

Niraldo Paulino

**ANÁLISE FARMACOLÓGICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE
Phyllanthus urinaria E DE ALGUNS DE SEUS CONSTITUINTES
SOBRE A TRAQUÉIA ISOLADA DE COBAIA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Florianópolis, agosto de 1996 .

"ANÁLISE FARMACOLÓGICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DO
Phyllanthus urinaria E DE ALGUNS DE SEUS CONSTITUINTES
SOBRE A TRAQUÊIA ISOLADA DE COBAIA"

POR

NIRALDO PAULINO

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:

Banca Examinadora:

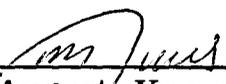

João Batista Calixto

(FMC/UFSC-Orientador)

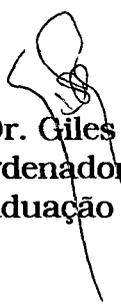


Nestor Schor

(UNIFESP/SP-Membro Titular)


Rosendo Augusto Yunes

(QMC/UFSC-Membro Titular)


Prof. Dr. Giles Alexander Rae
Coordenador do Curso de
Pós-Graduação em farmacologia

Florianópolis, agosto de 1996.

PAULINO, Niraldo. *Análise farmacológico do extrato hidroalcoólico de Phyllanthus urinaria e de seus constituintes sobre a traquéia isoalda de cobaia*. Florianópolis, 1996. 156 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto

Defesa: 27/08/1996.

O extrato hidroalcoólico (EH) de [*Phyllanthus urinaria*] (3 a 10.000 µg/ml) induziu [contração] concentração-dependente da traquéia isolada de cobaia sem epitélio. A [contração] induzida pelo EH foi antagonizada pela indometacina, dependente de [cálcio extracelular], sensíveis ao vermelho de rutênio e aos antagonistas dos receptores NK₁ e NK₂ das [taquicininas], FK888 e SR 48968, respectivamente. Compostos isolados do *P. urinaria*, [quercetina], [rutina], e [geranin], também produziram [contração] das preparações traqueais. Essa [contração] foi dependente de [cálcio extracelular] mas insensível ao vermelho de rutênio e ao FK 888 e SR 48968. O EH também induz efeito relaxante sobre a musculatura lisa da traquéia quando administrado nas concentrações de (0,1 a 10 mg/ml). Esse [relaxamento] demonstrou ser mediado por ativação de [canais de potássio] sensíveis a glibenclamida e a carlbdoxina, e parcialmente mediado por ativação de receptores [β-adrenérgicos] e VIPérgicos. Do *P. urinaria* foi isolado três compostos com atividade relaxante sobre o músculo liso da traquéia, o [ácido gálico], [galato de metila] e [galato de etila]. A resposta relaxante ao [ácido gálico] demonstrou ser dependente do epitélio, enquanto aos galatos não. O [relaxamento] produzido pelo [galato de metila] ou [gaiato de etila] em traquaéla de cobaia sem epitélio foi mediado por ativação direta de [canais de potássio], em especial os [canais de potássio] de alta condutância ativados por cálcio. Em conclusão podemos demosntrar que o extrato hidroalcoólico de *P. urinaria* pode induzir [contração] seguida de [relaxamento] do músculo liso traqueal, por mecanismos distintos e complementares, que envolvem vários sistemas efetores, e que ainda não foram isolados ou testados os compostos que atuam sobre o sistema vanilóide ou taquicinérgicos, mas há evidências que os gaiatos de metila e etila possam mediar, pelo menos em parte, as respostas relaxantes induzidas pelo EH. Contudo é possível que o efeito final do extrato seja decorrente da mistura de todos os compostos presentes na planta.

[*Phyllanthus urinaria*], [contração], [prostanóides], [taquicininas], [vanilóides], [quercetina], [rutina], [geranin], [cálcio extracelular], [relaxamento], [canais de potássio], [β-adrenérgico], [VIP], [ácido gálico], [gaiato de metila], [gaiato de etila], [canais de potássio de alta condutância ativados por cálcio].

“ Vulgar é o ler, raro o refletir. O saber não está na ciência alheia, que se absorve, mas principalmente, nas idéias próprias, que se geram dos conhecimentos absorvidos, mediante a transmutação por que passam, no espírito que os assimila. Um sabedor não é um armário de sabedoria armazenada, mas transformador reflexivo de aquisições digeridas.”

Rui Barbosa

Dedicatória

Dedico esta dissertação à minha família, e à família de minha esposa pelo apoio e incentivo, sem os quais eu não teria prosseguido nesta caminhada.

Dedicatória Especial

Dedico esta dissertação à minha esposa Amarilis e a minha filha Amabile, que mesmo nos momentos de ausência sempre estiveram presentes na minha vida, e sem as quais nada do que fiz teria realmente valido a pena.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Batista Calixto, que foi orientador, conselheiro e amigo, e ao qual eu devo grande parte de todo o trabalho que fiz.

À todos os professores do Departamento de Farmacologia da UFSC, que me receberam e ajudaram no aprendizado da farmacologia durante este período.

Aos Professores do Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da UFSC, em especial os Profs. Rosendo A. Yunes, Moacir G. Pizzolatti, Obdulio G. Miguel, e do Departamento de Química da Univale, Valdir Cechinel Filho, que nos forneceram os extratos vegetais e produtos isolados para os ensaios farmacológicos.

À todos os colegas do curso de pós-graduação, que durante todo esse período foram a minha segunda família.

Carinho especial às colegas Vania Ferreira e Daniela Cabrini, pelo incentivo e amizade, e a Dr. Tania Pasa pelo apoio para continuar no caminho científico.

À todos os técnicos e funcionários do departamento, pelo apoio e atenção, especialmente à Rosana Ostrosky.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

E à todas as pessoas que direta ou indiretamente participaram da realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
1 - INTRODUÇÃO	02
2 - OBJETIVOS	26
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 - Preparação do extrato bruto	27
3.2 - preparação do tecido	28
3.3 - Procedimento experimental	31
3.3.1 - Efeito contrátil induzido pelo EH de <i>Phyllanthus urinaria</i>	31
3.3.2 - Efeito contrátil induzido pelos compostos isolados do EH do <i>Phyllanthus urinaria</i>	33
3.3.3 - Efeito relaxante induzido pelo EH de <i>Phyllanthus urinaria</i>	34
3.3.4 - Efeito relaxante induzido pelos compostos isolados do <i>Phyllanthus urinaria</i>	36
3.3.5 - Determinação dos níveis de AMPc e GMPc na traquéia de cobaia	38
3.4 - Drogas e reagentes	39
3.5 - Análise estatística	41
4 - RESULTADOS	42
4.1 - Efeito contrátil induzido pelo EH de <i>Phyllanthus urinaria</i>	42
4.2 - Efeito contrátil induzido pelos compostos isolados do EH do <i>Phyllanthus urinaria</i>	50
4.2.1 - Quercetina	50

4.2.2 - Rutina _____	53
4.2.3 - Geranin _____	56
4.3 - Efeito relaxante induzido pelo EH de <i>Phyllanthus urinaria</i> _____	59
4.4 - Efeito relaxante induzido pelos compostos isolados do EH de <i>Phyllanthus urinaria</i> _____	64
4.4.1 - Ácido gálico _____	64
4.4.2 - Galato de metila _____	65
4.4.3 - Gaiato de etila _____	69
4.5 - Efeito do galato de metila e do gaiato de etila sobre os níveis de AMPc e GMPc _____	73
5 - DISCUSSÃO _____	74
5.1 - Contração induzida pelo EH de <i>Phyllanthus urinaria</i> _____	74
5.2 - Contração induzida pelos compostos isolados do EH do <i>Phyllanthus urinaria</i> _____	90
5.3 - Relaxamento induzido pelo EH de <i>Phyllanthus urinaria</i> _____	95
5.4 - Relaxamento induzido pelos compostos isolados do EH de <i>Phyllanthus urinaria</i> _____	106
6 - RESUMOS E CONCLUSÕES _____	112
7 - ABSTRACT _____	117
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	122

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
FIGURA 1 - Leonhard Fuchus. Tomado de sua obra de 1542 _____	4
FIGURA 2 - O Jardim Médico da Sociedade de Boticários _____	5
FIGURA 3 - Cobertura verde do planeta terra _____	8
FIGURA 4 - Vista geral do <i>Phyllanthus urinaria</i> _____	12
FIGURA 5 - Vista de um ramo lateral do <i>Phyllanthus urinaria</i> _____	12
FIGURA 6 - Vista geral do <i>Phyllanthus niruri</i> _____	13
FIGURA 7 - Vista de um ramo lateral do <i>Phyllanthus niruri</i> _____	13
FIGURA 8 - Compostos isolados do <i>Phyllanthus urinaria</i> _____	19
FIGURA 9 - Compostos isolados do <i>Phyllanthus niruri</i> _____	20
FIGURA 10 - Estudo farmacológico do <i>Phyllanthus urinaria</i> _____	23
FIGURA 11 - Montagem inicial das traquéias de cobaia _____	29
FIGURA 12 - Montagem para registro das respostas no polígrafo _____	30
FIGURA 13 - Resposta da traquéia de cobaia com ou sem epitélio ao extrato hidroalcoólico (EH) de <i>Phyllanthus urinaria</i> _____	43
FIGURA 14 - Resposta ao EH de <i>P. urinaria</i> na ausência ou na presença de: tetrodotoxina, indometacina, MK 571, L 655,240, WEB 2086 ou estaurosporina _____	44
FIGURA 15 - Resposta ao EH de <i>P. urinaria</i> em meio normal ou sem cálcio, e na ausência ou na presença de nicardipina ou ω -conotoxina _____	45
FIGURA 16 - Resposta ao EH de <i>P. urinaria</i> à capsaicina após dessensibilização, na ausência ou na presença de capsazepina ou vermelho de rutênio _____	47

FIGURA 17 - Resposta ao EH de <i>P. urinaria</i> na ausência ou na presença de: FK 888, SR 48968 ou na combinação de ambos _____	49
FIGURA 18 - Resposta à quercetina em meio normal ou sem cálcio, e na ausência ou na presença de cloreto de níquel, nicardipina ou ω -conotoxina _____	51
FIGURA 19 - Resposta à quercetina na ausência ou na presença de capsazepina ou vermelho de rutênio _____	52
FIGURA 20 - Resposta à quercetina na ausência ou na presença de FK 888 ou SR 48968 _____	52
FIGURA 21 - Resposta à rutina em meio normal ou sem cálcio, e na ausência ou na presença de cloreto de níquel, nicardipina ou ω -conotoxina _____	54
FIGURA 22 - Resposta à rutina na ausência ou na presença de capsazepina ou vermelho de rutênio _____	55
FIGURA 23 - Resposta à rutina na ausência ou na presença de FK 888 ou SR 48968 _____	55
FIGURA 24 - Resposta ao geranin em meio normal ou sem cálcio, e na ausência ou na presença de cloreto de níquel, nicardipina ou ω -conotoxina _____	57
FIGURA 25 - Resposta ao geranin na ausência ou na presença de capsazepina ou vermelho de rutênio _____	58
FIGURA 26 - Resposta ao geranin na ausência ou na presença de FK 888 ou SR 48968 _____	58

- FIGURA 27** - Resposta ao EH de *P. urinaria* e à cromacalina na traquéia de cobaia com ou sem epitélio, e em meio normal ou com concentrações crescentes de KCl (20, 40 e 80 mM) _____ **60**
- FIGURA 28** - Resposta ao EH de *P. urinaria* na ausência ou na presença de: tetraetilamônio, glibenclamida, apamina, L-NOARG ou azul de metileno _____ **62**
- FIGURA 29** - Resposta ao EH de *P. urinaria* na ausência ou na presença de: propranolol, [D-p-Cl-Phe⁶,Leu¹⁷]VIP ou CGRP(8-37) _____ **63**
- FIGURA 30** - Resposta ao ácido gálico na traquéia de cobaia com ou sem epitélio _____ **64**
- FIGURA 31** - Resposta ao galato de metila na traquéia de cobaia com ou sem epitélio _____ **65**
- FIGURA 32** - Resposta ao galato de metila em meio normal ou com concentrações crescentes de KCl (20, 40 e 80 mM), na ausência ou na presença de: tetraetilamônio, glibenclamida, caribdotoxina ou apamina _____ **67**
- FIGURA 33** - Resposta ao galato de metila na ausência ou na presença de: azul de metileno ou SQ 22536 _____ **68**
- FIGURA 34** - Resposta ao galato de etila na traquéia de cobaia com ou sem epitélio _____ **69**
- FIGURA 35** - Resposta ao galato de etila em meio normal ou com concentrações crescentes de KCl (20, 40 e 80 mM), na ausência ou na presença de: tetraetilamônio, glibenclamida, caribdotoxina ou apamina _____ **71**

FIGURA 36 - Resposta ao galato de etila na ausência ou na presença de: azul de metileno ou SQ 22536 _____	72
FIGURA 38 - Controle da contratilidade no músculo liso _____	75
FIGURA 39 - Neurônio sensorial terminal sensível à capsaicina ____	86
FIGURA 40 - Vias de relaxamento no músculo liso _____	97

1- INTRODUÇÃO

Estudos arqueológicos demonstraram que o ancestral mais remoto do homem era herbívoro, e vivia na copa das árvores que lhe fornecia alimento e proteção. O homem primitivo evoluiu, tornou-se predador, mas manteve sempre uma estreita ligação com a natureza que o rodeava. Essa interação foi registrada pelos primeiros artistas da época na forma de desenhos nas cavernas, que representavam a aproximação entre o homem e as plantas de seu meio ambiente.

Nessa época distante, de cerca de 2 milhões de anos até 12.000 anos a.C., as tribos eram nômades e vagavam pelo mundo em busca de alimento e proteção. A partir de 10.000 anos a.C., algumas tribos se fixaram em determinados locais onde havia maior abundância de alimento e proteção. Surgiram então as primeiras comunidades razoavelmente organizadas. Um passo decisivo para essa fixação do homem à terra, foi a domesticação de algumas espécies animais comestíveis e o domínio sobre o cultivo de algumas plantas.

O controle dos recursos naturais determinou o predomínio de certas tribos sobre as outras, e a evolução natural selecionou os mais aptos em se adaptar à natureza, e dela extrair os frutos para a sobrevivência da espécie.

Até cerca de 2.000 anos a.C., as plantas desempenhavam dois papéis fundamentais nas comunidades primitivas: eram complemento alimentar essencial, e possuíam ainda uma função

mística/religiosa/curativa, que ainda pode ser vista em algumas comunidades indígenas preservadas.

O primeiro registro do uso de plantas para fins medicinais aparece na civilização egípcia e data de cerca de 1.600 anos a.C., onde em um papiro descreve uma relação de plantas e sua utilização no tratamento de várias doenças. Apesar desse registro histórico, foi a civilização grega que mais diretamente influenciou o mundo ocidental com as obras de Hipócrates (460-377 a.C.), considerado o pai da medicina, que utilizou várias plantas na sua prática médica, e as descreve na sua "*Coleção Hipocrática*", tratando de todos os aspectos da medicina antiga, em seus 67 volumes. Há ainda as obras de Aristóteles (384-322 a.C.) e Teofrasto (370-287 a.C.) que descreveram minuciosamente as plantas que estudaram, determinando suas origens e funções.

Teofrasto, que passou a ser conhecido como o pai da botânica, chefiou a escola de Atenas, onde havia um jardim com mais de 450 espécies de plantas catalogadas, constituindo assim o primeiro jardim botânico do qual se tem registro. Nesse posto, Teofrasto desenvolveu alguns princípios, ainda hoje seguidos pelos botânicos de todo o mundo.

Todavia, a figura mais importante para o ocidente na ciência das plantas medicinais e botânica foi Dioscórides (64 d.C.), cirurgião romano, que pela primeira vez usou o termo herbário para descrever uma coletânea de plantas agrupadas, com o objetivo de estudá-las. Dioscórides acompanhou as legiões romanas nas suas campanhas vitoriosas por toda Europa e Ásia e registrou, ao longo de seu caminho,

todos os métodos e plantas utilizados pelas populações conquistadas, e compilou todas essas informações na sua obra de maior impacto intitulada "*De Materia Médica* de Dioscórides", descrevendo e ilustrando aproximadamente 500 plantas medicinais. Este manuscrito foi laboriosamente copiado durante os dezesseis séculos seguintes, servindo de base para a grande maioria dos trabalhos sobre botânica.

Somente a partir do século XVI, após a invenção da imprensa na Europa e a profusão de plágios do "herbários" original escrito por Dioscórides, é que sua influência diminuiu. Então novos trabalhos passaram a contribuir significativamente no aprimoramento do estudo botânico, como a obra "*De Historia Stirpium Commentarii Insignes*" (1542) por Leonhard Fuchus, que descreveu o gênero *Fuchsia*; e a obra "*La Historia de las Plantas*" de Valerius Cordus, publicada na Prússia em 1561.



Fig. 1: Leonhard Fuchus. Tomado de sua obra de 1542.

No final do século XVI as plantas começaram a ser objeto de uma nova análise e se iniciou um árduo esforço afim de padronizar e classificar as espécies vegetais de importância, com a formação de

grandes jardins botânicos na Europa e Estados Unidos, tais como o The Chelsea Physic Garden em Londres.



Fig. 2: O jardim médico da Sociedade de Boticários, Londres (The Chelsea Physic Garden) tal como era em 1750.

Nos séculos seguintes, com a introdução do método científico, a contribuição da natureza para a melhoria da qualidade de vida da humanidade passou a ser cada vez maior, a partir da análise criteriosa dos efeitos terapêuticos e das propriedades das plantas sobre os seres vivos, e não mais apenas pela exploração dos recursos naturais como fontes energéticas ou alimentares.

No Brasil, a grande maioria das descobertas do potencial terapêutico das plantas se deu com base no conhecimento empírico transmitido pelas gerações ao longo dos anos. Além disso, muitas plantas utilizadas popularmente tiveram sua origem junto aos povos indígenas,

habitantes desse país, e que delas faziam uso, como a ipecacuanha (*Cephaelis ipecacuanha* (Brot. A. Rich.)), o jaborandi (*Pilocarpus jaborandi*), o guaraná (*Paullinia cupana* H.B.K.), a erva de bugre (*Casearia silvestris* Swartz), entre outras. Plantas de origem européia, trazidas pelos colonizadores, também tiveram rápida difusão entre o povo brasileiro, como é o caso do funcho (*Foeniculum vulgare* Mill.), da camomila (*Matricaria chamomilla* L.), da melissa (*Melissa officinalis* L.), e da malva (*Malva sylvestris* L.). A utilização de outras plantas nativas das Américas difundiu-se devido à grande importância terapêutica a elas atribuídas pela população, como é o caso do boldo (*Peumus boldus* Mol.), a marcela (*Acchyroclines satureioides* (Lam.) DC.), e o quebra pedra (*Phyllanthus niruri* L., e *Phyllanthus urinaria* L.).

Esse conhecimento acumulado pela medicina popular permitiu o desenvolvimento ao longo dos anos de medicamentos utilizados na clínica médica, como os digitálicos, a quinina, a morfina, a atropina, etc. Contudo, somente a perfeita compreensão dos fenômenos que envolvem o cultivo, controle e utilização das plantas medicinais, ou produtos dela extraídos, nos possibilitarão a utilização plena desses recursos.

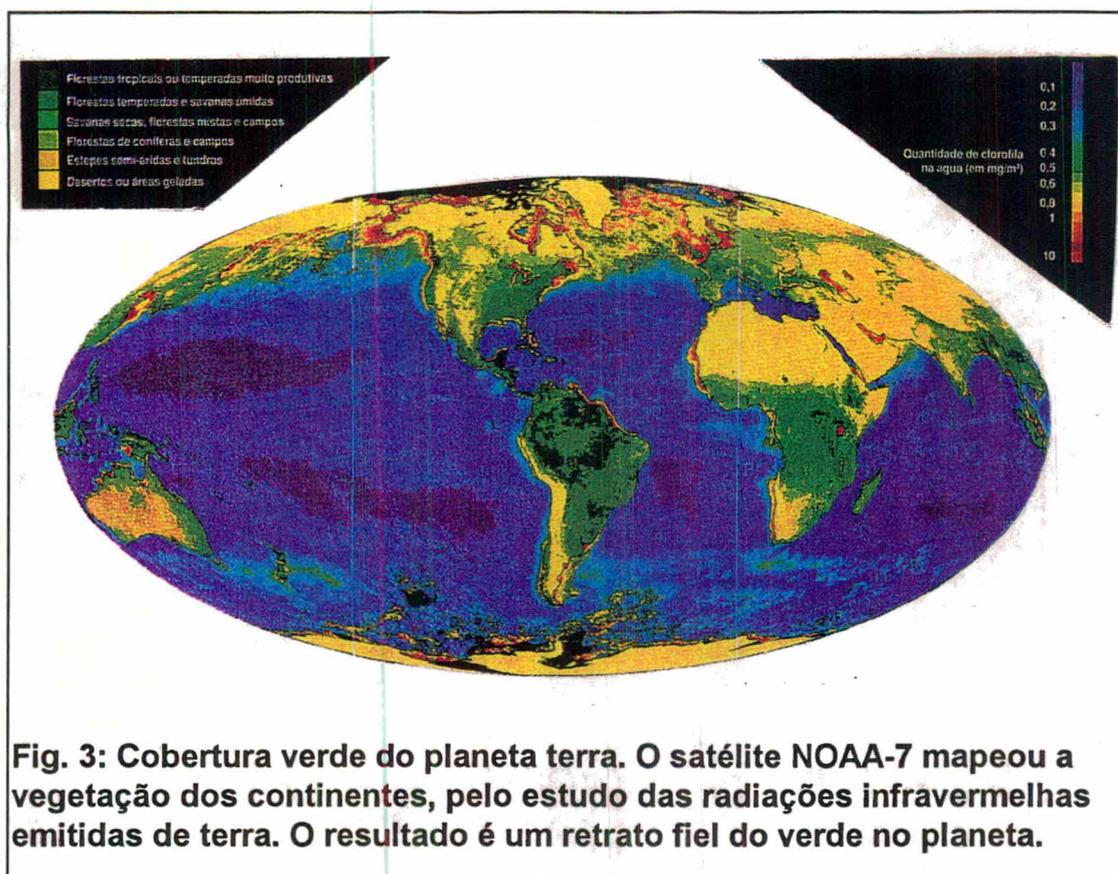
Estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) revelam que cerca de 80% da população mundial utiliza, de alguma maneira, formas medicamentosas derivadas de plantas. Os fitoterápicos de utilização popular, mais freqüentemente utilizados, são derivados de 25.000 espécies de plantas, sendo que foram catalogadas mais de 365.000 espécies. Desse total, somente cerca de 1.100 espécies já foram

estudadas como fonte de compostos biologicamente ativos, e em sua grande maioria em espécies europeias.

De toda a cobertura vegetal existente no planeta, cerca de 2/3 das espécies estão distribuídas nas florestas tropicais, de países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento da Ásia, África e América do Sul. Somente o Brasil detém aproximadamente 60.000 espécies representando um total de 20% de todas as espécies conhecidas da flora mundial, e supõe-se que existam mais de 10.000 espécies ainda não catalogadas na floresta amazônica.

A nossa responsabilidade, portanto, como potenciais fornecedores de matéria prima para o desenvolvimento da indústria de fitoterápicos, é enorme, e passa necessariamente, por uma mudança radical nas diretrizes da exploração racional, e no estudo científico das espécies com potenciais terapêuticos para a utilização clínica.

Analisando o mapa a seguir, que retrata a dispersão da cobertura vegetal sobre o planeta, vemos o Brasil estrategicamente localizado onde existe a maior concentração de florestas tropicais altamente produtivas, o que favorece a exploração econômica racional e científica desse potencial.



A legislação brasileira que trata da normatização e registro das patentes de produtos farmacêuticos e de origem vegetal foi finalmente aprovada pelo Senado, ao ser acatado o substitutivo Fernando Bezerra que inclui a lei número 9.279, de 14 de maio de 1996, reguladora dos direitos e obrigações relativos à propriedade industrial. Essa lei que foi cautelosamente aceita nos países desenvolvidos depois de consolidar as suas próprias indústrias e de dominar a tecnologia de produção, no Brasil foi aceita sem maiores discussões e com o mínimo de concessões para o país. Para citar alguns exemplos: o Japão só aceitou a lei de patentes de fármacos em 1976, quando já era o segundo maior produtor mundial de medicamentos, negociando ainda o livre acesso de seus produtos nos

países europeus e Estados Unidos. A Suíça, terceira maior indústria farmacêutica do mundo, esperou até 1978, bem como a Itália. A Espanha negociou a sua entrada na comunidade econômica européia em troca da aprovação da lei em 1986, e ainda conseguiu um prazo até 1992, com o objetivo de ampliar o seu parque industrial e seu volume de pesquisa nessa área.

Sem dúvida essa nova legislação trará benefícios, tais como atrair para o país um maior volume de capital estrangeiro a fim de implementar o parque industrial na área de fitoterápicos e de produtos naturais bioativos. Porém, a indústria de capital nacional está inexoravelmente destinada a ficar na obscuridade, e a produção científica estará cada vez mais dirigida ao complexo industrial, perdendo o seu caráter puramente acadêmico.

O desenvolvimento do estudo dos recursos naturais, portanto, mais do que uma necessidade, é uma urgência para o país. Por isso vários grupos científicos estão empenhados em projetos para determinação e caracterização da atividade farmacológica de produtos bioativos e plantas medicinais.

Seguindo as diretrizes dessa linha de trabalho, essa dissertação de mestrado procurou avaliar através de métodos farmacológicos e bioquímicos os mecanismos de ação do extrato hidroalcoólico e de alguns dos princípios isolados do *Phyllanthus urinaria* (Euphorbiaceae).

Historicamente as plantas do gênero *Phyllanthus* têm sido utilizadas no tratamento, pela medicina popular, de várias doenças, em especial

aquelas relacionadas a problemas hepáticos e renais, e estão sendo estudadas pelos cientistas em todo o mundo para se determinar as suas propriedades farmacológicas e seus constituintes químicos.

O gênero *Phyllanthus* foi criado em 1737, por Lineu, sendo descrito pela primeira vez na edição inicial do "Genera Plantarum". Trata-se do maior e mais diversificado gênero da família Euphorbiaceae, subfamília Phyllanthoideae, com aproximadamente 750 espécies distribuídas em mais de 50 seções e em pelo menos 10 subgêneros. Sua distribuição geográfica mundial é ampla, sendo encontrado em praticamente todos os continentes. Há cerca de 200 espécies distribuídas somente nas Américas, principalmente no Brasil e Caribe, como descrito por Webster (1967) e mais recentemente por Unander et al. (1990, 1991, 1992 e 1995). No Brasil várias espécies de *Phyllanthus* como o *P. tenellus*, *P. sellowianus*, *P. niruri* e *P. urinaria*, são denominados popularmente de "quebra-pedra", "erva pombinha", "arrebenta-pedras", "filanto" ou "sarandi branco" (Bacchi, 1984, Smith et al. 1988, Simões et al. 1989). Essas plantas são amplamente empregadas na medicina popular brasileira e de outros países com o propósito de facilitar a remoção de cálculos renais e/ou biliares como também para o tratamento de cistites, enfermidades crônicas da bexiga e da próstata, hidropsia, icterícia, distúrbios hepáticos e no combate à hepatite B, diabete e contra infecções dos intestinos (Perry e Metzger, 1980; Morton, 1981; Oliver-Bever, 1983; Unander et al., 1991, 1992; Bacchi, 1984; Simões et al. 1989).

Foi demonstrada a atividade do *P. niruri* sobre a formação de cálculos renais, comprovando-se em estudos pré-clínicos que a administração do chá de *P. niruri* (30 g/L de água, por um período de 42 dias) causou redução no tamanho dos cálculos de oxalato de cálcio, induzidos experimentalmente na bexiga de ratos Wistar (Santos, 1990). Nesse estudo clínico, também relatou que, em pacientes portadores de cálculo renal a administração do chá do *P. niruri* produziu um aumento no nível de filtração glomerular associado ao aumento significativo da capacidade de eliminação dos cálculos renais.

Outros ensaios comprovaram a sua ação inibitória ("*in vivo*" e "*in vitro*") contra o vírus da hepatite B (Blumberg et al. 1989; Venkateswaran et al. 1987; Thyagarajan et al., 1978), sua atividade hepatoprotetora e antiviral, descritas por Singh et al. (1989), além de ações antineoplásicas (Kupchan et al. 1978; Pettit et al. 1983, 1984, 1985, 1990).

Além disso, Higashino et al. (1992) analisaram o efeito de frações de duas plantas administradas por via oral, *Momordica charantia* e *Phyllanthus urinaria*, sobre os níveis de glicose sangüínea e na absorção da glicose em ratos diabéticos, demonstrando que a fração n-butanol foi a mais ativa para o efeito hipoglicemiante em ambas as plantas. Os autores concluíram que os compostos presentes nessa fração (moderadamente apolares) da *M. charantia* podem atuar como as sulfoniluréias, enquanto os presentes no *P. urinaria* parecem agir como as biguanidas, facilitando o metabolismo da glicose ou inibindo a sua absorção.



Fig. 4: Vista geral do *Phyllanthus urinaria*. (Foto gentilmente cedida pelas biólogas Prof^{as} Mirian Ulisséa e Leila da Graça Amaral).

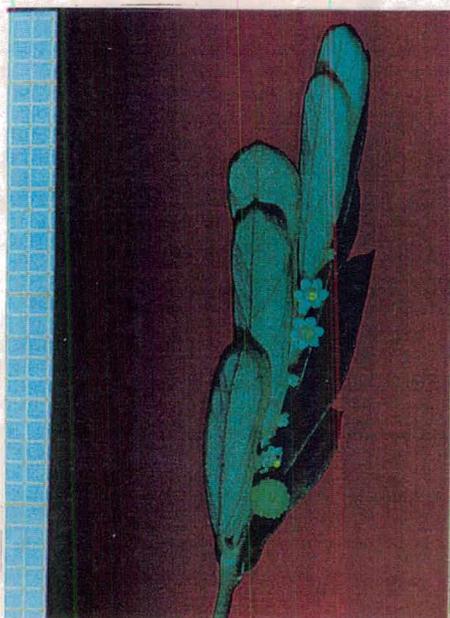


Fig. 5: Vista de um ramo lateral de *Phyllanthus urinaria* com flores masculinas e um fruto na base (Foto gentilmente cedida pelas biólogas Prof^{as} Mirian Ulisséa e Leila da Graça Amaral).



Fig. 6: Vista geral do *Phyllanthus niruri*. (Foto gentilmente cedida pelas biólogas Prof^{as} Mirian Ulisséa e Leila da Graça Amaral).

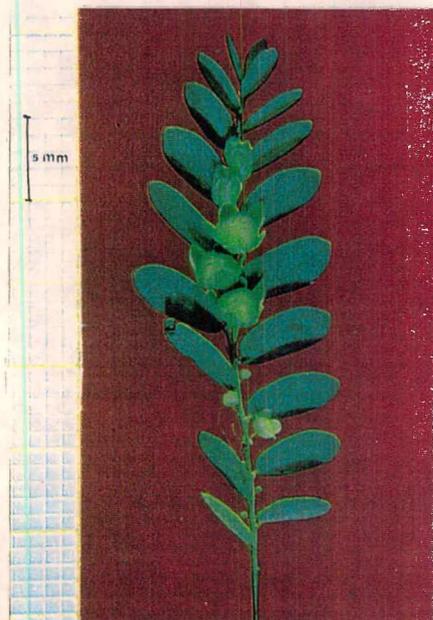


Fig. 7: Vista de um ramo lateral de *Phyllanthus niruri* com flores femininas, frutos no ápice e flores masculinas na base. (Foto gentilmente cedida pelas biólogas Prof^{as} Mirian Ulisséa e Leila da Graça Amaral).

Ji et al. (1993) demonstraram que, em células de hepatoma humano, a produção e liberação de antígeno HBs (HBsAg) diminuiu marcadamente após a incubação por 48 horas com 2-4 mg/ml de *P. urinaria*, especialmente quando administrado com 10 μ mol/L de Ara-A, droga antiviral. Suthienkul et al. (1993) analisaram várias espécies vegetais no modelo de inibição da transcriptase reversa retroviral, demonstrando que o extrato aquoso (a quente) de *P. urinaria* apresentou inibição de 91%, enquanto o extrato metanólico foi inativo. Confirmando esta atividade demonstrada para as espécies de *Phyllanthus* sobre o vírus da hepatite B, Chen (1995) demonstrou também que o *Phyllanthus niruri* apresentava esses efeitos, e era potencializada pela administração conjunta de ciprofloxacina.

Entre as espécies de *Phyllanthus* estudadas até o momento, o *P. urinaria* aparece, na maioria dos ensaios farmacológicos comparativos, como um dos mais potentes. Por exemplo, Meixia et al. (1995) testaram a eficácia do *P. amarus* produzido na Índia, *P. niruri* coletado na província de Hainan e do *P. urinaria* da província de Henan, na China, no tratamento de 88 casos de hepatite B crônica. Demonstraram que esses pacientes, quando tratados com extrato de *P. urinaria*, obtiveram maior velocidade de recuperação da doença, que aqueles que receberam as outras preparações de extratos de *P. amarus* ou *P. niruri*.

A investigação do mecanismo de ação dos extratos das plantas do gênero *Phyllanthus*, em nossos laboratórios, teve início quando Calixto et al. (1984) demonstraram pela primeira vez uma potente atividade

antiespasmódica do *P. sellowianus* relacionada a presença de um alcalóide, posteriormente identificado e denominado de filantimida (Tempesta et al., 1988). O estudo químico e farmacológico de outras espécies do gênero *Phyllanthus* prosseguiu, dentro do grupo, com a observação de um efeito analgésico produzido pelo extrato hidroalcoólico de *P. corcovadensis* (Gorski et al., 1993) e posteriormente, de outras espécies de *Phyllanthus*, incluindo o *P. niruri*, *P. tenellus*, *P. sellowianus* e *P. urinaria* em vários modelos de nocicepção em camundongos (Santos et al., 1994, 1995 a, 1995 b), sem no entanto, apresentarem efeito antiedematogênico nos modelos da formalina, dextrana ou carragenina (Santos et al., 1995a). Resultados comparativos do efeito analgésico de algumas espécies de *Phyllanthus*, demonstraram que o *P. urinaria* foi o mais potente, tanto por via oral quanto por via intraperitoneal nesses ensaios (Santos et al., 1995a). Alguns fitosteróides isolados do *P. corcovadensis* também apresentaram potente efeito antinociceptivo sistêmico, quando testados nos mesmos modelos de nocicepção em camundongos, especialmente em relação a dor de origem neurogênia (Santos et al., 1995b).

O estudo inicial dos mecanismos de ação desses extratos demonstrou que a ação analgésica, produzida pelas plantas do gênero *Phyllanthus*, não envolvia inibição da síntese dos metabólitos do ácido araquidônico, ou a participação do sistema opióide, e aparentemente indicavam um possível envolvimento do sistema taquicinérgico (Santos et al., 1995c).

Procurando entender melhor os mecanismos pelos quais o extrato de *Phyllanthus urinaria* produzia seus efeitos farmacológicos, foram realizados estudos em preparações isoladas, onde se observou que concentrações crescentes do extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus urinaria* induziam contração na bexiga de cobaia (Dias et al., 1995). Nesse estudo foi demonstrado que a contração induzida pelo extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus urinaria* envolvia ações diretas sobre a musculatura lisa do trato urinário, produzindo mobilização de cálcio extracelular, não relacionada à ativação de canais de cálcio do tipo L ou N, sensíveis à voltagem. Esse efeito também não estava relacionado à ativação direta de receptores taquicinérgicos do tipo NK₁ ou NK₂, nem tampouco de receptores vanilóides sensíveis à capsaicina (Dias et al., 1995).

A análise química dos compostos presentes no extrato do *P. urinaria* demonstrou a presença de flavonóides como a astragalina, quercetina, quercitrina, isoquercitrina e rutina (Nara et al. 1977). Enquanto, Yao e Zuo (1993), também estudando essa planta, isolaram e identificaram o kaempferol e o daucosterol, além de dois novos compostos fenólicos denominados de carboxilato de metil brevifolin e o ácido dehidrochebulico trimetil éster. Nesse trabalho ainda foram descritos 8 compostos já conhecidos: n-octadecano, beta-sitosterol, ácido elágico, quercetina, ácido gálico e rutina. Dados da literatura também comprovam a presença de ácido gálico e seus ésteres: galato de metila e galato de etila nos extratos de *Phyllanthus sellowianus* (Miguel et al., 1995) e no *Phyllanthus*

urinaria (Miguel et al., dados não publicados). Satyan et al. (1995) identificaram triterpenos como acetato de lupeol, β -amirin, e outros compostos como triacontanol, ácido hexacosanóico e ácido montanóico etil éster. Mais recentemente também se identificou uma filanturinolactona (Ueda, 1995).

A figura 8 mostra os compostos já isolados do *Phyllanthus urinaria* descritos na literatura, e a figura 9 apresenta os compostos de importância descritos no *P. niruri*. As demais espécies de *Phyllanthus* têm um perfil químico mais limitado, e apresentam grupos funcionais predominantes nas descrições da literatura, tais como: *P. flexuosus*, com predomínio de triterpenos e taninos (Tanaka e Matsunaga, 1988; Yoshida et al., 1992); *P. maderaspatensis*, com predomínio de lipídios (Bhakuni, 1959); *P. orbiculatus*, com predomínio de flavonóides (Nara et al. 1977); *P. reticulatus*, *P. acidus* e *P. watsonii* com predomínio de triterpenos (Hui et al., 1976; Matsunaga et al., 1993, respectivamente); *P. veuminatus* e *P. acuminatus*, com predomínio de sesquiterpenos (Pettit, 1983, 1984); *P. discoideus*, com predomínio de alcalóides (Mensah et al. 1988, Willaman e Li, 1970, Parello, 1968); *P. emblica*, com predomínio de compostos fenólicos (Srivastava e Ranjan, 1967).

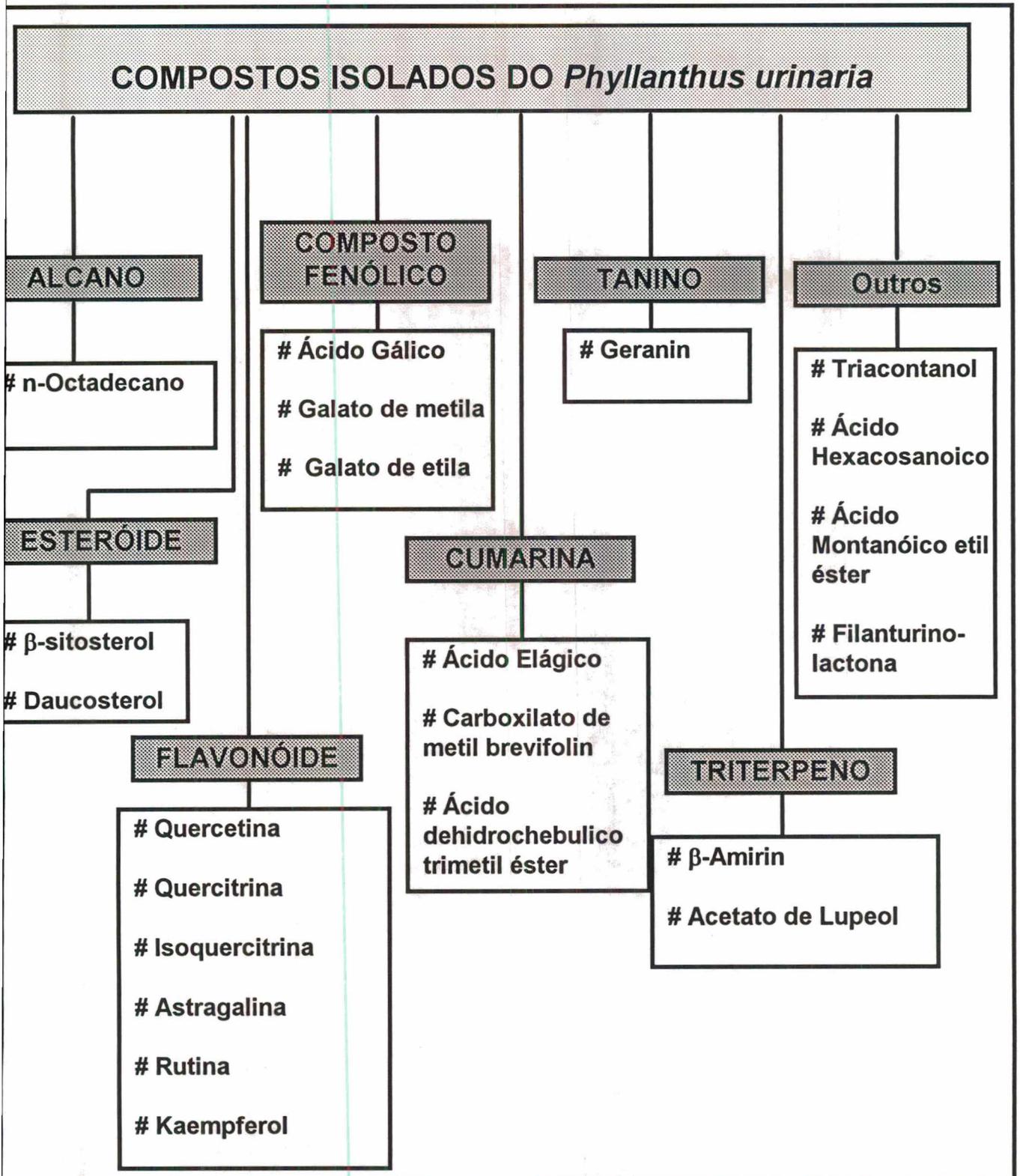


Fig. 8 - Compostos isolados do *P. urinaria* descritos na literatura.

