



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DA ATIVIDADE
ANTINOCICEPTIVA DAS FISALINAS**

MILENA DA SILVA LIMA

Salvador
2012

MILENA DA SILVA LIMA

**CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DA ATIVIDADE
ANTINOCICEPTIVA DAS FISALINAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Farmácia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia (UFBA) como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Dra. Cristiane Flora Villarreal

Salvador

2012

Sistema de Bibliotecas - UFBA

Lima, Milena da Silva.

Caracterização farmacológica da atividade antinociceptiva das fisalinas / Milena da Silva
Lima. - 2012.
70f.: il.

Orientadora: Profª Drª Cristiane Flora Villarreal.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Salvador, 2012.

1. Agentes antiinflamatórios. 2. Fisalinas - Efeito fisiológico. 3. Dor crônica - Tratamento.
4. Plantas medicinais. 5. Physalis angulata. 6. Sistema nervoso central - Efeito das drogas.
I. Villarreal, Cristiane Flora. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD - 615.75
CDU - 615.276



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

TERMO DE APROVAÇÃO

MILENA DA SILVA LIMA

CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DAS FISALINAS

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia (nível Mestrado Acadêmico) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmácia.

Aprovada em 29 de março de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Cristiane Flora Villarreal
Universidade Federal da Bahia
Orientadora

Dr. Eudes da Silva Vellozo
Universidade Federal da Bahia

Dr. Abrahão Baptista
Universidade Federal da Bahia

Apoio Financeiro:

FAPESB (bolsista nº 0269/10)

*Aos meus pais, Rita e Francisco, pelo exemplo de
vida, pelo apoio e pelos grandes ensinamentos. As
minhas irmãs, Fânia e Thalita, pelo carinho e pela
amizade.*

AGRADECIMENTOS

'Sonho que se sonha junto é realidade.' (Raul Seixas)

A DEUS, divino Mestre e condutor de nossas vidas.

À minha família pelas abdições para que eu pudesse ter uma boa formação. À minha mãe, Rita Maria da Silva Lima, pelas incansáveis orações. Ao meu pai, Francisco Santana de Lima, pela dedicação e por estar incondicionalmente disponível para atender minhas necessidades. Às minhas lindas irmãs, Fânia Lima e Thalita Lima, por serem minha grande alegria de viver. A vocês, minha eterna gratidão. Amo vocês!

A Everton Fernandes pelo companheirismo, pela paciência, pela compreensão, pela proteção e por ser um grande incentivador.

Aos animais que doaram suas vidas para a concretização desse trabalho.

À Professora Cristiane Flora Villarreal, minha orientadora, pela confiança, por acreditar no meu potencial e nesse trabalho, pelas discussões científicas e pelas palavras de incentivo.

À Dra Milena Botelho Pereira Soares pelo exemplo de pesquisadora, por me mostrar os desafios da pesquisa durante minha Iniciação Científica e por conceder o espaço do LETI, na Fiocruz, para que eu pudesse desenvolver experimentos.

À Dra Simone Macambira pelas conversas e pela incrível convivência.

À Fabiana Regina Nonato pelo espírito de auxílio, pelas idéias e pelo otimismo.

Ao Professor Frederico Guaré Cruz, do Instituto de Química, por me ensinar a dar os primeiros passos na Iniciação Científica e por desenvolver o meu amor pela Ciência.

Aos amigos do grupo da Dor, Flavielle Martins, Márcio Coutinho, Wagno Alcântara e Rebecca Imbrionise, pelos ensinamentos relacionados ao trabalho, mas, sobretudo, pelas dicas e carinho.

Às companheiras do Grupo da Dor, Flávia Lima e Gisele Leite, pelo apoio, pelas longas conversas e por me mostrarem que as coisas sempre terminam bem. A vocês, meninas, um agradecimento mais do que especial.

À Nanashara Carvalho por não medir esforços para me auxiliar, mesmo em horários e dias tão complicados. A você, Nana, uma gratidão sem medidas.

À Elisalva Teixeira Guimarães pelo ombro amigo desde sempre, pelas palavras de carinho e por compartilhar comigo seus conhecimentos.

À Marlene Cerqueira pela alegria e pelo grande auxílio no laboratório.

À Juliana Vasconcelos e Carla Kaneto pela ajuda na execução e interpretação de experimentos.

Aos demais amigos do LETI pela sempre divertida companhia.

À Lucyvera Imbrionise pela excelente execução das atividades administrativas do LETI e pela competência.

A toda a equipe do Biotério da Fiocruz pela competência e pela qualidade do trabalho desenvolvido.

Ao Leonardo, secretário da Coordenação da Pós Graduação, pela presteza.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Farmácia da UFBA pela preocupação com formação dos alunos e por dividir conhecimentos em prol do nosso crescimento profissional.

Aos amigos e colegas de Pós-Graduação, em especial, Vanessa Menezes e Humberto Freitas, amizados para toda a vida, por dividir angústias, alegrias e experiências, pelas longas e produtivas conversas.

Aos meus amigos, eternos IC's Sucesso, uma lembrança constante e feliz.

À Pós Graduação em Farmácia pela competência em conduzir o programa.

À Fapesb pelo apoio financeiro.

*“Cada um de nós compõe a sua história e
cada ser em si carrega o dom de ser capaz.*

E ser feliz.”

(Almir Sater e Renato Teixeira)

LIMA, Milena da Silva. Caracterização farmacológica da atividade antinociceptiva das fisalinas. 70f. il. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

RESUMO

Fisalinas são derivados esteroidais isolados da espécie *Physalis angulata* com diversas atividades biológicas já comprovadas. O objetivo desse trabalho foi investigar se as fisalinas possuem propriedade antinociceptiva e caracterizar essa atividade em modelos experimentais de dor. Os efeitos farmacológicos da mistura das fisalinas (“pool”) e das fisalinas purificadas B, G, D e F foram avaliados nos testes de contorções abdominais, formalina, hiperalgesia mecânica e edema de pata induzidos por adjuvante completo de Freund (CFA). O limiar nociceptivo foi avaliado por filamentos de von Frey e o edema em pletismômetro. Efeitos sobre o desempenho motor foram determinados pelos testes de rota rod e open field. A administração intraperitoneal da mistura de fisalinas (6,25-100 mg/kg) e das fisalinas isoladas (25-100mg/kg) produziu uma redução do número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos. No teste da formalina, a administração das fisalinas (25-100mg/kg/IP) inibiu apenas a fase tardia, indicando que a ação antiinflamatória já descrita das fisalinas poderia ser o responsável pelo efeito antinociceptivo. Confirmando a especificidade da ação sugerida pelos testes nociceptivos, as fisalinas (100mg/kg/IP) não induziram déficit motor nos testes de rota rod e open field. A seguir, para confirmar se a ação antiinflamatória das fisalinas é o principal determinante do efeito antinociceptivo, os efeitos das fisalinas em um clássico modelo de inflamação – a inflamação da pata induzida por CFA - foram avaliados. A mistura das fisalinas e a fisalina F (100mg/kg/IP) reduziram o edema, a hiperalgesia mecânica e a liberação local da citocina hiperalgésica TNF- α , induzidos por CFA. As fisalinas B, D e G na dose de 100 mg/kg não tiveram efeito antiinflamatório no teste do CFA, indicando que provavelmente para essas fisalinas a atividade antinociceptiva descrita aqui deve estar associada a outros mecanismos. O presente estudo demonstrou, pela primeira vez, que as fisalinas possuem um efeito antinociceptivo. De acordo com os dados apresentados aqui, é provável que, para a fisalina F, essa atividade esteja parcialmente relacionada à ação antiinflamatória e inibição de citocinas, enquanto que para as fisalinas B, D e G outros mecanismos devem estar envolvidos. O trabalho fornece suporte para a investigação do potencial terapêutico dessas substâncias para o controle da dor, embora novos estudos sejam necessários para melhor compreensão do mecanismo de ação das fisalinas.

Palavras - chave: Fisalinas, *Physalis angulata*, antinocicepção, dor inflamatória, citocinas

LIMA, Milena da Silva. Pharmacological characterization of the antinociceptive activity of physalins. 70f.il. Master Dissertation – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

ABSTRACT

Physalins steroidal derivatives are isolated from the specie *Physalis angulata* with several confirmed biological activities. The objective of this study was to investigate whether physalins have antinociceptive property and characterize this activity in experimental pain models. The pharmacological effects of the mixture of physalins (pool) and purified physalins B, G, D, and F were evaluated in the writhing and formalin tests, by mechanical hyperalgesia and paw oedema induced by complete Freund's adjuvant (CFA). The nociceptive threshold was evaluated by von Frey filaments and edema in plethysmometer. Effects on motor performance were determined by the rota rod and open field tests. Intraperitoneal administration of physalins mixture (6.25 - 100 mg/kg) and isolated physalins (25 - 100 mg/kg) produced a reduction of the number of writhings induced by acetic acid in mice. In the formalin test, the administration of physalins (25 - 100 mg/kg/IP) inhibited only the late phase, indicating that the anti-inflammatory action, already described, of the physalins could be responsible for the antinociceptive effect. Confirming the specificity of the action suggested by nociceptive tests, the physalins (100 mg/kg/IP) did not induce motor deficits in the rota rod and open field tests. Next, to confirm whether the anti-inflammatory action of the physalins is the main determinant of the analgesic effect, the effects of physalins in a classic inflammation model – the paw inflammation induced by CFA - were evaluated. The mixture of the physalins and physalin F (100 mg/kg/IP) reduced the oedema, mechanical hyperalgesia and local release of hyperalgesic cytokine TNF- α induced by CFA. Physalins B, D and G in the dosage of 100 mg/kg had no anti-inflammatory effect on the CFA test, indicating probably that to these physalins the antinociceptive activity, described here, must be associated with other mechanisms. The current study demonstrates for the first time that the physalins have an antinociceptive effect. According to data presented here, it is likely that for physalin F, this activity is partially related to an anti-inflammatory action and cytokine inhibition, whereas for the physalins B, D and G other mechanisms may be involved. The work provides support to investigation of the therapeutic potential of these substances for pain control, although further studies are needed to better understand the mechanism of action of physalins.

Keywords: Physalins, *Physalis angulata*, antinociception, inflammatory pain, cytokines

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINES	Antiinflamatórios Não Esteroidais
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina Tri-Fosfato
CCD	Cromatografia Camada Delgada
COX	Ciclooxigenase
CPqGM	Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
ELISA	Ensaio Imunoenzimático (do inglês, <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>)
E.P.M.	Erro padrão da média
GC	Glicocorticóide
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor (do inglês, <i>International Association of the Study of Pain</i>)
IL -2	Interleucina 2
IL-1 β	Interleucina1 beta
IL-7	Interleucina 7
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IL-4	Interleucina 4
IV	Intravenoso
IP	Intraperitoneal
NGF	Fator de Crescimento Neural
NFkB	Fator de Transcrição Nuclear kB
NO	Oxido Nítrico
PBS	Tampão Fosfato Salina (do inglês, <i>Phosphate buffered saline</i>)
PG	Prostaglandina
RPM	Rotações por minuto
SC	Via Subcutânea
SNC	Sistema Nervoso Central
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- alfa (do inglês, <i>tumor necrosis factor- α</i>)
RNA _m	Acido ribonucléico mensageiro (Messenger Ribonucleic acid)
TGF- β	Fator de Crescimento Transformante beta (Transforming growth factor- β)
VF	von Frey

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
\pm	Mais ou Menos
$^{\circ}\text{C}$	Grau centígrado
g	Gramas
μL	Microlitro
mg/kg	Miligramas por quilograma
mL	mililitro
pg/mL	Picograma por mililitro
ng/mL	Nanograma por mililitro
v/v	Volume/volume

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Gráfico da velocidade de condução do estímulo nociceptivo nas fibras aferentes primárias.	21
Figura 2: Esquema do Sistema Nociceptivo.	22
Figura 3: Estrutura Química das Fisalinas B, D, F e G.	27
Figura 4: Teste de contorções abdominais em modelo murino experimental.	33
Figura 5: Animais colocados em funis de vidro para observação do comportamento nociceptivo.	34
Figura 6: Teste da formalina em modelo murino experimental.	34
Figura 7: Teste de rota rod em camundongos.	35
Figura 8: Teste do Open Field.	36
Figura 9: Ambiente de experimentação para avaliação do limiar nociceptivo mecânico.	38
Figura 10: Equipamento Plestismômetro. Medida do edema de pata em camundongos.	39
Figura 11: Efeito antinociceptivo da administração intraperitoneal da mistura de fisalinas no teste de contorções abdominais. Camundongos foram tratados com a mistura de fisalinas (6,25-100 mg/kg) ou veículo (CTRL - DMSO 5%+ Tween 20 5%/ salina, grupo controle) por via intraperitoneal 40 minutos antes da injeção de ácido acético. A indometacina (INDO 10 mg/kg/IP) foi o fármaco utilizado como padrão ouro. Os dados foram representados como média ± E.P.M de seis camundongos por grupo. * significância estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), como determinado pelo teste de ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey.	42
Figura 12: Efeito antinociceptivo da administração intraperitoneal das fisalinas B, D, G ou F no modelo de contorções abdominais. Camundongos foram tratados com as fisalinas B (Painel A), D (Painel B), G (Painel C) ou F (Painel D) nas doses de 25 a 100 mg/kg por via intraperitoneal 40 minutos antes da injeção de ácido acético. A indometacina (INDO 10 mg/kg/IP) foi o fármaco utilizado como padrão ouro. O grupo controle recebeu veículo (CTRL - DMSO 5%+ Tween 20 5%/ salina) por via intraperitoneal 40 minutos antes da injeção de ácido acético. Os dados foram representados como média ± E.P.M de seis camundongos por grupo. * significância estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), como determinado pelo teste de ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey.	43
Figura 13: Efeito antinociceptivo da mistura de fisalinas no teste da formalina. Camundongos tratados com a mistura de fisalinas (25, 50 e 100 mg/kg) ou veículo (CTRL) por via intraperitoneal 40 minutos antes da injeção intraplantar de formalina. Indometacina (INDO 10 mg/kg/IP) foi a droga referência. Os dados foram representados como média ± E.P.M de seis animais por grupo. * significância estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), como determinado pelo teste de ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey.	44

- Figura 14: Efeito antinociceptivo das fisalinas B e D no teste da formalina. Camundongos tratados com as fisalinas B (Painel A) e D (Painel B) ou veículo (CTRL - DMSO 5%+ Tween 20 5%/ salina, grupo controle) por via intraperitoneal 40 minutos antes da injeção de formalina. Indometacina (INDO 10 mg/kg/ IP) foi a droga referência. Os dados foram representados como média \pm E.P.M de seis animais por grupo. * significância estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), como determinado pelo teste de ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey.45
- Figura 15: Efeito antinociceptivo das fisalinas G e F no teste da formalina. Camundongos tratados com as fisalinas G (Painel A) e F (Painel B) ou veículo (CTRL - DMSO 5%+ Tween 20 5%/ salina, grupo controle) por via intraperitoneal 40 minutos antes da injeção de formalina. Indometacina (INDO 10 mg/kg/ IP) foi a droga referência. Os dados foram representados como média \pm E.P.M de seis animais por grupo. * significância estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), como determinado pelo teste de ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey.46
- Figura 16: Efeito das fisalinas no desempenho motor dos camundongos no teste de rota rod. (A) Animais tratados com a mistura das fisalinas (150 mg/kg) por via intraperitoneal 40 minutos antes da exposição ao aparelho de rota rod. (B) Animais tratados com as fisalinas purificadas B, D, G ou F (100 mg/kg) por via intraperitoneal 40 minutos antes da exposição ao aparelho de rota rod. Diazepam (DZP) (10 mg/kg/IP) foi utilizado como droga referência. O grupo controle foi tratado com veículo (DMSO 5%+ Tween 20 5%/ salina - CTRL). Dados foram expressos como a média do tempo de permanência em segundos no rota rod ($m \pm$ E.P.M de seis animais por grupo). * significância estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), como determinado pelo teste de ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey.47
- Figura 17: Efeito das fisalinas na atividade locomotora dos camundongos no teste do open field. (A) Animais tratados com a mistura das fisalinas (150 mg/kg) por via intraperitoneal 40 minutos antes da exposição ao aparato do open Field. (B) Animais tratados com as fisalinas purificadas B, G, D ou F (100 mg/kg) tratados por via intraperitoneal 40 minutos antes da exposição ao aparato do open field. Diazepam (DZP) (10 mg/kg/IP) 30 minutos antes do teste foi utilizado como droga referência. O grupo controle foi tratado com veículo (DMSO 5%+ Tween 20 5%/ salina – CTRL). Dados foram expressos como a média do número de quadrados atravessados no open field ($m \pm$ E.P.M de seis animais por grupo). * significância estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), como determinado pelo teste de ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey.48
- Figura 18: Efeito da mistura de fisalinas no edema de pata induzido por CFA. A mistura de fisalinas (25, 50 e 100 mg/kg) ou veículo (CTRL - DMSO 5%+ Tween 20 5%/ salina, grupo controle) foram administrados por via intraperitoneal 40 minutos antes da injeção do CFA (registro inicial). Dexametasona (DEXA - 0,7 mg/kg/SC), quatro horas antes da injeção do CFA foi utilizado como droga referência. O edema foi medido nos

tempos de 02, 04, 06 e 24 horas. Dados expressos como \pm E.P.M de seis animais por grupo. * significância estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), como determinado no teste ANOVA de duas vias, seguido do pós teste de Bonferroni.49

Figura 19: Efeito das fisalinas no edema de pata induzido por CFA. As fisalinas D, B e G (100 mg/kg e ou veículo (CTRL - DMSO 5%+ Tween 20 5%/salina, grupo controle) foram administrados por via intraperitoneal 40 minutos antes da injeção do CFA (registro inicial). Dexametasona (DEXA - 0,7 mg/kg/SC), quatro horas antes da injeção do CFA foi utilizado como droga referência. O edema foi medido nos tempos de 02, 04 e 06 horas. Dados expressos como média \pm E.P.M de seis animais por grupo. * significância estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), como determinado no teste ANOVA de duas vias, seguido do pós teste de Bonferroni.....49

Figura 20: Efeito da fisalina F no edema de pata induzido por CFA. A fisalina F (50 e 100 mg/kg) ou veículo (CTRL - DMSO 5%+ Tween 20 5%/salina, grupo controle) foram administrados por via intraperitoneal 40 minutos antes da injeção do CFA (registro inicial). Dexametasona (DEXA - 0,7 mg/kg/SC), quatro horas antes da injeção do CFA foi utilizado como droga referência. O edema foi medido nos tempos de 02, 04, 06 e 24 horas. Dados expressos como \pm E.P.M de seis animais por grupo. * significância estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), como determinado no teste ANOVA de duas vias, seguido do pós teste de Bonferroni.50

Figura 21: Efeito da mistura de fisalinas na hiperalgesia induzida pelo CFA. A mistura de fisalinas (25, 50 e 100 mg/kg) ou veículo (CTRL - DMSO 5%+ Tween 20 5%/salina, grupo controle) foram administrados por via intraperitoneal 40 minutos antes da injeção do CFA (registro inicial). Dexametasona (DEXA - 0,7 mg/kg/SC), quatro horas antes da injeção do CFA foi utilizado como droga referência. A hiperalgesia foi medida nos tempos de 02 e 04 horas. Dados expressos como \pm E.P.M de seis animais por grupo. * significância estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), como determinado no teste ANOVA de duas vias, seguido do pós teste de Bonferroni.51

