

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Estudo do mecanismo de ação antinociceptiva de uliginosina B**

**Eveline Dischkaln Stolz**

**Porto Alegre, 2014**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Estudo do mecanismo de ação antinociceptiva da uliginosina B**

Tese apresentada por **Eveline Dischkaln Stolz**  
para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em  
Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof. Dr. Stela Maris Kuze Rates

Porto Alegre, 2014

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovado em 18.12.2014, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Ana Luisa Palhares de Miranda

Universidade de Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Carla Denise Bonan

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Elfrides Eva Scherman Schapoval

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Patrícia Pereira

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Stolz, Eveline Dischkaln

Estudo do mecanismo de ação antinociceptiva de uliginosina B / Eveline Dischkaln Stolz. -- 2014. 167 f.

Orientadora: Stela Maris Kuze Rates.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Uliginosina B. 2. Hypericum. 3. Antinocicepção. 4. Dor. 5. Floroglucinol dimérico. I. Rates, Stela Maris Kuze, orient. II. Título.

Este estudo foi realizado no Laboratório de Psicofarmacologia Experimental da Faculdade de Farmácia da UFRGS, onde foram executados todos os experimentos comportamentais e contou com a colaboração de diferentes grupos de pesquisa. O isolamento da uliginosina B foi realizado no Laboratório de Farmacognosia desta instituição sob supervisão da Prof. Dr. Gilsane Lino von Poser. Os ensaios enzimáticos *ex vivo* foram realizados sob supervisão da Prof. Dr. Ana Battastini e Prof. Dr. Iraci Torres no Departamento de Bioquímica da UFRGS. Os ensaios *in vitro* de atividade enzimática, foram realizados em parceria com o Prof. Dr. François Noel e Prof. Dr. Luis Quintas, no Laboratório de Farmacologia Bioquímica e Molecular da Universidade Federal do Rio de Janeiro. O autor recebeu bolsa de estudos do CAPES.



## **AGRADECIMENTOS**

A minha orientadora Prof. Dr. Stela Rates por ter me acolhido em seu laboratório e ter ensinado/transmitido o aspecto fundamental da pesquisa, a ética.

À Prof. Dr. Gilsane von Poser por ter despendido tempo em uma co-orientação informal e ter disponibilizado material e apoio fundamentais para o isolamento da uliginosina B.

Ao Prof. Dr. François Noël pelas incansáveis seções de debate via email e Skype, que tornaram possível o estudo da análise isobolar.

Aos professores Dr. Luis Quintas, Dr. Iraci Torres e Dr. Ana Batastini pelas colaborações e ensinamentos.

As colegas do Laboratório de Psicofarmacologia Experimental pela amizade, apoio e companheirismo. Em especial, a Camila Boque Antônio e Liz Girardi Müller que contribuíram para a realização deste estudo, bem como as ICs Paola da Costa, Carolina Siqueira e Caroline Magalhães.

Aos colegas do Laboratório de Farmacognosia pela amizade e inúmeras seções de terapia grupal. Agradeço especialmente ao Dr. Francisco Barros (Maikon) e aos MSc Gari Vidal Ccana-Ccpatinta pelo auxílio e ensinamentos na parte fitoquímica.

As Dr. Liciane Medeiros e Dr. Andressa Souza pelo auxílio nos experimentos de atividade enzimática com sinaptossomas.

A minha linda e amada família pelo apoio e amor incondicionais.

Aos meus pais, que nunca mediram esforços para proporcionar o melhor para minha vida. Muito obrigada pela educação, amor, carinho, dedicação e pelas lições de vida, fundamentais para minha formação. A vocês dedico tudo que conquistei.

Ao meu marido, pelo apoio incondicional, amor, paciência, confiança, lealdade e principalmente pelo incentivo na busca pelos meus sonhos e por sonhar comigo. Obrigada por fazer parte da minha vida.

Ao meu mano Vini pela extrema prontidão em ajudar no que for preciso para realizar meus objetivos.

Aos demais familiares e amigos que muitas vezes sem compreender o motivo das minhas ausências sempre me apoiaram e incentivaram.

Aos membros da banca por aceitarem o convite de colaborar com este estudo.

Aos professores e funcionários do PPG Ciências Farmacêuticas da UFRGS, pela formação proporcionada.

À CAPES, pela bolsa concedida durante a realização do doutorado.



## RESUMO

### Estudo do mecanismo de ação antinociceptiva de uliginosina B

Uliginosina B é um derivado acilfloroglucinol natural, isolado de espécies de *Hypericum* nativas da América do Sul. Estudos prévios demonstraram que a uliginosina B apresenta efeitos do tipo antidepressivo e antinociceptivo em baixas doses (até 15 mg/kg, i.p. ou v.o.) e, em doses elevadas (90 mg/kg, i.p.), prejudica a coordenação motora. A atividade antidepressiva depende da ativação da neurotransmissão monoaminérgica e envolve a regulação da homeostase através do balanço de Na<sup>+</sup>. A atividade antinociceptiva é mediada por receptores opioides e dopaminérgicos da família D<sub>2</sub>. O efeito atáxico depende da ativação de receptores opioides e dopaminérgicos. Os efeitos parecem ser decorrentes da sua capacidade de inibir a recaptação de monoaminas (especialmente dopamina) com consequente ativação de receptores opioides e monoaminérgicos. O objetivo deste estudo foi aprofundar o conhecimento sobre o mecanismo de ação antinociceptiva de uliginosina B, investigando o envolvimento da neurotransmissão monoaminérgica, glutamatérgica e purinérgica. O tratamento com uliginosina B aumentou a disponibilidade intersticial de dopamina e seu metabólito, ácido homovanílico (HVA), no estriado de ratos; dados que reforçam o papel da neurotransmissão dopaminérgica nos efeitos da uliginosina B. O papel das outras monoaminas e da neurotransmissão glutamatérgica foi investigado nos efeitos antinociceptivo e atáxico induzidos por uliginosina B. A ataxia (90 mg/kg, i.p.) foi completamente prevenida pelo tratamento prévio com pCPA (inibidor da síntese de serotonina) e MK-801 (antagonista do receptor glutamatérgico NMDA), mas não foi afetada pelo pré-tratamento com prazosina ou ioimbina (antagonistas de receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ , respectivamente). A atividade antinociceptiva (15 e 90 mg/kg, i.p.) foi reduzida significativamente pelo pré-tratamento com pCPA e MK-801 e aumentada pelo pré-tratamento com prazosina e ioimbina, apenas na dose mais elevada (90 mg/kg, i.p.). A importância da neurotransmissão monoaminérgica para o efeito antinociceptivo da uliginosina B foi confirmada através da análise isobolar. A associação de uliginosina B com amitriptilina (inibidor da recaptação de monoaminas) ou clonidina (agonista

adrenérgico  $\alpha_2$ ) apresentou interação aditiva – dados sugestivos de substâncias com mecanismos de ação mediados pelas mesmas vias – enquanto a associação com morfina (agonista opioide) apresentou interação sinérgica – dados indicativos de um possível uso clínico, como adjuvante opioide na farmacoterapia da dor. O efeito antinociceptivo de uliginosina B (15 mg/kg, i.p.) também foi prevenido pelo tratamento prévio com DPCPX e ZM-241385 (antagonistas de receptores adenosinérgicos  $A_1$  e  $A_{2A}$ , respectivamente). Este efeito está relacionado, pelo menos em parte, com a capacidade da uliginosina B aumentar a hidrólise de AMP na medula espinhal e de ATP no córtex cerebral. A uliginosina B também inibiu *in vitro* a atividade da enzima  $Na^+,K^+$ -ATPase (isoformas  $\alpha_1$  e  $\alpha_3$ ). O conjunto de dados apresentados nesta tese evidencia a uliginosina B como um padrão estrutural multirreceptor promissor no desenvolvimento de fármacos com ação analgésica. Em suma, os efeitos antinociceptivo e atáxico induzidos pelo tratamento com uliginosina B são mediados pela ativação da neurotransmissão monoaminérgica, glutamatérgica, purinérgica e opioide, requisitadas com diferente grau de importância; e ainda envolvem o balanço iônico da  $Na^+,K^+$ -ATPase.

Palavras-chave: adenosina; ATP; derivado acilfloroglucinol; dor; glutamato; *Hypericum*; monoaminas;  $Na^+,K^+$ -ATPase; uliginosina B.

## ABSTRACT

Study of the antinociceptive mechanism of action of uliginosin B

Uliginosin B is a natural acylphloroglucinol derivative obtained from *Hypericum* species native to South America. Previous studies have shown that uliginosin B presents antidepressant-like and antinociceptive effects at low doses (up to 15 mg/kg, i.p. or p.o.), and at high doses (90 mg/kg, i.p.) it impairs the motor coordination. The antidepressant-like activity seems to depend on the activation of monoaminergic neurotransmission and ionic balance of Na<sup>+</sup>. The antinociceptive effect is mediated by opioid and D<sub>2</sub> dopamine receptors. The ataxic effect involves opioid and dopaminergic receptors activation. The uliginosin B effects appear to be a consequence of their ability to inhibit reuptake of monoamines (especially dopamine) with subsequent activation of opioid and monoaminergic receptors. The aim of this study was to deepen our knowledge about the mechanism of antinociceptive action of uliginosin B, investigating the involvement of monoaminergic, glutamatergic and purinergic neurotransmissions. Treatment with uliginosin B increased the interstitial availability of dopamine and its metabolite, homovanillic acid (HVA), in the striatum of rats; these data underscore the role of dopaminergic neurotransmission in the effects of uliginosin B. The role of other monoamines as well as the glutamatergic neurotransmission, were investigated in the antinociceptive and ataxic effects induced by uliginosin B. The ataxic effect (90 mg/kg, i.p.) was completely prevented by pre-treatment with pCPA (a serotonin synthesis inhibitor) and MK-801 (a NMDA glutamatergic receptor antagonist), but was not affected by pretreatment with prazosin or yohimbine ( $\alpha_1$  and  $\alpha_2$  adrenoceptor antagonists, respectively). The antinociceptive activity (15 and 90 mg/kg, i.p.) was significantly reduced by pretreatment with pCPA and MK-801 and increased by pretreatment with yohimbine and prazosin only at the highest dose (90 mg/kg, i.p.). The importance of monoaminergic neurotransmission for the uliginosin B antinociceptive effect was confirmed by isobolar analysis. The association between uliginosin B with amitriptyline (monoamine reuptake inhibitor) or clonidine ( $\alpha_2$  adrenergic agonist) showed additive interaction - findings suggestive of substances with mechanisms of

action mediated by the same pathways - while the association with morphine (opioid agonist) showed synergistic interaction - indicative of a possible clinical use as adjuvant to opioid pharmacotherapy of pain relief. The antinociceptive effect of uliginosin B (15 mg/kg, i.p.) was also prevented by pretreatment with DPCPX and ZM-241385 ( $A_1$  and  $A_{2A}$  adenosinergic receptor antagonists, respectively). This effect is related, at least in part, to its ability of increases the AMP and ATP hydrolysis in the spinal cord and cerebral cortex synaptosomes, respectively. Moreover, uliginosin B inhibited the  $Na^+,K^+$ -ATPase activity ( $\alpha 1$  and  $\alpha 3$  isoforms) *in vitro*. The data set presented in this thesis pointed uliginosin B as a promising multireceptor molecular pattern in the analgesic drug development. In summary, the antinociceptive and ataxic effects induced by uliginosin B were mediated by the activation of monoaminergic, glutamatergic, purinérgico and opioid neurotransmission and involves the ionic balance, required with different degree of importance.

Keywords: acylphloroglucinol derivative; adenosine; ATP; glutamate; *Hypericum*; monoamines;  $Na^+,K^+$ -ATPase; pain; uliginosin B.

## LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO	20
Figura 1. Uliginosina B com núcleo benzopirano incorporado.....	
CAPÍTULO I	52
Figura 1. Esquema do procedimento cirúrgico.....	
Figura 2. Esquema do procedimento de microdiálise cerebral.....	53
Figura 3. Cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector eletroquímico.....	58
Figura 4. Curvas padrão para os neurotransmissores e seus metabólitos.....	59
Figura 5. Efeito do tratamento com uliginosina B 30 mg/kg, i.p. ou veículo sobre os níveis extracelulares de DA, seus metabólitos e 5-HIAA no estriado de ratos.....	64
Figura 6. Fatia de encéfalo de rato Wistar mostrando a cicatriz deixada pela guia de sonda no estriado.....	66
Figura 7. Esquema do metabolismo da dopamina.....	68
CAPÍTULO II	
Figure 1. Effect produced by pretreatment with pCPA 24 h before treatment with uliginosin B in the hot-plate and rotarod.....	86
Figure 2. Effect produced by pretreatment with prazosin 15 min before treatment with uliginosin B in the hot-plate and rotarod.....	88
Figure 3. Effect produced by pretreatment with yohimbine 30 min before treatment with uliginosin B in the hot-plate and rotarod.....	89
Figure 4. Effect produced by pretreatment with MK-801 30 min before treatment with uliginosin B in the hot-plate and rotarod .....	90
CAPÍTULO III	100
Figure 1. Uliginosin B structure.....	
Figure 2. Analysis of morphine/uliginosin B interaction.....	101
Figure 3. Analysis of amitriptyline/uliginosin B interaction.....	101
Figure 4. Analysis of clonidine/uliginosin B interaction.....	102
CAPÍTULO IV	111
Figure 1. Uliginosin B structure.....	
Figure 2. Effect produced by pretreatment with DPCPX or ZM-241385 15 min before treatment with uliginosin B in the hot-plate test.....	116
Figure 3. ATP, ADP, and AMP hydrolysis in synaptosomes from spinal cord and cerebral cortex of mice treated with uliginosin B....	117
Figure 4. Uliginosin B inhibition of Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase activity from rat	

kidney and brain hemisphere preparations..... 118

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Figura 1. Esquema demonstrado os compostos isolados de espécies de *Hypericum* sul-americanas que apresentam efeitos antinociceptivo e antidepressivo..... 130

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

Tabela 1. Desvios e erros padrões relativos intradia e interdia das amostras de controle de qualidade e limite de quantificação inferior para a curva padrão dos analitos em LCA.....	60
Tabela 2. Taxa de recuperação das sondas de microdiálise.....	66

### CAPÍTULO III

Table 1. Effective doses for the antinociceptive effect of uliginosin B, morphine, amitriptyline and clonidine alone and in combination in the hot-plate test.....	102
Table 2. Effect of uliginosin B, morphine, amitriptyline and clonidine, alone and in combination, on the number of falls and permanence time in the rotarod test.....	102





## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	177
OBJETIVOS .....	23
REVISÃO DE LITERATURA .....	27
Definições e conceitos gerais.....	28
Transmissão e modulação do estímulo nociceptivo.....	29
Tratamentos para dor e perspectivas.....	33
Espécies vegetais e seus constituintes como agentes terapêuticos no tratamento da dor.....	36
CAPÍTULO I: Estudo do efeito da uliginosina B sobre os níveis de monoaminas e seus metabolitos em estriado de ratos conscientes .....	41
Introdução .....	43
Revisão de literatura .....	45
<i>Aspectos anatômicos e neuroquímicos do estriado.....</i>	45
<i>Monoaminas na farmacologia da dor.....</i>	46
<i>A microdiálise encefálica como técnicas para detecção de monoaminas.....</i>	47
Materiais e Métodos.....	48
<i>Isolamento da uliginosina B.....</i>	48
<i>Animais.....</i>	50
<i>Determinação dos níveis de monoaminas em estriado .....</i>	50
Reagentes.....	50
Cirurgia.....	51
Microdiálise.....	52
Histoquímica.....	53
Análise dos dialisados.....	53

Taxa de recuperação das sondas de microdiálise.....	55
Análise estatística.....	56
Resultados.....	57
<i>Validação da metodologia analítica</i> .....	57
<i>Análise dos microdialisados</i> .....	64
Discussão .....	67
Referências .....	71
CAPÍTULO II: <i>Uliginosin B, a natural phloroglucinol derivative, presents a multi-mediated antinociceptive effect in mice</i> .....	79
CAPÍTULO III: <i>Determination of pharmacological interactions of uliginosin B, a natural phloroglucinol derivative, with amitriptyline, clonidine and morphine by isobolographic analysis</i> .....	95
CAPÍTULO IV: <i>Uliginosin B, a natural antinociceptive agent, modulates the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity and present effect mediated by purinergic system</i> .....	105
Abstract.....	110
Introduction.....	111
Material and methods.....	113
Results.....	116
Discussion.....	118
Acknowledgment.....	121
References.....	121
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	127
REFERÊNCIAS .....	137
ANEXOS.....	159

# **INTRODUÇÃO**



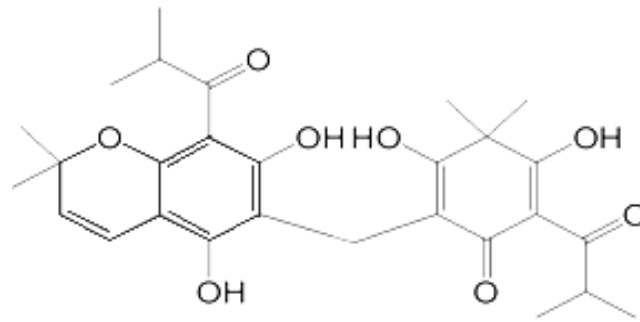
O gênero *Hypericum* despertou interesse a partir de estudos com *H. perforatum*, espécie nativa da Europa, utilizada na clínica para o tratamento de depressão leve à moderada. Esta atividade é atribuída à presença de flavonoides, naftodiantronas (hipericina e pseudo-hipericina) e derivados monoméricos de floroglucinol (hiperforina e ad-hiperforina) (Linde, Berner e Kriston, 2008; Linde, 2009; Nahrstedt e Butterweck, 2010). Estudos pré-clínicos também demonstram efeito antinociceptivo para o extrato de *H. perforatum* e seus principais constituintes (Galeotti *et al.*, 2010a; 2010b; 2013a; 2013b; 2013c; 2014a; 2014b).

Espécies de *Hypericum*, nativas da América do Sul, também apresentam efeitos do tipo antidepressivo e antinociceptivo em roedores (Viana, 2002; Viana *et al.*, 2003; Viana *et al.*, 2005; Viana *et al.*, 2006; von Poser, Rech e Rates, 2006; Viana, 2007; Stolz, 2011; Stein, 2012; Stein *et al.*, 2012; Stolz *et al.*, 2012). *H. polyanthemum* e seu principal derivado acilfloroglucinol, uliginosina B, são objetos de depósito de patente para o uso como antidepressivo e em outras doenças que envolvam disfunções dopaminérgicas (Rates *et al.*, 2010). O tratamento agudo (2000 mg/kg, v.o.) ou por 28 dias (90 mg/kg, v.o. – dose ativa em ensaios pré-clínicos de atividade antinociceptiva e antidepressiva) com extrato de *H. polyanthemum* não induziu indícios de toxicidade em roedores (Betti *et al.*, 2012).

As espécies de *Hypericum* sul-americanas e europeias são filogeneticamente distintas; *H. perforatum* pertence à seção *Hypericum*, enquanto as espécies da América do Sul pertencem às seções *Brathys* e *Trigynobrathys* (Crockett e Robson, 2011). A principal diferença entre as espécies europeias e americanas envolvem o acúmulo de naftodiantronas produzidas nas glândulas negras, presentes em *H. perforatum* e ausentes nas espécies sul-americanas (Ferraz *et al.*, 2002). As espécies de *Hypericum*, nativas da América do Sul, tendem a acumular compostos fenólicos com o núcleo benzopirano na forma de monômeros ou incorporado em outras estruturas, como xantonas, benzofenonas e derivados acilfloroglucinol diméricos (Ferraz *et al.*, 2002; Nor *et al.*, 2004; von Poser, Rech e Rates, 2006; Nor *et al.*, 2008; Barros *et al.*, 2011; Ccana-Ccapatinta *et al.*, 2013). Nosso grupo tem demonstrado que derivados acilfloroglucinol diméricos e monômeros de benzopirano apresentam atividade no sistema nervoso central e representam um padrão molecular promissor para o desenvolvimento de fármacos com ação antidepressiva

e analgésica (Viana *et al.*, 2005; Viana *et al.*, 2006; Viana, 2007; Haas *et al.*, 2010; Stolz, 2011; Stein, 2012; Stein *et al.*, 2012; Stolz *et al.*, 2012).

A uliginosina B (Fig. 1) é um derivado acilfloroglucinol dimérico descrito em 19 espécies de *Hypericum* sul-americanas (Ferraz *et al.*, 2002; Nor *et al.*, 2004; Nor *et al.*, 2008; Barros *et al.*, 2013; Ccana-Ccapatinta *et al.*, 2013).



**Figura 1. Uliginosina B com núcleo benzopirano incorporado (cinza escuro).**

Estudos pré-clínicos demonstraram que a uliginosina B apresenta efeito do tipo antidepressivo, prevenido pelo pré-tratamento com antagonistas de receptores dopaminérgicos ( $D_{1/3/5}$  e  $D_{2/4}$ ) e noradrenérgicos ( $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ ), bem como por um inibidor da síntese de serotonina. No entanto, ensaios de radioligação mostraram que a uliginosina B não ativa a proteína G acoplada aos receptores monoaminérgicos, indicando que o efeito observado não se deve a uma ligação direta da uliginosina B a estes receptores (Viana, 2007). O efeito observado parece ser consequência da do aumento na disponibilidade de monoaminas na fenda sináptica (dopamina > serotonina > noradrenalina). Sabe-se que a inibição da recaptção realizada pela uliginosina B envolve um mecanismo distinto dos antidepressivos convencionais, uma vez que a uliginosina B não se liga no sítio monoaminérgico dos transportadores responsáveis pela recaptção destes neurotransmissores (Stein *et al.*, 2012). A importância da neurotransmissão monoaminérgica para o efeito do tipo antidepressivo descrito para a uliginosina B foi confirmada em um estudo de associação com antidepressivos que apresentam mecanismos de ação distintos, onde as combinações de doses não efetivas produziram efeito do tipo antidepressivo (Stein *et al.*, 2012). Resultados prévios indicam ainda que a uliginosina B altera o

gradiente iônico de sódio, podendo contribuir para o efeito monoaminérgico (Stein, 2012).

A uliginosina B também apresenta efeito antinociceptivo em doses que não alteram a coordenação motora dos camundongos. Porém, em doses elevadas foi observado prejuízo motor (efeito atáxico). O efeito antinociceptivo depende da ativação de receptores opioides e dopaminérgicos da família D<sub>2</sub>, enquanto o efeito atáxico é mediado tanto por receptores opioides como por receptores dopaminérgicos das famílias D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>. Ensaios de radioligação demonstram que a uliginosina B não liga, nem ativa receptores opioides e dopaminérgicos (Viana, 2007; Stolz, 2011; Stolz *et al.*, 2012), o que permite supor que os efeitos descritos para a uliginosina B estão associados à inibição da recaptação de dopamina, conforme descrito por Stein e colaboradores (2012), com consequente ativação de receptores dopaminérgicos e estimulação indireta do sistema opioide, através de vias como o circuito dependência/recompensa (Stolz *et al.*, 2012).





