2018).

The exact mechanism involving a migraine attack is unclear. It is well established the involvement of nociceptive transmission of trigeminovascular system. When the nociceptive transmission achieves trigeminovascular neurons in the thalamus and, successively, in the somatosensory cortex and other cortical areas, results in the pain perception. Furthermore, the activation of trigeminovascular system results in antridomic release of vasoactive signaling molecules, with emphasis on calcitonin gene-related peptide (CGRP) (Ashina, 2020), a strong vasodilator found in sensory nerve endings around cranial blood vessels (Olesen and Ashina, 2019). These brain areas control autonomic, affective, cognitive, and sensorial functions, that together could explain the complexity of the symptoms associated with migraine (Ashina, 2020).

The American Headache Society (AHS) propose different pharmacological protocols for acute and prophylactic migraine treatment. The acute treatment includes ergot alkaloids, triptans (5-HT_{1B/1D} receptor agonists), gepants (CGRP receptor antagonists), CGRP monoclonal antibodies, ditans (5-HT_{1F} receptor agonists), and nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). For preventive treatment, the first-line medications options include anticonvulsants, antidepressants, beta blockers, onabotulinumtoxinA and CGRP antibodies and/or receptor antagonists (American Headache Society, 2019). Among several purposes, the pharmacological migraine preventive therapy aims reduce migraine frequency, severity, duration, and disability, improving quality of life of life of patients and preventing the chronic migraine progression (American Headache Society, 2019). Despite the recent Food and Drug Administration approval of agents targeting CGRP, most prophylactic

treatments present limited long-term effectiveness and adverse effects, explaining why few patients with migraine (~13%) take preventive treatments. Thus, it is remarkable that medicinal plants, such as *Petasites hybridus* could be considered a valuable natural option for the development of a complementary and effective migraine preventive treatment (Ha and Gonzalez, 2019).

Petasites hybridus is a perennial shrub, member of Asteraceae family, that is found throughout Europe and in parts of North America and Asia, usually in wet sites. Commonly known as butterbur, it has been used for several medicinal purposes, including headache and migraines, fever, bronchitis, asthma, allergic rhinitis, skin wounds, dysmenorrhea, gastrointestinal diseases, among others (Sutherland and Sweet, 2010). The plant rhizome extract is commercially available and marketed in the United States as a dietary supplement due to the clinical interest in the prophylactic migraine treatment as well as to the allergic rhinitis and asthma. *Petasites hybridus* rhizome extract effects are strongly related to the presence of sesquiterpenes petasin and isopetasin, defined as the mainly active compounds (U.S. Department of Health and Human Services, 2009).

Several studies demonstrated that *Petasites hybridus* rhizome extract, or isolated petasin and isopetasin are able to inhibit cytosolic phospholipase A2 α , leukotrienes and PGE2 synthesis *in vitro* and reduced the leukotriene and histamine levels in nasal fluids of patients with allergic rhinitis, indicating their anti-inflammatory effects (Thomet *et al.*, 2001; Thomet and Simon, 2002; Fiebich *et al.*, 2005; Arnold *et al.*, 2015). Regarding the anti-migraine effect, *Petasites hybridus* rhizome extract (containing at least 15% of petasins) or isopetasin have been considered responsible for the beneficial effect on migraine prevention in clinical studies (Grossmann and Schmidramsl, 2001; Lipton *et al.*, 2004; Pothmann and Danesch, 2005). Nevertheless, there are few studies explaining by which mechanisms of action the anti-migraine effect is achieved. *Petasites hybridus* extract blocked voltage-gated calcium channels (Ca_v2.1) *in vitro*, inhibiting neurotransmitter release and trigeminovascular signaling (Horak *et al.*, 2009), whereas isopetasine seems to act as an agonist of TRPA1 cation channel, promoting desensitization of peptidergic trigeminal nociceptors, reducing the release of CGRP and painful signaling (Benemei *et al.*, 2017). Thus, the present study sought to investigate the effects of oral administration of *Petasites hybridus* rhizome extract standardized with minimum of 15% petasins in nociceptive facial responses induced by migraine-provoking

substances and in acute pain models in mice, to better understand the mechanisms of action behind the analgesic effects of the *Petasites hybridus*.

2 Experimental procedure

2.1 Drugs and reagents

The following reagents were used: capsaicin, cinnamaldehyde, Evan's Blue dye, GSK 1016790A, histamine, ketotifen, L-NAME and PGE₂ were obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). CGRP and olcegepant were from Tocris Bioscience (Bristol, UK) and all other chemicals used were of analytical grade, and obtained from standard commercial suppliers.

2.2 Animals

Experiments were conducted using male Swiss mice (25–35 g), housed at 22 ± 2 °C under a 12/12 h light/dark cycle and with free access to food and water. All experiments were performed after approval of the respective protocols by the Committee of Animal Experimentation of Federal University of Parana (CARE/BIO - UFPR, protocol 1299/19) and were carried out in strict compliance with the ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals (National Research Council, 2011). The animals were divided into groups of 5-8 mice. Each mouse was used only once in the experiment.

2.3 *Petasites hybridus* rhizome extract and dose conversion between humans and mice

The *Petasites hybridus* rhizome extract (PHE), extracted in a special way with supercritical CO₂ as solvent, was obtained through a partnership with Herbarium, a national pharmaceutical industry, located in Colombo, Paraná, Brazil. The extract contains a minimum of 15% petasins and toxic pyrrolizidine alkaloids were removed by the extraction method adopted by the extract manufacturer. Based on clinical trials (Lipton *et al.*, 2004; Pothmann and Danesch, 2005; Sutherland and Sweet, 2010; Ha and Gonzalez, 2019), the average dosage used for migraine prevention treatment is 100 mg/day, extrapolated to the ingestion of 1.67/mg/kg/day for adults with a mean weight of 60 kg. Then, based on allometric scaling approach, the normalization of human dose (1.67/mg/kg/day) was performed according to body surface area, providing the equivalent dose of 20 mg/kg for mice. From this dose, were extrapolated the doses of 10 and 40 mg/kg/mice (Nair and Jacob, 2016).

2.4 Facial nociceptive responses and periorbital mechanical allodynia

Measurements of behaviors associated to periorbital nociception and periorbital mechanical allodynia (PMA) were carried out as described by De Logu *et al.*, (2019). Briefly, mice were injected subcutaneously in the periorbital area (p.orb., 10 μ L/site) with the following algogenic substances: histamine (1.5 nmol/10 μ L), PGE₂ (1.5 nmol/10 μ L), capsaicin (1 nmol/10 μ L), GSK 1016790A (15 nmol/10 μ L), nitroglycerin (10 mg/kg, intraperitoneal route - exceptionally), cinnamaldehyde (100 nmol/10 μ L) and CGRP (1.5 nmol/10 μ L). The subcutaneous injection was performed unilaterally on the right side of the periorbital area. Then, groups of animals were treated with PHE (20 and 40 mg/kg, p.o.), vehicle (0.2%; Tween 20, 0.01% alcohol in water, 10 mL/kg, p.o.) or with the respective drugs: ketotifen (H1 receptor antagonist and mast cell stabilizer, 5 mg/kg, i.p.); capsazepine (TRPV1 antagonist channel, 10 nmol/10 μ L, p.orb.); HC 067047 (TRPV4 antagonist channel, 100 nmol/10 μ L, p.orb.); L-NAME (NO synthase inhibitor, 40 mg/kg, i.p.); HC 030031 (TRPA1 antagonist, 100 mg/kg, i.p.) and olcegepant (CGRP antagonist 4 nmol/10 μ L, p.orb.). The oral pretreatments were performed 60 min before the subcutaneous mediators injection, while the intraperitoneal and local (p.orb.) pretreatments were given 30 min previous the mediators injection. A Naive group was also used as control.

Following the injection of migraine-provoking agents, animals were placed into inverted glass funnels and the time that each animal spent rubbing the injected area with the forepaws was measured using a stopwatch during 10 min, and was considered as time of nociception (in seconds, s).

For PMA measurements, mice were allocated in an apparatus (3H $\times$ 3W $\times$ 9L cm) designed for the evaluation of periorbital mechanical thresholds. The apparatus consists in a box with two openings, one for the head and other for the tail, allowing the operator to achieve the periorbital area of mice. The box enables forepaw mouse movements but prevents turning around inside. The allodynia response was measured by mechanical threshold with von Frey filaments (0.02, 0.04, 0.07, 0.16, 0.4, 1.0 and 1.4 g) using the up-down paradigm as previously described (Chaplan *et al.*, 1994), registered at basal (0) and at 1, 2, 4 and 6 h following the above mentioned mediators injection. Previously to the PMA measurements, adaptation inside the chamber was performed. During von Frey's filament applications, were considered positive responses the following behaviors: when mouse vigorously

stroked its face with the forepaw, head withdrawal from the stimulus, or head shaking.

2.5 Peripheral inflammatory pain models

2.5.1 Nociception induced by orofacial formalin

First, the animals were orally treated with vehicle (Tween 20 0.2%; alcohol 0.01% in water, 10 mL/kg), PHE (10, 20 and 40 mg/kg) or intraperitoneally with diclofenac (10 mg/kg, i.p.). Then, 20 μ L of a 2.5% formalin was injected into the right upper lip in on each animal (for the groups vehicle and PHE, the injection was done 60 min after the oral treatment, and for the diclofenac group, 30 min after the intraperitoneal treatment). Animals were placed into an inverted glass funnel and the time that each animal spent rubbing the injected area with the forepaws was recorded, in seconds (s), with a chronometer for both the early neurogenic phase (0–5 min) and late inflammatory phase (15–40 min), and was considered as time of nociception (Nomura *et al.*, 2013).

2.5.2 Abdominal constriction, peritoneal capillary permeability and leukocyte infiltration induced by acetic acid

For peritoneal capillary permeability measurement, mice were intravenously pretreated, one day before the experiment, with 2.5% Evans blue dye solution (10 mL/kg). The animals are divided into groups and orally treated with vehicle (Tween 20 0.2%; alcohol 0.01% in water, 10 mL/kg) or PHE (10, 20 and 40 mg/kg). After 60 min, the animals were intraperitoneally treated with 0.6% acetic acid solution (0.45 mL/mouse) and positioned in inverted glass funnel for abdominal constrictions observation, that were counted cumulatively over a period of 30 min. Then, mice were euthanized and their peritoneal cavity washed with 1 mL of cold sterile saline plus heparin (25 IU/mL). A Neubauer chamber was used for performed the total leukocyte cell counts. The peritoneal capillary permeability was expressed in terms of dye (μ g/mL), which leaked into the peritoneal cavity according to the standard curve of Evans blue dye (620 nm) (Rodrigues *et al.*, 2012).