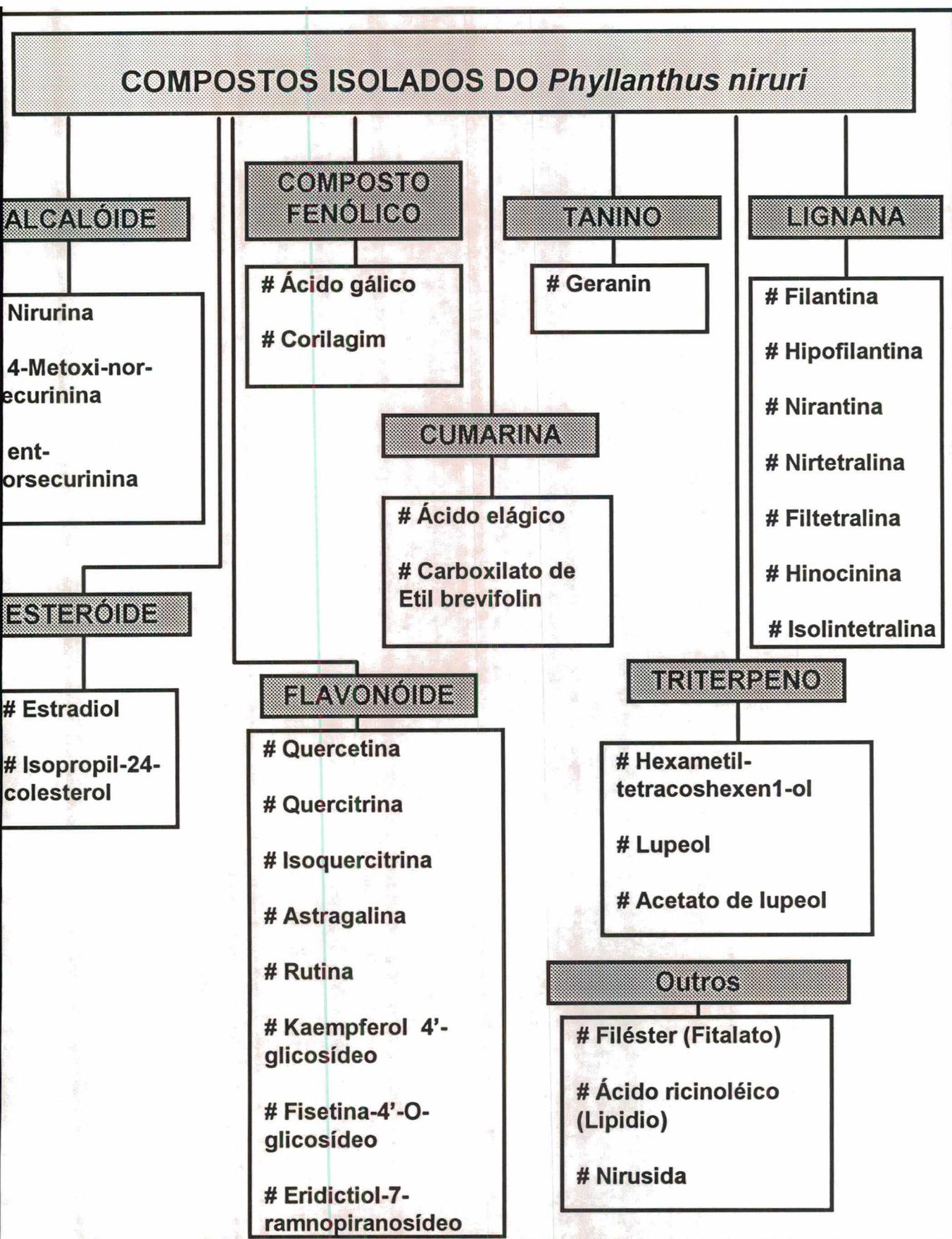


Fig. 9 - Compostos isolados do *P. niruri* descritos na literatura.

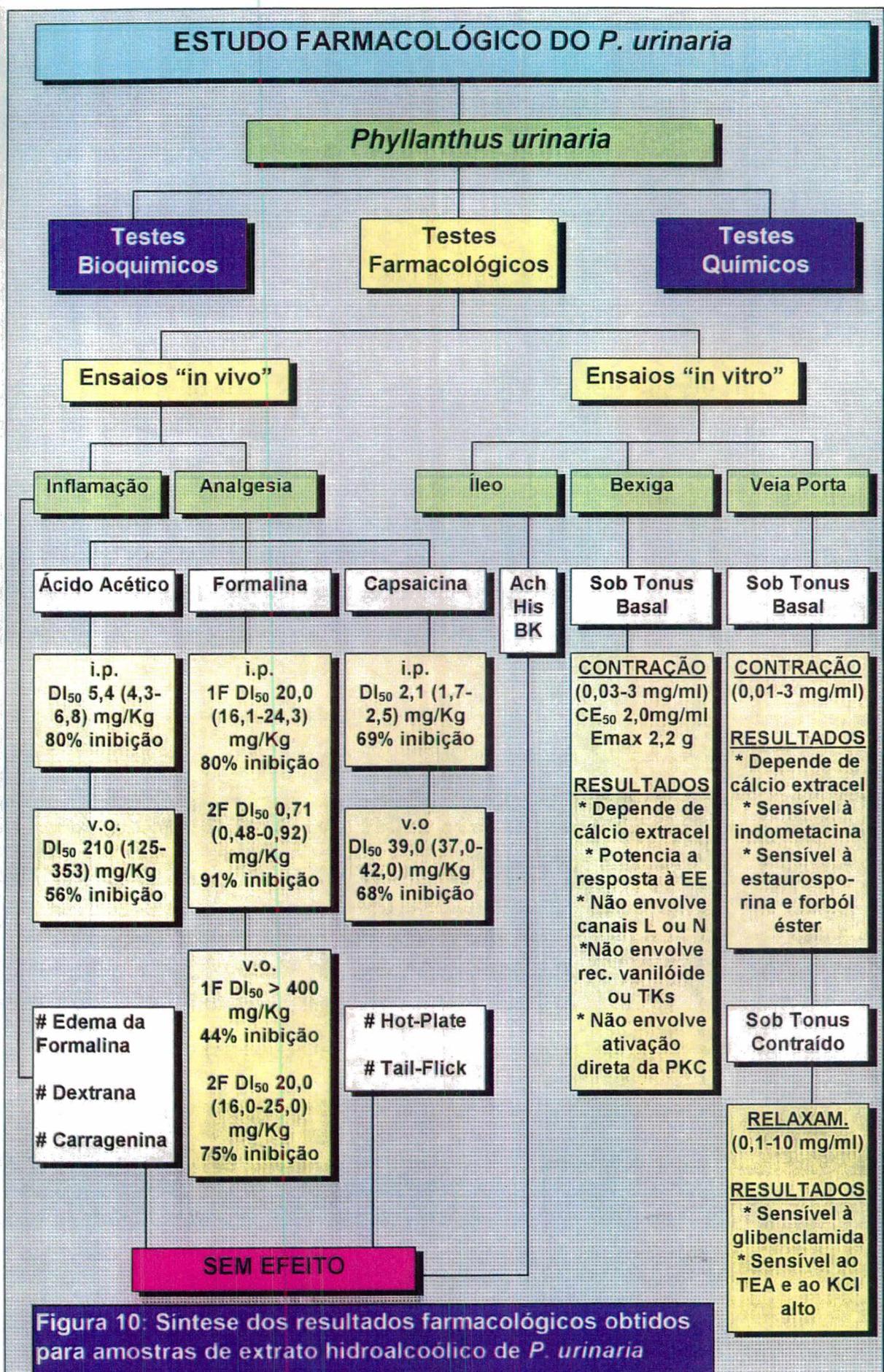
A correlação entre os constituintes químicos presentes nas amostras de *Phyllanthus* estudadas e suas ações farmacológicas, ainda não se encontra totalmente esclarecida, mas vários compostos já foram isolados e estão sendo testados com a finalidade de identificar seus mecanismos de ação. Isso contribuirá para a perfeita compreensão dos efeitos terapêuticos propostos para essa planta. Na Tabela 1 são descritos alguns dos compostos já identificados nas amostras de *P. urinaria* e *P. niruri*, com as suas respectivas atividades farmacológicas descritas na literatura.

Além desses compostos, foram isolados duas novas lignanas do *P. myrtifolius* Moon, filamicina B e retrojusticidina B (Lin et al., 1995), que apresentaram importante atividade inibidora sobre a transcriptase reversa do vírus HIV do tipo 1 (Chang et al., 1995).

Tabela 1: Relação de alguns compostos relatados na literatura presentes no *P. urinaria* e *P. niruri* com suas respectivas atividades farmacológicas. (* Também descrito no *P. niruri*, ** enzima conversora de angiotensina)

ESPÉCIES	COMPOSTOS	ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	REFERÊNCIA
<i>P. urinaria</i>	Ácido elágico*	# Inibidor da aldose redutase.	Shimizu et al. (1989)
	Geranin*	# Inibidor da ECA**.	Ueno et al. (1988)
	Quercetina*	# Inibidor da ATPase mitocondrial.	Lang e Racker (1974)
		# Inibidor da fosfodiesterase.	Beretz et al. (1978)
		# Atividade mutagênica em bactérias.	Bjeldanes e Chang (1977)
		# Efeito vasodilatador	Duarte et al. (1993)
		# Inibidor da fosforilase quinase e da tirosina quinase.	Srivastava (1985)
# Inibidor da fosfolipase A2	Lindhal e Tagesson (1993)		
# Antagonista de cálcio no músculo liso aórtico	Morales e Lozoya (1993)		
# Inibidor da ON sintase	Chiesi et al. (1994)		
<i>P. niruri</i>	Ácido A Repandusínico (Sal monossódico)	# Inibidor da transcriptase reversa do vírus HIV-1	Ogata et al. (1992)
	Filantina	# Atividade hepatoprotetora	Syamasundar et al. (1985)
	Hipofilantina	# Antagonistas de endotelinas	Hussain et al. (1995)
	Nirtetralina	# Antagonistas de endotelinas	Hussain et al. (1995)
Nirusida	# Antagonista de endotelinas	Hussain et al. (1995)	
	# inibidor da transcriptase reversa do HIV	Qian-Cutrone et al. (1996)	

Para uma melhor compreensão do estudo da atividade farmacológica do extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus urinaria*, procurando explicar os efeitos terapêuticos a ele atribuídos na medicina popular e descritos na literatura, resumimos abaixo os resultados obtidos até o momento nos testes farmacológicos das amostras de *P. urinaria* em nossos laboratórios (figura10).



A análise inicial do mecanismo de ação apresentado pelo EH do *P. urinaria* aponta para vários sítios possíveis, e parecem envolver a interação com diversos sistemas farmacológicos distintos. Poucas preparações "in vitro" são tão ricamente inervadas como as do trato respiratório. Ele recebe inervação do sistema simpático, parassimpático e sensorial (Richardson, 1979). As fibras de inervação estão associadas à musculatura lisa vascular e não vascular, às glândulas seromucosas e sob a cobertura epitelial. Comparativamente, há um suprimento maior de nervos na parte superior, como no ducto nasal e traquéia, e menor nos brônquios mediais, distais, e periferia do pulmão (Uddman e Sundler, 1987). Estudos anatomo-morfológicos dessas fibras indicaram que os corpos neuronais estão localizados principalmente no gânglio simpático cervical, no complexo jugular/gânglio nodoso, nos gânglios da raiz espinhal dorsal, em gânglios pequenos que podem ser encontrados ao longo do nervo vago e gânglios na parede traqueal (Lundberg et al. 1983; Daisgaard e Lundberg, 1984).

Barnes et al. (1991) classificaram a resposta neuralmente mediada, resistente a antagonistas colinérgicos e adrenérgicos, em mamíferos, como resposta não-adrenérgica não-colinérgica (NANC), que pode produzir eventos excitatórios ou inibitórios. Os eventos NANC excitatórios, nas vias aéreas, são conhecidos por induzir contração da musculatura lisa, secreção de muco e extravasamento plasmático. Essas respostas foram sensíveis ao bloqueio por antagonistas de receptores para substância P e neurocinina A, demonstrando o envolvimento

taquicinérgico nessa resposta (Maggi et al., 1991a, d; Renzetti et al., 1992).

Os eventos NANC inibitórios são menos conhecidos e parecem envolver a liberação de peptídeo intestinal vasoativo e óxido nítrico (Belvisi et al., 1991, 1992). Entretanto a natureza precisa dos mecanismos envolvidos no relaxamento muscular das vias aéreas ainda é alvo de estudos.

A traquéia de cobaia, em particular, é ricamente innervada por fibras colinérgicas e por fibras contendo vários peptídios, como neuropeptídeo Y (NPY), peptídeo intestinal vasoativo (VIP), peptídeo histidina-isoleucinamida (PHI), substância P (SP), neurocinina A (NKA), peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e galanina (Uddman e Sundier, 1987). Além disso, estudos imunohistoquímicos e farmacológicos revelaram a presença de óxido nítrico ou substância relacionada a ele nas vias aéreas de várias espécies incluindo a cobaia (Li e Raud, 1990; Tucker et al., 1990; Belvisi et al., 1991; Schiemper e Calixto, 1994).

O sistema de produção de prostanóides também desempenha papel fundamental na contratilidade e controle da responsividade das vias aéreas, seja na manutenção do tonus intrínseco da traquéia de cobaia (Charette et al., 1995), ou por modular a liberação de peptídios de neurônios sensoriais (Mapp et al., 1991).

A grande diversidade de sistemas neurotransmissores apresentados pela traquéia de cobaia, foi o fator decisivo na opção por esse tecido, para a análise do possível mecanismo de ação do EH de *Phyllanthus urinaria* e de alguns compostos, isolados desta planta.

2 - OBJETIVOS

O presente estudo foi desenvolvido com os seguintes objetivos:

1- Analisar os mecanismos envolvidos nas ações contráteis e relaxantes do extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus urinaria* na traquéia isolada de cobaia através do emprego de agonistas e antagonistas seletivos de diversos neurotransmissores e de canais iônicos.

2- Analisar, através de testes farmacológicos "in vitro", os diversos princípios isolados desta espécie, com vistas a identificar o(s) compostos responsáveis pelos efeitos contráteis e relaxantes do extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus urinaria* na traquéia de cobaia.

3- Analisar, com o emprego de agonistas e antagonistas seletivos de vários receptores e de canais iônicos, além de testes bioquímicos, alguns mecanismos envolvidos nas respostas contráteis e relaxantes para os compostos isolados de *P. urinaria* na traquéia isolada de cobaia.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1-) PREPARAÇÃO DO EXTRATO BRUTO

O material botânico usado em todos os experimentos foi coletado no Campus da Universidade Federal de Santa Catarina/Florianópolis - SC e classificado pela Dr^a Leila da Graça Amaral e pela bióloga Mirian Ulyseia, do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). As amostras utilizadas na classificação botânica foram coletadas no dia 23 de março de 1992 (Cechinel Filho), no Campus da UFSC - Trindade, e estão arquivadas no Departamento de Botânica da UFSC, sob o número FLOR 23163.

As folhas, caules e raízes de *P. urinaria* foram cortadas, trituradas, e colocadas em uma solução (50%) de etanol-água na proporção de 1:3 (p/v) para a maceração em uma sala com a temperatura controlada em 21 ± 3 °C, por um período de 15 dias. Após esse período, o etanol foi evaporado e o extrato foi concentrado até a concentração desejada e foi mantido sob refrigeração a -4°C. No momento do uso, o extrato foi diluído em água até as concentrações requeridas pelo experimento.

Os constituintes químicos das amostras de *P. urinaria* foram identificados e isolados para os ensaios farmacológicos no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, seguindo este procedimento: o extrato etanólico obtido das folhas, caules e raízes do *P. urinaria* foi sucessivamente particionado com hexano, clorofórmio e acetato de etila, as frações obtidas com hexano e clorofórmio foram

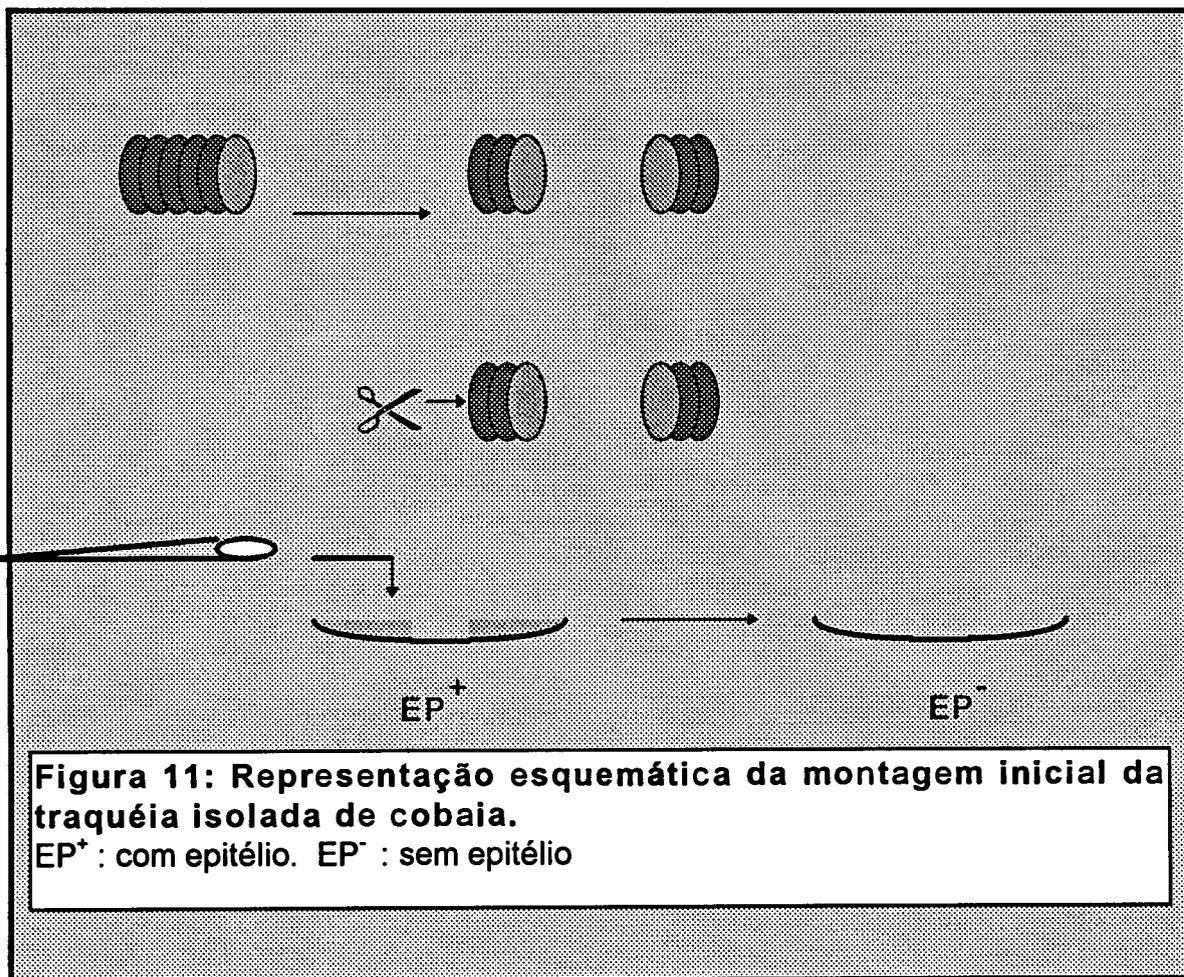
cromatografadas em sílica gel (70 g) e eluídas com uma mistura hexano-acetato de etila (100 : 0, 70 : 30, 0 : 100), 100 ml cada. Da cromatografia foi isolado o β -sitosterol. A fração solúvel em acetato de etila, foi cromatografada em sílica gel (70 g) em coluna e eluída com uma mistura clorofórmio-metanol (100 : 0, 95 : 5, 90 : 10, 85 : 15, 80 : 20, 70 : 30, 50 : 50 e 0 : 100), 100 ml cada. Este processo produziu o ácido gálico, gaiato de metila e gaiato de etila. Outras frações foram cromatografadas em Sephadex LH 20 (3 g) eluídas com 15 ml de água, seguido de uma mistura de metanol-água (70 : 30) 100 ml e produziram rutina, quercetina e geranin.

3.2-) PREPARAÇÃO DO TECIDO

Cobaias de ambos os sexos (250-400 g) foram anestesiadas com éter e sacrificadas por deslocamento cervical. A traquéia foi rapidamente retirada e, após remoção dos tecidos conectivos, foi cortada em seis segmentos transversos de cerca de 4 mm de tamanho. Cada segmento continha entre três a quatro anéis de cartilagem, como descrito anteriormente por Schiemper e Calixto (1994, 1995). Os anéis foram abertos e usualmente seis preparações foram retiradas do mesmo animal. Nas preparações em que o epitélio traqueal foi mantido íntegro, tomou-se o cuidado de preservar a parte interna das preparações afim de não lesar a camada epitelial, enquanto que nos experimentos em que o epitélio foi deliberadamente retirado, as paredes das preparações que continham o epitélio foram gentilmente raspadas com o auxílio de um aplicador de

madeira provido de algodão inserido em sua extremidade, procurando não lesar a camada muscular.

Todas as preparações foram montadas em cuba de vidro para órgão isolado contendo 5 ml de solução de Krebs-Henseleit mantida a 37°C e borbulhada com uma mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂. A solução de Krebs-Henseleit apresentou a seguinte composição (mM): NaCl 118,0; KCl 4,4; MgSO₄ 1,1; CaCl₂ 2,5; NaHCO₃ 25,0; KH₂PO₄ 1,2; Glicose 11,0. O procedimento técnico experimental está representado nas figuras 12 e 13.



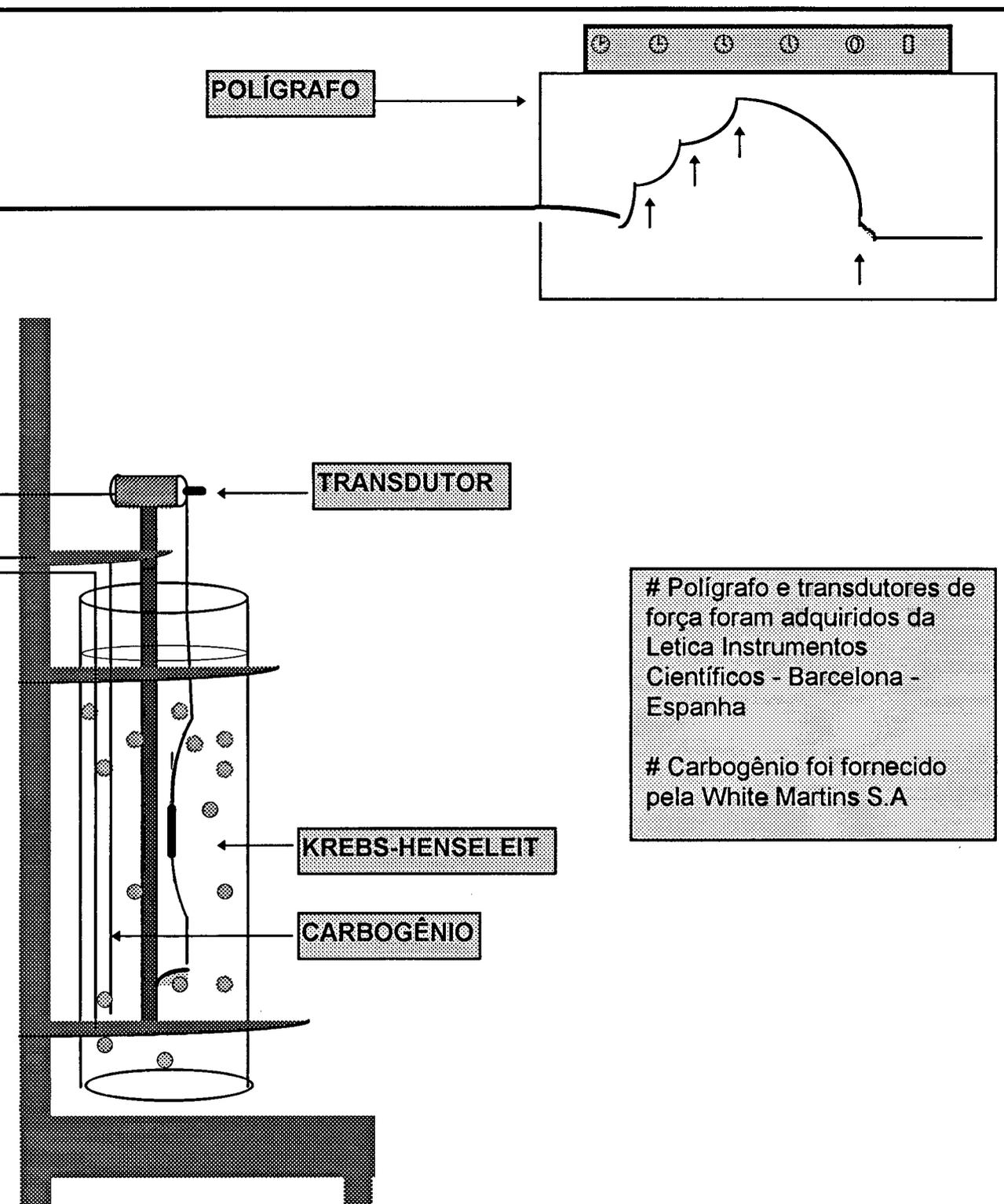


Figura 12: Representação esquemática da montagem das preparações de traquéia isolada de cobaia, para o registro das respostas ao EH do *P. urinaria* ou de seus compostos.

3.3-) PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.3.1-) Efeito Contrátil induzido pelo EH de *Phyllanthus urinaria*

Após o período de equilíbrio de pelo menos uma hora, as preparações com ou sem epitélio foram expostas ao extrato hidroalcoólico de *P. urinaria* (1 a 10.000 µg/ml) que foi adicionado ao banho pelo método cumulativo (Van Rossum 1963). Duas a cinco curvas concentração-resposta cumulativas completas foram obtidas para o extrato em cada preparação, com intervalos de pelo menos uma hora entre cada curva.

Para investigar o possível mecanismo de ação envolvido na resposta contrátil induzida pelo EH do *P. urinaria* (1 - 10.000 µg/ml) na traquéia isolada de cobaia, após obter pelo menos uma curva concentração-resposta cumulativa completa para o EH, as preparações foram incubadas com uma das seguintes drogas, 15 a 30 minutos antes do experimento: atropina (1 µM), mepiramina (3 µM), tetrodotoxina (bloqueador de canal rápido de sódio neuronal, 0,1 µM), indometacina (inibidor da ciclooxigenase, 3 µM), L 655.240 (antagonista seletivo do receptor de tromboxano A₂, 1 µM), MK 571 (antagonista seletivo de receptores para leucotriênos D₄ e E₄, 1 µM), capsazepina (antagonista seletivo de receptor vanilóide, 1 µM), FK 888 (antagonista seletivo para receptores NK₁), SR 48968 (antagonista seletivo de receptores NK₂), vermelho de rutênio (bloqueador do canal iônico acoplado ao receptor vanilóide, 0,1, 1 ou 3 µM), nicardipina (antagonista de canal de cálcio do tipo L ativado por voltagem, 1 µM), ω-conotoxina GIVA (bloqueador de

canal de cálcio neuronal do tipo N, 0,1 μM), estaurosporina (inibidor da proteína quinase C, 0,1 μM) ou WEB 2086 (antagonista seletivo de receptores de PAF, 1 μM). Somente um antagonista foi testado em cada preparação.

Em outra série de experimentos foi analisada a influência da dessensibilização prolongada das preparações com capsaicina (10 μM por 30 minutos) sobre a resposta contrátil induzida pelo extrato de *P. urinaria*. Além disso, foram realizados experimentos para investigar a influência do cálcio extracelular na resposta ao EH de *P. urinaria*. Com esse objetivo, após obtenção de pelo menos uma curva concentração-resposta contrátil para o extrato em meio normal, as preparações foram transferidas para uma solução de Krebs-Henseleit sem cálcio, contendo 1 mM de EGTA, por 20 minutos, durante o qual a solução foi renovada a cada 5 minutos. Após este período as preparações foram recolocadas em uma solução sem cálcio e sem EGTA, para se obter uma nova curva concentração-resposta cumulativa contrátil para o extrato de *P. urinaria*.

Para analisar a influência dos veículos usados para diluir os agonistas ou antagonistas, foram realizadas curvas concentração-resposta controle para os agonistas na presença do veículo utilizado no experimento. Em nenhum experimento foi observado alteração do tonus normal da preparação.

3.3.2-) Efeito Contrátil Induzido pelos Compostos isolados do EH do *Phyllanthus urinaria*

Com o objetivo de analisar os mecanismos envolvidos nas respostas induzidas pelos compostos isolados do *P. urinaria*: quercetina, rutina, geranin, β -sitosterol, foram realizadas curvas concentração-resposta contráteis cumulativas para cada um dos compostos, na ausência ou na presença de agonistas e antagonistas para receptores ou canais iônicos.

Após o período de equilíbrio de pelo menos uma hora, as preparações com ou sem epitélio foram expostas a um dos compostos isolados do extrato hidroalcoólico de *P. urinaria*: quercetina (10 nM à 30 μ M), rutina (100 nM à 100 μ M), geranin (100 μ M à 300 μ M), β -sitosterol (1 μ M à 300 μ M), que foram adicionadas ao banho pelo método cumulativo (Van Rossum 1963). Duas a cinco curvas concentração-resposta cumulativas completas foram obtidas para os compostos em cada preparação, com intervalos de repouso de pelo menos uma hora entre cada curva.

Após obtenção de pelo menos uma curva concentração-resposta cumulativa para cada composto, as preparações foram incubadas com uma das seguintes drogas, 15 a 30 minutos antes do experimento: capsazepina (antagonista seletivo de receptor vanilóide, 1 μ M), FK 888 (antagonista seletivo para receptores NK₁), SR 48968 (antagonista seletivo de receptores NK₂), vermelho de rutênio (bloqueador do canal iônico acoplado ao receptor vanilóide, 0,1, 1 ou 3 μ M), nicardipina (antagonista de canal de cálcio do tipo L ativado por voltagem, 1 μ M), ω -

modo cumulativo (0,1 à 10 mg/ml), sendo que cada concentração era administrada após a observação do efeito máximo relaxante produzido pela concentração anterior.

Após o período de pelo menos uma hora, foram realizados experimentos onde as preparações eram previamente incubadas com uma das seguintes drogas 15 a 30 minutos antes de serem submetidas às curvas concentração-respostas cumulativa ao EH do *P. urinaria*: tetraetilamônio (TEA, bloqueador de canal de potássio não seletivo 100 ou 300 μM), apamina (bloqueador seletivo de canal de potássio de baixa condutância ativado por cálcio, 0,1 ou 1 μM), glibenclamida (bloqueador seletivo de canais de potássio modulados por ATP, 1 ou 3 μM), propranolol (antagonista de receptores β -adrenérgicos, 1 ou 3 μM), [D-P-CI-Phe⁶,Leu¹⁷] VIP (antagonista de receptor de VIP, 0,1 ou 0,3 μM), CGRP (8-37) (antagonista de receptor de CGRP, 0,1 μM), azul de metileno (inibidor da guanilato ciclase solúvel, 10 μM), L-NOARG (inibidor competitivo da óxido nítrico sintase, 100 μM).

Em outra série de experimentos foi investigado o efeito do EH do *P. urinaria* em produzir relaxamento em preparações pré-contraídas com diferentes concentrações de KCl (20, 40 ou 80 mM).

Para analisar a influência dos veículos usados para diluir os agonistas ou antagonistas, sob o tonus normal das preparações, foram realizadas curvas concentração-resposta controle para cada veículo utilizado no experimento, e nenhum deles alterou significativamente o tonus normal da preparação, ou induziu relaxamento por si só.

conotoxina GIVA (bloqueador de canal de cálcio neuronal do tipo N, 0,1 μM), e cloreto de níquel (bloqueador não seletivo de canais de cálcio, 1 mM). Somente um único antagonista foi testado em cada preparação.

Além disso, foi investigado ainda a influência do cálcio extracelular na resposta contrátil causada por esses compostos. Com esse objetivo, após obtenção de pelo menos uma curva concentração-resposta contrátil completa para cada composto em meio normal, as preparações foram transferidas para uma solução de Krebs-Henseleit sem cálcio, contendo 1 mM de EGTA, por 20 minutos, durante o qual, a solução nutritiva foi renovada a cada 5 minutos. Após este período, uma solução sem cálcio e sem EGTA foi recolocada sobre as preparações e nova curva concentração-resposta cumulativa contrátil foi obtida para os compostos.

Para analisar a influência dos veículos utilizados para diluir os agonistas ou antagonistas, foram realizadas curvas concentração-resposta na presença de cada veículo utilizado no experimento e nenhum deles alterou o tonus ou a resposta aos agonistas.

3.3.3-) Efeito Relaxante Induzido pelo EH de *Phyllanthus urinaria*

Para investigar o possível mecanismo responsável pelo efeito relaxante induzido pelo EH do *P. urinaria* (nas concentrações de 0,1 a 10 mg/ml) na traquéia isolada de cobaia, as preparações sem epitélio foram contraídas pela adição de carbacol (0,1 - 0,3 μM). Após estabilizada a resposta contrátil ao carbacol (formação do platô), as preparações controle recebiam concentrações crescentes de EH de *P. urinaria* de

3.3.4-) Efeito Relaxante Induzido pelos Compostos Isolados do *Phyllanthus urinaria*

Três compostos isolados do *P. urinaria* apresentaram atividade relaxante sobre as preparações de traquéia isolada de cobaia: ácido gálico, gaiato de metila e gaiato de etila.

Com o objetivo de analisar o mecanismo responsável pela ação relaxante induzida pelos compostos isolados do *P. urinaria*, foram realizadas curvas concentração-resposta contráteis cumulativas para cada um dos compostos, na ausência e na presença de agonistas ou de antagonistas de receptores e canais iônicos.

Após o período de equilíbrio de pelo menos uma hora, as preparações com ou sem epitélio foram expostas a um dos compostos isolados do extrato hidroalcoólico de *P. urinaria*: ácido gálico (0,1 μ M à 0,1 mM), galato de metila (0,1 nM à 30 μ M), gaiato de etila (0,1 μ M à 30 μ M), que foram adicionadas ao banho pelo método cumulativo (Van Rossum 1963). Duas a cinco curvas concentração-resposta cumulativas completas foram obtidas para os compostos em cada preparação, com intervalos de repouso de pelo menos uma hora entre cada curva.

Para analisar a influência do epitélio da traquéia na resposta relaxante induzida pelos compostos, após o período de equilíbrio de pelo menos 60 minutos, as preparações com ou sem epitélio foram contraídas pela adição de histamina (1 - 3 μ M). Após estabilização da resposta contrátil à histamina (formação do platô), as preparações controle

receberam concentrações crescentes de ácido gálico (0,1 μ M à 0,1 mM), galato de metila (0,1 μ M à 30 μ M) e galato de etila (0,1 μ M à 30 μ M), de modo cumulativo, sendo que cada concentração era administrada após a observação do efeito máximo relaxante produzido pela concentração anterior.

Em outra série de experimentos, após obtenção do período de equilíbrio, as preparações sem epitélio foram contraídas pela adição de histamina (1 - 3 μ M) como descrito anteriormente, e após estabilizada a contração máxima, as preparações foram expostas ao galato de metila e ou galato de etila (0,1 μ M - 30 μ M), que foram adicionados ao banho pelo método cumulativo descrito por Van Rossum (1963). Duas a cinco curvas concentração-resposta cumulativas foram obtidas para o galato de metila ou galato de etila em cada preparação, a intervalos de 60 min.

Para investigar o possível mecanismo responsável pela resposta relaxante induzida pelo galato de metila e o galato de etila na traquéia isolada de cobaia, as preparações sem epitélio foram contraídas pela adição de histamina (1 ou 3 μ M), previamente incubadas por 15 a 30 minutos com uma das seguintes drogas: tetraetilamônio (TEA, bloqueador não-seletivo de canais de potássio, 100 ou 300 μ M), apamina (inibidor de canais de potássio de baixa condutância ativados por cálcio (SK_{Ca}), 0,1 μ M), caribdotoxina (inibidor seletivo de canais de potássio de alta condutância ativados por cálcio (BK_{Ca}), 0,1 μ M), glibenclamida (inibidor de canais de potássio modulados por ATP, 1 ou 3 μ M), azul de metileno (inibidor da guanilato ciclase solúvel, 10 ou 30 μ M), SQ 22536 (inibidor

da adenilato ciclase, 3 ou 10 μM). Além disso, foi também analisada a ação do gaiato de metila e do gaiato de etila em induzir relaxamento de preparações contraídas previamente com diferentes concentrações de cloreto de potássio (20, 40 e 80 mM).

3.3.5-) Determinação dos Níveis de AMPc e GMPc na Traquéia de Cobaia

Investigamos a possibilidade do gaiato de metila e do gaiato de etila estarem produzindo relaxamento através do aumento dos níveis intracelulares de AMPc ou GMPc. Foi determinada a concentração dos nucleotídeos cíclicos nas amostras de tecido após a exposição à uma concentração de gaiato de metila ou gaiato de etila capaz de produzir o relaxamento máximo das preparações. Essas medidas foram obtidas com o uso de "kits" de dosagem por radioimunoensaio (Amersham International pic, Little Chalfont, Buckinghamshire - Inglaterra).

Para a determinação dos níveis de AMPc, o ensaio foi baseado na competição entre o AMPc não ligado e uma quantidade conhecida de um composto radio marcado com [^3H], pela ligação com uma proteína de alta afinidade e especificidade para o AMPc, ou por um antisoro para o GMPc. A quantidade do complexo proteína-AMPc ou antisoro-GMPc formada é inversamente proporcional à quantidade não-ligada do nucleotídeo presente na amostra biológica. A medida da radioatividade emitida pelo complexo efetivamente formado possibilita estimar as concentrações de AMPc ou de GMPc livres presentes na amostra biológica. A sensibilidade

do método foi de 0,05 pmoles para o AMPc e de 0,04 pmoles para o GMPc.

As preparações foram submetidas ao mesmo protocolo experimental de montagem, sendo expostas a uma concentração única (10 μ M) dos galatos. Após a obtenção do relaxamento máximo, as preparações foram rapidamente retiradas do banho e colocadas em um meio de extração contendo ácido tricloroacético (10%). Em seguida as amostras foram trituradas para expor o conteúdo dos nucleotídeos cíclicos do interior das células, que foram extraídos com uma sequência de lavagens com solução de dietiléter. As amostras foram então concentradas e utilizadas nos ensaios para a determinação dos níveis de AMPc e GMPc, ou congeladas em freezer (-70°C) para quantificação posterior. Nos experimentos para a determinação dos níveis basais dos nucleotídeos cíclicos, as preparações receberam apenas o veículo de diluição dos galatos. Para efeito de comparação, foram dosados os níveis de AMPc e GMPc, após a incubação nas preparações de forskolin (10 μ M) ou do nitroprussiato de sódio (10 μ M). Todos os ensaios foram realizados em triplicata, e foram expressos como a média \pm EPM.

3.4-) DROGAS E REAGENTES

As drogas usadas foram obtidas das seguintes fontes: estaurosporina, vermelho de rutênio, cloreto de nicardipina, tetrodotoxina, ω -conotoxina GIVA, indometacina, atropina, mepiramina, salina tamponada com fosfato, cloreto de tetraetilamônio, apamina,

glibenclamida, bitartarato de noradrenalina, cloreto de propranolol, azul de metileno, L-N-g-nitroarginina (L-NOARG), cromacalina, SQ 22536, histamina diidrocloreto, peptídeo intestinal vasoativo (VIP) de porco, [D-p-CI-Phe⁶,Leu¹⁷] VIP de porco, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP humana, CGRP (8-37) humana, cloreto de carbamilcolina (carbacol), EGTA (etileno glicol (β -amino etil éter] N,N,N',N'-tetraacético ácido) (todos da Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), [β -ala⁸] NKA (4-10) (Península Laboratories, Califórnia, USA), forskolin (RBI Research Biochemicals International, Natick, MA, EUA), FK 888 ({94R)-4-hidroxi-1-([1-metil-1H-indol-3-il]carbonil)-L-N-benzil-Nmetil-3-2-(2-naftil)-L-alaninamide}) (Fujisawa Pharmaceutical Co., Osaka, Japão), SR 48968 ({(S)-N-metil-N-[4-acetilamino-4-fenilpiperidino-2-(3,4-diclorofenil)butil]benzamida}) (Sanofi Recherche, Montpellier, França), WEB 2086 ({(3-[4-2-clorofenil-9-metil-6H-tienol[3,2-f][1,2,4]triazolo-[4-3-a)(1,4]-diazepin-2-il)-1-(4-morfolinil-1-propanona}) (Boehringer - Ingelheim, Ingelheim - Alemanha),

L 655.240 ({3-[1-(4-clorobenzil)-5-fluoro-3-metilindol-2-il]2,2-dimetilpropanoico ácido}) (cedido gentilmente pelo Dr. P. D'Orleans-Juste, Departamento de Farmacologia, Universidade de Sherbrooke, Canadá), MK 571 (3-(3-(2-(7-cloro-2-quinolinil)etenil)fenil((3-dimetilamino-3-oxo-propil)tio)metil) propanoico ácido) (Merck Frost, Quebec, Canadá), capsaicina (Calbiochem, San Diego, Califórnia, EUA), capsazepina (Sandoz Institute for Medical Research, Londres, Inglaterra), dimetilsuifóxido (VETEQ BR, RJ, Brasil). Além disso foram utilizadas as

soluções do "kit" de radioimunoensaio da Amersham: tampão tris/EDTA, [8-³H]adenosina 3',5'-fosfato cíclico (180 pmol, contendo aprox. 185 kBq, 5μCi), adenosina 3',5'-fosfato cíclico padrão (1.600 pmol), carvão adsorvente, proteína de ligação purificada de músculo bovino, antisoro específico para GMPc, [8-³H]guanosina 3',5'-fosfato cíclico (80 pmol, contendo aproximadamente 59 kBq, 1,6 μCi), guanosina 3',5'-fosfato cíclico padrão (400 pmol), sulfato de amônia.