Figura 22: Efeito das fisalinas na hiperalgesia induzida pelo CFA. As fisalinas B, G e D (100 mg/kg) e ou veículo (CTRL - DMSO 5%+ Tween 20 5%/salina, grupo controle) foram administrados por via intraperitoneal 40 minutos antes da injeção do CFA (registro inicial). Dexametasona (DEXA - 0,7 mg/kg/SC), quatro horas antes da injeção do CFA foi utilizado como droga referência. A hiperalgesia foi medida nos tempos de 02 e 04 horas. Dados expressos como média \pm E.P.M de seis animais por grupo. * significância estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), como determinado no teste ANOVA de duas vias, seguido do pós teste de Bonferroni.51

Figura 23: Efeito da fisalina F na hiperalgesia induzida pelo CFA. A fisalina F (50 e 100 mg/kg) e ou veículo (CTRL - DMSO 5%+ Tween 20 5%/salina, grupo controle) foram administrados por via intraperitoneal 40 minutos antes da injeção do CFA (registro inicial). Dexametasona

(DEXA - 0,7 mg/kg/SC), quatro horas antes da injeção do CFA foi utilizado como droga referência. A hiperalgesia foi medida nos tempos de 02 e 04 horas. Dados expressos como média \pm E.P.M de seis animais por grupo. * significância estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), como determinado no teste ANOVA de duas vias, seguido do pós teste de Bonferroni.52

Figura 24: Efeito das fisalinas sobre na produção local de citocinas hiperalgésicas. A figura representa os níveis de TNF $-\alpha$ (A) e de IL-1 β (B) na pata inflamada medidos 02 horas após a injeção de CFA (registro inicial). A mistura de fisalinas (*Pool*) e a fisalina F (100 mg/kg) ou veículo (CTRL - DMSO 5%+ Tween 20 5%/ salina, grupo controle) foram administrados 40 minutos antes da injeção do CFA. Dados foram expressos como média \pm E.P.M. de 6 camundongos por grupo. * significância estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), como determinado pelo teste de ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey.53

Figura 25: Efeito das fisalinas na expressão gênica de mediadores hiperalgésicos TNF $-\alpha$ e IL-1 β . A expressão gênica de TNF $-\alpha$ (A) e IL-1 β (B) na pata inflamada medidos 02 horas após a injeção de CFA (registro inicial). A mistura de fisalinas (*Pool*) e a fisalina F (100 mg/kg) ou veículo (CTRL - DMSO 5%+ Tween 20 5%/ salina, grupo controle) foram administrados 40 minutos antes da injeção do CFA. Dados foram expressos como média \pm E.P.M. de seis camundongos por grupo. * significância estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), como determinado pelo teste de ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey.54

Figura 26: Efeito das fisalinas na expressão gênica de mediadores hiperalgésicos IL-6 e IL-10. A expressão gênica de IL-6 (A) e IL-10 (B) na pata inflamada medidos 02 horas após a injeção de CFA (registro inicial). A mistura de fisalinas (*Pool*) e a fisalina F (100 mg/kg) ou veículo (CTRL - DMSO 5%+ Tween 20 5%/ salina, grupo controle) foram administrados 40 minutos antes da injeção do CFA. Dados foram expressos como média \pm E.P.M. de seis camundongos por grupo. * significância estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), como determinado pelo teste de ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey.54

Figura 27: Efeito das fisalinas na expressão gênica de COX-2. A expressão gênica de COX na pata inflamada medidos 02 horas após a injeção de CFA (registro inicial). A mistura de fisalinas (*Pool*) e a fisalina F (100 mg/kg) ou veículo (CTRL - DMSO 5%+ Tween 20 5%/ salina, grupo controle) foram administrados 40 minutos antes da injeção do CFA. Dados foram expressos como média \pm E.P.M. de seis camundongos por grupo. * significância estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), como determinado pelo teste de ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey.55

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 DOR	19
1.2 DOR INFLAMATÓRIA	23
1.3 CONTROLE FARMACOLÓGICO DA DOR	24
1.4 PRODUTOS NATURAIS E FISALINAS.....	25
2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO	29
3. OBJETIVOS	30
3.1 OBJETIVO GERAL	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4. METODOLOGIA	31
4.1 ANIMAIS.....	31
4.2 DROGAS, DILUENTES E VIAS DE ADMINISTRAÇÃO.....	31
4.3 OBTENÇÃO DAS FISALINAS.....	31
4.4 CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS PELO ÁCIDO ACÉTICO.....	32
4.5 TESTE DA FORMALINA	33
4.6 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MOTORA NO TESTE DE ROTA-ROD	35
4.7 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MOTORA NO TESTE DE OPEN- FIELD (CAMPO ABERTO).....	36
4.8 MODELO DE DOR INFLAMATÓRIA INDUZIDA PELO ADJUVANTE COMPLETO DE FREUND (CFA).....	37
4.9 AVALIAÇÃO DE LIMIAR NOCICEPTIVO MECÂNICO: FILAMENTOS DE VON FREY.....	37
4.10 MENSURAÇÃO DE EDEMA DE PATA: PLETISMÔMETRO	38
4.11 ELISA	39
4.12 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) EM TEMPO REAL.....	40
4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
5 RESULTADOS	42
5.1 EFEITO DAS FISALINAS NO TESTE DE CONTORÇÕES ABDOMINAIS	42
5.2 EFEITO DAS FISALINAS NO TESTE DA FORMALINA	44
5.3 INVESTIGAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA ADMINISTRAÇÃO DAS FISALINAS NA COORDENAÇÃO E DESEMPENHO MOTOR DOS CAMUNDONGOS	47
5.4 EFEITO DAS FISALINAS NO MODELO DE EDEMA DE PATA INDUZIDO PELO ADJUVANTE COMPLETO DE FREUND (CFA)	48
5.5 EFEITO DAS FISALINAS NA HIPERALGESIA INDUZIDA PELO CFA	50
5.6 EFEITO DAS FISALINAS SOBRE NA PRODUÇÃO LOCAL DE CITOCINAS HIPERALGÉSICAS.....	52
5.7 EFEITO DAS FISALINAS NA EXPRESSÃO GÊNICA DE MEDIADORES HIPERALGÉSICOS	53

6. DISCUSSÃO	56
7. CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS.....	63

1. INTRODUÇÃO

1.1 DOR

A dor é considerada o sintoma principal em diferentes doenças, sendo um importante fator que limita a qualidade de vida das pessoas (KIPEL, 2004; YUE et al., 2007; STRASSELS et al., 2008). Quando se cronifica, a dor deixa de ser um sintoma e passa a ser a doença em si, trazendo grandes prejuízos sociais e econômicos. Atualmente, apesar da subnotificação, do uso indiscriminado de medicamentos e, até mesmo, das falhas no diagnóstico, estima-se que em diversos países, inclusive no Brasil, de 10% a 50% das pessoas procuram os serviços de saúde, queixando-se de dor (ROCHA et al., 2007). Nesse contexto, estudo de BONICA em 2010, mostrou que a ocorrência de dor aguda nos Estados Unidos e em outros países é de 15 a 20% e, para a dor crônica, esse percentual aumenta para 25% a 30%. Dados, também atuais, registraram, em estudo com a população de Salvador-BA, que 41,4% dos indivíduos sofrem de dor crônica (SÁ, 2009), o que coloca essa cidade entre as mais prevalentes do mundo.

O termo “dor” tem origem no latim *dolor*, sofrimento. Deriva das palavras *paine*, do grego e *poena*, do latim, que significam punição ou pena (MENESCAL - OLIVEIRA, 2008; BONICA, 2010). Essas definições se justificam no fato das civilizações antigas compreenderem a dor como um evento atribuído a forças sobrenaturais que penalizavam aqueles que cometiam pecados (TEIXEIRA E OKADA, 2001). Egípcios e babilônios compreendiam a dor como uma influência divina ou dos espíritos dos mortos (MENESCAL - OLIVEIRA, 2008). Escritos da Índia descrevem a dor como uma frustração dos deuses e, dessa forma, um evento emocional advindo da alma (DIAS, 2009). Contudo, a evolução do conceito de dor ocorreu a partir da concepção feita inicialmente por Alcmaeon (535-?), discípulo de Pitágoras, de que o cérebro seria o órgão mais importante na percepção das sensações de dor. Contribuições aos estudos iniciados pelo anatomista Galeno (130-201), apoiadas, posteriormente, pelo filósofo René Descartes (1596-1650) consideraram a idéia de que o cérebro, de fato, seria a sede das sensações dolorosas e, assim, houve a introdução do conceito de reflexo nervoso e a concepção de dor como um aspecto sensorial. No início do século XX, a definição

da dor, elaborada pelo fisiologista Charles Sherrington (1857-1952), propôs que “o reflexo de proteção seria o complemento físico da dor” (MENESCAL - OLIVEIRA, 2008). Esse conceito, no entanto, vem sofrendo modificações à medida que avança o conhecimento sobre a dor. O interesse dos estudiosos para a compreensão e controle da dor levou ao surgimento, em 1973, da International Association for Study of Pain (IASP). A IASP define a dor como ‘uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tais danos’. Portanto, o fenômeno doloroso, caracterizado como experiência, envolve dimensões distintas: o evento do sofrimento, ou seja, a sensação original somada às reações que ela provoca, associado a uma sensação específica, assistida por estruturas neurofisiológicas particulares (GUNSTEIN et al., 2006).

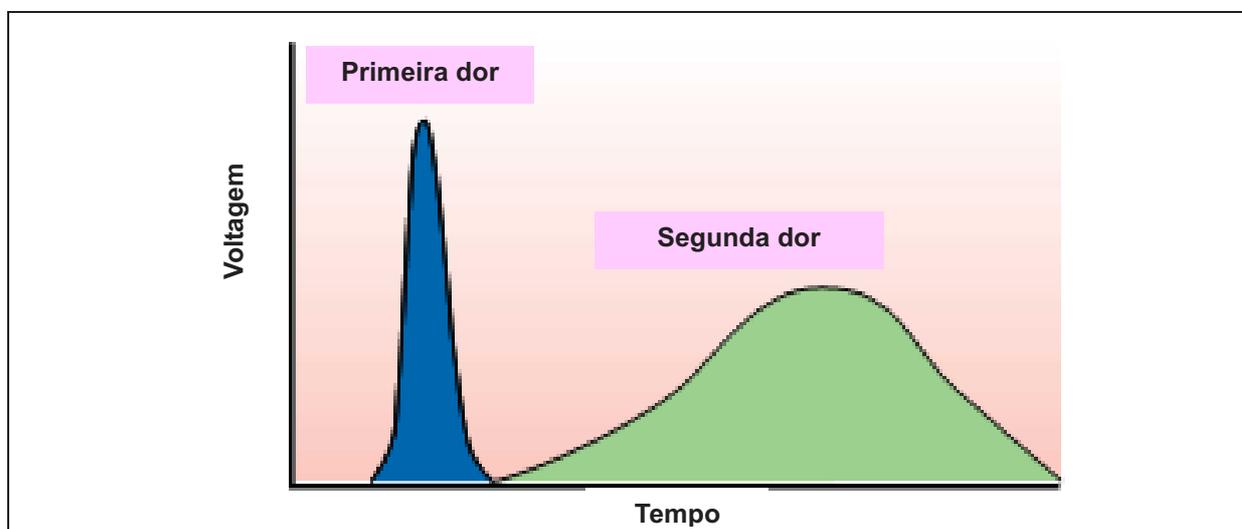
Dessa forma, a interpretação da dor caracteriza-se como um evento que envolve tanto a transdução dos estímulos nocivos e prejudiciais, quanto o processamento emocional pelo encéfalo (JULIUS E BASBAUM, 2001). Sendo assim, a dor é constituída de dois componentes: um componente emocional ou psicológico, definido como afetivo-motivacional; e outro fisiológico ou sensorial, dito sensorial-discriminativo. O componente emocional é responsável pela construção de memória e aprendizagem associada ao evento de dor (CALVINO E GRILO, 2006; VITOR et al., 2008). O componente sensorial corresponde aos mecanismos envolvidos na ativação de uma cascata de alterações no sistema somático-sensorial transmitido ao sistema nervoso central (SNC) após estímulos químicos, mecânicos e/ou térmicos que permitem determinar, por exemplo, a localização e a intensidade do estímulo que provocou a dor. (BASBAUM E WOOLF, 1999; DAHL et al., 2004; CALVINO E GRILO, 2006; VITOR et al., 2008). Além desses, há a concepção de uma dimensão cognitivo-comportamental, relacionada à compreensão de experiência dolorosa de acordo com experiências passadas, sintomas, processos biológicos e socioculturais que buscam o ajuste entre o indivíduo e seu ambiente.

De acordo com esses conceitos, dor e nocicepção não são definições sinônimas. Nocicepção se refere ao mecanismo pelo qual o estímulo tecidual - mecânico, térmico ou químico - excitando fibras nervosas, dá início ao processo que conduz a informação nociceptiva ao Sistema Nervoso Central (SNC) (LOESER, 1975 apud PERISSINOTI, 2002). Por outro lado, a dor envolve a percepção de um estímulo aversivo e exige a capacidade de abstração e elaboração de impulsos sensoriais (ALMEIDA et al., 2004). Considerando que a identificação da dor em

animais não é óbvia, termos como dor e analgesia devem ser restritos aos seres humanos, cabendo aos métodos experimentais a avaliação única e exclusiva da nocicepção (JONES, 1992 apud SOUZA, 2008).

A atividade nociceptiva é causada por estimulação dos receptores nociceptivos (nociceptores) e transmitida ao longo de vias neurais (GUNSTEIN et al., 2006). Os nociceptores, que são as terminações nervosas livres das fibras aferentes primárias, são caracterizados dependendo da localização e da capacidade de resposta a diferentes estímulos (DAHL et al., 2004). Estão amplamente distribuídos na pele, vasos, músculos, articulações e vísceras (JULIUS e BASBAUM, 2001). Após ativação dos nociceptores, a informação de dor é conduzida nas fibras aferentes primárias que transmitem o estímulo para o SNC, no corno dorsal da medula espinal. As fibras aferentes primárias nociceptivas, A δ e C, diferenciam-se pela presença ou ausência de mielina e pelos distintos calibres, respectivamente (ROCHA et al., 2007). Os nociceptores ligados às fibras mielinizadas A δ são especializados na detecção de injúrias mecânicas e térmicas, traduzidas em uma rápida resposta à dor, por possuírem maior velocidade de condução. Os nociceptores ligados às fibras aferentes C, não mielinizadas, são importantes na resposta aos estímulos mecânicos e térmicos intensos e aos estímulos químicos, com condução mais lenta (DAHL et al., 2004; MENESCAL - OLIVEIRA, 2008). Dessa forma, as fibras A δ e C são responsáveis pela “first pain” (primeira fase da dor) e “second pain” (segunda fase da dor) (DAHL et al., 2004), respectivamente, como ilustrado na Figura 1.

Figura 1: Gráfico da velocidade de condução do estímulo nociceptivo nas fibras aferentes primárias.



Fonte: modificado de JULIUS et al, 2001.

Após ativação do nociceptor pelo estímulo nocivo, o estímulo inicial é transformado em potenciais de ação que se propagam, através das conexões sinápticas com neurônios secundários na substância cinzenta do corno dorsal da medula espinal. De modo abrangente, pode-se considerar que o mecanismo envolvido na dor compreende três fases: a transdução, que constitui a ativação dos nociceptores por converter o estímulo nocivo em potenciais de ação; a transmissão, que é o conjunto de eventos que permitem que o impulso nocivo seja conduzido para o SNC; e modulação, que se refere aos mecanismos e vias responsáveis pela inibição ou facilitação da dor (PORTO, 2004) (Figura 2). A projeção de axônios dos neurônios do corno dorsal forma os tratos ascendentes de condução da dor que levam a informação sensorial para os centros encefálicos superiores, chegando aos neurônios terciários, que se projetam ao córtex cerebral (MILLAN, 1999; SCHAIBLE et al., 2004) onde a informação de dor é percebida.

Figura 2: Esquema do Sistema Nociceptivo.



Fonte: modificado Dor on Line, 2011

O fenômeno doloroso quanto à duração pode ser transitório, agudo ou crônico. No primeiro caso, denominada dor nociceptiva ou fisiológica, não há qualquer dano tecidual e a dor decorre da ativação de nociceptores e desaparece com o fim do estímulo. Esse tipo de dor funciona como um mecanismo protetor de alerta contra dano iminente (SCHAIBLE e RICHTER 2004; MENESCAL - OLIVEIRA, 2008). Em outras situações, a dor perde sua função de sistema de alarme e passa a adquirir características patológicas. Nesses casos, ocorre lesão e a ativação dos

nociceptores é feita no sítio lesionado. Nessas condições, a dor pode cessar quando há resolução da lesão inicial (dor aguda); ou se perpetuar por fatores que não são os causadores, envolvendo plasticidade neuronal e sensibilização das vias de condução e processamento da dor (dor crônica) (MILLAN, 1999). Em adição, a dor crônica pode ocorrer na ausência de dano evidente e se perpetuar por meses ou anos (MENESCAL - OLIVEIRA, 2008; KLAUMAN et al., 2008; APKARIAN e BALIKI et al., 2009). Tanto na dor aguda quanto na dor crônica, pode ocorrer dor espontânea, uma exacerbação na resposta ao estímulo nocivo (hiperalgesia) ou ainda dor induzida por estímulo inócua (alodinia) (SCHAIBLE e RICHTER 2004; KLAUMAN et al., 2008).

1.2 DOR INFLAMATÓRIA

A dor pode também ser classificada de acordo com a origem em dor inflamatória e dor neuropática. A dor inflamatória está presente em muitas doenças de duração transitória ou em processos crônicos, podendo resultar em limitações à rotina do indivíduo (DUBNER e RUDA 1992). A ocorrência da dor inflamatória está associada ao processo de sensibilização periférica, em que, após uma lesão tecidual ou inflamação, há a liberação de substâncias endógenas, responsáveis pela ativação direta ou pela sensibilização dos nociceptores (CUNHA et al., 2005). Essa sensibilização leva aos fenômenos de alodinia, hiperalgesia e dor espontânea, descritos acima, frequentemente associados a condições inflamatórias (SCHAIBLE e RICHTER, 2004).

Nos processos inflamatórios, as células lesadas e as células inflamatórias liberam mediadores químicos, denominados algio gênicos (ROCHA et al., 2007), incluindo prótons H⁺ e K⁺, bradicinina, histamina, ATP (adenosina tri-fosfato), óxido nítrico (NO), serotonina (5-HT), substância P (KIDD, 2001), interleucinas (IL) e fator de necrose tumoral (TNF) (ROCHA et al., 2007; MENESCAL - OLIVEIRA, 2008). Em sequência, ocorre a indução da via do ácido araquidônico e produção dos mediadores finais da dor inflamatória: as prostaglandinas. Uma vez liberados, esses mediadores químicos contribuirão para uma modificação fenotípica na fibra aferente primária, através da ativação de cascatas de segundos mensageiros, enzimas e proteínas, o que reduzirá o limiar de resposta dessa fibra, aumentará a frequência de

potenciais de ação e a atividade espontânea dos nociceptores. Esse contexto resulta em maior excitabilidade neuronal, facilitação da transmissão nociceptiva e manutenção da dor (BASBAUM, 1999; SCHAIBLE e RICHTER, 2004).