2.5.3 Carrageenan-induced mechanical allodynia and paw edema

Sixty minutes before the 20 μ L of carrageenan injection subcutaneously in the right paw (300 μ g/paw), mice were treated with vehicle (V, Tween 20 0.2%; alcohol 0.01% in water, 10 mL/kg, p.o.) or PHE (20 and 40 mg/kg, p.o.). Another animal

group was treated with dexamethasone (1 mg/kg, i.p.), 30 min prior to the carrageenan paw injection (Dallazen *et al.*, 2020). The allodynia response was measured by mechanical threshold with von Frey filaments using the up-down paradigm as previously described (Chaplan *et al.*, 1994), registered at basal (0) and at 1, 2, 3 and 4 h later carrageenan paw injection. The paw edema was measured using a digital micrometer (Digimess, São Paulo, SP, BR) at the same times used to measure the mechanical threshold (0, 1, 2, 3 and 4 h) (Carlotto *et al.*, 2016). Naive mice were employed as control. The percentage antiallodynic and anti-edematogenic effect were calculated at each time point, using the following equation (Dallazen *et al.*, 2020):

$$\% \text{ Antiallodynic or Anti - edematogenic effect} = 100 - \left\{ \frac{100 \times (N - \text{PHE group})}{N - V} \right\}$$

2.6 Fourteen-day repeated-dose toxicity study

Acute oral toxicity was carried out based on OECD (2002), with some modifications. Briefly, for the 14-day repeat-dose toxicity study, mice were randomly distributed into 4 groups: vehicle control group vehicle (2% Tween 20; 2% alcohol in water, 10 mL/kg); PHE 50 mg/kg group, PHE 300 mg/kg group and PHE 2000 mg/kg group. Animals were orally treated, weighed and observed for clinical signs daily for 14 days. On the 14th day, the animals were euthanized and blood samples were obtained from the abdominal aorta for biochemical analysis of liver (alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and alkaline phosphatase (ALP)) and kidney (creatinine and urea) functions at UFPR Veterinary Hospital. The parameters were analyzed by an automated system (Mindray BS-200) according to the kit manufacturer's instructions (Labtest Diagnostica, Brazil). Organs including adrenal glands, spleen, heart, testicle, kidney and liver were removed, weighed, and examined macroscopically. Relative organ weights (%) were calculated using the following formula: (organ weight/body weight) × 100%.

2.7 Statistical analysis

All data were expressed as mean ± standard error of the mean (S.E.M). Statistical analysis were performed using one-way ANOVA for single factor experiments and two-way ANOVA for behavioral experiments with repeated measures. In both cases, Bonferroni's multi-comparison post hoc test was employed criterion to maintain the experiment-wise error rate at 5%. P values less than 0.05

were considered as indicative of significance. All analyzes were performed using the GraphPad Prism® version 6.0 (GraphPad Software, San Diego, USA).

3 Results

3.1 Acute facial nociceptive test and periorbital mechanical allodynia

Only local (p. orb., 10 µL) administration of PGE₂ (Fig. 1C), capsaicin (Fig. 2A) and cinnamaldehyde (Fig. 4A) were able to produce measurable rubbing nociceptive responses. Oral treatment with PHE (20 and 40 mg/kg) prevented only cinnamaldehyde-induced ongoing nociception (Fig. 4A), when compared to the vehicle group (V: 22 ± 2 s).

When compared to the vehicle group, oral treatment with PHE (20 and 40 mg/kg), given 60 min previously the periorbital application, prevented the development of PMA induced by histamine (1.5 nmol/10 µl, p. orb.) (Fig. 1B), where the highest PHE dose showed similar behavior than pretreatment with the histamine H₁ receptor antagonist (ketotifen 5 mg/kg, i.p.). However, the same PHE doses were unable to prevent the PMA induced by PGE₂ (1.5 nmol/10 µl, p. orb.) (Fig. 1D).

In the same way, the PHE doses were unable to prevent the PMA induced by capsaicin (1 nmol/10 µl, p. orb.) (Fig. 2B), but was able to prevent the development of PMA induced by GSK 1016790A (15 nmol/10 µl, p. orb.) (Fig. 2D).

The PMA prevention could be observed when induced by nitroglycerin (10 mg/kg, i.p.) (Fig. 3), in which PHE 40 mg/kg present similar behavior than nitric oxide synthase inhibitor (L-NAME 40 mg/kg, p.o.) (Fig. 3).

Oral treatment with PHE (20 and 40 mg/kg) prevented the development of PMA induced by cinnamaldehyde (100 nmol/10 µl, p. orb.) (Fig. 4B) and CGRP (1.5 nmol/10 µL, p. orb.) (Fig. 4D). In both cases, the PHE highest dose (40 mg/kg) showed similar behavior that the respective antagonist selective of TRPA1 receptor (HCO 030031, 100 mg/kg, i.p.) (Fig. 7B) and calcitonin gene-related peptide receptor antagonist (olcegepant, 4 nmol/10 µL, p. orb.) (Fig. 4D).

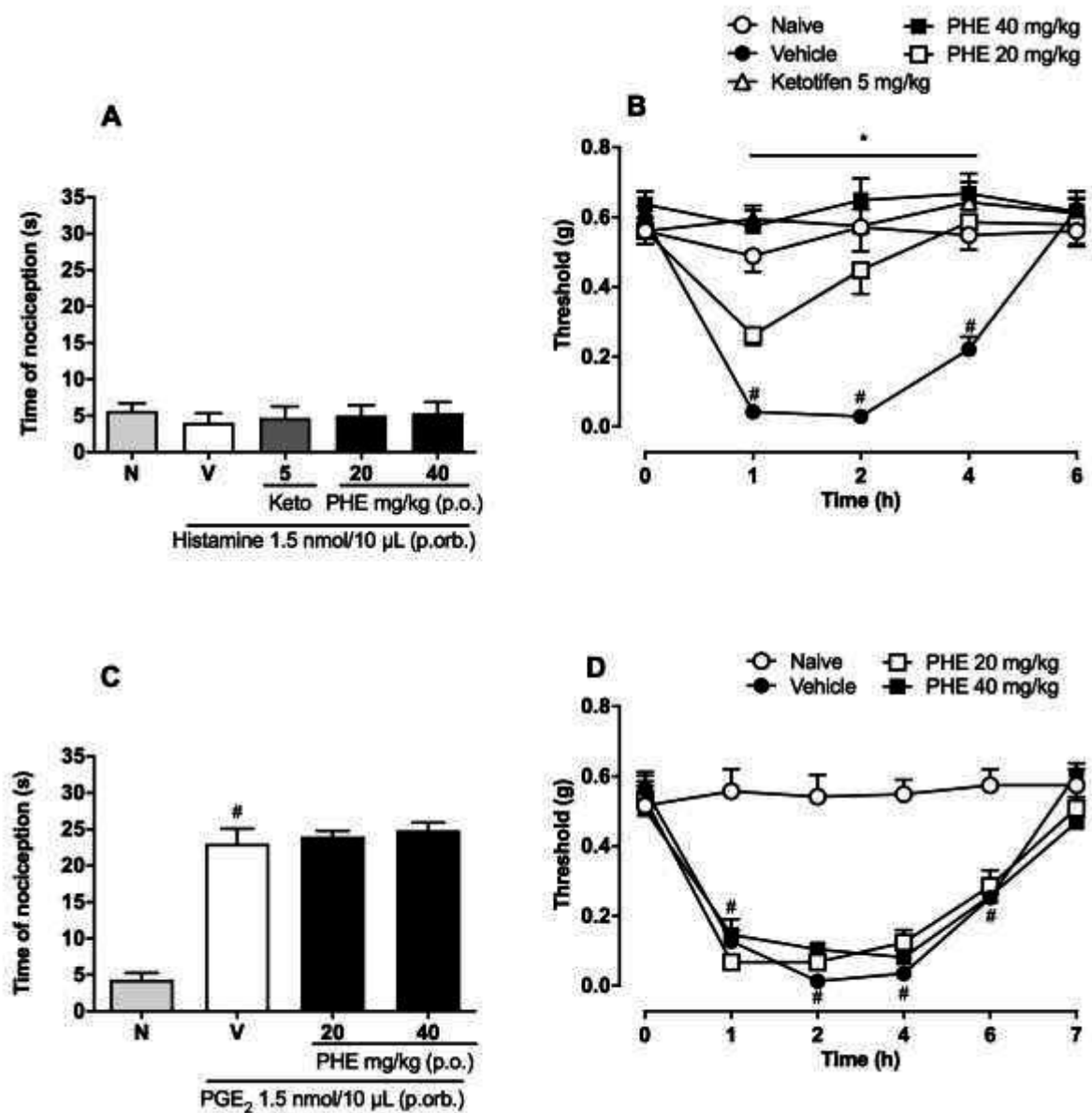


Fig. 1. Effect of PHE oral administration on the spontaneous nociceptive behavior (A and C) and periorbital mechanical allodynia (PMA) (B and D) evoked by periorbital (p.orb., 10 μ L/site) injection of histamine (A and B) or PGE₂ (C and D). The animals were treated with vehicle (10 mL/kg, p.o.), PHE (20 and 40 mg/kg, p.o.) or ketotifen (Keto: 5 mg/kg, i.p.). Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. (n=6). #P < 0.05 compared to Naive group. *P < 0.05 compared to control (vehicle) group (one-way ANOVA followed by *post-hoc* Bonferroni test for spontaneous nociceptive behavior and two-way ANOVA followed by *post-hoc* Bonferroni test for PMA).