As soluções estoques das drogas (1 a 100 mM) foram preparadas e mantidas sob refrigeração à -20°C. As concentrações de etanol ou dimetilsulfóxido usados não excederam a 0,03%, que demonstraram não ter efeito "per se" sobre tonus basal das preparações ou na reatividade induzida pelos agonistas.

3.5-) ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados como a média ± erro padrão da média, exceto as CE₅₀ (concentração que produz 50% do efeito máximo em experimentos individuais) e as Ci₅₀ (concentração do inibidor que produziu 50% de inibição da resposta em relação aos grupos controle), que são apresentadas como médias geométricas acompanhadas de seus respectivos limites de confiança de 95% (Fleming et al., 1972).

A análise estatística dos resultados foi realizada através do teste "t" de Student para amostras relacionadas ou não, ou através de análise de variância seguido pelo teste de Dunnett, quando apropriado. P<0,05 ou menos foi considerado como indicativo de significância.

Os valores de pA_2 foram calculados como o logaritmo negativo da concentração molar do antagonista que causou deslocamento de 2 vezes à direita da curva concentração-resposta ao agonista, ao nível da CE_{50} (Aruniakshana e Schild, 1959).

4 - RESULTADOS

4.1-) Efeito Contrátil Induzido pelo EH de *Phyllanthus urinaria*:

A figura 13 demonstra que o EH de *P. urinaria* (1 - 3.000 $\mu\text{g/ml}$) causou contração dependente da concentração empregada nas preparações de traquéia isolada de cobaia sem epitélio. Além disso, concentrações iguais ou maiores que 3.000 $\mu\text{g/ml}$ determinaram relaxamento. A CE_{50} média (com limite de confiança de 95%) para a resposta contrátil foi 284,4 (216,4 - 373,9) $\mu\text{g/ml}$ e a contração máxima desenvolvida em resposta a concentração de 3.000 $\mu\text{g/ml}$ foi 580 ± 35 mg de tensão.

A resposta contrátil para o EH na traquéia isolada de cobaia sem epitélio foi bem reproduzível, sem evidência de taquifilaxia, e reversível quando os experimentos foram realizados com pelo menos uma hora de intervalo entre cada curva. Por outro lado, em preparações com o epitélio traqueal preservado, o EH de *P. urinaria* nas mesmas concentrações causou contração menor, com o efeito máximo obtido de cerca de 65% daquele observado nas preparações cujo epitélio havia sido retirado (Figura 13).

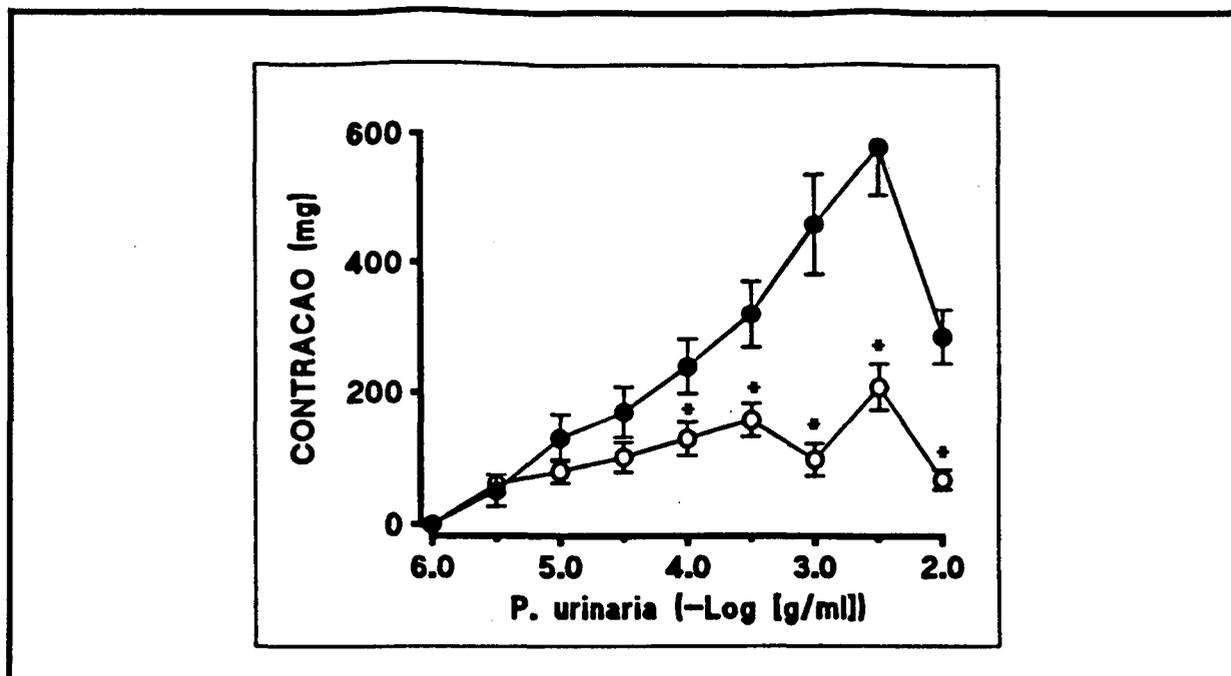


Figura 13: Curvas concentração-resposta obtidas para o extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus urinaria* na traquéia isolada de cobaia com (O) ou sem (●) epitélio. Cada ponto representa a média de 4-5 experimentos e as linhas verticais indicam os erros padrão das médias.

Quando as preparações sem epitélio foram expostas à tetrodotoxina ($0,1 \mu\text{M}$), a resposta contrátil causada pelo EH foi apenas parcialmente afetada (Figura 14 A). Os resultados da Figura 14 B demonstram que a indometacina ($3 \mu\text{M}$) antagonizou totalmente a contração induzida pelo extrato. Todavia, o antagonista seletivo do receptor de leucotriêno D_4 e E_4 MK 571 ($1 \mu\text{M}$) afetou apenas parcialmente a contração causada pelo EH de *P. urinaria*, enquanto que a atropina ($2 \mu\text{M}$), mepiramina ($1 \mu\text{M}$) e o antagonista seletivo do receptor da tromboxano A_2 , L 655.240 ($1 \mu\text{M}$), não afetaram de maneira significativa a contração causada pelo EH de *P. urinaria* (Figura 14 C e 14 D e resultados não demonstrados). A incubação das preparações com o antagonista seletivo do receptor de

PAF, WEB 2086 ($1 \mu\text{M}$) e com o inibidor da proteína quinase C, estaurosporina ($0,1 \mu\text{M}$), causou pequena inibição na resposta inicial ao EH de *P. urinaria*, sem no entanto afetar o efeito máximo contrátil produzido pelo EH (Figura 14 E e 14 F).

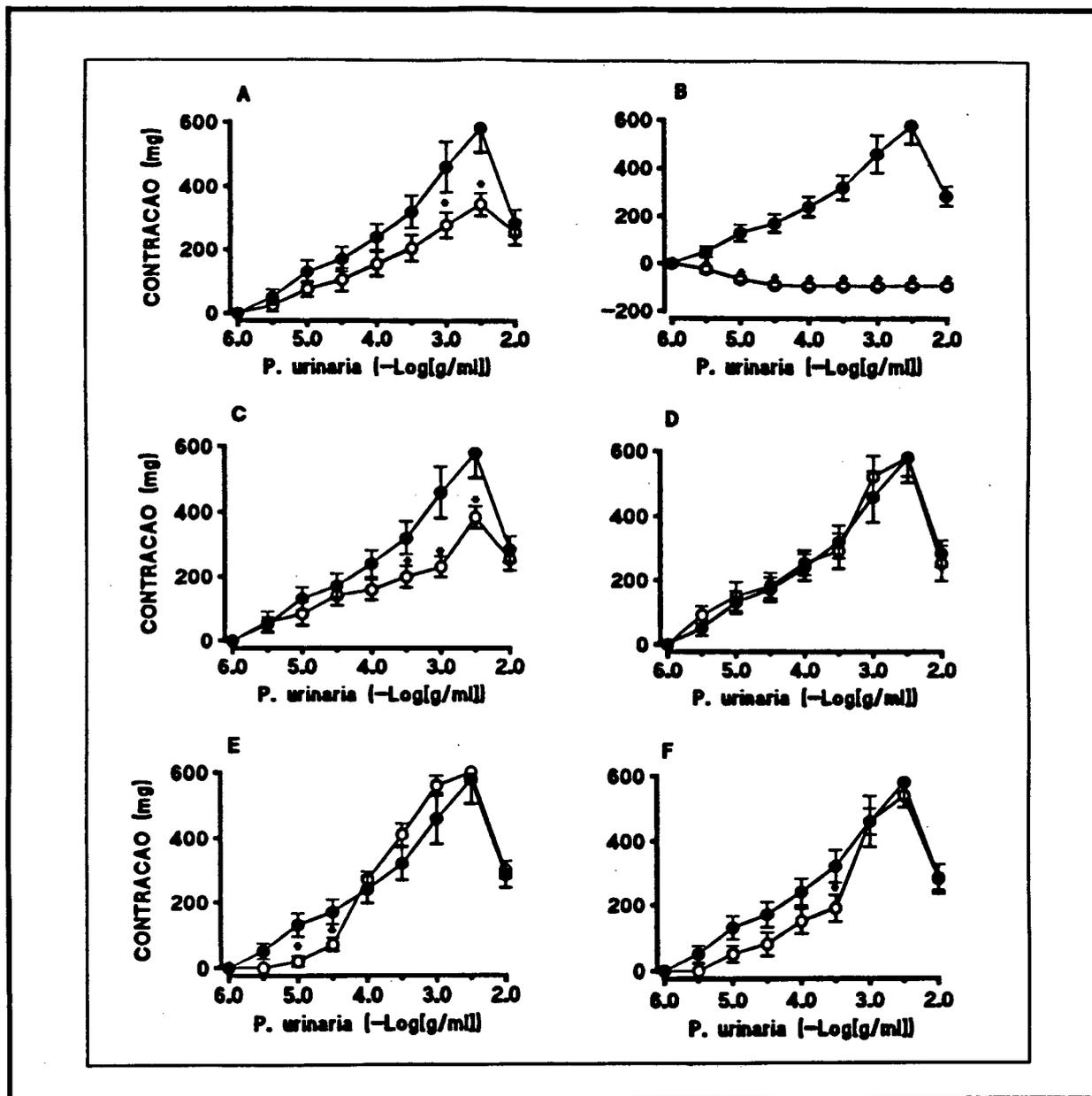


Figura 14: Curvas concentração-resposta obtidas para o extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus urinaria* na traquéia isolada de cobaia na ausência (●) ou na presença (○) de: tetrodotoxina ($0,1 \mu\text{M}$) (A); indometacina ($3 \mu\text{M}$) (B); MK 571 ($1 \mu\text{M}$) (C); L 655,240 ($1 \mu\text{M}$) (D); WEB 2086 ($1 \mu\text{M}$) (E); ou estaurosporina ($0,1 \mu\text{M}$) (F). Cada ponto representa a média de 4-5 experimentos e as linhas verticais os erros padrão das médias.

As contrações causadas pelo EH de *P. urinaria* na traquéia isolada de cobaia sem epitélio foram quase que abolidas quando as preparações foram transferidas para solução de Krebs-Henseleit sem cálcio contendo EGTA (Figura 15 A). Este efeito foi completamente revertido quando as preparações foram transferidas para a solução de Krebs-Henseleit normal (resultados não apresentados). O bloqueador de canal de cálcio do tipo L sensível a voltagem, nicardipina (1 μ M), causou apenas inibição parcial enquanto que o bloqueador de canais de cálcio tipo N, ω -conotoxina (0,1 μ M) não interferiu com a contração causada pelo EH (Figura 15B e 15 C).

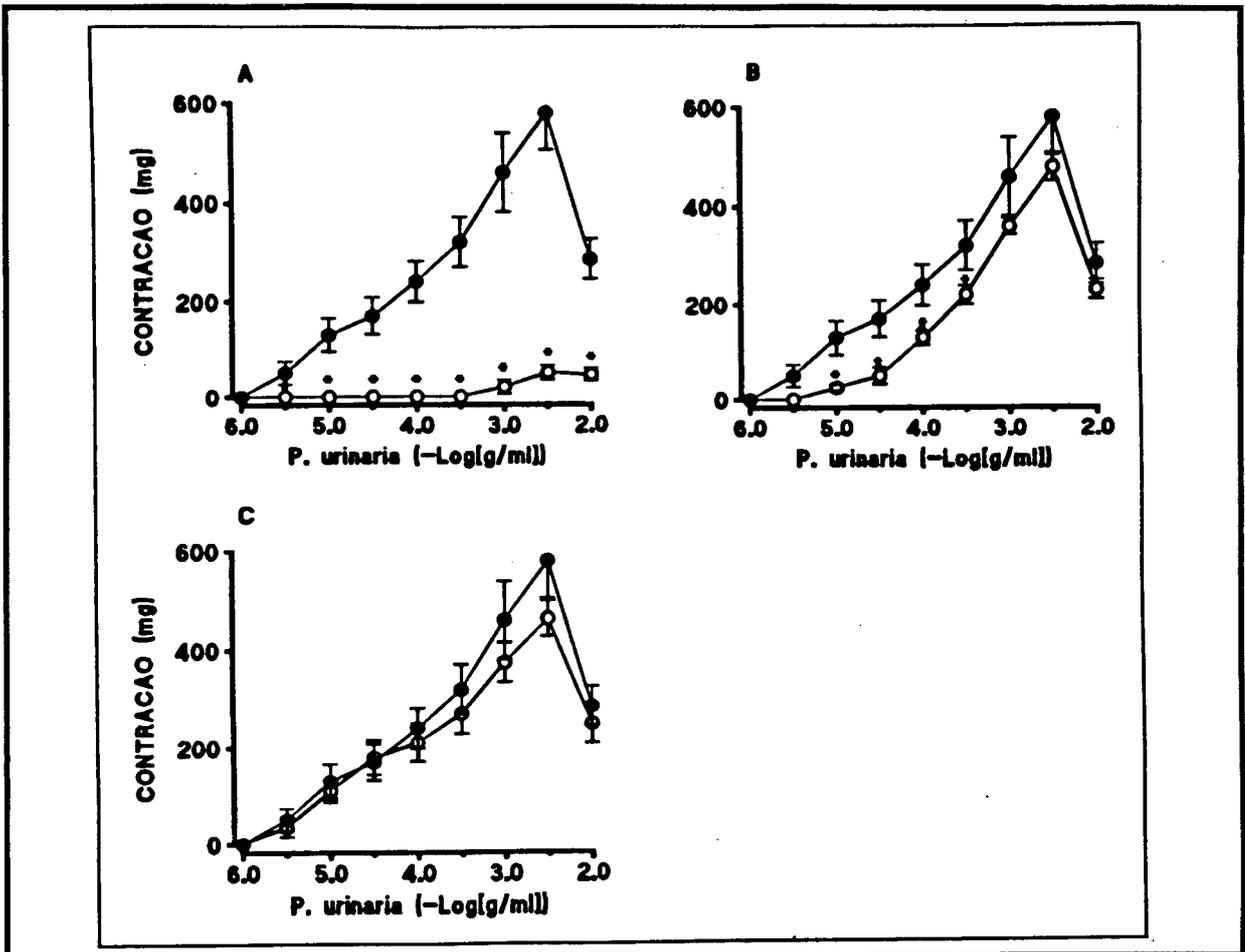


Figura 15: Curvas concentração-resposta obtidas para o extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus urinaria* na traquéia isolada de cobaia; resposta controle (●), ou resposta obtida em: solução sem cálcio (○) (A); ou na presença de nicardipina (○, 1 μ M) (B); ou ω -conotoxina (○, 0,1 μ M) (C). Cada ponto representa a média de 4-5 experimentos e as linhas verticais os erros padrão das médias.

A adição de capsaicina (10 μM) nas preparações por 30 min determinou completa dessensibilização às ações da capsaicina (Figura 16 B). A dessensibilização das preparações produziu deslocamento para a direita da curva concentração-resposta ao EH de *P. urinaria*, em cerca de 5 vezes (Figura 16 A). Contudo a incubação das preparações com capsazepina (1 μM , um antagonista competitivo dos receptores vanilóides para a capsaicina), não afetou a resposta contrátil induzida pelo EH de *P. urinaria* (Figura 16 C), mas deslocou de maneira competitiva à direita a curva concentração resposta à capsaicina como esperado (Figura 16 D). A incubação das preparações com vermelho de rutênio (0,1 - 3 μM), droga que é descrita como bloqueadora do canal iônico acoplado ao receptor vanilóide da capsaicina, causou inibição de modo não-competitivo e concentração-dependente da resposta contrátil induzida pelo EH de *P. urinaria* e pela capsaicina, com CI_{50} médias de 1,20 (1,00 - 1,43) μM e 1,23 (0,98 - 1,78) μM , respectivamente (Figura 16 E e F). Nas concentrações em que o vermelho de rutênio produziu inibição significativa sobre a resposta contrátil produzida pelo EH ou pela capsaicina, a droga não afetou a resposta contrátil causada pelo carbacol, histamina ou prostaglandina E_2 .

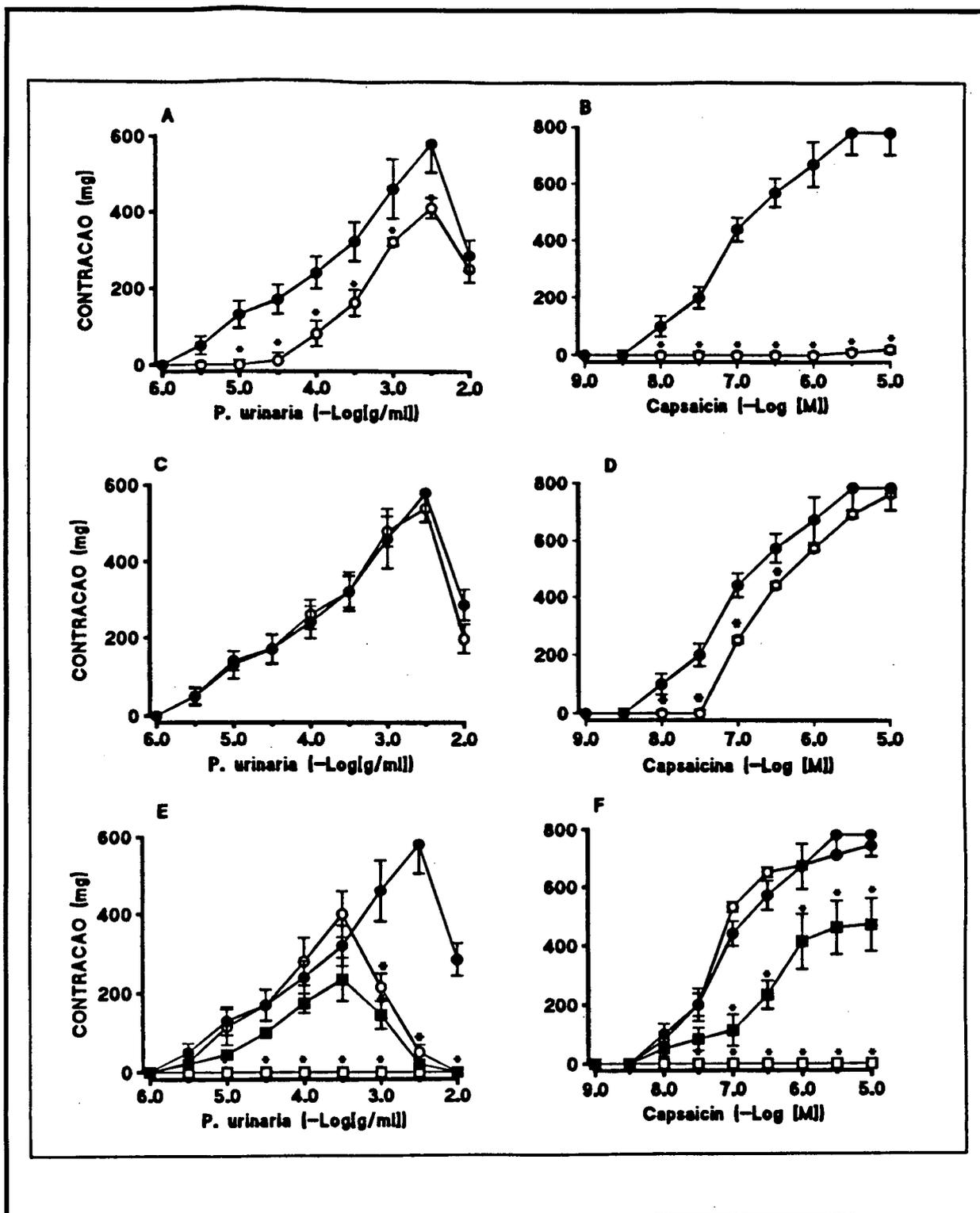


Figura 16: Curvas concentração-resposta obtidas para o extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus urinaria* (A, C e E) ou capsaicina (B, D e F) na traquéia isolada de cobaia sem epitélio, resposta controle (○), ou após dessensibilização com capsaicina (○) (A) e (B); ou na presença de capsazepina (○, 1 μ M) (C) e (D); ou vermelho de rutênio (○, 0,1; ■, 1; ou □, 3 μ M) (E) e (F). Cada ponto representa a média de 4-5 experimentos e as linhas verticais os erros padrão das médias.

A incubação das preparações com os antagonistas seletivos de receptores das taquicininas, NK₁ (FK 888, 1 μM) ou NK₂ (SR 48968, 1 μM), causou deslocamento paralelo para a direita da curva concentração-resposta contrátil induzida pela substância P (0,1 nM - 10 μM) e pela [β-al⁸]NKA(4-10) (1 pM - 0,1 μM), respectivamente, com um antagonismo do tipo aparentemente competitivo (Figura 17 A e 17 B), fornecendo valor médio de pA₂ 6,2 ± 0,3 e 9,1 ± 0,2, respectivamente. O FK 888 (1 μM) e o SR 48968 (1 μM), também causaram uma inibição significativa da resposta máxima induzida pelo EH de *P. urinaria* com percentuais de inibição de 57,8 ± 4,8 e 78,0 ± 8,0, respectivamente (Figura 17 C e 17 D). A combinação de ambos os antagonistas NK₁ e NK₂ (1 μM cada), praticamente aboliu a resposta contrátil induzida pelo EH (Figura 17 E).

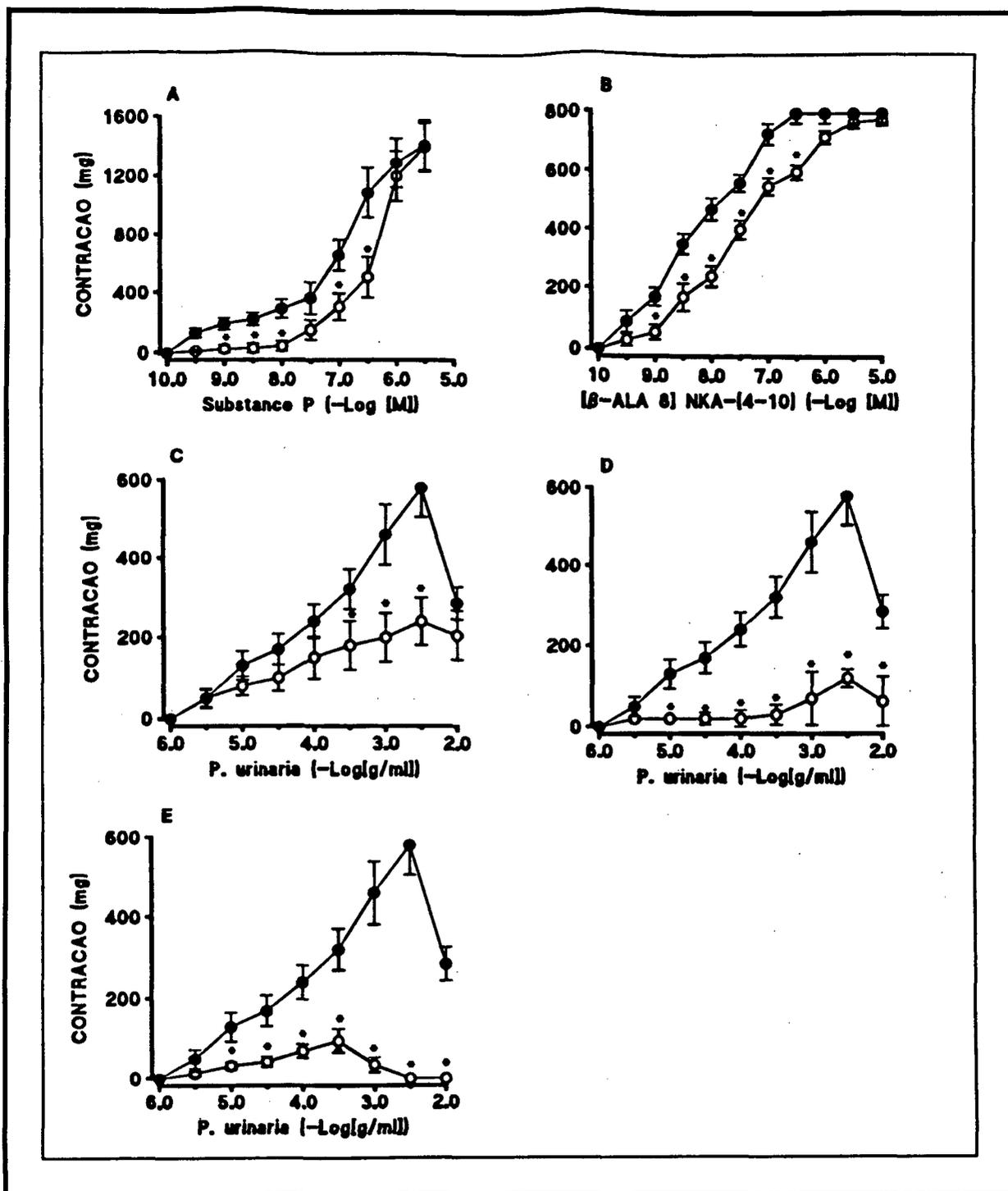
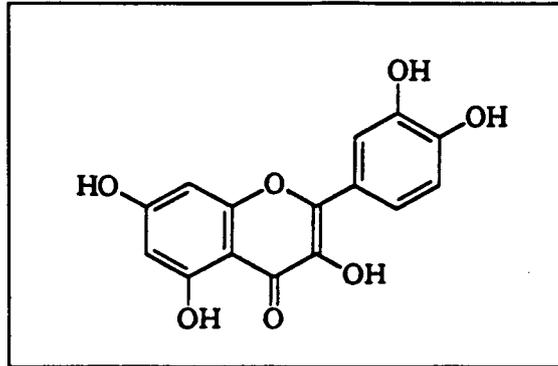


Figura 17: Curvas concentração-resposta obtidas para a substância P (A), ou extrato hidroalcoólico (EH) de *Phyllanthus urinaria* (C) na traquéia isolada de cobaia sem epitélio, na ausência (●) ou na presença (○) de FK 888 (1 μ M); β -[Ala⁶]NKA(4-10) (B), ou EH de *Phyllanthus urinaria* (D) na ausência (●) ou na presença (○) de SR 48968 (1 μ M); ou para o EH de *Phyllanthus urinaria* (E) na ausência (●) ou na presença (○) da combinação de FK 888 e SR 48968 (1 μ M cada). Cada ponto representa a média de 4-5 experimentos e as linhas verticais os erros padrão das médias.

4-2) Efeito Contrátil Induzido pelos Compostos Isolados do EH de *Phyllanthus urinaria*:

4.2.1-) QUERCETINA:



A Quercetina produziu resposta contrátil reversível e sustentada da traquéia isolada de cobaia sem epitélio, apresentando uma CE_{50} média de 0,62 (0,43 - 0,71) μ M, e E_{max} de 1.240 ± 40 mg de tensão. A figura 18 demonstra que a resposta contrátil induzida pela quercetina na traquéia isolada de cobaia, é dependente do cálcio extracelular (Figura 18 A e B), e dependente da ativação de canais de cátions sensíveis ao cloreto de níquel (Figura 18 C). A resposta contrátil induzida pela quercetina, é parcialmente modulados por canais de cálcio do tipo L sensíveis a nicardipina (Figura 18 D), mas não por aqueles do tipo N, bloqueados pela ω -conotoxina (Figura 18 E).

A resposta contrátil induzida pela quercetina não foi afetada pelo antagonista do receptor vanilóide, capsazepina (1 μ M), ou pelo bloqueador de canal de cátion acoplado a esse receptor, vermelho de rutênio (3 μ M), (Figura 19 A e B, respectivamente). Essa resposta também não foi afetada significativamente pelos antagonistas de receptores

taquicinérgicos NK_1 , FK 888 (1 μM), ou NK_2 , SR 48968 (1 μM) (Figura 20 A e B).

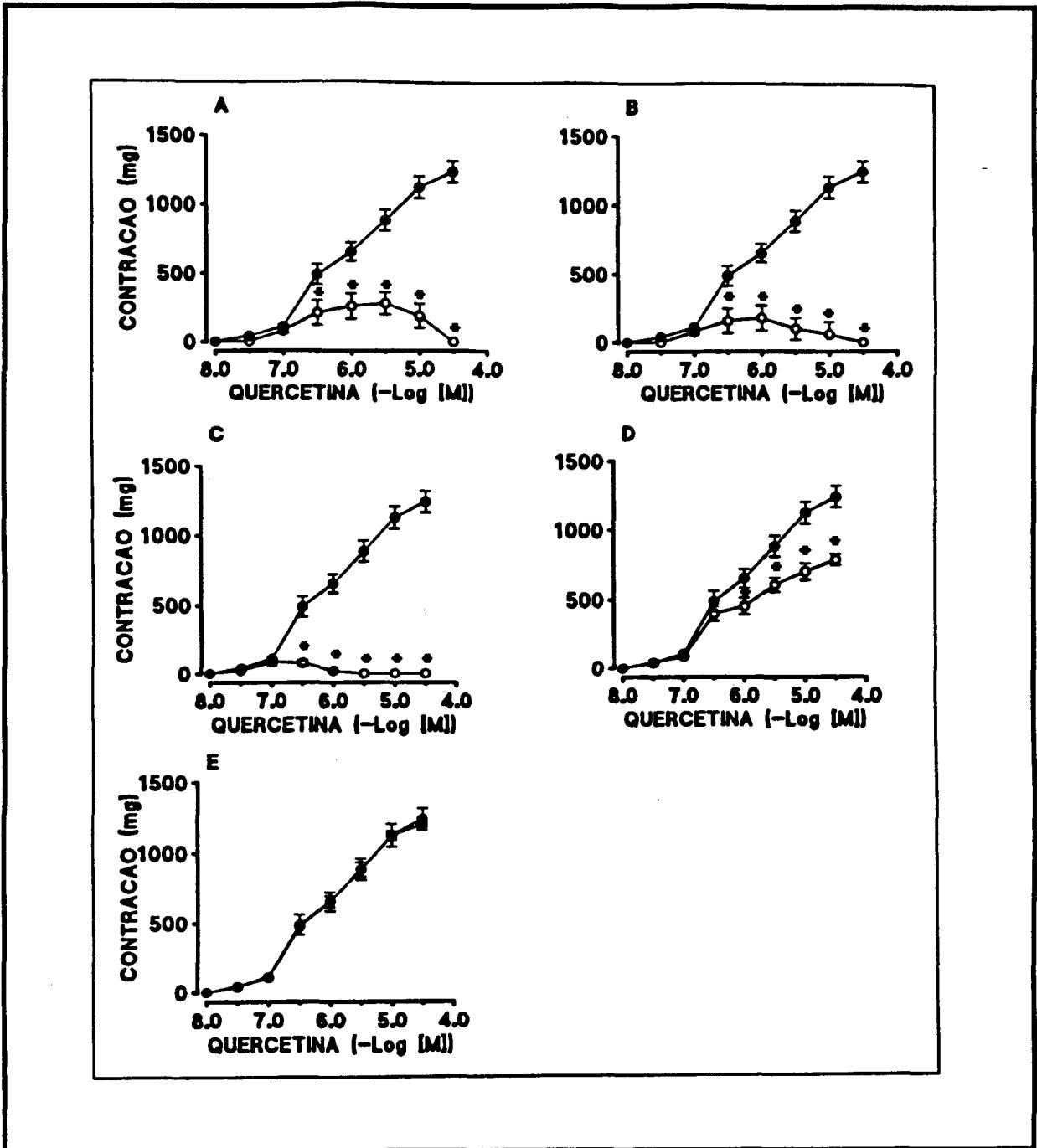


Figura 18: Curvas concentração-resposta obtidas para a quecetina na traquéia isolada de cobaia sem epitélio, resposta controle (●), ou resposta obtida em: solução sem cálcio (○) (A), solução sem cálcio mais EGTA (○) (B) ou na presença de cloreto de níquel (○, 1 mM) (C), nifedipina (○, 3 μM) (D); ou ω -conotoxina (○, 0,1 μM) (E). Cada ponto representa a média de 4-5 experimentos e as linhas verticais os erros padrão das médias.

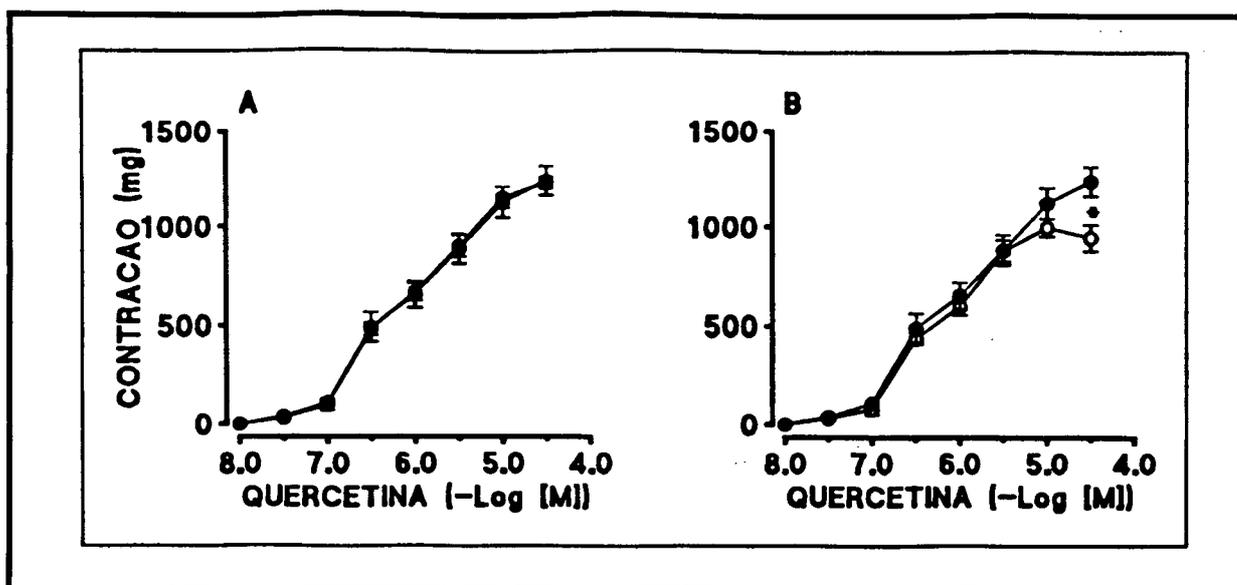


Figura 19: Curvas concentração-resposta obtidas para a quercetina na traquéia isolada de cobaia sem epitélio, na ausência (●), ou na presença (○) de (A) capsazepina (1 μ M), ou vermelho de rutênio (3 μ M). Cada ponto representa a média de 4-5 experimentos e as linhas verticais os erros padrão das médias.

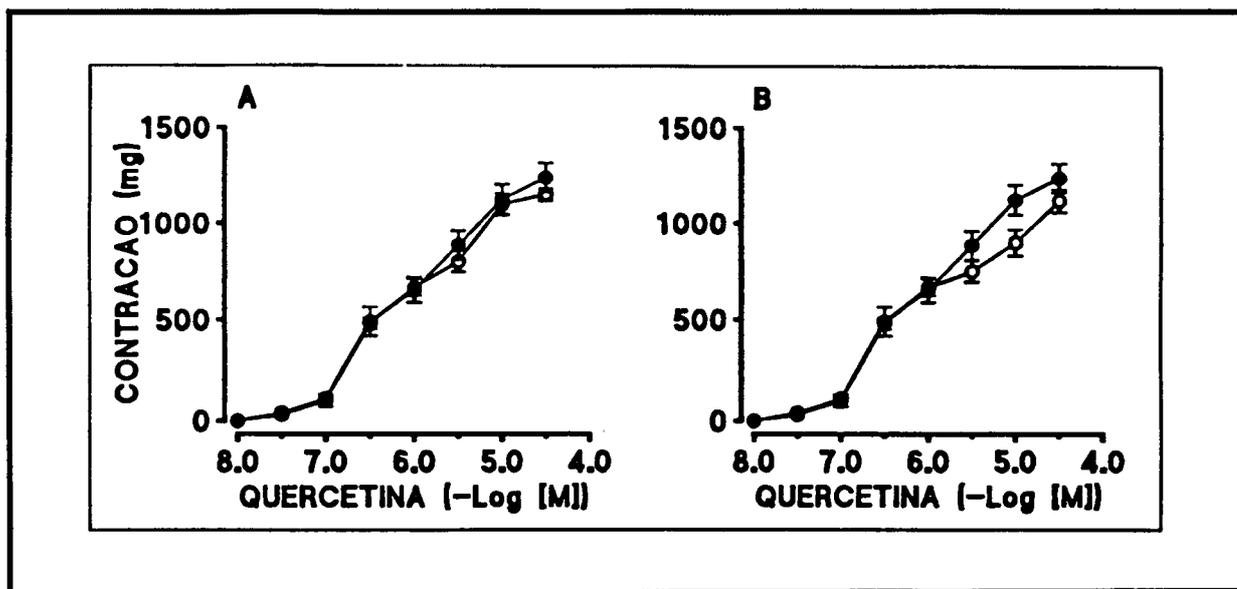
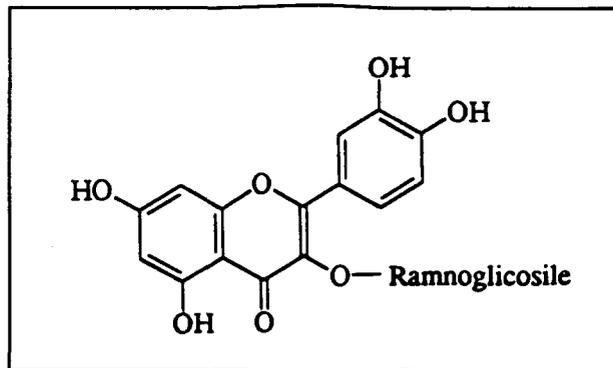


Figura 20: Curvas concentração-resposta obtidas para a quercetina na traquéia isolada de cobaia sem epitélio, na ausência (●), ou na presença (○) de (A) FK 888 (1 μ M), ou SR 48968 (1 μ M). Cada ponto representa a média de 4-5 experimentos e as linhas verticais os erros padrão das médias.

4.2.2-) RUTINA:



A rutina produziu resposta contrátil sustentada e reversível da traquéia isolada de cobaia sem epitélio, apresentando uma CE_{50} média de 63,10 (55,00 - 70,03) μ M, e E_{max} de 910 ± 37 mg de tensão. Os resultados da figura 21 demonstram que a resposta contrátil induzida pela rutina, na traquéia isolada de cobaia, como aquela produzida pela quercetina, é dependente do cálcio extracelular (Figura 21 A e B), e sensível ao bloqueador de canal de canal de cátions, cloreto de níquel (Figura 21 C). A resposta contrátil induzida pela rutina depende parcialmente da ativação de canais de cálcio do tipo L sensíveis a nicardipina (Figura 21 D), mas é insensível ao bloqueio dos canais de cálcio do tipo N, bloqueados pela ω -conotoxina (Figura 21 E).

A contração induzida pela rutina não foi afetada pelo antagonista do receptor da capsaicina, capsazepina (1 μ M), ou pelo bloqueador de canal de cátion acoplado ao receptor vanilóide, vermelho de rutênio (3 μ M), (Figura 22 A e B, respectivamente). Essa resposta também não foi afetada pelos antagonistas de receptores das taquicininas, NK_1 , FK 888 (1 μ M), ou NK_2 , SR 48968 (1 μ M), como mostra a figura 23 A e B.