1.3 CONTROLE FARMACOLÓGICO DA DOR

Os medicamentos atualmente utilizados no controle da dor constituem principalmente os analgésicos opióides, antiinflamatórios não esteroidais (AINES), anestésicos locais, glicocorticóides, anticonvulsivantes e antidepressivos tricíclicos. A dor aguda intensa, em geral, responde satisfatoriamente aos analgésicos opióides (GUNSTEIN et al., 2006). Entretanto, embora o uso clínico dos opióides se deva principalmente às suas propriedades analgésicas, eles produzem uma série de efeitos indesejados sobre o hipotálamo, sistema endócrino, trato gastrointestinal, trato biliar, sistema cardiovascular e, sobretudo, freqüentemente estão associados a fenômenos de tolerância e dependência física (GUNSTEIN et al., 2006). Do mesmo modo, AINES apresentam efeitos colaterais freqüentes, associados a danos no trato gastrointestinal e desordens renais (ROBERT, 1976; PESKAR, 1977; RAINSFORD, 2007).

Como a dor crônica é um fenômeno complexo, associado a alterações de plasticidade e funcionamento do SNC, é, muitas vezes, resistente aos analgésicos eficazes na dor aguda. Na dor crônica, o efeito dessas substâncias é freqüentemente limitado, com crescente nível de efeitos colaterais causados por doses elevadas. De fato, os anticonvulsivantes e antidepressivos somente aliviam a dor já estabelecida e são eficazes em menos de 50% dos pacientes (McQUAY et al., 1996). Além disso, a maioria das terapias farmacológicas para a dor é administrada sistemicamente, quer através da via enteral ou parenteral, e exercem seus efeitos sobre uma multiplicidade de órgãos e estruturas do corpo, independentemente do seu envolvimento em vias de dor crônica (RAINOV et al., 2007).

O controle farmacológico da dor inflamatória é feito principalmente pelos antiinflamatórios esteroidais e não esteroidais (CASHMAN, 1996). Os AINES têm seu efeito por impedir a continuidade da via do ácido araquidônico por inibição das isoformas das enzimas ciclooxigenases, a constitutiva (COX-1) e a induzível (COX-2) (ROBERT, 1976; PESKAR, 1977; GOODMAN E GILMAN, 2006). A COX é a

enzima responsável pela metabolização do ácido araquidônico a prostaglandinas, como a prostaglandina E2 (PGE2), mediador relevante na indução da dor inflamatória (TAPIERO et al., 2002; NONATO et al., 2009; CHOPADE e MULLA, 2010). Como as prostaglandinas são também citoprotetoras, um longo período de utilização dos AINES pode desencadear o aparecimento de úlceras gastrointestinais, desordens renais, entre outros efeitos decorrentes de uma inibição não seletiva (GOODMAN E GILMAN, 2006). Por outro lado, inibidores seletivos para COX-2, os coxibes, possuem menos efeitos adversos no trato gastrointestinal, porém, estão associados a riscos cardiovasculares. Os glicocorticóides, antiinflamatórios esteroidais, também têm sido utilizados no controle da dor inflamatória, embora em menor escala em função da ampla gama de efeitos indesejados associados a essa classe.

Diante do exposto acima, considerando os efeitos indesejados e a carência de fármacos mais seletivos e eficazes, entende-se que o estudo de novas opções farmacológicas para o controle da dor torna-se de extrema relevância.

1.4 PRODUTOS NATURAIS E FISALINAS

O uso de plantas como fonte de medicamentos para o tratamento de enfermidades é descrito desde os tempos mais remotos (CALIXTO, 2001). Dada a contribuição da medicina popular, essas utilizações têm sido cada vez investigadas em todo o mundo.

O valor dos produtos naturais, especialmente os extraídos de plantas, para a sociedade e para a economia mundial é bastante significativo. As propriedades terapêuticas de produtos naturais têm fornecido subsídios para a pesquisa da atividade biológica de extratos ou frações de produtos de origem vegetal utilizados como medicamentos populares (ROSSI-BERGMANN et al., 1997). A busca por plantas e moléculas bioativas tem crescido juntamente com o entendimento da biologia molecular e química medicinal, tornando-se uma ferramenta importante para a descoberta de substâncias e derivados cada vez mais potentes.

O uso dos produtos naturais tem se expandido, sobretudo em função da pressão das indústrias farmacêuticas pela seleção de moléculas bioativas ou protótipos para desenhos de novos medicamentos (CALIXTO, 2001). Isso, porque,

moléculas com atividade biológica podem ser utilizadas como ferramentas para o desenvolvimento de medicamentos sintéticos ou semi-sintéticos. Estima-se que em cada quatro fármacos da terapêutica atual foi obtido ou desenvolvido a partir de substâncias isoladas de plantas (SANT'ANA, 2002).

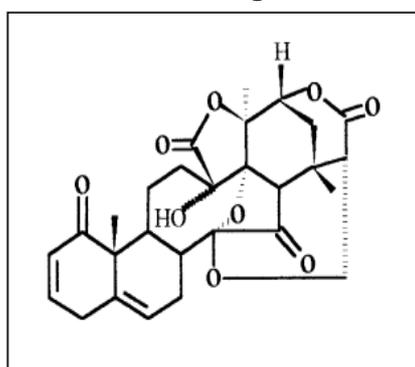
Ao longo do avanço da ciência e dos conhecimentos acerca dos produtos naturais, diversas plantas utilizadas na medicina popular tiveram suas propriedades analgésicas e antiinflamatórias validadas por estudos científicos. Dentre os AINES, têm-se destaque os salicilatos, produtos naturais que contêm precursores do ácido salicílico, presente na casca do salgueiro, por exemplo. Podem-se citar ainda outras plantas já reconhecidas com propriedades analgésicas, como a “arnica brasileira” (*Lychnophora ericoides*) (LOPES, 2003) e a “jalapa” (*Mandevilla velutina*) (MATOS et al., 2006). Com ação antiinflamatória, podem-se citar a *Curcuma zedoaria* (NAVARRO et al. 2002) e a *Bryophillum calycinum* (SOUZA et al., 2005). Em posse dessas informações, vários grupos de pesquisas têm se preocupado com o seguimento desses estudos, visando a perspectiva planejamento de novos fitoterápicos e fármacos, transformando esse conhecimento em produtos no mercado como alternativas terapêuticas para o controle da dor e inflamação, como é o caso, por exemplo, do Acheflan[®], obtido a partir da *Cordia verbenaceae*.

As substâncias avaliadas no presente estudo foram obtidas da *Physalis angulata*, pertencente ao gênero *Physalis*. O gênero *Physalis* compreende cerca de cento e vinte espécies com caracteres herbáceos e hábitos perenes. A origem do nome remete ao grego onde “physis” significa bolha ou bexiga, referindo-se ao cálice que encerra seus frutos (TOMASSINI et al., 2000). *Physalis angulata*, uma importante espécie desse gênero, é uma planta herbácea de ciclo anual amplamente difundida nas regiões tropicais e subtropicais dos continentes asiático, africano e sul-americano. Esta Solanácea tem sido bastante estudada e existem diversas validações científicas já reconhecidas para distintas atividades biológicas da planta e de seus isolados, como antileucêmica, antitumoral (CHIANG et al., 2001), antimutagênica, antiespasmódica, antiséptica, imunomoduladora e no tratamento de diabetes, doença do sono, malária, hepatite, reumatismo, dermatites, asma e gonorréia (LIN et al., 1992; CHIANG et al., 1992; SOARES et al., 2003; SANTOS et al., 2003). No Brasil, *Physalis angulata* é conhecida como “camapu”, “bucho de rã”, “juá de capote” ou “mata-fome”, cujo suco é considerado depurativo contra reumatismo e dor de ouvido (BRANCH E SILVA, 1983). Há referências do uso

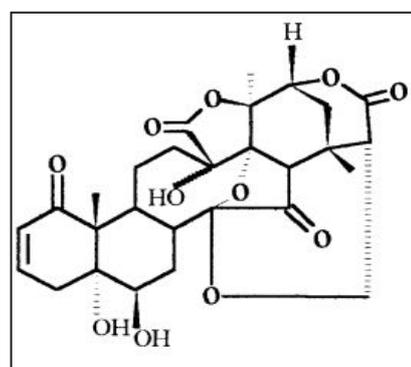
Physalis angulata por populações indígenas como analgésico e antireumático, para o tratamento de dor abdominal, além de atividade antipirética, antidiurética e antiinflamatória no tratamento de hepatite e cervicite (LORENZI, 1982; BASTOS et al., 2008). Estudos sobre o efeito antinociceptivo e antiinflamatório de extratos dessa espécie já foram descritos, validando seu uso na medicina popular (CHOI e HWANG, 2003; BASTOS et al., 2006). Essa variedade de ações biológicas tem sido atribuída, sobretudo, pela vasta diversificação nas estruturas químicas das fisalinas, constituintes importantes da *Physalis angulata* (TOMASSINI et al., 2000).

As fisalinas são moléculas de estruturas bastante complexas, pois possuem, além da lactona, outra γ lactona fundida ao anel D. São derivados esteroidais do tipo 13,14-seco-16,24 ciclo ergostano, carbonilados em C-15. Constituem um grupo de fito-esteróides com pluralidade de anéis, caracterizando-se como seco-derivados resultantes da clivagem oxidativa efetuada por agente oxidante biológico, com o grupo OH em C-14 tendo a carbonila em C-15 como agente facilitador (TOMASSINI et al., 2000). Abaixo, a representação estrutural de algumas fisalinas, isoladas da espécie citada, ressaltando as diferenças estruturais entre elas (Figura 3).

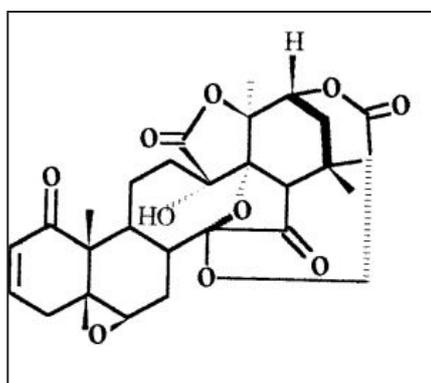
Figura 3: Estrutura Química das Fisalinas B, D, F e G.



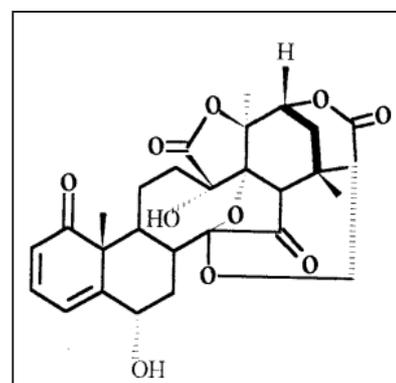
Fisalina B



Fisalina D



Fisalina F



Fisalina G

Corroborando os efeitos farmacológicos descritos para a planta e seu uso na medicina popular, as fisalinas, encontradas em *Physalis angulata* (VIEIRA et al., 2005), apresentam uma ampla variedade de atividades farmacológicas descritas. Alguns estudos sugerem uma importante atividade anti-*T. cruzi* (NAGAFUJI et al., 2004; ABE et al., 2006) e anti-*Leishmania* (GUIMARÃES et al., 2009). A atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* das fisalinas B e D foi demonstrada por HEMERSON et al., 2006. A atividade antiinflamatória, com inibição da produção de NO por macrófagos e diminuição da letalidade em camundongos submetidos à injeção de lipopolissacarídeo também foi demonstrada (SOARES et al., 2003; VIEIRA et al., 2005). Estudos indicam o potencial das fisalinas B, F e G, como agentes imunossupressores, devido à inibição da ativação de linfócitos (SOARES et al., 2006). Para a fisalina D, estudo recente descreve uma relevante atividade biológica *in vivo* contra malária (SÁ et al., 2011). Esses estudos apontam as fisalinas como moléculas relevantes do ponto de vista farmacológico. No entanto, apesar da atividade analgésica da espécie *Physalis angulata* ser sugerida pelo uso popular e validada por estudos experimentais (CHOI & HWANG, 2003; BASTOS et al., 2008; BASTOS et al., 2006) até onde vai nosso conhecimento nenhum estudo até aqui avaliou a atividade analgésica das fisalinas. Diante disso, e da necessidade de novas opções para o controle da dor, esse trabalho propõe a avaliação e caracterização da atividade antinociceptiva das fisalinas em modelos experimentais de dor. Esse estudo pode contribuir para validar o uso etnofarmacológico de *Physalis angulata*, reafirmando o vínculo entre a medicina popular e as abordagens e justificativas científicas.

2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO

Os produtos naturais têm contribuído para o estudo e descoberta de novas substâncias com diferentes atividades farmacológicas, visando alternativas para o desenvolvimento de medicamentos (RATES, 2001). Os estudos das espécies oriundas dos recursos naturais, em geral, são orientados pelo uso popular, ressaltando a importância da contribuição das sociedades para a descoberta de novas alternativas terapêuticas. Com base na etnofarmacologia, muitas investigações têm sido realizadas no intuito de validar o potencial farmacológico da nossa biodiversidade. O planejamento de novos fármacos isolados de produtos naturais representa uma abordagem estratégica, principalmente, visando o uso racional, produtivo e sustentável da biodiversidade regional (FILHO et al., 2001). Nesse sentido, os estudos de caracterização farmacológica de moléculas isoladas a partir de produtos naturais podem representar uma etapa importante no desenvolvimento de medicamentos, sobretudo, em função da variedade e complexidade estrutural de moléculas bioativas.

A dor exerce uma função fisiológica protetora que indica um possível dano tecidual, mas, por vezes, torna-se patológica, podendo constituir o principal sintoma em diferentes doenças ou tornar-se uma doença em si, como nos casos de dor crônica (SCHAIBLE, 2004). Atualmente, o controle farmacológico da dor é insatisfatório, em função da relativa ineficácia dos fármacos existentes em diferentes tipos de dor e dos freqüentes efeitos indesejados que dificultam a adesão ao tratamento e acarretam riscos variados ao paciente (TAPIERO et al., 2002; STRASSELS et al., 2008). De acordo com esses dados, o adequado controle farmacológico da dor permanece ainda um desafio.

Historicamente, as plantas têm se mostrado uma rica fonte de analgésicos, como pode ser constatado pelos exemplos dos opióides e AINES. Com o objetivo de aliar o grande potencial farmacológico da biodiversidade brasileira, à necessidade de desenvolvimento de novos analgésicos, o presente trabalho foi delineado para investigar a atividade antinociceptiva das fisalinas em modelos experimentais de dor. Os dados obtidos nesse estudo podem estabelecer as bases para futuras investigações do efeito dessas substâncias no controle da dor.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar e caracterizar farmacologicamente a atividade antinociceptiva de fisalinas em modelos experimentais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar o efeito antinociceptivo das fisalinas em modelos experimentais de dor;

Caracterizar farmacologicamente o efeito antinociceptivo das fisalinas;

Avaliar a possível interferência das fisalinas na função motora dos animais;

Investigar possíveis mecanismos envolvidos na atividade antinociceptiva das fisalinas.

4. METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS

Camundongos Swiss Webmaster, machos, pesando de 20-25 gramas, provenientes do Biotério do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - CPqGM, FIOCRUZ/BA, foram utilizados nos experimentos. Os protocolos experimentais foram revisados e aprovados pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) do CPqGM sob o CEUA nº L-IGM-012/09. Além dessa parceria, também fizeram parte de grupos experimentais, animais fornecidos pelo Biotério da Universidade Federal de Bahia e do Biotério da Universidade Estadual de Feira de Santana. Os animais foram mantidos com água e ração balanceada *ad libitum*, em estante com ventilações adequadas e com ciclo claro/escuro de 12 horas, à temperatura de 22 ± 2 °C. As manipulações e protocolos experimentais foram seguidos, segundo regulamentações e diretrizes determinadas pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (Zimmermann, 1983). Os testes de comportamento foram realizados entre 8 e 17 horas. Grupos de seis animais foram determinados para cada teste experimental.

4.2 DROGAS, DILUENTES E VIAS DE ADMINISTRAÇÃO

Diazepam foi obtido da Cristália (Itapira, São Paulo, Brasil), Indometacina, Dexametasona, PBS, Tween 20 foram obtidos da Sigma Chemical Company (St Louis, MO, USA). A indometacina foi dissolvida em Tris HCl 0,1M/salina, dexametasona foi dissolvida em 10% etanol/salina. O diazepam foi dissolvido em salina. As substâncias foram administradas por via intraperitoneal (IP) ou subcutânea (SC). As fisalinas puras e em mistura foram dissolvidas em 5%DMSO, 5%Tween 20/ salina.

4.3 OBTENÇÃO DAS FISALINAS

A mistura das fisalinas e os compostos purificados foram obtidos do extrato etanólico do caule da planta *Physalis angulata* e purificados, a partir de espécies

coletadas em Belém do Pará, como descrito em SOARES et al, 2003. Cerca de 15 gramas do extrato etanólico foi dissolvido em metanol. Adicionou-se, em seqüência, solução de acetato de chumbo (200 mL de água destilada, quente, com 25 gramas de acetato de chumbo). Após agitação por duas horas, foram adicionados 20 gramas de carvão ativado, sob agitação constante. A mistura foi filtrada e extraída em clorofórmio, obtendo 700 mg de material sólido (mistura de fisalinas). Essa mistura foi submetida à cromatografia líquida de média pressão (MPLC) utilizando gradiente de eluição de hexano/acetato de etila, inicialmente na proporção (70:30) até chegar a 100% do acetato de etila. Após evaporação do solvente, as frações coletadas foram submetidas à cromatografia de camada delgada (CCD) e métodos espectroscópicos para elucidação estrutural. Como resultado da purificação obteve-se 15 mg de fisalina B (96% de pureza), 75 mg de fisalina D (95,6% de pureza), 56 mg de fisalina F (97,8% de pureza) e 51 mg de fisalina G (95% de pureza). O processo de purificação descrito acima foi realizado no Laboratório de Produtos Naturais II em Farmanguinhos - Fiocruz/RJ, sob coordenação da Dra. Therezinha Tomassini.

4.4 CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS PELO ÁCIDO ACÉTICO

Ácido acético (1,2%v/v - 0,1mL/10g) foi injetado na cavidade peritoneal dos camundongos, 40 minutos após a administração intraperitoneal de doses crescentes da mistura de fisalinas (6,25-150mg/kg), das substâncias isoladas B, D, G e F (25-100mg/kg) ou do veículo (DMSO 5%+ Tween 20 5%/ salina, grupo controle). Os animais foram colocados em caixas de acrílico invertidas, individualmente, para facilitar a observação do padrão característico. O comportamento nociceptivo foi quantificado pelo número de contorções abdominais no intervalo de 30 minutos após a injeção do agente algésico (COLLIER, DINNEEN et al., 1968). Esse padrão de resposta é caracterizado pela extensão do corpo com estiramento das patas traseiras (Figura 4). A indometacina (10mg/kg) foi utilizada como droga de referência.

Figura 4: Teste de contorções abdominais em modelo murino experimental.



Fonte: Acervo Pessoal.

4.5 TESTE DA FORMALINA

Solução de formalina (20 μ L - Formol 2,5% diluído em salina) foi injetada na superfície intraplantar direita dos camundongos, após 40 minutos da administração intraperitoneal da mistura de fisalinas e das substâncias isoladas B, D, G e F (25-100mg/kg) ou do veículo (DMSO 5%+ Tween 20 5%/ salina, grupo controle). Os animais foram colocados em funis de vidro, individualmente, para facilitar a observação do comportamento nociceptivo (Figura 5), que consiste no tempo de lambida da pata estimulada (Figura 6), que é registrado em cronômetro por um período de 30 minutos. O teste da formalina é dividido em duas fases. A primeira fase (inicial ou neurogênica) que compreende o intervalo de 0-10 minutos, e a segunda fase (tardia ou inflamatória) que compreende o intervalo de 10-30 minutos (DUBUISSON E DENNIS, 1977). A indometacina (10mg/kg) foi utilizada como droga referência.