## **OBJETIVOS**



## **Objetivo geral**

O objetivo deste trabalho foi aprofundar o conhecimento sobre o mecanismo de ação antinociceptiva da uliginosina B frente a neurotransmissão monoaminérgica, glutamatérgica e purinérgica.

## **Objetivos específicos**

- investigar o efeito da uliginosina B sobre os níveis extracelulares de dopamina e metabólitos em estriado de ratos conscientes, através de ensaio de microdiálise cerebral;
- avaliar o envolvimento das vias serotoninérgicas, noradrenérgicas e glutamatérgicas no efeito antinociceptivo e atáxico da uliginosina B, utilizando manipulação farmacológica destes sistemas neurotransmissores;
- avaliar, através da análise isobolar, o tipo de interação que ocorre entre uliginosina B e morfina, amitriptilina e clonidina – fármacos utilizados no tratamento da dor na clínica;
- investigar o envolvimento das vias purinérgicas no efeito antinociceptivo da uliginosina B, bem como, avaliar seu efeito sobre a atividade das enzimas Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase, nucleosídeo trifosfato difosfoidrolases (NTPDases) e ecto-5'-nucleotidase;

Cada um dos quatro itens acima foi abordado em um dos capítulos que integra esta tese.



# **REVISÃO DE LITERATURA**



## **Definições e conceitos gerais**

A dor é conceituada pela Associação Internacional de Estudos da Dor (*International Association for the Study of Pain – IASP*) como uma “experiência sensorial e emocional desagradável, associada a lesões reais ou potenciais ou descrita em termos de tais lesões”. Este conceito abrange a natureza multifatorial da dor. Seu propósito inicial é alertar sobre estímulos potenciais ou eminentes que levam à lesão tecidual, permitindo adoção de mecanismos de defesa ou fuga (Millan, 1999; Fishman, Ballantyne e Rathmell, 2009).

A resposta dolorosa apresenta dois componentes essenciais, o emocional e à sensação dolorosa (nocicepção). O componente emocional é subjetivo; corresponde à interpretação afetiva da dor, tem caráter individual e é influenciado por estados ou traços psicológicos, experiências prévias e outros fatores, como sociais, culturais e ambientais (Millan, 1999; Fishman, Ballantyne e Rathmell, 2009). A nocicepção (do latim *noci* significa dano, lesão) é a manifestação fisiológica e neuroquímica gerada pelo estímulo nocivo através da ativação de fibras aferentes primárias. Compreende a transmissão e processamento da informação dolorosa (Millan, 1999). Nos modelos animais, a dor é avaliada de forma indireta, através de respostas comportamentais, mensura-se a nocicepção (Millan, 1999; Fishman, Ballantyne e Rathmell, 2009).

## **Transmissão e modulação do estímulo nociceptivo**

A circuitaria envolvida no processo de transmissão e modulação das vias nociceptivas, envolve inúmeras substâncias mediadoras ao longo do sítio de lesão, medula espinhal e sistema nervoso central, bem como vias distintas, o que torna o

fenômeno bastante complexo. A literatura apresenta boas revisões deste processo (Millan, 1999; 2002; Bear, 2008; Fishman, Ballantyne e Rathmell, 2009; Purves, 2010).

A informação nociceptiva é iniciada pela ativação de terminações nervosas livres, denominadas nociceptores. Estas terminações estão amplamente distribuídas no corpo, incluindo pele, músculo, vísceras e articulações (Bear, 2008; Fishman, Ballantyne e Rathmell, 2009; Purves, 2010). As fibras podem ser sensibilizadas por estímulos exógenos (mecânico, químico, físico, biológico) ou endógenos (inflamação, isquemia encefálica, outros). Estas levam à despolarização da membrana neuronal, provocam abertura dos canais iônicos de sódio e cálcio e redução do influxo de potássio e cloro para o meio intracelular. A informação nociceptiva é conduzida por vias sensoriais aferentes ao nível talâmico sendo processada em regiões encefálicas (Ferreira e Torres, 2004; Fishman, Ballantyne e Rathmell, 2009). As fibras nociceptivas aferentes primárias liberam mediadores químicos (como neurotransmissores e neuropeptídeos – glutamato e adenosina, por exemplo) para comunicar-se com neurônios secundários, que compõem as vias nociceptivas ascendentes (Millan, 1999; Almeida, Roizenblatt e Tufik, 2004; Fishman, Ballantyne e Rathmell, 2009).

A principal via ascendente de condução do impulso doloroso é o trato espinotalâmico. As fibras aferentes primárias da lâmina I, II e V do corno dorsal se projetam para o lado contralateral da medula espinhal ao nível da comissura anterior, ascendem à substância branca ântero-lateral e chegam ao tálamo. A via espinotalâmica a partir do tálamo é subdividida em neoespinotalâmica e paleoespinotalâmica. A via neoespinotalâmica apresenta poucas estações sinápticas. Ela projeta neurônios terciários do núcleo ventral póstero-lateral do



tálamo para o córtex somatossensorial, onde ocorre a percepção da dor; é responsável pelos aspectos sensoriais e discriminativos da dor, tais como percepção da qualidade da dor (ardor, queimação), intensidade, localização e duração (Almeida, Roizenblatt e Tufik, 2004; Bear, 2008). A via paleoespinotalâmica projeta neurônios difusamente do tálamo medial para o córtex e algumas fibras atingem o sistema límbico (hipotálamo, amígdala, globo pálido ventral, estriado lateral). Está relacionada ao componente afetivo-emocional da dor, responsável pelas respostas de fuga, alerta, emocional, neurovegetativo, somático e endócrino (Almeida, Roizenblatt e Tufik, 2004; Bear, 2008; Fishman, Ballantyne e Rathmell, 2009).

Há outras vias ascendentes de transmissão da informação nociceptiva: espinorreticular, espinomesencefálica, cervicotalâmica e espinohipotálâmica. A via espinorreticular é formada por neurônios das lâminas VII e VIII, que ascendem ao tálamo, sem cruzar obrigatoriamente a linha média, passando pela formação reticular bulbar e pontina. Envia projeções do tálamo para o córtex associativo e para o córtex somatossensorial. A via espinomesencefálica contribui com o aspecto emocional da dor. Neurônios das lâminas I e V cruzam a linha média até o funículo lateral dorsal com maior frequência do que o quadrante antero-lateral da medula espinhal. Envia projeções para a formação reticular mesencefálica, substância cinzenta periaquedutal e finalmente chegam à amígdala (principal componente do sistema límbico), através do trato espinoparabraquial. A via cervicotalâmica é constituída por neurônios do núcleo cervical lateral (substância branca lateral da medula) e recebe aferências das lâminas III e IV da medula espinhal. Ascendem: (1) pelo lemnisco medial do tronco encefálico para núcleos mesencefálico e talâmicos, ventro-posterior lateral e pósteromedial; (2) pela coluna dorsal para núcleos cuneiforme e grácil do bulbo. A via espino-hipotalâmica é formada por neurônios das

lâminas I, V e VIII da medula espinhal. Projetam-se a centros supra-espinhais de controle autonômico e ativam respostas endócrinas e cardiovasculares complexas (Almeida, Roizenblatt e Tufik, 2004; Fishman, Ballantyne e Rathmell, 2009).

Os circuitos modulatórios, denominados vias descendentes, regulam a transmissão nociceptiva principalmente no sistema nervoso central e na medula espinhal. De maneira geral, a substância cinzenta periaquedutal envia aferências excitatórias ao núcleo magno da rafe e ao núcleo reticular magnocelular, estes projetam eferências através do funículo dorsolateral e controlam o impulso nociceptivo na lâmina II do corno dorsal da medula espinhal, através de fibras serotoninérgicas e noradrenérgicas. As fibras A $\delta$  e C inibidas na camada gelatinosa da medula espinhal projetam-se a níveis supra-espinhais e, indiretamente, ao núcleo reticular gigantocelular e ativam este sistema de inibição descendente, formando uma alça de retroalimentação negativa (Basbaum e Fields, 1978; 1984; Fields e Basbaum, 1978; Willis e Westlund, 1997; Prado e Faganello, 2000; Millan, 2002; Fishman, Ballantyne e Rathmell, 2009).

O estímulo nociceptivo é modulado por substâncias como neurotransmissores e neuropeptídeos, que ativam interneurônios responsáveis por inibir o terminal pós-sináptico das fibras ascendentes, modulando a transmissão dolorosa (Basbaum e Fields, 1984; Millan, 2002; Fishman, Ballantyne e Rathmell, 2009). A adenosina e o ATP são alguns exemplos. Ambos podem desempenhar ação antinociceptiva na medula espinhal e encéfalo, interagindo principalmente com as vias inibitórias descendentes (Sawynok e Sweeney, 1989; Sollevi, 1997; Sawynok, 1998; Sawynok, Reid e Poon, 1998; Burnstock, 2001; Millan, 2002; Sawynok e Liu, 2003; Burnstock, 2006b; c; d; e). O ATP extracelular é a principal fonte de adenosina neste meio (Dunwiddie, Diao e Proctor, 1997; Haskó e Cronstein, 2004). Diversos estudos

demonstram que o ATP é coliberado com dopamina, serotonina, noradrenalina, glutamato, acetilcolina, GABA, glicina e uma série de outros mediadores pró e anti-inflamatórios tanto no sistema nervoso central como periférico, estas vias são responsáveis pela disponibilidade de ATP e conseqüentemente adenosina no meio extracelular e contribuem para a interação entre o sistema purinérgico e estes neurotransmissores (Sneddon e Burnstock, 1984; Sperlágh et al., 1998; Burnstock, 1999; Poelchen et al., 2001; Burnstock, 2004; 2006d; e; a; 2009; Kanno, Yaguchi e Nishizaki, 2010; Burnstock, Fredholm e Verkhatsky, 2011). Cunha (2001) revisa estudos demonstrando que a ativação de receptores  $A_1$  e  $A_{2A}$  esta associada a liberação de acetilcolina, noradrenalina, glutamato e serotonina em diferentes regiões encefálicas, bem como esta associada a presença de dopamina e serotonina.

### **Tratamentos para dor e perspectivas**

Os tratamentos disponíveis para dor incluem analgésicos opioides, não opioides (ex. anti-inflamatório não esteroide – AINE) e adjuvantes (ex. antidepressivos tricíclicos e anticonvulsivantes). A escolha do tratamento é baseada principalmente no quadro clínico do paciente.

Nos casos de dor aguda, ligeira à moderada, o agente farmacológico de escolha é o acetaminofeno (paracetamol), ácido acetilsalicílico ou um AINE. O tratamento depende basicamente do tipo de dor e dos fatores de risco do paciente, visto que AINES possuem importantes efeitos adversos, tais como gastrointestinais, renovascular e cardiovascular (Blondell, Azadfard e Wisniewski, 2013). Se esta

opção de tratamento for ineficaz ou insuficiente pode-se considerar o uso de combinações de acetaminofeno com opioides ou uso exclusivo de opioides (Wu e Raja, 2011; Blondell, Azadfard e Wisniewski, 2013). Nos quadros de dor aguda grave, utiliza-se opioides potentes como primeira escolha (Blondell, Azadfard e Wisniewski, 2013).

Na dor crônica, a escolha do tratamento adequado é um pouco mais complicada. Idealmente a dor crônica não oncológica é medicada com adjuvantes analgésicos (Chou *et al.*, 2009; Furlan *et al.*, 2010). Para a dor neuropática, por exemplo, existem estudos que consideram revisões sistemáticas, ensaios clínicos randomizados e diretrizes institucionais (Dworkin *et al.*, 2007; Moulin *et al.*, 2007). Estes recomendam tratamentos baseados na eficácia analgésica, segurança, facilidade de uso, experiência clínica dos autores e relação custo-benefício. Estes estudos sugerem o uso de antidepressivos tricíclicos (amitriptilina, imipramina, nortriptilina) e ligantes de canais de cálcio  $\alpha 2\text{-}\delta$  (gabapentina e pregabalina) como farmacoterapia de primeira escolha. Entre os principais efeitos adversos descritos estão os efeitos anticolinérgicos (confusão, hipotensão, boca seca, constipação, retenção urinária e arritmia) e sonolência relatados para os antidepressivos tricíclicos e sonolência, tontura, edema periférico e visão turva para os ligantes de canais de cálcio. Como agentes alternativos são indicados lidocaína tópica e inibidores da recaptção de serotonina e noradrenalina (venlafaxina, duloxetina), seguidos por analgésicos opioides (morfina e tramadol), e como última escolha canabinoides, outros opioides (metadona), anticonvulsivantes (lamotrigina, topiramato e ácido valproico), outros antidepressivos e antagonistas dos receptores *N*-metil-D-aspartato (NMDA). Os efeitos adversos para estes fármacos foram sumarizados por Moulin e colaboradores (2007).

Contudo, na clínica, casos de dor crônica, associados ou não ao câncer, são tratados com terapia opioide (Trescot *et al.*, 2008; Chou *et al.*, 2009; Noble *et al.*, 2010; Lee, Wanigasekera e Tracey, 2013). Há consenso geral entre os médicos que os opioides são benéficos na gestão da dor persistente, inclusive a não oncológica, embora neste caso prevaleça a escassez de comprovação científica (Chou *et al.*, 2009; The British Pain Society, 2010; Kahan, Mailis-Gagnon e Tunks, 2011; Kahan, Mailis-Gagnon, *et al.*, 2011; Kahan, Wilson, *et al.*, 2011; Dahan *et al.*, 2013).

Seguramente, entre todos os tratamentos disponíveis, os opioides são os mais utilizados e os que apresentam maior diversidade e incidência de efeitos adversos. Estimativas apontam que 80% dos pacientes apresentam pelo menos um efeito adverso (The British Pain Society, 2010). Uma revisão sistemática e meta-análise baseada em 35 estudos clínicos apontou que os efeitos adversos mais frequentes no uso de qualquer opioide oral são boca seca em 25% dos pacientes, náusea em 21% e prisão de ventre em 15%, provocando uma taxa de 22% de abandono do tratamento (Moore e Mcquay, 2005). Outros efeitos incluem sonolência, prurido, tonturas e vômitos no início do tratamento, sendo que o prurido e a constipação tendem a persistir. Entre os efeitos adversos mais graves estão a depressão respiratória, tolerância e dependência, comuns em casos de dor persistente e uso contínuo (The British Pain Society, 2010). Talvez a maior preocupação no uso de opioides é referente às taxas crescentes de mortalidade por overdose, relatados em diversos países, incluindo Estados Unidos e Canadá (Okie, 2010; Kahan, Mailis-Gagnon e Tunks, 2011; Kahan, Mailis-Gagnon, *et al.*, 2011; Kahan, Wilson, *et al.*, 2011; Dahan *et al.*, 2013).

Somado a este contexto que aponta alta incidência de efeitos adversos para todos os tratamentos de quadros dolorosos, dados da literatura mostram que pelo

menos 30% dos pacientes com dor moderada à severa relatam alívio inadequado da dor, ou seja, sofrem de dor diariamente, muitas vezes por um período superior a cinco anos, mesmo usando analgésicos cotidianamente (Roper *et al.*, 1999; Fundação e Grünenthal, 2008). Assim, pode-se inferir que o maior desafio no tratamento da dor parece ser o desenvolvimento de terapias com maior eficácia, tolerabilidade e segurança, associadas a um índice reduzido de efeitos adversos.

Nas últimas três décadas foram introduzidos 17 novos analgésicos (Cragg *et al.*, 2012; Newman e Cragg, 2012), sendo 3 destes desenvolvidos a partir de produtos naturais. Contudo, o tratamento continua dependente de modalidades terapêuticas que apresentam eficácia limitada e/ou efeitos adversos importantes. Na ausência de novas terapias, uma alternativa frequentemente adotada para melhorar a eficácia e/ou reduzir efeitos adversos é combinar agentes analgésicos com mecanismos de ação distintos em condições dolorosas complexas (Smith, H. S., 2008; Smith, M. T., 2008; Miranda *et al.*, 2013). A administração simultânea de duas ou mais substâncias para a mesma finalidade é comum em ambientes clínicos. Entretanto, o benefício resultante de tal combinação é incerto; em tese, as chances de ampliar o efeito farmacológico são as mesmas de ampliar os efeitos adversos, toxicológicos e a letalidade, o que dificulta esta prática, mas incentiva o desenvolvimento de estudos pré-clínicos (Tallarida, 2001).

### **Espécies vegetais e seus constituintes como agentes terapêuticos no tratamento da dor**

Na busca por novos agentes terapêuticos é reconhecida a grande diversidade química oferecida pelos produtos naturais. Muitos exemplos de fármacos,

amplamente empregados na terapêutica, são obtidos de fontes naturais (Rates, 2001), especialmente analgésicos e anti-inflamatórios. O alcaloide morfina, um potente analgésico opioide, foi isolado de *Papaver somniferum* L.. O precursor do ácido acetilsalicílico (analgésico não-esteróide), a salicilina, foi isolado de *Salix alba*. A colchicina, isolada de *Colchicum autumnale* L., é amplamente utilizada no tratamento de processos inflamatórios e artrite gotosa (Brunton *et al.*, 2007). Recentemente, o uso de uma combinação de canabidiol e delta-9-tetra-hidrocanabidiol, obtidos de *Cannabis sativa*, foi liberada em alguns países, com a finalidade analgésica (Russo, 2008; Pharmaceuticals, 2014).

Espécies de *Hypericum* têm sido utilizadas na medicina popular para tratar condições dolorosas e inflamatórias (Noelli, 1996; Mentz, Lutzemberger e Schemkel, 1997; Arsić *et al.*, 2011; Dikmen *et al.*, 2011; Polat e Satil, 2012). Estudos pré-clínicos confirmam o uso descrito na medicina tradicional, para as espécies de *Hypericum*. Há um depósito de patente para o uso de *H. gentianoides* como anti-inflamatório (Hillwig e Ames, 2010). Outras espécies, tais como *H. brasiliense*, *H. calycinum*, *H. canariense*, *H. caprifoliatum*, *H. cordatum*, *H. empetrifolium*, *H. glandulosum*, *H. grandifolium*, *H. organifolium*, *H. perforatum*, *H. polyanthemum*, *H. reflexum* e *H. triquetifolium* apresentaram atividade antinociceptiva e/ou anti-inflamatória em ensaios pré-clínicos (Oztürk *et al.*, 1996; Apaydin *et al.*, 1999; Trovato *et al.*, 2001; Rieli Mendes, Mattei e De Araújo Carlini, 2002; Viana *et al.*, 2003; Bukhari, Dar e Khan, 2004; Rabanal *et al.*, 2005; Perazzo *et al.*, 2008; Bonkanka, Sánchez-Mateo e Rabanal, 2011; Yaşar *et al.*, 2013).

A atividade antinociceptiva para *H. perforatum* parece ser uma das mais bem investigadas, apresentando efeito no teste do reflexo de retirada da cauda, no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético, na placa aquecida e em

modelos de dor neuropática (Oztürk *et al.*, 1996; Gambarana *et al.*, 1999; Kumar, Singh e Bhattacharya, 2001; Bukhari, Dar e Khan, 2004; Abdel-Salam, 2005; Galeotti *et al.*, 2010a; 2010b; 2013a; 2013b; 2013c; 2014a, 2014b). Formulações contendo *H. perforatum* também têm sido testadas (Hatanaka *et al.*, 2011). Os dados disponíveis indicam que a ativação da via opioide parece ser importante para o efeito antinociceptivo, embora um estudo apresente resultados contrários (Subhan *et al.*, 2007; Uchida *et al.*, 2008; Galeotti *et al.*, 2010a). Além da atividade antinociceptiva também foi relatada atividade anti-inflamatória para *H. perforatum* (Tedeschi *et al.*, 2003; Abdel-Salam, 2005; Hammer *et al.*, 2007; 2008; 2010; Birt *et al.*, 2009; Hammer e Birt, 2014).

A hiperforina, um derivado acilfloroglucinol monomérico de *H. perforatum*, apresenta efeito antinociceptivo nos testes da placa aquecida e de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Este efeito parece depender da ativação do sistema opioide (Galeotti *et al.*, 2010a). Gobbi e Mennini (2001) mostraram, em ensaios *in vitro*, que a hiperforina e análogos não se ligam a receptores do tipo  $\sigma$  (Cervo *et al.*, 2005). Além disto, ensaios *in vitro* demonstraram que a hiperforina bloqueia canais de sódio e inibe receptores dependentes de ATP envolvidos na transdução do estímulo de dor (Krishtal *et al.*, 2001).

Sabe-se ainda que a hiperforina inibe a recaptação sinaptossomal de monoaminas, glutamato e ácido gama-aminobutírico (GABA) (Chatterjee *et al.*, 1998a; Chatterjee *et al.*, 1998b; Müller *et al.*, 1998; Chatterjee *et al.*, 1999; Wonnemann, Singer e Muller, 2000; Gobbi *et al.*, 2001) com eficácia semelhante (Müller, 2003). O mecanismo multirreceptor parece envolver mudanças adaptativas nos receptores (Beerhues, 2006), geradas pela ativação de canais iônicos não-seletivos (Marsh e Davies, 2002; Treiber *et al.*, 2005), os quais alteram as



concentrações intracelulares dos íons sódio, potássio e cálcio (Singer, Wonnemann e Muller, 1999; Fisunov *et al.*, 2000). Estas mudanças na homeostase afetam a sinalização via proteína G acoplada aos receptores metabotrópicos envolvidos no efeito antidepressivo da hiperforina e, possivelmente, através da ativação destas mesmas vias, modulam a transmissão nociceptiva (Feisst e Werz, 2004).

Atividade anti-inflamatória também foi relatada para a hiperforina (Schempp, Hezel e Simon, 2003; Hammer e Birt, 2014). Este acilfloroglucinol parece atuar modulando linfócitos T (Schempp *et al.*, 2000), cicloxigenase-1, lipoxigenase-5 (Albert *et al.*, 2002), interleucina-8 (Zhou *et al.*, 2004) e outros fatores pró-inflamatórios (Medina *et al.*, 2006). As atividades fotoprotetora e anti-inflamatória tópica de hiperforina parecem estar associadas a captação de radicais livres (Meinke *et al.*, 2012).

Espécies de *Hypericum* sul-americanas, bem como compostos isolados destas, apresentam atividade antinociceptiva em estudos pré-clínicos: *H. caprifoliatum*, *H. polyanthemum* e o benzopirano HP1 tem efeito dependente da ativação de vias opioides (Viana *et al.*, 2003; Haas *et al.*, 2010); hiperbrasilol B (derivado acilfloroglucinol dimérico) ainda não teve seu mecanismo de ação investigado (Sakamoto, 2012); uliginosina B (derivado acilfloroglucinol dimérico) tem efeito dependente da ativação de receptores opioides e dopaminérgicos da família D<sub>2</sub> (Stolz *et al.*, 2012). Além disto, tem um depósito de patente para uso em disfunções dopaminérgicas que envolvem o sistema nervoso central (Rates *et al.*, 2010).

O conjunto de evidências levantadas embasa e corrobora para a continuidade dos estudos envolvendo espécies de *Hypericum*, bem como seus compostos

isolados, como alternativas ou protótipos para o desenvolvimento de novos antidepressivos e analgésicos.