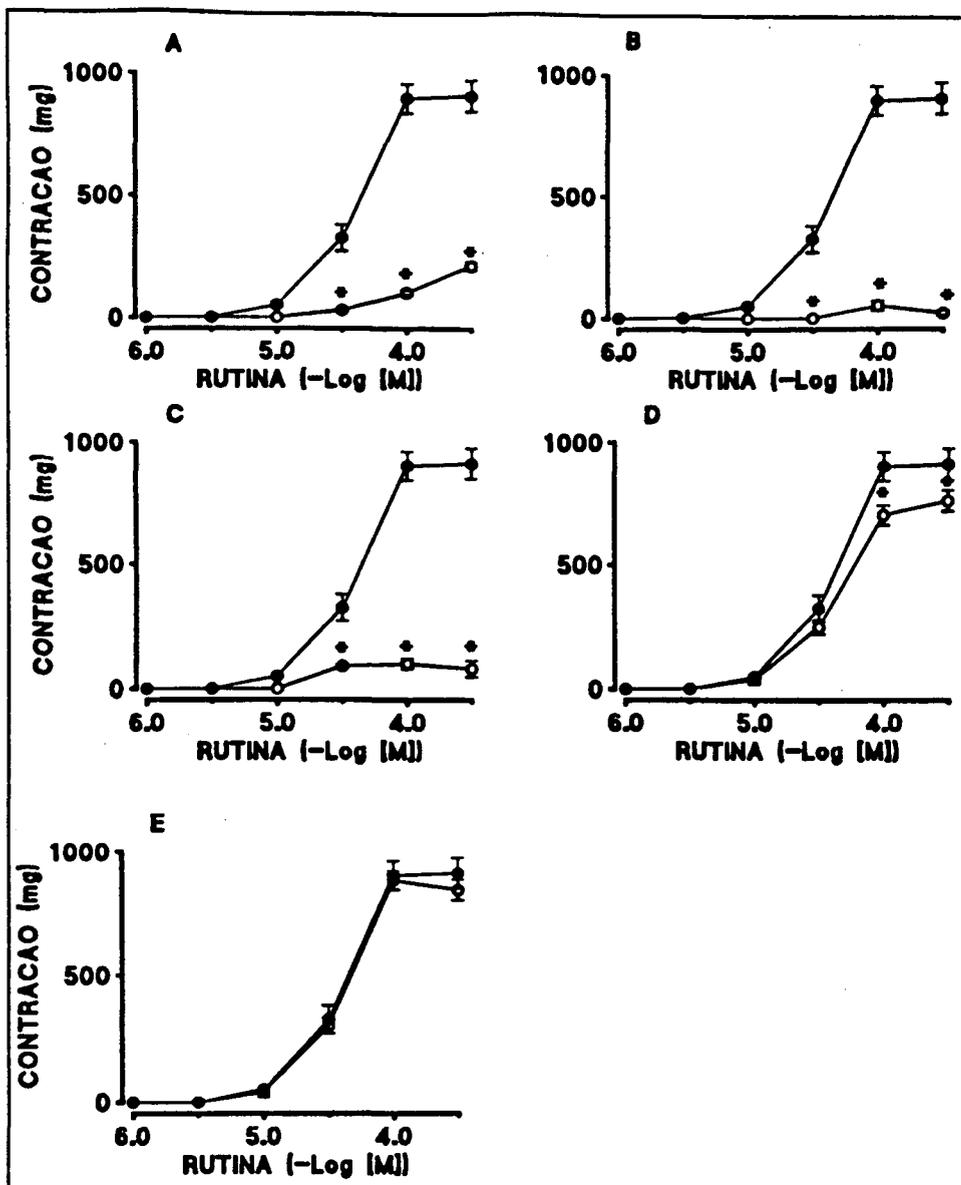


Figura 21: Curvas concentração-resposta obtidas para a rutina na traquéia isolada de cobaia sem epitélio, resposta controle (●), ou resposta obtida em: solução sem cálcio (○) (A), solução sem cálcio mais EGTA (○) (B) ou na presença de cloreto de níquel (○, 1 mM) (C), nifedipina (○, 3 μ M) (D); ou ω -conotoxina (○, 0,1 μ M) (E). Cada ponto representa a média de 4-5 experimentos e as linhas verticais os erros padrão das médias.

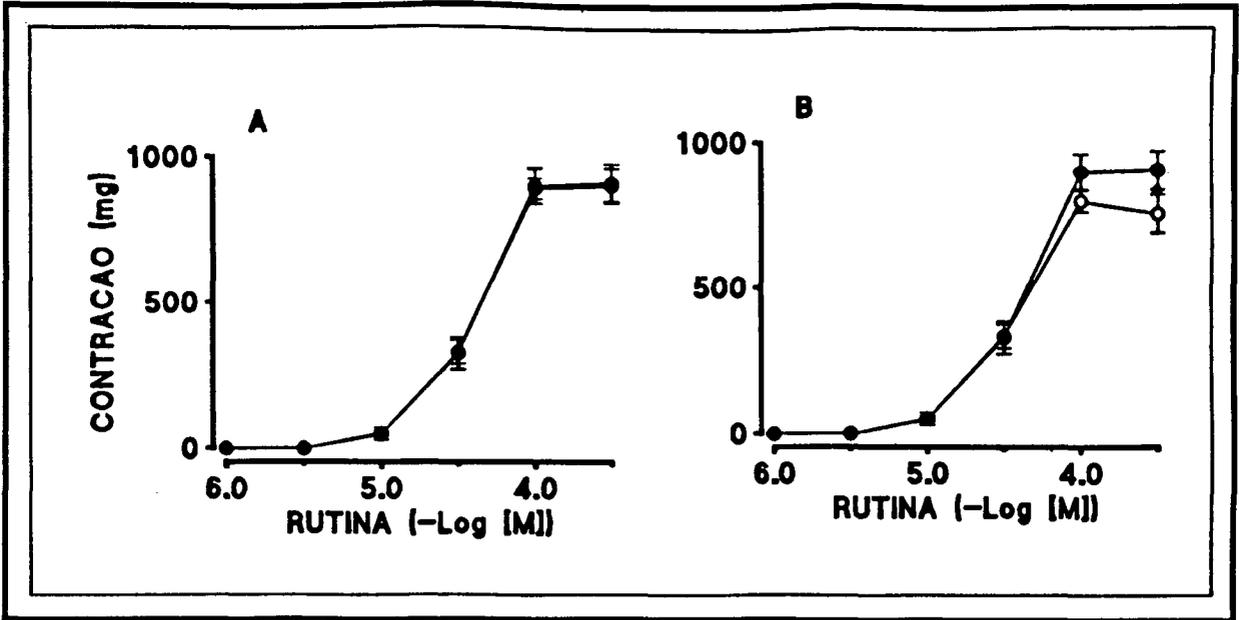


Figura 22: Curvas concentração-resposta obtidas para a rutina na traquéia isolada de cobaia sem epitélio, na ausência (●), ou na presença (○) de (A) capsazepina (1 μ M), ou vermelho de rutênio (3 μ M). Cada ponto representa a média de 4-5 experimentos e as linhas verticais os erros padrão das médias.

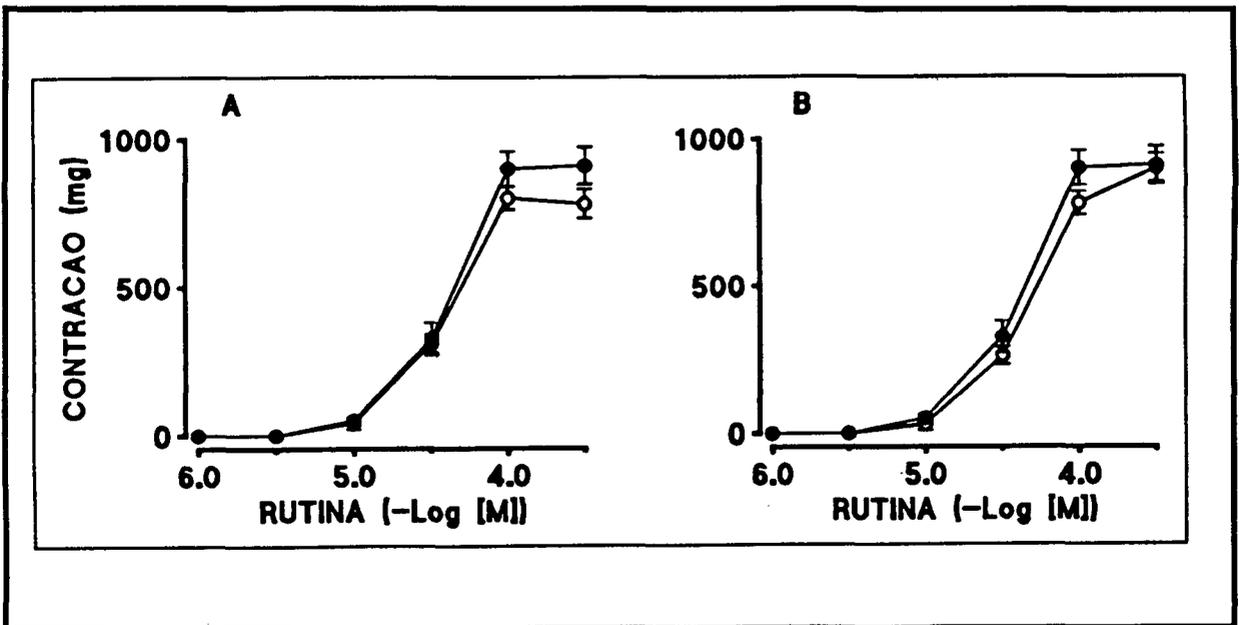
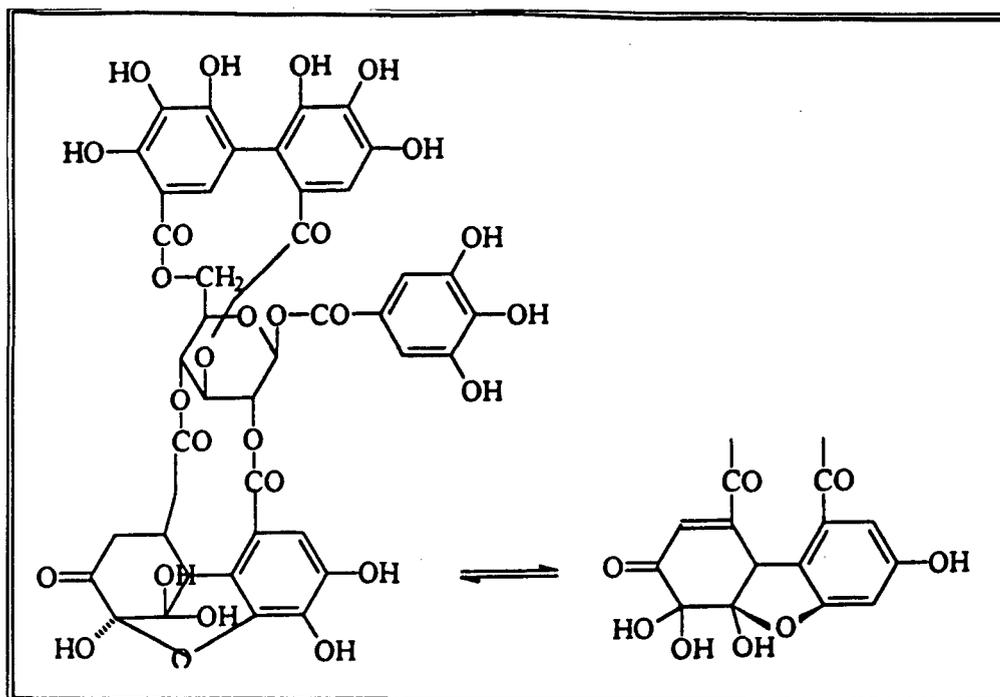


Figura 23: Curvas concentração-resposta obtidas para a rutina na traquéia isolada de cobaia sem epitélio, na ausência (●), ou na presença (○) de (A) FK 888 (1 μ M), ou SR 48968 (1 μ M). Cada ponto representa a média de 4-5 experimentos e as linhas verticais os erros padrão das médias.

4.2.3-) GERANIN:



O geranin produziu contração sustentada e reverssível da traquéia isolada de cobaia sem epitélio, apresentando uma CE_{50} média de 25,20 (18,05 - 30,10) μM , e E_{max} de 1.090 ± 30 mg de tensão. A figura 24 mostra que a contração produzida pelo geranin, na traquéia isolada de cobaia, é dependente do cálcio extracelular e sensível ao cloreto de níquel, bloqueador inespecífico de canais de cátions (Figura 24 A, B e C). Entretanto essa contração não foi afetada significativamente pelos bioqueadores de canais de cálcio do tipo L ativados por voltagem e sensíveis às dihidropiridinas (Figura 24 D), nem tampouco por antagonistas do tipo N, sensíveis à ω -conotoxina (Figura 24 E).

Esse efeito contrátil, induzido pelo geranin, também não foi afetado pelo antagonista competitivo do receptor vanilóide da capsaicina, a capsazepina (1 μM), ou pelo bloqueador de canal de cátion acoplado a esse receptor, o vermelho de rutênio (3 μM), (Figura 25 A e B,

respectivamente). A contração da traquéia de cobaia provocada pelo geranin, como nos ensaios para a quercetina e a rutina, não foi afetada pelos antagonistas de receptores das taquicininas, NK_1 , FK 888 (1 μM), ou NK_2 , SR 48968 (1 μM) (Figura 26 A e B).

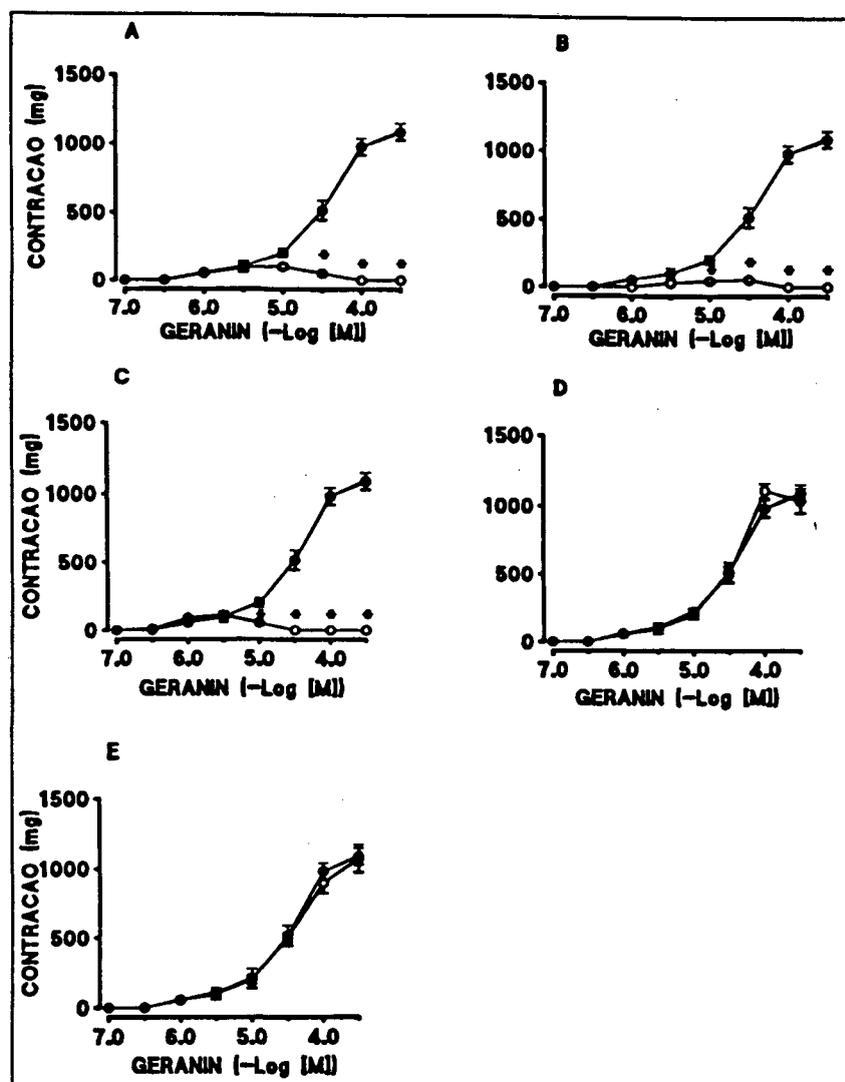


Figura 24: Curvas concentração-resposta obtidas para o geranin na traquéia isolada de cobaia sem epitélio, resposta controle (●), ou resposta obtida em: solução sem cálcio (O) (A), solução sem cálcio mais EGTA (O) (B) ou na presença de cloreto de níquel (O, 1 mM) (C), nifedipina (O, 3 μM) (D); ou ω -conotoxina (O, 0,1 μM) (E). Cada ponto representa a média de 4-5 experimentos e as linhas verticais os erros padrão das médias.

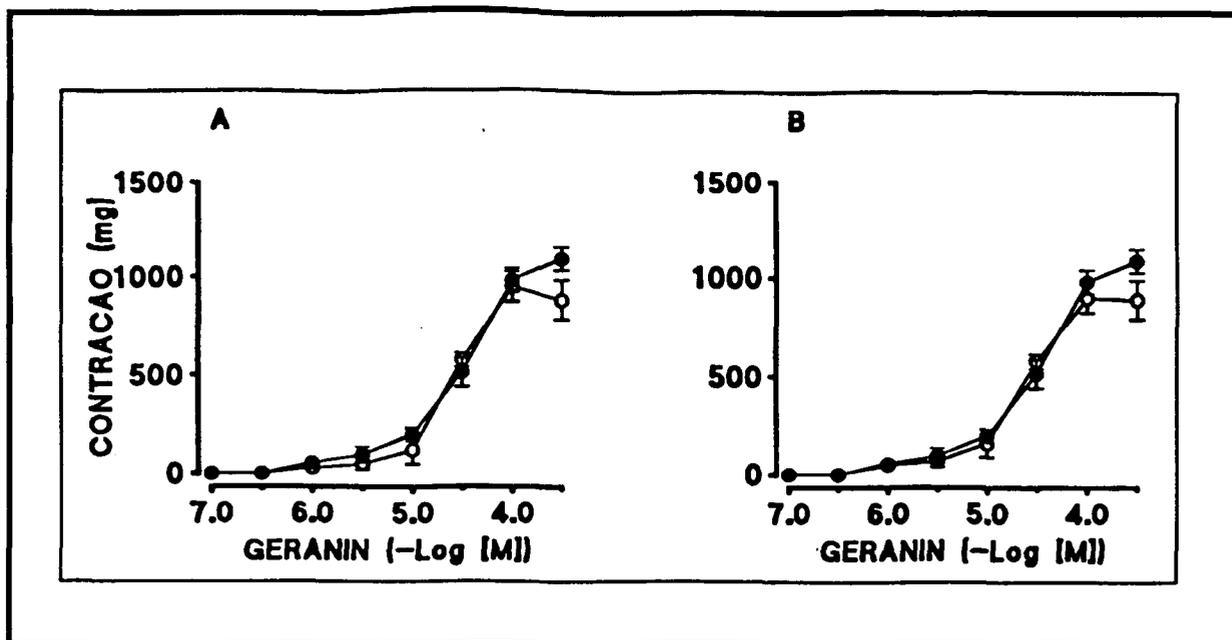


Figura 25: Curvas concentração-resposta obtidas para o geranin na traquéia isolada de cobaia sem epitélio, na ausência (●), ou na presença (○) de (A) capsazepina (1 μ M), ou vermelho de rutênio (3 μ M). Cada ponto representa a média de 4-5 experimentos e as linhas verticais os erros padrão das médias.

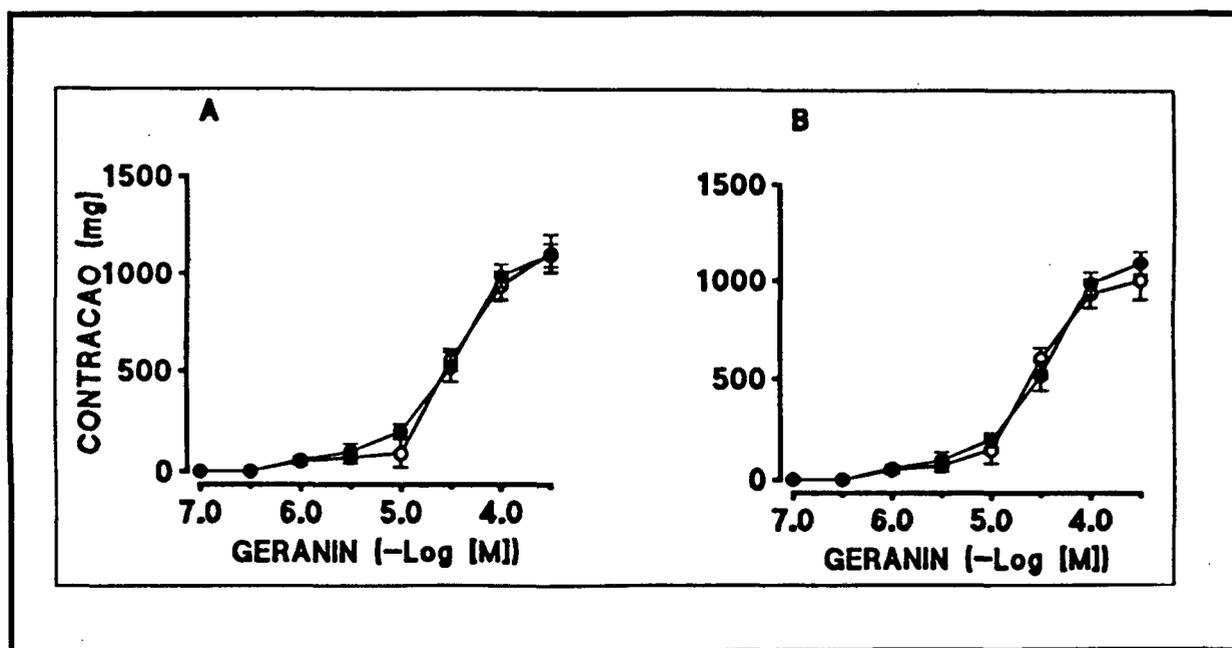


Figura 26: Curvas concentração-resposta obtidas para o geranin na traquéia isolada de cobaia sem epitélio, na ausência (●), ou na presença (○) de (A) FK 888 (1 μ M), ou (B) SR 48968 (1 μ M). Cada ponto representa a média de 4-5 experimentos e as linhas verticais os erros padrão das médias.

4.3-) Efeito Relaxante Induzido pelo EH de *Phyllanthus urinaria*:

A adição de concentrações cumulativas do EH de *P. urinaria* (0.1 - 10 mg/ml) nas preparações de traquéia isolada de cobaia com ou sem epitélio, pré-contraídas com carbacol, causou relaxamento concentração dependente. As CE_{50} médias (com limites de confiança de 95%) e os relaxamentos máximos ($R_{max.}$) para esses efeitos foram: 2,00 (1,47 - 2,78) e 1,94 (1,41 - 2,67) mg/ml e 627 ± 12 mg e 717 ± 16 mg, respectivamente (Figura 27 A). Contudo, o EH de *P. urinaria* causou relaxamento significativamente maior nas preparações cujo epitélio havia sido removido (Figura 27 A). Esse efeito relaxante induzido pelo EH foi bem reproduzível e reversível quando os experimentos foram realizados com pelo menos uma hora de intervalo entre as curvas.

Os resultados da figura 27 B demonstraram que o relaxamento causado pelo EH de *P. urinaria* foi significativamente antagonizado nas preparações contraídas pelo KCl (20 e 40 mM). Na concentração de 80 mM de KCl o relaxamento ao EH foi completamente inibido. Da mesma forma, a adição de cromacalina ao banho (10 nM - 10 μ M), ativador de canais de potássio modulados por ATP nas preparações sem epitélio e contraídas previamente com carbacol (0,1 μ M), causou relaxamento dependente da concentração, com CE_{50} média de 3,57 (2,75 - 4,64) μ M e um efeito máximo de 627 ± 17 mg (Figura 27 C). Como descrito na literatura, o efeito da cromacalina foi mais potente quando os experimentos foram realizados em preparações com o epitélio íntegro (Figura 27 C). Do mesmo modo que o EH de *P. urinaria*, o relaxamento

causado pela cromacalina foi totalmente inibido por altas concentrações de KCl (80 mM) no meio (Figura 27 D).

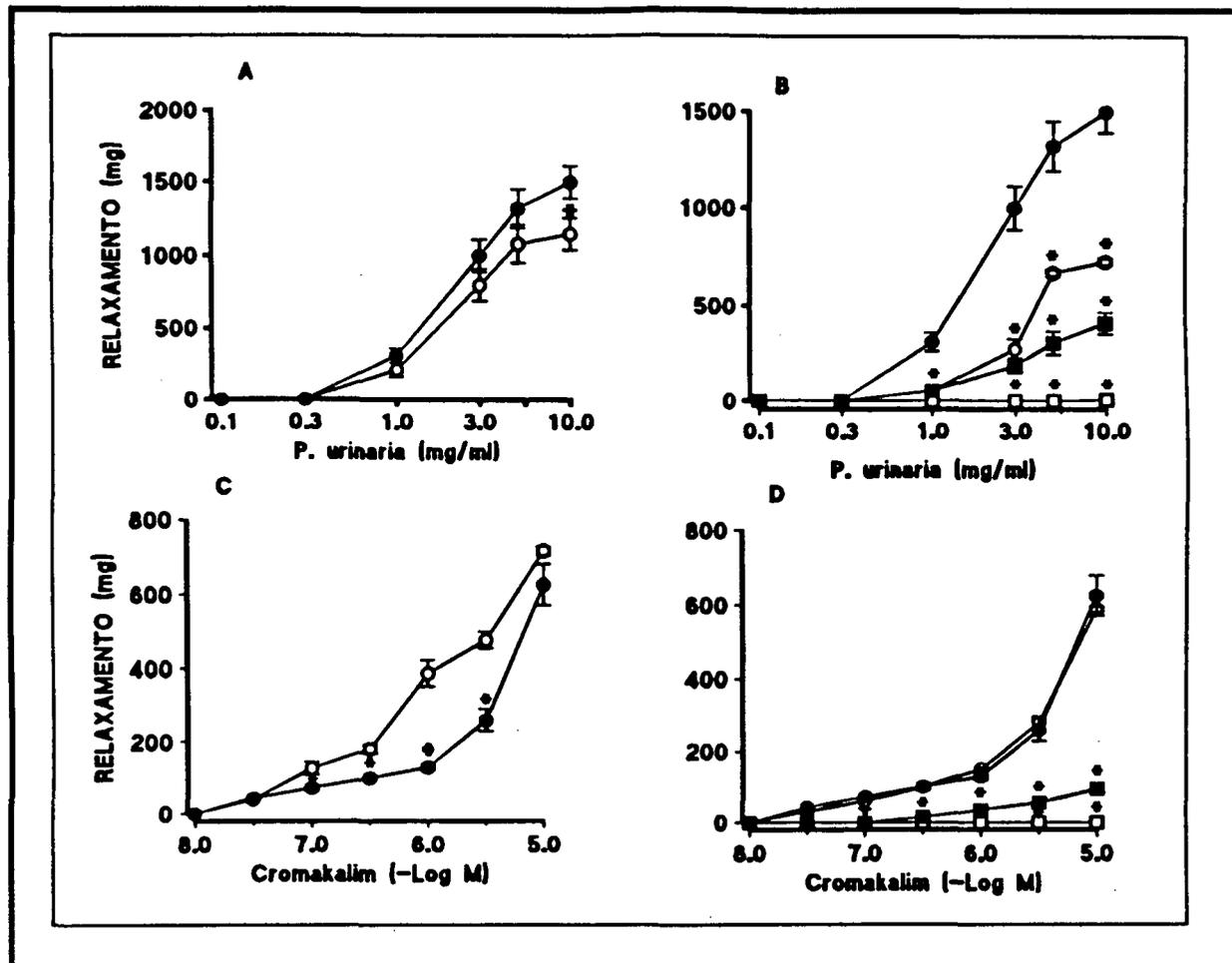


Figura 27: Curvas concentração-resposta obtidas para o extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus urinaria* (A e B) ou cromacalina (C e D) na traquéia isolada de cobaia com (O) ou sem (●) epitélio (A e C), ou em meio normal (●) ou em presença de concentrações crescentes de KCl no meio (mM): 20 (O), 40 (■), 80 (□) (B e D). Cada ponto representa a média de 4-5 experimentos e as linhas verticais os erros padrão das médias.

Os relaxamentos induzidos pelo EH e pelo cromacalina na traquéia isolada de cobaia sem epitélio foram antagonizados de maneira reversível e dependente da concentração pelo tetraetilamônio (TEA, 100 ou 300 μ M, bloqueador não seletivo de canais de potássio) e pela glibenclamida (0,1 ou 3 μ M, bloqueador de canais de potássio modulados por ATP) (Figura

28 A e 28 B). Entretanto, a apamina (0,1 ou 0,3 μM , bloqueador de canais de potássio de baixa condutância ativado pelo cálcio), não afetou significativamente o efeito relaxante induzido pelo EH de *P. urinaria* (Figura 28 C), bem como a da cromacalima (resultado não demonstrado). É importante notar, que nem a L-NOARG (100 μM , inibidor da óxido nítrico sintase), nem o azul de metileno (10 μM , inibidor da guanilato ciclase solúvel), foram capazes de interferir com o relaxamento produzido pelo EH de *P. urinaria* (Figura 28 D e 28 E).

A incubação prévia das preparações de traquéia isolada de cobaia com propranolol (1 μM), ou com o antagonista seletivo de receptores de VIP, (D-p-Cl-Phe⁶,Leu¹⁷)VIP (0,1 μM), produziu deslocamento paralelo à direita de aproximadamente 2 vezes na resposta relaxante induzida pelo extrato de *P. urinaria* (Figura 29 A e 29 B). Entretanto, o aumento das concentrações de propranolol para 3 μM não resultou em aumento adicional no deslocamento para a direita causado pelo EH (figura 29 A). Por outro lado, o antagonista seletivo de receptores do CGRP, CGRP(8-37) (0,1 μM) não afetou significativamente a resposta relaxante do extrato (Figura 29 C).

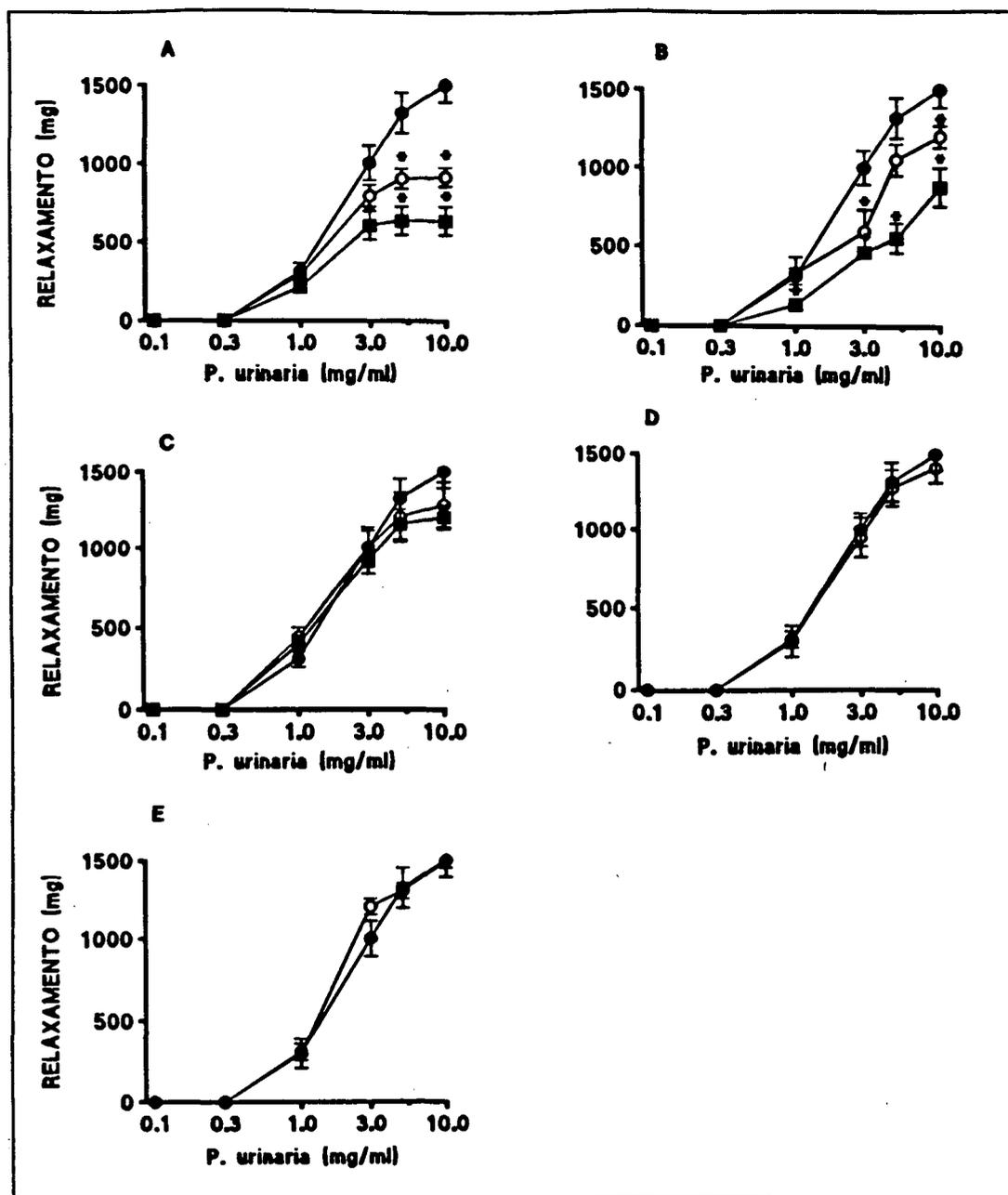


Figura 28: Curvas concentração-resposta obtidas para o extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus urinaria* na traquéia isolada de cobaia sem epitélio, na ausência (●) ou na presença de: (A) tetraetilamônio (○ 100 μ M) ou (■ 300 μ M), (B) glibenclamida (○ 0,1 μ M) ou (■ 3 μ M), (C) apamina (○ 0,1 μ M) ou (■ 0,3 μ M), (D) L-NOARG (○ 100 μ M) ou (E) azul de metileno (○ 10 μ M). Cada ponto representa a média de 4-5 experimentos e as linhas verticais os erros padrão das médias.

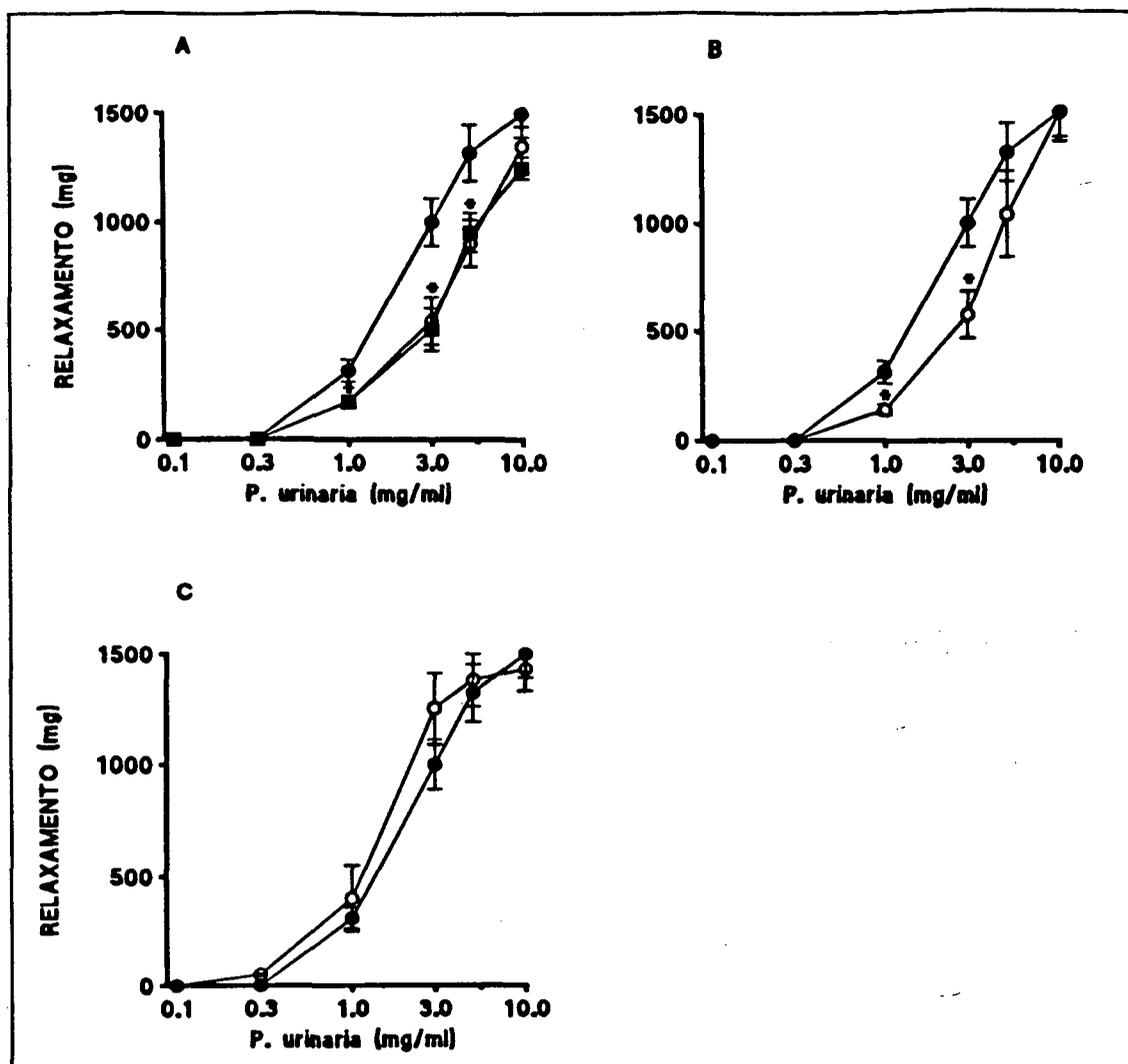
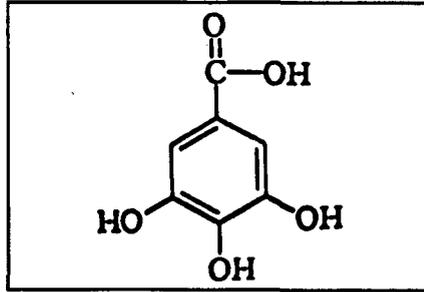


Figura 29: Curvas concentração-resposta obtidas para o extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus urinaria* na traquéia isolada de cobaia, na ausência (●) ou na presença de: (A) propranolol (○ 1 μ M) ou (3 μ M), (B) [D-p-Cl-Phe⁶,Leu¹⁷]VIP (○ 0,1 μ M), ou (C) CGRP (8-37) (○ 0,1 μ M). Cada ponto representa a média de 4-5 experimentos e as linhas verticais os erros padrão das médias.

4-4) Efeito Relaxante Induzido pelos Compostos Isolados do EH de *Phyllanthus urinaria*:

4.4.1-) ÁCIDO GÁLICO:



A adição de concentrações cumulativas crescentes de ácido gálico (0,1 μM - 1 mM) nas preparações de traquéia de cobaia com epitélio causou relaxamento concentração dependente. A remoção do epitélio das preparações produziu redução de aproximadamente 60% da resposta relaxante induzida pelo ácido gálico. A CE_{50} média (com um limite de confiança de 95%) foi 50,0 (37,2 - 55,0) μM , e o $\text{R}_{\text{máx.}}$ de 422 ± 34 mg produzido em preparações com o epitélio íntegro (Figura 30).

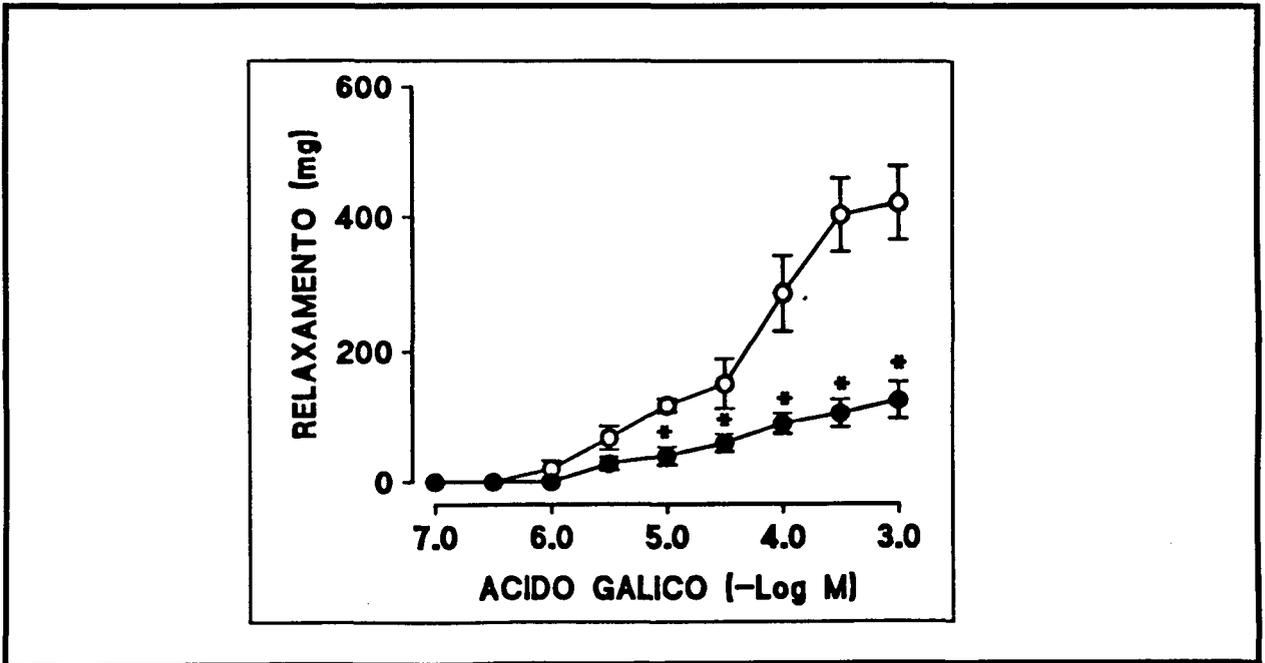
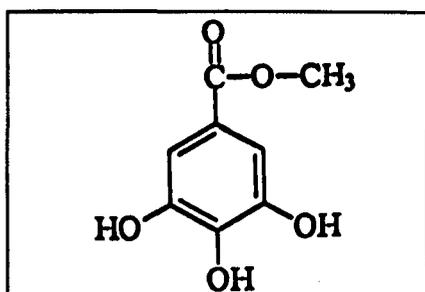


Figura 30: Curva concentração-resposta cumulativa relaxante para o ácido gálico na traquéia isolada de cobaia com (O) ou sem (●) epitélio. Valores representam a média \pm EPM de 4 a 5 experimentos.