Figura 5: Animais colocados em funis de vidro para observação do comportamento nociceptivo.



Fonte: Acervo Pessoal.

Figura 6: Teste da formalina em modelo murino experimental.



Fonte: Acervo Pessoal.

4.6 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MOTORA NO TESTE DE ROTA-ROD

A possível interferência das fisalinas na capacidade motora e produção de déficits neurológicos nos animais foram avaliadas pelo desempenho no aparelho de rota rod (DUNHAM E MIYA, 1957). Os animais foram submetidos a uma análise de pré-seleção dois dias antes do experimento, com a finalidade de selecionar apenas os animais que se mantivessem em equilíbrio sobre a barra durante três minutos por três tentativas. A rotação constante adotada foi de 06 rotações por minuto (rpm). No momento do experimento, os animais selecionados foram tratados com as fisalinas na maior dose testada, mistura (150 mg/kg) e fisalinas puras (100 mg/kg), e após 40 minutos, colocados no aparelho para observação. O aparelho consiste de um cilindro, distante 07 cm da superfície, que gira à velocidade constante (Figura 7). Para manter-se no cilindro o animal necessita locomover-se e a capacidade de coordenação é quantificada pelo registro do tempo de permanência no aparelho. Os resultados foram expressos em média do tempo em segundos de permanência dos animais no rota rod. A droga de referência utilizada foi o diazepam 10 mg/kg com pré-tratamento de 30 minutos.

Figura 7: Teste de rota rod em camundongos.



Fonte: Acervo Pessoal.

4.7 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MOTORA NO TESTE DE OPEN- FIELD (CAMPO ABERTO)

O teste do campo aberto avalia respostas comportamentais como atividade locomotora, hiperatividade e comportamento exploratório. O aparato consiste em uma caixa de acrílico opaco (50 cm x 60 cm x 45 cm), com piso demarcado em 12 quadrados iguais (Figura 8). No momento do teste, os animais foram colocados em um dos cantos do aparato e foi registrado o número de vezes em que os animais cruzam os quadrados com as quatro patas durante o período de três minutos. Os animais foram tratados com as fisalinas na maior dose testada, mistura (150 mg/kg) e fisalinas puras (100 mg/kg), e, 40 minutos após, colocados no aparato para registro. Os resultados foram expressos em média de quantidade de quadrados percorridos. A droga de referência utilizada foi o diazepam (10 mg/kg) com pré-tratamento de 30 minutos.

Figura 8: Teste do Open Field.



Fonte: Acervo Pessoal.

4.8 MODELO DE DOR INFLAMATÓRIA INDUZIDA PELO ADJUVANTE COMPLETO DE FREUND (CFA)

O CFA constitui de uma solução de *Mycobacterium tuberculosis* (1mg/mL) em 85% de óleo de parafina e 15% de óleo de monooleato de manide. Os animais foram pré-tratados com a mistura de fisalinas (25-100 mg/kg), das fisalinas isoladas B, G, D (100 mg/kg) e F (50 e 100mg/kg) ou veículo (DMSO 5%+ Tween 20 5%/ salina, grupo controle). Quarenta minutos depois, os camundongos foram levemente anestesiados com halotano e receberam injeção subcutânea de CFA (20µL, 1mg/mL) na região plantar direita (registro inicial) (KASSUYA et al., 2003). A hiperalgesia mecânica, edema de pata e produção local de citocinas foram avaliados com von Frey filamentos, pletismômetro e ELISA, como descrito abaixo.

4.9 AVALIAÇÃO DE LIMIAR NOCICEPTIVO MECÂNICO: FILAMENTOS DE VON FREY

O limiar de resposta ao estímulo mecânico foi medido a cada 02 horas após o registro inicial com filamentos de von Frey pelo método up-down (CHAPLAN et al., 1994) (Stoelting, Chigaco, EUA). Estes filamentos consistem em segmentos de fio de nylon cuja rigidez à tensão é previamente determinada em gramas pelo fabricante. Foram utilizados sete filamentos correspondentes às seguintes forças em gramas: 0,04; 0,07; 0,16; 0,4; 0,6; 1; 1,4; 2. e 4, considerando o filamento de partida o de 0,6. Os animais foram postos em caixa de acrílico transparente, com fundo em tela de arame galvanizado, elevada sobre um espelho de modo a permitir o acesso á superfície plantar e visualização da resposta do animal (Figura 9). Os animais permaneceram na caixa para adaptação por um período de trinta minutos. A pata foi tocada verticalmente com a série dos filamentos, considerando um total de seis respostas consecutivas, tendo início quando o animal inverte o comportamento não responsivo (negativo) por um comportamento responsivo (positivo), detectado pelo movimento de retirada da pata – *flinch*. Considerou-se como resposta positiva a retirada brusca da pata testada. A série foi interrompida quando o animal exibiu resposta positiva. As medidas foram realizadas tendo como princípio que uma resposta positiva é sempre seguida por um estímulo de filamento inferior, enquanto

que uma resposta negativa é seguida de um estímulo de filamento superior. O resultado é obtido através do valor em logaritmo da força proporcional ao último filamento (X_f), do valor equivalente ao padrão de respostas positivas e negativas (k) e a média da diferença entre os estímulos em unidades logarítmicas (δ), com a expressão de 50% do limiar nociceptivo em gramas, ou seja, a força correspondente ao filamento em que o camundongo responde em 50% das apresentações, conforme fórmula a seguir:

Figura 9: Ambiente de experimentação para avaliação do limiar nociceptivo mecânico.

$$50\%gramasLimiar = \frac{(10^{[X_f + k\delta]})}{10.000}$$



Fonte: Acervo Pessoal.

4.10 MENSURAÇÃO DE EDEMA DE PATA: PLETISMÔMETRO

Outro parâmetro avaliado foi a formação do edema induzido por CFA. O edema foi quantificado pelo registro da variação do volume da pata no aparelho Pletismômetro (Ugo, Basile, Comerio, Itália) (Figura 10). O volume de cada pata foi medido antes da administração de CFA (Valor basal) e 02, 04, 06 e 24 horas após (Valor final). A variação do volume foi determinada através do valor obtido em função do valor de volume da pata no registro inicial, ou seja, antes da administração

do estímulo inflamatório. Esse valor foi estabelecido em percentual para o aumento do edema. Dexametasona (0,7 mg/kg/ SC) foi utilizada como droga referência.

Figura 10: Equipamento Plestismômetro. Medida do edema de pata em camundongos.



Fonte: Acervo Pessoal.

4.11 ELISA

Os níveis TNF- α e IL- 1 β nas amostras foram determinados pela técnica de ELISA sanduíche. Camundongos foram tratados com os compostos avaliados e, após o período de 40 minutos, receberam injeção intraplantar de CFA na pata posterior direita. Depois de 2 horas, os animais de cada grupo foram anestesiados para retirada do tecido da pata. Proteínas do tecido foram extraídas na proporção de 100 mg de tecido/mL PBS (0,05% Tween 20; 0,1mM PMSF; 0,1mM benzametônio; 10mM EDTA; 2 μ g/ml aprotinina A; 0,5% BSA). As amostras foram centrifugadas por 3000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante estocado a -70°C. A dosagem de citocinas foi estimada utilizando o kit de imunoenensaio ELISA para camundongos (R&D SYSTEM, Minneapolis, MN). A leitura da densidade óptica foi determinada por espectrofotômetro (Spectra Max 190 – Molecular Devices, Califórnia, EUA), no comprimento de onda de 450nm. As análises foram realizadas no Software Softmax

4.3.1 (molecular Devices) e os resultados foram expressos em picogramas de citocina por mililitro de solução de proteínas.

4. 12 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) EM TEMPO REAL

Camundongos foram tratados com os compostos avaliados e, após o período de 40 minutos, receberam injeção intraplantar de CFA na pata posterior direita. Depois de 2 horas, os animais de cada grupo foram anestesiados para retirada do tecido da pata. Materiais plásticos e soluções livres de RNase foram utilizados em todas as etapas do processo. O tecido da pata de cada animal foi homogeneizado em 1mL de reagente Trizol (Gibco - BRL Life Technologies, Grand Island, N.Y.) e a extração do RNA total foi realizada de acordo com as orientações do fabricante e a concentração foi determinada por medição fotométrica utilizando o aparelho NanoDrop 2000c (Thermo Scientific). Em seguida 1 µg do RNA total foi transcrito por ação da enzima transcriptase reversa utilizando-se do kit *High Capacity Reverse Transcription* (Applied Biosystems). O cDNA assim obtido foi usado para análise da expressão quantitativa dos genes TNF- α (Mm 00443258_m1), IL-1β (Mm 00434228_m1), COX-2 (Mm 01307329_m1), IL – 6 (Mm 00446190_m1) e IL -10 (Mm 00439616_m1) em reações de PCR em Tempo Real. À reação de amplificação de qRT-PCR contendo 20 ng da amostra de cDNA, 5,0 µL Taqman Master Mix (Applied Biosystems) foram adicionadas as sondas de hidrólise Taqman (Applied Biosystems) acima indicadas em quantidade suficiente para completar o volume final de 10 µL. Todas as reações foram realizadas em duplicata no Sistema de Detecção ABI7500 Sequence (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) sob condições do padrão de ciclagem térmica. Os valores médios de Ct (Cycle threshold) foram usados para calcular a expressão do gene estudado, com normalização ao controle interno (*GAPDH* – Mm 9999915_g1) usando a fórmula 2^{-DCt} . Amostras com coeficiente de variação maior que 5% foram excluídas. Um controle sem amostra (NTC) e outro sem a enzima para transcrição reversa (No-RT) também foram incluídos.

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados utilizando o GraphPad Prism v.5.0 (GraphPad Inc., San Diego, CA). Os dados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de medidas feitas com 6 animais por grupo. A comparação entre grupos distintos de tratamento foi feita utilizando one - way ANOVA, seguido do teste de Tukey. Em estudos de medidas repetidas ao longo do tempo, foi utilizado o two-way ANOVA, seguido do teste de Bonferroni. Em todos os testes, as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para valores de $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 EFEITO DAS FISALINAS NO TESTE DE CONTORÇÕES ABDOMINAIS

O efeito antinociceptivo das fisalinas foi investigado no teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. A mistura (*pool*) de fisalinas (6,25-100 mg/kg), as fisalinas puras B, D, G ou F (25-100 mg/kg) e o fármaco de referência indometacina (10 mg/kg) foram administrados por via intraperitoneal, 40 minutos antes da injeção de ácido acético. O *pool* produziu uma inibição significativa do número de contorções abdominais nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg (Figura 11), mas o efeito não foi dose-dependente. A partir desse dado, as fisalinas B, G, D ou F foram administradas nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg. As fisalinas B (Figura 12A) e F (Figura 12D) produziram efeito antinociceptivo nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg. As fisalinas D (Figura 12B) e G (Figura 12C) produziram efeito antinociceptivo nas doses de 50 e 100 mg/kg. A indometacina produziu efeito antinociceptivo que não foi estatisticamente diferente do efeito das fisalinas.

Figura 11: Efeito antinociceptivo da administração intraperitoneal da mistura de fisalinas no teste de contorções abdominais. Camundongos foram tratados com a mistura de fisalinas (6,25-100 mg/kg) ou veículo (CTRL - DMSO 5%+ Tween 20 5%/ salina, grupo controle) por via intraperitoneal 40 minutos antes da injeção de ácido acético. A indometacina (INDO 10 mg/kg/IP) foi o fármaco utilizado como padrão ouro. Os dados foram representados como média \pm E.P.M de seis camundongos por grupo. * significância estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), como determinado pelo teste de ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey.

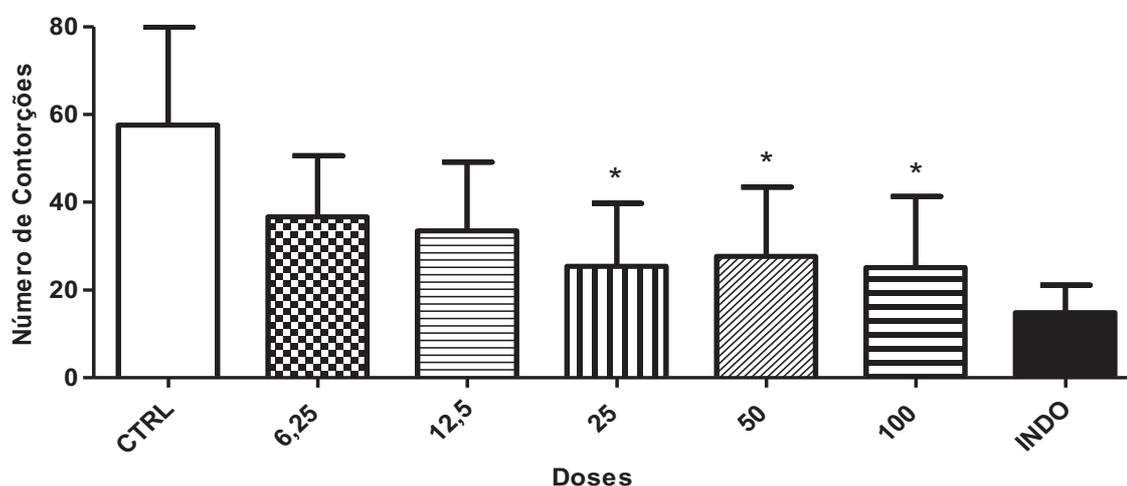
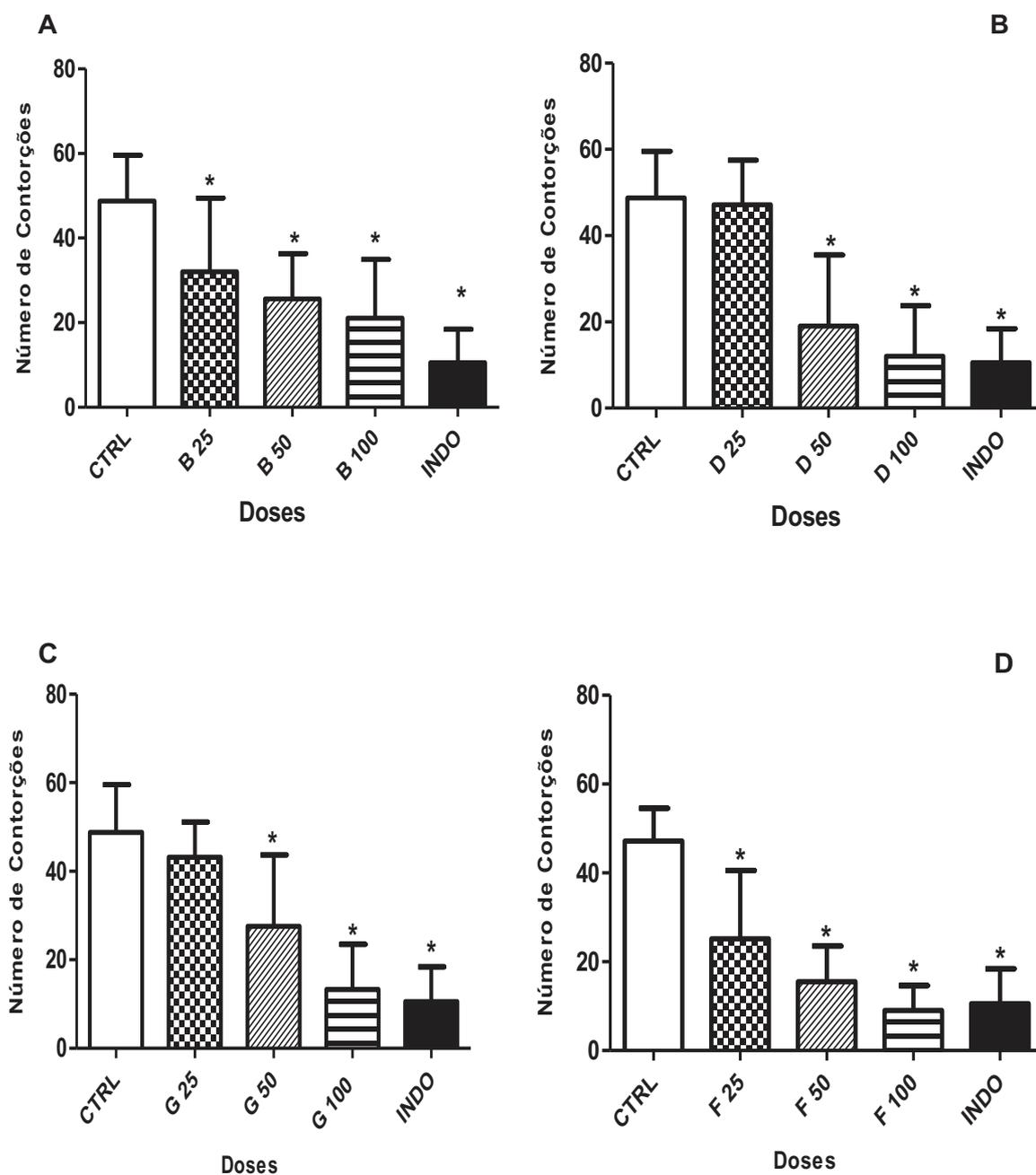


Figura 12: Efeito antinociceptivo da administração intraperitoneal das fisalinas B, D, G ou F no modelo de contorções abdominais. Camundongos foram tratados com as fisalinas B (Painel A), D (Painel B), G (Painel C) ou F (Painel D) nas doses de 25 a 100 mg/kg por via intraperitoneal 40 minutos antes da injeção de ácido acético. A indometacina (INDO 10 mg/kg/IP) foi o fármaco utilizado como padrão ouro. O grupo controle recebeu veículo (CTRL - DMSO 5%+ Tween 20 5%/ salina) por via intraperitoneal 40 minutos antes da injeção de ácido acético. Os dados foram representados como média \pm E.P.M de seis camundongos por grupo. * significância estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), como determinado pelo teste de ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey.



5.2 EFEITO DAS FISALINAS NO TESTE DA FORMALINA

Para confirmar o efeito antinociceptivo das fisalinas, seus efeitos foram investigados no teste da formalina. A mistura de fisalinas (25 - 100 mg/kg), as fisalinas puras B, G, D ou F (25 -100 mg/kg) e o fármaco de referência indometacina (10 mg/kg) foram administrados por via intraperitoneal 40 minutos antes da injeção de formalina. A mistura de fisalinas nas doses de 50 e 100 mg/kg promoveu inibição significativa do tempo de lambida da pata apenas na segunda fase da formalina (Figura 13). Da mesma maneira, as fisalinas B (Figura 14A), D (Figura 14B), G (Figura 15A) e F (Figura 15B) produziram efeito antinociceptivo apenas na segunda fase da formalina, nas doses de 25 a 100 mg/kg. A indometacina produziu efeito antinociceptivo na segunda fase da formalina, que não foi estatisticamente diferente do efeito das fisalinas.

Figura 13: Efeito antinociceptivo da mistura de fisalinas no teste da formalina.