## **CAPÍTULO I**

**Estudo do efeito da uliginosina B sobre os níveis de  
dopamina e seus metabólitos em estriado de ratos  
conscientes**



## Introdução

A uliginosina B é um derivado acilfloroglucinol descrito em aproximadamente 20 espécies de *Hypericum* nativas da América do Sul (Ccana-Ccapatinta *et al.*, 2013), dentre elas *H. caprifoliatum*, que contém outros compostos estruturalmente relacionados, como hiperbrasilol B e japonicina A (Barros *et al.*, 2013). Estudos demonstraram que o extrato de *H. caprifoliatum* produz efeito do tipo antidepressivo e antinociceptivo em roedores (Viana *et al.*, 2003; Viana *et al.*, 2005; Viana *et al.*, 2006). O efeito do tipo antidepressivo depende, *in vivo*, da ativação de vias monoaminérgicas, especialmente dopaminérgica. Os efeitos atribuídos ao extrato de *H. caprifoliatum* parecem ser, pelo menos em parte, consequência do aumento da disponibilidade de monoaminas na fenda sináptica, demonstrado em ensaios *in vitro* (Viana *et al.*, 2005; Viana *et al.*, 2006).

Ensaio de microdiálise cerebral demonstraram que o tratamento com extrato de *H. caprifoliatum* 270 mg/kg, v.o. (dose ativa em modelos animais de nocicepção e preditivo de atividade antidepressiva) não altera (mas apresenta tendência em aumentar) os níveis extracelulares de dopamina, ácido 3,4-di-hidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA) no núcleo accumbens de ratos (Munari, 2006; Viana *et al.*, 2006). A partir do conjunto de dados apresentados para *H. caprifoliatum* uma série de hipóteses foram levantadas por Munari (2006): (i) o extrato poderia alterar os níveis extracelulares de dopamina em estruturas específicas, como estriado ou córtex pré-frontal; (ii) a dose administrada de extrato não foi capaz de atingir as concentrações mínimas efetivas para alterar os níveis de monoaminas, determinadas em ensaios *in vitro*; (iii) o extrato de *H. caprifoliatum* poderia atuar de

maneira semelhante ao descrito para a bupropiona (antidepressivo), que não altera os níveis monoaminérgicos extracelulares no tratamento agudo.

A uliginosina B, assim como o extrato de *H. caprifoliatum*, também reduz o tempo de imobilidade no teste da natação forçada e aumenta o tempo de latência no teste da placa aquecida, modelos animais preditivos de efeitos antidepressivo e analgésico, respectivamente (Stein *et al.*, 2012; Stolz *et al.*, 2012). O efeito antinociceptivo depende da ativação de vias opioides e dopaminérgicas e a atividade do tipo antidepressiva envolve a neurotransmissão monoaminérgica (Stein *et al.*, 2012; Stolz *et al.*, 2012). Entretanto, a uliginosina B não se liga a receptores opioides e monoaminérgicos (Viana, 2007; Stolz *et al.*, 2012), assim, seus efeitos têm sido atribuídos à inibição da recaptação sinaptossomal de monoaminas (com maior potência para dopamina > noradrenalina > serotonina), sem se ligar aos transportadores no sítio de ligação dos monoaminas (Stein *et al.*, 2012). No entanto, até o momento nenhum estudo investigou se este aumento ocorre *in vivo*.

Com base neste cenário, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do tratamento agudo com uliginosina B (30 mg/kg, i.p.) sobre o conteúdo extracelular de dopamina – o neurotransmissor que apresentou maior aumento de disponibilidade em ensaios *in vitro* (Stein *et al.*, 2012). Os níveis extracelulares de dopamina (DA) e seus metabólitos – ácido 3,4-di-hidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA) e 3-metoxitiramina (3-MT) – foram avaliados em estriado de ratos através da técnica de microdiálise cerebral em animais acordados. Os níveis extracelulares do ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), um metabólito da serotonina, também foram investigados, visto que o estriado também recebe projeções serotoninérgicas.

## Revisão de literatura

### *Aspectos anatômicos e neuroquímicos do estriado*

O estriado ou corpo estriado é uma região formada pelo globo pálido (ventral e dorsal) e pela cápsula interna (substância branca). A substância branca é dividida em núcleo caudado e putâmen. Por vezes é utilizado o termo núcleo lentiforme para se referir ao putâmen e globo pálido. A partir do final do século XX, a literatura passou a considerar a substância inominada, o núcleo accumbens e o tubérculo olfatório como parte do corpo estriado, denominando esta porção de estriado ventral e a porção que constitui o “antigo” estriado foi denominada estriado dorsal (Haines, 1997).

O estriado apresenta projeções serotoninérgicas e dopaminérgicas. O feixe serotoninérgico inicia no núcleo dorsal da Rafe e envia projeções para o estriado (caudado-putâmen e estriado ventral), enquanto o feixe dopaminérgico compreende a via nigro-estriatal (Sthal, 2008). Esta última está envolvida na modulação inibitória da nocicepção, juntamente com as vias mesocortical e mesolímbica (revisado por Millan, 2002).

Estudos têm demonstrado que a neurotransmissão serotoninérgica altera o *turnover* da dopamina e que o oposto também ocorre em diferentes regiões encefálicas, incluindo o estriado (Waldmeier e Delini-Stula, 1979; Agren *et al.*, 1986; Sivam, 1995; De Deurwaerdère, Stinus e Spampinato, 1998). Além disto, alguns autores têm proposto a quantificação destes neurotransmissores e, principalmente de seus metabólitos (especialmente HVA e 5-HIAA), em distúrbios psiquiátricos, esquizofrenia, depressão e agressividade. Entretanto, estas relações ainda não estão bem estabelecidas (Brown *et al.*, 1979; Banki, Molnar e Fekete, 1981; Banki, Molnar e Vojnik, 1981; Banki, Vojnik e Molnar, 1981; Geraciotti *et al.*, 1998).

### *Monoaminas na farmacologia da dor*

Millan (2002) revisa extensamente as vias envolvidas na modulação facilitatória e inibitória da transmissão nociceptiva e destaca o papel das vias monoaminérgicas, especialmente das vias inibitórias serotoninérgicas e noradrenérgicas, as mais bem investigadas e descritas na literatura clássica. Entretanto, o envolvimento da neurotransmissão dopaminérgica também tem sido proposto, sendo que parte destes achados envolve o estriado, sobretudo o ventral (Millan, 2002; Hagelberg *et al.*, 2004; Scott *et al.*, 2006; Wood, 2008; Barceló, Filippini e Pazo, 2012; Villemure, Laferrière e Bushnell, 2012; Zengin-Toktas *et al.*, 2013; Taylor *et al.*, 2014).

Evidências clínicas e estudos pré-clínicos demonstram a importância de vias monoaminérgicas na farmacoterapia da dor. A morfina, o principal analgésico disponível, apresenta mecanismo de ação opioide, contudo, trabalhos têm relatado que vias monoaminérgicas podem contribuir para o efeito (Bianchi *et al.*, 1985; Tao e Auerbach, 1994a; b). O mesmo ocorre com outros analgésicos, como tramadol e tapentadol (Giusti *et al.*, 1997; Bloms-Funke *et al.*, 2011; Afilalo e Morlion, 2013). Outros exemplos de fármacos utilizados na clínica para o tratamento de quadros dolorosos, sobretudo de dor neuropática, incluem os antidepressivos que exercem ação por inibir a recaptação de uma ou mais monoaminas (Brunton *et al.*, 2007; Sthal, 2008; Fishman, Ballantyne e Rathmell, 2009).

Estudos pré-clínicos também têm investigado moléculas ou combinações de substâncias com ação monoaminérgica em modelos animais de nocicepção. Um exemplo é o estudo de *Hypericum perforatum*; Galeotti e colaboradores (2010; 2010; 2013a; b; 2014) mostraram que o extrato de *H. perforatum* produz efeito antinociceptivo em roedores submetidos a modelos de dor central e periférica, bem como modelos de enxaqueca e neuropatia diabética. *H. perforatum* é um fitomedicamento utilizado no tratamento de depressão leve a moderada que inibe a recaptação de monoaminas e outros neurotransmissores (dados revisados por Linde e colaboradores 2008; 2009; Russo *et al.*, 2014). As alterações nos níveis de monoaminas, especialmente dopamina, foram evidenciadas em estudos de microdiálise cerebral, realizados em diferentes estruturas (Di Matteo *et al.*, 2000;



Rommelspacher, Siemanowitz e Mannel, 2001; Yoshitake *et al.*, 2004). Estudos conduzidos com seu principal derivado floroglucinol, hiperforina, indicam o mecanismo de ação monoaminérgico semelhante ao descrito para *H. perforatum* (Linde, 2009).

#### *A microdiálise encefálica como técnicas para detecção de monoaminas*

A técnica de microdiálise é utilizada há cerca de 50 anos (Englander e Crowe, 1965; Delgado *et al.*, 1972; Ungerstedt e Pycock, 1974). Esta técnica pode ser aplicada em qualquer tecido que possibilite a implantação cirúrgica de uma sonda de microdiálise. Seu princípio básico é mimetizar um capilar sanguíneo, atuando através de difusão passiva. De maneira geral o experimento depende da implantação de uma sonda, que é constantemente perfundida por uma solução – o mais semelhante possível do líquido intersticial do tecido a ser analisado – permitindo a difusão de moléculas endógenas e exógenas do meio intersticial para o fluido perfundido, devido ao gradiente de concentração formado; posteriormente o líquido resultante da perfusão deve ser analisado quimicamente para determinar os níveis da(s) substância(s) perfundida(s). Esta técnica permite a coleta (para posterior análise) de qualquer molécula que possa ser difundida pelos poros da sonda de diálise.

A microdialise não é a única técnica disponível para determinar a concentração intersticial de neurotransmissores, mas é uma das principais (Bourne, 2003). Segundo Plock and Kloft (2005) algumas das vantagens da técnica de microdialise é que esta permite a implantação de uma ou mais sondas para analisar o analito em sítios específicos; mantém os fluidos biológicos; permite a coleta de diversas amostras em um período de tempo; os animais permanecem acordados durante todo o experimento; o dialisado fica livre de proteínas, facilitando a etapa de análise. Entre as principais limitações estão o risco de trauma e lesão tecidual, bem como alterações na barreira hematoencefálica; o tamanho da partícula do analito deve ser compatível com o poro da sonda; a necessidade de validar um método analítico.

## Materiais e Métodos

### *Isolamento da uliginosina B*

As partes aéreas de *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt (Hypericaceae) foram coletadas em Caçapava do Sul – Rio Grande do Sul, no período de floração (outubro de 2009). A coleta foi autorizada pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético/Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis – CGEN/IBAMA (número: 003/2008, protocolo: 02000.001717/2008-60). O material vegetal foi identificado pelo botânico Dr. Sérgio Bordignon (UNILASALLE, Brasil) e a exsicata foi depositada no Herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob registro ICN *H. polyanthemum*, Bordignon et al. 175915.

As partes aéreas secas e trituradas de *H. polyanthemum* foram submetidas à maceração estática com *n*-hexano, relação planta:solvente – 1:10 (p/v). A cada 48 h o macerado foi filtrado e concentrado em evaporador rotatório, a pressão reduzida e em temperatura inferior a 45 °C, até o esgotamento da planta (Stein *et al.*, 2012). Por fim, o extrato foi solubilizado em acetona, filtrado para remoção de ceras epicuticulares, concentrado em evaporador rotatório e armazenado a 4 °C até o uso.

O extrato foi submetido a uma coluna cromatográfica para a obtenção de frações enriquecidas em uliginosina B, utilizando como fase estacionária sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mesh, Merck, Darmstadt, Germany) e fase móvel gradiente *n*-hexano:diclorometano (100:0 - 0:100 v/v). As frações contendo uliginosina B foram submetidas a colunas cromatográficas, utilizando fase estacionária com maior

superfície de contato de sílica gel 60 (0,040 – 0,063 mesh, Merck, Darmstadt, Germany) e fase móvel gradiente *n*-hexano:diclorometano ou acetato de etila (100:0 - 0:100 v/v). O isolamento final foi realizado por cromatografia planar centrífuga utilizando sílica gel 60 F<sub>254</sub> (placas de 1 ou 2 mm), em equipamento Chromatotron™ (modelo 7924 T, Harrison Research, San Bruno, CA, USA), usando diferentes fases móveis (gradientes 100:0 - 0:100 v/v): *n*-hexano:diclorometano, *n*-hexano:acetato de etila, *n*-hexano:éter etílico e *n*-hexano:acetona em polaridade crescentes, ou ainda o sistema descrito por Rocha e colaboradores (Rocha *et al.*, 1995). O isolamento da uliginosina B foi acompanhado por cromatografia em camada delgada em placas pré-revestidas com sílica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck, Darmstadt, Germany), usando como fases móveis: *n*-hexano:diclorometano (50:50 v/v), *n*-hexano:acetato de etila (90:10 v/v), *n*-hexano:éter etílico (95:5 v/v), *n*-hexano:acetona (97,5:2,5 v/v), os três últimos na presença e ausência de 0,25% de ácido fórmico.

A identidade e pureza da uliginosina B foram confirmadas através da aplicação de técnicas espectroscópicas e espectrométricas: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (<sup>1</sup>H – anexo I) e de Carbono (<sup>13</sup>C – anexo II) a 25 °C em espectrômetro Varian MR400 (operando a 400 MHz para <sup>1</sup>H e 100 MHz para <sup>13</sup>C), utilizando clorofórmio deuterado (99,8%, Acros Organics, New Jersey, USA) com tetrametilsilano (TMS) como padrão interno; HRESIMS (vide Ccana-Ccapatinta, 2014 pag. 173) obtido no modo íon-positivo em espectrômetro de massas Waters Q-TOF Premier equipado com uma fonte de nanospray iônico (Waters, Milford, MA, USA) obtendo *m/z* 499,2320 [M + H]<sup>+</sup> (calculado para C<sub>28</sub>H<sub>35</sub>O<sub>8</sub>: 499,2332). Os dados obtidos nestas técnicas foram comparados com dados descritos na literatura (Parker e Johnson, 1968; Ccana-Ccapatinta *et al.*, 2013). A uliginosina B ainda foi analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector

Ultravioleta (CLAE-UV), utilizando dois sistemas distintos (Nunes *et al.*, 2009; Ccana-Ccapatinta *et al.*, 2013), obtendo área do pico superior a 94%.

### *Animais*

Foram utilizados 11 ratos Wistar machos com 60-80 dias (250-350 g) provenientes do biotério da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Antes dos experimentos, os animais foram adaptados por no mínimo 05 dias no biotério da Faculdade de Farmácia – UFRGS. Os animais foram mantidos em caixas plásticas de 25x40x18 cm com no máximo quatro ratos em cada caixa e após o procedimento cirúrgico (descrito a seguir) foram alojados em caixas individuais por 48 h (período de recuperação pós-cirúrgico). Os animais foram mantidos sob ciclo claro/escuro de 12 h (luzes acesas das 07 às 19 h), com temperatura constante ( $23 \pm 2$  °C), sob sistema de exaustão (estantes ventiladas Alesco®) e umidade monitorada, com acesso livre à água e alimento.

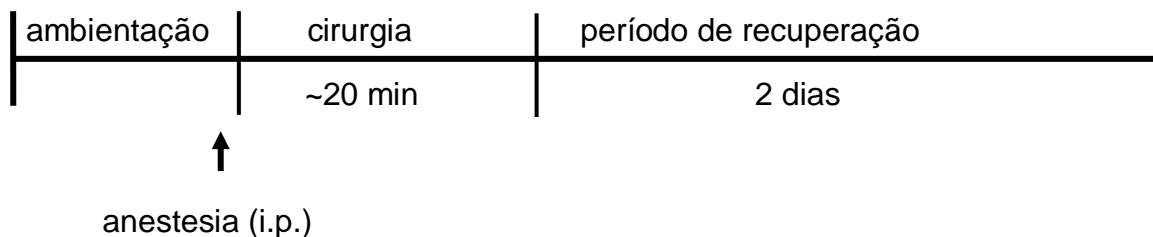
Os experimentos foram realizados seguindo os preceitos éticos recomendados pela legislação brasileira (Brasil, 2008; 2013a; 2013b) e foram aprovados pela Comissão de Ética e Pesquisa da UFRGS (número 18518).

### *Determinação dos níveis de monoaminas em estriado*

**Reagentes.** Noradrenalina (NA), dopamina (DA), serotonina (5-HT), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), 3-metoxitiramina (3-MT), ácido homovanílico (HVA), e

ácido 5-hidroxiindoleacético (5-HIAA) foram obtidos da Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). Cloridrato de cetamina (Dopalen<sup>®</sup>) e cloridrato de xilazina (Anasedan<sup>®</sup>) produzidos pela Agibrands do Brazil LTDA (São Paulo, SP, Brasil). Metanol (CH<sub>4</sub>O) grau HPLC e cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Germany). Cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e fosfato monopotássico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) foram adquiridos da Fisher Scientific (New Jersey, USA). Cloreto de sódio (NaCl) e ácido heptanosulfônico (C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>NaO<sub>3</sub>S) foram adquiridos da Dinâmica Química Contemporânea LTDA (Diadema, SP, Brasil) e Acros Organics (New Jersey, USA), respectivamente.

**Cirurgia.** Foi realizada conforme padronizado por Munari (2006), com pequenas modificações. As etapas estão esquematizadas na Figura 1. Antes do procedimento após foram anestesiados (i.p.) com mistura de cetamina 0,1 g/mL (0,75 mL/kg) + xilazina 0,2 g/mL (0,5 mL/kg). Quando necessário foi administrado durante a cirurgia dose reforço anestésica (1/3 da dose anestésica). A cirurgia foi realizada utilizando estereotáxico (ASI Instruments, EUA) para implantação da guia de sonda (CMA/11 – 14 mm) no estriado (anterioridade: -0,3; lateralidade: +3,2; profundidade: -4,5; coordenadas definidas por Paxinos e Watson, 1998) de ratos (Cooley e Vanderwolf, 1990). Após a cirurgia, os animais foram alojados por 48 h (período de recuperação) no biotério em caixas individuais, com água e comida *ad libitum*. Não foram observados sinais de sofrimento ou infecção.

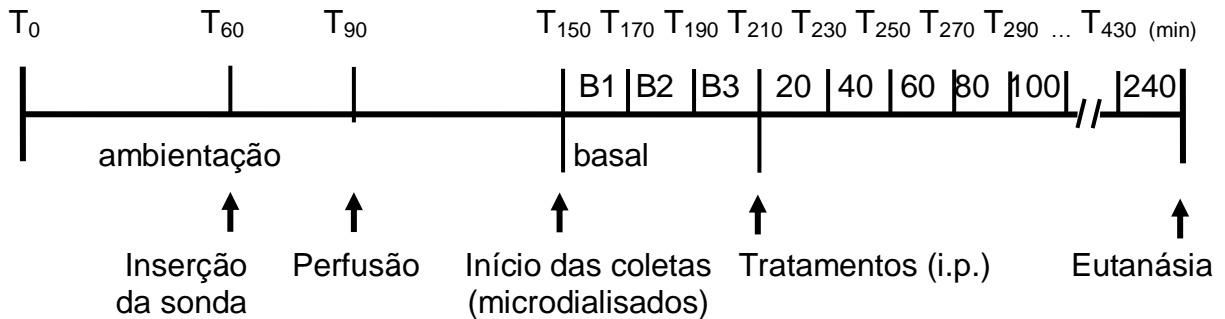


**Figura 1. Esquema do procedimento cirúrgico.**

**Microdiálise.** Foi realizada conforme padronizado por Munari (2006). As etapas estão esquematizadas na Figura 2. Os animais foram ambientados a sala de microdiálise por 1 h. Em seguida, a sonda (CMA/11, 3mm, 6 KDa) foi inserida na guia implantada previamente, o animal foi transferido da sua caixa moradia para a cuba de microdiálise e foi conectado ao sistema de microdiálise (sem fluxo). Após 30 min, foi iniciada a perfusão com LCA<sup>1</sup> (NaCl 145 mM, KCl 2,7 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,2 mM e MgCl<sub>2</sub> 1 mM; pH 7,4), fluxo de 1 µL/min, por 1 h (período de estabilização). Imediatamente após, foram coletadas três amostras de 20 µL, em intervalos de 20 min, para a determinação dos níveis médios basais dos neurotransmissores e metabólitos. Em seguida, os ratos foram tratados com uliginosina B (30 mg/kg, i.p.) ou veículo (1 mL/kg, i.p.) e os dialisados (20 µL) foram coletados em intervalos de 20 min por 4 h. Todas as amostras foram coletadas em tubos eppendorf preparados com 10 µL de solução de conservação (cisteína 0,1% e ácido perclórico 0,1 N); mantidas ao abrigo da luz e em recipiente contendo gelo, até o final do procedimento, após, as amostras foram armazenadas em freezer à -80 °C até a análise. Finalizado o procedimento de microdiálise, os ratos foram mortos por

<sup>1</sup> O Líquido Cerebroespinal Artificial (LCA) utilizado no experimento foi preparado a partir de uma solução estoque (NaCl 2,9 M, KCl 54 mM, CaCl<sub>2</sub> 24 mM e MgCl<sub>2</sub> 20 mM) concentrada 20 vezes e armazenada a 4 °C. O volume foi completado com água Milli Q e o LCA foi filtrado em membrana Millipore 0,45 µm antes do uso.

decapitação e os encéfalos foram armazenados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para posterior verificação do local de implantação das guias de sonda por histoquímica.



**Figura 2. Esquema do procedimento de microdiálise cerebral.**

**Histoquímica.** Os encéfalos dos animais submetidos à microdiálise foram retirados do freezer  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  e seccionados em criostato a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , em secções coronais de  $25\text{ }\mu\text{m}$ . Os cortes foram fixados em lâminas gelatinizadas e corados com cresil-violeta. Resumidamente, a técnica consiste em mergulhar as lâminas em uma solução de cresil-violeta 5% (com acetato de sódio 1%; pH 3,5) por 10 min; retirar o excesso de corante com dois banhos consecutivos de água:álcool (1:1, v/v) por 5 s; desidratar os cortes por 3 min em álcool 95% e posteriormente em álcool absoluto; o corante foi fixado em banho com metilciclohexano por 5 min e os cortes foram fixados (entre a lâmina e a lamínula) com resina de Damar. O local de inserção da guia de sonda de microdiálise foi verificado de acordo com Atlas de Anatomia Cerebral de Ratos (Paxinos e Watson, 1998). Todos os animais tiveram a guia de sonda implantada no estriado.

**Análise dos dialisados.** Foi realizada em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência acoplado a Detector Eletroquímico conforme descrito por Hubbard e colaboradores

(2010) e Munari (2006). O sistema utilizado foi formado por bomba isocrática modelo LC-6AD (Shimadzu, Japão), autoinjeter modelo SIL-20AC (Shimadzu, Japão), detector amperométrico DECADE (Antec Leyden, Holanda) com célula eletroquímica VT-03 (Antec Leyden, Holanda) constituída por um eletrodo de trabalho *glassy carbon* (3 mm) e um eletrodo de referência Ag/AgCl.