4.4.2-) GALATO DE METILA:



A adição de concentrações cumulativas crescentes de gaiato de metila (10 nM - 30 μ M) nas preparações de traquéia de cobaia com ou sem epitélio, causou relaxamento concentração dependente. A remoção do epitélio das preparações não produziu redução da resposta relaxante induzido pelo gaiato de metila. A CE_{50} média (com limites de confiança de 95%) foi 1,8 (1,2 - 2,2) μ M, e o $R_{m\acute{a}x.}$ de 500 ± 25 mg produzido em preparações sem o epitélio íntegro (Figura 31).

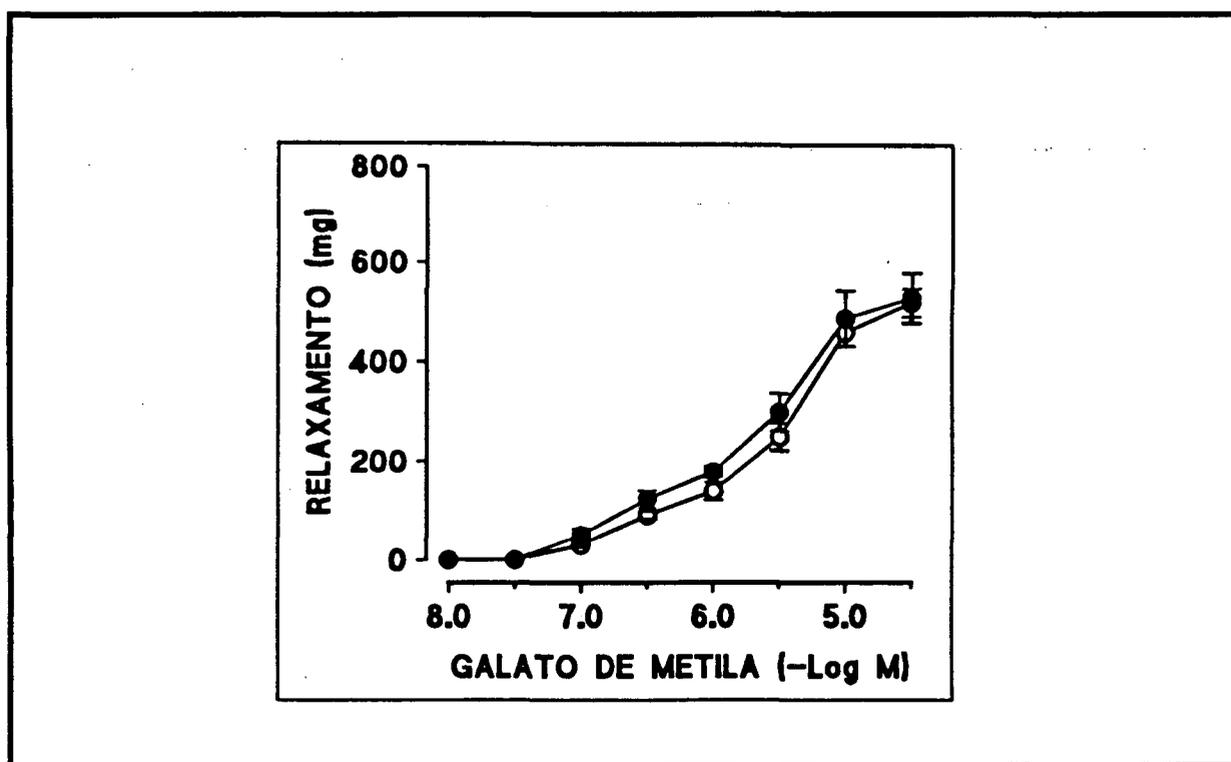


Figura 31: Curva concentração-resposta cumulativa relaxante para o gaiato de metila na traquéia isolada de cobaia com (O) ou sem (●) epitélio. Valores representam a média \pm EPM de 4 a 5 experimentos.

Os resultados da figura 32 indicam que o efeito relaxante causado pelo galato de metila foi parcialmente afetado pelo aumento da concentração de KCl no meio de incubação das preparações (20 e 40 mM), e foi totalmente bloqueada na presença de altas concentrações de KCl (80 mM) (Figura 32 A). Semelhante ao observado para o EH de *P. urinaria*, a incubação das preparações com tetraetilamônio (100 μ M) produziu inibição significativa de 47 ± 4 % da resposta relaxante induzida pelo galato de metila (Figura 32 B). A incubação das preparações com glibenclamida (3 μ M) causou deslocamento para a direita da curva concentração-resposta relaxante ao EH de *P. urinaria* em cerca de 2 vezes (Figura 32 C). Quando as preparações foram incubadas com caribdotoxina (100 nM), o relaxamento produzido pelo galato de metila foi marcadamente reduzido, (55 ± 7 %) (Figura 32 D). Ao contrário, a apamina (100 nM) não afetou significativamente a resposta relaxante causada pelo galato de metila (Figura 32 E).

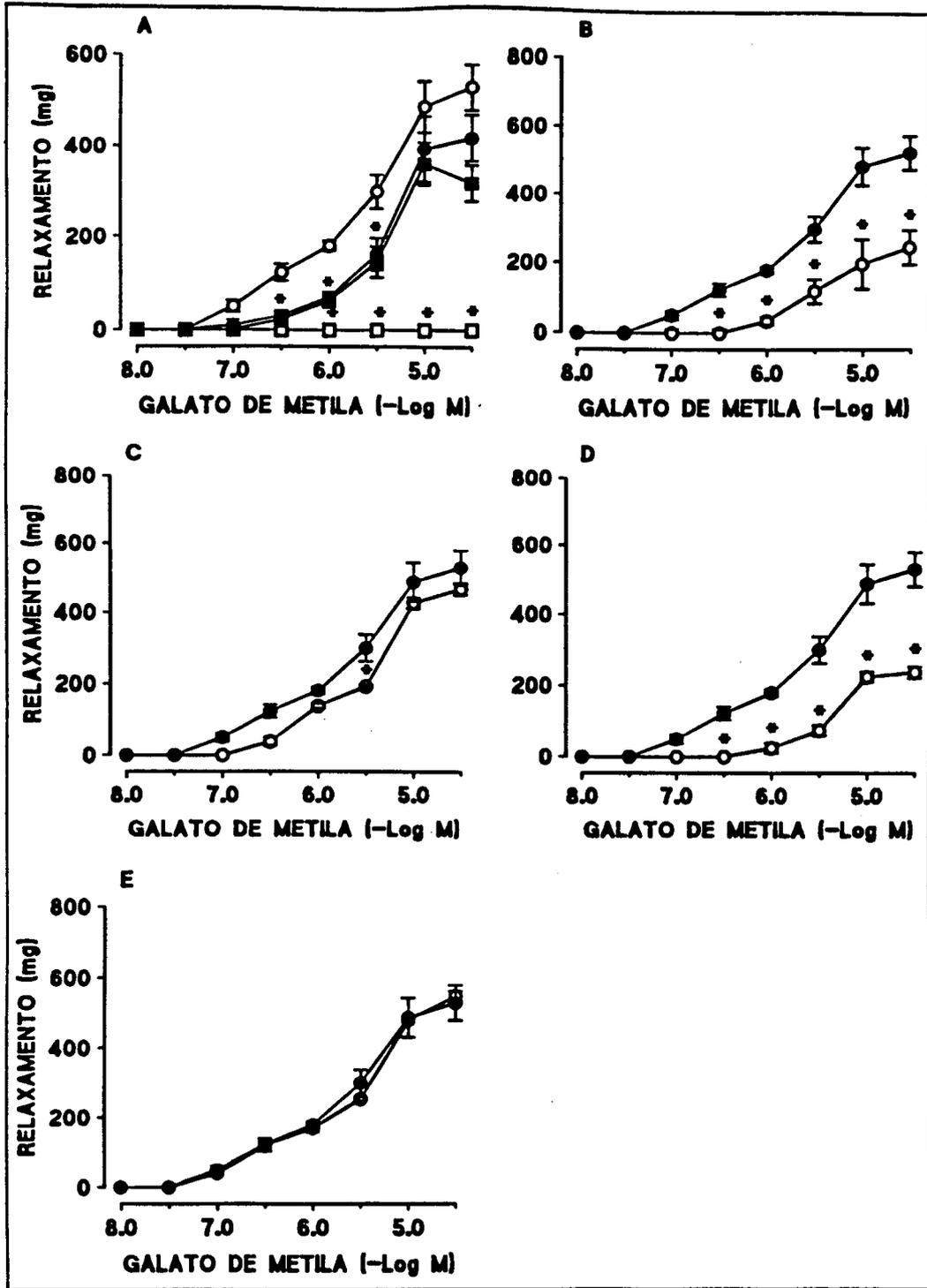


Figura 32: Curva concentração-resposta cumulativa relaxante para o galato de metila na traquéia isolada de cobaia sem epitélio (A) em meio normal (●) ou em presença de concentrações crescentes de KCl no meio (mM): 20 (○), 40 (■), 80 (□), na ausência (●) ou na presença de: (B) tetraetilamnio (○ 100 μ M) ou (■ 300 μ M), (C) glibenclamida (○ 0,1 μ M) ou (■ 3 μ M), (D) caribdotoxina, ou (E) apamina (○ 0,1 μ M). Valores representam a média \pm EPM de 4 a 5 experimentos.

A incubação das preparações com azul de metileno (10 ou 30 μM) ou com o SQ 22536 (3 ou 10 μM) influenciou apenas parcialmente a resposta relaxante produzida pelo gaiato de metila (Figura 33 A e B).

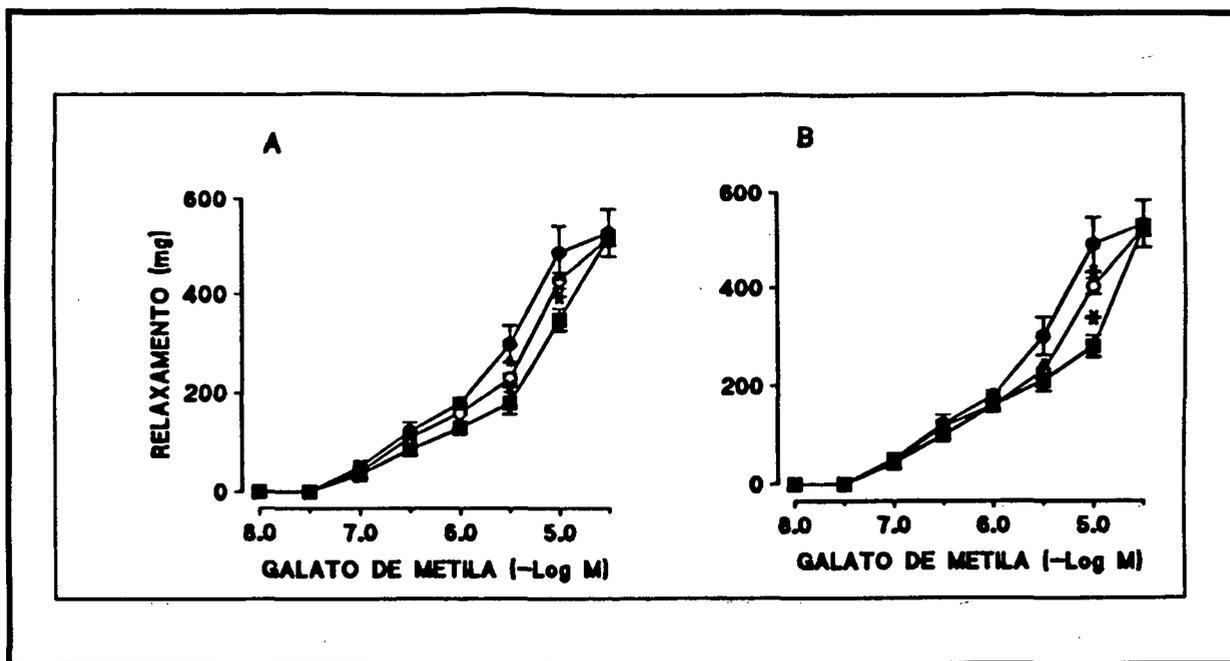
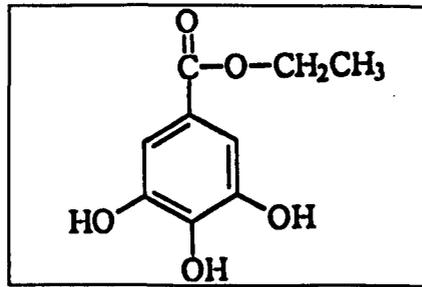


Figura 33: Curva concentração-resposta cumulativa relaxante para o gaiato de metila na traquéia isolada de cobaia sem epitélio, na ausência (●) ou na presença de: (A) azul de metileno (○ 10 μM) ou (◐ 30 μM), (B) SQ 22536 (○ 3 μM) ou (■ 10 μM). Valores representam a média \pm EPM de 4 a 5 experimentos.

4.4.3-) GALATO DE ETILA:



A adição de concentrações cumulativas crescentes de galato de etila (10 nM - 30 μM), como observado para o galato de metila, nas preparações de traquéia de cobaia com ou sem epitélio, causou relaxamento concentração dependente. A remoção do epitélio das preparações produziu pequeno aumento na resposta relaxante induzido pelo galato de etila. A CE_{50} média (com um limite de confiança de 95%) foi 0,7 (0,6 - 0,8) μM , e o relaxamento máximo de 666 ± 12 mg produzido em preparações sem o epitélio (Figura 34).

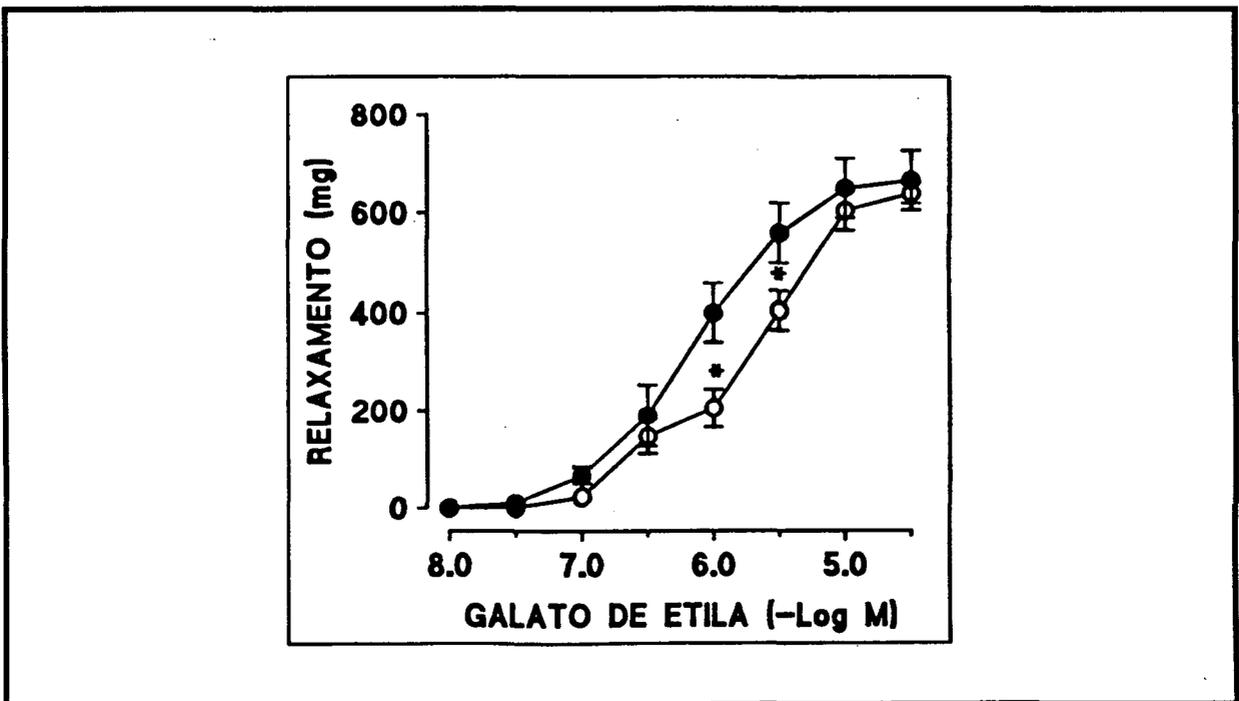


Figura 34: Curva concentração-resposta cumulativa relaxante para o galato de etila na traquéia isolada de cobaia com (O) ou sem (●) epitélio. Valores representam a média \pm EPM de 4 a 5 experimentos.

Os resultados da figura 35 indicam que o efeito relaxante causado pelo galato de etila, de modo similar aquele produzido para o galato de metila, foi parcialmente afetado pelo aumento das concentrações de KCl no meio de incubação das preparações (20 e 40 mM), sendo totalmente inibida na presença de altas concentrações de KCl (80 mM) (Figura 35 A). Semelhante ao observado para o EH de *P. urinaria* e para o galato de metila, a incubação das preparações com tetraetilamônio (100 μ M) produziu inibição significativa de 47 ± 6 % da resposta relaxante induzida pelo galato de etila (Figura 35 B). A incubação das preparações com glibenclamida (3 μ M) também causou inibição de modo aparentemente competitivo, deslocando à direita a curva concentração-resposta relaxante ao galato de etila em cerca de 3 vezes (Figura 35 C). Quando as preparações foram incubadas com caribdotoxina (100 nM) foi observado redução importante de resposta relaxante produzida pelo galato de etila, (62 ± 5 %) (Figura 35 D). Entretanto, a apamina (100 nM) não afetou significativamente a resposta relaxante causada pelo galato de metila (Figura 35 E).

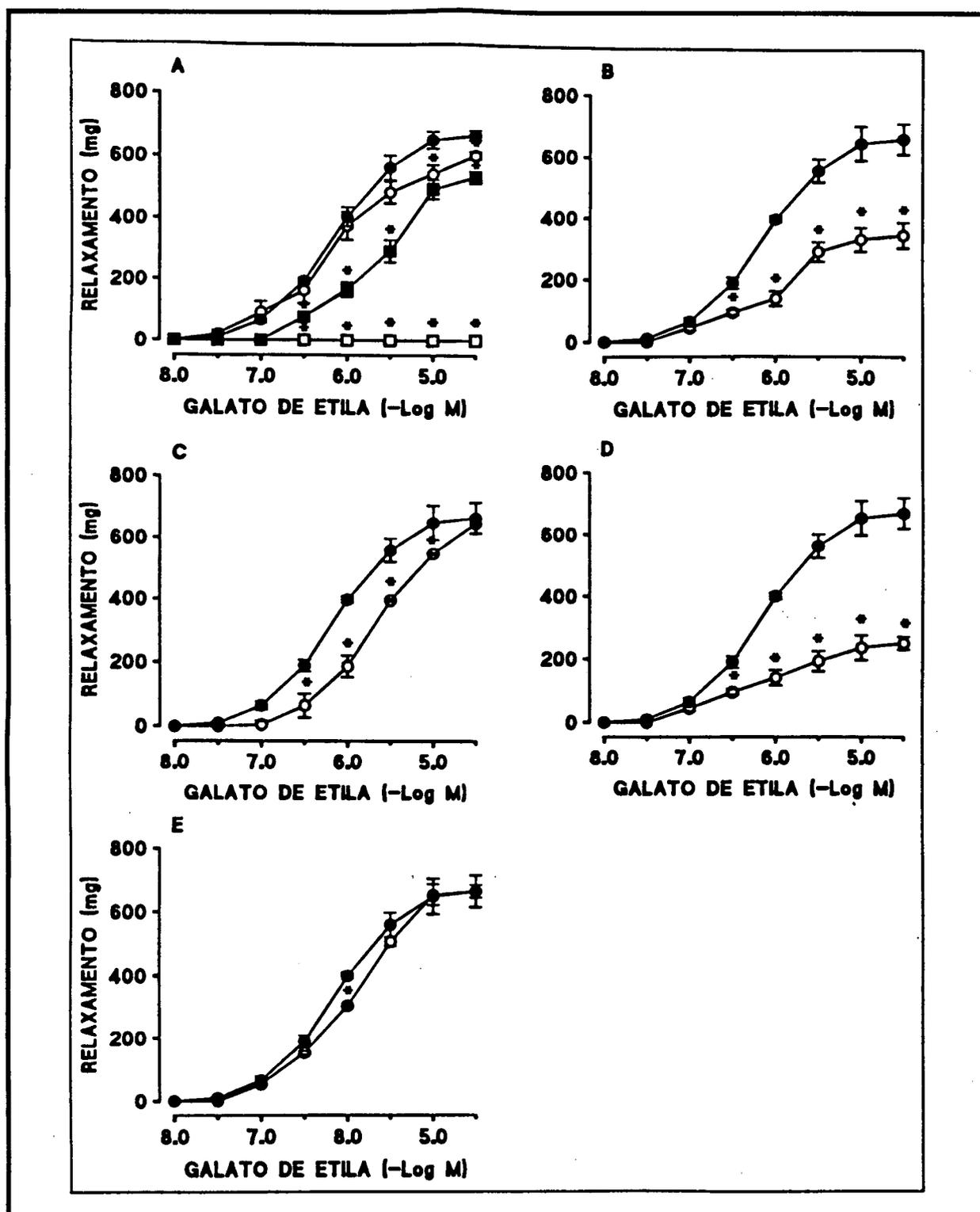


Figura 35: Curva concentração-resposta cumulativa relaxante para o galato de etila na traquéia isolada de cobaia (A) em meio normal (●) ou em presença de concentrações crescentes de KCl no meio (mM): 20 (○), 40 (■), 80 (□), na ausência (●) ou na presença de: (B) tetraetilamônio (○ 100 μM) ou (■ 300 μM), (C) glibenclamida (○ 0,1 μM) ou (■ 3 μM), (D) caribdotoxina, ou (E) apamina (○ 0,1 μM). Valores representam a média ± EPM de 4 a 5 experimentos.

A incubação das preparações com azul de metileno (10 ou 30 μM) ou com o SQ 22536 (3 ou 10 μM) não influenciou de maneira significativa a resposta relaxante produzida pelo galato de etila (Figura 36 A e B).

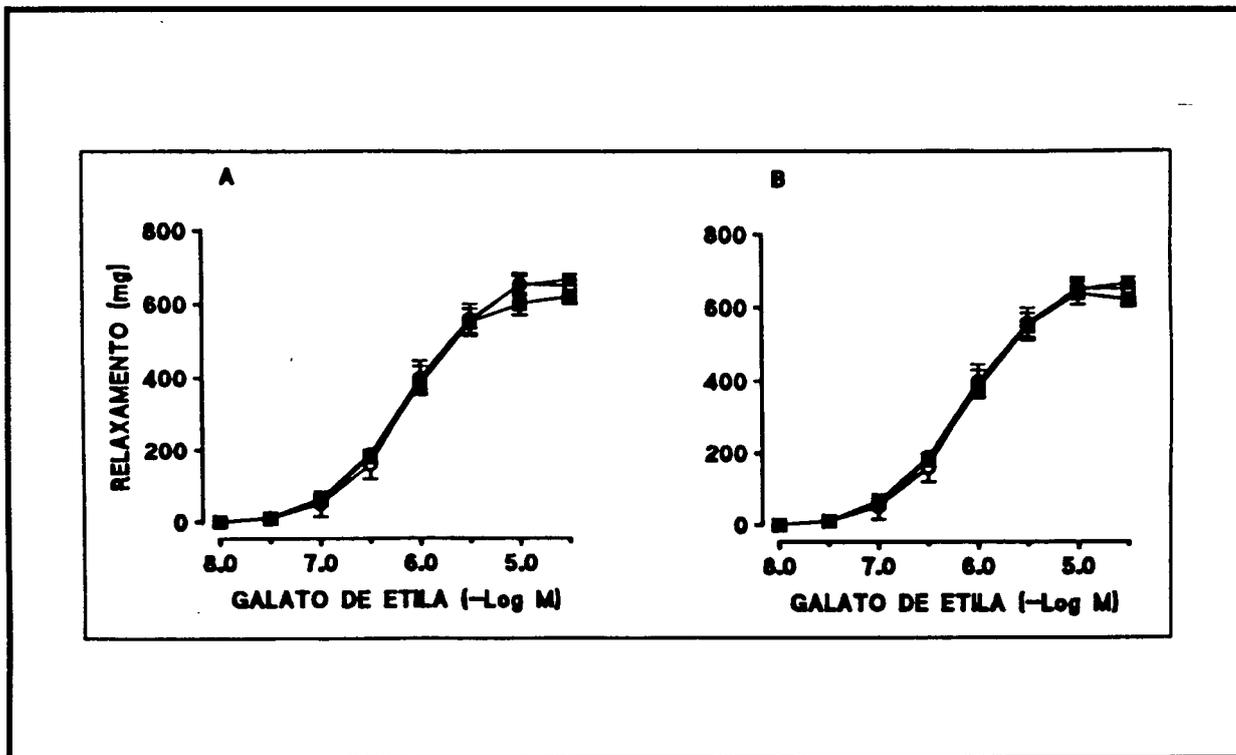


Figura 36: Curva concentração-resposta cumulativa relaxante para o galato de etila na traquéia isolada de cobaia, na ausência (●) ou na presença de: (A) azul de metileno (○ 10 μM) ou (■ 30 μM), (B) SQ 22536 (○ 3 μM) ou (■ 10 μM). Valores representam a média \pm EPM de 4 a 5 experimentos.

4.5) Efeito do galato de metila e do galato de etila sobre os níveis de AMPc e GMPc:

Resultados preliminares demonstram que a incubação das preparações com galato de metila ou com galato de etila em concentrações que induzem relaxamento máximo das preparações de traquéia isolada de cobaia, não afetou de maneira significativa os níveis de AMPc ou GMPc, confirmando os dados da análise farmacológica, observados nas figuras 33 e 36. No entanto, a adição de forskolin (10 μ M) ao banho, composto usado como controle positivo, aumentou significativamente os níveis de AMPc em relação aos níveis basais determinados em preparações tratadas com veículo. Da mesma forma, a adição de nitroprussiato de sódio (10 μ M) produziu aumento significativo dos níveis de GMPc em relação ao grupo controle tratados apenas com o veículo utilizado para diluir a droga.

5 - DISCUSSÃO

5.1-) Contração Induzida pelo EH do *Phyllanthus urinaria*:

O tecido muscular liso representa cerca de 10% da massa corporal em mamíferos e possui estruturas funcionais de resposta aos estímulos que podem variar significativamente para cada órgão. Pode ser didaticamente dividido em: músculo liso multiunitário, constituído por fibras musculares isoladas, como os músculos ciliares do olho, os piloerectores e músculos dos vasos de maior calibre; e músculos liso visceral, organizado em feixes de fibras, como o músculo da parede do intestino, dos canais biliares, dos uretères, útero e traquéia (Guyton, 1988).

O controle da reatividade e da contractilidade das células musculares lisas, é um processo que envolve um grande número de efetores e sinalizadores intracelulares, que podem ser direta ou indiretamente afetados por várias moléculas, ou pelos gradientes iônicos do meio intra e extracelular, o que pode diferenciar as respostas de um tecido para o outro.

O processo contrátil representa, para a célula muscular lisa, o resultado final de uma complicada rede intracelular de eventos que incluem, entre outros a formação de complexos com o íon cálcio, ativação de proteínas e fosforilação de sítios específicos nas moléculas do citoesqueleto e do mecanismo que regulam a contração (Figura 38).

REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CONTROLE DA CONTRATILIDADE NO MÚSCULO LISO

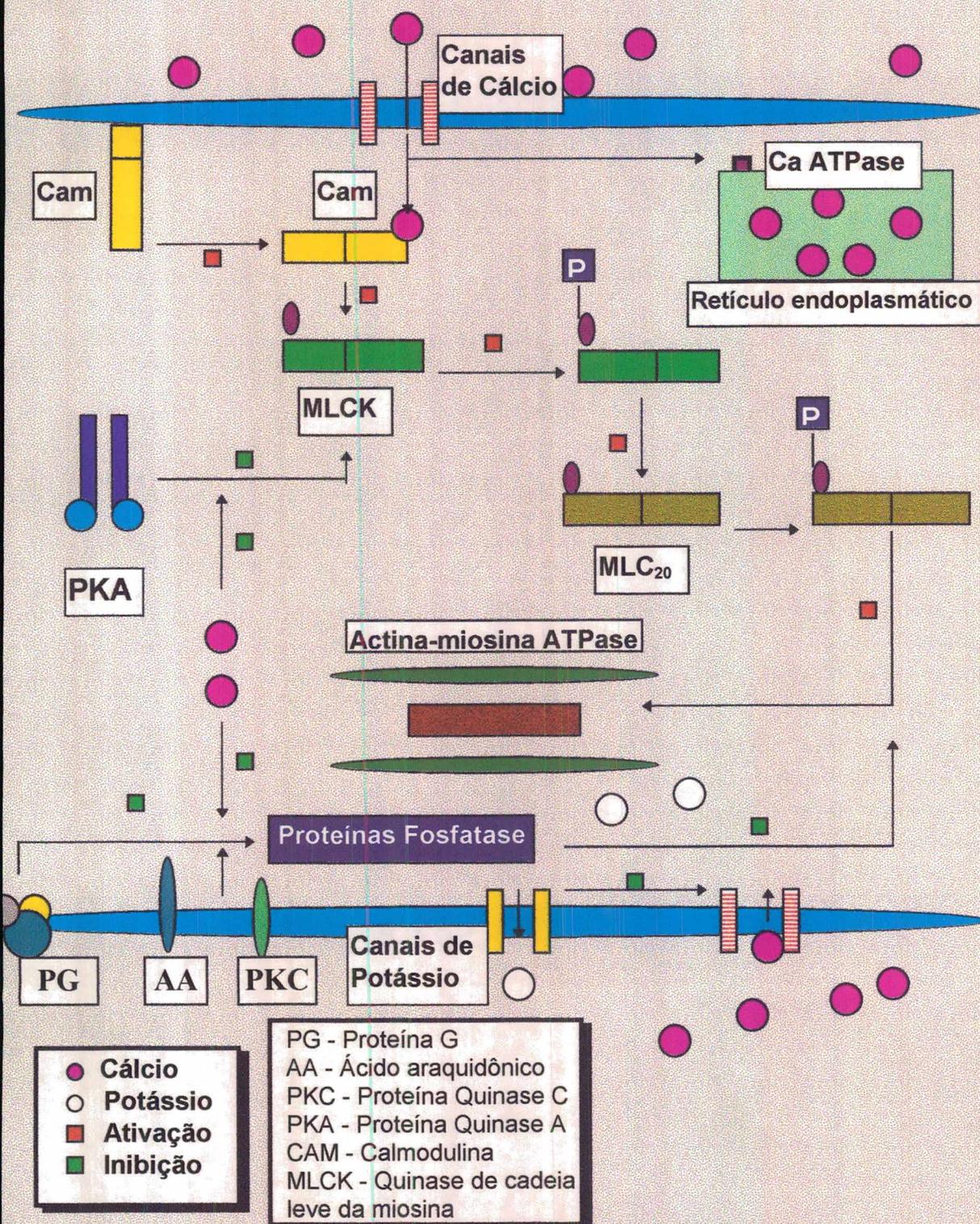


Figura 38: Representação esquemática dos possíveis sítios modulatórios do processo contrátil e alguns pontos de intervenção na cadeia de sinalização intracelular.

Como regra geral, toda contração envolve gasto de energia para a célula, e portanto necessidade de hidrólise de ATP. O processo, na sua grande maioria, é modulado pela abertura de canais de cálcio, que permitem controlar os níveis citoplasmáticos desse íon. O cálcio intracelular é indispensável para a formação do complexo ativo da quinase de cadeia leve da miosina (MCLK), que tem a função de catalisar a fosforilação de um sítio particular, um resíduo de serina localizado na posição 19 da molécula protéica, em um dos dois tipos de cadeia leve da miosina (MLC) (Sweeney et al., 1994). A fosforilação da MLC altera a sua estrutura conformacional, expondo o sítio catalítico e tornando-a muito mais reativa e capaz de estimular a atividade hidrolítica da ATPase actina-miosina, que passa a fornecer energia para que os filamentos de actina deslizem sobre os filamentos de miosina gerando, com isso, o movimento de contração (Figura 38).

A atividade fosforilativa das quinases também pode ser modulada pelas proteínas fosfatases, que promovem a defosforilação dos sítios de serina da MLC e, com isso, antagonizam a resposta contrátil promovida por essa proteína (Alessi et al., 1992). A maquinaria contrátil funciona de acordo com as concentrações de cálcio citoplasmático, que é inversamente proporcional à atividade das fosfatases, ou seja, o aumento da concentração intracelular de cálcio inibe a atividade das proteínas fosfatases e favorece a contração. A medida que o gradiente de cálcio volta ao normal inicia-se o processo defosforilativo (Itoh et al., 1993).

Também é interessante notar que as proteínas fosfatases presentes em vários sistemas musculares podem ser moduladas por outros agentes, como, por exemplo, a proteína quinase C (PKC), o ácido araquidônico (AA), e proteínas G (PG), acopladas ou não a receptores. A maquinaria intracelular que sinaliza a contração é, portanto, mais complexa do que se imaginava inicialmente, e muitos são os pontos de intervenção nessa cadeia para a modulação da atividade contrátil.

Das vias possíveis de modulação desse processo podemos distinguir dois caminhos distintos, porém complementares entre si, denominados de acoplamento farmacomecânico e acoplamento eletromecânico (Somiyo e Somiyo, 1994). O processo de controle contrátil baseado no acoplamento farmacomecânico é operado por múltiplos mecanismos de sinalização intracelular e envolve a ativação direta de receptores de membrana acoplados à proteína G que podem estimular enzimas específicas, como a fosfolipase C, que induz a quebra de fosfoinosítídeos da membrana gerando dois segundos mensageiros ativos que são o diacilglicerol (DAG) e o inositol trifosfato (IP_3). O DAG e o IP_3 promovem a ativação da PKC e ativação de receptores no retículo sarcoplasmático, respectivamente, resultando em aumento da concentração intracelular de cálcio. Esse aumento de cálcio intracelular modula a sensibilidade das proteínas contráteis e controla a atividade armazenadora do retículo sarcoplasmático (Somiyo et al. 1988; Somiyo e Somiyo, 1990). Essa parece ser a via de ação de vários

neurotransmissores no trato respiratório, como por exemplo, a acetilcolina, substância P, NKA e histamina, entre outros.

O segundo mecanismo, denominado acoplamento eletromecânico, é operado por mudanças no potencial de membrana que afetam diretamente a concentração do cálcio citoplasmático, por estimulação de canais iônicos dependentes de voltagem. Na célula muscular lisa o potencial de membrana é negativo, variando entre -40 e -70 mV (dependendo do tipo de tecido). Mudanças nesse potencial para valores mais positivos determinam estimulação de canais de cálcio operados por voltagem, promovendo o rápido influxo desse íon para o meio intracelular, desencadeando assim o processo contrátil (Somiyo e Himpens, 1989; Prosser, 1992).

O cálcio que entra na célula é rapidamente tamponado por proteínas com afinidade por esse íon, e por isso, pequenos estímulos que incidam sobre a célula não induzem grandes alterações estruturais da fibra. Todavia, quando o influxo de cálcio supera a capacidade tamponante dessas proteínas de ligação do cálcio, inicia-se todo o processo contrátil.

A membrana da célula muscular lisa possui uma série de canais iônicos regulados por voltagem ou operados por receptores. Nesse sítio também podem atuar alguns neurotransmissores como as neurocininas, que além de apresentarem uma resposta farmacomecânica envolvendo proteína G, produzem também estimulação elétrica por ativação dos canais de cálcio dependentes de voltagem. A capsaicina, também parece atuar por essa via, ativando receptores específicos chamados de

vanilóides, supostamente através de um acoplamento eletromecânico com canal de cátion não-seletivo permeável ao sódio e principalmente ao cálcio, para promover a liberação de neuropeptídios das fibras sensoriais.

Os resultados apresentados no presente estudo demonstram que o EH do *P. urinaria* contém princípios ativos capazes de contrair de maneira concentração-dependente a traquéia isolada de cobaia, um efeito que foi apenas parcialmente dependente da liberação de neurotransmissores através de mecanismos neuronais. Contudo, a contração causada pelo EH de *P. urinaria* não envolve estimulação de receptores muscarínicos ou histaminérgicos, evidenciados pelo fato de que a contração produzida pelo EH não foi afetada pela atropina ou mepiramina. Além disso, esse efeito parece não estar relacionado a mecanismos que resultem na ativação da proteína quinase C (PKC), tendo em vista que a estauroporina, um inibidor da PKC (Hidaka e Kobayashi, 1992), não afetou a resposta contrátil produzida pelo EH de *P. urinaria* na traquéia de cobaia.

A incubação das preparações com indometacina inibiu completamente a contração causada pelo extrato do *P. urinaria*, sugerindo que a sua resposta contrátil é indiretamente mediada pela liberação de metabólitos derivados da via do ácido araquidônico. Contudo, esse metabólito parece ser distinto do tromboxano A_2 , uma vez que o antagonista seletivo de receptores de tromboxano A_2 , o L 655,244 (Hall et al., 1987; Girard et al., 1989) não foi capaz de afetar a contração provocada pelo EH. Do mesmo modo, o leucotriêno D_4/E_4 e o PAF não

parecem estar envolvidos na resposta contrátil induzida pelo EH do *P. urinaria*, tendo em vista que o MK 571, um antagonista seletivo de leucotriêno D₄ e E₄ (Jones et al., 1989) e o antagonista de PAF WEB 2086 (Casals-Stenzel et al., 1987; Brambilia et al., 1987) também não afetaram significativamente a contração induzida pelo EH do *P. urinaria*.

De fato, a síntese e a liberação contínua de prostanóides, e a interação destes com os receptores específicos (ver Ushikubi et al., 1995 para revisão) determinam, em grande parte, o desenvolvimento do tonus intrínseco característico da traquéia isolada de cobaia (Buntling et al., 1976; Brink et al., 1981; Burka et al., 1981). Porém, os mecanismos celulares que controlam essa liberação, bem como a modulação da contratilidade da traquéia ainda permanecem obscuros (Hay et al., 1988, Braunstein et al., 1988).

A indometacina, antiinflamatório não esteroide, inibe a enzima ciclo-oxigenase (COX) que é responsável pela síntese de prostaglandinas em uma variedade de tecidos. Resultados recentes demonstraram que a indometacina é capaz de inibir não seletivamente tanto a enzima constitutiva (COX1) como a enzima induzida e presente em processos inflamatórios (COX2) (Meade et al., 1993, Mitchell et al., 1994, O'Neill et al., 1994). Recentemente, Charette et al., (1995) demonstraram que a produção de prostanóides responsáveis pelo tonus intrínseco na traquéia isolada de cobaia "in vitro" se deve principalmente a atividade da COX2. A precisa origem celular dessa enzima não foi ainda elucidada, mas a análise de tecidos da cartilagem e da musculatura lisa indicou a presença

de COX2 em ambas as células. De fato, a presença dessa enzima já havia sido descrita em outras células como fibroblastos, macrófagos, células epiteliais e na própria camada muscular lisa (Battistini et al., 1994, Pitchard et al., 1994, Vane et al., 1994).

A natureza do estímulo para a expressão da COX2 não está ainda bem explicada, mas o trauma da remoção e dissecação do tecido pode induzir o aumento da expressão dessa enzima. Outros fatores, como o sangue, a presença das citocinas interleucina 1 e o fator de necrose tumoral, além de certos fatores de crescimento já foram descritos como ativadores da expressão da COX2 (Battistini et al. 1994). Assim, não está claro com base nos presentes resultados, a possível participação da COX2 nas respostas contráteis ao EH do *P. urinaria* na traquéia de cobaia.

Aparentemente, o metabólito do ácido araquidônico envolvido na resposta contrátil ao EH de *P. urinaria* pertence à família das prostaglandinas. Várias evidências indicam que as prostaglandinas são sintetizadas e liberadas em vários tecidos incluindo os do trato respiratório (Moncada e Vane, 1983), e podem participar de uma série de funções biológicas diferentes como, por exemplo, o controle da contratilidade das vias aéreas (Orehek et al., 1973, 1975). Roberts et al. (1985) demonstraram que a PGI₂, endoperóxido derivado da família das prostaglandinas, produziu estimulação das fibras C bronquiais e pulmonares em cães, promovendo aumento da responsividade e da contração das células musculares lisas do trato respiratório. Além disso,

de COX2 em ambas as células. De fato, a presença dessa enzima já havia sido descrita em outras células como fibroblastos, macrófagos, células epiteliais e na própria camada muscular lisa (Battistini et al., 1994, Pitchard et al., 1994, Vane et al., 1994).

A natureza do estímulo para a expressão da COX2 não está ainda bem explicada, mas o trauma da remoção e dissecação do tecido pode induzir o aumento da expressão dessa enzima. Outros fatores, como o sangue, a presença das citocinas interleucina 1 e o fator de necrose tumoral, além de certos fatores de crescimento já foram descritos como ativadores da expressão da COX2 (Battistini et al. 1994). Assim, não está claro com base nos presentes resultados, a possível participação da COX2 nas respostas contráteis ao EH do *P. urinaria* na traquéia de cobaia.