Camundongos tratados com a mistura de fisalinas (25, 50 e 100 mg/kg) ou veículo (CTRL) por via intraperitoneal 40 minutos antes da injeção intraplantar de formalina. Indometacina (INDO 10 mg/kg/IP) foi a droga referência. Os dados foram representados como média \pm E.P.M de seis animais por grupo. * significância estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), como determinado pelo teste de ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey.

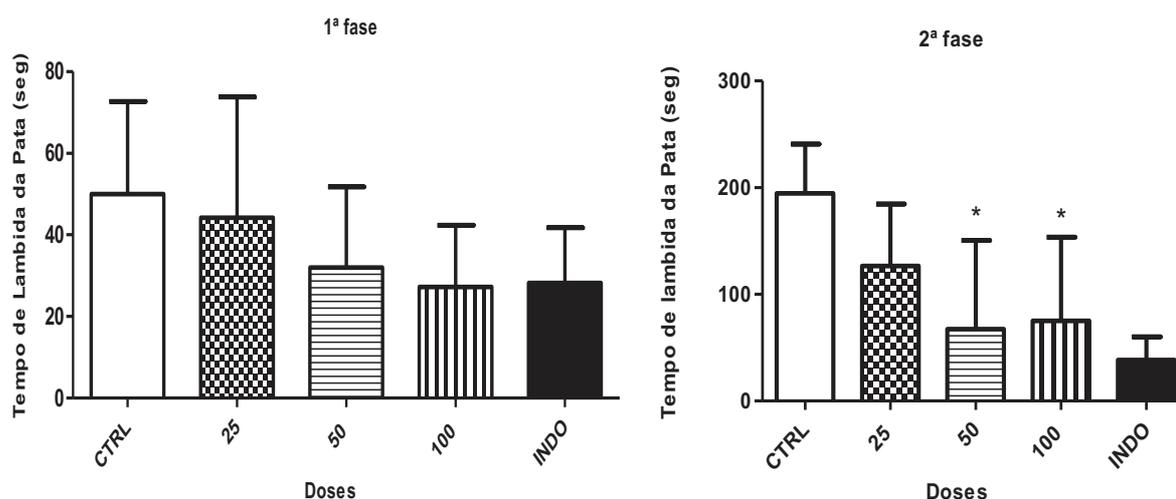
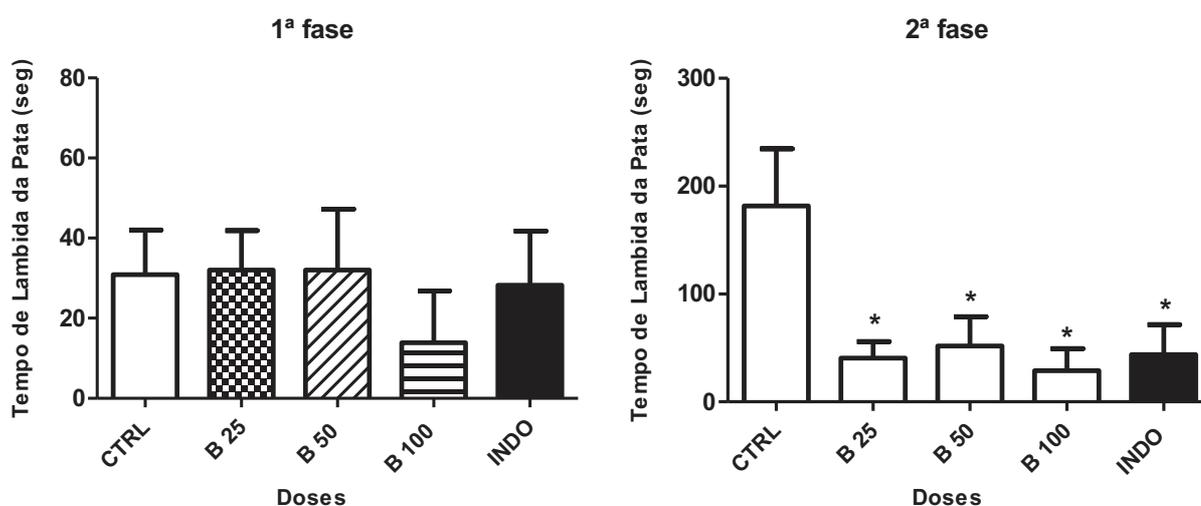


Figura 14: Efeito antinociceptivo das fisalinas B e D no teste da formalina.

Camundongos tratados com as fisalinas B (Painel A) e D (Painel B) ou veículo (CTRL - DMSO 5%+ Tween 20 5%/ salina, grupo controle) por via intraperitoneal 40 minutos antes da injeção de formalina. Indometacina (INDO 10 mg/kg/ IP) foi a droga referência. Os dados foram representados como média \pm E.P.M de seis animais por grupo. * significância estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), como determinado pelo teste de ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey.

PAINEL A- Fisalina B



PAINEL B- Fisalina D

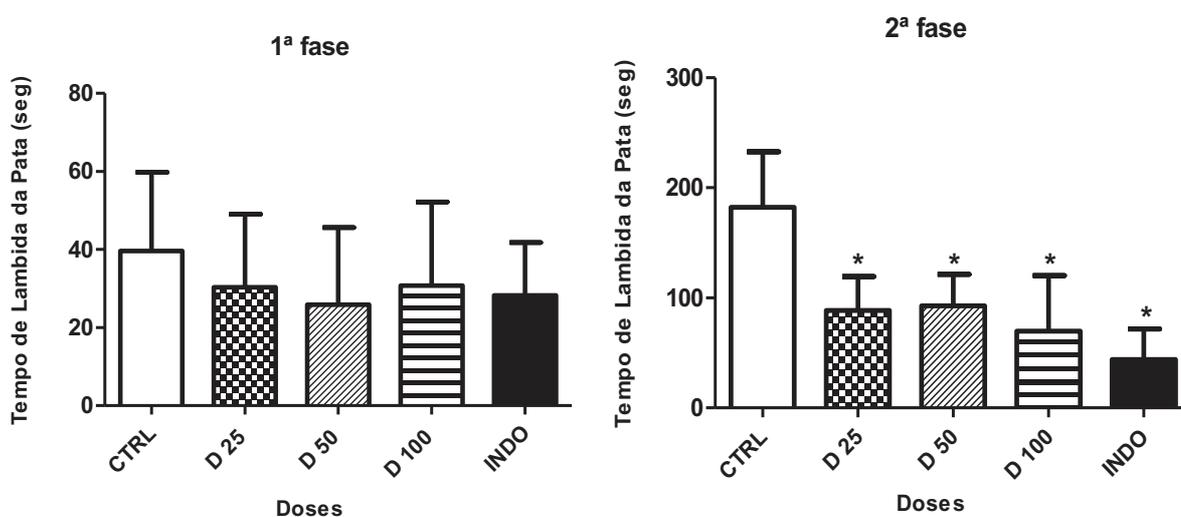
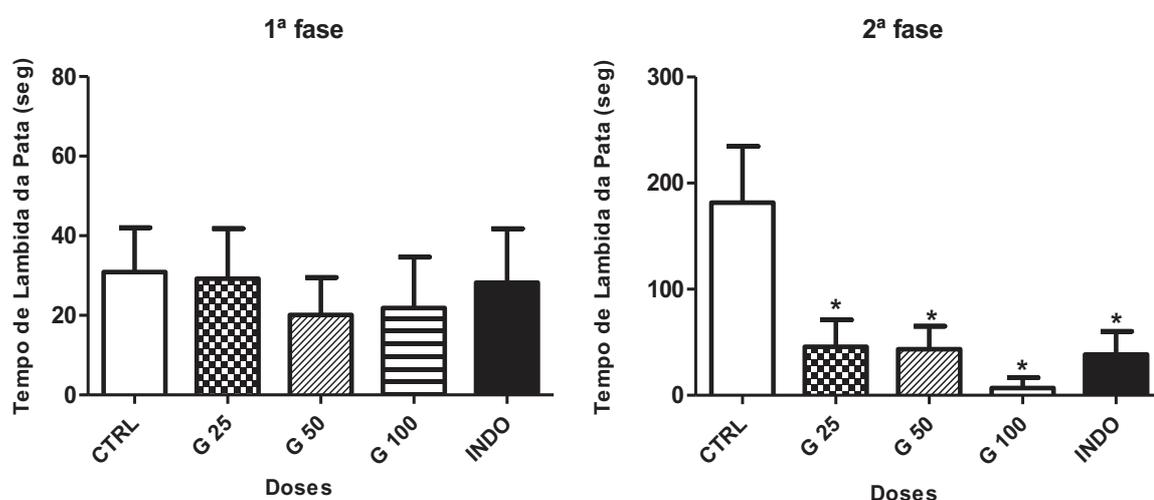


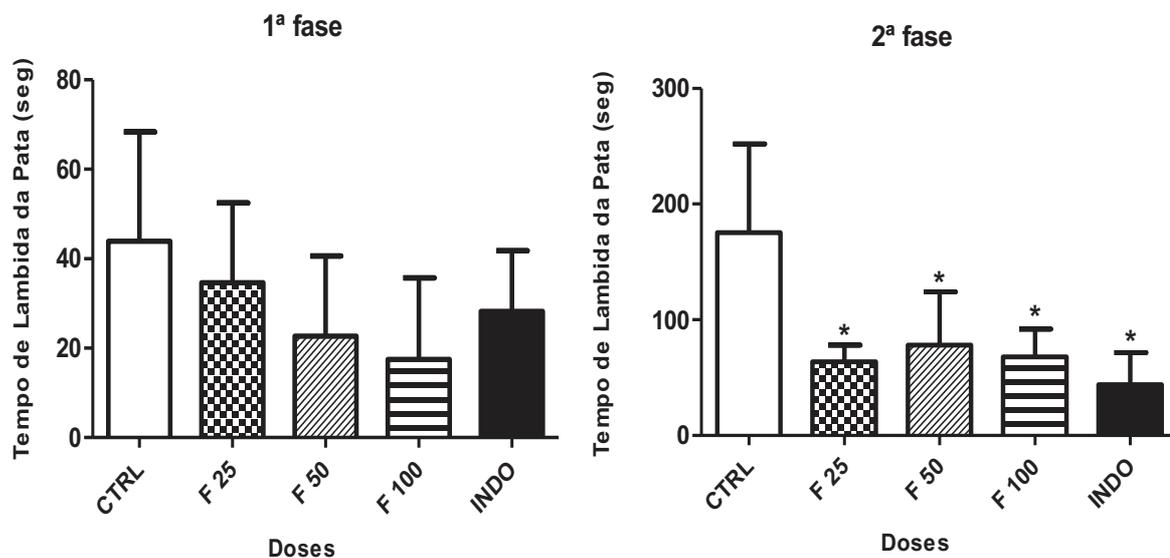
Figura 15: Efeito antinociceptivo das fisalinas G e F no teste da formalina.

Camundongos tratados com as fisalinas G (Painel A) e F (Painel B) ou veículo (CTRL - DMSO 5%+ Tween 20 5%/ salina, grupo controle) por via intraperitoneal 40 minutos antes da injeção de formalina. Indometacina (INDO 10 mg/kg/ IP) foi a droga referência. Os dados foram representados como média \pm E.P.M de seis animais por grupo. * significância estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), como determinado pelo teste de ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey.

PAINEL A- Fisalina G



PAINEL B- Fisalina F



5.3 INVESTIGAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA ADMINISTRAÇÃO DAS FISALINAS NA COORDENAÇÃO E DESEMPENHO MOTOR DOS CAMUNDONGOS

Com o objetivo de avaliar se uma possível deficiência motora ou sedação induzida pelas fisalinas poderia interferir no comportamento observado nos testes nociceptivos, a função motora foi avaliada nos testes de rota rod e open field após a administração das fisalinas. Como resultados, observou-se que a administração da mistura de fisalinas (150 mg/kg) e das fisalinas B, D, G e F (100 mg/kg) não alterou o tempo de permanência no rota rod (Figura 16) nem o número de quadrados percorridos pelos camundongos no open field (Figura 17). Esses dados indicam que as fisalinas não afetam o desempenho motor dos camundongos. Diazepam (10 mg/kg/IP), depressor do sistema nervoso central, ao contrário, inibiu significativamente o tempo de permanência dos animais no aparelho de rota Rod e o número de quadrados percorridos no open field.

Figura 16: Efeito das fisalinas no desempenho motor dos camundongos no teste de rota rod. (A) Animais tratados com a mistura das fisalinas (150 mg/kg) por via intraperitoneal 40 minutos antes da exposição ao aparelho de rota rod. (B) Animais tratados com as fisalinas purificadas B, D, G ou F (100 mg/kg) por via intraperitoneal 40 minutos antes da exposição ao aparelho de rota rod. Diazepam (DZP) (10 mg/kg/IP) foi utilizado como droga referência. O grupo controle foi tratado com veículo (DMSO 5%+ Tween 20 5%/ salina - CTRL). Dados foram expressos como a média do tempo de permanência em segundos no rota rod ($m \pm E.P.M$ de seis animais por grupo). * significância estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), como determinado pelo teste de ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey.

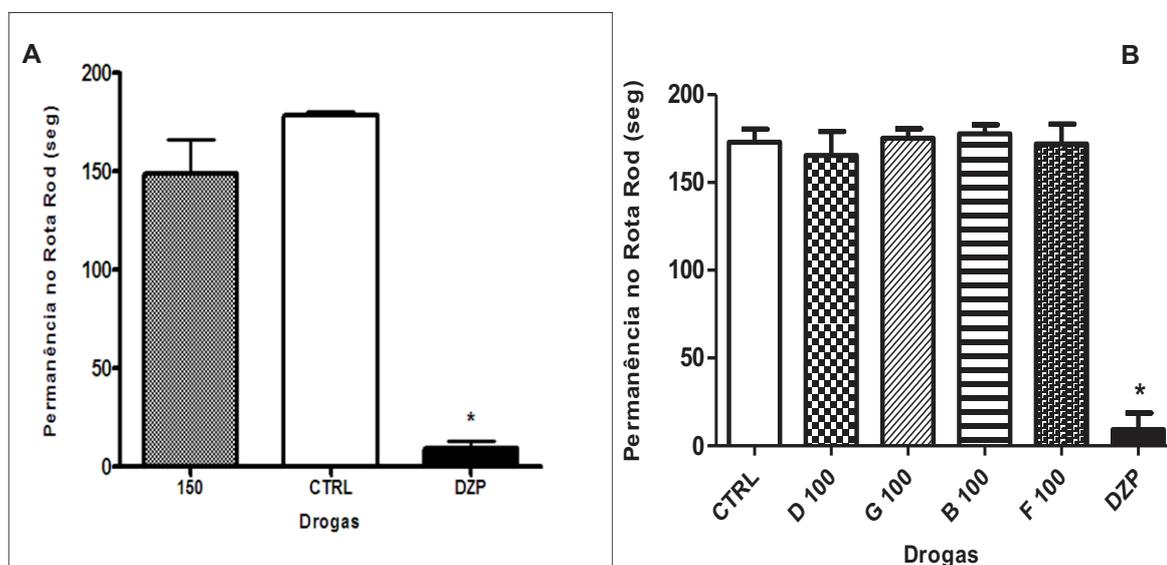
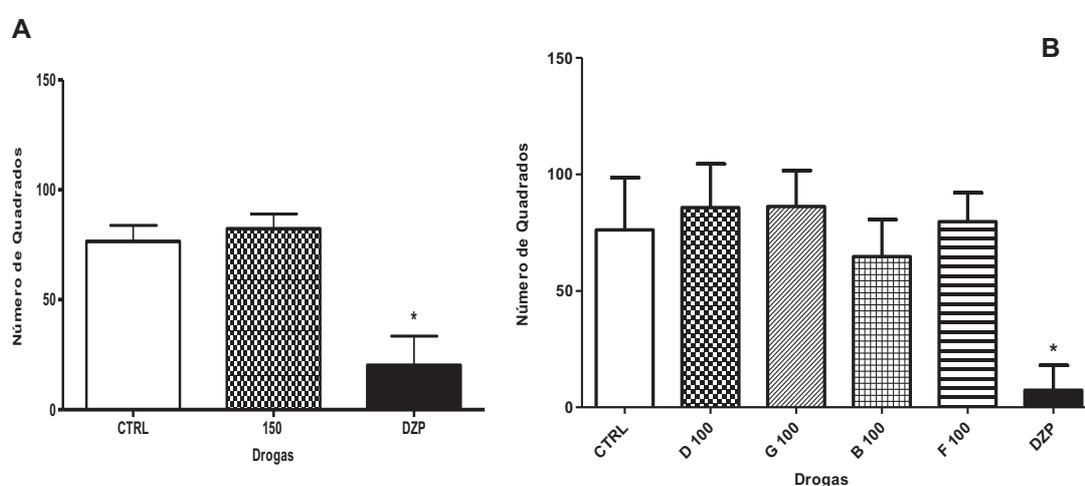


Figura 17: Efeito das fisalinas na atividade locomotora dos camundongos no teste do open field. (A) Animais tratados com a mistura das fisalinas (150 mg/kg) por via intraperitoneal 40 minutos antes da exposição ao aparato do open Field. (B) Animais tratados com as fisalinas purificadas B, G, D ou F (100 mg/kg) tratados por via intraperitoneal 40 minutos antes da exposição ao aparato do open field. Diazepam (DZP) (10 mg/kg/IP) 30 minutos antes do teste foi utilizado como droga referência. O grupo controle foi tratado com veículo (DMSO 5%+ Tween 20 5%/salina – CTRL). Dados foram expressos como a média do número de quadrados atravessados no open field ($m \pm E.P.M$ de seis animais por grupo). * significância estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), como determinado pelo teste de ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey.



5.4 EFEITO DAS FISALINAS NO MODELO DE EDEMA DE PATA INDUZIDO PELO ADJUVANTE COMPLETO DE FREUND (CFA)

A atividade antiinflamatória das fisalinas foi investigada em um modelo clássico de inflamação: o modelo de edema de pata induzido por CFA. O tratamento com a mistura das fisalinas (100 mg/kg) por via intraperitoneal, 40 minutos antes do CFA, reduziu significativamente o edema de pata até quatro horas após a injeção do estímulo inflamatório (Figura 18). A administração da fisalina B (100mg/kg) inibiu a formação do edema até as primeiras duas horas após injeção do CFA. Entretanto, as fisalinas G e D não apresentaram efeito antiinflamatório nesse modelo (Figura 19). Por outro lado, a fisalina F (100 mg/kg) demonstrou um perfil de ação semelhante ao evidenciado pela mistura, com inibição significativa do edema de pata, até 04 horas após a injeção do CFA (Figura 20). Dexametasona (0,7 mg/kg/SC), um

antiinflamatório glicocorticoide utilizado como droga referência, reduziu o edema por até 24 h após a indução da inflamação.

Figura 18: Efeito da mistura de fisalinas no edema de pata induzido por CFA. A mistura de fisalinas (25, 50 e 100 mg/kg) ou veículo (CTRL - DMSO 5%+ Tween 20 5%/ salina, grupo controle) foram administrados por via intraperitoneal 40 minutos antes da injeção do CFA (registro inicial). Dexametasona (DEXA - 0,7 mg/kg/SC), quatro horas antes da injeção do CFA foi utilizado como droga referência. O edema foi medido nos tempos de 02, 04, 06 e 24 horas. Dados expressos como \pm E.P.M de seis animais por grupo. * significância estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), como determinado no teste ANOVA de duas vias, seguido do pós teste de Bonferroni.