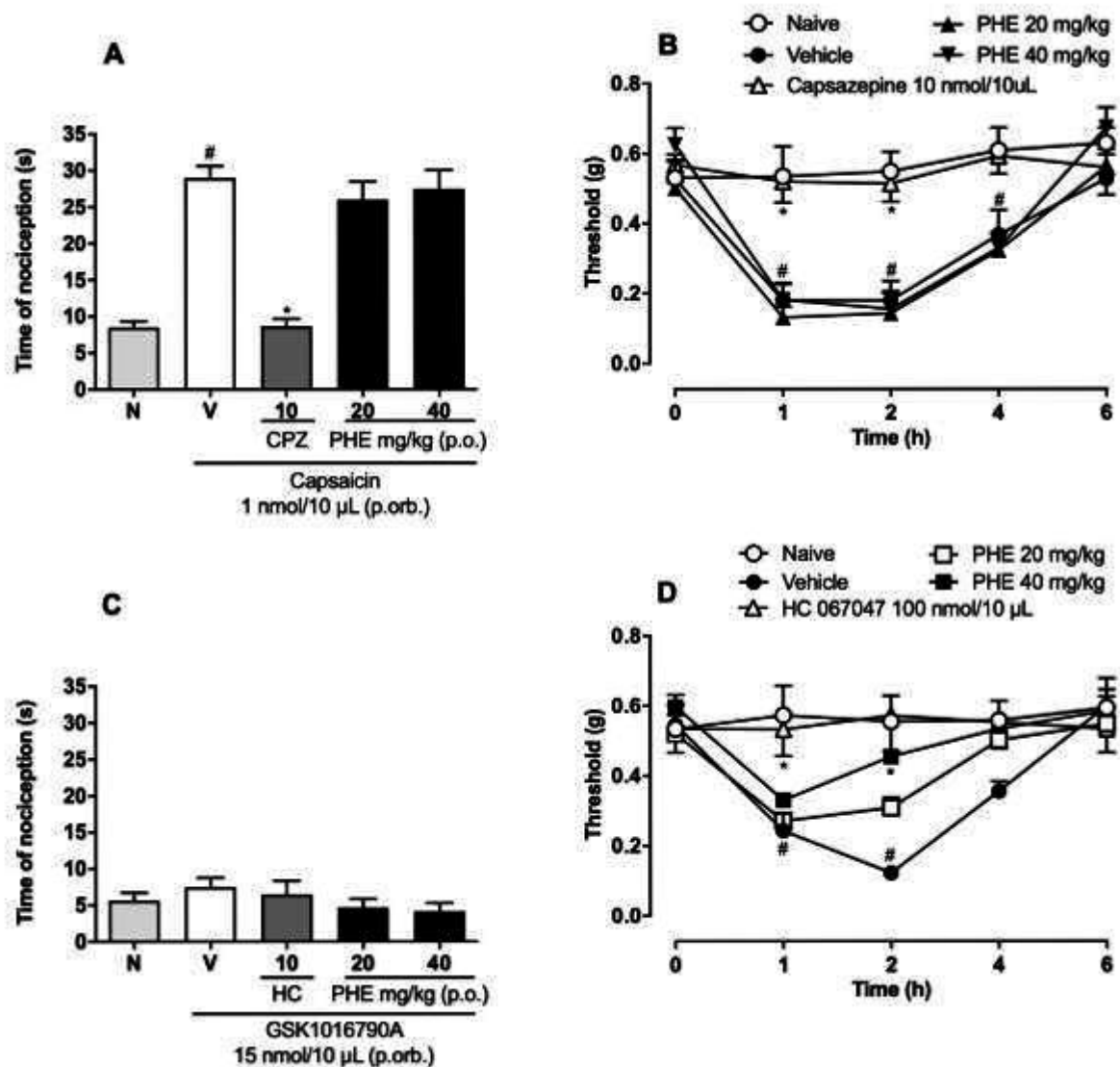


Fig. 2. Effect of PHE oral administration on the spontaneous nociceptive behavior (A and C) and periorbital mechanical allodynia (PMA) (B and D) evoked by periorbital (p.orb., 10 μ L/site) injection of capsaicin (A and B) or GSK 1016790A (C and D). The animals were treated with vehicle (10 mL/kg, p.o.), PHE (20 and 40 mg/kg, p.o.), capsazepine (CPZ: 10 nmol/10 μ L, p. orb.) or HC 067047 (HC: 100 nmol/10 μ L, p. orb.). Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. (n=6). #P < 0.05 compared to Naive group. *P < 0.05 compared to control (vehicle) group (one-way ANOVA followed by post-hoc Bonferroni test for spontaneous nociceptive behavior and two-way ANOVA followed by post-hoc Bonferroni test for PMA).

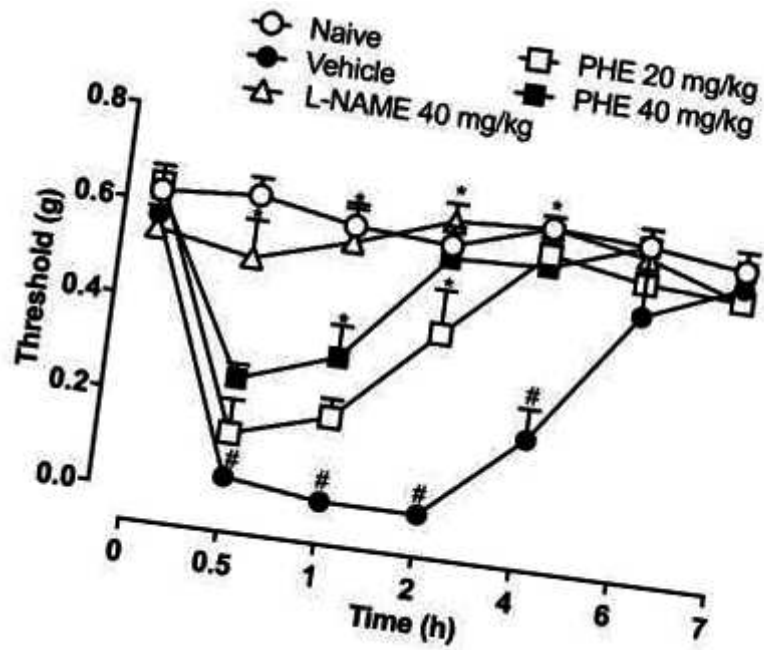


Fig. 3. Effect of PHE oral administration on the periorbital mechanical allodynia (PMA) evoked by nitroglycerin (10 mg/kg, i.p.) injection. Mice were treated with vehicle (10 mL/kg, p.o.), PHE (20 and 40 mg/kg, p.o.) or L-name (40 mg/kg, p.o.). Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. ($n=6$). #P < 0.05 compared to Naive group. *P < 0.05 compared to control (vehicle) group (two-way ANOVA followed by *post-hoc* Bonferroni test for PMA).

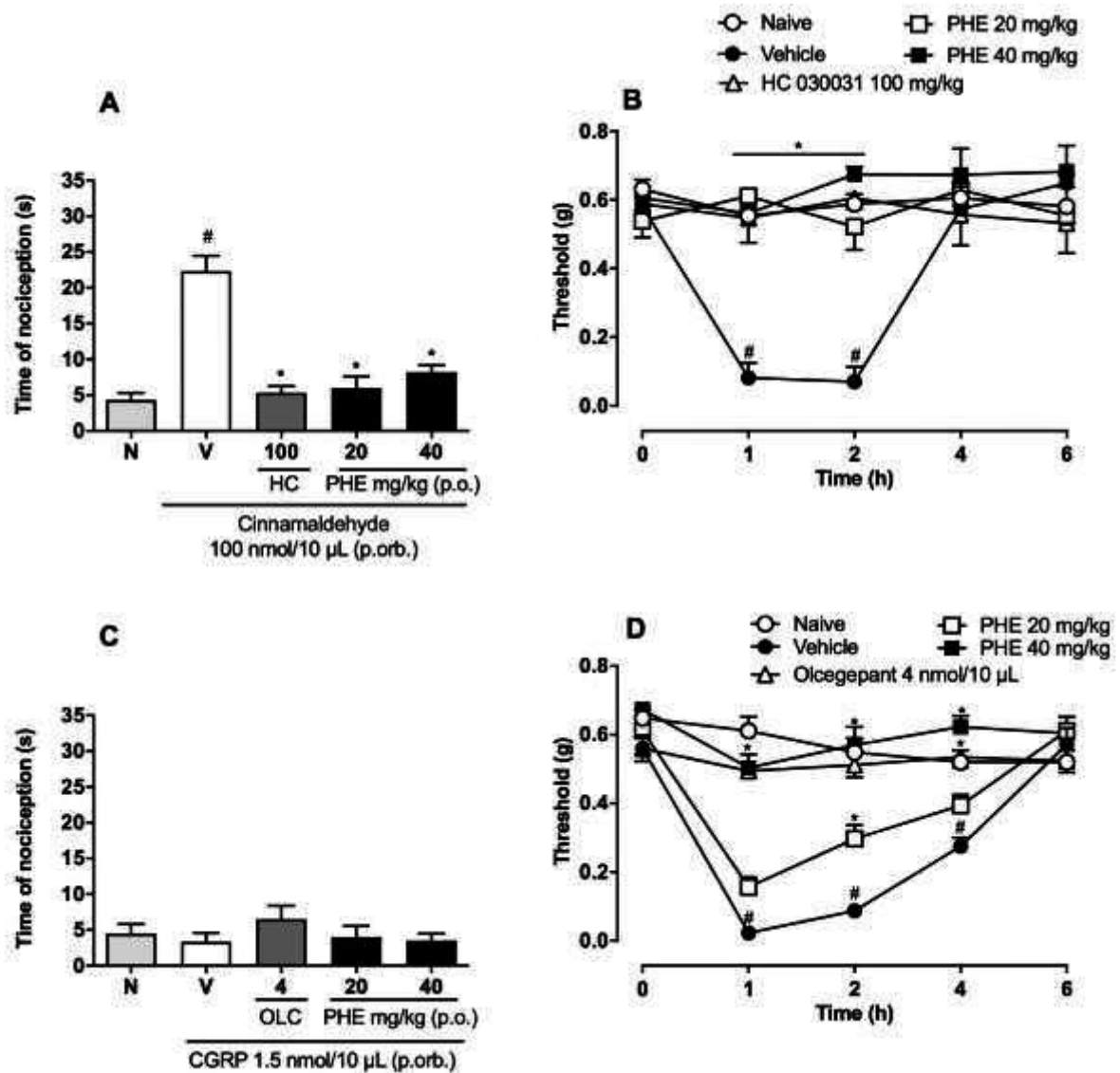


Fig. 4. Effect of PHE oral administration on the spontaneous nociceptive behavior (A and C) and periorbital mechanical allodynia (PMA) (B and D) evoked by periorbital (p.orb., 10 μ L/site) injection of cinamaldehyde (A and B) or CGRP (C and D). The animals were treated with vehicle (10 mL/kg, p.o.), PHE (20 and 40 mg/kg, p.o.), HC 030031 (HC: 100 mg/kg, i.p.) or olcegepant, 4 nmol/10 μ L, p.orb. (OLC: 10 nmol/10 μ L, p. orb.). Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. (n=6). #P < 0.05 compared to Naive group. *P < 0.05 compared to control (vehicle) group (one-way ANOVA followed by post-hoc Bonferroni test for spontaneous nociceptive behavior and two-way ANOVA followed by *post-hoc* Bonferroni test for PMA).

3.2 Nociception induced by orofacial formalin

PHE (10, 20 and 40 mg/kg) given orally 60 min before the orofacial 2.5% formalin injection, inhibited the rubbing in the neurogenic phase in $38 \pm 2\%$, $44 \pm 2\%$ and $57 \pm 3\%$, respectively, when compared to the vehicle group (V: 95 ± 6 s) (Fig 5A). All the three PHE doses were also able to inhibit the nociceptive behavior in the inflammatory phase in 19 ± 2 , $64 \pm 5\%$ and $79 \pm 5\%$, respectively, when compared to the control group (V: 137 ± 17 s). As expected, diclofenac (10 mg/kg, p.o.) inhibited the inflammatory phase by $85 \pm 9\%$ (Fig. 5B).

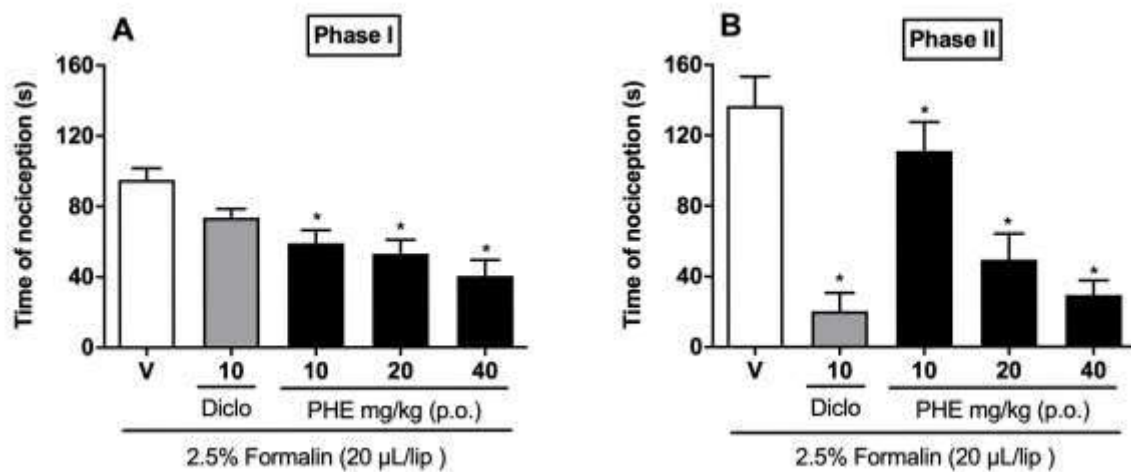


Fig. 5. Antinociceptive effect of oral administration of PHE in the orofacial formalin test. Mice were pretreated with vehicle (V), diclofenac (Diclo: 10 mg/kg, i.p.) or PHE (10, 20 and 40 mg/kg, p.o.) 1h before the 2.5% formalin-induced nociception (20 µL/i.pl.). Rubbing behavior was recorded in both first (neurogenic phase, Panel A) and second (inflammatory phase, Panel B) phases and expressed as time of nociception (s). Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. (n=6). *P < 0.05 compared to control (vehicle) group (one-way ANOVA followed by *post-hoc* Bonferroni test).