Aparentemente, o metabólito do ácido araquidônico envolvido na resposta contrátil ao EH de *P. urinaria* pertence à família das prostaglandinas. Várias evidências indicam que as prostaglandinas são sintetizadas e liberadas em vários tecidos incluindo os do trato respiratório (Moncada e Vane, 1983), e podem participar de uma série de funções biológicas diferentes como, por exemplo, o controle da contratilidade das vias aéreas (Orehek et al., 1973, 1975). Roberts et al. (1985) demonstraram que a PGI₂, endoperóxido derivado da família das prostaglandinas, produziu estimulação das fibras C bronquiais e pulmonares em cães, promovendo aumento da responsividade e da contração das células musculares lisas do trato respiratório. Além disso,

foi demonstrado também que a PGI₂ estimula fibras C pulmonares em coelho (Armstrong et al., 1981). Por outro lado, Mapp et al. (1991) demonstraram que a PGI₂ pode liberar taquicininas de terminais aferentes sensíveis à capsaicina em brônquio isolado de cobaia, sendo esse efeito altamente sensível ao vermelho de rutênio, após dessensibilização com capsaicina, e ao antagonista seletivo de receptores de NK₂ o MEN 10,207. Esses resultados sugeriram que a ação contrátil induzida pela PGI₂, no brônquio isolado de cobaia, seja decorrente da liberação de taquicininas de fibras aferentes C.

Nossos resultados indicam que o efeito contrátil causado pelo EH de *P. urinaria*, além de ser dependente da produção de metabólitos do ácido araquidônico, foram também antagonizados por bloqueadores seletivos de receptores NK₁, o FK888 e de NK₂, o SR 48968. Tais resultados sugerem fortemente que os princípios ativos presentes no EH são capazes de induzir a liberação de taquicininas como a substância P, neurocinina A e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) das terminações nervosas sensíveis à capsaicina.

De acordo com os resultados recentes (Dias et al., 1995), o EH do *P. urinaria* causou contração de maneira concentração-dependente da bexiga isolada de cobaia, que dependem, a exemplo das ações da substância P, em grande parte do influxo de cálcio do meio extracelular. O efeito contrátil do EH foi parcialmente afetado pela nicardipina, um bloqueador de canais de cálcio do tipo L sensíveis a voltagem, mas foi insensível à ω -conotoxina, um bloqueador de canais de cálcio do tipo N.

Resultados semelhantes foram obtidos na traquéia de cobaia. Esses resultados nos levam a concluir que a contração produzida pelo EH de *P. urinaria* na traquéia isolada de cobaia resulta, essencialmente, da mobilização de cálcio extracelular que parece ter acesso à célula por ativação de outros canais de cálcio independentes dos canais do tipo L ou N sensíveis à voltagem, possivelmente os canais iônicos acoplados ao receptor da capsaicina e sensíveis ao vermelho de rutênio.

Ellis et al. (1993) caracterizaram farmacologicamente os receptores responsáveis pelas respostas contráteis das taquicininas nas vias aéreas isoladas de humanos, cobaias e hamsters, e concluíram que, em humanos e em hamsters, as contrações induzidas pelas taquicininas envolvem preferencialmente a estimulação de receptores do tipo NK₂, enquanto que, em cobaias, ambos os receptores contribuem para esse efeito.

Os genes dos receptores taquicinérgicos que foram identificados em mamíferos por Nakanishi (1987), tiveram sua estrutura protéica proposta em 1991 pelo mesmo autor (Nakanishi, 1991). Esses receptores cresceram em importância a partir da caracterização da relevância de suas ações fisiológicas e da sua ampla distribuição nos vários tecidos (Otsuka e Yoshioka, 1993; Maggi, 1994 para revisão). Resultados descritos na literatura confirmam que a traquéia de cobaia contém receptores para as taquicininas do tipo NK₁, que contribuem para a resposta contrátil produzida pelas neurocininas no músculo liso das vias aéreas (Maggi, 1991 a, b; Ireland et al., 1988, 1991; McKee et al., 1993; Geppetti et al., 1993; Floch et al., 1994; Regoli et al., 1994). Em vista

desses resultados, investigamos também se a contração produzida pelo EH de *P. urinaria* na traquéia de cobaia não estaria associada com a liberação, estimulada direta ou indiretamente, de taquicininas de neurônios sensoriais.

Confirmando dados prévios da literatura (Maggi, 1989; Floch et al., 1994; Ellis e Udem, 1994), demonstramos que os antagonistas seletivos de receptores NK₁ (FK 888) e NK₂ (SR 48968) produziram deslocamento paralelo à direita da curva concentração-resposta à substância P e ao agonista seletivo do receptor NK₂, a [β -Ala⁸]NKA(4-10), fornecendo valores de pA₂ de 6,2 \pm 0,3 e 9,1 \pm 0,2, respectivamente. Tais resultados sugerem a coexistência desses receptores nessa preparação. De particular relevância são os resultados que demonstram que os antagonistas seletivos de receptores NK₁ e NK₂, FK 888 (Fujii et al., 1992; Murai et al., 1993) e SR 48968 (Emonds-Alt et al., 1992; Advenier et al., 1992; Kamikawa e Shimo, 1993), antagonizaram de modo tipicamente não-competitivo, mas de maneira seletiva, a contração mediada pelo EH de *P. urinaria*. Esses resultados, portanto, demonstram que os princípios ativos presentes no EH do *P. urinaria* estimulam os nervos sensoriais sensíveis à capsaicina ou indiretamente pelo estímulo da produção de PGI₂, causando em decorrência, a liberação a liberação de taquicininas da traquéia de cobaia.

Ellis e Udem (1994), relataram que as respostas contráteis induzidas por duas substâncias de ocorrência natural, a capsaicina e a resiniferatoxina (um diterpeno análogo da capsaicina ultrapotente obtido

da *Euphorbia resinifera* e *Euphorbia poissonii*) (Hergenhahn et al., 1974), não foram afetadas pelo antagonista seletivo de receptores NK₁, CP 96345, mas foi antagonizada pelo antagonista de receptor NK₂, o SR 49968. No entanto, esses efeitos contráteis foram quase que totalmente abolidos pela combinação desses dois antagonistas.

Pesquisas neurofarmacológicas recentes demonstraram que a capsaicina e a resiniferatoxina atuam em receptores específicos identificados como receptores vanilóides. Estes receptores estão distribuídos em vários tecidos de mamíferos (Dray, 1992), incluindo a medula espinhal (Szallasi e Blumberg, 1991), bexiga (Szallasi et al., 1993), e vias aéreas (Szallasi, 1993). A estrutura proposta para esse receptor indica que ele está associado a um canal iônico permeável a cátions, especialmente ao cálcio (Wood et al. 1988, revisado por Szolcsanyi, 1990; Bevan e Szolcsanyi, 1990). O receptor vanilóide, que é seletivamente ativado pela capsaicina e pela resiniferatoxina (Szallasi, 1994; Szallasi e Goso, 1994; Szallasi et al., 1993; Charette et al., 1993), promove a excitação das terminações nervosas, causando liberação de taquicininas incluindo a substância P, NKA e CGRP.

Vários trabalhos têm proposto que o ligante endógeno para o receptor específico da capsaicina, e de seu análogo natural, o diterpeno resiniferatoxina, seja os prótons H⁺. Esses prótons seriam produzidos nas proximidades dos neurônios sensoriais por alterações fisiológicas ou patológicas, como por exemplo na inflamação neurogênica. Recentemente, Liu e Simon (1994) demonstraram que as correntes

induzidas em neurônios ganglionares ativadas pela capsaicina e por uma diminuição do pH, são muito similares quanto à cinética, reversão de potencial, resposta ao cálcio e inibição pelo vermelho de rutênio ou pela capsazepina. Liu e Simon (1994) sugeriram ainda, que o estímulo ácido poderia funcionar como um ativador endógeno da corrente ativada pela capsaicina, e que isso justificaria o aumento da dor em processos patológicos onde ocorre redução brusca do pH do meio, como por exemplo no caso das isquemias e nos processos inflamatórios. Bevan e Geppetti (1994), propuseram uma representação esquemática para o receptor vanilóide, bem como para os sítios de ação dos agonistas e antagonistas desse receptor (figura 39).

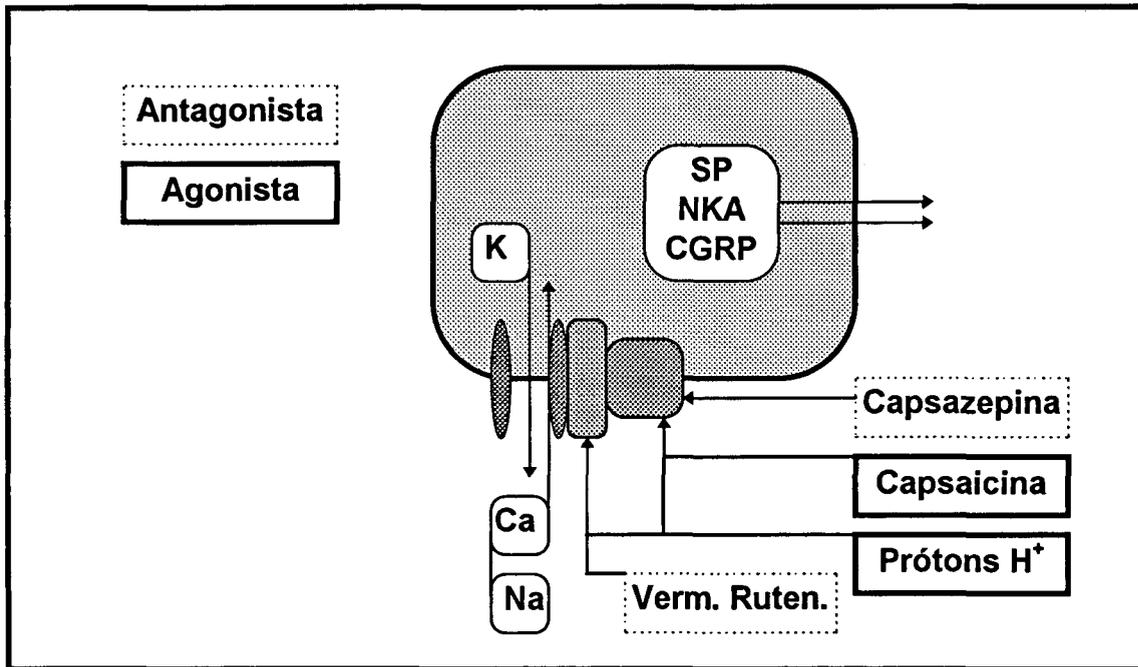


Figura 39: Representação esquemática de um neurônio sensorial terminal sensível a capsaicina, e dos sítios de ação propostos para os agonistas e antagonistas.

O tratamento sistêmico com capsaicina pode levar à depleção do conteúdo de neurocininas de uma subpopulação de células ganglionares sensoriais, fibras aferentes do corno dorsal da medula espinhal ou em tecidos periféricos, como o das vias aéreas (Holzer et al., 1991). Esse processo de dessensibilização é dependente de cálcio e ocorre em decorrência de concentrações elevadas e persistentes de capsaicina sobre as terminações sensitivas. Tal procedimento é capaz de promover a liberação maciça dos neuropeptídios e causar o bloqueio axonal da condutância e a interrupção do transporte intra-axonal de moléculas, incluindo as vesículas sinápticas taquicinérgicas do corpo neuronal até a periferia, na zona ativa da sinapse (Miller et al., 1982; Taylor, 1984 e 1985). Esse mecanismo parece ser mediado pela ativação de uma proteína fosfatase 2B dependente de cálcio-calmodulina, a calcineurina, que é ativada pela grande quantidade de cálcio que entra na célula a partir da abertura persistente do canal iônico vanilóide. Todavia, não está ainda bem esclarecido se o canal ativado pela capsaicina é um substrato para esta enzima ou se há algum processo intermediário entre a estimulação do canal e a dessensibilização (Yeats et al. 1992). Por outro lado, a neurotoxicidade dos vanilóides parece ser devida à deterioração mitocondrial causada pelo aumento do influxo de cálcio, e ao dano osmótico que segue a entrada de sódio pelo canal iônico ativado pelo receptor da capsaicina, com produção de NaCl e alterações na osmolaridade celular, podendo em células jovens, levar à destruição irreversível.

A capsaicina é capaz de causar outras ações que independem da ativação direta do seu receptor, como por exemplo a destruição do sistema de microtúbulos, reduzindo a capacidade de transporte axonal. Esse efeito, contudo, não parece estar relacionado ao receptor, pois a administração exógena do fator de crescimento neural (NGF) pode inibir, ou até mesmo reverter, o processo de dessensibilização de longo prazo produzido pela capsaicina (Taylor et al., 1984, 1985).

Os resultados observados com o EH de *P. urinaria*, sugerem que a ativação do canal iônico do receptor vanilóide, induzida pelo EH, não foi capaz de inibir as ações da capsaicina sobre as preparações, não causando dessensibilização dos terminais sensíveis. Esses dados sugerem que provavelmente existam outros sítios de ação intracelulares para a capsaicina responsáveis pelo efeito dessensibilizante além da simples abertura do canal vanilóide, como descritos por (Miller et al., 1982; Yeats et al., 1992).

Contudo, a dessensibilização prolongada com capsaicina (10 μ M), afetou apenas parcialmente a contração induzida pelo EH de *P. urinaria*, demonstrando que esse efeito não parece depender da ativação de receptores vanilóides na célula muscular lisa. Por outro lado, a contração provocada pelo EH, similar aquela induzida pela capsaicina, depende em grande parte do influxo de cálcio extracelular, que demonstrou ser altamente sensível ao vermelho de rutênio, um antagonista seletivo dos canais de cálcio acoplados ao receptor vanilóide (Amann e Maggi, 1991). A contração produzida pelo EH de *P. urinaria* também foi sensível ao

vermelho de rutênio, que inibiu de maneira dependente da concentração e por um mecanismo não-competitivo tanto as respostas causadas pela capsaicina como às causadas pelo extrato do *P. urinaria*. Esse efeito foi bastante seletivo, já que nas concentrações em que houve uma inibição importante nas respostas contráteis produzidas pela capsaicina e pelo EH de *P. urinaria*, o vermelho de rutênio não afetou a contração induzida por outros agonistas como o carbacol, a histamina ou a prostaglandina E₂.

De acordo com os resultados descritos na literatura (Dickenson e Dray, 1991; Bevan et al., 1992; Perkins e Campbell, 1992), o antagonista seletivo da capsaicina, a capsazepina, produziu antagonismo competitivo da resposta contrátil à capsaicina na traquéia de cobaia, fornecendo valor de pA₂ de $6,2 \pm 0,1$. Interessante notar que a capsazepina não interferiu com a contração produzida pelo EH do *P. urinaria*. Recentemente, Ellis e Udem (1994) relataram que a capsazepina antagonizou, de modo competitivo e com potência similar, as contrações causadas pela capsaicina e para a resiniferatoxina na traquéia de cobaia, fornecendo valores de pA₂ de $6,02 \pm 0,13$ e $6,28 \pm 0,25$, respectivamente. Esses resultados, são portanto, consistentes com a noção de que as ações da capsaicina e da resiniferatoxina na traquéia de cobaia envolvem a ativação de receptores vanilóides sensíveis a capsazepina.

Apesar das espécies de *Phyllanthus* pertencerem a mesma família das plantas conhecidas por produzirem o diterpeno forbol éster e o irritante e ultrapotente análogo da capsaicina, o diterpeno resiniferatoxina (Euphorbiaceae), e a despeito do fato do EH de

Phyllanthus urinaria produzir algumas ações comuns com esses compostos na traquéia de cobaia, os princípios ativos presentes nas espécies de *Phyllanthus* responsáveis pelos seus efeitos contráteis não parecem estar relacionados a esses compostos. Esta conclusão está baseada nas seguintes evidências: (1) O EH de *P. urinaria* não apresentou efeito irritante, sendo bem tolerado por animais (Santos et al., 1994). (2) Ao contrário dos compostos irritantes, como a capsaicina e resiniferatoxina, os EH de várias espécies de *Phyllanthus* apresentaram importante efeito analgésico, principalmente contra a dor de origem neurogênica (Santos et al., 1994; 1995a; 1995c). (3) Os compostos ativos presentes nas várias espécies de plantas do gênero *Phyllanthus*, pelo menos para a atividade analgésica, são quimicamente distintos da capsaicina e da resiniferatoxina, e incluem esteróides (Santos et al., 1995b), flavonóides e taninos (Miguel et al., 1995a; 1995b).

5.2-) Contração Induzida pelos Compostos Isolados do EH do *Phyllanthus urinaria*:

A análise química dos compostos presentes no extrato de *P. urinaria* demonstrou a presença de flavonóides como a astragalina, quercetina, quercitrina, isoquercitrina e rutina (Nara et al., 1977). Yao e Zuo (1993) isolaram e identificaram o kaempferol e o daucosterol, além de dois novos compostos fenólicos denominados pelos autores como sendo o carboxilato de metil brevifolin e o ácido dehidrochebúlico trimetil éster. Yao e Zuo (1993) também descreveram 8 compostos já conhecidos: o n-

octadecano, beta-sitosterol, ácido elágico, daucosterol, kaempferol, quercetina, ácido gálico e rutina. O geranin, isolado do *P. niruri* (Ueno et al., 1988), foi também identificado no *P. urinaria* por Cechinel et al. (dados não publicados).

Dentre os diversos compostos isolados do EH do *P. urinaria* aqueles responsáveis pelo efeito contrátil na traquéia de cobaia incluem dois flavonóides, a quercetina e a rutina, um tanino hidrolisável, o geranin e um esteróide, o β -sitosterol. Esses compostos apresentaram atividade contrátil concentração-dependente, reversível e sem evidência de taquifilaxia, na traquéia isolada de cobaia. A ordem de potência encontrada foi quercetina > geranin > rutina >> β -sitosterol.

O esteróide, β -sitosterol, apresentou efeito contrátil muito discreto e não foi admitido com sendo um dos responsáveis pelo efeito contrátil obtido a partir do extrato total. Já a quercetina, rutina e o geranin, apresentaram efeito contrátil similar ao perfil apresentado pelo EH de *P. urinaria*, sendo suas ações dependentes do influxo extracelular de cálcio, e sensíveis parcialmente á nicardipina. Interessantemente, ao contrário do que foi observado para o EH, as respostas contráteis à esses três compostos foram insensíveis ao vermelho de rutênio e aos antagonistas de receptores das taquicininas, tanto do tipo NK_1 como NK_2 . Tais resultados sugerem que, possivelmente, outros compostos ainda não identificados nesta planta seriam os responsáveis pelos efeitos sobre os sistemas taquicinérgico e/ou vanilóide.

Tem sido relatado na literatura que compostos fenólicos em especial os bioflavonóides, exercem várias ações farmacológicas sobre os sistemas biológicos. Os efeitos mais estudados desses compostos têm sido aqueles relacionados ao sistema vascular. Foi observado que vários flavonóides de ocorrência natural causam aumento da resistência capilar ao trauma (Fairbairn, 1959), podendo ainda modular a pressão arterial. Além disso, alguns taninos revelaram um complexo efeito contrátil sobre anéis de artéria pulmonar de coelho (Russel e Rohrbach, 1989), promovendo contração em preparações submetidas ao tonus basal, mas causando relaxamento nas preparações pré-contraídas com noradrenalina (Russel e Rohrbach, 1989). Essa ação dual parece ser decorrente da liberação conjunta de fatores derivados do endotélio com ação relaxante, como por exemplo o óxido nítrico, e contrátil, como o tromboxano A₂. Fitzpatrick et al. (1993) demonstraram que vários extratos de plantas, sementes e frutas produziam relaxamento dependente do endotélio em preparações vasculares contraídas com fenilefrina. Resultados semelhantes foram descritos com alguns taninos e com a quercetina isolados desses extratos. De modo interessante, os relaxamentos induzidos tanto pelos taninos quanto pela quercetina foram bloqueados por um inibidor seletivo da óxido nítrico sintase (Fitzpatrick et al. 1993). Mais recentemente, Chen e PaceAsciak (1996) demonstraram que a quercetina e o resveratrol produziram relaxamento em aortas isoladas de rato, sendo esses efeitos dependentes da produção de óxido nítrico. Chiesi e Schwaller (1994) demonstraram que tanto os taninos como a

quercetina produziram inibição da atividade da óxido nítrico sintase constitutiva do endotélio. Apesar desse relato não contribuir para a explicação do efeito vasorrelaxante da quercetina, outros trabalhos demonstram que a quercetina, bem como taninos, possuem ação inibitória sobre outras enzimas diretamente envolvidas no processo contrátil, tais como a PKC, a MLCK e a calmodulina dependente de cálcio (Polya et al., 1995).

A quercetina é, provavelmente, o flavonóide derivado de planta que mais tem sido estudado. Para ela são propostas, na literatura, ações em vários sítios, tais como: ações sobre o músculo liso isolado (Abdala et al. 1989), inibidor da ATPase dependente de Na^+/K^+ (Mirsalikhova e Pakudina, 1977), inibidor da Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático (Shoshan e MacLennan, 1981), inibidor da ATPase mitocondrial (Lang e Racker, 1974), inibidor da fosfodiesterase seletiva para AMPc (Beretz et al., 1978), atividade mutagênica em bactérias (Bjeldanes e Chang, 1977). Além disso, a quercetina produz efeito vasodilatador na aorta de rato (Duarte et al., 1993, Chen e PaceAsciak, 1996), sendo também capaz de regular o sinal de transdução em células de carcinoma humano (Singhal et al., 1995), possui atividade inibidora sobre a fosforilase quinase, tirosina quinase (Srivastava, 1985), e fosfolipase A_2 (Lindhal e Tagesson, 1993). Além disso, a quercetina apresenta propriedade antagonista de canal de cálcio no músculo liso vascular (Morales e Lozoya, 1993) e atividade inibidora sobre a óxido nítrico sintase, especialmente sobre a forma constitutiva (Chiesi e Schwaller, 1995).

A quercetina e outros compostos flavonoídicos possuem uma multiplicidade de outras ações bioquímicas que dificultam a explicação das ações observadas no presente estudo na musculatura lisa da traquéia. Apesar disso, a dependência dessa contração do cálcio extracelular, sugere que a quercetina esteja alterando a permeabilidade desse íon na membrana plasmática, ou inibindo a ATPase dependente de Na^+/K^+ , e a Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático que controla as concentração de cálcio intracelular. De fato, dos sítios enzimáticos de atuação sugeridos para a quercetina, a ATPase do retículo sarcoplasmático, parece ser o de maior afinidade, pelo menos nas células musculares lisas traqueais (Fewtrell e Gomperts, 1977; Gietzen et al., 1981). Morales e Lozoya (1993), analisando o efeito da quercetina no músculo liso vascular, observaram que, em baixas concentrações, a quercetina pode produzir contração das preparações mediada por aumento dos níveis de cálcio intracelular através da inibição da Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático. Esse efeito também foi descrito em preparações de íleo (Abdalla et al., 1989), demonstrando que a quercetina apresenta uma maior afinidade pela Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático que para outros sítios protéicos.

As ações atribuídas à rutina podem ser decorrentes da sua similaridade com a quercetina, já que na literatura não são descritas atividades substancialmente diferentes daquelas atribuídas à primeira, exceto pela ação estimulatória da produção de fator de necrose tumoral em camundongos, descrita por Kunizane et al. (1995).

Além dos dados reportados na literatura, ensaios preliminares da ação desses compostos sobre a atividade das enzimas COX1 e COX2 (resultados não publicados), revelaram que apenas o geranin apresentou atividade estimulatória discreta mas significativa sobre a atividade da COX1, enquanto todos os demais foram inativos.

As respostas produzidas pelos compostos obtidos do *P. urinaria* apresentaram perfis similares, pelo menos em parte, às induzidas pelo EH, sendo dependentes de cálcio extracelular, parcialmente sensíveis à nicardipina, e insensíveis a ω -conotoxina. Entretanto, divergiram substancialmente quanto a sensibilidade aos antagonistas do sistema vanilóide, capsazepina e vermelho de rutênio, e aos antagonistas dos receptores das taquicininas, FK 888 e SR 48968. É provável que a análise química do EH de *P. urinaria* revele a existência de outros compostos que possam mediar suas respostas por mecanismos semelhantes àqueles apresentados pelo EH na traquéia de cobaia, que envolvem ativação do sistema taquicinérgico e vanilóide.

5.3-) Relaxamento Induzido pelo EH de *Phyllanthus urinaria*:

Os mecanismos envolvidos na resposta relaxante da musculatura lisa da traquéia de cobaia, assim como no processo contrátil, poderiam envolver uma complexa rede intracelular de sinais transduccionais incluindo alterações iônicas e/ou a fosforilação de substratos protéicos. Entre as principais vias envolvidas nessa resposta, poderiam ser mencionadas, entre outras: (1) aumento dos níveis de AMPc, (2) aumento

dos níveis de GMPc, (3) aumento da produção e/ou liberação do óxido nítrico, (4) ativação de canais de potássio, (5) inibição das fosfodiesterases seletivas para AMPc e GMPc, (6) redução da sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio, (7) inibição direta da atividade de enzimas relacionadas ao processo contrátil, ou (8) atividades específicas em outros sítios como por exemplo nas proteínas do citoesqueleto (Figura 40).

As vias modulatórias do relaxamento no músculo liso, envolvem uma série de fatores intracelulares que podem incluir a ativação de um receptor (Rec) de membrana acoplado à proteína Gs que promove a estimulação de uma ou mais isoformas da adenilato ciclase (AC) presentes na membrana celular. A ativação da AC, produz aumento da sua atividade catalítica sobre a reação de transformação do ATP em AMPc, que é necessário para a atividade da proteína quinase dependente de AMPc, denominada PKA. Essa quinase possui várias propriedades no músculo liso e em neurônios, e incluem a modulação da atividade de canais de potássio, atividade fosforilativa sobre substratos protéicos específicos, e regulação da expressão gênica de alguns receptores de membrana e de proteínas contráteis. No músculo liso das vias aéreas, a PKA parece ser diretamente responsável pela fosforilação de canais de potássio, permitindo assim, a sua abertura e conseqüente hiperpolarização da membrana, causando em decorrência o relaxamento muscular (Figura 40).

REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS VIAS DE RELAXAMENTO DA MUSCULATURA LISA

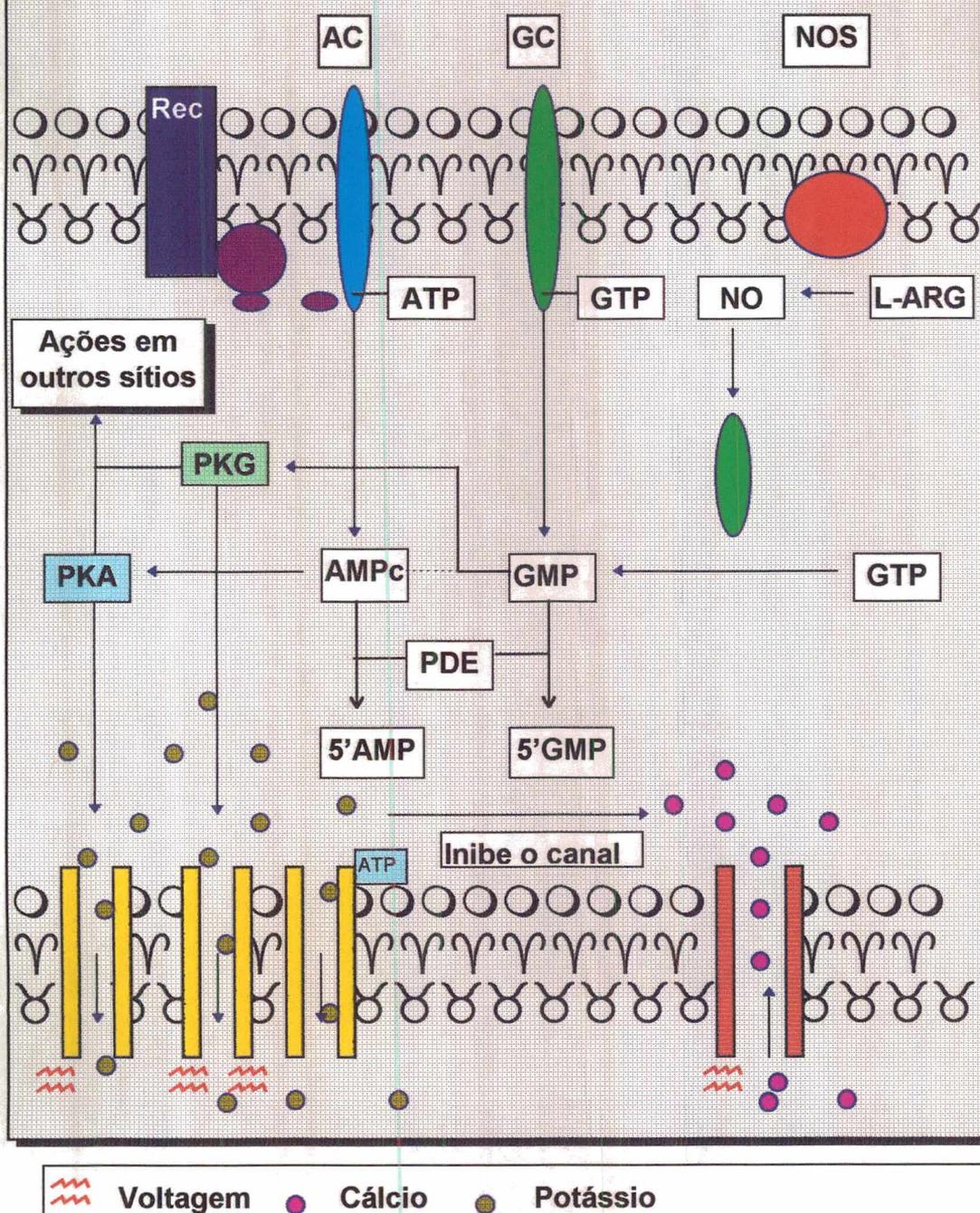


Figura 40: Representação esquemática dos possíveis sítios modulatórios do processo de relaxamento e alguns pontos de intervenção na cadeia de sinalização intracelular.

Vários agonistas que estimulam a produção de AMPc e relaxamento das vias aéreas, como por exemplo os agonistas de receptores β -adrenérgicos e inibidores da fosfodiesterase, podem ter seus efeitos antagonizados de forma concentração-dependente por bloqueadores de canais de potássio (Huang et al., 1993).

Da mesma forma, a estimulação direta ou indireta das isoformas da guanilato ciclase (GC), permite a formação de um outro nucleotídeo cíclico (GMPc) a partir do GTP presente no citosol. A partir da identificação da estrutura da GC, e da descoberta de duas formas distintas, uma constitutiva, acoplada a membrana, e uma forma solúvel, dispersa no citosol, que reconhecem como ligantes endógenos alguns peptídios como o fator natriurético atrial, e o óxido nítrico (respectivamente), se propôs que essa enzima apresente características de receptor farmacológico (Garbers, 1992; Garbers e Lowe, 1994; Lowe, 1992).

A guanilato ciclase presente na membrana pode ser modulada por pelo menos três ativadores bem conhecidos, o fator natriurético atrial (FNA) (Chinkers et al., 1991; Garbers, 1992), o fator natriurético cerebral (FNC) (Rosenzweig et al., 1991), por uma enterotoxina de *E. coli* e pela guanilina (De Sauvage et al., 1992; Schulz et al., 1992). Ao contrário, a guanilato ciclase solúvel pode ser endogenamente ativada pelo óxido nítrico (Moncada et al., 1991). Os níveis de GMPc intracelulares podem ser controlados pela ação das fosfodiesterases que transformam o GMPc em seu análogo inativo o 5'GMP. Além disso, o GMPc pode também interferir com a atividade de outras fosfodiesterases com maior

seletividade para o AMPc determinando em decorrência aumento ou diminuição das funções desse nucleotídeo, sobretudo nas vias aéreas (Trophy et al., 1993).

O substrato enzimático seletivo para ligação do GMPc é a proteína quinase GMPc-dependente (PKG), que é um membro da superfamília de proteínas chamadas serina/treonina quinases (Hofmann et al., 1992). Esta enzima tem sido descrita nas vias aéreas (Feibel et al., 1988). A importância farmacológica da PKG cresceu no contexto científico internacional nos últimos anos quando se atribuiu a ela o papel de proteína efetora da maioria das respostas ao óxido nítrico. Por outro lado, essa enzima pode ser ativada por níveis elevados de AMPc (ver figura 40), tornado-se via secundária da atividade de alguns neurotransmissores que atuam via AMPc citosólico.

Recentemente, outras funções têm sido descritas para o GMPc e para a PKG sobre o músculo liso, tais como (1) modulador dos níveis intracelulares de cálcio, por estimulação de uma Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático, a fosfolambam (Sarcevic et al., 1989; Karczewski et al., 1991); (2) Ativação direta de canais de potássio de alta condutância modulados por cálcio (BK), que foram demonstrados existir inicialmente nos músculos lisos gastrointestinais (Ward et al., 1992, Thornbury et al., 1991), vasculares (Chen e Rembold, 1992; Krippeit-Drews et al., 1992), e nas preparações traqueais onde a caribdotoxina é capaz de bloquear o relaxamento mediado por óxido nítrico ou GMPc (Hamaguchi et al., 1991); (3) inibição do sistema enzimático da fosfolipase C (Hirata et al., 1990) e

(4) redução da sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio, pela fosforilação da quinase de cadeia leve da miosina que aumenta a concentração de cálcio/calmodulina requerida para a atividade contrátil, em vários tecidos (Conti e Adiestein, 1981; Rapoport et al., 1983), incluindo a traquéia (Pfitzer et al., 1982).

Na sua grande maioria, as ações descritas para o GMPc e para a PKG, também envolvem as ações mediadas pelo óxido nítrico, que pode promover a estimulação seletiva da guanilato ciclase solúvel, e com isso determinar aumento dos níveis intracelulares de GMPc, além de outras ações inespecíficas descritas para o sistema NO-GMPc que parecem contribuir para o efeito celular de resposta proposto para esse sistema. Simonsen et al. (1995) sugerem que o aumento de GMPc induzido pelo óxido nítrico em artéria peniana, determine a ativação da PKG que aumenta a probabilidade de abertura de canais de potássio ativados por cálcio, e em consequência causando

e relaxamento. Além disso, o óxido nítrico parece estar envolvido na resposta relaxante que se segue a ativação de uma série de neurotransmissores, tais como o CGRP (Maggi et al. 1994), bradicinina (Schiemper e Calixto 1994; Gooch e Frangos, 1996). Ele pode ainda atuar independentemente da produção de GMPc podendo agir diretamente sobre canais de potássio ativados por cálcio sensíveis a apamina (Martins et al., 1995), ou sensíveis a caribdotoxina (Murray et al., 1995).

O óxido nítrico parece ainda ser o responsável pela resposta relaxante por várias substâncias de origem vegetal (Fitzpatrick et al.,

1995), como aquela demonstrada por Tamaoki et al. (1995) em resposta a administração de Saiboku-to, uma erva usada na medicina chinesa, em células epiteliais de vias aéreas de cão; ou de origem animal, como por exemplo aquela demonstrada para Gwee et al. (1995) em resposta ao veneno de escorpião no músculo anococcygeus isolado de rato.

Os processos celulares de relaxamento da musculatura lisa das vias aéreas, entre outros mecanismos, parecem envolver em grande parte aumento dos níveis de nucleotídeos cíclicos seguindo a ativação das proteínas quinases dependentes dos nucleotídeos, e por fim induzindo abertura de canais de potássio que causam a hiperpolarização das fibras e relaxamento muscular. No interior da célula muscular lisa, as vias de transdução relacionadas ao relaxamento parecem estar intimamente ligadas e cooperando entre si para o efeito final.

Kannan et al. (1995), demonstraram que o relaxamento dependente de óxido nítrico observado nas preparações de músculo liso da traquéia de cobaia pode ser modulado por inibidores da guanilato ciclase e por bloqueadores de canal de potássio de alta condutância ativados por cálcio, sensíveis a caribdotoxina e à iberiotoxina. De fato, os canais de potássio constituem uma classe de proteínas de membrana excepcionalmente diversas quanto as suas variedades. Células individuais podem, e normalmente possuem, vários tipos de correntes de potássio, como nos neurônios hipocâmpais (CA1) que apresentam seis ou mais correntes de condutância ao potássio modulando sua excitabilidade. Na atividade neuronal que segue o potencial de ação ocorre uma

hiperpolarização decorrente da ativação de pelo menos dois tipos de canais de potássio modulados por cálcio, de alta (BK) e de baixa (SK) condutância (Sah, 1996). Essas correntes em geral são classificadas de acordo com os agentes que as induzem ou com as características da condutância que desenvolvem. Há também uma condutância associada com um canal que está acoplado a uma proteína G ativada por um receptor como aquelas propostas para os receptores da serotonina ou para acetilcolina no músculo cardíaco (Dascal et al., 1993; Krapivinsky et al., 1995). De todos os canais de potássio descritos na literatura, os que são mais efetivamente estudados são aqueles modulados pelo potencial de membrana da célula ou pelas concentrações de cálcio intracelular, e os sensíveis ao ATP (Castle et al., 1989).

Sem dúvida dois fatores foram fundamentais para o estudo dos canais de potássio: as técnicas de clampeamento de células integras (whole-cell patch record), que permitem obter informações sobre o mecanismo de disparo da abertura do canal, com relação a sua dependência a voltagem ou das concentrações de cálcio interno, e a descoberta de toxinas e drogas altamente seletivas para os diversos tipos de canais iônicos, incluindo os canais de potássio (Kotiikoff, 1990; Muraki et al., 1990; Marchenko e Sage, 1996). Algumas toxinas foram fundamentais para a caracterização e a distribuição dos canais de potássio e de suas funções biológicas no organismo, tais como a apamina, um octadecapeptídeo encontrado no veneno das abelhas (*Apis mellifera*) que bloqueia seletivamente uma classe de canais de potássio

de baixa condutância (6 - 14 pS) ativados por cálcio (Habermann, 1984); a carbibdotoxina, que é uma toxina peptídica altamente básica presente no veneno do escorpião *Leirus quinquestriatus*, que bloqueia com alta afinidade ($K_D \sim 3$ nM) canais de potássio de alta condutância (250 pS) dependentes de voltagem e ativados por cálcio no músculo esquelético de mamíferos (Miller et al., 1985, Smith et al., 1986) e em uma variedade de outros tecidos (Guggino et al., 1987), incluindo a traquéias de cobaia (Jones et al., 1990). Outras toxinas que também contribuíram para o melhor entendimento dos canais de potássio (para mais detalhes ver *TINS neurotoxins supplement*, 1994, 1996).

Os resultados obtidos com o EH e os compostos isolados do *Phyllanthus urinaria* mostraram que além de induzirem contração na traquéia e na bexiga de cobaia (Dias et al., 1995), em concentrações maiores produziram relaxamento dependente da concentração e reversível na traquéia de cobaia com ou sem epitélio contraída previamente com carbacol, ou sob tonus espontâneo.

O relaxamento induzido pelo EH de *P. urinaria* parece envolver múltiplos mecanismos de ação evidenciado pelo fato de que o efeito relaxante do EH, como aquele produzido pelo cromacalina, um ativador de canal de potássio modulado por ATP (Arch et al., 1988; Ichinose e Barnes, 1990; Spinelli et al., 1990; Lijnen et al., 1989), foi antagonizado de maneira dependente da concentração pelo bloqueador não seletivo de canal de potássio tetraetilamônio (TEA) (De Man et al., 1993; 1994), bem como por glibenclamida, um bloqueador de canal de potássio sensível ao

ATP (Schimid'Antomarchi et al., 1987, Muray et al., 1989). Entretanto, a neurotoxina apamina, que é descrita como um bloqueador de canais de potássio de baixa condutância modulados por cálcio (Romey et al., 1984; Cooke e Hayllet, 1985), não afetou o relaxamento induzido pelo EH de *P. urinaria* ou pela cromacalina, indicando que os canais de potássio modulados por ATP, mas não aqueles de baixa condutância ativados por cálcio, são importantes para a resposta relaxante induzida pelo EH na traquéia de cobaia. Outra evidência importante observada no presente estudo com relação ao envolvimento de canais de potássio na resposta relaxante do EH de *P. urinaria*, consiste no fato de que o aumento das concentrações de potássio (KCl 20 e 40 mM) no meio nutritivo inibiu significativamente sua resposta relaxante, enquanto que altas concentrações de potássio (KCl 80 mM) aboliu totalmente essa resposta. Resultados similares têm sido propostos para outros ativadores de canais de potássio sensíveis ao ATP (Hamilton et al., 1986; Morley, 1984; Findiay, 1994).

Um outro mecanismo que parece, pelo menos em parte, contribuir para explicar o mecanismo envolvido na resposta relaxante do EH de *P. urinaria*, é a estimulação direta de receptores β_2 -adrenérgicos e de VIP ou da liberação de noradrenalina e VIP da inervação na traquéia de cobaia. Essa observação é sustentada pelo fato de que a incubação das preparações com propranolol e [D-p-CI-Phe⁶,Leu¹⁷]VIP, um antagonista de VIP (Pandol et al., 1986), em concentrações que aboliram totalmente a resposta relaxante induzidas, respectivamente por noradrenalina e VIP,

causou deslocamento parcial da curva concentração-resposta relaxante para a direita induzida pelo EH de *P. urinaria*. Por outro lado, o efeito reiaxante ao EH não parece envolver a ativação de receptores de CGRP, ou a sua liberação, pois o uso do antagonista seletivo de CGRP, o CGRP(8-37) (Chiba et al., 1989; Maggi et al. 1991), nas mesmas condições em ele que antagonizou o relaxamento mediado pelo CGRP no ureter de cobaia (Maggi et al., 1994) e na traquéia de cobaia (presente estudo), não afetou significativamente a resposta reiaxante ao EH do *P. urinaria*.