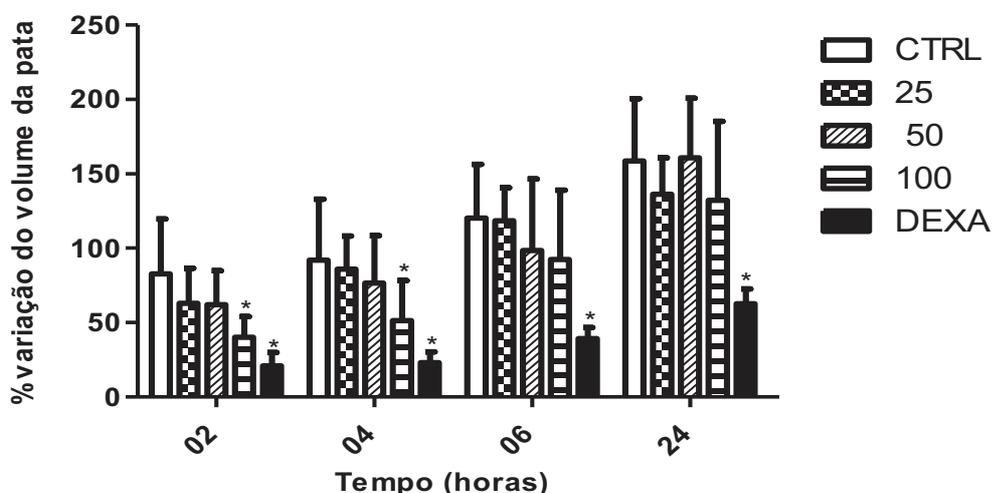


Figura 19: Efeito das fisalinas no edema de pata induzido por CFA. As fisalinas D, B e G (100 mg/kg e ou veículo (CTRL - DMSO 5%+ Tween 20 5%/ salina, grupo controle) foram administrados por via intraperitoneal 40 minutos antes da injeção do CFA (registro inicial). Dexametasona (DEXA - 0,7 mg/kg/SC), quatro horas antes da injeção do CFA foi utilizado como droga referência. O edema foi medido nos tempos de 02, 04 e 06 horas. Dados expressos como média \pm E.P.M de seis animais por grupo. * significância estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), como determinado no teste ANOVA de duas vias, seguido do pós teste de Bonferroni.

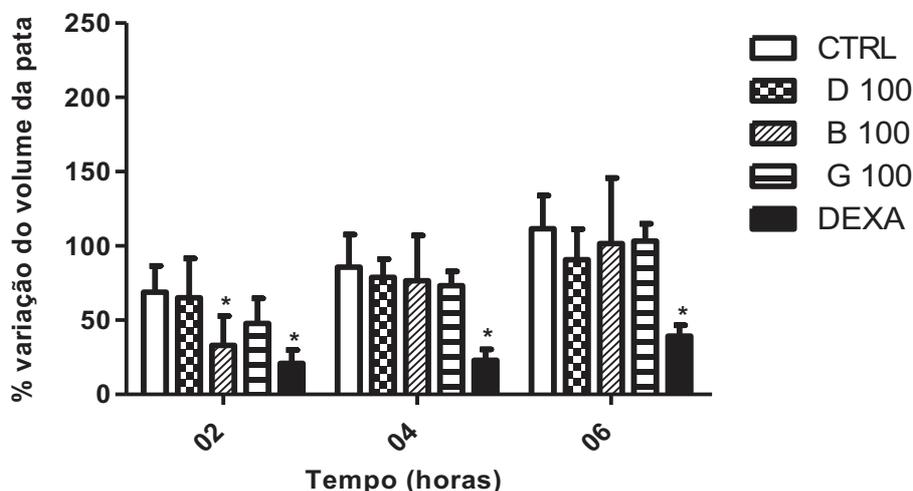
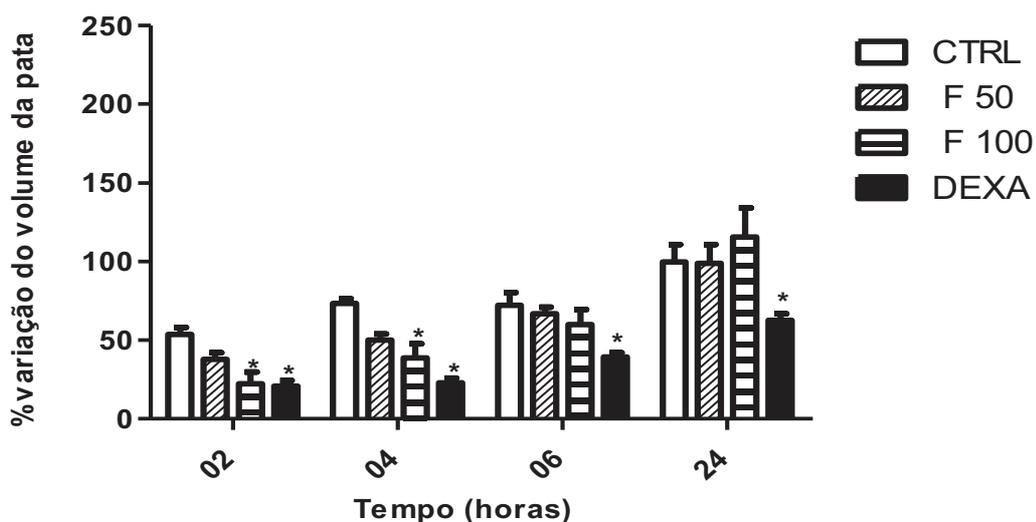


Figura 20: Efeito da fisalina F no edema de pata induzido por CFA. A fisalina F (50 e 100 mg/kg) ou veículo (CTRL - DMSO 5%+ Tween 20 5%/ salina, grupo controle) foram administrados por via intraperitoneal 40 minutos antes da injeção do CFA (registro inicial). Dexametasona (DEXA - 0,7 mg/kg/SC), quatro horas antes da injeção do CFA foi utilizado como droga referência. O edema foi medido nos tempos de 02, 04, 06 e 24 horas. Dados expressos como \pm E.P.M de seis animais por grupo. * significância estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), como determinado no teste ANOVA de duas vias, seguido do pós teste de Bonferroni.



5.5 EFEITO DAS FISALINAS NA HIPERALGESIA INDUZIDA PELO CFA

A administração da mistura de fisalinas (50 e 100 mg/kg) por via intraperitoneal, com pré-tratamento de 40 minutos inibiu a resposta nociceptiva dos camundongos duas horas após a injeção do CFA (Figura 21). Esse efeito não foi observado no tratamento com as fisalinas B, G ou D (Figura 22). Entretanto, o tratamento com a fisalina F (100 mg/kg), nas mesmas condições, inibiu a hiperalgesia até duas após injeção do agente inflamatório (Figura 23).

Figura 21: Efeito da mistura de fisalinas na hiperalgesia induzida pelo CFA. A mistura de fisalinas (25, 50 e 100 mg/kg) ou veículo (CTRL - DMSO 5%+ Tween 20 5%/ salina, grupo controle) foram administrados por via intraperitoneal 40 minutos antes da injeção do CFA (registro inicial). Dexametasona (DEXA - 0,7 mg/kg/SC), quatro horas antes da injeção do CFA foi utilizado como droga referência. A hiperalgesia foi medida nos tempos de 02 e 04 horas. Dados expressos como \pm E.P.M de seis animais por grupo. * significância estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), como determinado no teste ANOVA de duas vias, seguido do pós teste de Bonferroni.

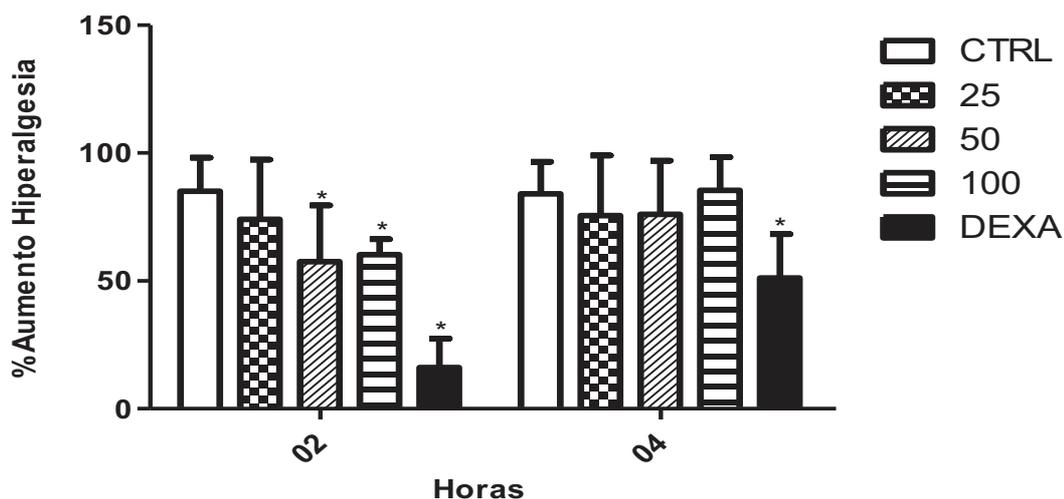


Figura 22: Efeito das fisalinas na hiperalgesia induzida pelo CFA. As fisalinas B, G e D (100 mg/kg) e ou veículo (CTRL - DMSO 5%+ Tween 20 5%/ salina, grupo controle) foram administrados por via intraperitoneal 40 minutos antes da injeção do CFA (registro inicial). Dexametasona (DEXA - 0,7 mg/kg/SC), quatro horas antes da injeção do CFA foi utilizado como droga referência. A hiperalgesia foi medida nos tempos de 02 e 04 horas. Dados expressos como média \pm E.P.M de seis animais por grupo. * significância estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), como determinado no teste ANOVA de duas vias, seguido do pós teste de Bonferroni.

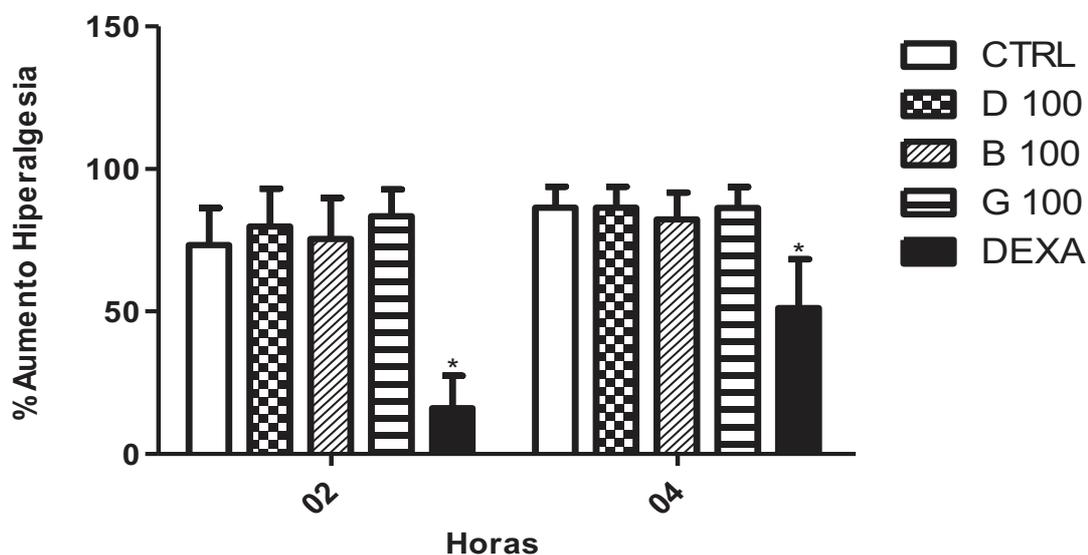
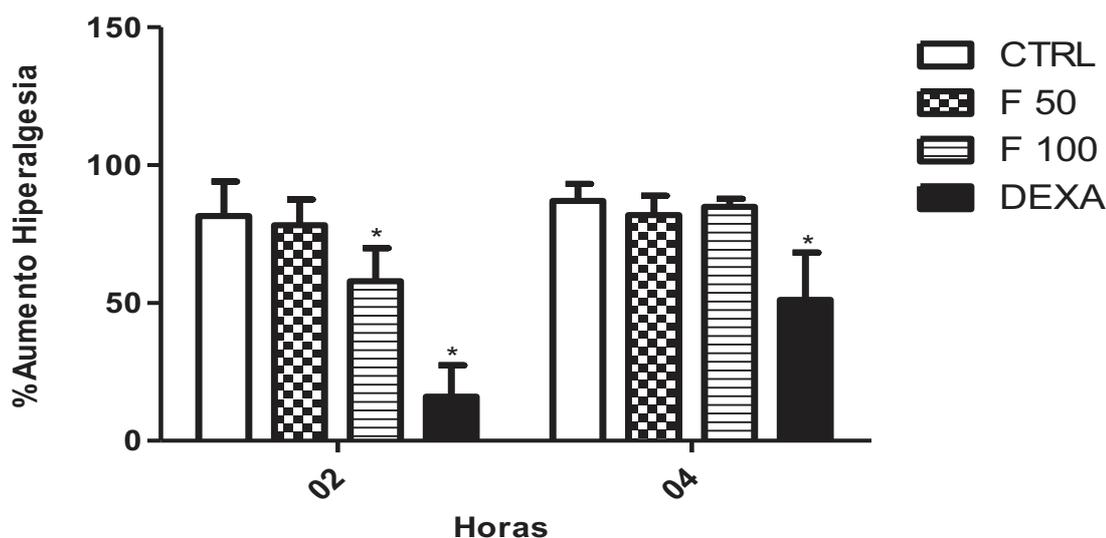


Figura 23: Efeito da fisalina F na hiperalgesia induzida pelo CFA. A fisalina F (50 e 100 mg/kg) e ou veículo (CTRL - DMSO 5%+ Tween 20 5%/ salina, grupo controle) foram administrados por via intraperitoneal 40 minutos antes da injeção do CFA (registro inicial). Dexametasona (DEXA - 0,7 mg/kg/SC), quatro horas antes da injeção do CFA foi utilizado como droga referência. A hiperalgesia foi medida nos tempos de 02 e 04 horas. Dados expressos como média \pm E.P.M de seis animais por grupo. * significância estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), como determinado no teste ANOVA de duas vias, seguido do pós teste de Bonferroni.

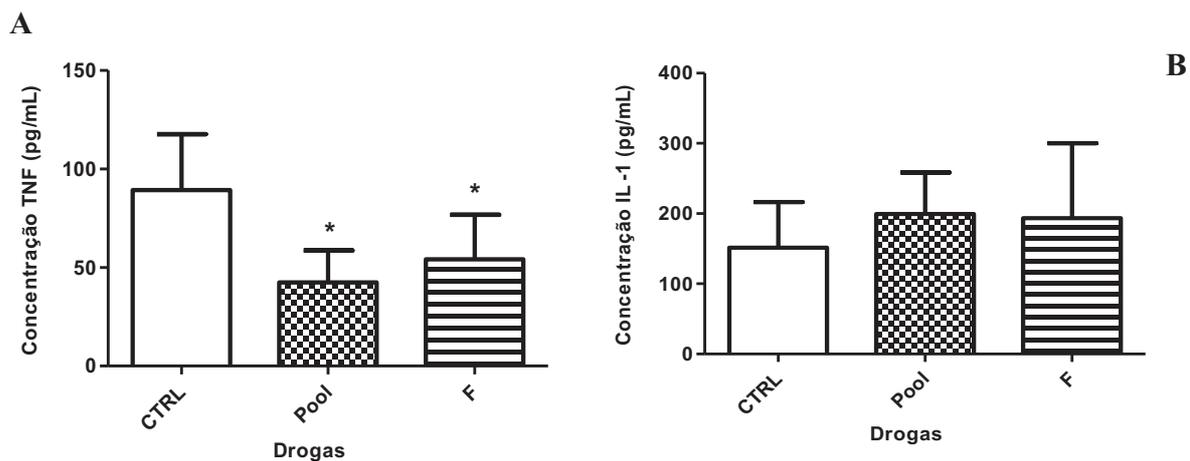


5.6 EFEITO DAS FISALINAS SOBRE NA PRODUÇÃO LOCAL DE CITOCINAS HIPERALGÉSICAS

Nesse experimento, foi avaliado se o efeito observado pela mistura de fisalinas e pela fisalina F na hiperalgesia e edema, induzidos pelo CFA, envolveria redução dos níveis locais de citocinas hiperalgésicas TNF $-\alpha$ e IL-1 β . Os resultados mostrados na Figura 24 evidenciaram que a administração da mistura de fisalinas, bem como da fisalina F (100 mg/kg), reduziu significativamente os níveis de TNF $-\alpha$ (Figura 24A), mas não de IL-1 β (Figura 24B) nas patas inflamadas, após 02 horas da injeção do estímulo do CFA, quando comparadas com o grupo controle.

Figura 24: Efeito das fisalinas sobre na produção local de citocinas hiperalgésicas.

A figura representa os níveis de TNF α (A) e de IL-1 β (B) na pata inflamada medidos 02 horas após a injeção de CFA (registro inicial). A mistura de fisalinas (*Pool*) e a fisalina F (100 mg/kg) ou veículo (CTRL - DMSO 5%+ Tween 20 5%/salina, grupo controle) foram administrados 40 minutos antes da injeção do CFA. Dados foram expressos como média \pm E.P.M. de 6 camundongos por grupo. * significância estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), como determinado pelo teste de ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey.



5.7 EFEITO DAS FISALINAS NA EXPRESSÃO GÊNICA DE MEDIADORES HIPERALGÉSICOS

Nesse experimento, o efeito das fisalinas sobre a modulação da expressão gênica de importantes mediadores de dor e inflamação foi avaliada por PCR em tempo real. Os resultados obtidos demonstraram que a mistura de fisalinas e a fisalina F nas doses avaliadas, não modificaram a expressão gênica local de TNF α (Figura 25A), IL-1 β (Figura 25B), IL-6 (Figura 26A), IL-10 (Figura 26B) e COX-2 (Figura 27), embora uma tendência de redução da expressão de TNF α tenha sido observada.

Figura 25: Efeito das fisalinas na expressão gênica de mediadores hiperalgésicos TNF – α e IL-1 β . A expressão gênica de TNF – α (A) e IL-1 β (B) na pata inflamada medidos 02 horas após a injeção de CFA (registro inicial). A mistura de fisalinas (*Pool*) e a fisalina F (100 mg/kg) ou veículo (CTRL - DMSO 5%+ Tween 20 5%/ salina, grupo controle) foram administrados 40 minutos antes da injeção do CFA. Dados foram expressos como média \pm E.P.M. de seis camundongos por grupo. * significância estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), como determinado pelo teste de ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey.