3.3 Abdominal constriction, peritoneal capillary permeability and leukocyte infiltration induced by acetic acid

Oral administration with PHE (10, 20 and 40 mg/kg) decreased the abdominal constrictions induced by acetic acid in 62 ± 3 , 50 ± 2 and $46 \pm 5\%$, respectively, when compared to the vehicle group (V: 34 ± 3 s), as show in Fig. 6A. Only the highest PHE dose (40 mg/kg) inhibited significantly the plasmatic extravasation by $55 \pm 4\%$, when compared to the vehicle group (V: 16 ± 0.9 $\mu\text{g/mL}$) (Fig. 6B). However, total leukocytes were reduced with the lowest doses of PHE (10 and 20 mg/kg), by $73 \pm 7\%$ and $64 \pm 4\%$, when compared to the vehicle group (V: $5 \pm 0.6 \times 10^5$ cells) (Fig. 6C).

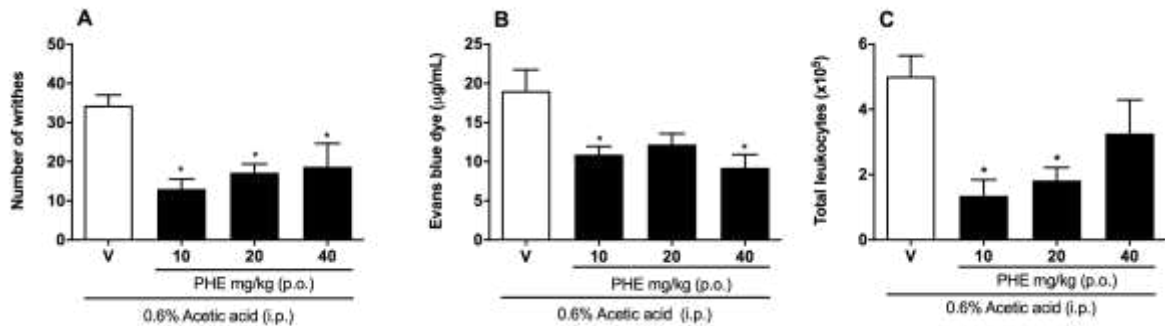


Fig. 6. Effect of oral administration of PHE on abdominal constriction (A), Evans blue leakage (B) and leukocyte infiltration (C) induced by acetic acid. Mice were pretreated with vehicle (V) or PHE (10, 20 and 40 mg/kg, p.o.) 1 h before the intraperitoneal injection of 0.6% acetic acid (0.45 mL/mice). Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. (n=6). *P < 0.05 compared to control (vehicle) group (one-way ANOVA followed by *post-hoc* Bonferroni test).

3.4 Carrageenan-induced allodynia response and edema in the mouse paw

Intraplantar injection of carrageenan induced mechanical allodynia and edema in mouse paw. Mechanical threshold decreased from 1.1 ± 0 g (basal value) to 0.5 ± 0 g, 0.2 ± 0 g, 0.2 ± 0 g and 0.1 ± 0 g, at times of 1, 2, 3 and 4 h, respectively (Fig. 7A). The results depicted in the Fig. 7A show that PHE 20 mg/kg significantly inhibited carrageenan-induced mechanical allodynia by 52% (1 h), 61% (2 h), 62% (3 h), and 71% (4 h) whereas the inhibitions achieved with the PHE 40 mg/kg were 97% (1 h), 103% (2 h), 100% (3 h) and 107% (4 h), when compared to the vehicle group. In the same way, carrageenan-induced paw edema formation starting at 1 h (3.0 ± 0 mm) until 4 h (4.0 ± 0 mm). Oral treatment with PHE 20 mg/kg reduced the paw edema by 73.1, 71.4, 71.9 and 61.1% from 1 to 4 h, respectively, whereas PHE 40 mg/kg reduced the paw edema by 98, 88, 86 and 86 (from 1 to 4 h, respectively), when compared to the vehicle group (Fig. 7B).

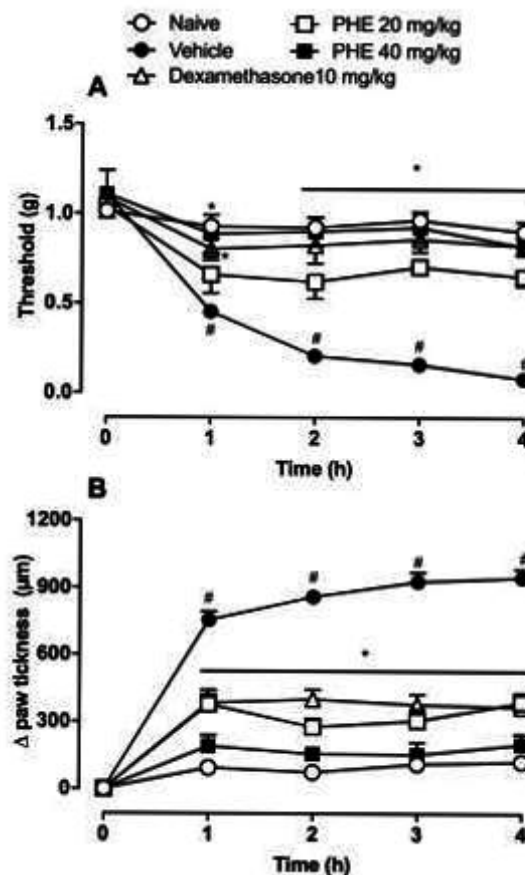


Fig. 7. Effect of PHE oral administration on mechanical allodynia (A) and paw edema (B) induced by carrageenan. Mice were pretreated with vehicle (V), dexamethasone (10 mg/kg, i.p.) or PHE (20 and 40 mg/kg, p.o.), 30 or 60 min, respectively, before intraplantar injection of carrageenan (300 μ g/20 μ L). Mechanical allodynia (g) and paw edema (Δ mm) were evaluated before (basal value) and after carrageenan injection at 1, 2, 3, and 4 h. The results are expressed as mean $\pm$ SEM (n = 6). #P < 0.05 compared to Naive group. *P < 0.05 compared to control (vehicle) group (two-way ANOVA followed by *post-hoc* Bonferroni test).

3.5 Acute oral toxicity of repeated doses

No weighing significant differences were observed between animals of the same group over or between groups (Fig. 8A). Regarding the relative weights of the organs, a statistically significant difference was observed only in the testicle of the group treated with 50 mg/kg and in the liver of the group treated with 2000 mg/kg (Fig. 8B). Increase of alkaline phosphatase was observed in the group treated with PHE 2000 mg/kg and urea in all the groups treated with the different doses of PHE (50, 300 and 2000 mg/kg) (Fig. 8C).

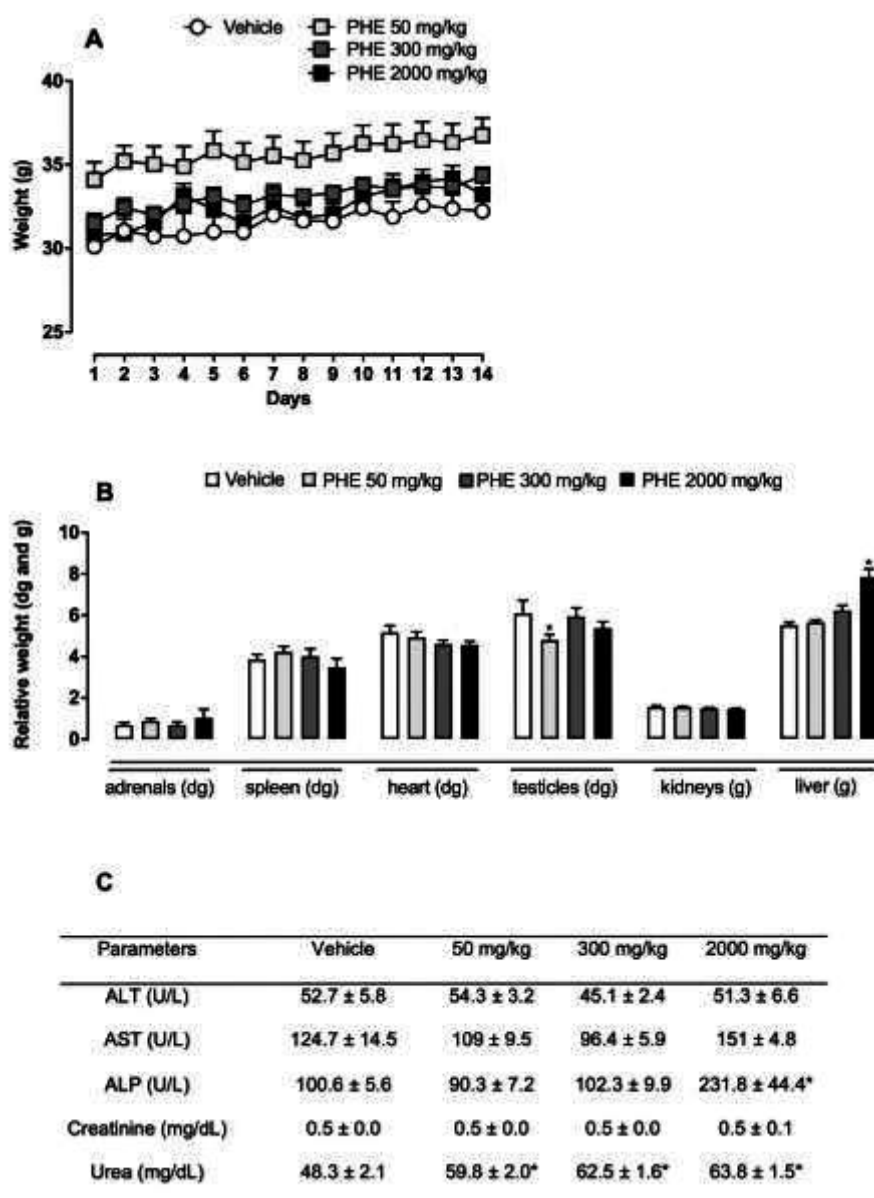


Fig. 8. Toxicological parameters of mice after administration of PHE daily for 14 days. Effect of PHE at 50, 300 and 2000 mg/kg on on body weight (A), organs relative weights (B) and serum biochemistry data (C). The animals were treated with vehicle (10 mL/kg, p.o.) or PHE (50, 300 and 2000 mg/kg, p.o.). Data are expressed as means ± S.E.M. (n=3-6). *P < 0.05 compared to control (vehicle) group (one-way ANOVA followed by *post-hoc* Bonferroni test).