As condições cromatográficas adotadas foram: fase móvel ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  64,5 mM, EDTA 1 mM, metanol 1,58 M e  $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NaO}_3\text{S}$  0,8 mM diluídos em água Milli Q qsp 1 L; pH 3,4) filtrada em membrana Millipore 0,45  $\mu\text{m}$  e desgaseificada 30 minutos antes do uso; coluna C18 Wide Pore (2,1 x 150 mm, 3  $\mu\text{m}$ , 300 Å, Discovery BIO<sup>®</sup>), fase reversa, com vazão da fase móvel de 0,2 mL/min; o potencial de trabalho foi ajustado a +0,8 V e a sensibilidade do detector eletroquímico a 5 nA; o carrossel contendo as amostras e forno foram mantidos a 4 e 30 °C, respectivamente; os volumes de injeção foram 10  $\mu\text{L}$  e o tempo da corrida 35 min; para aquisição e integração dos picos foi utilizado o programa Labsolutions LC solution (Shimadzu, Japão).

A técnica de análise dos dialisados foi validada segundo as recomendações preconizadas pela legislação vigente no Brasil (2012). A sensibilidade e linearidade foram determinadas em triplicata, por 3 dias consecutivos, nas concentrações 2 - 200  $\text{pg}/\mu\text{L}$  (com no mínimo 6 concentrações, mais amostra branca) para noradrenalina (NA), dopamina (DA), ácido homovanílico (HVA), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), 3-metoxitiramina (3-MT), serotonina (5-HT) e ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA)<sup>2</sup>. A exatidão e precisão foram avaliadas: intradia ou

---

<sup>2</sup> Embora o presente estudo vise quantificar dopamina e seus metabólitos e o 5-HIAA, estudos futuros, em outras estruturas, estão previstos para investigar as demais monoaminas e seus metabólitos, para tanto, optou-se validá-las em uma única metodologia.



intracorrída, analisada diariamente por 3 dias consecutivos, com seis amostras em cada concentração (total de 4 concentrações, correspondendo aos controles de qualidade baixo, médio e alto e ao limite de quantificação inferior); interdía ou intercorrída, analisada a partir dos valores médios obtidos na análise intradía. Para determinar a exatidão foi calculado o erro padrão relativo ( $EPR = \frac{[\text{concentração média experimental} - \text{concentração nominal}] \times 100}{\text{concentração nominal}}$ ) e para a precisão foi determinado o desvio padrão relativo ( $DPR = \frac{\text{desvio padrão}}{\text{média da concentração}} \times 100$ ).

Após validação, para análise dos dialisados, semanalmente, equações da reta foram determinadas para todas as substâncias nas concentrações 2, 5, 10, 20, 50, 100, 150 e 200 pg/ $\mu\text{L}$ , a partir de soluções estoque<sup>3</sup>; diariamente, foram analisados, entre a leitura dos dialisados, controles de qualidade baixo (5 pg/ $\mu\text{L}$ ), médio (90 pg/ $\mu\text{L}$ ) e alto (160 pg/ $\mu\text{L}$ ) e o limite de quantificação inferior (2 pg/ $\mu\text{L}$ ).

***Taxa de recuperação das sondas de microdialise.*** Foi determinada *in vitro* através de um sistema de perfusão de LCA (sem nenhum analito) com vazão de 1  $\mu\text{L}/\text{min}$ , a 37 °C. A sonda foi imersa em um tubo com solução padrão contendo todos os analitos investigados na concentração de 100 pg/ $\mu\text{L}$ . Este sistema foi perfundido por 1 h para estabilização, após, quatro amostras (20  $\mu\text{L}/\text{amostra}$ ) foram coletadas, em intervalos de 20 min e analisadas nas mesmas condições dos dialisados obtidos dos animais tratados com uliginosina B ou veículo.

---

<sup>3</sup> As soluções estoque foram preparadas para cada neurotransmissor ou metabólito na concentração de 1 mg/mL diluídas em LCA; alicotadas em tubos contendo 30  $\mu\text{L}$  e mantidos a -80 °C. No dia do experimento, 10  $\mu\text{L}$  de cada alíquota foram pipetadas em um mesmo balão volumétrico (5 mL) e o volume foi completado com LCA, resultando em uma única solução contendo todos os analitos na concentração de 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Esta solução foi usada para obter as soluções padrão e controle de qualidade nas diferentes concentrações.

A taxa de recuperação (TR) de cada sonda de microdiálise foi calculada em porcentagem, através da fórmula:

$$TR (\%) = (C_{\text{dial}}/C_{\text{perf}}) * 100$$

Onde:  $C_{\text{dial}}$  é a concentração dialisada coletada,  $C_{\text{perf}}$  é a concentração da solução padrão perfundida (100 pg/ $\mu$ L).

O procedimento foi realizado após a sonda ser utilizada em três animais. Os dados de recuperação não foram considerados no cálculo para quantificação das amostras.

**Análise estatística.** Inicialmente a concentração de cada dialisado foi determinada a partir das equações das retas. Os níveis basais em todos os grupos foram calculados através da média das três amostras basais, coletadas antes das administrações, e ajustadas para 100%. Todos os outros valores foram calculados como porcentagem de alteração em cada ponto de tempo em relação à média dos valores basais. Os dados foram analisados através da determinação da área sobre a curva (AUC) para cada tratamento, através de teste *t* bicaudal, utilizando o programa GraphPad Prism versão 4.02 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Os resultados foram expressos em média (%)  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). Foi aceito  $P < 0,05$  para as diferenças estatisticamente significativas.

## Resultados

### *Validação da metodologia analítica*

As Figuras 3 e 4 e a Tabela 1 apresentam os dados da validação da metodologia analítica<sup>4</sup>.

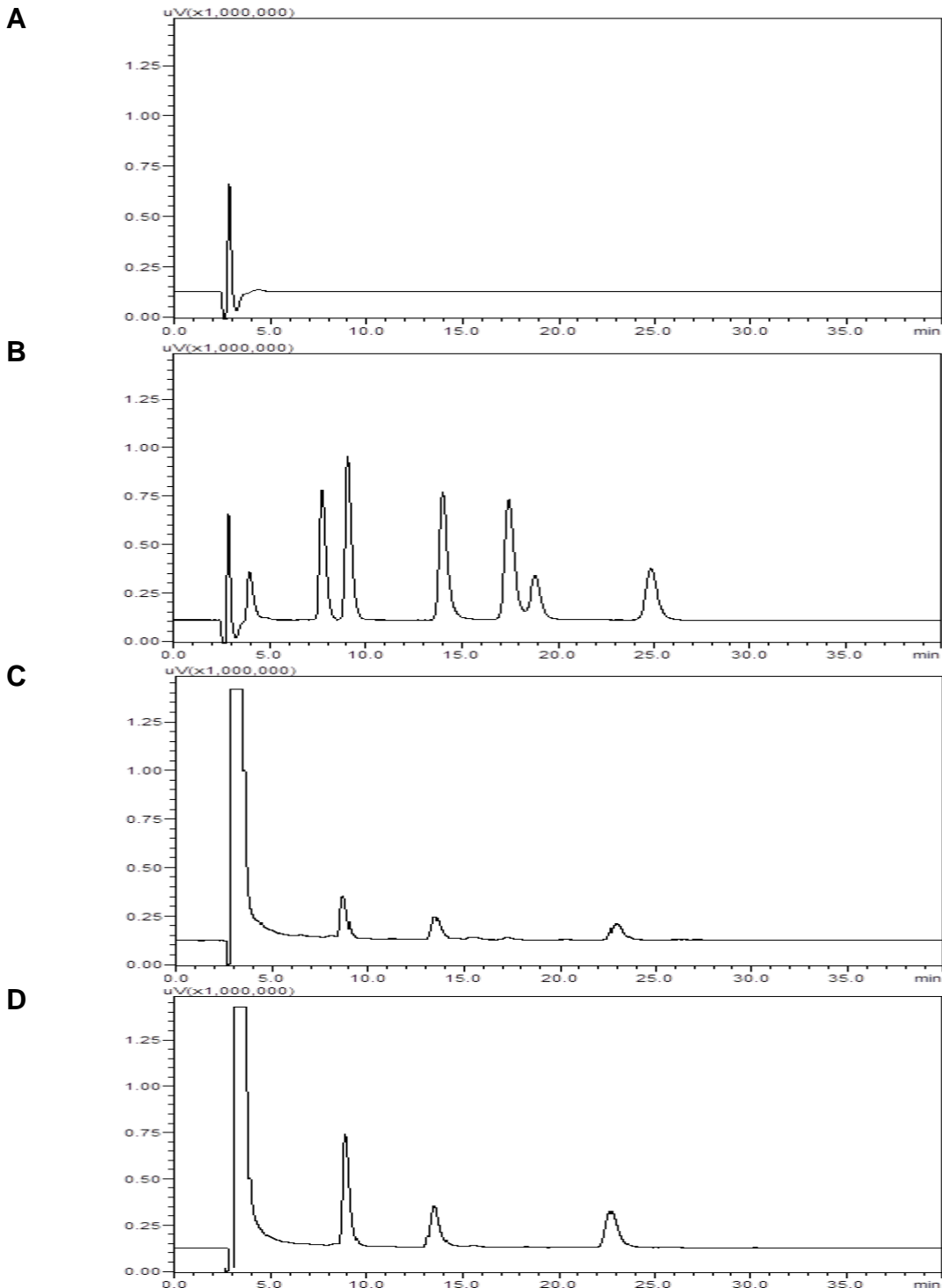
A seletividade do método pode ser verificada na Figura 3, através da comparação entre os cromatogramas obtidos para: o LCA (painel A); o LCA com todos os analitos padronizados na concentração de 100 pg/ $\mu$ L (painel B); dialisados de animais tratados com veículo (painel C) ou uliginosina B (painel D). Não foi evidenciado nenhum pico correspondente à presença de substância interferente.

A linearidade para cada analito está demonstrada na Figura 4. Este parâmetro foi avaliado através da determinação das curvas de calibração, equação da reta e coeficiente de determinação, avaliados para cada analito. Não foi constatado desvio de linearidade no intervalo de concentrações avaliadas (ANOVA  $P > 0,001$ ; *dados não mostrados*).

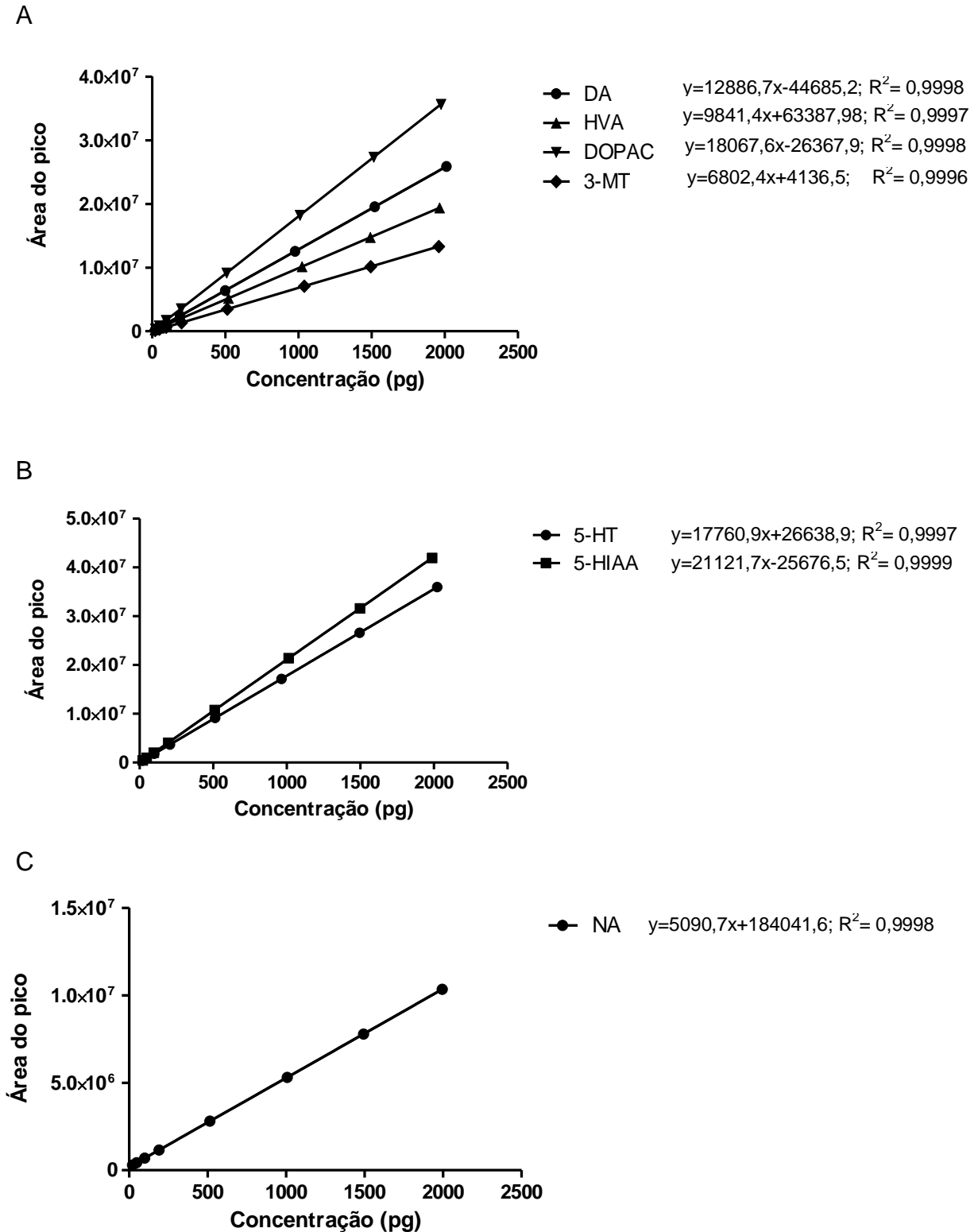
A Tabela 1 apresenta os dados de precisão e exatidão intra e intercorridas. Todos os valores de Desvio Padrão Relativo (DPR) e Erro Padrão Relativo (EPR) estão dentro da faixa de variação aceita pela legislação ( $\pm 15\%$  para os CQ – controles de qualidade – e  $\pm 20\%$  para o LIQ – limite inferior de quantificação).

---

<sup>4</sup> A metodologia foi validada para a análise das três monoaminas e metabólitos, visto que estudos paralelos estão sendo desenvolvidos em estruturas com predomínio de neurônios serotoninérgicos e noradrenérgicos.



**Figura 3. Cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector eletroquímico.** (A) líquido cerebrospinal artificial – LCA; (B) curva padrão com todos os analitos na concentração de 100 pg/μL; (C) dialisado de animal tratado com veículo no tempo de 40 min de perfusão; (D) dialisado de animal tratado com uliginosina B (30 mg/kg, i.p.) no tempo de 40 min de perfusão. Sendo: noradrenalina (NA) o pico em 4 min, dopamina (DA) em 7 min, ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) em 9 min, 5-hidroxitriptamina (5-HIAA) em 13,5 min, serotonina (5-HT) em 17 min, 3-metoxitiramina (3-MT) em 18,5 min e ácido homovanílico (HVA) em 24 min.



**Figura 4. Curvas padrão para os neurotransmissores e seus metabólitos apresentados com as respectivas equações da reta e coeficiente de determinação ( $R^2$ ).** (A) Dopamina e metabólitos; (B) serotonina e metabólito; (C) noradrenalina. Os analitos foram diluídos em LCA em concentração entre 2 – 200  $\text{pg}/\mu\text{L}$ . As curvas padrão foram obtidas através de regressão linear da área dos picos ponderados contra o inverso do quadrado das concentrações ( $1/x^2$ ), a partir da média de três curvas contendo todos os analitos.

Tabela 1. Desvios e erros padrões relativos intradia e interdia das amostras de controle de qualidade e limite de quantificação inferior para a curva padrão dos analitos em LCA (n=6 amostras/dia).

Concentração (pg/ $\mu$ L)	Dia	5-HT				5-HIAA				
		Concentração média (pg/ $\mu$ L)	DP	DPR (%)	EPR (%)	Concentração média (pg/ $\mu$ L)	DP	DPR (%)	EPR (%)	
<b>VARIACÃO INTRADIA</b>	<b>2</b>	1	1,87	0,08	4,32	6,66	2,33	0,04	1,81	16,67
		2	1,99	0,06	3,20	0,54	2,07	0,06	2,66	3,51
		3	1,97	0,05	2,30	1,29	2,08	0,03	1,35	3,96
	<b>5</b>	1	4,99	0,08	1,62	0,08	5,28	0,11	2,15	5,62
		2	4,79	1,01	2,12	4,29	4,49	0,09	2,03	10,19
		3	4,99	0,08	1,60	0,17	4,45	0,06	1,31	11,03
	<b>90</b>	1	92,27	1,16	1,26	2,52	99,53	0,70	0,70	10,59
		2	96,53	1,37	1,42	7,25	88,32	1,37	1,55	1,86
		3	100,39	0,92	0,91	0,17	90,70	0,52	0,57	0,79
	<b>160</b>	1	160,56	1,57	0,97	0,35	177,38	1,97	1,08	10,86
		2	169,39	1,19	0,70	5,87	156,35	1,82	1,17	2,28
		3	175,64	0,98	1,72	9,78	159,96	0,95	0,59	0,02
<b>INTERDIA</b>	<b>2</b>		1,94	0,08	4,14	2,82	2,16	0,13	5,93	8,05
	<b>5</b>		4,94	0,11	2,26	1,16	4,73	0,39	8,37	5,36
	<b>90</b>		96,39	3,48	3,61	7,11	92,85	4,90	5,27	3,17
	<b>160</b>		168,53	6,34	3,76	5,33	164,56	9,30	5,65	2,85

Continuação da Tabela 1

Concentração (pg/ $\mu$ L)	Dia	NA				DA				
		Concentração média (pg/ $\mu$ L)	DP	DPR (%)	EPR (%)	Concentração média (pg/ $\mu$ L)	DP	DPR (%)	EPR (%)	
VARIACÃO INTRADIA	2	1	2,06	0,20	9,65	2,82	2,19	0,07	3,19	5,92
		2	1,98	0,19	9,45	1,07	1,70	0,05	3,02	15,20
		3	2,05	0,21	10,45	2,43	2,06	0,05	2,67	2,96
	5	1	4,43	0,09	1,94	11,44	4,69	0,12	2,45	6,17
		2	4,39	0,09	2,09	12,17	5,06	0,51	9,12	1,30
		3	4,45	0,16	3,67	12,53	4,61	0,05	4,90	7,84
	90	1	101,89	1,25	1,23	13,21	91,35	2,22	2,43	1,50
		2	84,26	8,69	10,32	6,38	85,01	7,28	8,56	5,54
		3	78,72	2,62	3,33	10,92	79,65	3,28	4,12	11,50
160	1	170,60	10,2	5,98	6,62	156,63	5,91	3,77	2,00	
	2	150,32	8,66	5,76	6,05	154,96	6,40	4,13	3,15	
	3	144,29	4,03	2,79	9,82	152,50	3,34	2,19	4,69	
INTERDIA	2	2,08	0,18	9,11	1,30	1,96	0,19	9,91	2,10	
	5	4,44	0,10	2,35	11,18	4,76	0,32	6,68	4,74	
	90	88,29	10,99	12,46	1,90	85,34	6,48	7,59	5,18	
	160	155,07	13,45	8,67	3,08	154,70	5,20	3,36	3,31	

Continuação da Tabela 1

Concentração nominal (pg/ $\mu$ L)	Dia	DOPAC				3-MT				
		Concentração média (pg/ $\mu$ L)	DP	DPR (%)	EPR (%)	Concentração média (pg/ $\mu$ L)	DP	DPR (%)	EPR (%)	
<b>VARIAÇÃO INTRADIA</b>	<b>2</b>	1	1,91	0,05	2,84	4,69	2,10	0,09	4,39	4,91
		2	1,74	0,08	4,75	13,3	2,01	0,09	4,62	0,73
		3	1,97	0,07	3,76	1,73	1,85	0,05	2,88	7,45
	<b>5</b>	1	4,49	0,09	2,09	10,23	5,20	0,33	6,42	3,94
		2	4,35	0,03	0,58	12,96	4,75	0,24	4,96	5,04
		3	4,45	0,13	3,00	11,08	4,45	1,61	3,63	10,98
	<b>90</b>	1	89,38	1,26	1,41	0,69	99,66	0,88	0,88	10,74
		2	87,26	4,02	4,60	3,04	91,31	2,18	2,39	1,46
		3	87,36	1,24	1,42	2,93	88,53	1,43	1,62	1,64
	<b>160</b>	1	159,79	1,19	0,74	0,13	178,45	2,05	1,15	11,53
		2	155,39	3,34	2,15	2,88	155,37	3,93	2,53	2,89
		3	157,20	1,76	1,12	1,75	159,84	8,16	5,10	0,10
<b>INTERDIA</b>	<b>2</b>	1,87	0,12	6,30	6,58	1,99	0,13	6,38	0,60	
	<b>5</b>	4,43	0,10	2,22	11,30	4,49	0,39	8,14	4,70	
	<b>90</b>	88,00	2,51	2,86	2,22	93,17	4,95	5,31	3,50	
	<b>160</b>	157,47	2,76	1,76	1,58	164,55	11,13	6,76	2,85	