Estudos farmacológicos e imunohistoquímicos, revelaram que o óxido nítrico (NO) ou uma substância correlata, está presente nas vias aéreas de várias espécies animais, incluindo traquéia de cobaia (Li e Rand, 1991; Tucker et al., 1990; Belvise et al., 1991; Schiemper e Calixto, 1994). A liberação de óxido nítrico poderia também ser responsável pelo efeito reiaxante do extrato hidroalcoólico de *P. urinaria*, pois Fitzpatrick et al. (1995) demonstraram que uma grande variedade de vegetais, frutas, chás, semente e ervas medicinais apresentaram efeito relaxante dependente do endotélio em anéis de aorta isolada de rato acompanhado de aumento de GMPc que foram bloqueados por inibidores da óxido nítrico sintase. Entretanto, nem o inibidor da biossíntese de óxido nítrico, a L-NOARG, nem o agente que inibe a ativação da guanilato ciclase solúvel, o azul de metileno, em concentrações onde eles consistentemente antagonizaram as respostas mediadas pelo NO (Palmer et al., 1987; Moore et al., 1990; Schiemper e Calixto, 1994; Gruetter et

al., 1981), não foram capazes de prevenir o relaxamento causado pelo EH de *P. urinaria* na traquéia isolada de cobaia. Esses resultados sugerem portanto, que o NO não parece ter um papel fundamental no relaxamento induzido pelo EH do *P. urinaria* na traquéia de cobaia.

4-) Relaxamento induzido pelos compostos isolados do EH de *Phyllanthus urinaria*:

Os resultados do presente estudo demonstraram que o relaxamento induzido pelo ácido gálico foi mediado por substância liberadas do epitélio traqueal, pois a remoção do epitélio praticamente aboliu a resposta relaxante produzida por esse composto. Talvez, o ácido gálico atue por liberação de óxido nítrico ou do fator hiperpolarizante derivado do epitélio, mas essas hipóteses não foram testadas, já que objetivo do estudo foi de encontrar as substâncias presentes no EH que fossem responsáveis pelo seu efeito, ainda que o ácido gálico possa contribuir com alguma parcela para o efeito relaxante do extrato total. O efeito produzido pelo EH de *P. urinaria* não foi afetado pela remoção do epitélio, por esse motivo as ações relaxantes induzidas pelo ácido gálico serão estudadas oportunamente, e não são parte integrante dessa dissertação.

O galato de metila e o galato de etila, por outro lado, apresentaram efeito relaxante muito similar aquele produzido pelo EH do *P. urinaria*. O relaxamento induzido pelos galato de metila e galato de etila, assim como o demonstrado para o EH de *P. urinaria*, não foram significativamente afetados pela retirada do epitélio da traquéia, além de serem sensíveis

ao potássio alto no meio de incubação (80 mM), e aos mesmos antagonistas de canais de potássio. Em complemento, o galato de metila e o gaiato de etila não produziram alterações nos níveis intracelulares de AMPc ou GMPc. Além disso, suas respostas relaxantes não foram afetadas pelos inibidores da adenilato ciclase (SQ 22536) ou da guanilato ciclase solúvel (azul de metileno), e apresentaram ainda uma grande seletividade pelos canais de potássio modulados por ATP sensíveis a glibenclamida e principalmente pelos canais de potássio de alta condutância modulados por cálcio sensíveis a carbdotoxina.

Os canais de potássio de maior importância na resposta relaxante do trato respiratório são dois: (1) os de alta condutância e ativados por cálcio (Jones et al., 1990) que parecem modular as ações de várias substâncias relaxantes como o óxido nítrico, cujo relaxamento é altamente sensível a caribdotoxina e a iberiotoxina (Ellis e Conanan, 1994), e modular também o relaxamento produzido pelo agonista β -adrenérgico, salbutamol (Huang et al., 1993); e (2) os modulados por ATP (Arch et al., 1988, Daniel e Jury, 1991, Nielsen-Kudsk et al. 1990). Nos últimos anos algumas substâncias têm sido descritas como ativadores de canais de potássio plasmalemal. Os representantes mais estudados são os ativadores dos canais de potássio modulados por ATP sensíveis a glibenclamida, como o cromacalina, o pinacidil e o apricalina (Edwards e Weston, 1993). Mais recentemente, entretanto, os canais de potássio de alta condutância ativados por cálcio passaram a ter cada vez mais importância no contexto científico, por representarem o mecanismo efetor

da planta *Desmodium adscendens* (McManus et al., 1993), e os benzimidazois, NS 004 e NS 1619 são descritos como ativadores seletivos desses canais. Esses agentes naturais são capazes de hiperpolarizarem as células de neuroblastoma e aumentam seletivamente a probabilidade de transporte iônico através de canais de potássio de alta condutância ativados por cálcio (Olesen e Wätjen, 1992, Olesen et al., 1994). Entretanto, estudos posteriores indicaram que o NS 004 poderia interferir com canais de cálcio e que seu efeito predominante não era devido a interação direta com os canais de potássio (Sargent et al., 1993), e o NS 1619 apresentava ações farmacológicas muito mais complexa do aquela inicialmente proposta por Olesen et al. (1994), envolvendo vários sítios de ação, incluindo ações sobre canais de cálcio dependentes de voltagem e outras correntes de potássio (Edwards et al., 1994). A inexistência de substâncias que ativam diretamente esses canais, torna ainda mais relevantes os resultados apresentados pelos galatos de metila e etila isolados do *P. urinaria* na traquéia isolada de cobaia. Assim, esses compostos podem representar um passo importante para desenvolver uma nova classe de compostos capazes de ativar os canais de potássio de alta condutância ativados por cálcio.

Os galatos de metila e etila, também apresentaram efeito analgésico importantes em vários modelos de nocicepção, especialmente na dor de origem neurogênica em camundongos. Tais resultados podem ser explicados em parte por suas propriedades ativadoras de canais de potássio. Por outro lado, tem sido relatado na literatura e comprovado

cientificamente tanto em animais como em estudos clínicos (Santos, 1990) que pelo menos o extrato do *P. niruri* foi eficaz em eliminar os cálculos renais. Considerando o fato de que o *P. niruri* também contém basicamente os mesmos constituintes presentes no *P. urinaria*, incluindo a existência do ácido gálico, gaiato de metila e gaiato de etila, é bastante provável que tais compostos possam contribuir para explicar suas ações anti-litíase, já demonstradas experimentalmente em testes clínicos (Santos, 1990).

Testes preliminares com o gaiato de propila demonstraram que o aumento da cadeia lateral no anel benzenóide central parece aumentar a potência relaxante dos compostos derivados do ácido gálico, sugerindo que modificações simples na cadeia lateral contribuam efetivamente para o desenvolvimento de uma molécula ainda mais potente.

Estudos químicos das amostras de *P. urinaria* ainda estão em andamento e a possibilidade de isolar outros princípios ativos com função similar aquelas descritas para os gaiatos de metila e etila, não pode ser descartada. A quantificação dos constituintes químicos presentes no extrato hidroalcoólico de *P. urinaria* poderia possibilitar uma melhor compreensão dos resultados obtidos com as substâncias isoladas, e poderia revelar ainda se eles estão presentes nessas plantas nas concentrações em que desenvolveram os seus efeitos farmacológicos "in vivo" e "in vitro". Contudo, é possível que o efeito final do EH de *P. urinaria*, a exemplo das outras espécies de *Phyllanthus* sejam aqueles produzidos nos ensaios de músculos liso isolado (Dias et al. 1995, e o

presente estudo), quanto aos efeitos analgésicos demonstrados nos modelos de dor induzidos em camundongos (Gorsli et al., 1993; Santos et al., 1995 a, b), ou ainda aquelas ações atribuídas ao *P. urinaria* pela medicina popular, sejam decorrentes de uma ação sinérgica entre os distintos princípios ativos presentes nestas plantas.

Os resultados apresentados nesta dissertação estão em fase final de publicação sob os títulos:

“Mechanisms involved in the contractile response induced by the hydroalcoholic extract of *Phyllanthus urinaria* on the guinea pig isolated trachea: Evidence for participation of tachykinin and influx of extracellular Ca^{2+} sensitive to ruthenium red”

Paulino, N.; Cechinel-Filho, V.; Pizzolatti, M.G.; Yunes, R.A. and Calixto, J.B.

Gen. Pharmacol. 27: in press, 1996.

“The relaxant effect of extract of *Phyllanthus urinaria* in the guinea pig isolated trachea. Evidence for involvement of ATP-sensitive potassium channels”

Paulino, N.; Cechinel-Filho, V.; Yunes, R.A. and Calixto, J.B.

J. Pharm. Pharmacol. in press (Aceito para publicação em 17 de abril de 1996).

A análise do efeito relaxante do gaiato de metila e do galato de etila, faram parte de um trabalho que está em fase final de conclusão.

6 - RESUMO E CONCLUSÕES

1 - No presente estudo foram analisados os mecanismos envolvidos nas respostas contráteis e relaxantes induzidas pelo extrato hidroalcoólico (EH) e de alguns dos constituintes químicos isolados do *Phyllanthus urinaria* (Euphorbiaceae) na traquéia isolada de cobaia (TC).

2 - O EH de *Phyllanthus urinaria* causou contração sustentada e concentração-dependente na TC com CE_{50} de 284,4 (216,4 - 373,9) $\mu\text{g/ml}$ e resposta máxima (R_{max}) de 580 ± 35 mg de tensão. A contração induzida pelo EH foi inibida na presença de solução sem cálcio, foi parcialmente afetada pela nicardipina (1 μM), mas não pela ω -conotoxina (0,1 μM), ou pela tetrodotoxina (0,1 μM). A indometacina (3 μM , inibidor da ciclo-oxigenase) aboliu a contração causada pelo EH, entretanto nem o inibidor de tromboxano A_2 (L 655.240, 1 μM), nem o antagonista seletivo de receptores de leucotriêno D_4 e E_4 (MK 571, 1 μM) ou antagonista de PAF (WEB 2086, 1 μM), não interferiram com o efeito do EH. Tanto as contrações induzidas pelo EH, quanto aquelas produzidas pela capsaicina foram inibidas pelo vermelho de rutênio (0,1 - 3 μM , bloqueador de canal iônico acoplado ao receptor vanilóide). Além disso, a contração produzida pela capsaicina, mas não a do EH de *P. urinaria*, foi antagonizada pela capsazepina (antagonista de receptor vanilóide). Os antagonistas seletivos de receptores das taquicininas, NK_1 , o FK 888 (1 μM), e NK_2 , SR 48968 (1 μM), antagonizaram a contração produzida pelo EH de *P.*

urinaria, enquanto que a associação de ambos (1 μ M cada) praticamente aboliu essa resposta.

3 - Os compostos isolados do *P. urinaria*, quercetina, rutina e geranin, também produziram contração das preparações de TC, com CE_{50} de 0,62, 63 e 25 μ M, e R_{max} de 1.240 ± 40 , 910 ± 37 e 1.090 ± 30 mg de tensão, respectivamente. Essas respostas foram dependentes do cálcio extracelular e sensíveis ao cloreto de níquel (bloqueador não seletivo de canais de cátions 1 mM), mas não foram afetados pela nicardipina (1 μ M) ou pela ω -conotoxina (0,1 μ M). Contudo, as contrações produzidas pela quercetina, rutina ou geranin, não foram antagonizadas pelo vermelho de rutênio (3 μ M), pela capsazepina (1 μ M), nem pelos antagonistas taquicinérgicos (FK 888 e SR 48968) (1 μ M cada).

4 - Em concentrações mais elevadas, o EH do *Phyllanthus urinaria* induziu resposta relaxante sobre a musculatura lisa da TC com ou sem epitélio. As CE_{50} médias para esses efeitos foram 2,00 (1,47 - 2,78) mg/ml e 1,94 (1,41 - 2,67) mg/ml, respectivamente, com R_{max} de 627 ± 12 e 717 ± 16 mg de tensão, respectivamente.

5 - O efeito relaxante do EH do *P. urinaria* parece ser mediado por ativação de canais de potássio modulados por ATP, uma vez que a glibenclamida (0,1 e 3 μ M), deslocou significativamente a curva ao EH à direita. Além disso, o relaxamento produzido pelo EH foi parcialmente

afetado pela incubação do antagonista de receptores β -adrenérgicos (propranolol 1 μ M), e pelo antagonista de receptores do peptídeo vasoativo intestinal ([D-p-Cl-Phe⁶,Leu¹⁷]VIP (0,1 μ M).

6 - O ácido gálico (0,1 μ M - 1 mM), o galato de metila e o galato (10 nM - 30 μ M) isolados do extrato de acetato de etila do *P. urinaria* causaram relaxamento concentração dependente na TC, sendo que a resposta ao ácido gálico foram dependentes do epitélio. Os relaxamentos produzidos pelo galato de metila e pelo galato de etila na TC sem epitélio apresentaram CE₅₀ médias de 1,8 (1,2 - 2,2) μ M e 0,7 (0,6 - 0,8) μ M, com R_{max} de 500 \pm 25 mg e 666 \pm 12 mg de tensão, respectivamente.

7 - Os efeitos relaxantes do galato de metila e galato de etila foram antagonizados por concentrações altas de KCl no meio de incubação (80 mM), ou na presença de bloqueador de canais de potássio não seletivo, o tetraetilamônio (100 e 300 μ M). Essas respostas foram também parcialmente antagonizadas pelo bloqueador de canais de potássio modulados por ATP, a glibenclamida (3 μ M), e pelo bloqueador de canais de potássio de alta condutância modulado por cálcio, a caribdotoxina (0,1 μ M), mas não foram inibidas pelos antagonistas de receptores de VIP ([D-p-Cl-Phe⁶,Leu¹⁷]VIP, 0,1 μ M) ou de receptores β -adrenérgicos (propranolol, 1 μ M), nem tampouco foram afetadas pelo azul de metileno (inibidor da guanilato ciclase solúvel, 10 μ M), pelo SQ 22536 (inibidor da

adenilato ciclase, 3 ou 10 μM), nem pela L-NOARG (inibidor da óxido nítrico sintase, 300 μM).

8 - Ensaio preliminares para a determinação bioquímica dos níveis de AMPc e GMPc, nas TC após incubação com forskolin (10 μM), nitroprussiato de sódio (3 μM), galato de metila ou gaiato de etila (10 μM) incubados por 5 minutos, demonstraram que o forskolin (ativador seletivo da adenilato ciclase) produziu aumento significativo dos níveis de AMPc, enquanto que o nitroprussiato de sódio (3 μM), aumentou significativamente os níveis de GMPc. No entanto, os níveis de ambos nucleotídeos cíclicos não foram afetados após incubação das preparações com os gaiatos isolados do *P. urinaria*.

9 - Em conclusão, os resultados apresentados neste estudo demonstram que o EH obtido do *P. urinaria* induz contração seguida de relaxamento na TC. Ambas as ações ocorreram de forma concentração-dependente, sendo esses efeitos mediados por distintos compostos com a participação de vários sistemas efetores. A resposta contrátil parece ser dependente da ativação de receptores das taquicininas do tipo NK₁ e NK₂, além de envolver a liberação de metabólitos derivados do ácido araquidônico, sensível a indometacina. Além disso, a contração causada pelo EH de *P. urinaria* na TC depende também da estimulação de fibras sensoriais aferentes sensíveis ao vermelho de rutênio, mas não a capsazepina.

As respostas contráteis produzidas pelos compostos isolados do *P. urinaria*, a quercetina, a rutina e o geranin a exemplo do EH, envolvem mobilização de cálcio extracelular através de canais de cátions, sensíveis ao cloreto de níquel, mas não parecem ser decorrentes da estimulação de canais de cálcio do tipo L ou N dependentes de voltagem. Essa contração, ao contrário daquela produzida pelo EH não é decorrente do estímulo sobre o sistema taquicinérgico e vanilóide, não sendo bloqueadas pelos antagonistas de taquicininas, ou pelo vermelho de rutênio.

O relaxamento causado pelo extrato está relacionado com a presença do gaiato de metila e galato de etila, sendo esses efeitos dependentes da ativação de canais de potássio modulados por ATP sensíveis a glibenclamida e por canais de potássio de alta condutância modulados por cálcio sensíveis a caribdotoxina. Além disso, parte dessas ações parecem estar relacionadas á estimulação de receptores β -adrenérgico ou de receptores de VIP.

Analisados em conjunto, esses resultados podem contribuir, pelo menos em parte, para explicar as ações antinociceptivas especialmente nos modelos de dor neurogênica, e outros usos medicinais dessa e de outras espécies de *Phyllanthus* relacionados ao tratamento de afecções renais demonstradas em estudos anteriores neste e em outros laboratórios. Contudo, a existência de diversos compostos ativos sugere fortemente que as ações farmacológicas do EH de *P. urinaria* decorrem de efeito sinérgico entre os vários compostos presentes nesta planta.

8- ABSTRACT

1- The purpose of the present study was to investigate some of the mechanisms involved in the contractile and relaxant responses caused by the HE and some compounds isolated from *P. urinaria* in the guinea pig trachea "in vitro".

2 - The hydroalcoholic extract (HE) of stems, leaves and roots from *P. urinaria* (*Euphorbiaceae*) (1 - 3000 mg/ml), caused graded contraction in guinea pig trachea (GPT) (EC_{50} 284.4 μ g/ml and maximal response 580 ± 35 mg), being more effective in preparations without epithelium.

3 - The contraction induced by HE was slightly affected by tetrodotoxin (0.3 μ M) and nicardipine (1 μ M), but was unaffected by ω -conotoxin, atropine, mepyramine or staurosporine (all 1 μ M). Indomethacin (3 μ M) greatly inhibited HE contraction, but MK 571 (leukotriene D_4 and E_4 antagonist) caused a partial inhibition, while L-655,240 (thromboxane A_2 antagonist) and WEB 2086 (PAF antagonist) (all 1 μ M) were ineffective.

4 - The contraction induced by HE was markedly inhibited in a Ca^{2+} -free solution and was partially affected in GPT desensitised to capsaicin (10 μ M).

5 - Capsazepine (capsaicin antagonist, 3 μM) antagonized contractions to capsaicin, leaving responses to HE unaffected. In contrast, ruthenium red (an ionic channel antagonist coupled to vanilloid receptors of capsaicin) (0.1 - 3 μM) caused graded and equipotent non-competitive inhibition of HE and capsaicin-induced contractions, but had no effect on carbachol- and prostaglandin E_2 -mediated responses.

6 - FK 888 and SR 48968 (NK_1 and NK_2 receptor antagonists, respectively) (both at 1 μM) antagonized through a competitive mechanism contraction to SP and $[\beta\text{-ala}^8]\text{NKA}$ (4-10) respectively, but antagonized, through a non-competitive mechanism, HE-mediated contraction.

7 - We concluded that contraction to HE in GPT is modulated by the epithelium, depends on the release of cyclo-oxygenase metabolite, and relies largely upon an extracellular Ca^{2+} influx that is highly sensitive to ruthenium red, but is insensitive to L and N-type of voltage sensitive Ca^{2+} channel antagonists. In addition, NK_1 and NK_2 tachykinins, but not vanilloid receptors, play an important role in mediating its response.

8 - The compounds isolated from *P. urinaria*, quercetin, rutin and geraniin, produced concentration dependent contraction on GPT, with means EC_{50} of 0.62, 63 e 25 μM , e R_{max} . $1,240 \pm 40$, 910 ± 37 , $1,090 \pm 30$ mg of tension, respectively. These response were dependent of extracellular calcium and sensitive to nikel chloride (non selective cation channels

blocker, 1 mM), but were not affected by nicardipine (1 μ M) or ω -conotoxin (0.1 μ M). Contraction produced by quercetin, rutin and geraniin, were not antagonized by ruthenium red (3 μ M), capsazepine (1 μ M), or by tachykinin receptor antagonists (FK 888 and SR 48968) (1 μ M each).

9- In high concentration (0.1 - 10 mg/ml) the HE of *P. urinaria* caused concentration dependent relaxation in GPT pre-contracted by carbachol with or without epithelium with mean EC_{50} values of 1.94 (1.41 - 2.67) and 2.00 (1.47 - 2.78) mg/ml and E_{max} of 717 mg (\pm 16) and 627 mg (\pm 12), respectively.

10 - The relaxation in response to HE, like that of cromakalim (EC_{50} 3.57 μ M in GPT without epithelium, was fully abolished in presence of high KCl concentrations (80 mM), and was significantly attenuated by tetraethylammonium (10 or 30 mM) or by glibenclamide (0.1 or 3 μ M). However, the relaxation caused by the HE was unaffected by apamin (0.1 or 1.0 μ M), nitro-L-arginine (L-NOARG, 100 μ M), methylene blue (10 μ M) or by CGRP (8-37) (a CGRP antagonist, 0.1 μ M). Both propranolol (1 or 3 μ M) and [D-p-Cl-Phe⁶,Leu¹⁷]VIP (a vasoactive intestinal peptide receptor antagonist, 0.1 μ M) produced a significant displacement to the right (about 2-fold) of the relaxation response to HE of *P. urinaria*. In addition, both methyl and ethyl gallate in concentration which they produced consistent relaxation failed to change the cAMP and cGMP levels in GPT.

11 - Thus, the present results indicate that the ATP-activated potassium channels sensitive to glibenclamide, but not the small conductance calcium-activated potassium channels sensitive to apamin, largely contribute to the relaxation of the HE of *P. urinaria* in GPT. In addition, both β_2 and VIP-mediated responses seem to account, at least in part, for the relaxation of the HE, as its relaxant response was partially attenuated by both propranolol and VIP receptor antagonist.

12 - Addition of gallic acid (0.1 μM - 1 mM), methyl gallate and the ethyl gallate (10 nM - 30 μM) isolated from ethyl acetate extract of *P. urinaria* caused concentration dependent relaxation in the GPT with means EC_{50} 1.8 μM and 0.7 μM , and R_{max} of 500 ± 25 mg and 666 ± 12 mg of tension, respectively.

13 - Both compounds caused dependent relaxation in GPT pre-contracted by 20 and 40 mM of KCl, but their maximal responses were significantly reduced. In GPT pre-contracted by high KCl concentration (80 mM), both ethyl gallate and methyl gallate did not cause any relaxation.

14 - Relaxations caused by both ethyl and methyl gallate in GPT were inhibited significantly in the presence of tetraethylammonium (100 μM) and by charibdotoxin (100 nM), but were not affected by apamin (100 nM). Furthermore, glibenclamide (3 μM), produced a displacement to the right

of the relaxant concentration response curve to both methyl and ethyl gallate.

15 - Methylene blue (3 and 10 μM) caused a discrete displacement to the right of the relaxant response induced by methyl gallate, but had no significant effect on the ethyl gallate response. SQ 22536 (an inhibitor of adenylate cyclase, 3 and 10 μM), caused a marginal inhibition of methyl gallate-mediated relaxation, but had no effect against methyl gallate relaxation.

16 - These data demonstrate that as reported previously for the hydroalcoholic extract of *P. urinaria*, both methyl and ethyl gallate isolated from this plant, produced a direct and concentration dependent relaxation in GPT pre-contracted by histamine. The mechanisms underlying their relaxation response is not completely clear, but great part of their action involve an activation of high conductance charybdotoxin sensitive calcium-activated potassium channels, and to a lesser extent, ATP-sensitive potassium channels. Taken together, the results of the present study can account for, at least partially, some of the reported "in vitro" and "in vivo" pharmacological properties for the *P. urinaria* and other species of this genus.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALA, S.; ZARGA, M.A.; AFIFI, F.; AL-KHALIL, S.; MAHASNEH, A.; SABRI, S. effects of 3,3'-di-O-methylquercetin on guinea pig isolated smooth muscle. *J. Pharm. Pharmacol.* 41: 138-141, 1989.
- ADVENIER, C.; NALINE, E.; TOTY, L.; BAKDACH, H.; EMONDS-ALT, X.; VILAIN, P.; BRELIERE, J.C; LE FUR, G. Effects on the isolated human bronchus of SR 48968, a potent and selective nonpeptide antagonist of the neurokinin A (NK₂) receptors. *Am. Rev. Respir. Dis.* 146: 1177-1181, 1992.
- ALESSI, D.;MACDOUGALL, L.K.; SOLA, M.M.; IKEBE, M.; COHEN, P. The control of protein phosphatase-1 by targetting subunits. The major myosin phosphatase in avian smooth muscle is a novel form of protein phosphatase-1. *Eur. J. Biochem.* 210: 1023-1035, 1992.
- AMANN, R.; MAGGI, C.A. Ruthenium red as a capsaicin antagonist. *Life Sciences.* 49: 849-856, 1991.
- ARCH, J.R.; BUCKLE, D.R.; BUMSTEAD, J.; CLARKE, G.D.; TAYLOR, J.F.; TAYLOR, S.G. Evaluation of the potassium channel activator cromacalina (BRL 34915) as a bronchodilator in the guinea pig: comparison with nifedipine. *Br. J. Pharmacol.* 95: 763-770, 1988.
- ARMSTRONG, D.J.; MILLER, S.A. Intrapulmonary C-fibres contribute to the afferent arm of the vagally mediated responses to right atrial injections of prostacyclin into rabbits. *J. Physiol.* 301: 65P-66P, 1981.

- ARUNLAKSHANA, O.; SCHILD, H.O. Some quantitative uses of drug antagonists. *Br. J. Pharmacol.* 14: 48-58, 1959.
- BACCHI, E.M. Farmacognosia de algumas espécies de *Phyllanthus* (conhecidas como quebra pedras). *An. Farm. Quim.* 24: 39-40, 1984.
- BARNES, P.J.; BARANUIK, J.-N.; BELVISI, M.G. Neuropeptides in the respiratory tract. Part I. *Am. Rev. Resp. Dis.* 144: 1187-1198, 1991.
- BATTISTINI, B.; BOTTING, R.; BAKHLE, Y.S. COX-1 and COX-2: toward the development of more selective NSAIDS. *Drug News Perspect.* 7: 501-512, 1994.
- BELVISI, M.G.; STRETTON, C.D.; YACOUB, M.; BARNES, P.J. Nitric oxide is the endogenous neurotransmitter of bronchodilator nerves in humans. *Eur. J. Pharmacol.* 210: 221-222, 1992.
- BELVISI, M.G.; STRETTON, D.; BARNES, J.P. Nitric oxide as an endogenous modulator of cholinergic neurotransmission in guinea pig airways. *Eur. J. Pharmacol.* 198: 219-221, 1991.
- BERETZ, A.; ANTON, R.; STOCLET, J.C. Flavonoid compounds are potent inhibitors of cAMP phosphodiesterase. *Experientia* 34: 1054, 1978.
- BEVAN, S.; GEPETTI, P. Protons: small stimulants of capsaicin-sensitive sensory nerves. *TINS* 17: 509-512, 1994.
- BEVAN, S.; HOTH, S.; HUGHES, G.; JAMES, I.F.; RANG, H.P.; SHAH, K.; WALPOLE, C.S.J.; YEATS, J.C. Capsazepine: A competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. *Br. J. Pharmacol.* 107: 544-552, 1992.

- BEVAN, S.; SZOLCSANYI, J. Sensory neuron-specific actions of capsaicin: mechanisms and applications. *Trends Pharmacol. Sci.* 11: 330-333, 1990.
- BJELDANES, L.F.; CHANG, G.W. Mutagenic activity of quercetin and related compounds. *Science* 197: 577-578, 1977.
- BLUMBERG, B.S.; MILLMAN, I.; VENKATESWARAN, P.S.; THYAGARAJAN, S.P. Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma-treatment of HBV carries with *Phyllanthus amarus*. *Cancer Detect. Prevent.* 14: 195-201, 1989.
- BRAMBILLA, A.; GHIORZI, A.; GIACHETTI, A.; WEB 2086 a potent PAF antagonist exerts protective effect toward PAF-induced gastric damage. *Pharmacol. Res. Comm.* 19: 147-151, 1987.
- BRAUNSTEIN, G.; LABAT, C.; BRUNELLESCHI, S.; BENVENISTE, J.; MARSAC, J.; BRINK, C. Evidence that the histamine sensitivity and responsiveness of guinea pig isolated trachea are modulated by epithelial prostaglandin E₂ production. *Br. J. Pharmacol.* 95: 300-308, 1988.
- BRINK, C.; DUNCAN, P.G.; DOUGLAS, J.S.; Histamine, endogenous prostaglandins and cyclic nucleotides in the regulation of airway muscle response in the guinea pig. *Prostaglandins* 22: 429-438, 1981.
- BUNTLING, S.; GRYGLEWSKI, R.; MONCADA, S.; VANE, J.R. Arterial walls generate prostaglandin endoperoxides a substance (prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and coeliac arterial and inhibits platelet aggregation. *Prostaglandins*. 12: 897-913, 1976.

- BURKA, J.A.; ALI, M.; MCDONALD, J.W.D.; PATERSON, N.A.M. Immunological and non-immunological synthesis and release of prostaglandins and thromboxanes from isolated guinea pig trachea. *Prostaglandins* 22: 683-691, 1981.
- BUTLER, A. mSlo, a complex mouse gene encoding "maxi" calcium-activated potassium channels. *Science* 261: 221-224, 1993.
- CALIXTO, J.B.; YUNES, R.A.; NETO, A.S.O.; VALE, R.M.R.; RAE, G.A. Antispasmodic effects of an alkaloid extracted from *Phyllanthus selowianus*: A comparative study with papaverine. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 17: 313-321, 1984.
- CASALS-STENZEL, J.; FRANKE, J.; FRIEDRICH, T.; LICHEY, J.; Bronchial and vascular effects of PAF in the rat isolated lung are completely blocked by WEB 2086, a novel specific PAF antagonist. *Br. J. Pharmacol.* 91: 799-802, 1987.
- CASTLE, N.A.; HAYLETT, D.G.; JENKINSON, D.H. Toxins in the characterization of potassium channels. *Tr. Neurosci.* 12: 59-65, 1989.
- CHANG, C.W.; LIN, M.T.; LEE, S.S.; LIU, K.C.S.C.; HSU, F.L.; LIN, J.Y. Differential inhibition of reverse transcriptase and cellular DNA polymerase-alpha activities by lignans isolated from Chinese herbs, *Phyllanthus myrtifolius* Moon, and tannins from *Lonicera japonica* Thumb and *Castanopsis hystrix*. *Antiviral Res.* 27: 367-374, 1995.
- CHARETTE, L.; FOULON, D.; RODGER, I.W.; JONES, T.R. Neurokinin (NK2) receptors mediate nonadrenergic noncholinergic contractile

- responses to electrical stimulation and resiniferatoxin in guinea pig trachea. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 72: 182-188, 1993.
- CHARETTE, L.; MISQUITTA, C.; GUAY, J.; RIENDEAU, D.; JONES, T.R. Involvement of cyclooxygenase 2 (COX2) in intrinsic tone of isolated pig trachea. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 73: 1561-1567, 1995.
- CHEN, C.K.; PACE-ASCIAK, C.R. Vasorelaxing activity of resveratrol and quercetin in isolated rat aorta. *Gen. Pharmacol.* 27: 363-366, 1996.
- CHEN, X.-L.; REMBOLD, C.M. Cyclic nucleotide-dependent regulation of Mn^{2+} influx, $[Ca^{2+}]_i$, and arterial smooth muscle relaxation. *Am. J. Physiol.* 263: C468-C473, 1992.
- CHIBA, T.; YAMAGUCHI, A.; YAMATANI, T.; NAKAMURA, A.; MORISHITA, T.; INUI, T.; FUKASE, M.; NODA, T.; FUJITA, T. CGRP receptor antagonist hCGRP (8-37). *Am. J. Physiol.* 256: E331-335, 1989.
- CHIESI, M.; SCHAWALLER, S. Reversal of phospholamban-induced inhibition of cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase by tannin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202: 1668-1673, 1994.
- CHIESI, M.; SCHWALLER, R. Inhibition of constitutive endothelial NO-synthase activity by tannin and quercetin. *Biochem. Pharmacol.* 49: 495-501, 1995.
- CHINKERS, M.; GARBERS, D.L. Signal transduction by guanylyl cyclases. *Ann. Rev. Biochem.* 60: 553-575, 1991.
- CHIU, P.; COOK, S.J.; SMALL, R.C.; BERRY, J.L.; CARPENTER, J.R.; DOWNING, S.J.; FOSTER, R.W.; MILLER, A.J.; SMALL, A.M. Beta-adrenoceptor subtype and the opening of plasmalemmal K^+ channels in

bovine trachealis muscle: studies of mechanical activity and ion fluxes.

Br. J. Pharmacol. 109: 1149-1156, 1993.

CONTI, M.A.; ADELSTEIN, R.S. The relationship between calmodulin binding and phosphorylation of smooth muscle myosin kinase by the catalytic subunit of 3':5' cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 256: 3178-3181, 1981.

COOKE, N.S.; HAYLLET, D.G. Effects of apamin, quinidine and neuromuscular blockers on calcitonin-activated potassium channels in guinea pig hepatocytes. *J. Physiol. Lond.* 358: 373-375, 1985.

DALSGAARD, C.-j.; LUNDBERG, J. Evidence for a spinal afferent innervation of the guinea pig lower respiratory tract as studied by the horseradish peroxidase technique. *Neurosci. Lett.* 45: 117-122, 1984.

DANIEL, E.E.; JURY, J. Cromacalina and K⁺ channels in canine trachealis. *Pulm. Pharmacol.* 4: 209-217, 1991.

DE MAN, J.G.; BOECKXSTAENS, G.E.; HERMAN, A.G.; PELCKMANS, P.R.P. Effect of potassium channels blockade and α_2 -adrenoceptor activation on the release of nitric oxide from non-adrenergic non-cholinergic nerves. *Br. J. Pharmacol.* 112: 341-345, 1994.

DE MAN, J.G.; BOECKXSTAENS, G.E.; PELCKMANS, P.R.P.; DE WINTER, B.Y.; HERMAN, A.G.; VAN MAERCKE, Y.M. Prejunctional modulation of the nitrergic innervation of the canine ileocolonic junction via potassium channels. *Br. J. Pharmacol.* 110: 559-564, 1993.

DE SAUVAGE, F.J.; KESHAV, S.; KUANG, W.-J.; GILLETT, N.; HENZEL, W.; GOEDDEL, D.V. Precursor structure, expression, and tissue

- distribution of human guanylin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 9089-9093, 1992.
- DIAS, M.A.; CAMPOS, A.H.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Analysis of the mechanisms underlying the contractile response induced by the hydroalcoholic extract of *Phyllanthus urinaria* in the guinea pig urinary bladder "in vitro". *J. Pharm. Pharmacol.* 47: 847-855, 1995.
- DICKENSON, A.H.; DRAY, A. Selective antagonism of capsaicin by capsazepine: evidence for a spinal receptor site in capsaicin-induced antinociception. *Br. J. Pharmacol.* 104: 1045-1049, 1991.
- DRAY, A. Neuropharmacological mechanisms of capsaicin and related substances. *Biochem. Pharmacol.* 44: 611-615, 1992.
- DUARTE, J.; PÉREZ-VIZCAÍNO, F.; ZARZUELO, A.; JIMÉNEZ, J.; TAMARGO, J. Vasodilator effects of quercetin in isolated rat vascular smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 239: 1-7, 1993.
- EDWARDS, G.; NIEDERSTE-HOLLENBERG, A.; SCHNEIDER, J.; NOACK, Th.; WESTON, A.H. Ion channel modulation by NS 1619, the putative BKCa channel opener, in vascular smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 113: 1538-1547, 1994.
- EDWARDS, G.; WESTON, A.H. The pharmacology of ATP-sensitive potassium channels. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 33: 597-637, 1993.
- ELLIS, J.L.; CONANAN, N.D. Effect of potassium channel blockers on relaxations to a nitric oxide donor and to nonadrenergic nerve

stimulation in guinea pig trachea. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 271: 782-786, 1994.

ELLIS, J.L.; UNDEM, B.J. Inhibition by capsazepine of resiniferatoxin- and capsaicin-induced contractions of guinea pig trachea. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268: 85-89, 1994.

ELLIS, J.L.; UNDEM, B.J.; KAYS, J.S.; GHANEKAR, S.V.; BARTHLOW, H.G.; BUCKNER, C.K. Pharmacological examination of receptors mediating contractile responses to tachykinins in airways isolated from human, guinea pig and hamster. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 267: 95-101, 1993.

EMONDS-ALT, X.; VILAIN, P.; GOULAOUIC, P.; PROIETTO, V.; VAN BROECK, D.; ADVENIER, C.; NALINE, G.; NELIAT, G.; LE FUR, G.; BRELIERE, J.C. A potent and selective non-peptide antagonist of the neurokinin A (NK2) receptor. *Life Sciences* 50, 101-106, 1992.

FAIRBAIRN, J.W. In: *The Pharmacology of Plant Phenolics*, p. 149. Academic Press, New York, 1959.

FEWTRELL, C.M.S.; GOMPERS, B.D. Effect of flavone inhibitors of transport ATPase on histamine secretion from rat mast cells. *Nature.* 265: 635-636, 1977.

FINDLAY, I. Interactive regulation of the ATP-sensitive potassium channel of cardiac muscle. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 24 suppl. 4: S6-11, 1994.

FITZPATRICK, D.F.; HIRSCHFIELD, S.L.; COFFEY, R.G. Endotelium dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *Am. J. Physiol.* 34: H774-H778, 1993.

- FITZPATRICK, D.F.; HIRSCHFIELD, S.L.; RICCI, T.; JANTZEN, P.; COFFEY, R.G. Endothelium-dependent vasorelaxation caused by various plant extracts. *J. Card. Pharmacol.* 26: 90-95, 1995.
- FLEMING, W.W.; WESTPHALL, D.P.; DE LA LANDE, I.S.; JELLET, L.B. Log-normal distribution of equieffective doses of norepinephrine and acetylcholine in several tissues, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 181: 339-345, 1972.
- FLOCH, A.; FARDIN, V.; CAVERO, I. Characterization of NK1 and NK₂ tachykinin receptors in guinea pig and rat bronchopulmonary and vascular systems. *Br. J. Pharmacol.* 111: 759-768, 1994.
- FUJII, T.; MURAI, M.; MORIMOTO, H.; MAEDA, Y.; YAMAOKA, M.; HAGIWARA, D.; MIYAKE, H.; IKARI, N.; MATSUO, M. Pharmacological profile of a high affinity dipeptide NK1 receptor antagonist, FK 888. *Br. J. Pharmacol.* 107: 785-789, 1992.
- GARBERS, D.L. Guanylyl cyclase receptors and their endocrine, paracrine and autocrine ligands. *Cell.* 71: 1-4, 1992.
- GARBERS, D.L.; LOWE, D.G. Guanylyl cyclase receptors. *J. Biol. Chem.* 269: 30741-30744, 1994.
- GEPPETTI, P.; BERTRAND, C.; BACCI, E.; HUBER, O.; NADEL, J.A. Characterization of tachykinin receptors in ferret trachea by peptide agonists and nonpeptide antagonists. *Am. J. Physiol.* 265:L164-L169, 1993.
- GIETZEN, K.; WUTHRICH, A.; BADER, H. R 24571: a new powerful inhibitor of red blood cell Ca²⁺-transport ATPase and of calmodulin-

- regulated functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101: 418-425, 1981.
- GIRARD, Y.; YOAKIN-RANCOURT, C.; HAMEL, P.; GILLARD, J.W.; GUINDON, Y.; LETTS, G.; EVANS, J.; LÉVEILLÉ, C.; ETHIER, D.; LORD, A.; JONES, T.; MASSON, P.; FORD-HUTCHINSON, A.W.; ROKACH, J. Tetrahydrocarbazol-1-acetic acid: New class of thromboxane receptor antagonists. In *Prostaglandins in clinical research: Cardiovascular System*, Vol. 1, pp. 585- 589, Alan R. Liss, inc., New York, . 1989.
- GOOCH, K.J.; FRANGOS, J.A. Flow-and bradikinin-induced nitric oxide production by endothelial cells is independet of membrane potencial. *Am. J. Physiol.* 270: C546-C551, 1996.
- GORSKI, F.; CORREA, C.R.; CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Potent antinociceptive activity of the hydroalcoholic extract from *Phyllanthus corcovadensis*. *J. Pharm. Pharmacol.* 45: 1046-1049, 1993.
- GRUETTER, C.A.; GRUETTER, D.Y.; LYON, J.E.; KADOWITZ, P.J.; IGNARRO, L.J. Relationship between cyclic guanosine 3',5'-monophosphate formation and relaxation of coronary arterial smooth muscle by gliceril trinitrate, nitroprusside, nitrite and nitric oxide: Effects of methylene blue and methemoglobin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 249:181-186, 1981.

- GUGGINO, S.E.; GUGGINO, W.B.; GREEN, N.; SACKTOR, B. Ca^{2+} -activated K^+ channels in cultured medullary thick ascending limb cells. *Am. J. Physiol.* 252: C121-127, 1987.
- GUYTON A.C. Anatomia funcional e contração do músculo. In: *Fisiologia Humana*. Ed. Guanabara Koogan S.A - RJ 1988 pp.90.
- GWEE, M.C.E.; CHEAD, L.S.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Involvement of the L-arginine-nitric oxide synthase pathway in the relaxant responses of the rat isolated anococcygeus muscle to a scorpion (*Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*) venom. *Toxicon*. 33: 1141-1150, 1995.
- HABERMANN, E. Apamin. *Pharmacol. Ther.* 25: 255-270, 1984.
- HALL, R.A.; GILLARD, J.; GUINDON, Y.; LETTS, G.; CHAMPION, E.; ETHIER, D.; EVANS, J.; YOAKIN, C. Pharmacology of L-655,240 (3-[1-(4-chlorobenzyl)-5-fluoro-3-methyl-Indol-2-yl]2,2-dimethylpropanoic acid); a potent, selective thromboxane/prostaglandin endoperoxide antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* 135: 193-201, 1987.
- HAMAGUCHI, M.; ISHIBASHI, T.; IMAI, S. Involvement of charybdotoxin-sensitive K^+ channel in the relaxation of bovine tracheal smooth muscle by glyceryl trinitrate and sodium nitroprusside. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 262: 263-270, 1991.
- HAMILTON, T.C.; WEIR, S.W.; WESTON, A.H. Comparison of the effects of BRL 34915 and Verapamil on electrical and mechanical activity in rat portal vein. *Br. J. Pharmacol.* 88: 103-111, 1986.