4 Discussion

Through periorbital mechanical allodynia and nociceptive experiments, this study assessed the efficacy and pharmacological activity of the *Petasitis hybridus* rhizome extract. The results confirm previous findings about analgesic and anti-inflammatory butterbur properties and plays a role in pharmacological knowledge about migraine mechanisms properties of the *Petasites* rhizome extract. Moreover, it demonstrates the toxicological findings of the extract.

One of the explanations for the generation of a headache in a migraine episode is the activation of nociceptors innervating the cranial meninges. However the specific mechanism that cause meninges nociceptor activation is unclear (Benemei and Dussor, 2019). It is well established the involvement of the trigeminovascular system in the migraine headache. The nociceptive transmission begins at first-order trigeminovascular neurons, which has cell bodies in the trigeminal ganglion and afferent fibers innervating meninges and its vessels, activation and sensitization. In sequence, the transmission ascending to second-order trigeminovascular neurons (in brainstem) (Ashina, 2020). Besides, transmit pain signal to secondary neurons, the nociceptors of trigeminal anatomy, when mechanical or chemical stimulated, release neuropeptides, as CGRP, SP and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, from their peptidergic secretory vesicles located in cell bodies, synapses and nonsynaptic varicosities. The release of this neuropeptides interact with surrounding structures (blood vessels, neurons, and immunocytes) (Yuan and Silberstein, 2018). Hence, third-order trigeminovascular neurons in the thalamus are activated and sensitized and finally the nociceptive transmission reaches the somatosensory cortex and other cortical areas follow-on in the perception of migraine pain (Ashina, 2020).

Our methodology was based on that described by De Logu et al. (2019), that shows correspondence between migraine-provoking mediators and periorbital allodynia in mice. Besides mechanical allodynia is not able to run through pain migraine-like attacks, mechanical allodynia evoked by mediators in mice could help the understanding of the mechanisms in migraine in patients (De Logu *et al.*, 2019). Therefore, the present data provides pharmacological information about *Petasistis hybridus* rhizome extract related with migraine.

The oral treatment with PHE prevented the development of PMA induced by histamine, and the highest PHE dose showed similar results when compared to the

pretreatment with the histamine H₁ receptor antagonist (ketotifen). One of the migraine theories is that there is a connection between peripheral and central pain sensitization and meninges neurogenic inflammation. The peptides released from trigeminal nerves, including CGRP, interact with vessels, neurons and immunocytes, resulting in neurogenic inflammation. As a consequence, occurs mast cell degranulation, releasing histamine, among other mediators such as serotonin and prostaglandins. Like other inflammatory mediators, histamine is capable of reduce the nociceptive threshold, sensitizing neurons that promotes more neuropeptide releasing. Histamine acts through 4 metabotropic receptors (H₁, H₂, H₃ and H₄) and the linking with H₁-receptor is responsible for excitation of the neurons in most brain areas. The H₁-receptor pathway results in intracellular Ca²⁺ increase, that in turn active specific PKC isoforms, smooth muscle contraction, nitric oxide (NO) synthase, inducing vasodilatation, and production of arachidonic acid by phospholipase A2 stimulus. However, it is important to emphasize that the antihistaminic effect demonstrated prospective for pain control in preclinical studies, but not in clinical studies for migraine control, especially regarding H₁ and H₂ antagonists (Yuan and Silberstein, 2018). Although the results found could implicate in a possible effect of PHE in histamine liberation and/or signaling, the clinical importance for this antimigraine mechanism is uncertain.

Regarding the involvement of transient receptor potential (TRP) channels family in pain signaling, we analyze the PHE capacity to prevent the development of PMA induced by TRPV1 (capsaicin), TRPV4 (GSK 1016790A) and TRPA1 agonists (cinnamaldehyde). TRP channels is divided into 6 subfamilies, named Canonical (TRPC), Vanilloid (TRPV), Melastatin (TRPM), Ankyrin (TRPA), Mucolipin (TRPML) and Polycystic (TRPP). They are found in different types of cells, being expressed by nociceptors (Samanta, Hughes and Moiseenkova-Bell, 2018), reinforcing theories that links TRP channels with migraine, through meningeal nociceptors activation (Benemei and Dussor, 2019).

TRPV1 channels are expressed in sensorial neurons including those who innervate the meninges, can be activated by capsaicin, protons and higher temperature, being important for mechanical, chemical and thermal nociception (Samanta, Hughes and Moiseenkova-Bell, 2018). It is known that chronic migraine patients displayed higher TRPV1 expression, suggesting the involvement of TRPV1 channel with headache phase of migraine by meningeal and vascular function

(Benemei and Dussor, 2019). Similarly to the TRPV1 channels, TRPV4 is responsible for the mechanosensation, thermosensation and osmoregulation, and importantly, is also expressed on meningeal nociceptors (Samanta, Hughes and Moiseenkova-Bell, 2018). In preclinical experiments with rats, the TRPV4 activation in dura provoked headache behavioral responses; however, there is few publications about the mechanisms of this channel in headache episodes (Benemei and Dussor, 2019).

TRPA1 is expressed in peptidergic and non-peptidergic neurons, acting as a chemo-nociceptor activated for many endogenous and exogenous compounds, such as cinnamaldehyde, nitric oxide (NO) and prostaglandins (Samanta, Hughes and Moiseenkova-Bell, 2018). In sharp contrast to the other TRP family members, TRPA1 role in migraine has been widely investigated. Preclinical studies demonstrated that the activation of TRPA1 by umbellulone and mustard oil causes headache like responses in rats. On the other hand, compounds as parthenolide (from feverfew) and isopetasin act as TRPA1 agonists, resulting in the TRPA1-desensitizing, explaining an important mechanism of these herbs against migraine attacks. Interestingly, NO is recognized for provoking headache through the TRPA1 activation, since the combination of NO with hydrogen sulfide (H₂S), forming nitroxyl (HNO), activates TRPA1 and releases CGPR, increasing meningeal blood flow (Benemei and Dussor, 2019).

Our results indicate the PHE ability to prevent the development of periorbital mechanical allodynia induced by GSK 1016790A, a potent TRPV4 agonist, and cinnamaldehyde, responsible to activates TRPA1 channel, but not prevent PMA induced by capsaicin (TRPV1 agonist). The PMA prevention induced by cinnamaldehyde, are consistent with earlier finding (Benemei *et al.*, 2017) that attributed the anti-migraine effect of *Petasites* extract to isopetasin, which promotes excitation of nociceptors, followed by marked peptidergic nociceptors desensitization due to the TRPA1 channel activation. Horak et al. (2009) demonstrate that S-petasin and iso-S-petasin, isolated from a CO₂ extract of *Petasites hybridus*, are voltage-gated calcium channel inhibitors, preferentially acting as use-dependent channel blockers. Considering this, it is reasonable suggest that PHE effects could be also associated with calcium regulation in TRPA1 and TRPV4 channels.

PHE was also able to prevent PMA induced by nitroglycerin, which has been characterized as a provoking headache substance in experimental models of

migraine in humans. Nitroglycerin stimulates the basal activity of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), releasing NO, which is responsible for promote vasodilation. Despite vasodilation, that is considered as one of the main causes of migraine (Ashina *et al.*, 2017), the TRPA1 activation by NO, as above mentioned (Benemei and Dussor, 2019), appears to be intrinsically related to the preventive antiallodynic effects of the PHE.

Furthermore, it is well know that TRP activation releases CGRP in sensorial nerve endings, such as the trigeminal system that presents a solid perivascular innervation, that is related to CGRP releasing during migraine (Russell *et al.*, 2014). CGRP acts via receptor constituted by the calcitonin receptor-like receptor (CLR), receptor activity-modifying protein 1 (RAMP1) and a receptor component protein (RCP) (Edvinsson *et al.*, 2018). Clinical evidence support that CGRP plays a role in migraine mechanisms, since intravenous infusion of CGRP can induce migraine-like attacks in patients and CGRP levels are increased during a migraine attack. In chronic patients, this increase appears in the pain-free interval too, returning to normal levels after pharmacological headache treatment. In addition, treatments with CGRP antagonists and anti-CGRP antibodies revealed the efficacy to treat or prevent migraine (Benemei and Dussor, 2019). In our experimental conditions, PHE was able to prevent the development of PMA induced by CGRP, similarly to the CGRP antagonist (olcegepant), suggesting that in addition to the TRPA1 modulation, PHE could acts as an CGRP receptor antagonist. Altogether, our data strengthens the concept that a decrease in TRPA1 channel-mediated release of CGRP, or the release by itself, may contribute to the efficacy of *Petasites* as a pharmacological agent for migraine treatment.

To complement the analgesic properties of PHE, we conducted experiments with nociceptive inflammatory models. Starting with the orofacial formalin injection, animals displayed nociceptive behaviors related to the neurogenic phase (nociceptor activation and SP and glutamate release) and to the inflammatory phase (inflammatory mediators release) (Nomura *et al.*, 2013). Our results demonstrated that PHE inhibited both phases. The pain behavior evoked by formalin is CGRP dependent, once was demonstrated that formalin activates directly both TRPA1 and TRPV1 in dorsal root ganglion neurons, releasing CGRP at central and peripheral levels similar to that caused by capsaicin (White *et al.*, 2014). Therefore, PHE could promotes antinociceptive effects due to its action on TRPA1 channels, corroborating

with our previous findings, but also through the modulation of inflammatory mediators.

Previous studies indicated anti-inflammatory activity of *Petasites* extracts and isopetasin, by the inhibition of leukotriene synthesis (Johnston, 2001) (Bickel *et al.*, 1994) and by the inhibition of COX-2-mediated PGE₂ release (Fiebich *et al.*, 2005). It is well established that intraperitoneal injection of acetic acid provoke a visceral inflammatory response, promoting abdominal constrictions, increase of vascular permeability and of leukocyte infiltration due to the releasing of local inflammatory mediators (Rodrigues *et al.*, 2012). Here, PHE standardized with minimum of 15% petasins, also presented antinociceptive and anti-inflammatory effects. Similarly, the carrageenan has been used to test anti-inflammatory agents, for its ability to induced hindpaw sensitization and edema. The edema formation is one of the initial acute inflammatory signs, triggered by plasma exudation into injury site and leukocyte infiltration (Carlotto *et al.*, 2016). With these tests, our results shows that *Petasites hybridus* extract displayed both antinociceptive and anti-inflammatory effects in mice. Altogether, these findings indicated that PHE reduce the inflammatory process, suggesting that its effects could be associated with different antinociceptive mechanisms.

In order to analyze any possible toxic effect, we also investigated PHE acute toxicity in mice. Through toxicological animal data, it is possible to access potential hazard and risk to humans. However, it is important to highlight that the data represents only an approximation of the potential biological effect on humans (Lewis *et al.*, 2002).