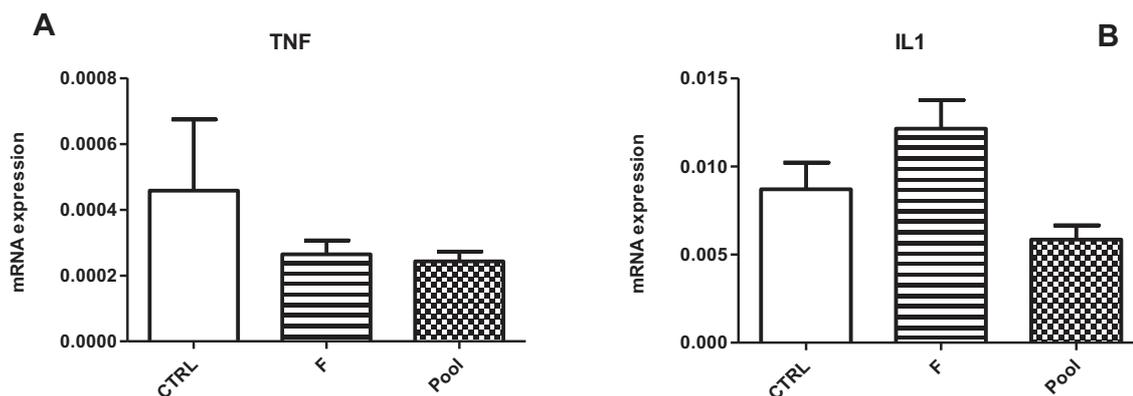


Figura 26: Efeito das fisalinas na expressão gênica de mediadores hiperalgésicos IL-6 e IL-10. A expressão gênica de IL-6 (A) e IL-10 (B) na pata inflamada medidos 02 horas após a injeção de CFA (registro inicial). A mistura de fisalinas (*Pool*) e a fisalina F (100 mg/kg) ou veículo (CTRL - DMSO 5%+ Tween 20 5%/ salina, grupo controle) foram administrados 40 minutos antes da injeção do CFA. Dados foram expressos como média \pm E.P.M. de seis camundongos por grupo. * significância estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), como determinado pelo teste de ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey.

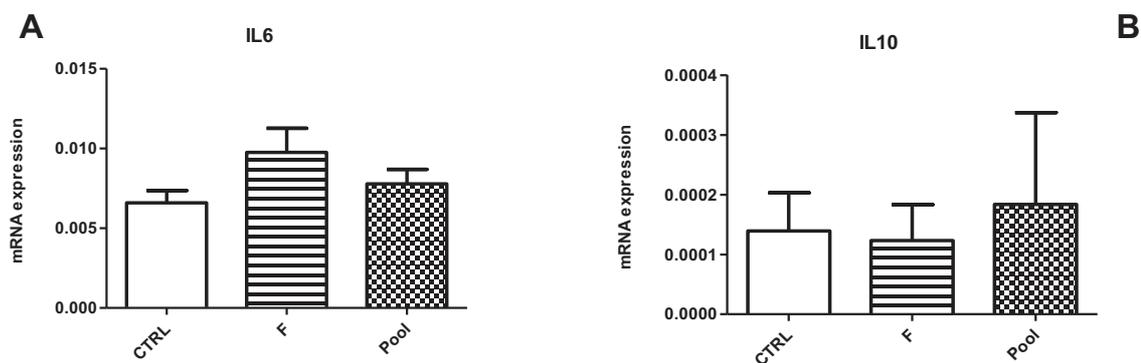
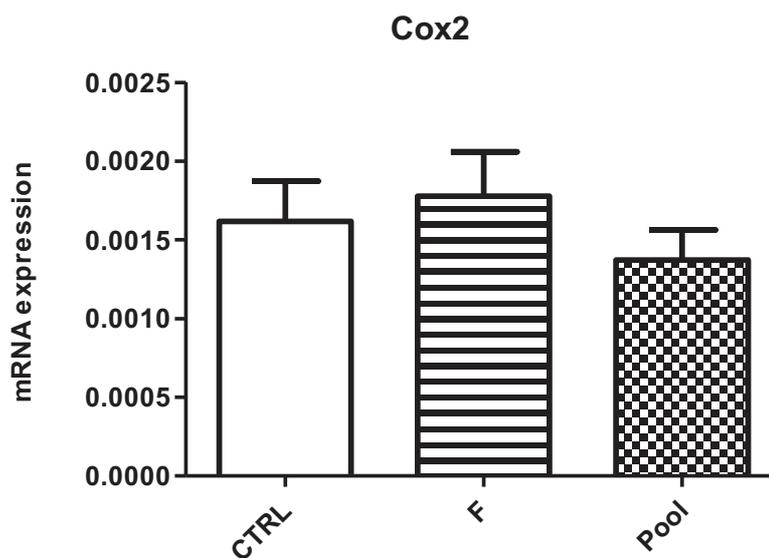


Figura 27: Efeito das fisalinas na expressão gênica de COX-2. A expressão gênica de COX na pata inflamada medidos 02 horas após a injeção de CFA (registro inicial). A mistura de fisalinas (*Pool*) e a fisalina F (100 mg/kg) ou veículo (CTRL - DMSO 5%+ Tween 20 5%/ salina, grupo controle) foram administrados 40 minutos antes da injeção do CFA.. Dados foram expressos como média \pm E.P.M. de seis camundongos por grupo. * significância estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), como determinado pelo teste de ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey.



6. DISCUSSÃO

Esse estudo demonstrou que as fisalinas B, G e D ou sua mistura possuem relevante atividade antinociceptiva, provavelmente dissociada de atividade antiinflamatória, em doses que não induzem toxicidade aparente e déficits motores. Em adição, a fisalina F induziu antinocicepção com componente antiinflamatório, associada à redução da liberação da citocina hiperálgica TNF- α . Esses resultados apontam para uma possível nova atividade farmacológica das fisalinas reforçando seu potencial para o desenvolvimento de fármacos.

A administração intraperitoneal das fisalinas puras ou sua mistura promoveu efeito antinociceptivo no teste de contorções abdominais induzido pelo ácido acético. Estudos com o extrato aquoso obtido da raiz de *Physalis angulata* corroboram com esse resultado, pois se evidenciou uma inibição significativa na resposta nociceptiva visceral induzida pelo ácido acético em tratamento por via intraperitoneal e por via oral (BASTOS et al., 2006). O teste de contorções é muito utilizado como modelo de triagem para a avaliação e busca de propriedades analgésicas e antiinflamatórias de novas substâncias, descrevendo um modelo típico de dor visceral. O ácido acético promove, em nível celular, a ativação de canais catiônicos não seletivos, localizados principalmente na pele e vísceras (LAPA et al., 2009), induzindo um comportamento nociceptivo caracterizado pela contorção do abdômen. Apesar desse teste ser uma boa ferramenta nos ensaios farmacológicos, possui baixa especificidade (COLLIER, DINNEEN et al., 1968). Dessa forma, para a confirmação da atividade antinociceptiva, o teste de contorções foi seguido pelo teste da formalina.

O teste da formalina possui interpretação em duas fases distintas, que caracterizam tipos diferentes de dor (HUNSKAAR e HOLE, 1987). A primeira fase, dita fase inicial, refere-se à resposta nociceptiva com estimulação direta dos nociceptores. A segunda fase, tardia, envolve um período de sensibilização durante o qual a inflamação ocorre, e parece ter um componente periférico e um de sensibilização central (LE BARS et al., 2011). Analgésicos opióides inibem ambas as fases, embora a segunda fase seja mais sensível. Por outro lado, AINES suprimem apenas a segunda fase do teste (HUNSKAAR e HOLE, 1987; SHIBATA et al., 1989; MALMBERG e YAKSH, 1992; JOURDAN et al., 1997). Dessa forma, o teste da formalina, pode determinar não somente a propriedade antinociceptiva, como

também orientar quanto aos possíveis mecanismos envolvidos (SHIBATA, OHKUBO et al., 1989). A mistura de fisalinas, assim como as fisalinas purificadas apresentaram atividade antinociceptiva apenas na fase tardia do teste de formalina, sugerindo que o efeito antinociceptivo pode decorrer da interferência com a sensibilização do nociceptor, como ocorre com os antiinflamatórios. Corroborando esses achados, estudo relacionado evidenciou uma inibição do comportamento nociceptivo no teste da formalina apenas na fase tardia em animais tratados com extrato aquoso da planta *Physalis angulata* (BASTOS et al., 2006). Em concordância, estudos com o extrato metanólico das flores de *P. angulata* não evidenciaram atividade no modelo de placa quente, específico para drogas analgésicas de ação central, fortalecendo, então, a orientação a uma possível ação periférica das fisalinas (CHOI e HWANG, 2003).

Como nos testes nociceptivos o comportamento nociceptivo é caracterizado por uma resposta motora, a avaliação da integridade da função motora é fundamental para validar os resultados. As fisalinas nas maiores doses testadas nos ensaios nociceptivos, não induziram nenhuma alteração no desempenho motor dos animais, medida pela locomoção e coordenação motora nos testes de open field e rota rod. Em posse desses resultados, se valida a especificidade do efeito antinociceptivo das fisalinas.

Considerando que a ação antiinflamatória das fisalinas já foi demonstrada (SOARES et al., 2003; SOARES et al., 2006; VIEIRA et al., 2005; BRUSTOLIM et al., 2010; PINTO et al., 2010) , e que o efeito antinociceptivo dessas moléculas teve um perfil semelhante ao dos AINES no teste da formalina, a relação entre as propriedades antinociceptiva e antiinflamatória das fisalinas foi então investigada. Para tal, estudamos os efeitos das fisalinas em um modelo experimental clássico usado na seleção de novos antiinflamatórios: a inflamação na pata induzida por CFA. O CFA consiste em uma suspensão em óleo mineral de micobactéria que produz uma inflamação crônica característica em roedores. Representa, dessa forma, um modelo de inflamação persistente e duradoura, resultando em edema e hiperalgesia inflamatória associada à ativação de nociceptores periféricos e liberação local de mediadores inflamatórios, como citocinas e prostanoídes, intimamente relacionados à sensibilização das vias nociceptivas (LARSON et al., 1985; BARROS et al., 2010; DE LIMA, et al., 2010).

A mistura de fisalinas, assim como as fisalinas B e F inibiram a formação do edema com um efeito observado até 04 horas após a injeção do agente inflamatório. Esses resultados estão de acordo com os dados da literatura, que indicam ação antiinflamatória de fisalinas. Em modelos de edema de pata induzido por carragenina e edema de orelha induzido pelo ácido araquidônico, o extrato das flores de *P. angulata* demonstrou uma efeito inibitório até a terceira hora (CHOI e HWANG, 2003). Em adição, estudos recentes revelaram que a fisalina F induz diminuição do edema de pata em modelo de artrite induzido pelo colágeno com mecanismo distinto dos glicocorticóides (BRUSTOLIM et al., 2010). Corroborando essa ação antiinflamatória, fisalinas B e F, extraídas de *Witheringia solanacea*, inibiram a ativação de NF-kB (JOCABO-HERRERA et al., 2006), fator de transcrição chave na regulação da resposta inflamatória e dor.

Além do edema, a hiperalgesia é outro parâmetro da inflamação por CFA. No presente estudo, apenas a mistura de fisalinas e a fisalina F apresentaram efeito antinociceptivo no modelo do CFA. As fisalinas B, D e G não reduziram o comportamento nociceptivo nesse modelo de dor inflamatória. Esses resultados indicam que, pelo menos, para as fisalinas B, D e G, a ação inflamatória não é o principal determinante do efeito antinociceptivo. De fato, já foi demonstrado que a fisalina D não possui atividade antiinflamatória (SOARES et al., 2003; SOARES et al., 2006; JACOBO-HERRERA et al., 2006), mas tem outras propriedades farmacológicas como ação antimalárica (SÁ et al., 2011).

Com o objetivo de entender os mecanismos envolvidos na ação antinociceptiva da fisalina F em condições inflamatórias, sua possível interferência na produção de citocinas foi avaliada. Na análise das citocinas pró-inflamatórias, tanto a mistura (*pool*) quanto a fisalina F foram capazes de reduzir os níveis locais de TNF- α , mas não de IL-1 β e IL-6. Corroborando esses dados, Soares et al. (2003) demonstraram que, *in vitro*, a fisalina F induz diminuição da ativação de macrófagos e, por conseqüência, redução na produção de NO e citocinas pró-inflamatórias. Em adição, outro estudo em modelo de isquemia intestinal validou que há uma diminuição dos níveis de TNF- α em animais tratados com as fisalinas F e B. Durante o processo inflamatório há o reconhecimento celular, seguido da liberação de mediadores importantes para o processo de propagação e manutenção da inflamação, sendo as citocinas, os principais agentes mediadores (DINARELLO, 2000). Atualmente é bem aceito que as primeiras citocinas formadas

após lesão tecidual são TNF- α e IL-1 β , as quais atuam de forma direta sobre os nociceptores e levam à síntese de outros mediadores hiperalgésicos (DE OLIVEIRA et al., 2011). Tem sido demonstrado que a hiperalgesia inflamatória envolve uma cascata de citocinas, sobretudo TNF- α , IL-1 β e IL-6, que contribuem para o aparecimento e manutenção da dor (LORAM et al., 2007; CUNHA et al., 2004; LARSON et al., 1985). Antagonistas de citocinas reduzem a hiperalgesia inflamatória em roedores, indicando que a ativação de citocinas é um passo importante no desenvolvimento da dor inflamatória (CUNHA et al., 2003). De fato, a injeção local de TNF- α produz hiperalgesia, que é dependente de prostanoídes (FERREIRA et al., 1988; CUNHA et al., 1992). No presente trabalho, descrevemos que a fisalina F produz efeito antinociceptivo paralelo à redução dos níveis de TNF- α . Considerando o papel chave dessa citocina na dor inflamatória, a redução da produção de TNF- α pode contribuir, pelo menos parcialmente, para o efeito antinociceptivo da fisalina F aqui descrito. Baseado no fato de que o TNF- α regula positivamente a expressão de COX-2 e a produção de prostaglandinas envolvidas na sensibilização nociceptiva (CUNHA et al., 2005; VERRI JUNIOR et al., 2006; KRAYCHETE et al., 2006), a influência da fisalina F sobre a expressão de COX-2 foi investigada. Os resultados mostram que a fisalina F não foi capaz de modificar o perfil de expressão de COX-2, indicando que a via COX-2/PG possivelmente não contribuiria para a ação antinociceptiva dessa fisalina.

Além das citocinas pró-inflamatórias, o estímulo inflamatório induz também a liberação de citocinas antiinflamatórias, como IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- β , responsáveis pela modulação da resposta. Citocinas antiinflamatórias, inibem a produção de outras citocinas e mediadores finais de hiperalgesia, de modo que o balanço entre citocinas pró e antiinflamatórias pode definir a intensidade da hiperalgesia (VERRI JUNIOR et al., 2006; BALKOWIEC-ISKRA, E., 2010; DE OLIVEIRA, C.M. et al., 2011; POOLE et al., 1995, CUNHA et al., 1999). A IL-10 é uma citocina antiinflamatória que inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α (FIORENTINO et al., 1991; KASAMA et al., 1995). Além disso, IL-10 inibe a hiperalgesia induzida pela administração local de TNF- α (POOLE et al., 1995). Dessa forma, buscando entender o mecanismo de ação da fisalina F, seu efeito sobre a expressão de IL-10 foi investigado. Demonstramos, no entanto, que a produção local de IL-10 não foi alterada pelo tratamento com fisalina F, descartando a contribuição dessa citocina para a antinocicepção dessa molécula. É possível que

outras citocinas anti-inflamatórias contribuam para os efeitos antinociceptivos da fisalina F, mas esta hipótese precisa ser investigada.

Em conclusão, apesar das evidências de que o componente antiinflamatório das fisalinas poderia ser o principal determinante da ação antinociceptiva, essa hipótese não se confirmou. Pelo contrário, nas doses antinociceptivas apenas a fisalina F mostrou atividade antiinflamatória, que parece decorrer da redução dos níveis de TNF- α . Por outro lado, os efeitos da fisalina F nos testes de contorções e formalina foram maiores e obtidos com menores doses do que o efeito observado no modelo de dor inflamatória por CFA, sugerindo que o componente antiinflamatório explica apenas parcialmente sua ação antinociceptiva. Para as fisalinas D, B e G o efeito antinociceptivo não foi acompanhado por ação antiinflamatória, o que evidencia uma nova propriedade farmacológica dessas moléculas, ainda não descrita: a ação antinociceptiva.

Um ponto relevante à discussão é a possível relação estrutura-atividade. Aparentemente, o esqueleto carbônico, derivado esteroidal, é importante para a atividade antinociceptiva das fisalinas. Isso é sugerido pelo fato de todas as fisalinas com atividade antinociceptiva apresentarem essa estrutura em comum. Em adição, o substituinte epóxido, presente apenas na fisalina F pode contribuir para a ação antiinflamatória dessa molécula, que não foi observada para as demais fisalinas. De fato, sabe-se que estudos de correlação entre a estrutura e atividade biológica representam importante ferramenta para a química medicinal na determinação dos fatores envolvidos na atividade das moléculas de interesse (FILHO, 2001). Além disso, não se pode descartar a possibilidade do envolvimento do metabolismo das substâncias *in vivo*. No entanto, essa avaliação exige o emprego de técnicas analíticas sensíveis e eficazes, não exploradas nesse trabalho.

Do ponto de vista de planejamento de fármacos, um importante dado do presente estudo foi o fato da mistura de fisalinas preservar as propriedades farmacológicas das fisalinas puras. Sabe-se que, dada a similaridade estrutural entre as fisalinas B, D, G e F, a purificação e separação desses compostos torna-se de difícil execução. Dessa forma, como a atividade observada em mistura parece semelhante àquela vista pelas fisalinas puras, entende-se que a mistura *per se* já apresenta atividade e que o efeito antinociceptivo não é mascarado ou diminuído pela presença das outras moléculas. Tem sido sugerido que a pureza de uma substância pode não estar necessariamente relacionada à sua atividade biológica

(JAKI et al., 2008), de fato, no caso das fisalinas, a mistura e as moléculas puras apresentam o mesmo perfil de ação. Essa observação indica que, no futuro, o pool pode ser utilizado para o desenvolvimento de medicamentos, eliminando a dispendiosa etapa de purificação.

Em resumo, o presente estudo demonstrou, pela primeira vez, que as fisalinas possuem efeito antinociceptivo, contribuindo para a validação do uso etnofarmacológico dos extratos de *Physalis angulata* para fins de analgesia. De acordo com os dados apresentados aqui, é provável que para a fisalina F, essa atividade esteja parcialmente relacionada à ação antiinflamatória e redução dos níveis de TNF- α , enquanto que para as fisalinas B, D e G outros mecanismos devem estar envolvidos. Esse trabalho estimula novas investigações sobre o potencial terapêutico das fisalinas no controle da dor, assim como sobre os mecanismos envolvidos nas ações farmacológicas das fisalinas.