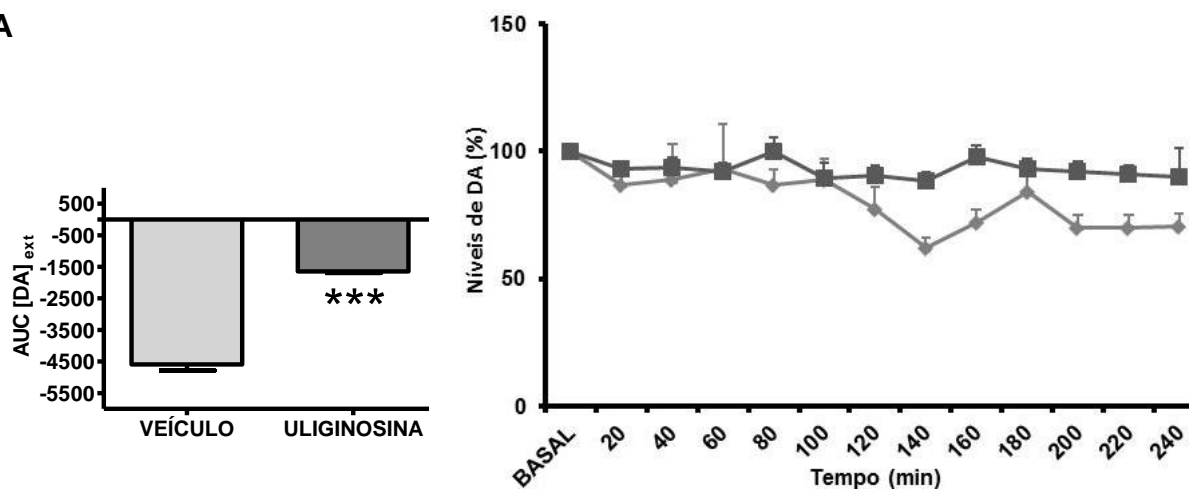
Continuação da Tabela 1

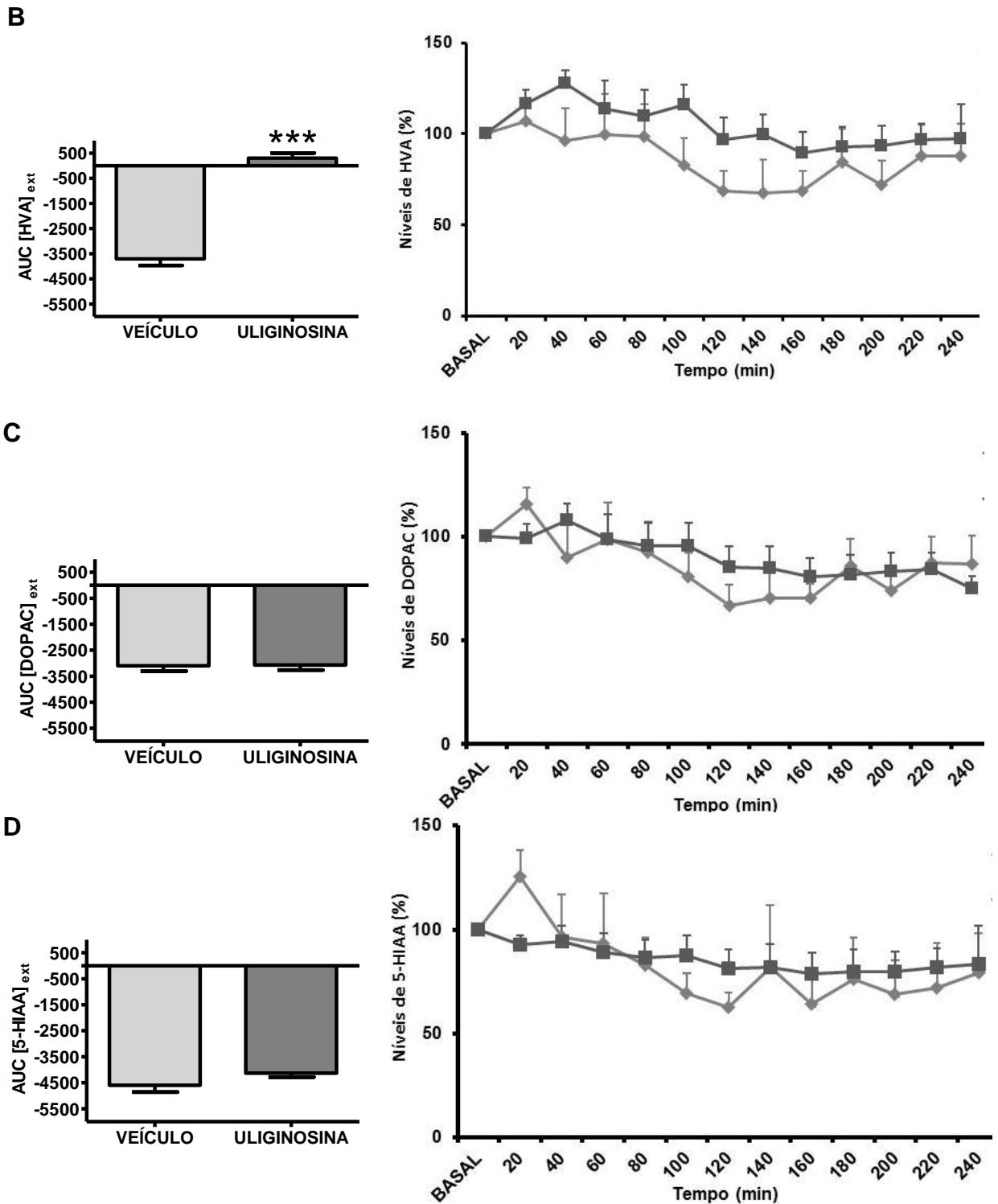
Concentração nominal (pg/ $\mu$ L)	Dia	HVA				
		Concentração média (pg/ $\mu$ L)	DP	DPR (%)	EPR (%)	
VARIACÃO INTRADIA	5	1	4,48	0,19	4,16	10,42
		2	4,16	0,14	3,27	16,76
		3	4,40	0,21	4,84	11,97
	15	1	14,22	0,14	0,97	5,21
		2	13,00	0,26	2,01	13,27
		3	15,06	0,23	1,15	0,41
	90	1	89,39	0,76	0,84	0,68
		2	84,54	1,46	1,72	6,06
		3	91,47	1,33	1,46	1,63
	160	1	157,86	1,78	1,13	1,34
		2	146,61	2,13	1,16	8,37
		3	157,12	2,07	1,32	1,70
INTERDIA	5	4,35	0,21	4,91	13,04	
	15	14,22	0,83	5,86	5,19	
	90	88,47	3,11	3,51	1,70	
	160	153,86	5,45	3,54	3,84	

Sendo, DP: Desvio Padrão; DPR: Desvio Padrão Relativo; EPR: Erro Padrão Relativo.

### Análise dos microdialisados

A Figura 5 apresenta o efeito do tratamento com uliginosina B (30 mg/kg, i.p.) sobre os níveis extracelulares de dopamina, seus metabólitos e 5-HIAA em estriado de ratos acordados submetidos à técnica de microdialise cerebral. A análise estatística revela que o tratamento aumenta os níveis extracelulares de dopamina (DA;  $p < 0,001$ ; Fig. 5A) e ácido homovanílico (HVA;  $p < 0,001$ ; Fig 5B) e não altera os níveis de ácido 3,4-di-hidroxi-fenilacético (DOPAC;  $p = 0,917$ ; Fig. 5C) e do ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA;  $p = 0,1487$ ; Fig. 5D) no estriado de ratos. Os níveis de 3-metoxitiramina (3-MT) ficaram abaixo do limite de quantificação de 2 pg/ $\mu$ L (11,96 nM).

**A**



**Figura 5.** Efeito do tratamento com uliginosina B 30 mg/kg, i.p. (—■) ou veículo (—◆) sobre os níveis extracelulares de DA (painel A), seus metabólitos – HVA (Painel B) e DOPAC (Painel C) – e 5-HIAA (painel D) no estriado de ratos (n= 5-6/grupo). Gráficos a esquerda valores expressos em área sob a curva da porcentagem de efeito  $\pm$  E.P.M.: \*\*\*  $P < 0,001$  diferença em relação ao veículo. Gráficos a direita, valores expressos em média da porcentagem de efeito em relação ao grupo basal  $\pm$  E.P.M.

A Figura 6 apresenta um corte histológico de encéfalo de rato, demonstrando a cicatriz no estriado, local onde a sonda foi implantada, assegurando que a microdialise foi realizada no local de interesse.



**Figura 6. Fatia de encéfalo de rato Wistar mostrando a cicatriz deixada pela guia de sonda no estriado.** Histoquímica de secção coronal de 30 µm em ME (Método de coloração: cresil-violeta).

As taxas de recuperação das sondas estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Taxa de recuperação das sondas de microdialise

<b>Analito</b> <b>Sonda</b>	<b>DA</b>	<b>DOPAC</b>	<b>HVA</b>	<b>3-MT</b>	<b>5-HIAA</b>
<b>I</b>	2,4±0,2	2,6±0,2	21,4±0,4	19,2±1,6	15,8±0,3
<b>II</b>	12,5±1,0	10,8±1,0	15,4±1,5	16,4±2,6	15,1±1,4
<b>III</b>	6,4±0,9	6,5±1,5	15,4±1,3	13,0±0,4	10,9±0,6
<b>IV</b>	4,2±0,3	4,3±0,4	9,9±0,8	12,2±2,8	9,0±0,1
<b>V</b>	9,9±0,9	9,8±1,0	20,5±0,8	21,9±1,3	18,1±0,7

Valores expressos em média de quatro dialises ± desvio padrão. Dialisados coletados em intervalos de 20 min, com fluxo 1 µL/min.

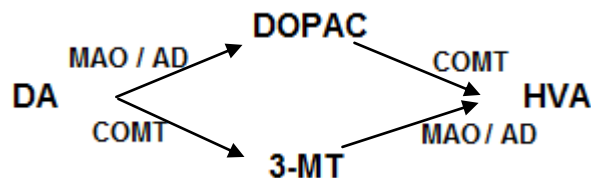
## Discussão

Os resultados apresentados neste capítulo demonstraram que o método foi padronizado de acordo com as recomendações da legislação brasileira para metodologias bioanalíticas (Brasil, 2012), apresentando dados de linearidade (curvas padrão), seletividade, precisão e exatidão dentro dos valores estabelecidos.

A análise dos dialisados mostrou que o tratamento agudo com uliginosina B (30 mg/kg, i.p.) aumenta os níveis de dopamina (DA) e do seu metabólito final, o ácido homovanílico (HVA), no estriado de ratos (o local foi confirmado através de histologia, vide Fig. 6 e comparado com a lâmina de Paxinos e Watson, 1998, p. 20). Estes dados corroboram com resultados prévios, em preparados de sinaptossomas incubados com uliginosina B, que demonstraram aumento na disponibilidade de monoaminas na fenda sináptica, especialmente de dopamina (Stein *et al.*, 2012). Também confirmam os achados prévios, que demonstraram que as atividades antinociceptiva e antidepressiva induzidas pela uliginosina B dependem da ativação de receptores dopaminérgicos, mas que este efeito é indireto, uma vez que a uliginosina B não liga-se a estes receptores (Stein *et al.*, 2012; Stolz *et al.*, 2012). Este conjunto de dados permite assegurar que o mecanismo de ação da uliginosina B envolve, pelo menos em parte, aumento dos níveis extracelulares de dopamina e consequente ativação de receptores dopaminérgicos.

Considerando o metabolismo da dopamina (Fig. 7), as alterações nos níveis extracelulares de dopamina e HVA demonstradas para a uliginosina B podem estar relacionadas tanto a um aumento na liberação, como a uma inibição da recaptção de dopamina. O efeito inibitório da uliginosina B sob a recaptção sinaptossomal de monoaminas já foi relatado, entretanto, o mecanismo responsável por tal efeito ainda

é desconhecido; sabe-se que não envolve uma ligação direta da uliginosina B no sítio das monoaminas nos transportadores responsáveis pela recaptação destes neurotransmissores (Stein *et al.*, 2012). Entretanto, a ação da uliginosina B na liberação de dopamina não foi investigada. Foi demonstrado que uma fração rica em derivados acilfloroglucinol diméricos, estruturalmente relacionados à uliginosina B, aumenta a liberação espontânea de [<sup>3</sup>H]-dopamina em aproximadamente 12% (Viana *et al.*, 2005; Viana *et al.*, 2006). O fato da uliginosina B não ter alterado os níveis extracelulares de DOPAC e os níveis do 3-MT não terem sido quantificados (pois ficaram abaixo do limite de quantificação) limita as conclusões sobre o efeito da uliginosina B na liberação de dopamina. A literatura infere que alterações nos níveis de DOPAC estão relacionadas ao metabolismo intraneuronal, enquanto alterações nos níveis de 3-MT estão associadas à liberação de dopamina (revisado por Wood e Altar, 1988); isto ocorre, pois a enzima catecol O-metiltransferase (COMT), responsável por metilar a dopamina a 3-MT, está presente predominantemente em células gliais e no estriado, em neurônios pós-sinápticos (Kaplan, Hartman e Creveling, 1979; Kastner *et al.*, 1994; Karhunen *et al.*, 1995b; a).



**Figura 7. Esquema do metabolismo da dopamina.** A dopamina (DA) liberada no meio extracelular pode ser metilada a 3-metoxitiramina (3-MT) pela COMT (catecol O-metiltransferase) e posteriormente metabolizada ao ácido homovalínico (HVA) pela ação da MAO (monoamino oxidase) e da AD (aldeído dehidrogenase). No neurônio pré-sináptico a DA pode ser deaminada e carboxilada a ácido 3,4-dihidroxi-fenilacético (DOPAC) pela ação das enzimas MAO e AD. O DOPAC também é metabolizado a HVA.

O tratamento com uliginosina B não alterou os níveis extracelulares do metabólito da serotonina, o ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA). Estes dados se opõem aos apresentados por Stein e colaboradores (2012) - uliginosina B aumenta a disponibilidade de serotonina na fenda sináptica. Essa divergência de resultados pode ocorrer por diversos motivos, os mais relevantes parecem ser a dose de uliginosina B e a estrutura encefálica utilizada, já que Stein e colaboradores (2012) realizaram o experimento *in vitro* utilizando o córtex frontal.

A ausência de alterações nas concentrações extracelulares de 5-HIAA indica que os efeitos demonstrados para a uliginosina B não estão associados à ativação das projeções do núcleo dorsal da Rafe (inerva os neurônios dopaminérgicos corticais e estriatais), pelo menos a nível estriatal (caudado-putamen e estriado ventral). Entretanto, outros feixes serotoninérgicos – como as projeções que partem do núcleo medial da Rafe e da Rafe Magnus/Pallidus (Pliszka, 2004) – podem contribuir para os efeitos relatados para a uliginosina B. É provável, mas até o momento meramente especulativo, que as projeções iniciadas na Rafe Magnus/Pallidus estejam envolvidas nos efeitos da uliginosina B, visto que este feixe projeta-se para a medula espinhal, formando a via descendente inibitória da transmissão do estímulo nociceptivo.

Outra contribuição importante deste estudo, que reflete também uma fragilidade da metodologia analítica validada, foi a impossibilidade de detecção dos níveis extracelulares de 3-MT. A técnica analítica foi padronizada utilizando a concentração mínima 20 pg do analito por injeção, metade da padronizada inicialmente em no nosso laboratório (Munari, 2006). Esta estratégia foi adotada considerando que no estudo prévio os níveis extracelulares de 3-MT não haviam sido detectados no núcleo accumbens. Analisando os cromatogramas dos dialisados

dos animais tratados com veículo ou uliginosina B (Fig. 3) percebe-se a ausência de picos no período entre 18,5-20 min (tempo de retenção do 3-MT na amostra padrão), o que indica que esta metodologia não é adequada para a análise do 3-MT nas concentrações obtidas no estriado de ratos Wistar. De fato, estudos recentes que conseguiram quantificar os níveis de 3-MT utilizam outras metodologias – fase móvel, fase estacionária, equipamento de análise e detector – e/ou ainda outras espécies animais (Wąsik, Romańska e Antkiewicz-Michaluk, 2010; Antkiewicz-Michaluk *et al.*, 2011; Ferry *et al.*, 2014; Sustkova-Fiserova *et al.*, 2014).

Sumarizando, os resultados deste capítulo mostram que o tratamento com uliginosina B aumenta a disponibilidade de DA e seu metabólito, HVA, no estriado de ratos e não altera os níveis extracelulares de DOPAC e 5-HIAA. Estes dados reforçam a importância da ativação dopaminérgica para os efeitos antinociceptivo e do tipo antidepressivo descritos para a uliginosina B. Este estudo também mostra evidências que a metodologia analítica utilizada não é adequada para detectar as concentrações extracelulares de 3-MT presentes no estriado de ratos Wistar, contudo, não se pode inferir que em outras estruturas ou espécies animais as quantificações serão inviáveis.



## Referências

AFILALO, M.; MORLION, B. Efficacy of tapentadol ER for managing moderate to severe chronic pain. **Pain Physician**, v. 16, n. 1, p. 27-40, 2013. ISSN 2150-1149. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23340531> >.

AGREN, H. et al. Interacting neurotransmitter systems. A non-experimental approach to the 5HIAA-HVA correlation in human CSF. **J Psychiatr Res**, v. 20, n. 3, p. 175-93, 1986. ISSN 0022-3956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2430098> >.

ANTKIEWICZ-MICHALUK, L. et al. Both stereoselective (R)- and (S)-1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline enantiomers protect striatal terminals against rotenone-induced suppression of dopamine release. **Neurotox Res**, v. 20, n. 2, p. 134-49, 2011. ISSN 1476-3524. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21069490> >.

BANKI, C. M.; MOLNAR, G.; FEKETE, I. Correlation of individual symptoms and other clinical variables with cerebrospinal fluid amine metabolites and tryptophan in depression. **Arch Psychiatr Nervenkr**, v. 229, n. 4, p. 345-53, 1981. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6164353> >.

BANKI, C. M.; MOLNAR, G.; VOJNIK, M. Cerebrospinal fluid amine metabolites, tryptophan and clinical parameters in depression. Part 2. Psychopathological symptoms. **J Affect Disord**, v. 3, n. 2, p. 91-9, 1981. ISSN 0165-0327. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6166645> >.

BANKI, C. M.; VOJNIK, M.; MOLNAR, G. Cerebrospinal fluid amine metabolites, tryptophan and clinical parameters in depression. Part 1. Background variables. **J Affect Disord**, v. 3, n. 2, p. 81-9, 1981. ISSN 0165-0327. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6166644> >.

BARCELÓ, A. C.; FILIPPINI, B.; PAZO, J. H. The striatum and pain modulation. **Cell Mol Neurobiol**, v. 32, n. 1, p. 1-12, 2012. ISSN 1573-6830. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21789630> >.

BARROS, F. M. C. et al. Determination of phenolic compounds in flowers of *Hypericum* species native to South Brazil and Peruvian Páramos **Plant Systematics and Evolution**, Springer-Verlag Wien, v. 299, p. 8, 2013.

BIANCHI, C. et al. The effect of morphine on monoamine release and content in guinea-pig brain slices. **Pharmacol Res Commun**, v. 17, n. 4, p. 377-84, 1985. ISSN 0031-6989. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4011653> >.

BLOMS-FUNKE, P. et al. Tramadol increases extracellular levels of serotonin and noradrenaline as measured by in vivo microdialysis in the ventral hippocampus of freely-moving rats. **Neurosci Lett**, v. 490, n. 3, p. 191-5, 2011. ISSN 1872-7972. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21195741> >.

BOURNE, J. A. Intracerebral microdialysis: 30 years as a tool for the neuroscientist. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 30, n. 1-2, p. 16-24, 2003. ISSN 0305-1870. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12542448> >.

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Resolução n. 27**. D.O.U.: 17 de maio de 2012 .

BRASIL. **Lei procedimentos para o uso científico de animais**. Lei n. 11794. Diário Oficial da União (DOU): 8 de outubro de 2008.

BRASIL, MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO; CONCEA. **DIRETRIZ BRASILEIRA PARA O CUIDADO E A UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA FINS CIENTÍFICOS E DIDÁTICOS - DBCA. PORTARIA Nº 465, DE 23 DE MAIO DE 2013**. Brasília-DF, Brasil: 50 p. 2013a. Disponível em: < [http://www.mct.gov.br/upd\\_blob/0226/226494.pdf](http://www.mct.gov.br/upd_blob/0226/226494.pdf) >.

\_\_\_\_\_. **DIRETRIZES DA PRÁTICA DE EUTANÁSIA DO CONCEA. PORTARIA N. 596, DE 25 DE JUNHO DE 2013**. Brasília-DF, Brasil: 54 p. 2013b. Disponível em: < [http://www.mct.gov.br/upd\\_blob/0226/226746.pdf](http://www.mct.gov.br/upd_blob/0226/226746.pdf) >.

BROWN, G. L. et al. Aggression in humans correlates with cerebrospinal fluid amine metabolites. **Psychiatry Res**, v. 1, n. 2, p. 131-9, 1979. ISSN 0165-1781. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/95232> >.

BRUNTON, L. L. et al. **Goodman & Gilman's: Manual of Pharmacology and Therapeutic** New York, USA: Mc Graw Hill, 2007. 1230.

CCANA-CCAPATINTA, G. V. **Aspectos químicos e biológicos de espécies de *Hypericum* (Hypericaceae) das seções Brathys e Trigynobrathys nativas dos Páramos Peruanos**. 2014. (MSc). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

CCANA-CCAPATINTA, G. V. et al. Dimeric acylphloroglucinols in *Hypericum* species from sections Brathys and Trigynobrathys. **Phytochemistry Reviews**, p. 26, 2013. ISSN 1572-980X. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007/s11101-013-9332-2> >.

COOLEY, R. K.; VANDERWOLF, C. H. **Stereotaxic surgery in the rat: a photographic series**. Canada: A. J. Kirby CO, 1990. 102.

DE DEURWAERDÈRE, P.; STINUS, L.; SPAMPINATO, U. Opposite change of in vivo dopamine release in the rat nucleus accumbens and striatum that follows electrical stimulation of dorsal raphe nucleus: role of 5-HT<sub>3</sub> receptors. **J Neurosci**, v. 18, n. 16, p. 6528-38, 1998. ISSN 0270-6474. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9698340> >.

DELGADO, J. M. et al. Dialytrode for long term intracerebral perfusion in awake monkeys. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, v. 198, n. 1, p. 9-21, 1972. ISSN 0003-9780. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4626478> >.

DI MATTEO, V. et al. Effect of acute administration of *Hypericum perforatum*-CO<sub>2</sub> extract on dopamine and serotonin release in the rat central nervous system. **Pharmacopsychiatry**, v. 33, n. 1, p. 14-8, 2000. ISSN 0176-3679. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10721879> >.

ENGLANDER, S. W.; CROWE, D. Rapid microdialysis and hydrogen exchange. **Anal Biochem**, v. 12, n. 3, p. 579-84, 1965. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5859519> >.

FERRY, B. et al. Analysis of microdialysate monoamines, including noradrenaline, dopamine and serotonin, using capillary ultra-high performance liquid chromatography and electrochemical detection. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 951-952, p. 52-7, 2014. ISSN 1873-376X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24508677> >.

FISHMAN, S. M.; BALLANTYNE, J. C.; RATHMELL, J. P. **Bonica's Management of Pain**. 2009.

GALEOTTI, N.; GHELARDINI, C. Reversal of NO-induced nociceptive hypersensitivity by St. John's wort and hypericin: NF- $\kappa$ B, CREB and STAT1 as molecular targets. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 227, n. 1, p. 149-63, 2013a. ISSN 1432-2072. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23254377> >.

\_\_\_\_\_. St. John's wort relieves pain in an animal model of migraine. **Eur J Pain**, v. 17, n. 3, p. 369-81, 2013b. ISSN 1532-2149. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23152076> >.

GALEOTTI, N. et al. St. John's Wort seed and feverfew flower extracts relieve painful diabetic neuropathy in a rat model of diabetes. **Fitoterapia**, v. 92, p. 23-33, 2014. ISSN 1873-6971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24125916> >.

\_\_\_\_\_. A prolonged protein kinase C-mediated, opioid-related antinociceptive effect of St. John's Wort in mice. **J Pain**, v. 11, n. 2, p. 149-59, 2010. ISSN 1528-8447. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19945352> >.

\_\_\_\_\_. St. John's Wort reduces neuropathic pain through a hypericin-mediated inhibition of the protein kinase C $\gamma$  and epsilon activity. **Biochem Pharmacol**, v. 79, n. 9, p. 1327-36, 2010. ISSN 1873-2968. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20045676> >.

GERACIOTI, T. D. et al. Continuous covariability of dopamine and serotonin metabolites in human cerebrospinal fluid. **Biol Psychiatry**, v. 44, n. 3, p. 228-33, 1998. ISSN 0006-3223. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9693394> >.