The results for acute oral toxicity reveled some few alterations: weight augmentation of the testicle of the group treated with PHE 50 mg/kg and in the liver of the group treated with PHE 2000 mg/kg and increase of alkaline phosphatase (highest PHE dose) and urea in all the groups treated with the different doses of PHE. In our experiment conditions, no deaths or clinical signs of toxicity related to the treatment were observed, similarly, there was no change in body weight of the animals or in food consumption during the 14 days of treatment. The variations in the relative weight in some organs, reduction in the relative weight of the spleen at the lowest treatment dose and relative increase of the liver at the highest dose were statistically significant, but small in relation to the vehicle group. Such alterations did not present a dose-effect relation, and could characterize an effect not related to the

PHE treatment (Lewis *et al.*, 2002). Blood urea concentration can be a parameter to detect kidney changes, analyzed together to the creatinine plasmatic levels (Widyastuti, Ristianti and Sari, 2019). The creatinine concentration results showed no change comparing the treated PHE groups with the vehicle group. Furthermore, this alterations was not associated with an increase in the relative weight of the kidneys, so it may indicate non-adverse effects (Lewis *et al.*, 2002). In the same way, the biochemical analyses for hepatic evaluation showed an increase of alkaline phosphatase only in the group treated with PHE 2000 mg/kg, with no observation of alterations in other hepatic enzymes. Pyrrolizidine alkaloids, as senecionine and integerrimine, considered toxic for the liver, are found naturally in *Petasites hybridus*. These alkaloids are able to promote sinusoidal obstruction syndrome in animals and humans. However, extracts processed to eliminate any traces of pyrrolizidine alkaloids (CO₂ extraction), as the PHE, do not appear to cause liver injury, either by serum enzyme increase or clinical symptoms (LiverTox, 2019). It is important to mention that previous non-clinical studies showed a non-toxicological profile for butterbur rhizome extracts free of pyrrolizidine alkaloids. In Wistar rats, were found a LD₅₀ of 2.5 g/kg and 1 g/kg body weight, obtained from the oral and intraperitoneal single dose administration, respectively. These values represented an interval between 333 and 1250 times the recommended dose for humans. A chronic toxicity study conducted with 200 Wistar rats during 26 weeks, based on OECD guidelines, showed a NOAEL that guarantees a safe range of the recommended dose in humans (Danesch and Rittinghausen, 2003). Considering that no deaths related to the PHE treatment were observed, it is plausible to consider a LD₅₀ higher than 2000 mg/kg in Swiss mice.

In summary, the present study confirms and extends the results from literature about the antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Petasites hybridus*. The antiallodynic property suggest that PHE could prevent migraine trough the modulation of TRPV4 channel, NO-TRPA1 and TRPA1-CGRP trigeminal signaling. Moreover, apart from the decrement of CGRP release, we could propose that *Petasites hybridus* can act directly as a CGRP receptor antagonist, providing new insights for a better understanding of the mechanisms underlying the prophylactic migraine effect. To our knowledge, this mice study is the first study that provide convincing evidence that the *Petasites hybridus* rhizome extract standardized with minimum of 15% petasins presents potential to treat inflammatory pain conditions,

indicating new properties in addition to those already studied, and associated with the no-observed-adverse-effect-level of the extract.

References

American Headache Society (2019) 'The American Headache Society Position Statement On Integrating New Migraine Treatments Into Clinical Practice', *Headache*, 59(1), pp. 1–18. doi: 10.1111/head.13456.

Anderson, N. and Borlak, J. (2019) 'Hepatobiliary Events in Migraine Therapy with Herbs—The Case of Petadolex, A Petasites Hybridus Extract', *Journal of Clinical Medicine*, 8(5), p. 652. doi: 10.3390/jcm8050652.

Andreou, A. P. and Edvinsson, L. (2019) 'Mechanisms of migraine as a chronic evolutive condition', *Journal of Headache and Pain*, 20(1). doi: 10.1186/s10194-019-1066-0.

Arnold, E. *et al.* (2015) 'Inhibition of cytosolic phospholipase A2 α (cPLA2 α) by Medicinal plants in relation to their phenolic content', *Molecules*, 20(8), pp. 15033–15048. doi: 10.3390/molecules200815033.

Ashina, M. *et al.* (2017) 'Human models of migraine-short-Term pain for long-Term gain', *Nature Reviews Neurology*, 13(12), pp. 713–724. doi: 10.1038/nrneurol.2017.137.

Ashina, M. (2020) 'Migraine', *The new england journal of medicine*, (383), pp. 1866–76. doi: 10.1056/NEJMra1915327.

Basbaum, A. I. *et al.* (2009) 'Cellular and Molecular Mechanisms of Pain', *Cell*, 139(2), pp. 267–284. doi: 10.1016/j.cell.2009.09.028.

Benemei, S. *et al.* (2017) 'The anti-migraine component of butterbur extracts, isopetasin, desensitizes peptidergic nociceptors by acting on TRPA1 cation channel', *British Journal of Pharmacology*, 174(17), pp. 2897–2911. doi: 10.1111/bph.13917.

Benemei, S. and Dussor, G. (2019) 'TRP channels and migraine: Recent developments and new therapeutic opportunities', *Pharmaceuticals*, 12(2), pp. 1–17. doi: 10.3390/ph12020054.

Bickel, D. *et al.* (1994) 'Identification and characterization of inhibitors of peptido-leukotriene-synthesis from Petasites hybridus', *Planta Medica*, 60(4), pp. 318–322. doi: 10.1055/s-2006-959492.

Carlotto, J. *et al.* (2016) 'Polysaccharides from Arctium lappa L.: Chemical structure and biological activity', *International Journal of Biological Macromolecules*,

91, pp. 954–960. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.06.033.

Chaplan, S. R. *et al.* (1994) 'Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw', *Journal of Neuroscience Methods*, 53(1), pp. 55–63. doi: 10.1016/0165-0270(94)90144-9.

Cohen, S. P. and Mao, J. (2014) 'Neuropathic pain: Mechanisms and their clinical implications', *BMJ (Online)*, 348, pp. 1–12. doi: 10.1136/bmj.f7656.

D'Amico, D. and Tepper, S. J. (2008) 'Prophylaxis of migraine: General principles and patient acceptance', *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 4(6), pp. 1155–1167. doi: 10.2147/ndt.s3497.

Dallazen, J. L. *et al.* (2020) 'Pharmacological potential of alkylamides from *Acmella oleracea* flowers and synthetic isobutylalkyl amide to treat inflammatory pain', *Inflammopharmacology*, 28(1), pp. 175–186. doi: 10.1007/s10787-019-00601-9.

Danesch, U. and Rittinghausen, R. (2003) 'Safety of a patented special butterbur root extract for migraine prevention', *Headache*, 43(1), pp. 76–78. doi: 10.1046/j.1526-4610.2003.03015.x.

Daniel, O. and Mauskop, A. (2016) 'Nutraceuticals in Acute and Prophylactic Treatment of Migraine', *Current Treatment Options in Neurology*, 18(4), pp. 1–8. doi: 10.1007/s11940-016-0398-1.

Diener, H. C., Rahlfs, V. W. and Danesch, U. (2004) 'The first placebo-controlled trial of a special butterbur root extract for the prevention of migraine: Reanalysis of efficacy criteria', *European Neurology*, 51(2), pp. 89–97. doi: 10.1159/000076535.

Disch, L. *et al.* (2018) 'In Vitro and in Situ Absorption and Metabolism of Sesquiterpenes from *Petasites hybridus* Extracts', *Planta Medica*, 84(11), pp. 795–805. doi: 10.1055/s-0044-100401.

Dux, M. *et al.* (2016) 'Meningeal blood flow is controlled by H₂S-NO crosstalk activating a HNO-TRPA1-CGRP signalling pathway', *British Journal of Pharmacology*, 173(3), pp. 431–445. doi: 10.1111/bph.13164.

Edvinsson, L. (2015) 'CGRP receptor antagonists and antibodies against CGRP and its receptor in migraine treatment', *British Journal of Clinical Pharmacology*, 80(2), pp. 193–199. doi: 10.1111/bcp.12618.

Edvinsson, L. *et al.* (2018) 'CGRP as the target of new migraine therapies - Successful translation from bench to clinic', *Nature Reviews Neurology*, 14(6), pp.

338–350. doi: 10.1038/s41582-018-0003-1.

Evers, S. *et al.* (2009) 'EFNS guideline on the drug treatment of migraine - Revised report of an EFNS task force', *European Journal of Neurology*, 16(9), pp. 968–981. doi: 10.1111/j.1468-1331.2009.02748.x.

Fiebich, B. L. *et al.* (2005) 'Petasites hybridus extracts in vitro inhibit COX-2 and PGE2 release by direct interaction with the enzyme and by preventing p42/44 MAP kinase activation in rat primary microglial cells', *Planta Medica*, 71(1), pp. 12–19. doi: 10.1055/s-2005-837744.

Goadsby, P. J. and Holland, P. R. (2019) 'An Update: Pathophysiology of Migraine', *Neurologic Clinics*, 37(4), pp. 651–671. doi: 10.1016/j.ncl.2019.07.008.

Grossmann, W. and Schmidramsl, H. (2001) 'An extract of Petasites hybridus is effective in the prophylaxis of migraine', *Alternative Medicine Review*, 6(3), pp. 303–310.

Ha, H. and Gonzalez, A. (2019) 'Migraine headache prophylaxis', *American Family Physician*, 99(1), pp. 17–24.

Haratym, W. and Weryszko-Chmielewska, E. (2012) 'The ecological features of flowers and inflorescences of two species of the genus Petasites Miller (Asteraceae)', *Acta Agrobotanica*, 65(2), pp. 37–46. doi: 10.5586/aa.2012.056.

Holland, S. *et al.* (2012) 'Evidence-based guideline update: NSAIDs and other complementary treatments for episodic migraine prevention in adults Report of the quality standards subcommittee of the american academy of neurology and the American headache society', *Neurology*, 78(17), pp. 1346–1353. doi: 10.1212/WNL.0b013e3182535d0c.

Horak, S. *et al.* (2009) 'Use-dependent block of voltage-gated Cav2.1 Ca²⁺ channels by petasins and eudesmol isomers', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 330(1), pp. 220–226. doi: 10.1124/jpet.109.151183.

Jensen, T. S. and Finnerup, N. B. (2014) 'Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: Clinical manifestations and mechanisms', *The Lancet Neurology*, 13(9), pp. 924–935. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70102-4.

Johnston, J. (2001) 'Petasites hybridus Monograph', *Alternative Medicine Review*, 6(2), pp. 207–209. Available at: <http://www.altmedrev.com/archive/publications/6/2/207.pdf>.

Kumar, A. and Kadian, R. (2020) 'Migraine prophylaxis', in *NCBI Bookshelf*. doi: 10.5694/j.1326-5377.2008.tb02028.x.

Lewis, R. W. *et al.* (2002) 'Recognition of Adverse and Nonadverse Effects in Toxicity Studies', *Toxicologic Pathology*, 30(1), pp. 66–74. doi: 10.1080/01926230252824725.

Lipton, R. B. *et al.* (2004) 'Petasites hybridus root (butterbur) is an effective preventive treatment for migraine', *Neurology*, 63(12), pp. 2240–2244. doi: 10.1212/01.WNL.0000147290.68260.11.

De Logu, F. *et al.* (2019) 'Migraine-provoking substances evoke periorbital allodynia in mice', *Journal of Headache and Pain*, 20(1), pp. 1–9. doi: 10.1186/s10194-019-0968-1.

Mihajilov-Krstev, T. *et al.* (2020) 'Phytochemistry, toxicology and therapeutic value of petasites hybridus subsp. Ochroleucus (common butterbur) from the Balkans', *Plants*, 9(6), pp. 1–14. doi: 10.3390/plants9060700.