CONCLUSÕES

Com os resultados apresentados e discutidos nesse trabalho, conclui-se que:

- A mistura de fisalinas e as fisalinas isoladas B, G, D e F apresentam atividade antinociceptiva em modelos experimentais de dor;
- Nas doses testadas, as fisalinas não induziram alterações da função motora;
- A mistura de fisalinas e a fisalina F, mas não as fisalinas B, D e G, apresentam atividade antinociceptiva e antiinflamatória em modelo experimental de inflamação;
- As fisalinas B, G e D apresentaram atividade antinociceptiva, possivelmente dissociada da atividade antiinflamatória;
- A atividade antinociceptiva da fisalina F pode decorrer, pelo menos parcialmente, do seu efeito antiinflamatório, com o mecanismo associado à inibição de TNF- α ;
- A produção de IL-10 e a inibição da via COX-2/PGs possivelmente não estão envolvidas na ação antinociceptiva nos modelos descritos;

REFERÊNCIAS

- ABE, F.; NAGAFUJI, S.; OKAWA, M.; KINJO, J. Trypanocidal Constituents in Plants. Minor Withanolides from the Aerial Parts of *Physalis angulata*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 54, n. 8, p.1226-1228, 2006.
- ALMEIDA, T. F., ROIZENBLATT, S., TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**, v. 1000, p. 40-56, 2004.
- APKARIAN, A. V.; BALIKI, M. N. Towards a theory of chronic pain. **Progress in Neurobiology**, v.87, n.2, p 81-97, 2009.
- BALKOWIEC-ISKRA, E. The role of immune system in inflammatory pain pathophysiology. **Pol. Merkur Lekarski**, v.9, n.174, 2010.
- BARREIRO, E. J.; DA SILVA, J. F. M.; FRAGA, A. M. Noções básicas do metabolismo de fármacos. **Química Nova**, v.19, n.6, p.641-650, 1996.
- BARROS T. A. A.; DE FREITAS, L. A. R.; FILHO, M. B. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of 7-hydroxycoumarin in experimental animal models: potential therapeutic for the control of inflammatory chronic pain. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.62, n.205-213, 2010.
- BASBAUM, A. I. e WOOLF, C. **Journal of Pain Curr. Biol.**, v9, n.12, p.429-431, 1999.
- BASTOS, G. N. T.; SILVEIRA, A. J. A. SALGADO, C. G. et al. *Physalis angulata* extract exerts antiinflammatory effects in rats by inhibiting different pathways. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, p. 246–251, 2008.
- BASTOS G. N.; SANTOS A. R.; FERREIRA V. M. et al. Antinociceptive effect of the aqueous extract obtained from roots of *Physalis angulata* L. on mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.2, n.103, p.241-5.2006.
- BONICA, J. J. **The management of pain. History of pain concepts and therapies**, v.1, p.1-17, 2010.
- BRANCH, L. C.; SILVA, M. F. D.; Folk medicine of Alter Chão, Pará, Brasil. **Acta Amazônica**, v.73, p.737, 1983.
- BRUSTOLIM D.; VASCONCELOS J. F; FREITAS, L. A. R et al. Activity of Physalin F in a Collagen-Induced Arthritis Model. **Journal of Natural Products**, v.73, n.8, p.1323-1326, 2010.
- CAILLIET, R. Dor: mecanismo e tratamento. **Artmed**, 1999.
- CALIXTO J. B; SCHEIDT, C. et al. Biology activity of plantas extracts: novel analgesic drugs. **Expert Opinion Emerging Drugs**, v.6, n.2, p.261-279, 2001.

CALIXTO, J. B; BEIRITH A. et al. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytotherapy Research**, v.14, n.6, p.401-418, 2000.

CALVINO, B.; GRILO, R. M. Central Pain Control. **Joint Bone Spine**, v.73, n.1, p.10-16, 2006.

CASHMAN, J. N. The mechanisms of action of NSAIDs in analgesia. **Drugs**, v. 52, p. 13 – 23, 1996.

CHIANG, H. C.; JAW, S. M.; CHEN, C. F.; KAN, W. S. Antitumor agent physalin F from *Physalis angulata*. L. **Anticancer Research**, v. 12, p. 837-843, 2001.

CHIANG, H. C.; JAW, S. M.; CHEN, P. M. Inhibitory effects of Physalin B and physalin F on various human leukemia cells *in vitro*. **Anticancer Research**, v. 12, p. 155–162, 1992.

CHAPMAN, C. R.; GAVRIN, J. Suffering: the contributions of persistent pain. **The Lancet**, v. 353, n. 9171, p. 2233-2237, 1999.

CHOI, E. M.; HWANG, J. K. Investigations of anti-inflammatory and antinociceptive activities of Piper cubeba, *Physalis angulata* and *Rosa hybrida*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.89, n.1, p.171-175, 2003.

CHOPADE, A. R.; MULLA, W. A. Novel strategies for the treatment of inflammatory hyperalgesia. **European Journal of Clinical Pharmacology**, 2010.

COLLIER, H. O.; DINNEEN et al. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v.32, n.2, p.295- 310, 1968.

CROFFORD, L. J.; WILDER, R. L. et al. Cyclooxygenase -1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin -1 beta, phorbol ester and corticosteroids. **Journal of Clinical Investigation**, v.93, n.3, p. 1095-1101, 1994.

CUNHA, T. M.; VERRI, W. A. et al. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA, v.102, n.5, p. 1755-1760, 2005.

CUNHA, T. M.; VERRI JUNIOR, W. A.; VIVANCOS, G. G. et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, n.3, p.401-407, 2004.

CUNHA, J. M.; SACHS, D.; CANETTI, C.; POOLE, S. et al. The critical role of leukotriene B₄ in antigen-induced mechanical hyperalgesia in immunised rats. **British Journal of Pharmacology**, v.139, n.6, p.1135-1145, 2003.

CUNHA, F. Q.; TEIXEIRA, M. M.; FERREIRA, S. H.; Pharmacological modulation of secondary mediator systems-cyclic AMP and cyclic GMP - on inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v.127, n.3, p.671-678, 1999.

- CUNHA, F. Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v.107, n.3, p.660-664, 1992.
- CUNHA, F. Q.; LORENZETTI, B. B. et al. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. **British Journal of Pharmacol**, v.104, n.3, p. 765-767, 1991.
- DAHL, J. B.; MOINICHE, S. Pre-emptive analgesia. **British Medical Bulletin**, v. 71, p. 13-27, 2004.
- DE OLIVEIRA C. M.; SAKATA, R. K.; GEROLA, L. R.; SALOMÃO, R. Cytokines and pain. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.61, n.2, p.255-259, 2011.
- DIAS, J. M. Dor: passado, presente e futuro. **Revista de anestesia regional e terapêutica da dor**, v.57, 2009.
- DINARELLO, C. A. Proinflammatory cytokines. **Chest**, v.118, n.2, p. 503-508, 2000.
- DUBNER, R.; RUDA, M. A. Activity- dependent neuronal plasticity following tissue injury and inflammation. **Trends Neurosciences**, v.15, n.3, p. 96-103, 1992.
- FERREIRA, S. H.; LORENZENTI, B. B.; BRISTOW, A. F.; POOLE, S. Interleukin-1 beta as a potente hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. **Nature**, v. 6184, n.334, p.698-700, 1988.
- FILHO, V. C.; YUNES, R. A. Estudo Químico de Plantas Medicinais Orientado para a Análise Biológica. Obtenção, Determinação e Modificação Estrutural de Compostos Bioativos. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Santa Catarina: editora ARGOS, p.47-75, 2001.
- FIORENTINO, D. F.; ZLOTNIK, A.; MOSMANN, T. R.; HOWARD, M.; O'GARRA, A. IL-10 inhibits cytokines production by activated macrophages. **Journal of Immunology**, v. 147, n.11, p.3815-1822, 1991.
- FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal Cord. **Brain Research Bulletin**, v.48, n. 2, p.129-141, 1999.
- GOODMAN e GILMAN. As bases farmacológicas da terapêutica. Rio de Janeiro, **Mc Graw Hill**, 2006.
- GUSTEIN, H. B.; AKIL, H. Analgésicos Opióides. In: GOODMAN & GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, ed.11, p. 487-526, 2006.
- GUIMARÃES, E. T.; LIMA, M. S.; SANTOS, L. A.; TOMASSINI, T. B.; RIBEIRO DOS SANTOS, R.; dos SANTOS, W. L.; SOARES, M. B. Activity of physalins purified from *Physalis angulata* *in vitro* and *in vivo* models of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 1, p. 84-87, 2009.
- SMITH, D. A.; van de WATERBEEMD, H.; WALKER, D.K. **Pharmacokinetics and metabolism in drug design**. Weinheim, Wiley- VCH Verlag GmbH & Co, p. 165-173, 2006.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K.; The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v.30, n.1, p. 103-114, 1987.

JAKE, B. U.; FRANZBLAU, S. G.; CHADWICK, L. R. et al. Purity-activity relationships of natural products: The case of anti-TB active ursolic acid. **Journal of Natural Products**, v. 71, n.10, 2008.

JACOBO - HERRERRA, N. J.; BREMNER, P. et al. Physalins from *Witheringia solanácea* as Modulators of the NF-kB Cascade. **Journal of Natural Products**, v.69, n.3, 2006.

JONES, S. L. Anatomy of pain. In: Sinatra, R. S.; HORD, A. H.; GINSBERG, B.; PREBLE, L. Acute pain: Mechanisms & Management. St. Louis: Mosby-Year Book, 1992. In: SOUZA, A. H. **Avaliação da atividade antinociceptiva espinhal da toxina Phalfa1beta isolada do veneno da *Phoneutria nigriventer* em roedores**. 2008. 146f. Tese (Doutorado em Ciências). Curso de Pós-graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2008.

JOURDAN, D. et al. A new automated method of pain scoring in the formalin test in rats. **Pain**, v.71, p. 265-270, 1997.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p.203-210, 2001.

KASAMA, T.; STRIETER, R. M.; LUKACS, N. W. et al. Interleukin-10 expression and chemokine regulation during the evolution of murine type II collagen-induced arthritis. **Journal Clinical Investigation**, v. 95, n.6, p. 2868-2876, 1995.

KASSUYA, C. A.; SILVESTRE, A. A.; REHDER, V. L.; CALIXTO, J. B. Anti-allodynic and anti-oedematogenic properties of the extract and lignans from *Phyllanthus amarus* in models of persistent inflammatory and neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**, v.478, n.2-3, p. 145-153, 2003.

KLAUMAN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILAS, T. **Pathophysiology of pain**. Archives of Veterinary Science, v. 13, n.1, p.1-12, 2008

KIDD, B. L. E URBAN, L. A. Mechanisms of inflammatory pain. **British Journal Anaesthesiology**, v.87, n.1, p 3-11, 2001.

KIPEL, A. G. B. Prevalência da dor: mitos, medos e desacertos relacionados ao uso de amangésicos opiáceos. **Texto e Contexto Enfermagem**, v.13, n.2, p. 303-308, 2004.

KRAYCHETE, D. C.; CALASANS, M. T. de A.; VALENTE, C. M. L. Citocinas pró-inflamatórias e dor. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 46, n.3, p.199-206, 2006.

LAPA, F. da R.; GADOTTI, V. M.; MISSAU, F. C. et al. Antinociceptive properties of the hidroalcoholic Extract and the Flavonoid Rutin obtained from *Polygala paniculata* L. in mice. **Journal compilation. Nordic Pharmacology Society. Basic and Clinical Pharmacology**, v.104, p. 306-315, 2009.

LARSON A. A. et al, Pain threshold changes in adjuvant-induced inflammation: a possible model of chronic pain in the mouse. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 24, p. 49-53, 1985.

LIMA, F. O.; NONATO, F. R.; COUTO, R. D. et al. Mechanisms Involved in the Antinociceptive Effects of 7- Hydroxycoumarin. **Journal of Natural Products**, v.74, p.596-602, 2011.

LIN, Y. S.; CHIANG, H. C.; KAN, W. S.; HONE, E.; SHIH, S. J.; WON, M. H. Immunomodulatory activity of various fractions derived from *Physalis angulata* L. Extract. **American Journal of Chinese Medicine Articles**, v. 20, p. 233-243, 1992.

LOESER, J. D., BLACK, R. A taxonomy of pain. **Pain**, v. 1, p. 81 – 90, 1975. In: PERISSINOTTI, D. M. N. Compreendendo o processo doloroso. A dor como traição. **Associação Brasileira de Cuidados Paliativos**, mai. 2002. Disponível em: <<http://www.cuidadospaliativos.com.br/artigo.php?cdTexto=26>>. Acesso em: 10 nov. 2011.

LOESER, J. D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **The Lancet**, v. 353, n. 9164, p.1607-1609, 1999.

LONGUI, C. A. Glucocorticoid therapy: minimizing side effects. **Jornal de Pediatria**, v.83, n.5 suppl, p.163-171, 2007.

LOPES, N. P. Química e atividade biológica da Arnica brasileira (*Lychnophora ericoides*). **Biológico**, v.65, p.67,2003.

LORAM L. C; THEMISTOCLEOUS, A.C.; FICK, L.G.; KMERMANN P.R. The time course of inflammatory cytokine secretion in a rat model of postoperative pain does not coincide with the onset of mechanical hyperalgesia. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.85, p.613-620, 2007.

LORENZI, H. **Plantas danificadas do Brasil**. Nova Odessa, São Paulo, Brasil, p.372, 1982.

MALMBERG, A. B; YAKSH, T. L. Antinociceptive actions of spinal anti-inflammatory agents on the formalin test in the rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapy**, v. 263, p.136-146, 1992.

MATTOS, W. M.; CAMPOS, M.M; FERNANDES, E. S. et al. Anti-edematogenic effects of velutinol A isolated from *Mandevilla velutina*: evidence for a selective inhibition of kinin B1 receptor-mediated responses. **Regulatory Peptides**, v.136, n.1-3, p.98-104, 2006.

MENESCAL - DE - OLIVEIRA, L. **As dores. Neurociências da Mente e do Comportamento**, Ed. Gen. Guanabara Koogan, 2008.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, v. 57, n. 1,p. 1-164, 1999.

NAGAFUJI, S.; OKABE, H.; AKAHANE, H.; ABE, F. Trypanocidal Constituents in Plants 4. Withanolides from the Aerial Parts of *Physalis angulata*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 2, p. 193-97, 2004.

NAVARRO, D.; PAMPLONA, C. R.; DE SOUZA, M. M et al. Seasonal variation and analgesic properties of different parts from *Curcuma zedoaria* Roscoe (Zingiberaceae) grown in Brazil. **Z Natuforsch C**, v. 61, , p.6-10, 2006.

NONATO, F. R.; NOGUEIRA, T. M. O.; BARROS, T. A. de A. et al. Antinociceptive and antiinflammatory activities of *Adiantum latifolium* Lam.: Evidence for a role of IL-1 inhibition. **Journal of Ethnopharmacology**, v.136, p.518-524, 2011.

NONATO, F. R.; BARROS, T. A. A. LUCHESEB, A. M.; OLIVEIRA, C. E. C. RIBEIROS DOS SANTOS, R. SORES, M. B. P. VILLARREAL, C. F. Antiinflammatory and antinociceptive activities of *Blechnum occidentale* L.extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v.125, n.1, p.10-107, 2009.

PEREIRA, D. G. Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. **Química Nova**, v. 30, n.1, p. 171-177, 2007.

PESKAR, B. M. On the synthesis of prostaglandins by human gastric mucosa and its modification by drugs. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 487, n.2, p.307-314, 1977.

POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; SELKIRK, S. LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S. H. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-10. **British Journal of Pharmacology**, v.115, n.4, p. 684-688, 1995.

PORTO, C. C. **Exame Clínico: Bases para a prática médica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

RAINOV, N. G.; HEIDECHE, V. Experimental therapies for chronic pain. **Acta Neurochirurgica Supplementum**, v. 97, p. 473-477, 2007.

RAINSFORD, K. D. Antiinflammatory drugs in the 21st century. **Sub-cellular Biochemistry**, v. 42, p. 3-27, 2007.

RANG, H. P.; DALE, M. M. **Farmacologia**, ed. Guanabara Koogan, 5 edição, 2001.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v.39, p.603-613, 2001.

ROBERT, A. Antisecretory, antiulcer, cytoprotective and diarrheogenic properties of prostaglandins. **Advances inProstaglandin Tromboxane Research**, v.2, p. 507-520, 1976.

ROCHA, A. P. C.; KRAYCHETE, D. C. et al 2007. Dor: Aspectos Atuais da Sensibilização Periférica e Central. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.57, n.1, p.94-105, 2007.

ROSE, N. R. Mechanisms of autoimmunity. **Seminars in Liver Diseases**, v.22, n.4, p.387-394, 2002.

ROSSI-BERGMANN, B. R.; COSTA, S. S.; DE MORAES, V. L. G. Brazilian medicinal plants: A rich source of immunomodulatory substances. **Ciência e Cultura**, v. 49, p. 395-401, 1997.

SÁ, M. S.; de MENEZES, M. N.; KRETTLI, A. U. et al. Antimalarial activity of physalins B, D, F and G. **Journal of Natural Products**, v.74, n.10, p.2269-2272, 2011.

SÁ, K.; BAPTISTA, A. F. et al. Prevalence of chronic pain and associated factors in the population of Salvador, Bahia. **Revista de Saúde Pública**, v.43, n.4, p.622-630, 2009.

SANTOS, J. A. A.; TOMASSINI, T. C. B.; XAVIER, D. C. D et al. Molluscicidal activity of *Physalis angulata* L. extracts and fractions on *Biomphalaria tenagophila* (d'Órbigny, 1835) under laboratory conditions. **Memória Instituto Oswaldo Cruz**, 98, p.425-428, 2003.

SCHAIBLE, H. G.; RICHTER, F. Pathophysiology of pain. **Langenbeck's Archives of Surgery**, v. 389, p. 237-243, 2004.

SHIBATA, M. T.; OHKUBO et al. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, v.38, n.3 p. 347-352, 1989.

SOARES, M. B. P.; BRUSTOLIM, D.; SANTOS, L. A. et al. Physalins B, F and G, seco-steroids purified from *Physalis angulata* L., inhibit lymphocyte function and allogeneic transplant rejection. **International Immunopharmacology**, v.6, p. 408-414, 2006.

SOARES, M. B. P.; BELLINTANI, M. C.; RIBEIRO, I. M.; TOMASSINI, T. C. B.; RIBEIRO DOS SANTOS, R. Inhibition of macrophage activation and lipopolysaccharide-induced death by seco-steroids purified from *Physalis angulata* L. **European Journal of Pharmacology**, v. 459, n.1, p.107-112, 2003.

SOUZA, P. J. C.; ROCHA, J. C. S.; PESSOA, A. M. et al. Estudo preliminar de atividade antiinflamatória de *Bryophillum calycinum* Salisb. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, p.60-64, 2005.

STRASSELS, S. A. et al. Pharmacotherapy of pain in older adults. **Clinics of Geriatric Medicine**, v.24, p.97-120, 2008.

SUN L.; LIU, J.; CUI, D. Anti-Inflammatory Function of Withangulatin A by Targeted Inhibiting COX-2 Expression via MAPK and NF-kB Pathways. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.109, p.532-541, 2010.

TAPIERO, H.; BA, G. N. et al. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.56, n.5, p.215-222, 2002.

TEIXEIRA, M. J. e OKADA, M. **A dor na antiguidade: da punição dos deuses à qualidade sensorial**. São Paulo, Lemos, 2001.

TOMASSINI, C. B.; BARBI, N. S.; RIBEIRO, I. M.; XAVIER, D. C. D. Gênero Physalis- Uma revisão sobre vitaesteróides. **Química Nova**, v. 23, n.1, p. 47-57, 2000.

VERRI, W. A. Jr.; CUNHA, et al. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development?. **Pharmacology Therapy**, v.112, n.1, p. 116-138, 2006.

VIEIRA, A. T.; PINHO, V.; LEPSCH, L. B.; SCAVONE, C.; RIBEIRO, I. M.; TOMASSINI, T.; RIBEIRO DOS SANTOS, R.; SOARES, M. B. P.; TEIXEIRA, M. M.; SOUZA, D. G. Mechanisms of the anti-inflammatory effects of the natural secosteroids physalins in a model of intestinal ischaemia and reperfusion injury. **British Journal of Pharmacology**, v. 146, p. 244-251, 2005.

VITOR, A. O.; DA PONTE, E. L.; SOARES, P. M. et al. Psicofarmacologia da dor: uma revisão bibliográfica **Eletr. de Com. Inf. Inov. Saúde**,v.2, n.1, p.87-96, 2008.

YUE, CAI-QIN; YE, J. 2007, Antinociceptive effects of the novel spirocyclopiperazinium salt compound LXM-10 in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.86, p.643-650, 2007.

WINTER C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antinflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology**, v.111, n.6, p.544-547, 1962.