GIUSTI, P. et al. Effect of acute and chronic tramadol on [3H]-5-HT uptake in rat cortical synaptosomes. **Br J Pharmacol**, v. 122, n. 2, p. 302-6, 1997. ISSN 0007-1188. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9313939> >.

HAGELBERG, N. et al. Striatal dopamine D2 receptors in modulation of pain in humans: a review. **Eur J Pharmacol**, v. 500, n. 1-3, p. 187-92, 2004. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15464032> >.

HAINES, D. E. **Fundamental of Neuroscience**. New York: Churchill Livingstone, 1997.

HUBBARD, K. E. et al. Determination of dopamine, serotonin, and their metabolites in pediatric cerebrospinal fluid by isocratic high performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection. **Biomed Chromatogr**, v. 24, n. 6, p. 626-31, 2010. ISSN 1099-0801. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19810006> >.

KAPLAN, G. P.; HARTMAN, B. K.; CREVELING, C. R. Immunohistochemical demonstration of catechol-o-methyltransferase in mammalian brain. **Brain Res**, v. 167, n. 2, p. 241-50, 1979. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/376064> >.

KARHUNEN, T. et al. Catechol-O-methyltransferase (COMT) in rat brain: immunoelectron microscopic study with an antiserum against rat recombinant COMT protein. **Neurosci Lett**, v. 187, n. 1, p. 57-60, 1995a. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7617303> >.

\_\_\_\_\_. Neuronal and non-neuronal catechol-O-methyltransferase in primary cultures of rat brain cells. **Int J Dev Neurosci**, v. 13, n. 8, p. 825-34, 1995b. ISSN 0736-5748. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8770656> >.

KASTNER, A. et al. Immunohistochemical study of catechol-O-methyltransferase in the human mesostriatal system. **Neuroscience**, v. 62, n. 2, p. 449-57, 1994. ISSN 0306-4522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7830891> >.

LINDE, K. St. John's wort - an overview. **Forsch Komplementmed**, v. 16, n. 3, p. 146-55, 2009. ISSN 1661-4127. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19657198> >.

LINDE, K.; BERNER, M.; KRISTON, L. St John's wort for major depression. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 4, 151, 2008. ISSN 1469-493X.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Prog Neurobiol**, v. 66, n. 6, p. 355-474, 2002. ISSN 0301-0082. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12034378> >.

MUNARI, L. **Avaliação do efeito de um extrato lipofílico de *Hypericum caprifoliatum* Cham. & Schlttdl sobre os níveis de dopamina e seus metabólitos através de microdialise cerebral em ratos consciêntes.** 2006. 145 (MSc). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre.

NUNES, J. et al. Promotive effects of long-term fertilization on growth of tissue culture-derived *Hypericum polyanthemum* plants during acclimatization. **Industrial Crops and Products**, v. 30, n. 2, p. 329-332, 2009. ISSN 0926-6690.

PARKER, W. L.; JOHNSON, F. The structure determination of antibiotic compounds from *Hypericum uliginosum*. I. **J Am Chem Soc**, v. 90, n. 17, p. 4716-23, 1968. ISSN 0002-7863. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5661141> >.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates.** New York: Academic Press, 1998. 456.

PLISZKA, S. R. **Neurociência para o clínico de saúde mental.** Porto Alegre: Artmed, 2004.

PLOCK, N.; KLOFT, C. Microdialysis--theoretical background and recent implementation in applied life-sciences. **Eur J Pharm Sci**, v. 25, n. 1, p. 1-24, 2005. ISSN 0928-0987. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15854796> >.

ROCHA, L. et al. Antibacterial phloroglucinols and flavonoids from *Hypericum brasiliense*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1447-52, 1995. ISSN 0031-9422. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8534402> >.

ROMMELSPACHER, H.; SIEMANOWITZ, B.; MANNEL, M. Acute and chronic actions of a dry methanolic extract of *Hypericum perforatum* and a hyperforin-rich extract on dopaminergic and serotonergic neurones in rat nucleus accumbens. **Pharmacopsychiatry**, v. 34 Suppl 1, p. S119-26, 2001. ISSN 0176-3679. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11518060> >.

RUSSO, E. et al. *Hypericum perforatum*: pharmacokinetic, mechanism of action, tolerability, and clinical drug-drug interactions. **Phytother Res**. 28(5):643-55, 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23897801> >.

SCOTT, D. J. et al. Variations in the human pain stress experience mediated by ventral and dorsal basal ganglia dopamine activity. **J Neurosci**, v. 26, n. 42, p. 10789-95, 2006. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17050717> >.

SIVAM, S. P. Dopaminergic modulation of serotonin metabolism in rat striatum: a study with dopamine uptake inhibitor GBR-12909. **Life Sci**, v. 56, n. 26, p. PL467-72, 1995. ISSN 0024-3205. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7540709> >.

STEIN, A. C. et al. Uliginosin B, a phloroglucinol derivative from *Hypericum polyanthemum*: a promising new molecular pattern for the development of antidepressant drugs. **Behav Brain Res**, v. 228, n. 1, p. 66-73, 2012. ISSN 1872-7549. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22155486> >.

STHAL, S. M. **Stahl's Essential Psychopharmacology: Neuroscientific Basis and Practical Applications**. New York: Cambridge University Press, 2008. ISBN 9780511447990.

STOLZ, E. D. et al. Uliginosin B presents antinociceptive effect mediated by dopaminergic and opioid systems in mice. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 39, n. 1, p. 80-7, 2012. ISSN 1878-4216. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22627196> >.

SUSTKOVA-FISEROVA, M. et al. Ghrelin receptor antagonism of morphine-induced accumbens dopamine release and behavioral stimulation in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 231, n. 14, p. 2899-908, 2014. ISSN 1432-2072. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24531567> >.

TAO, R.; AUERBACH, S. B. Anesthetics block morphine-induced increases in serotonin release in rat CNS. **Synapse**, v. 18, n. 4, p. 307-14, 1994a. ISSN 0887-4476. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7886623> >.

\_\_\_\_\_. Increased extracellular serotonin in rat brain after systemic or intraperitoneal administration of morphine. **J Neurochem**, v. 63, n. 2, p. 517-24, 1994b. ISSN 0022-3042. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7518500> >.

TAYLOR, A. M. et al. Correlation between ventral striatal catecholamine content and nociceptive thresholds in neuropathic mice. **J Pain**, v. 15, n. 8, p. 878-85, 2014. ISSN 1528-8447. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25052072> >.

UNGERSTEDT, U.; PYCOCK, C. Functional correlates of dopamine neurotransmission. **Bull Schweiz Akad Med Wiss**, v. 30, n. 1-3, p. 44-55, 1974. ISSN 0036-7494. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4371656> >.

VIANA, A. **Estudo de moléculas potencialmente antidepressivas e analgésicas de espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul**. 2007. 196 (Ph.D.). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

VIANA, A. et al. The antidepressant-like effect of *Hypericum caprifoliatum* Cham & Schlecht (Guttiferae) on forced swimming test results from an inhibition of neuronal monoamine uptake. **Neuropharmacology**, v. 49, n. 7, p. 1042-52, 2005. ISSN 0028-3908. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16040063> >.

VIANA, A. F. et al. *Hypericum caprifoliatum* (Guttiferae) Cham. & Schltdl.: a species native to South Brazil with antidepressant-like activity. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 20, n. 6, p. 507-14, 2006. ISSN 0767-3981. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17109644> >.

\_\_\_\_\_. Antinociceptive activity of *Hypericum caprifoliatum* and *Hypericum polyanthemum* (Guttiferae). **Braz J Med Biol Res**, v. 36, n. 5, p. 631-4, 2003. ISSN 0100-879X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12715083> >.

VILLEMURE, C.; LAFERRIÈRE, A. C.; BUSHNELL, M. C. The ventral striatum is implicated in the analgesic effect of mood changes. **Pain Res Manag**, v. 17, n. 2, p. 69-74, 2012. ISSN 1203-6765. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22518367> >.

WALDMEIER, P. C.; DELINI-STULA, A. A. Serotonin--dopamine interactions in the nigrostriatal system. **Eur J Pharmacol**, v. 55, n. 4, p. 363-73, 1979. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/572774> >.

WOOD, P. B. Role of central dopamine in pain and analgesia. **Expert Rev Neurother**, v. 8, n. 5, p. 781-97, May 2008. ISSN 1744-8360. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18457535>>.

WOOD, P. L.; ALTAR, C. A. Dopamine release in vivo from nigrostriatal, mesolimbic, and mesocortical neurons: utility of 3-methoxytyramine measurements. **Pharmacol Rev**, v. 40, n. 3, p. 163-87, 1988. ISSN 0031-6997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3065792>>.

WAŚIK, A.; ROMAŃSKA, I.; ANTKIEWICZ-MICHALUK, L. Important role of 3-methoxytyramine in the inhibition of cocaine sensitization by 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline: an in vivo microdialysis study. **Pharmacol Rep**, v. 62, n. 6, p. 983-97, 2010. ISSN 1734-1140. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21273655>>.

YOSHITAKE, T. et al. *Hypericum perforatum* L (St John's wort) preferentially increases extracellular dopamine levels in the rat prefrontal cortex. **Br J Pharmacol**, v. 142, n. 3, p. 414-8, 2004. ISSN 0007-1188. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15148244>>.

ZENGIN-TOKTAS, Y. et al. Bilateral lesions of the nigrostriatal pathways are associated with chronic mechanical pain hypersensitivity in rats. **Neurosci Res**, v. 76, n. 4, p. 261-4, 2013. ISSN 1872-8111. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23684766>>.



## **CAPÍTULO II**

**Uliginosin B, a natural phloroglucinol derivative, presents a multi-mediated antinociceptive effect in mice**



Este capítulo foi publicado no periódico *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 66 (2014) 1774-1785, sob doi número 10.1111/jphp.12307. Em resumo, investigou o envolvimento da neurotransmissão monoaminérgica e glutamatérgica sobre os efeitos antinociceptivo e atáxico de uliginosina B. Os principais resultados indicaram que o efeito antinociceptivo de uliginosina B é: (i) prevenido parcialmente por *p*CPA (inibidor da síntese de serotonina) e MK-801 (antagonista de receptores glutamatérgicos NMDA); (ii) aumentado por prazosina e ioimbina (antagonistas de receptores noradrenérgicos  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ , respectivamente). O efeito atáxico de uliginosina B foi: (i) prevenido por *p*CPA e MK-801; (ii) inalterado por prazosina e ioimbina.



## **CAPÍTULO III**

**Determination of pharmacological interactions of uliginosin B, a natural phloroglucinol derivative, with amitriptyline, clonidine and morphine by isobolographic analysis**



Este capítulo foi publicado no periódico *Phytomedicine* 21 (2014) 1684–1688, sob doi número 10.1016/j.phymed.2014.08.009. Em suma, o objetivo deste estudo foi aprofundar o conhecimento sobre o mecanismo de ação antinociceptiva de uliginosina B através de sua co-administração com fármacos utilizados na clínica para o alívio da dor. Os principais resultados da análise isobolográfica demonstram que a combinação de uliginosina B com morfina (agonista opioide) tem interação sinérgica, enquanto as combinações de uliginosina B com amitriptilina (inibidor da recaptação de monoaminas) e com clonidina (agonista noradrenérgico  $\alpha_2$ ) apresentaram interações aditivas. Estes dados indicam que o envolvimento da neurotransmissão monoaminérgica no efeito antinociceptivo da uliginosina B e apontam o uso desta substância como adjuvante da analgesia opioide.







## **CAPÍTULO IV**

**Uliginosin B, a natural antinociceptive agent, modulates the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity and present effect mediated by purinergic system**



Este capítulo será submetido na forma de artigo ao periódico *Journal of Natural Products*, intitulado “Uliginosina B, a natural antinociceptive agent, modulates the  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity and present effect mediated by purinergic system” de autoria de E.D. Stolz, P.F. da Costa, L.F. Medeiros, A. Souza, A.M.O. Battastini, G.L. von Poser, P.O. Feijó, F. Noël, L.E.M. Quintas, I.L.S. Torres, S.M.K. Rates. Este estudo teve como objetivo investigar o envolvimento do sistema purinérgico no efeito antinociceptivo da uliginosina B, bem como avaliar sua ação sobre a atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. Os resultados chave deste estudo mostram que: (i) o efeito antinociceptivo de uliginosina B foi prevenido por DPCPX e ZM-241385 (antagonistas de receptores adenosinérgicos  $A_1$  e  $A_{2A}$ , respectivamente); (ii) o tratamento com uliginosina B aumenta a hidrólise de AMP e ATP, na medula espinhal e córtex cerebral, respectivamente; (iii) *in vitro* a uliginosina B inibe a atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. Este conjunto de resultados indicam que a ativação de vias purinérgicas contribui para as propriedades antinociceptivas de uliginosina B.

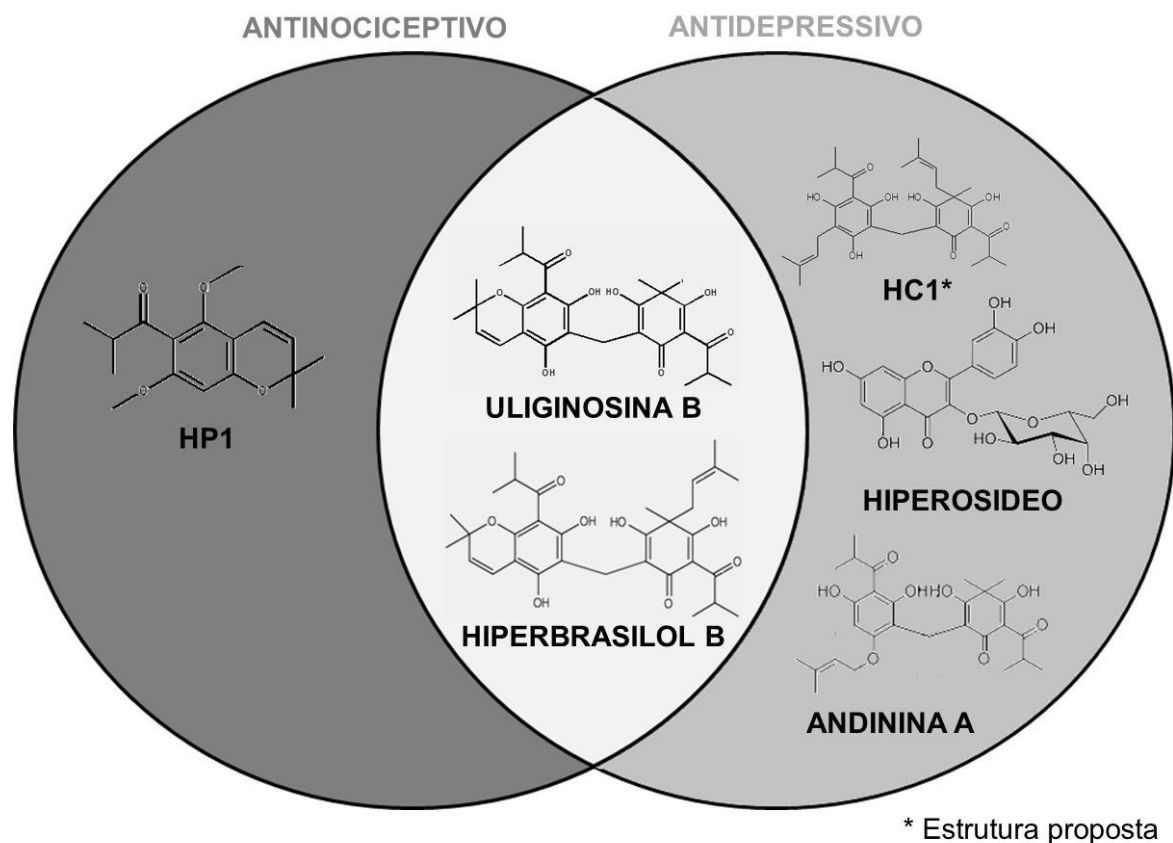


## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**



A presente tese visou contribuir para o entendimento do mecanismo de ação antinociceptiva da uliginosina B, um derivado acilfloroglucinol dimérico isolado de espécies de *Hypericum* nativas da América do Sul. Trabalhos anteriores do grupo de pesquisa coordenado pelas prof. Dr. Stela M. K. Rates e prof. Dr. Gilsane L. von Poser têm demonstrado que as espécies de *Hypericum* brasileiras apresentam um padrão molecular promissor para o desenvolvimento de protótipos neuroativos, em especial por acumular derivados acilfloroglucinois (Viana, 2002; 2007; Viana *et al.*, 2003; 2005; 2006; von Poser, Rech e Rates, 2006; Haas *et al.*, 2010; Rates *et al.*, 2010; Haas *et al.*, 2011; Stolz, 2011; Centurião, 2012; Sakamoto, 2012; Stein, 2012; Stein *et al.*, 2012; Stolz *et al.*, 2012; Ccana-Ccapatinta, 2014; Ccana-Ccapatinta *et al.*, 2014; Centurião *et al.*, 2014a; 2014b). A Figura 1 apresenta um esquema com as moléculas avaliadas em ensaios preditivos de ação antidepressiva e/ou analgésica. Outras sete moléculas, com padrão estrutural semelhante, algumas inéditas, estão sendo investigadas em testes de nocicepção (dados preliminares, não publicados). Além disto, outros grupos de pesquisa também têm investido no estudo de moléculas com este padrão estrutural (Bohr *et al.*, 2005; Koeberle *et al.*, 2009; Rossi *et al.*, 2009; Galeotti *et al.*, 2010a; 2010b; 2013a; 2013b; 2013c; 2014a; 2014b; Socolsky *et al.*, 2012; Duarte *et al.*, 2014), inclusive gerando patentes para propriedades analgésica e anti-inflamatória (Hillwig e Ames, 2010). Estes dados incentivam o desenvolvimento de pesquisas com derivados acilfloroglucinois, sobretudo os prenilados.





**Figura 1. Esquema demonstrando os compostos isolados de espécies de *Hypericum* sul-americanas que apresentam efeitos antinociceptivo (cinza escuro), antidepressivo (cinza intermediário) ou ambos (cinza claro).**

A investigação da ação central da uliginosina B foi objeto de um depósito de patente (Rates *et al.*, 2010), de uma dissertação de mestrado (Stolz, 2011) e de quatro teses de doutorado (Viana, 2007; Stein, 2012), incluindo esta tese e outra em andamento. Outros grupos de pesquisa também têm direcionado esforços para estudar esta molécula, propondo sua síntese e estrutura tridimensional (Leal *et al.*, 2010; Kraus e Liu, 2012).

Os dados descritos para a uliginosina B, até a presente tese, demonstravam que o tratamento com este derivado acilfloroglucinol apresenta efeito do tipo antidepressivo e antinociceptivo (Stein *et al.*, 2012; Stolz *et al.*, 2012). A ação antidepressiva envolve a ativação de receptores monoaminérgicos (Stein *et al.*, 2012), enquanto o efeito antinociceptivo envolve receptores opioides e dopaminérgicos da família D<sub>2</sub> (Stolz *et al.*, 2012). Em doses elevadas (6-10 vezes maiores que a antinociceptiva e antidepressiva), o tratamento com uliginosina B

induz efeito atáxico, mediado por receptores opioides e dopaminérgicos, das famílias  $D_1$  e  $D_2$  (Stolz *et al.*, 2012). Estes dados indicam que vias opioides e monoaminérgicas estão envolvidas de maneira diferente nos efeitos da uliginosina B, entretanto, sabe-se que a uliginosina B não ativa estes receptores (Viana, 2007; Stolz *et al.*, 2012). O mecanismo de ação exato, responsável por estes efeitos, ainda não foi elucidado, mas parece envolver o aumento da disponibilidade de monoaminas na fenda sináptica, especialmente dopamina (Stein *et al.*, 2012).

Os resultados apresentados nesta tese revelam que o tratamento com uliginosina B aumenta a disponibilidade de dopamina e HVA (ácido homovanílico) no estriado de roedores, confirmando o resultado *in vitro* apresentado por Stein e colaboradores (2012). É sabido que o déficit de dopamina nesta região está envolvido em distúrbios motores, como o Parkinsonismo, entretanto concentrações aumentadas induzem movimentos desnecessários/exagerados (“tiques motores”) que podem estar associados ao efeito atáxico descrito para a uliginosina B (Stolz *et al.*, 2012). Além disto, estudos têm apontado relação direta entre os níveis de dopamina e dor, embasados, sobretudo, em indícios de que antagonistas dopaminérgicos atenuam a capacidade analgésica (Wood, 2008).

Completando o estudo do envolvimento das vias monoaminérgicas (serotoninérgica e noradrenérgica) nos efeitos de uliginosina B, foram investigados o efeito dos pré-tratamentos com inibidor da síntese de serotonina (*p*CPA) e antagonistas de receptores noradrenérgicos  $\alpha_1$  (prazosina) e  $\alpha_2$  (ioimbina) na atividade motora e antinociceptiva de camundongos. O efeito atáxico induzido por uliginosina B foi prevenido parcialmente quando a síntese de serotonina foi inibida, enquanto que o antagonismo noradrenérgico não alterou o efeito da molécula estudada. Este envolvimento discreto da neurotransmissão serotoninérgica sobre o efeito atáxico pode estar associado ao aumento na disponibilidade de serotonina relatado previamente (Stein *et al.*, 2012) e, permite inferir que este efeito é decorrente de uma modulação indireta deste circuito. De fato, há relatos de modulação de neurônios dopaminérgicos da via nigro-estriatal por projeções serotoninérgicas do núcleo dorsal da rafe (Wirtshafter, Stratford e Asin, 1987; Reed, Nijhout e Best, 2013). Tais hipóteses também podem justificar o efeito de *p*CPA, que preveniu parcialmente o efeito antinociceptivo de uliginosina B. Este efeito ainda

pode estar relacionado à modulação de vias descendentes inibitórias, as quais regulam a transmissão do estímulo doloroso através da liberação de serotonina (Millan, 2002; Fishman, Ballantyne e Rathmell, 2009).

A atividade antinociceptiva produzida por uliginosina B foi aumentada na presença de antagonistas noradrenérgicos, somente na dose mais alta (90 mg/kg, i.p.), que também induz efeito atáxico. É importante ressaltar que o prejuízo motor detectado no rotarod é indicativo de falsos positivos no teste da placa aquecida e este prejuízo pode ser interpretado como uma série de efeitos colaterais, tais como: hipotensão, catalepsia, sedação ou ação relaxante muscular (Plummer *et al.*, 1991; Le Bars, Gozariu e Cadden, 2001); além disto, é sabido que antagonistas noradrenérgicos apresentam efeito hipotensor (Brunton *et al.*, 2007) - não detectado nas doses investigadas neste estudo. Assim, a hipótese mais coerente para justificar o efeito aumentado no tratamento com antagonistas noradrenérgicos associados à uliginosina B é uma interação entre os efeitos motores descritos para estas substâncias, que poderiam gerar um aumento no tempo de latência no teste da placa-aquecida. Esta teoria precisa ser investigada, utilizando delineamento experimental adequado.