Nair, A. and Jacob, S. (2016) 'A simple practice guide for dose conversion between animals and human', *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, 7(2), p. 27. doi: 10.4103/0976-0105.177703.

National Research Council (2011) *Guide for the care and use of laboratory animals*. Eighth, *Ntional Research Council of the National Academies*. Eighth. Washington.

Nomura, E. C. O. *et al.* (2013) 'Antinociceptive effects of ethanolic extract from the flowers of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen in mice', *Journal of Ethnopharmacology*, 150(2), pp. 583–589. doi: 10.1016/j.jep.2013.09.007.

OECD (2002) 'Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method', *Oecd Guideline for Testing of Chemicals*, (December), pp. 1–14. doi: 10.1787/9789264071001-en.

Olesen, J. (2018) 'Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS) The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition', *Cephalalgia*, 38(1), pp. 1–211. doi: 10.1177/0333102417738202.

Olesen, J. and Ashina, M. (2019) 'Calcitonin gene-related peptide — beyond migraine prophylaxis', *Nature Reviews Neurology*, 15(10), pp. 562–564. doi: 10.1038/s41582-019-0258-1.

Pothmann, R. and Danesch, U. (2005) 'Migraine prevention in children and adolescents: Results of an open study with a special butterbur root extract', *Headache*, 45(3), pp. 196–203. doi: 10.1111/j.1526-4610.2005.05044.x.

Rainero, I. *et al.* (2020) 'Migraine pathways and the identification of novel

therapeutic targets', *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 24(3), pp. 245–253. doi: 10.1080/14728222.2020.1728255.

Rajapakse, T. and Davenport, W. J. (2019) 'Phytomedicines in the Treatment of Migraine', *CNS Drugs*, 33(5), pp. 399–415. doi: 10.1007/s40263-018-0597-2.

Rodrigues, M. R. A. *et al.* (2012) 'Antinociceptive and anti-inflammatory potential of extract and isolated compounds from the leaves of *Salvia officinalis* in mice', *Journal of Ethnopharmacology*, 139(2), pp. 519–526. doi: 10.1016/j.jep.2011.11.042.

Russell, F. A. *et al.* (2014) 'Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology', *Physiological reviews*, 94(4), pp. 1099–1142. doi: 10.1152/physrev.00034.2013.

Samanta, A., Hughes, T. and Moiseenkova-Bell, V. (2018) 'HHS Public Access', *Subcell Biochem*, 87, pp. 141–165. doi: 10.1007/978-981-10-7757-9_6.

Sangermani, R. and Boncimino, A. (2017) 'The use of nutraceuticals in children's and adolescent's headache', *Neurological Sciences*, 38, pp. 121–124. doi: 10.1007/s10072-017-2896-7.

Schwedt, T. J. (2018) 'Preventive Therapy of Migraine', *CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology*, 24(4-Headache), pp. 1052–1065. doi: 10.1212/CON.0000000000000635.

Sneddon, L. U. (2018) 'Comparative physiology of nociception and pain', *Physiology*, 33(1), pp. 63–73. doi: 10.1152/physiol.00022.2017.

Soleimani, A. *et al.* (2015) 'High Cytotoxicity and Apoptotic Effects of Natural Bioactive Benzofuran Derivative on the MCF-7 Breast Cancer Cell Line', *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 18(5), pp. 505–513. doi: 10.2174/1386207318666150430114815.

Stovner, L. J. *et al.* (2018) 'Global, regional, and national burden of migraine and tension-type headache, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016', *The Lancet Neurology*, 17(11), pp. 954–976. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30322-3.

Sutherland, A. and Sweet, B. V. (2010) 'Butterbur: An alternative therapy for migraine prevention', *American Journal of Health-System Pharmacy*, 67(9), pp. 705–711. doi: 10.2146/ajhp090136.

Thomet, O. A. R. *et al.* (2001) 'Role of petasin in the potential anti-inflammatory activity of a plant extract of *Petasites hybridus*', *Biochemical*

Pharmacology, 61(8), pp. 1041–1047. doi: 10.1016/S0006-2952(01)00552-4.

Thomet, O. A. R. and Simon, H. U. (2002) 'Petasins in the treatment of allergic diseases: Results of preclinical and clinical studies', *International Archives of Allergy and Immunology*, 129(2), pp. 108–112. doi: 10.1159/000065884.

U.S. Department of Health and Human Services (2009) 'Chemical Information Review Document for Butterbur (*Petasites hybridus*, ext.) [CAS No. 90082-63-6]', in.

Utterback, G. *et al.* (2014) 'Butterbur extract: Prophylactic treatment for childhood migraines', *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 20(1), pp. 61–64. doi: 10.1016/j.ctcp.2012.04.003.

White, S. *et al.* (2014) 'Heat hyperalgesia and mechanical hypersensitivity induced by calcitonin gene-related peptide in a mouse model of neurofibromatosis', *PLoS ONE*, 9(9). doi: 10.1371/journal.pone.0106767.

Widyastuti, D. A., Ristianti, M. A. and Sari, I. M. (2019) 'The Study of Blood Creatinin and Urea Concentration of Wistar Rats (*Rattus norvegicus*) Due to Sodium Nitrite Induction', *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 17(1), p. 14. doi: 10.35814/jifi.v17i1.560.

Wildi, E. *et al.* (1998) 'Quantitative analysis of petasin and pyrrolizidine alkaloids in leaves and rhizomes of in situ grown *Petasites hybridus* plants', *Planta Medica*, 64(3), pp. 264–267. doi: 10.1055/s-2006-957422.

Yam, M. F. *et al.* (2018) 'General pathways of pain sensation and the major neurotransmitters involved in pain regulation', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8). doi: 10.3390/ijms19082164.

Yuan, H. and Silberstein, S. D. (2018) 'Histamine and Migraine', *Headache*, 58(1), pp. 184–193. doi: 10.1111/head.13164.

Acknowledgements

Naidek, A. F. is recipient of scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho, através de modelos experimentais de alodinia mecânica periorbital evocada por mediadores capazes de provocar migrânea em humanos, e modelos agudos de nocicepção e inflamação, complementa os achados prévios da literatura sobre os efeitos de *Petasites hybridus*. Nossos dados fornecem elucidação complementar aos mecanismos subjacentes ao seu efeito profilático na migrânea. Sugere-se que o efeito antialodínico do extrato dos rizomas de butterbur na profilaxia da migrânea pode estar associado a modulação dos canais TRP, especificamente os canais TRPV4 e TRPA1, esse último via modulação de NO e redução da liberação de CGRP na sinalização trigeminal. Além dos dados prévios da literatura que sugerem a capacidade da isopetasina em reduzir a liberação de CGRP, nossos dados nos permitem aventar a possibilidade de que o extrato de *Petasites hybridus* atue como antagonista do receptor de CGRP. Este estudo fornece evidências convincentes de que o extrato dos rizomas de *Petasites hybridus* (padronizado com mínimo de 15% de petasinas) apresenta potencial para tratar dores de origem inflamatória, indicando novas propriedades além das já estudadas, e associadas a ausência de efeitos adversos significantes do extrato.

Considerando os relatos bibliográficos sobre o efeito hepatotóxico de extratos não tratados para a remoção de alcaloides pirrolizidínicos, a investigação de toxicidade de doses repetidas de 14 dias forneceu dados que mostram que o extrato estudado não apresentou um perfil tóxico em camundongos. Contudo, foram observados aumento do peso do fígado, nos níveis plasmáticos de fosfatase alcalina e de ureia, efeitos que precisam ser melhor investigados. Considerando ainda a ausência de mortes em virtude do tratamento oral com o extrato dos rizomas de *Petasites hybridus*, é possível correlacionar uma $DL_{50} > 2000$ mg/kg, sugerindo um baixo potencial de toxicidade ou letalidade.

REFERÊNCIAS

American Headache Society (2019) 'The American Headache Society Position Statement On Integrating New Migraine Treatments Into Clinical Practice', *Headache*, 59(1), pp. 1–18. doi: 10.1111/head.13456.

Anderson, N. and Borlak, J. (2019) 'Hepatobiliary Events in Migraine Therapy with Herbs—The Case of Petadolex, A *Petasites Hybridus* Extract', *Journal of Clinical*

Medicine, 8(5), p. 652. doi: 10.3390/jcm8050652.

Andreou, A. P. and Edvinsson, L. (2019) 'Mechanisms of migraine as a chronic evolutive condition', *Journal of Headache and Pain*, 20(1). doi: 10.1186/s10194-019-1066-0.

Arnold, E. *et al.* (2015) 'Inhibition of cytosolic phospholipase A2 α (cPLA2 α) by Medicinal plants in relation to their phenolic content', *Molecules*, 20(8), pp. 15033–15048. doi: 10.3390/molecules200815033.

Ashina, M. *et al.* (2017) 'Human models of migraine-short-Term pain for long-Term gain', *Nature Reviews Neurology*, 13(12), pp. 713–724. doi: 10.1038/nrneurol.2017.137.

Ashina, M. (2020) 'Migraine', *The new england journal of medicine*, (383), pp. 1866–76. doi: 10.1056/NEJMra1915327.

Basbaum, A. I. *et al.* (2009) 'Cellular and Molecular Mechanisms of Pain', *Cell*, 139(2), pp. 267–284. doi: 10.1016/j.cell.2009.09.028.

Benemei, S. *et al.* (2017) 'The anti-migraine component of butterbur extracts, isopetasin, desensitizes peptidergic nociceptors by acting on TRPA1 cation channel', *British Journal of Pharmacology*, 174(17), pp. 2897–2911. doi: 10.1111/bph.13917.

Benemei, S. and Dussor, G. (2019) 'TRP channels and migraine: Recent developments and new therapeutic opportunities', *Pharmaceuticals*, 12(2), pp. 1–17. doi: 10.3390/ph12020054.

Bickel, D. *et al.* (1994) 'Identification and characterization of inhibitors of peptido-leukotriene-synthesis from *Petasites hybridus*', *Planta Medica*, 60(4), pp. 318–322. doi: 10.1055/s-2006-959492.

Brasil (2006). Decreto nº 5.813 de 22 de junho de 2006. Aprova a política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 23 de junho de 2006, p.2.

Brasil (2008). Portaria interministerial nº 2.960 de 9 de novembro de 2008. Aprova o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e cria o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Diário Oficial da União, Brasília, 10 de dezembro de 2008, p. 56.

Carlotto, J. *et al.* (2016) 'Polysaccharides from *Arctium lappa* L.: Chemical structure and biological activity', *International Journal of Biological Macromolecules*, 91, pp. 954–960. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.06.033.

Chaplan, S. R. *et al.* (1994) 'Quantitative assessment of tactile allodynia in the

rat paw', *Journal of Neuroscience Methods*, 53(1), pp. 55–63. doi: 10.1016/0165-0270(94)90144-9.

Cohen, S. P. and Mao, J. (2014) 'Neuropathic pain: Mechanisms and their clinical implications', *BMJ (Online)*, 348, pp. 1–12. doi: 10.1136/bmj.f7656.

D'Amico, D. and Tepper, S. J. (2008) 'Prophylaxis of migraine: General principles and patient acceptance', *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 4(6), pp. 1155–1167. doi: 10.2147/ndt.s3497.