- HAY, D.W.P.; MUCCITELLI, R.M.; HARSTEMEYER, D.L.; RAEBURN, D. Is the epithelium-derived inhibitory factor in guinea pig trachea a prostanoid? *Prostaglandins* 35: 625-635, 1988.
- HERGENHAHN, H.; KUSUMOTO, S.; HECKER, E. Diterpene esters from "Euphorbium" and their irritant and cocarcinogenic activity. *Experientia* 30: 1438-1440, 1974.
- HIDAKA, H.; KOBAYASHI, R. Pharmacology of protein Kinase inhibitors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 377-397, 1992.
- HIRATA, M.; KOHSE, K.P.; CHANG, C.-H.; IKEBE, T.; MURAD, F. Mechanism of cyclic GMP inhibition of inositol phosphate formation in rat aorta segments and cultures bovine aortic smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 265: 1268-1273, 1990.
- HOFMANN, F.; DOSTMANN, W.; KEILBACH, A.; LANDGRAF, W.; RUTH, P. Structure and physiological role of cGMP-dependent protein kinase. *Biochim. Biophys. Acta* 1135: 51-60, 1992.
- HOFMANN, F.; LUDWIG, A.; PFEIFER, A. (1994) Cyclic GMP and the control of airways smooth muscle tone. In: *Airway Smooth Muscle: Biochemical Control of Contraction and Relaxation*. p. 253-268. ed. By D. Raeburn and M.A. Giembycz. Birkhäuser Verlag Basel/ Switzerland 1994.
- HOLZER, P. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmac. Rev.* 43: 143-201, 1991.

- HUANG, X.Y. MORIELLI, A.D.; PERALTA, E.G. Tyrosine kinase-dependent suppression of a potassium channel by the G protein-coupled m1 muscarinic acetylcholine receptor. *Cell* 75: 1145-1156, 1993.
- HUSSAIN, R.A.; DICKEY, J.K.; ROSSER, M.P.; MATSON, J.A.; KOZLOWSKI, M.R. A new class of non-peptidic endothelin antagonists isolated from the medicinal herb *Phyllanthus niruri*. *J. Nat. Prod.* 58: 1515-1520, 1995.
- ICHINOSE, M.; BARNES, P.J. A potassium channel activator modulates both excitatory noncholinergic and cholinergic neurotransmission in guinea pig airways. *J. Pharmacol Exp. Ther.* 252: 1207-1212, 1990.
- IRELAND, S.J.; BAILEY, F.; COOK A.; HAGAN, R.M.; JORDAN C.C.; STEPHENS-SMITH, M. Receptor mediating tachykinin-induced contractile responses in guinea pig trachea. *Br. J. Pharmac.* 103: 1463-1469, 1991.
- IRELAND, S.J.; JORDAN, C.C.; STEPHENS-SMITH, M.L.; WARD, P. Receptors mediating the contractile response to neurokinin agonists in the guinea pig trachea. *Regul. Peptides* 22: 93, 1988.
- ITOH, H.; SHIMOMURA, A.; OKUBO, S.; ICHIKAWA, K.; ITO, M.; KONISHI, T.; NAKANO, T. Inhibition of miosin light chain phosphatase during Ca^{2+} -independent vasoconstriction. *Am. J. Physiol.* 265: C1319-C1324, 1993.
- IWATA, T.; UCHIDA-MIZUNO, K.; KATAFUCHI, T.; ITO, T.; HAGIWARA, H.; HIROSE, S. Bifunctional atrial natriurétic peptide receptor (type A)

- exist as a disulfide-linked tetramer in plasma membranes of bovine adrenal cortex. *J. Biochem. (Tokyo)* 110: 35-39, 1991.
- JI, X.H.; QIN, Y.Z.; WANG, W.Y.; ZHU, J.Y.; LIU, X.T. Effects of extract from *Phyllanthus urinaria* L. on HBsAg production in PLC/PRF/5 cell line. *China Journal of Chinese Materia Medica* 18: 496-498, 1993.
- JONES, T.R.; CHARETTE, L.; GARCIA, M.L.; KACZOROWSKI, J. Selective inhibition of relaxations of guinea pig trachea by charybdotoxin, a potent Ca^{++} -activated K^+ channels inhibitor. *J. Pharm. Exp. Ther.* 255: 697-706, 1990.
- JONES, T.R.; ZAMBONI, R.; BELLEY, M.; CHAMPION, L.; CHARETTE, L.; FORD-HUTCHINSON, A.W.; FRENETTE, R.; GAUTHIER, J.-Y.; LEGER, S.; MASSON, P.; MCFARLANE, C.S.; PIECHUTA, H.; ROKACH, J.; WILLIAMS, H.; YOUNG, R.N.; DEHAVEN, R.N.; PONG, S.S. Pharmacology of L-600,711 (MK 571): a novel potent and selective leukotriene D_4 receptor antagonist. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 67: 17-28, 1989.
- KAMIKAWA, Y.; SHIMO, Y. SR 48968, a novel non-peptide tachykinin NK2-receptor antagonist, selectively inhibits the non-cholinergically mediated neurogenic contraction of guinea pig isolated bronchial muscle. *J. Pharm. Pharmacol.* 45: 1037-1041, 1993.
- KANNAN, M.S.; JOHNSON, D.E. Modulation of nitric oxide-dependent relaxation of pig tracheal smooth muscle by inhibitors of guanylyl cyclase and calcium activated potassium channels. *Life Sci.* 56: 2229-2238, 1995.

- KARCZEWSKI, P.; KELM, M.; HARTMANN, M.; SCHRADER, J. Role of phospholamban in NO/EDRF-induced relaxation in rat aorta. *Life Sci.* 51: 1205-1210, 1992.
- KRIPPEIT-DREWS, P.; NOREL, N.; GODFRAIND, T. Effect of nitric oxide on membrane potential and contraction of rat aorta. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 20: S72-S75, 1992.
- KUNIZANE, H.; UEDA, H.; YAMAZAKI, M. Screening of phagocyte activators in plants; enhancement of TNF production by flavonoids. *Yakugaku. Zasshi.* 115: 749-755, 1995.
- KUPCHAN, S.M.; LA VOIE, E.J.; BRANFMAN, A.R.; FEI, B.Y.; BRIGHT, W.M.; BRYAN, R.F. Phyllanthocin, a novel bisabolane aglycone from the antileukemic glycoside phyllanthoside. *J. Am. Soc.* 99: 3199-3201, 1978.
- LANG, C.; RACKER, M. Quercetin, an artificial regulator of the high aerobic glycolysis of tumor cells. *J. Natl. Cancer. Inst.* 53: 1515-1519, 1974.
- LI, C.G.; RAND, M.J. Evidence that participation of the NANC relaxant responses of guinea-pig trachea to electrical field stimulation is mediated by nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.* 102: 91-94, 1991.
- LIJNEN, P.; FAGARD, R.; STAESSEN, J.; WEIPING, T.; MOERMAN, E.; AMERY, A. Humoral and cellular effects of the K⁺-channel activator cromacalina in man. *Eur. j. Clin. Pharmacol.* 37: 609-611, 1989.
- LIN, M-T.; LEE, S-S.; LIU, K.C.S.C. Phyllamyricins A-C, three novel lignans from *Phyllanthus myrtifolius*. *J. Nat. Prod.* 58: 244-249, 1995.

- LINDHAL, M.; TAGESSON, C. Selective inhibition of group II phospholipase A₂ by quercetin. *Inflammation*. 17: 573-582.
- LIU, L.; SIMON, S.A. A rapid capsaicin-activated current in rat trigeminal ganglion neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 738-741, 1994.
- LOWE, D.G. Human natriuretic peptide receptor-A guanylyl cyclase is self-associated prior to hormone binding. *Biochemistry*, 31: 10421-10425, 1992.
- LUNDBERG, J.M.; MARTLING, C.R.; SARIA, A. Substance P and capsaicin-induced contraction of bronchi. *Acta Physiol. Scand.* 119: 49-53, 1983.
- MAGGI, C.A. Tachykinin receptors in the airways and lung: What should we block? *Pharmacol. Res.* 22: 527-540, 1990.
- MAGGI, C.A.; CHIBA, T.; GIULINAI, S. Human α -calcitonin gene-related peptide (8-37) as an antagonist of exogenous and endogenous calcitonin gene-related peptide. *Eur. J. Pharmacol.* 192: 85-88, 1991c.
- MAGGI, C.A.; GIULIANI, S.; SANTICIOLI, P. Multiple mechanisms in the smooth muscle relaxant action of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the guinea pig ureter. *Naunym-Schmiedeb. Arch. Pharmacol.* 350: 537-547, 1994.
- MAGGI, C.A.; GIULIANNI, S.; BALLAT, L.; LECCI, A.; MANZINI, S.; PATACCHINI, R.; RENZETTI, A.R.; ROVERO, P.; QUARTARA, L.; GIACHETTI, A. In vivo evidence for tachykininergic transmission using a new NK₂ receptor-selective antagonist, MEN-10,376. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 257: 1172-1178, 1991d.

- MAGGI, C.A.; PATACCHINI, R.; QUARTARA, L.; ROVERO, P.; SANTICIOLI, P. Tachykinin receptors in the guinea-pig isolated bronchi. *Eur. J. Pharmac.* 197: 167-174, 1991a.
- MAGGI, C.A.; PATACCHINI, R.; ROVERO, P.; GIACHETTI, A. Tachykinin receptors and tachykinin receptor antagonists. *J. Autonom. Pharmacol.* 13: 23-93, 1993.
- MAGGI, C.A.; PATACCHINI, R.; ROVERO, P.; SANTICIOLI, P. Tachykinin receptor and noncholinergic bronchoconstriction in the guinea pig isolated brochi. *Am. Rev. Resp. Dis.* 144: 363-367, 1991b.
- MAGGIO, J.E. Tachykinins. *Ann. Rev. Neurosci.* 11: 13-21, 1988.
- MAPP, C.E.; FABBRI, L.M.; BONIOTTI, A.; MAGGI, C.A. Prostacyclin activates tachykinin release from capsaicin-sensitive afferents in guinea-pig bronchi through a rutenium red-sensitive pathway. *Br. J. Pharmacol.* 104: 49-52, 1991.
- MARCHENKO, S.M.; SAGE, S.O. Calcium-activated potassium channels in the endothelium of intact rat aorta. *J. Physiol.* 492: 53-60, 1996.
- MARTINS, J.C.; VAN-DE-VEM, F.J.; BORREMANS, F.A. Determination of the three-dimensional solution structure of scyllatoxin by ^1H nuclear magnetic resonance. *J. Mol. Biol.* 253: 590-603, 1995.
- MATHE, A.A.; HEDQVIST, P. Effect of prostaglandi $\text{F}_{2\alpha}$ and E_2 on airway conductance in healthy subjects and asthmatic patients. *Am. Rev. Respir. Dis.* 111: 313-320, 1975.

- MATSUNAGA, S.; TANAKA, R.; TAKAOKA, Y.; IN, Y.; ISHIDA, T.; RAHMANI, M.; ISMAIL, H.B.M. 26-Nor-D:A-friedooleanane triterpenes from *Phyllanthus watsonii*. *Phytochemistry*, 32: 165-170, 1993.
- MCKEE, K.T., MILLAR, L., RODGER, I.W. E METTERS, K.M. Identification of both NK1 and NK2 receptors in guinea pig airway. *Br. J. Pharmacol.* 110: 693-700, 1993.
- MCMANUS, O.B.; HARRIS, G.H.; GIANGIACOMO, K.M.; FEIGENBAUM, P.; REUBEN, J.P.; ADDY, M.E.; BURKA, J.F., KACZOROWSKI, G.J.; GARCIA, M.L. Na activator of calcium dependent potassium channels isolated from a medicinal herb. *Biochemistry*. 32: 6128-6133, 1993.
- MEADE, E.A.; SMITH, W.L., DEWITT, D.L. Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclo-oxygenase) isoenzymes by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J. Biol. Chem.* 268: 6610-6614, 1993.
- MEIXIA, W.; HAOWEI, C.; YANJUN, L.; LINMIN, M.; GUOLONG, Z.; KAI, M. Herbs of the genus *Phyllanthus* in the treatment of chronic hepatitis B: Observations with three preparations from different geographic sites. *J. Lab. Clin. Med.* 126: 350-352, 1995.
- MIGUEL, O.G.; CECHINEL FILHO, V.; NIERO, R.; SILVA, G.O.; PIZZOLATTI, M.G.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B.; SANTOS, A.R. Constituent of *Phyllanthus sellowianus*. *Fitoterapia*. 66: 275, 1995a.
- MIGUEL, O.G.; CECHINEL FILHO, V.; PIZZOLATTI, M.G.; SANTOS, A.R.; CALIXTO, J.B.; FERRARI, F.; MESSANA, I.; YUNES, R.A. Further active

- constituents from leaves and stems of *Phyllanthus sellowianus* (EUPHORBIACEAE). *Planta Med.* (in press), 1995 b.
- MIGUEL, O.G.; CECHINEL-FILHO, V.; PIZZOLATTI, M.G.; SANTOS, A.R.; CALIXTO, J.B.; FERRARI, F.; MESSANA, I.; YUNES, R.A. A triterpene and phenolic compounds from leaves and stems of *Phyllanthus sellowianus*. *Planta Med.* 61: 391, 1995b.
- MILLER, C.; MOCZYDLOWSKI, E.; LATORRE, R.; PHILLIPS, M. Charybdotoxin, a inhibitor of single Ca^{2+} -activated K^+ channels from mammalian skeletal muscle. *Nature* 313: 316-318, 1986.
- MILLER, M.S.; BRENDDEL, K.; BUCK, S.H.; BURKS, T.F. Dihydrocapsaicin-induced hypothermia and substance P depletion. *Eur. J. Pharmacol.* 83: 289-292, 1982a.
- MILLER, M.S.; BUCK, S.H.; SIPES, I.G.; YAMAMURA, H.I.; BURKS, T.F. Regulation of substance P by nerve growth factor: disruption by capsaicin. *Brain Res.* 250: 193-196, 1982b.
- MIRSALIKOVA, N.M.; PAKUDINA, Z.P. Flavonoid inhibitors of Na-K-dependent ATPase. *Khim. Prir. Soedin* 1: 44-46, 1977.
- MITCHELL, J.A.; AKARASEREENONT, P.; THIEMERMANN, C.; FLOWER, R.J.; VANE, J.R. Selectivity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 11693-11697. 1994.
- MONCADA, S., PALMER, R.M.J. E HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43: 109-142, 1991.

- MONCADA, S.; VANE, J.R. Prostacyclin, thromboxane and leukotrienes. Introduction to Symposium. *Br. Med. Bull.*, 39: 209, 1983.
- MOORE, P.K.; AL-SWAYEH, D.A.; CHONG, N.W.S.; EVANS, R.S.; GIBSON, A. L-N^G-Nitroarginine (L-NOARG) a novel L-arginine-reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilation in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 99: 408-412, 1990.
- MORALES, M.A.; LOZOYA, X. Calcium-antagonist effects of quercetin on aortic smooth muscle. *Planta Med.* 60: 313-317, 1993.
- MORLEY, J. K⁺ channel openers and suppression of airway hyperreactivity. *Trends Pharmacol. Sci.* 15: 463-468, 1994.
- MORTON, J.F. In: Thomas, C.C. (ed.) Atlas of medicinal plants in middle America. Springfield, p.p. 458-462, 1981.
- MURAI, M.; MAEDA, Y.; YAMAOKA, M.; HAGIWARA, D.; MIYAKE, H.; MATSUO, M.; FUJII, T. The pharmacological properties of FK 888, a novel dipeptide NK1 antagonist. *Reg. Pept.* 64: 335-337, 1993.
- MURRAY, J.A.; SHIBATA, E.F.; BURESH, T.L.; PICKEN, H.; O'MEARA, B.W.; CONKLIN, J.L. Nitric oxide modulates a calcium-activated potassium current in muscle cells from opossum esophagus. *Am. J. Physiol.* 269: G606-G612, 1995.
- MURRAY, M.A.; BOYLE, J.P.; SMALL, R.C. Cromacalina-Induced relaxation of guinea-pig isolated trachealis: antagonism by glibenclamide and by phentolamine. *Br. J. Pharmacol.* 98: 865-874, 1989.

- NAKANISHI, S. Mammalian tachykinin receptors. *A. Rev. Neurosci.* 14: 123-136, 1991.
- NAKANISHI, S. Substance P precursor and kininogen: their structures, gene organizations and regulation. *Physiol. Rev.* 67: 1117-1142, 1987.
- NARA, T.; GLEYE, J.; LAVERGNEDE, C.E.; STANILAS, E. Flavonoids of *Phyllanthus niruri* L.; *Phyllanthus urinaria* L. and *Phyllanthus orbiculatus* L. C. Rich. *Plant. Med. Phytother.* 11: 82, 1977.
- NIELSEN-KUDSK, J.E.; BANG, L.; BRONSGAARD, A.M. Glibenclamide blocks the relaxant action of pinacidil and cromacalina in airway smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 180: 291-296, 1990.
- O'NEIL, G.P.; MANCINI, J.A.; KARGMAN, S.; YERGEY, J.; KWAN, M.Y.; FALGUEYRET, J.P.; ABRAMOVITZ, M.; KENNEDY, B.P.; OUELLET, M.; CROMLISH, W.; CULP, S.; EVANS, J.F.; FORD-HUTCHINSON, A.W.; VICKERS, P.J. Overexpression of prostaglandin G/H synthases-1 and 2 by recombinant vacciniavirus: inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs and biosynthesis of 15-hydroxyeicosatetraenoic acid. *Mol. Pharmacol.* 45: 245-254, 1994.
- OGATA, T.; HIGUCHI, H.; MOCHIDA, S.; MATSUMOTO, H.; KATO, A.; ENDO, T.; KAJI, A.; KAJI, H. HIV-1 reverse transcriptase inhibitor from *Phyllanthus niruri*. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 8: 1937-1944, 1992.
- OLESEN, S.P.; MUNCH, E.; MOLDT, P.; DREJER, J. Selective activation of Ca²⁺-dependent K⁺ channels by novel benzimidazolone. *Eur. J. Pharmacol.* 251: 53-59, 1994.

- OLESEN, S.P.; WÄTJEN, F. Benzimidazole derivatives, their preparation and use. European patent application, EP-477819-A. 1992.
- OLIVER-BEVER, B. Medicinal plants in tropical West Africa III. Anti-infection therapy with higher plants. *J. Ethnopharmacol.* 9: 1-83, 1983.
- OREHEK, J.; DOUGLAS, J.S.; BOUHUYS, A. Contractile responses of the guinea pig trachea *in vitro*: modification by prostaglandin synthesis - inhibitory drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 194: 554-564, 1975.
- OREHEK, J.; DOUGLAS, J.S.; LEWIS, A.J.; BOUHUYS, A. Prostaglandin regulation of airway smooth muscle tone. *Nature (London)* 245: 84-85, 1973.
- OTSUKA, M.; YOSHIOKA, K. Neurotransmitter function of mammalian TKs. *Physiol. Rev.* 73: 229-307, 1993.
- OYEKAN, A. Cryptolepine-induced vasodilation in the isolated perfused kidney of the rat: role of G-proteins, K⁺ and Ca⁺ channels. *Eur. J. Pharmacol.* 285: 1-9, 1995.
- PALMER, R.M.J.; FERRIGE, A.G.; MOCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526, 1987.
- PANDOL, S.J.; DHARMSATHAPHORN, K.; SCHOEFFIELD, M.S.; VALE, W.; RIVIER, J. Vasoactive intestinal peptide receptor antagonist [4CI-D-Phe⁶,Leu¹⁷]VIP. *Am. J. Physiol.* 250: G-553-555, 1986.
- PARELLO, J. Structure of phyllantine, a minor alkaloid from *Phyllanthus discoides* Meull. Arg. (*Euphorbiaceae*). *Bull. Soc. Chlm. Fr.* 3: 1117-1129, 1968.

- PERKINS, M.N.; CAMPBELL, E.A. Capsazepine reversal of the antinociceptive action of capsaicin in vivo. *Br. J. Pharmacol.* 107: 329-333, 1992.
- PERRY, L.M.; METZGER, J. *Medicinal plants of East and Southeast Asia: Atributed properties and uses.* Cambridge : MIT Press, 1980. P. 149-151, 1980.
- PETTIT, G.R.; CRAGG, G.M.; NIVEN, M.L.; NASSIMBENI, L.R. Structure of the principal antineoplastic glycosides of *Phyllanthus acuminatus* Vahl. *Can. J. Chem.* 61: 2630-2632, 1983.
- PETTIT, G.R.; CRAGG, G.M.; SUFFNESS, M.I. Phyllanthostatin 1. Phyllanthoside orthoacid rearrangement. *J. Org. Chem.* 50: 5060-5063, 1985.
- PETTIT, G.R.; CRAGG, G.M.; SUFFNESS, M.I.; GUST, D.; BOETTNER, F.E.; WILLIAMS, M.; SAENZ-RENAUD, J. A.; BROWN, P.; SCHMIDT, J.M.; ELLIS, P.D. Antineoplastic aggents 104. Isolation and structure of the *Phyllanthus acuminatus* Vahl. (Euphorbiaceae) glycosides. *J. Org. Chem.* 49: 4258-4266, 1984.
- PETTIT, G.R.; SCHAUFELBERGER, D.E.; NIEMAN, R.A.; DUFRESNE, C.; SAENZ-REUNAULD, J.A. Antineoplastic agents, 177. Isolation and structure of phyllanthostatin 6. *J.Nat. Prod.* 53: 1406-1413, 1990.
- PFITZER, G.; RUEGG, J.C.; FLOCKERZI, V.; HOFFMANN, F. cGMP-dependent protein kinase decrease calcium sensitivity of skinned cardiac fibers. *FEBS Lett.* 149: 171-175, 1982.

- PITCHARD, K.A.; O'BANION, M.K.; VLASIC, N.; BHATIA, U.G.; YOUNG, D.A.; STEMERMAN, M.B. Induction of cyclooxygenase-2 in rat vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 269: 8504-8509, 1994.
- POLYA, G.M.; WANG, B.H.; FOO, L.Y. Inhibition of signal-regulated protein kinases by plant-derived hydrolysable tannins. 38: 307-314, 1995.
- QIAN-CUTRONE, J.; HUANG, A.; TRIMBLE, J.; LI, H.; LIN, P-F.; ALAM, M.; KLOHR, S.E.; KADOW, K.F. Niruside, a new HIV REV/RRE binding inhibitor from *Phyllanthus niruri*. *J. Nat. Prod.* 59: 196-199, 1996.
- RAPOPORT, R.M.; DRAZNIN, M.B.; MURAD, F. Endothelium-dependent relaxation of rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature* 306: 174-176, 1983.
- REGOLI, D.; NGUYEN, Q.T.; JUKIC, D. Minireview: Neurokinin receptor subtypes characterized by biological assays. *Life Sci.* 54: 2035-2047, 1994.
- RENZETTI, L.M.; SHENVI, A.; BUCKNER, C.K. Non-adrenergic, non-cholinergic contractile response of the guinea pig hilar bronchus involve the preferential activation of tachykinin neurokinin 2 receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 262: 957-963, 1992.
- RICHARDSON, J.B. Nerve supply to the lungs. *Am. Rev. Respir. Dis.* 119: 785-802, 1979.

- ROBERTS, A.M.; BHATTANCHARYA, J.; SCHULTZ, H.D.; COLERIDGE, H.M.; COLERIDGE, J.C.G. Stimulation of pulmonary vagal afferent C-fibers by lung edema in dogs. *Circ. Res.* 58: 512-522, 1986.
- ROBERTS, A.M.; SCHULTZ, H.D.; GREEN, J.F.; ARMSTRONG, D.J.; KAUFMAN, M.P.; COLERIDGE, H.M.; COLERIDGE, J.C.G. Reflex tracheal contraction evoked in dogs by bronchodilator prostaglandins E₂ and I₂. *J. Appl. Physiol.* 58: 1823-1831, 1985.
- ROBERTSON, B.E.; SCHUBERT, R.; HESCHELER, J.; NELSON, M.T. cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K⁺ channels in cerebral artery smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 265: C299-C303, 1993.
- ROMEY, G.; HUGHES, M.; SCHIMID'ANTOMARCHI, H.; LAZDUNSKI, M. Apamin: a specific toxin to study a class of Ca²⁺-dependent K⁺ channels. *J. Physiol. Lond.* 79: 259-264, 1984.
- ROSENZWEIG, A.; HALAZONETIS, T.D.; SEIDMAN, J.G.; SEIDMAN, CE. Proximal regulatory domains of rat atrial natriuretic factor gene. *Circulation* 84: 1256-1265, 1991.
- RUSSEL, J.A.; ROHRBACH, M.S. Tannin induces endothelium-dependent contraction and relaxation of rabbit pulmonary artery. *Am. Rev. Resp. Dis.* 139: 498-503, 1989.
- SAH, P. Ca²⁺-activated K⁺ currents in neurones: types, physiological roles and modulation. *TINS* 19: 150-154, 1996.
- SANTOS, A.R.S.; CECHINEL FILHO, V.; NIERO, R.; VIANA, A.M.; MORENO, F.N.; CAMPOS, M.M.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B.

- Analgesic effects of Callus culture extracts from selected species of *Phyllanthus* in mice. *J. Pharm. Pharmacol.* 46: 755-759, 1994.
- SANTOS, A.R.S.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Analysis of the mechanisms underlying the antinociceptive effect of the extracts of plants from the genus *Phyllanthus*. *Gen. Pharmacol.* 26: 1499-1506, 1995c.
- SANTOS, A.R.S.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Further studies on the antinociceptive action of the hydroalcoholic extracts from the plants of the genus *Phyllanthus*. *J. Pharm. Pharmacol.* 47: 66-71, 1995a.
- SANTOS, A.R.S.; NIERO, R.; CECHINEL FILHO, V.; PIZZOLATTI, M.G.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Antinociceptive properties of steroids isolated from *Phyllanthus corcovadensis* in mice. *Planta Medica* 61: 329-332, 1995b.
- SANTOS, D.R. DOS. Chá de quebra-pedra (*Phyllanthus niruri*) na litíase urinária em humanos e ratos. PhD thesis, Escola Paulista de Medicina. São Paulo. pp. 157, 1990.
- SARCEVIC, B.; BROOKES, V.; MARTIN, T.J.; KEMP, B.E.; ROBINSON, P.J. Atrial natriuretic peptide-dependent phosphorylation of smooth muscle cell particulate fraction proteins is mediated by cGMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 264: 20648-20654, 1989.
- SARGENT, C.A.; GROVER, G.J.; ANTONACCIO, M.J., MCCULLOUGH, J.R. The cardioprotective, vasorelaxant and eletrophysiological profile

of the large conductance calcium-activated potassium channel opener NS 004. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 266: 1422-1429, 1993.

SCHLEMPER, V.; CALIXTO, J.B. Mechanisms involved in the relaxant response of bradykinin in epithelium intact strips of the guinea-pig trachea. *Eur. J. Pharmacol.* 282: 177-184, 1995.

SCHLEMPER, V.; CALIXTO, J.B. Nitric oxide pathway-mediated relaxant effect of bradykinin in the guinea pig isolated trachea. *Br. J. Pharmacol.* 111: 83-88, 1994.

SCHMID-ANTOMARCHI, H.; DE WEILLE, J.; FOSSET, M.; LADZDUNSKI, M. The receptor for antidiabetic sulfonylureas controls the activity of the ATP-modulated K⁺ channel in insulin-secreting cells. *J. Biol. Chem.* 262: 15840-15845, 1987.

SCHULZ, S.; CHRISMAN, T.D.; GARBERS, D.L. Cloning and expression of guanylin. *J. Biol. Chem.* 267: 16019-16021, 1992.

SHENG, H.; FÖRSTERMANN, U.; MURAD, F. Mechanism of bradikinin-induced cyclic GMP accumulation in bovine tracheal smooth muscle. *Lung* 173: 373-383, 1995.

SHENG, H.; ISHII, K.; MURAD, F. Generation of an endothelium-derived relaxing factor-like substance in bovine tracheal smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 260: L486-L493, 1991.

SHIMIZU, M.; HORIE, S.; TERASHIMA, S.; UENO, H.; HAYASHI, T.; ARISHAWA, M.; SUZUKI, S.; YOSHIZAKI, M.; MORITA, N. Studies on a aldose reductase inhibitors from natural products. II. Activite

components of a Paraguayan crude "Paraparai-mi", *Phyllanthus niruri*. *Chem.Pharm. Buli. (Tokyo)*. 37: 2591-2532, 1989.

SHOSHAN, V.; MACLENNAN, D.H. Quercetin interaction with the Ca-ATPase of sarcoplasmatic reticulum. *J. Biol. Chem.* 256: 887-892, 1981.

SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; IRGANG, B.E.; STEHMANN, J.R. *Plantas da Medicina Popular no Rio Grande do Sul. Porto Alegre*. Ed. Da Universidade/UFRGS. 168p., 1989.

SIMONSEN, U.; PRIETO, D.; SANEZ-DE-TEJADA, I.; GARCIA-SACRISTAN, A. Involvement of nitric oxide in the non-adrenergic non-cholinergic neurotransmission of horse deep penile arteries: role of charybdotoxin-sensitive K⁺ channels. *Br. J. Pharmacol.* 116: 2582-2590, 1995.

SINGH, B.; AGRAWAL, P.K.; THAKUR, R.S. A new lignan a new neolignan from *Phyllanthus niruri*. *J. Nat. Prod. (Llodya)*. 52: 48-51, 1989.

SINGHAL, R.L.; YEH, Y.A.; PRAJA, N.; OLAH, E.; SLEDGE, G.W.Jr.; WEBER, G. Quercetin down-regulates signal transduction in human breast carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208: 425-431, 1995.

SMITH, A.P.; CUTHEBERT, M.F. The response of normal and ashmatic subjects to prostaglandins E and F by different routes, and their significate in asthma. *In Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research*. ed. Samuelsson, B. & Paoletti, R. Vol. I, pp. 449-459. New York: Raven, 1976.

- SMITH, C.; PHILLIPS, M.; MILLER, C. Purification of charybdotoxin, a specific inhibitor of the high-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel. *J. Biol. Chem.* 261: 14607-14613, 1986.
- SMITH, L.B.; DOWNS, R.J.; KLEIN, R.M. Euphorbiaceae. *Flora Illustrada Catarinense. Parte 1*, 409p., 1988.
- SOMLYO, A.P.; HIMPENS, B. Cell calcium and its regulation in smooth muscle. *FASEB J.* 3: 2266-2276, 1989.
- SOMLYO, A.P.; SOMLYO, A.V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. 372: 231-236, 1994.
- SOMLYO, A.P.; SOMLYO, A.V. Flash photolysis studies of excitation-contraction coupling, regulation, and contraction in smooth muscle. *Annu. Rev. Physiol.* 52: 857-874, 1990
- SOMLYO, A.V.; BOND, M.; BRODERICK, R.; SOMLYO, A.P. Calcium and magnesium movements through sarcoplasmic reticulum, endoplasmic reticulum, and mitochondria. *Adv. Exp. Med. Biol.* 232: 221-229, 1988.
- SPINELLI, W.; FOLLMER, C.; PARSONS, R.; COLATSKY, T. Effects of cromacalina, pinacidil and nicorandil on cardiac refractoriness and arterial pressure in open-chest dogs. *Eur. J. Pharmacol.* 179: 243-252, 1990.
- SRIVASTAVA, A.K. Inhibition of phosphorylase kinase, and tyrosine protein kinase activities by quercetin. 131: 1-5, 1985.
- SUAREZ-KURTZ, G.; GARCIA, M.L.; KACZOROWSKI, G.J. Effects of charybdotoxin and iberiotoxin on the spontaneous motility and tonus of

- different guinea pig smooth muscle tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 259: 439-443, 1991.
- SWEENEY, H.L.; YANG, Z.; ZHI, G.; STULL, J.T.; TRYBUS, K.M. Charge replacement near the phosphorylatable serine of the myosin regulatory light chain mimics aspects of phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 1490-1494, 1994.
- SYAMASUNDAR, K.V.; SINGH, B.; YHAKUR, R.S.; HASAIN, A.; KISO, Y.; HIKINO, H. Antihepatotoxic principles of *Phyllanthus niruri* herbs. *J. Ethnopharmacol.* 14: 41-44, 1985.
- SZALLASI, A. The vanilloid (capsaicin) receptor: receptor type and species differences. *Gen. Pharmacol.* 25: 223-243, 1994.
- SZALLASI, A.; BLUMBERG, P.M. Characterization of vanilloid receptor in the dorsal horn of pig spinal cord. *Brain Res.* 547: 335-338, 1991.
- SZALLASI, A.; BLUMBERG, P.M. Specific binding of resiniferatoxin, an ultrapotent capsaicin analog, by dorsal root ganglion membranes. *Brain Res.* 524: 106-111, 1989.
- SZALLASI, A.; GOSO, C. Characterization by [³H]resiniferatoxin binding of a human vanilloid (capsaicin) receptor in post-mortem spinal cord. *Neurosc. Letters* 165: 101-104, 1994.
- SZALLASI, A.; GOSO, C.; BLUMBERG, P.M.; MANZINI, S. Competitive inhibition by capsazepine of [³H]resiniferatoxin binding to central (spinal cord and dorsal root ganglia) and peripheral (urinary bladder and airways) vanilloid (capsaicin) receptors in rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 267: 728-733, 1993.

- SZALLASI, A.; GOSO, C.; BLUMBERG, P.M.; MANZINI, S. The competitive inhibition by capsazepine of [³H]resiniferatoxin binding to central (spinal cord and dorsal root ganglia) and peripheral (urinary bladder and airway) vanilloid (capsaicin) receptors in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 267, 728-733, 1993.
- SZOLCSANYI, J. Capsaicin, irritation, and desensitization: neuropharmacological basis and future perspectives. In: *Chem. Sens.* vol. 2 ed. Green. B.G. Mason. J.R. e Kare, M.R. pp. 141-168. New York. Marcel Dekker inc. 1990.
- TAMAOKI, J.; KONDO, M.; TAKEMURA, H.; CHIYOTANI, A.; YAMAWAKI, I.; KONNO, K. Cyclic adenosine monophosphate-mediated release of nitric oxide from canine cultured tracheal epithelium. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 152: 1325-1330, 1995.
- TANAKA, R.; MATSUNAGA, S. Triterpene dienois and other constituents from the bark of *Phyllanthus flexuosus*. *Phytochemistry* 27: 2273-2277, 1988.
- TANIGUCHI, J.; FURAKAWA, K-I.; SHIGEKAWA, M. Maxi K⁺ channel are stimulated by cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase in canine coronary artery smooth muscle cells. *Pflügers Arch.* 423: 167-172, 1993.
- TAYLOR, D.C.; PIERAU, F.K.; SZOLCSANYI, J. Capsaicin-induced of axoplasmic transport is prevented by nerve growth factor. *Cell Tissue Res.* 240: 569-573, 1985.

- TAYLOR, D.C.; PIERAU, F.K.; SZOLCSANYI, J. Long lasting inhibition of horseradish peroxidase (HRP) transport in sensory nerves induced by capsaicin pretreatment of the receptive field. *Brain Res.* 298: 45-49, 1984.
- TEMPESTA, F.; CORLEY, D.G.; BEUTLER, J.A.; METRAL, C.J.; YUNES, R.A.; GIACOMOZZI, C.A.; CALIXTO, J.B. Phyllanthimide, a new alkaloid from *Phyllanthus sellowianus*. *J. Nat. Prod.* 51: 617-618, 1988.
- THORNBURY, K.D.; WARD, S.M.; DALZIEL, H.H.; CARL, A.; WESFALL, D.P.; SANDER, K.M. Nitric oxide and nitrosocysteine mimic nonadrenergic, noncholinergic hyperpolarization in canine proximal colon. *Am. J. Physiol.* 261: G553-G557, 1991.
- THYAGARAJAN, S.P.; SUBRAMANIAN, S.; THIRUNALASUNDARI, T.; VENKATESWARAN, P.S.; BLUMBERG, B.S. Effect of *Phyllanthus amarus* on chronic carriers of hepatitis B virus. *Lancet* II: 764-766, 1988.
- TROPHY, T.J.; UNDEM, B.J.; CIELINSKI, L.B.; LUTTMANN, M.A.; REEVES, M.L.; HAY, D.W.P. Identification, characterization and functional role of phosphodiesterase isoenzymes in human airway smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 265: 1213-1223, 1993.
- TUCKER, J.F.; BRANE, S.R.; CHARALAMBONS, L.; HOBBS, A.J.; GIBSON, A. L-N^G-Nitro arginine inhibits non-adrenergic, non-cholinergic relaxations of the guinea pig isolated tracheal smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 100: 663-664, 1990.

- UDDMAN, B.J.; SUNDLER, F. Sites and synthesis. Neuropeptides in the airway: A review. *Am. Rev. Respir. Dis.* 136: S3-S8, 1987.
- UEDA, M.; SHIGEMORI-SUZUKI, T.; YAMAMURA, S. Phyllanthurinolactone, a leaf-closing factor of nyctinastic plant, *Phyllanthus urinaria* L. *Tetrahedron Lett.* 36: 6267-6270, 1995.
- UENO, H.; HORIE, S.; NISHI, Y.; SHAGAWA, H.; KAWASAKI, M.; SUZUKI, S.; HAYASHI, T.; ARISAWA, M.; SHIMIZU, M.; YOSHIZAKI, M.; MORITA, N. Chemical and pharmaceutical studies on medicinal plants in Paraguay. Geraniin, na angiotensin converting enzyme inhibitor from "Paraparai Mi", *Phyllanthus niruri*. *J. Nat. Prod. (Lloydia)* 51: 357-359, 1988.
- UNANDER, D.W. Callus induction of *Phyllanthus* species and inhibition of viral DNA polymerase and reverse transcriptase by callus extracts. *Plant Cell Reports.* 10: 461-466, 1991.
- UNANDER, D.W.; WEBSTER, G.L.; BLUMBERG, B.S. Records of usage or assays in *Phyllanthus* (Euphorbiaceae) I. Subgenera *Isocladus*, *Kirganelia*, *Cicca* and *Emblica*. *J. Ethnopharmacol.* 30: 233-264, 1990.
- UNANDER, D.W.; WEBSTER, G.L.; BLUMBERG, B.S. Usage and bioassays in *Phyllanthus* (Euphorbiaceae): A compilation III. The subgenera *ericoccus*, *conami*, *gonphidium*, *botryanthys*, *xylophylla* and *phyllanthodendron*, and a complete list of the species cited in the three-part series. *J. Ethnopharmacol.* 36: 103-112, 1992.

- UNANDER, D.W.; WEBSTER, G.L.; BLUMBERG, B.S. Uses and bioassays in *Phyllanthus* (euphorbiaceae). IV. Clustering of antiviral uses and other effects. *J. Ethnopharmacol.* 45: 1-18, 1995.
- USHIKUBI, F.; Hirata, M.; Narumiya, S. Molecular biology of prostanoid receptors; an overview. *J. Lipid Mediators Cell Signaling.* 12: 343-359, 1995.
- VAN GRONDELLE, A.; WORTHEN, G.S.; ELLIS, D.; MATHIAS, M.M.; MURPHY, C.; STRIFE, R.J.; REEVES, J.T.; VOELKEL, N.F. Altering hydrodynamic variables influences PGI₂ production by Isolated lungs and endothelial cells. *J. Appl. Physiol.* 57: 388-395, 1984.
- VAN ROSUM, J.M. Cumulative dose-response curves. II. Tecnique for making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameters. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 143: 299-330, 1963.
- VANE, J.R.; MITCHELL, J.A.; APPLETON, I.; TOMLINSON, A.; BISHOP-BAILEY, D.; CROSTALL, J. AND WILLOUGHBY, D.A. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflamation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 2046-2050, 1994.
- VENKATESWARAN, P.S.; MILLMAN, I.; BLUMBERG, B.S. Effects of na extract from *Phyllanthus niruri* on hepatitis B and woodchuck hepatitisd viruses: In vivo and in vitro studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA).* 84: 274-278, 1987.
- WARD, S.M.; DALZIEL, H.H.; BRADLEY, M.E.; BUXTON, I.L.O.; KEEF, K.; WESTFALL, D.P.; SANDERS, K.M. involvement of cyclic GMP in non-

adrenergic, non-cholinergic inhibitory neurotransmission in dog proximal colon. *Br. J. Pharmacol.* 107: 1075-1082, 1992.

WEBSTER, G.L. The genera of Euphorbiaceae in the southeastern United States. *J. Arnold Arboretum* 48: 303-361; 363-430, 1967.

WOOD, J.N.; WINTER, J.; JAMES, I.F.; RANG, H.P.; YEATS, J.; BEVAN, S. Capsaicin-induced ion fluxes in dorsal root ganglion cells in culture. *J. Neurosci.* 8: 3208-3220, 1988.

YAO, Q.Q.; ZUO, C.X. Chemical studies on the constituents of *Phyllanthus urinaria* L. *Yao-Hsueh-Hsueh, Pao.* 28: 829-835, 1993.

YEATS, J.C.; BODDEKE, H.W.G.M.; DOCHERTY, R.J. Capsaicin desensitization in rat dorsal root ganglion neurones is due to activation of calcineurin. *Br. J. Pharmacol.* 105: 238P, 1992.