A fim de tentar elucidar o envolvimento da neurotransmissão noradrenérgica no efeito antinociceptivo de uliginosina B, foi realizado um ensaio de coadministração com agonista  $\alpha_2$ -noradrenérgico (clonidina). A clonidina é um adjuvante frequentemente utilizado na clínica no tratamento da dor; a literatura clássica (Brunton *et al.*, 2007) sugere que seu mecanismo de ação envolva a supressão da liberação de noradrenalina pós-ganglionar, bem como redução dos níveis plasmáticos, entretanto, estudos indicam que a administração intratecal aumenta a disponibilidade de noradrenalina nas vias descendentes que inibem a transmissão do estímulo doloroso e aumenta a acetilcolina no corno dorsal da medula espinhal, modulando o estímulo nociceptivo (Klimscha, Tong e Eisenach, 1997). Análise isobolar evidenciou que a associação entre uliginosina B e clonidina produz uma interação aditiva, indicando que ambas as substâncias atuam em vias semelhantes e, provavelmente, envolvem a neurotransmissão noradrenérgica.

O envolvimento da neurotransmissão monoaminérgica no mecanismo de ação da uliginosina B foi reforçado nos ensaios de associação com amitriptilina

(antidepressivo tricíclico) e morfina (analgésico opioide). A coadministração de uliginosina B e amitriptilina apresentou interação aditiva, enquanto a coadministração com morfina apresentou interação sinérgica. Estes dados corroboram com os achados prévios descritos para a uliginosina B, evidenciando-se o envolvimento monoaminérgico no seu mecanismo de ação, visto que a amitriptilina também apresenta efeito por aumentar a disponibilidade de monoaminas e a morfina sabidamente interage sinérgicamente com substâncias que aumentam os níveis extracelulares de monoaminas (Eisenach e Gebhart, 1995; Luccarini *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2013). Um dos principais aspectos levantados por este estudo foi a possibilidade de inserção da uliginosina B como adjuvante no tratamento com opioides. O tratamento com opioides, além de apresentar efeitos adversos graves, apresenta efeito-teto analgésico, ou seja, independente do quanto se aumente a dose de morfina, o efeito analgésico permanece inalterado, enquanto os efeitos adversos são aumentados, podendo levar à morte por insuficiência respiratória (Brunton *et al.*, 2007). Neste contexto, alternativas farmacológicas que potencializem o efeito analgésico da morfina são importantes na clínica.

Todo o conjunto de resultados apresentados para a uliginosina B reforça o envolvimento da neurotransmissão monoaminérgica em seus efeitos. Entretanto, o gatilho responsável pelo aumento na disponibilidade destes neurotransmissores permanece desconhecido. Stein (2012) e Viana (2007) em suas teses defendem a hipótese de que a uliginosina B poderia atuar alterando a fluidez das membranas neuronais, de maneira semelhante ao descrito para a hiperforina – um derivado floroglucinol monomérico prenilado, estruturalmente relacionado à uliginosina B. Esta teoria poderia justificar o mecanismo de ação multirreceptor da uliginosina B. Na presente tese, buscou-se investigar outras possibilidades que poderiam justificar o mecanismo de ação da uliginosina B; assim, avaliou-se o envolvimento de três vias que modulam a disponibilidade de monoaminas: o sistema glutamatérgico através dos receptores NMDA, o sistema purinérgico através de receptores de adenosina e da hidrólise do ATP, ADP e AMP, e a atividade da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase.

O pré-tratamento com MK-801 (antagonista de receptores NMDA) preveniu parcialmente os efeitos antinociceptivo e atáxico induzidos por uliginosina B. Sabe-

se que o antagonismo NMDA provoca redução na liberação de monoaminas encefálicas (Kiss e Vizi, 2001; Sthal, 2008), assim, é provável que o pré-tratamento com MK-801 tenha impedido a uliginosina B de aumentar a disponibilidade destes neurotransmissores na fenda sináptica. Entretanto, outras hipóteses podem justificar este efeito, dentre elas, o fato da uliginosina B poder atuar como um ligante de receptores NMDA ou um modulador da homeostase iônica. Uma ação direta da uliginosina B sobre a liberação ou captação de glutamato é improvável, visto que Centurião (2012) demonstrou que uma mistura de derivados floroglucinol diméricos estruturalmente relacionados a uliginosina B não apresentam estes efeitos *in vitro*.

Nesta tese demonstrou-se ainda que os pré-tratamentos com DPCPX (antagonista de receptores  $A_1$ ) e ZM-241385 (antagonista de receptores  $A_{2A}$ ) preveniram completamente o efeito antinociceptivo de uliginosina B. Além disto, o tratamento com uliginosina B aumentou a hidrólise do AMP na medula espinhal, levando a um aumento nos níveis extracelulares de adenosina. O tratamento com uliginosina B também aumentou a hidrólise de ATP no córtex cerebral, que pode, entre outras ações, culminar em aumento nos níveis extracelulares de adenosina encefálica. Sabe-se que a adenosina e/ou agonistas adenosinérgicos modulam a liberação de dopamina (Zetterström e Fillenz, 1990; Okada, Mizuno e Kaneko, 1996), serotonina (Barraco, Helfman e Anderson, 1996; Helfman *et al.*, 1996; Okada *et al.*, 1997) e glutamato (Cunha *et al.*, 1994; Ambrósio *et al.*, 1997) em algumas regiões encefálicas, e ainda que a liberação de adenosina pode ser modulada pela ativação destes neurotransmissores (Sweeney, White e Sawynok, 1988; 1990; Sawynok e Reid, 1991; Millan, 2002; Pereira, 2005), bem como por opioides (Sawynok *et al.*, 1989; 1990; Sawynok, 1998; Sawynok e Liu, 2003). Os dados descritos para a uliginosina B apontam para um mecanismo de ação envolvendo toda esta circuitaria.

A enzima  $Na^+,K^+$ -ATPase é outro agente que está implicado no processo de recaptação de monoaminas; sua inibição/antagonismo parece diminuir a recaptação de noradrenalina (Vatta *et al.*, 2004), serotonina e dopamina (Steffens e Feuerstein, 2004). Nesta tese demonstrou-se através de ensaios *in vitro* que a uliginosina B inibe a atividade da  $Na^+,K^+$ -ATPase em cérebro total (isoforma  $\alpha_3$ ) e rins (isoforma

$\alpha 1$ ) de ratos. Esses dados poderiam explicar o mecanismo responsável pela inibição da recaptação de monoaminas descrito para a uliginosina B (Stein *et al.*, 2012).

Com este trabalho foi aprofundado o conhecimento acerca do mecanismo de ação da uliginosina B, um derivado acilfloroglucinol dimérico obtido de espécies de *Hypericum* sul-americanas. Demonstrou-se, pela primeira vez, o envolvimento de vias glutamatérgicas e adenosinérgicas no mecanismo de ação da uliginosina B. Além disto, evidenciou-se um possível uso clínico para esta substância, em associação com a morfina. De maneira geral, os resultados permitem sugerir que o cerne do mecanismo de ação antinociceptiva da uliginosina B é decorrente do aumento da disponibilidade encefálica de monoaminas, especialmente dopamina, e da disponibilidade de adenosina, sobretudo na medula espinhal. Contudo, estes dados são insuficientes para afirmar se a adenosina é responsável pela alteração nas concentrações extracelulares de monoaminas ou vice-versa. É fundamental investigar a correlação entre os níveis extracelulares destes neurotransmissores. No presente estudo também evidenciou-se a participação de vias glutamatérgicas no mecanismo de ação da uliginosina B e reforçou-se o seu envolvimento no balanço iônico resultante da ação da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase.

Inúmeras hipóteses podem ser levantadas para justificar os efeitos da uliginosina B resultantes do aumento na concentração de monoaminas e adenosina. Entre eles destaca-se: (1) a ação da adenosina modulando o balanço iônico e a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, com consequente redução na recaptação de monoaminas (Hussain, Ali e Chandra, 1987; Lesch *et al.*, 1993; Caruso-Neves *et al.*, 1997; Zeng *et al.*, 1999; Grbović e Radenković, 2003; Radenković *et al.*, 2005; Wengert *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2009; Broch-Lips, Pedersen e Nielsen, 2010); (2) monoaminas e glutamato sendo coliberados com ATP e este defosforilado a adenosina (Sneddon e Burnstock, 1984; Sperrágh *et al.*, 1998; Burnstock, 1999; Poelchen *et al.*, 2001; Burnstock, 2004; 2006a; 2006b; 2006c; 2006d; 2006e; 2009; Kanno, Yaguchi e Nishizaki, 2010; Burnstock, Fredholm e Verkhatsky, 2011); (3) a ativação dos mais variados circuitos envolvendo vias dopaminérgicas e adenosinérgicas, incluindo, em muitos casos, regulação glutamatérgica, opioide e GABAérgica (Zetterström e Fillenz, 1990; Okada, Mizuno e Kaneko, 1996; Ferré *et al.*, 2008; Wardas, 2008; Azdad *et al.*, 2009; Filip *et al.*, 2012; Fuxe *et al.*, 2012).

Contudo, os dados levantados até o momento para a uliginosina B não permitem avançar nesta discussão.

A partir dos dados discutidos nesta tese conclui-se que, embora o conjunto de resultados apresentados para a uliginosina B não permita identificar um sítio de ação específico para a uliginosina B, demonstra um perfil dependente da ativação de múltiplas vias (monoaminérgicas, glutamatérgicas, opioides, adenosinérgicas e balanço iônico), requisitadas com importância diferenciada de acordo com o estímulo recebido pelo animal. Este perfil reforça a importância de estudos com a uliginosina B visando um novo padrão molecular, promissor no desenvolvimento de novos fármacos com ação analgésica e/ou antidepressiva, com mecanismo de ação distinto dos fármacos disponíveis no mercado. Este fato é reafirmado na revisão apresentada por Wood (2008), que encoraja o desenvolvimento de fármacos analgésicos com ação em receptores  $D_2$ , envolvendo ou não outras vias.

## **REFERÊNCIAS**





ABDEL-SALAM, O. M. Anti-inflammatory, antinociceptive, and gastric effects of *Hypericum perforatum* in rats. **Scientific World Journal**, v. 5, p. 586-95, 2005. ISSN 1537-744X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16088341> >.

ALBERT, D. et al. Hyperforin is a dual inhibitor of cyclooxygenase-1 and 5-lipoxygenase. **Biochem Pharmacol**, v. 64, n. 12, p. 1767-75, 2002. ISSN 0006-2952. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12445866> >.

ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Res**, v. 1000, n. 1-2, p. 40-56, 2004. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15053950> >.

AMBRÓSIO, A. F. et al. Inhibition of N-,P/Q- and other types of Ca<sup>2+</sup> channels in rat hippocampal nerve terminals by the adenosine A1 receptor. **Eur J Pharmacol**, v. 340, n. 2-3, p. 301-10, Dec 1997. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9537827> >.

APAYDIN, S. et al. *Hypericum triquetrifolium* Turra. extract exhibits antinociceptive activity in the mouse. **J Ethnopharmacol**, v. 67, n. 3, p. 307-12, 1999. ISSN 0378-8741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10617065> >.

ARSIĆ, I. et al. Estimation of dermatological application of creams with St. John's Wort oil extracts. **Molecules**, v. 17, n. 1, p. 275-94, 2011. ISSN 1420-3049. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22205093> >.

AZDAD, K. et al. Dopamine D2 and adenosine A2A receptors regulate NMDA-mediated excitation in accumbens neurons through A2A-D2 receptor heteromerization. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, n. 4, p. 972-86, 2009. ISSN 1740-634X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18800071> >.

BARRACO, R. A.; HELFMAN, C. C.; ANDERSON, G. F. Augmented release of serotonin by adenosine A2a receptor activation and desensitization by CGS 21680 in the rat nucleus tractus solitarius. **Brain Res**, v. 733, n. 2, p. 155-61, 1996. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8891297> >.

BARROS et al. Supercritical extraction of phloroglucinol and benzophenone derivatives from *Hypericum carinatum*: quantification and mathematical modeling. **J Sep Sci**, v. 34, n. 21, p. 3107-13, 2011. ISSN 1615-9314. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21998018> >.

\_\_\_\_\_. Antifungal and antichemotactic activities and quantification of phenolic compounds in lipophilic extracts of *Hypericum* spp. native to South Brazil. **J Ind Crop**, v. 44, p. 294–299, 2013. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.11.017> >.

BASBAUM, A. I.; FIELDS, H. L. Endogenous pain control mechanisms: review and hypothesis. **Ann Neurol**, v. 4, n. 5, p. 451-62, 1978. ISSN 0364-5134. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/216303> >.

\_\_\_\_\_. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. **Annu Rev Neurosci**, v. 7, p. 309-38, 1984. ISSN 0147-006X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6143527> >.

BEAR, M. **Neurociências - Desevendando o Sistema Nervoso**. Porto Alegre: Artmed, 2008. 858.

BEERHUES, L. Hyperforin. **Phytochemistry**, v. 67, n. 20, p. 2201-7, 2006. ISSN 0031-9422. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16973193> >.

BETTI, A. H. et al. Acute and repeated-doses (28 days) toxicity study of *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt (Guttiferare) in mice. **Food Chem Toxicol**, v. 50, n. 7, p. 2349-55, 2012. ISSN 1873-6351. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22525862> >.

BIRT, D. F. et al. *Hypericum* in infection: Identification of anti-viral and anti-inflammatory constituents. **Pharm Biol**, v. 47, n. 8, p. 774-782, 2009. ISSN 1744-5116. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19907671> >.

BLONDELL, R. D.; AZADFARD, M.; WISNIEWSKI, A. M. Pharmacologic therapy for acute pain. **Am Fam Physician**, v. 87, n. 11, p. 766-72, 2013. ISSN 1532-0650. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23939498> >.

BOHR, G. et al. Anti-inflammatory acylphloroglucinol derivatives from Hops (*Humulus lupulus*). **J Nat Prod**, v. 68, n. 10, p. 1545-8, 2005. ISSN 0163-3864. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16252923> >.

BONKANKA, C. X.; SÁNCHEZ-MATEO, C. E. C.; RABANAL, R. M. Antinociceptive activity of *Hypericum grandifolium* Choisy in mice. **J Nat Med**, v. 65, n. 1, p. 122-8, 2011. ISSN 1861-0293. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20953723> >.

BROCH-LIPS, M.; PEDERSEN, T. H.; NIELSEN, O. B. Effect of purinergic receptor activation on Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump activity, excitability, and function in depolarized skeletal muscle. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 298, n. 6, p. C1438-44, 2010. ISSN 1522-1563. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20457838> >.

BRUNTON, L. L. et al. **Goodman & Gilman's: Manual of Pharmacology and Therapeutic** New York, USA: Mc Graw Hill, 2007. 1230.

BURNSTOCK, G. Purinergic cotransmission. **Brain Res Bull**, v. 50, n. 5-6, p. 355-7, 1999. ISSN 0361-9230. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10643434> >.

\_\_\_\_\_. Purine-mediated signalling in pain and visceral perception. **Trends Pharmacol Sci**, v. 22, n. 4, p. 182-8, Apr 2001. ISSN 0165-6147. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11282418> >.

\_\_\_\_\_. Cotransmission. **Curr Opin Pharmacol**, v. 4, n. 1, p. 47-52, 2004. ISSN 1471-4892. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15018838> >.

\_\_\_\_\_. Historical review: ATP as a neurotransmitter. **Trends Pharmacol Sci**, v. 27, n. 3, p. 166-76, 2006a. ISSN 0165-6147. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16487603> >.

\_\_\_\_\_. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. **Pharmacol Rev**, v. 58, n. 1, p. 58-86, 2006b. ISSN 0031-6997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16507883> >.

\_\_\_\_\_. Purinergic P2 receptors as targets for novel analgesics. **Pharmacol Ther**, v. 110, n. 3, p. 433-54, 2006c. ISSN 0163-7258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16226312> >.

\_\_\_\_\_. Purinergic signalling. **Br J Pharmacol**, v. 147 Suppl 1, p. S172-81, 2006d. ISSN 0007-1188. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16402102> >.

\_\_\_\_\_. Purinergic signalling--an overview. **Novartis Found Symp**, v. 276, p. 26-281, 2006e. ISSN 1528-2511. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16805422> >.

\_\_\_\_\_. Purinergic cotransmission. **Exp Physiol**, v. 94, n. 1, p. 20-4, 2009. ISSN 1469-445X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18723580> >.

BURNSTOCK, G.; FREDHOLM, B. B.; VERKHRATSKY, A. Adenosine and ATP receptors in the brain. **Curr Top Med Chem**, v. 11, n. 8, p. 973-1011, 2011. ISSN 1873-4294. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21401499> >.

BUKHARI, I. A.; DAR, A.; KHAN, R. A. Antinociceptive activity of methanolic extracts of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) preparation. **Pak J Pharm Sci**, v. 17, n. 2, p. 13-9, 2004. ISSN 1011-601X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16414593> >.

CARUSO-NEVES, C. et al. Effect of adenosine on the ouabain-insensitive Na<sup>+</sup>-ATPase activity from basolateral membrane of the proximal tubule. **Biochim Biophys Acta**, v. 1329, n. 2, p. 336-44, 1997. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9371425> >.

CCANA-CCAPATINTA, G. V. **Aspectos químicos e biológicos de espécies de *Hypericum* (Hypericaceae) das seções Brathys e Trigynobrathys nativas dos Páramos Peruanos**. 2014. (MSc). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

CCANA-CCAPATINTA, G. V. et al. Dimeric acylphloroglucinols in *Hypericum* species from sections Brathys and Trigynobrathys. **Phytochemistry Reviews**, p. 1-26, 2014. ISSN 1572-980X. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007/s11101-013-9332-2> >.

CENTURIÃO, F. B. **Avaliação do efeito de derivados floroglucínóis presentes em *Hypericum caprifoliatum* sobre parâmetros glutamatérgicos e parâmetros relacionados à homeostasia dos íons sódio em roedores**. 2012. 143 (PhD). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

CENTURIÃO, F. B. et al. Study of antidepressant-like activity of an enriched phloroglucinol fraction obtained from *Hypericum caprifoliatum*. **Pharm Biol**, v. 52, n. 1, p. 105-10, 2014a. ISSN 1744-5116. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24102122> >.

\_\_\_\_\_. The antidepressant-like effect of hyperbrasilol B, a natural dimeric phloroglucinol derivative is prevented by veratrine, a sensitive-voltage Na<sup>+</sup> channel opener **European Journal of Medicinal Plants**, v. 4, n. 11, p. 14, 2014b.

CERVO, L. et al. Potential antidepressant properties of IDN 5491 (hyperforin-trimethoxybenzoate), a semisynthetic ester of hyperforin. **European Neuropsychopharmacology**, v. 15, n. 2, p. 211-218, 2005. ISSN 0924-977X.

CHATTERJEE, S. et al. Hyperforin attenuates various ionic conductance mechanisms in the isolated hippocampal neurons of rat. **Life Sciences**, v. 65, n. 22, p. 2395-2405, 1999. ISSN 0024-3205.

\_\_\_\_\_. Hyperforin as a possible antidepressant component of *Hypericum* extracts. **Life Sci**, v. 63, n. 6, p. 499-510, 1998a. ISSN 0024-3205. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9718074> >.

\_\_\_\_\_. Antidepressant activity of *Hypericum perforatum* and hyperforin: the neglected possibility. **Pharmacopsychiatry**, v. 31 Suppl 1, p. 7-15, 1998b. ISSN 0176-3679. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9684942> >.

CHOU, R. et al. Research gaps on use of opioids for chronic noncancer pain: findings from a review of the evidence for an American Pain Society and American Academy of Pain Medicine clinical practice guideline. **J Pain**, v. 10, n. 2, p. 147-59, 2009. ISSN 1528-8447. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19187891> >.

CRAGG, G. M. et al. The impact of the United Nations Convention on Biological Diversity on natural products research. **Nat Prod Rep**, v. 29, n. 12, p. 1407-23, 2012. ISSN 1460-4752. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23037777> >.

CROCKETT, S. L.; ROBSON, N. K. Taxonomy and Chemotaxonomy of the Genus *Hypericum*. **Med Aromat Plant Sci Biotechnol**, v. 5, n. Special Issue 1, p. 1-13, 2011. ISSN 1752-3389. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22662019> >.

CUNHA, R. A. et al. Evidence for functionally important adenosine A2a receptors in the rat hippocampus. **Brain Res**, v. 649, n. 1-2, p. 208-16, 1994. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7953635> >.

DAHAN, A. et al. Pharmacovigilance: a review of opioid-induced respiratory depression in chronic pain patients. **Pain Physician**, v. 16, n. 2, p. 85-94, 2013. ISSN 2150-1149. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23511694> >.

DIKMEN, M. et al. Evaluation of the wound healing potentials of two subspecies of *Hypericum perforatum* on cultured NIH3T3 fibroblasts. **Phytother Res**, v. 25, n. 2, p. 208-14, 2011. ISSN 1099-1573. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20632305> >.

DUARTE, M. O. et al. Phloroglucinol derivatives present an antidepressant-like effect in the mice tail suspension test (TST). **Nat Prod Commun**, v. 9, n. 5, p. 671-4, 2014. ISSN 1934-578X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25026718> >.

DUNWIDDIE, T. V.; DIAO, L.; PROCTOR, W. R. Adenine nucleotides undergo rapid, quantitative conversion to adenosine in the extracellular space in rat hippocampus. **J Neurosci**, v. 17, n. 20, p. 7673-82, Oct 1997. ISSN 0270-6474. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9315889> >.

DWORKIN, R. H. et al. Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations. **Pain**, v. 132, n. 3, p. 237-51, 2007. ISSN 1872-6623. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17920770> >.

EISENACH, J. C.; GEBHART, G. F. Intrathecal amitriptyline. Antinociceptive interactions with intravenous morphine and intrathecal clonidine, neostigmine, and carbamylcholine in rats. **Anesthesiology**, v. 83, n. 5, p. 1036-45, 1995. ISSN 0003-3022. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7486154> >.

FEISST, C.; WERZ, O. Suppression of receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> mobilization and functional leukocyte responses by hyperforin. **Biochem Pharmacol**, v. 67, n. 8, p. 1531-9, 2004. ISSN 0006-2952. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15041470> >.

FERRAZ et al. Screening for the presence of hypericins in southern Brazilian species of *Hypericum*. **Pharmaceutical Biology**. v. 4, p. 294-7, 2002.

\_\_\_\_\_. Uliginosin B from *Hypericum myrianthum* Cham. & Schldl. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, p. 989-991, 2002.

FERRÉ, S. et al. An update on adenosine A<sub>2A</sub>-dopamine D<sub>2</sub> receptor interactions: implications for the function of G protein-coupled receptors. **Curr Pharm Des**, v. 14, n. 15, p. 1468-74, 2008. ISSN 1873-4286. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18537670> >

FERREIRA, M. B. C.; TORRES, I. L. S. Dor crônica. In: KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J., et al (Ed.). **Bases biológicas de transtornos psiquiátricos**. 2 nd. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.347-365.

FIELDS, H. L.; BASBAUM, A. I. Brainstem control of spinal pain-transmission neurons. **Annu Rev Physiol**, v. 40, p. 217-48, 1978. ISSN 0066-4278. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/205165> >.

FILIP, M. et al. The importance of the adenosine A(2A) receptor-dopamine D(2) receptor interaction in drug addiction. **Curr Med Chem**, v. 19, n. 3, p. 317-55, 2012. ISSN 1875-533X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22335511> >.