Dallazen, J. L. *et al.* (2020) 'Pharmacological potential of alkylamides from *Acmella oleracea* flowers and synthetic isobutylalkyl amide to treat inflammatory pain', *Inflammopharmacology*, 28(1), pp. 175–186. doi: 10.1007/s10787-019-00601-9.

Danesch, U. and Rittinghausen, R. (2003) 'Safety of a patented special butterbur root extract for migraine prevention', *Headache*, 43(1), pp. 76–78. doi: 10.1046/j.1526-4610.2003.03015.x.

Daniel, O. and Mauskop, A. (2016) 'Nutraceuticals in Acute and Prophylactic Treatment of Migraine', *Current Treatment Options in Neurology*, 18(4), pp. 1–8. doi: 10.1007/s11940-016-0398-1.

Diener, H. C., Rahlfs, V. W. and Danesch, U. (2004) 'The first placebo-controlled trial of a special butterbur root extract for the prevention of migraine: Reanalysis of efficacy criteria', *European Neurology*, 51(2), pp. 89–97. doi: 10.1159/000076535.

Disch, L. *et al.* (2018) 'In Vitro and in Situ Absorption and Metabolism of Sesquiterpenes from *Petasites hybridus* Extracts', *Planta Medica*, 84(11), pp. 795–805. doi: 10.1055/s-0044-100401.

Dux, M. *et al.* (2016) 'Meningeal blood flow is controlled by H₂S-NO crosstalk activating a HNO-TRPA1-CGRP signalling pathway', *British Journal of Pharmacology*, 173(3), pp. 431–445. doi: 10.1111/bph.13164.

Edvinsson, L. (2015) 'CGRP receptor antagonists and antibodies against CGRP and its receptor in migraine treatment', *British Journal of Clinical Pharmacology*, 80(2), pp. 193–199. doi: 10.1111/bcp.12618.

Edvinsson, L. *et al.* (2018) 'CGRP as the target of new migraine therapies - Successful translation from bench to clinic', *Nature Reviews Neurology*, 14(6), pp. 338–350. doi: 10.1038/s41582-018-0003-1.

Evers, S. *et al.* (2009) 'EFNS guideline on the drug treatment of migraine -

Revised report of an EFNS task force', *European Journal of Neurology*, 16(9), pp. 968–981. doi: 10.1111/j.1468-1331.2009.02748.x.

Fiebich, B. L. *et al.* (2005) 'Petasites hybridus extracts in vitro inhibit COX-2 and PGE2 release by direct interaction with the enzyme and by preventing p42/44 MAP kinase activation in rat primary microglial cells', *Planta Medica*, 71(1), pp. 12–19. doi: 10.1055/s-2005-837744.

Goadsby, P. J. and Holland, P. R. (2019) 'An Update: Pathophysiology of Migraine', *Neurologic Clinics*, 37(4), pp. 651–671. doi: 10.1016/j.ncl.2019.07.008.

Grossmann, W. and Schmidramsl, H. (2001) 'An extract of Petasites hybridus is effective in the prophylaxis of migraine', *Alternative Medicine Review*, 6(3), pp. 303–310.

Ha, H. and Gonzalez, A. (2019) 'Migraine headache prophylaxis', *American Family Physician*, 99(1), pp. 17–24.

Haratym, W. and Weryszko-Chmielewska, E. (2012) 'The ecological features of flowers and inflorescences of two species of the genus Petasites Miller (Asteraceae)', *Acta Agrobotanica*, 65(2), pp. 37–46. doi: 10.5586/aa.2012.056.

Holland, S. *et al.* (2012) 'Evidence-based guideline update: NSAIDs and other complementary treatments for episodic migraine prevention in adults Report of the quality standards subcommittee of the american academy of neurology and the American headache society', *Neurology*, 78(17), pp. 1346–1353. doi: 10.1212/WNL.0b013e3182535d0c.

Horak, S. *et al.* (2009) 'Use-dependent block of voltage-gated Cav2.1 Ca²⁺ channels by petasins and eudesmol isomers', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 330(1), pp. 220–226. doi: 10.1124/jpet.109.151183.

Jensen, T. S. and Finnerup, N. B. (2014) 'Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: Clinical manifestations and mechanisms', *The Lancet Neurology*, 13(9), pp. 924–935. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70102-4.

Johnston, J. (2001) 'Petasites hybridus Monograph', *Alternative Medicine Review*, 6(2), pp. 207–209. Available at: <http://www.altmedrev.com/archive/publications/6/2/207.pdf>.

Kumar, A. and Kadian, R. (2020) 'Migraine prophylaxis', in *NCBI Bookshelf*. doi: 10.5694/j.1326-5377.2008.tb02028.x.

Lewis, R. W. *et al.* (2002) 'Recognition of Adverse and Nonadverse Effects in Toxicity Studies', *Toxicologic Pathology*, 30(1), pp. 66–74. doi:

10.1080/01926230252824725.

Lipton, R. B. *et al.* (2004) 'Petasites hybridus root (butterbur) is an effective preventive treatment for migraine', *Neurology*, 63(12), pp. 2240–2244. doi: 10.1212/01.WNL.0000147290.68260.11.

De Logu, F. *et al.* (2019) 'Migraine-provoking substances evoke periorbital allodynia in mice', *Journal of Headache and Pain*, 20(1), pp. 1–9. doi: 10.1186/s10194-019-0968-1.

Mihajilov-Krstev, T. *et al.* (2020) 'Phytochemistry, toxicology and therapeutic value of petasites hybridus subsp. Ochroleucus (common butterbur) from the Balkans', *Plants*, 9(6), pp. 1–14. doi: 10.3390/plants9060700.

Nair, A. and Jacob, S. (2016) 'A simple practice guide for dose conversion between animals and human', *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, 7(2), p. 27. doi: 10.4103/0976-0105.177703.

National Research Council (2011) *Guide for the care and use of laboratory animals*. Eighth, *National Research Council of the National Academies*. Eighth. Washington.

Nomura, E. C. O. *et al.* (2013) 'Antinociceptive effects of ethanolic extract from the flowers of *Acemella oleracea* (L.) R.K. Jansen in mice', *Journal of Ethnopharmacology*, 150(2), pp. 583–589. doi: 10.1016/j.jep.2013.09.007.

OECD (2002) 'Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method', *Oecd Guideline for Testing of Chemicals*, (December), pp. 1–14. doi: 10.1787/9789264071001-en.

Olesen, J. (2018) 'Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS) The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition', *Cephalalgia*, 38(1), pp. 1–211. doi: 10.1177/0333102417738202.

Olesen, J. and Ashina, M. (2019) 'Calcitonin gene-related peptide — beyond migraine prophylaxis', *Nature Reviews Neurology*, 15(10), pp. 562–564. doi: 10.1038/s41582-019-0258-1.

Pothmann, R. and Danesch, U. (2005) 'Migraine prevention in children and adolescents: Results of an open study with a special butterbur root extract', *Headache*, 45(3), pp. 196–203. doi: 10.1111/j.1526-4610.2005.05044.x.

Rainero, I. *et al.* (2020) 'Migraine pathways and the identification of novel therapeutic targets', *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 24(3), pp. 245–253. doi: 10.1080/14728222.2020.1728255.

Rajapakse, T. and Davenport, W. J. (2019) 'Phytomedicines in the Treatment of Migraine', *CNS Drugs*, 33(5), pp. 399–415. doi: 10.1007/s40263-018-0597-2.

Rodrigues, M. R. A. *et al.* (2012) 'Antinociceptive and anti-inflammatory potential of extract and isolated compounds from the leaves of *Salvia officinalis* in mice', *Journal of Ethnopharmacology*, 139(2), pp. 519–526. doi: 10.1016/j.jep.2011.11.042.

Russell, F. A. *et al.* (2014) 'Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology', *Physiological reviews*, 94(4), pp. 1099–1142. doi: 10.1152/physrev.00034.2013.

Samanta, A., Hughes, T. and Moiseenkova-Bell, V. (2018) 'HHS Public Access', *Subcell Biochem*, 87, pp. 141–165. doi: 10.1007/978-981-10-7757-9_6.

Sangermani, R. and Boncimino, A. (2017) 'The use of nutraceuticals in children's and adolescent's headache', *Neurological Sciences*, 38, pp. 121–124. doi: 10.1007/s10072-017-2896-7.

Schwedt, T. J. (2018) 'Preventive Therapy of Migraine', *CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology*, 24(4-Headache), pp. 1052–1065. doi: 10.1212/CON.0000000000000635.

Sneddon, L. U. (2018) 'Comparative physiology of nociception and pain', *Physiology*, 33(1), pp. 63–73. doi: 10.1152/physiol.00022.2017.

Soleimani, A. *et al.* (2015) 'High Cytotoxicity and Apoptotic Effects of Natural Bioactive Benzofuran Derivative on the MCF-7 Breast Cancer Cell Line', *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 18(5), pp. 505–513. doi: 10.2174/1386207318666150430114815.

Stovner, L. J. *et al.* (2018) 'Global, regional, and national burden of migraine and tension-type headache, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016', *The Lancet Neurology*, 17(11), pp. 954–976. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30322-3.

Sutherland, A. and Sweet, B. V. (2010) 'Butterbur: An alternative therapy for migraine prevention', *American Journal of Health-System Pharmacy*, 67(9), pp. 705–711. doi: 10.2146/ajhp090136.

Thomet, O. A. R. *et al.* (2001) 'Role of petasin in the potential anti-inflammatory activity of a plant extract of *Petasites hybridus*', *Biochemical Pharmacology*, 61(8), pp. 1041–1047. doi: 10.1016/S0006-2952(01)00552-4.

Thomet, O. A. R. and Simon, H. U. (2002) 'Petasins in the treatment of allergic

diseases: Results of preclinical and clinical studies', *International Archives of Allergy and Immunology*, 129(2), pp. 108–112. doi: 10.1159/000065884.

U.S. Department of Health and Human Services (2009) 'Chemical Information Review Document for Butterbur (*Petasites hybridus*, ext.) [CAS No. 90082-63-6]', in.

Utterback, G. *et al.* (2014) 'Butterbur extract: Prophylactic treatment for childhood migraines', *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 20(1), pp. 61–64. doi: 10.1016/j.ctcp.2012.04.003.

White, S. *et al.* (2014) 'Heat hyperalgesia and mechanical hypersensitivity induced by calcitonin gene-related peptide in a mouse model of neurofibromatosis', *PLoS ONE*, 9(9). doi: 10.1371/journal.pone.0106767.

Widyastuti, D. A., Ristianti, M. A. and Sari, I. M. (2019) 'The Study of Blood Creatinin and Urea Concentration of Wistar Rats (*Rattus norvegicus*) Due to Sodium Nitrite Induction', *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 17(1), p. 14. doi: 10.35814/jifi.v17i1.560.

Wildi, E. *et al.* (1998) 'Quantitative analysis of petasin and pyrrolizidine alkaloids in leaves and rhizomes of in situ grown *Petasites hybridus* plants', *Planta Medica*, 64(3), pp. 264–267. doi: 10.1055/s-2006-957422.

Yam, M. F. *et al.* (2018) 'General pathways of pain sensation and the major neurotransmitters involved in pain regulation', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8). doi: 10.3390/ijms19082164.

Yuan, H. and Silberstein, S. D. (2018) 'Histamine and Migraine', *Headache*, 58(1), pp. 184–193. doi: 10.1111/head.13164.