FISHMAN, S. M.; BALLANTYNE, J. C.; RATHMELL, J. P. **Bonica's Management of Pain**. 4 ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2009.

FISUNOV, A. et al. Hyperforin modulates gating of P-type Ca<sup>2+</sup> current in cerebellar Purkinje neurons. **Pflugers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 440, n. 3, p. 427-434, 2000. ISSN 0031-6768.

FUNDAÇÃO GRÜNENTHAL. **Abordagem bio-social da dor crónica: Dor como doença**. Portugal, 2008, 14.

FURLAN, A. D. et al. Opioids for chronic noncancer pain: a new Canadian practice guideline. **CMAJ**, v. 182, n. 9, p. 923-30, 2010. ISSN 1488-2329. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20439443> >.

FUXE, K. et al. Extrasynaptic neurotransmission in the modulation of brain function. Focus on the striatal neuronal-glia networks. **Front Physiol**, v. 3, p. 136, 2012. ISSN 1664-042X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22675301> >.

GALEOTTI, N. et al. PKC-mediated potentiation of morphine analgesia by St. John's Wort in rodents and humans. **J Pharmacol Sci**, v. 124, n. 4, p. 409-17, 2014. ISSN 1347-8648. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24739262> >.

GALEOTTI, N.; GHELARDINI, C. Reversal of NO-induced nociceptive hypersensitivity by St. John's wort and hypericin: NF-κB, CREB and STAT1 as molecular targets. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 227, n. 1, p. 149-63, 2013a. ISSN 1432-2072. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23254377> >.

\_\_\_\_\_. St. John's wort relieves pain in an animal model of migraine. **Eur J Pain**, v. 17, n. 3, p. 369-81, 2013b. ISSN 1532-2149. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23152076> >.



\_\_\_\_\_. St. John's wort reversal of meningeal nociception: a natural therapeutic perspective for migraine pain. **Phytomedicine**, v. 20, n. 10, p. 930-8, 2013c. ISSN 1618-095X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23578992> >.

GALEOTTI, N. et al. St. John's Wort seed and feverfew flower extracts relieve painful diabetic neuropathy in a rat model of diabetes. **Fitoterapia**, v. 92, p. 23-33, 2014. ISSN 1873-6971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24125916> >.

\_\_\_\_\_. A prolonged protein kinase C-mediated, opioid-related antinociceptive effect of st John's Wort in mice. **J Pain**, v. 11, n. 2, p. 149-59, 2010a. ISSN 1528-8447. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19945352> >.

\_\_\_\_\_. St. John's Wort reduces neuropathic pain through a hypericin-mediated inhibition of the protein kinase C-gamma and epsilon activity. **Biochem Pharmacol**, v. 79, n. 9, p. 1327-36, 2010b. ISSN 1873-2968. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20045676> >.

GAMBARANA, C. et al. Efficacy of an *Hypericum perforatum* (St. John's wort) extract in preventing and reverting a condition of escape deficit in rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 2, p. 247-57, 1999. ISSN 0893-133X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10432473> >.

GOBBI, M. et al. In vitro binding studies with two *Hypericum perforatum* extracts- hyperforin, hypericin and biapigenin-on 5-HT<sub>6</sub>, 5-HT<sub>7</sub>, GABA(A)/benzodiazepine, sigma, NPY-Y1/Y2 receptors and dopamine transporters. **Pharmacopsychiatry**, v. 34 Suppl 1, p. S45-8, 2001. ISSN 0176-3679. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11518075> >.

GRBOVIĆ, L.; RADENKOVIĆ, M. Analysis of adenosine vascular effect in isolated rat aorta: possible role of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. **Pharmacol Toxicol**, v. 92, n. 6, p. 265-71, 2003. ISSN 0901-9928. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12787258> >.

GW PHARMACEUTICALS. **Sativex**. GW Pharmaceuticals 2014. Disponível em: < <http://www.gwpharm.com/Sativex.aspx> >.

HAAS, J. S. et al. The antinociceptive effect of a benzopyran (HP1) isolated from *Hypericum polyanthemum* in mice hot-plate test is blocked by naloxone. **Planta Med**, v. 76, n. 13, p. 1419-23, 2010. ISSN 1439-0221. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20309796> >.

\_\_\_\_\_. The anti-immobility effect of hyperoside on the forced swimming test in rats is mediated by the D2-like receptors activation. **Planta Med**, v. 77, n. 4, p. 334-9, 2011. ISSN 1439-0221. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20945276> >.

HAMMER, K. D.; BIRT, D. F. Evidence for contributions of interactions of constituents to the anti-inflammatory activity of *Hypericum perforatum*. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 54, n. 6, p. 781-9, 2014. ISSN 1549-7852. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24345048> >.

HAMMER, K. D. et al. Pseudohypericin is necessary for the light-activated inhibition of prostaglandin E2 pathways by a 4 component system mimicking an *Hypericum perforatum* fraction. **Phytochemistry**, v. 69, n. 12, p. 2354-62, 2008. ISSN 0031-9422. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18707743> >.

\_\_\_\_\_. Inhibition of prostaglandin E(2) production by anti-inflammatory *Hypericum perforatum* extracts and constituents in RAW264.7 Mouse Macrophage Cells. **J Agric Food Chem**, v. 55, n. 18, p. 7323-31, 2007. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17696442> >.

\_\_\_\_\_. Identification of JAK-STAT pathways as important for the anti-inflammatory activity of a *Hypericum perforatum* fraction and bioactive constituents in RAW 264.7 mouse macrophages. **Phytochemistry**, v. 71, n. 7, p. 716-25, 2010. ISSN 1873-3700. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20303133> >.

HASKÓ, G.; CRONSTEIN, B. N. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. **Trends Immunol**, v. 25, n. 1, p. 33-9, Jan 2004. ISSN 1471-4906. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14698282> >.

HATANAKA, J. et al. In vitro and in vivo characterization of new formulations of St. John's Wort extract with improved pharmacokinetics and anti-nociceptive effect. **Drug Metab Pharmacokinet**, v. 26, n. 6, p. 551-8, 2011. ISSN 1880-0920. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21914965> >.

HELFMAN, C. C. et al. The effects of 5'-N-ethylcarboxamidoadenosine on evoked release of [3H]serotonin in the rat nucleus tractus solitarius. **Neurosci Lett**, v. 213, n. 1, p. 61-5, 1996. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8844713> >.

HILLWIG, M. L.; AMES, I. **Anti-inflammatory and anti-HIV compositions and methods of use**. MARKETPLACE. USA: Iowa State University Research Foundation, Inc., Ames, IA (US), 43, 2010. Disponível em: <

<http://www.ideaconnection.com/patents/14132-Anti-inflammatory-and-anti-HIV-compositions-and-metho.html> >.

HUSSAIN, T.; ALI, M. M.; CHANDRA, S. V. The combined effect of Pb<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup> on monoamine uptake and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in striatal synaptosomes. **J Appl Toxicol**, v. 7, n. 4, p. 277-80, 1987. ISSN 0260-437X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3040846> >.

KANNO, T.; YAGUCHI, T.; NISHIZAKI, T. Noradrenaline stimulates ATP release from DRG neurons by targeting beta(3) adrenoceptors as a factor of neuropathic pain. **J Cell Physiol**, v. 224, n. 2, p. 345-51, 2010. ISSN 1097-4652. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20432431> >.

KAHAN, M.; MAILIS-GAGNON, A.; TUNKS, E. Canadian guideline for safe and effective use of opioids for chronic non-cancer pain: implications for pain physicians. **Pain Res Manag**, v. 16, n. 3, p. 157-8, 2011. ISSN 1203-6765. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21766064> >.

KAHAN, M. et al. Canadian guideline for safe and effective use of opioids for chronic noncancer pain: clinical summary for family physicians. Part 1: general population. **Can Fam Physician**, v. 57, n. 11, p. 1257-66, e407-18, 2011. ISSN 1715-5258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22084455> >.

KISS, J. P.; VIZI, E. S. Nitric oxide: a novel link between synaptic and nonsynaptic transmission. **Trends Neurosci**, v. 24, n. 4, p. 211-5, 2001. ISSN 0166-2236. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11250004> >.

KLIMSCHA, W.; TONG, C.; EISENACH, J. C. Intrathecal alpha 2-adrenergic agonists stimulate acetylcholine and norepinephrine release from the spinal cord dorsal horn in sheep. An in vivo microdialysis study. **Anesthesiology**, v. 87, n. 1, p. 110-6, 1997. ISSN 0003-3022. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9232141> >.

KOEBERLE, A. et al. Myrtucommulone, a natural acylphloroglucinol, inhibits microsomal prostaglandin E(2) synthase-1. **Br J Pharmacol**, v. 156, n. 6, p. 952-61, 2009. ISSN 1476-5381. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19298395> >.

KRAUS, G. A.; LIU, F. Synthesis of uliginosins A and B. **Nat Prod Commun**, v. 7, n. 2, p. 191-2, 2012. ISSN 1934-578X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22474952> >.

KRISHTAL, O. et al. Modulation of ion channels in rat neurons by the constituents of *Hypericum perforatum*. **Pharmacopsychiatry**, v. 34 Suppl 1, p. S74-82, 2001. ISSN 0176-3679. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11518081> >.

KUMAR, V.; SINGH, P. N.; BHATTACHARYA, S. K. Anti-inflammatory and analgesic activity of Indian *Hypericum perforatum* L. **Indian J Exp Biol**, v. 39, n. 4, p. 339-43, 2001. ISSN 0019-5189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11491578> >.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews**, v. 53, n. 4, p. 597-652, 2001. ISSN 0031-6997.

LEAL, K. et al. Conformational analysis of phloroglucinols from *Hypericum brasiliense* by using X-ray diffraction and molecular modeling. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 5, p. 837-841, 2010. ISSN 0103-5053.

LEE, M. C.; WANIGASEKERA, V.; TRACEY, I. Imaging opioid analgesia in the human brain and its potential relevance for understanding opioid use in chronic pain. **Neuropharmacology**, 2013. ISSN 1873-7064. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23891639> >.

LESCH, K. P. et al. Regional brain expression of serotonin transporter mRNA and its regulation by reuptake inhibiting antidepressants. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 17, n. 1-2, p. 31-5, 1993. ISSN 0169-328X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8381906> >.

LINDE, K. St. John's wort - an overview. **Forsch Komplementmed**, v. 16, n. 3, p. 146-55, 2009. ISSN 1661-4127. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19657198> >.

LINDE, K.; BERNER, M.; KRISTON, L. St John's wort for major depression. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 4, 2008. ISSN 1469-493X.

LUCCARINI, P. et al. Synergistic antinociceptive effect of amitriptyline and morphine in the rat orofacial formalin test. **Anesthesiology**, v. 100, n. 3, p. 690-6, 2004. ISSN 0003-3022. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15108987> >.

MARSH, W. L.; DAVIES, J. A. The involvement of sodium and calcium ions in the release of amino acid neurotransmitters from mouse cortical slices elicited by hyperforin. **Life Sci**, v. 71, n. 22, p. 2645-55, 2002. ISSN 0024-3205. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12354583> >.

MEDINA, M. A. et al. Hyperforin: more than an antidepressant bioactive compound? **Life Sci**, v. 79, n. 2, p. 105-11, 2006. ISSN 0024-3205. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16438991> >.

MEINKE, M. C. et al. In vivo photoprotective and anti-inflammatory effect of hyperforin is associated with high antioxidant activity in vitro and ex vivo. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 81, n. 2, p. 346-50, 2012. ISSN 1873-3441. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22430217> >.

MENTZ, L. A.; LUTZEMBERGER, L. C.; SCHEMKEL, E. P. **Da flora medicinal do Rio Grande do Sul: notas sobre a obra D'Ávila (1910)**. Cadernos de Farmácia. Cadernos de Farmácia, p. 24, 1997.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol**, v. 57, n. 1, p. 1-164, 1999. ISSN 0301-0082. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9987804> >.

\_\_\_\_\_. Descending control of pain. **Prog Neurobiol**, v. 66, n. 6, p. 355-474, 2002. ISSN 0301-0082. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12034378> >.

MIRANDA, H. F. et al. Systemic synergism between codeine and morphine in three pain models in mice. **Pharmacol Rep**, v. 65, n. 1, p. 80-8, 2013. ISSN 1734-1140. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23563026> >.

MOULIN, D. E. et al. Pharmacological management of chronic neuropathic pain - consensus statement and guidelines from the Canadian Pain Society. **Pain Res Manag**, v. 12, n. 1, p. 13-21, 2007. ISSN 1203-6765. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17372630> >.

MÜLLER, W. E. Current St John's wort research from mode of action to clinical efficacy. **Pharmacol Res**, v. 47, n. 2, p. 101-9, 2003. ISSN 1043-6618. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12543057> >.

MÜLLER, W. E. et al. Hyperforin represents the neurotransmitter reuptake inhibiting constituent of *Hypericum* extract. **Pharmacopsychiatry**, v. 31 Suppl 1, p. 16-21, 1998. ISSN 0176-3679. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9684943> >.

NAHRSTEDT, A.; BUTTERWECK, V. Lessons learned from herbal medicinal products: the example of St. John's Wort (perpendicular). **J Nat Prod**, v. 73, n. 5, p. 1015-21, 2010. ISSN 1520-6025. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20408551> >.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J Nat Prod**, v. 75, n. 3, p. 311-35, 2012. ISSN 1520-6025. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22316239> >.

NOBLE, M. et al. Long-term opioid management for chronic noncancer pain. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 1, p. CD006605, 2010. ISSN 1469-493X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20091598> >.

NOELLI, F. S. **Múltiplos usos de espécies vegetais pela farmacologia Guarani através de informações históricas**. I Simpósio de Etnobiologia e Etnoecologia. Bahia, Brazil, p.23. 1996

NOR, C. et al. Phloroglucinol derivatives from four *Hypericum* species belonging to the Trigynobrathys section. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, n. 5, p. 517-519, 2004. ISSN 0305-1978.

\_\_\_\_\_. Phenolic constituents of *Hypericum* flowers. **Natural Product Communications**, v. 3, n. 2, p. 237-240, 2008. ISSN 1934-578X.

OKADA, M. et al. Effects of adenosine receptor subtypes on hippocampal extracellular serotonin level and serotonin reuptake activity. **J Neurochem**, v. 69, n. 6, p. 2581-8, 1997. ISSN 0022-3042. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9375692> >.

OKADA, M.; MIZUNO, K.; KANEKO, S. Adenosine A1 and A2 receptors modulate extracellular dopamine levels in rat striatum. **Neurosci Lett**, v. 212, n. 1, p. 53-6, 1996. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8823761> >.

OKIE, S. A flood of opioids, a rising tide of deaths. **N Engl J Med**, v. 363, n. 21, p. 1981-5, Nov 2010. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21083382> >.

OZTÜRK, Y. et al. Effects of *Hypericum perforatum* L. and *Hypericum calycinum* L. extracts on the central nervous system in mice. **Phytomedicine**, v. 3, n. 2, p. 139-46, 1996. ISSN 0944-7113. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23194961> >.

PERAZZO, F. F. et al. Anti-inflammatory and analgesic activities of *Hypericum brasiliense* (Willd) standardized extract. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. João Pessoa - PB: 320-325 p. 2008. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2008000300002> >.

PEREIRA, M. A. D. S. **Estudo da atividade antinociceptiva de adenosina em camundongos - análise do mecanismo de ação**. 2005. 133 (MSc). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí - SC.

PLUMMER, J. et al. Assessment of antinociceptive drug effects in the presence of impaired motor-performance. **Journal of Pharmacological Methods**, v. 26, n. 1, p. 79-87, 1991. ISSN 0160-5402.

POELCHEN, W. et al. Co-transmitter function of ATP in central catecholaminergic neurons of the rat. **Neuroscience**, v. 102, n. 3, p. 593-602, 2001. ISSN 0306-4522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11226696> >.

POLAT, R.; SATIL, F. An ethnobotanical survey of medicinal plants in Edremit Gulf (Balıkesir-Turkey). **J Ethnopharmacol**, v. 139, n. 2, p. 626-41, 2012. ISSN 1872-7573. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22193175> >.

PRADO, W. A.; FAGANELLO, F. A. The anterior pretectal nucleus participates as a relay station in the glutamate-, but not morphine-induced antinociception from the dorsal raphe nucleus in rats. **Pain**, v. 88, n. 2, p. 169-76, 2000. ISSN 0304-3959. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11050372> >.

PURVES, D. **Neurociências**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

RABANAL, R. M. et al. Analgesic and topical anti-inflammatory activity of *Hypericum canariense* L. and *Hypericum glandulosum* Ait. **J Ethnopharmacol**, v. 96, n. 3, p. 591-6, 2005. ISSN 0378-8741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15619583> >.

RADENKOVIĆ, M. et al. Isolated rat inferior mesenteric artery response to adenosine: possible participation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and potassium channels. **Pharmacol Rep**, v. 57, n. 6, p. 824-32, 2005. ISSN 1734-1140. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16382203> >.

RATES, S. M. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603-13, 2001. ISSN 0041-0101. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11072038> >.

RATES, S. M. K. et al. **Plant extract, useful to treat mood disorders, depression, and/or nervous system disorders, comprises compound belonging to the class of phloroglucinols and/or benzopyrans, where the plant extract is obtained**

from *Hypericum polyanthemum*. Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI). UFRGS e ROUEN UNIVERSITY. Brazil. PI0900614-1 2010.

REED, M. C.; NIJHOUT, H. F.; BEST, J. Computational studies of the role of serotonin in the basal ganglia. **Front Integr Neurosci**, v. 7, p. 41, 2013. ISSN 1662-5145. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23745108> >.

RIELI MENDES, F.; MATTEI, R.; DE ARAÚJO CARLINI, E. L. Activity of *Hypericum brasiliense* and *Hypericum cordatum* on the central nervous system in rodents. **Fitoterapia**, v. 73, n. 6, p. 462-71, 2002. ISSN 0367-326X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12385868> >.

ROSSI, A. et al. Myrtucommulone from *Myrtus communis* exhibits potent anti-inflammatory effectiveness in vivo. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 329, n. 1, p. 76-86, 2009. ISSN 1521-0103. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19056932> >.

RUSSO, E. B. Cannabinoids in the management of difficult to treat pain. **Ther Clin Risk Manag**, v. 4, n. 1, p. 245-59, 2008. ISSN 1176-6336. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18728714> >.

SAKAMOTO, S. **Avaliação do potencial antinociceptivo de hiperbrasilol B, derivado floroglucinol isolado de *Hypericum caprifoliatum* Cham. & Schldl.** 2012. 35 (Graduate). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

SAWYNOK, J. Adenosine receptor activation and nociception. **Eur J Pharmacol**, v. 347, n. 1, p. 1-11, 1998. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9650842> >.

SAWYNOK, J.; LIU, X. J. Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain. **Prog Neurobiol**, v. 69, n. 5, p. 313-40, 2003. ISSN 0301-0082. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12787573> >.

SAWYNOK, J.; REID, A. Noradrenergic and purinergic involvement in spinal antinociception by 5-hydroxytryptamine and 2-methyl-5-hydroxytryptamine. **Eur J Pharmacol**, v. 204, n. 3, p. 301-9, 1991. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1663459> >.

SAWYNOK, J.; REID, A.; POON, A. Peripheral antinociceptive effect of an adenosine kinase inhibitor, with augmentation by an adenosine deaminase inhibitor, in the rat



formalin test. **Pain**, v. 74, n. 1, p. 75-81, Jan 1998. ISSN 0304-3959. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9514563> >.

SAWYNOK, J. et al. Adenosine release by morphine and spinal antinociception: role of G-proteins and cyclic AMP. **NIDA Res Monogr**, v. 105, p. 40-6, 1990. ISSN 1046-9516. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1652084> >.

\_\_\_\_\_. Adenosine release may mediate spinal analgesia by morphine. **Trends Pharmacol Sci**, v. 10, n. 5, p. 186-9, 1989. ISSN 0165-6147. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2667227> >.

SCHEMPP, C. M.; HEZEL, S.; SIMON, J. C. Topical treatment of atopic dermatitis with *Hypericum* cream. A randomised, placebo-controlled, double-blind half-side comparison study. **Hautarzt**, v. 54, n. 3, p. 248-53, 2003. ISSN 0017-8470. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12634994> >.

\_\_\_\_\_. Topical application of St John's wort (*Hypericum perforatum* L.) and of its metabolite hyperforin inhibits the allostimulatory capacity of epidermal cells. **Br J Dermatol**, v. 142, n. 5, p. 979-84, 2000. ISSN 0007-0963. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10809859> >.

SHEN, F. et al. Relative contributions of norepinephrine and serotonin transporters to antinociceptive synergy between monoamine reuptake inhibitors and morphine in the rat formalin model. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e74891, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24098676> >.

SINGER, A.; WONNEMANN, M.; MULLER, W. Hyperforin, a major antidepressant constituent of St. John's Wort, inhibits serotonin uptake by elevating free intracellular Na<sup>+</sup>. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 290, n. 3, p. 1363-1368, 1999. ISSN 0022-3565.

SMITH, H. S. Combination opioid analgesics. **Pain Physician**, v. 11, n. 2, p. 201-14, 2008. ISSN 1533-3159. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18354712> >.

SMITH, M. T. Differences between and combinations of opioids re-visited. **Curr Opin Anaesthesiol**, v. 21, n. 5, p. 596-601, 2008. ISSN 1473-6500. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18784485> >.

SNEDDON, P.; BURNSTOCK, G. ATP as a co-transmitter in rat tail artery. **Eur J Pharmacol**, v. 106, n. 1, p. 149-52, 1984. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6152212> >.

SOCOLSKY, C. et al. Acylphloroglucinols from *Elaphoglossum crassipes*: antidepressant-like activity of crassipin A. **J Nat Prod**, v. 75, n. 6, p. 1007-17, 2012. ISSN 1520-6025. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22686708> >.

SOLLEVI, A. Adenosine for pain control. **Acta Anaesthesiol Scand Suppl**, v. 110, p. 135-6, 1997. ISSN 0515-2720. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9248564> >.

SPERLÁGH, B. et al. Co-release of endogenous ATP and [3H]noradrenaline from rat hypothalamic slices: origin and modulation by alpha2-adrenoceptors. **Neuroscience**, v. 82, n. 2, p. 511-20, 1998. ISSN 0306-4522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9466457> >.

STEFFENS, M.; FEUERSTEIN, T. J. Receptor-independent depression of DA and 5-HT uptake by cannabinoids in rat neocortex--involvement of Na(+)/K(+)-ATPase. **Neurochem Int**, v. 44, n. 7, p. 529-38, 2004. ISSN 0197-0186. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15209421> >.

STHAL, S. M. **Stahl's Essential Psychopharmacology: Neuroscientific Basis and Practical Applications**. New York: Cambridge University Press, 2008. ISBN 9780511447990.

STEIN, A. C. **Avaliação do mecanismo de ação antidepressiva e estudo da toxicidade oral aguda e de doses repetidas de *Hypericum polyanthemum* em camundongos**. 2012. p. 112 (Ph.D.). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

STEIN, A. C. et al. Uliginosin B, a phloroglucinol derivative from *Hypericum polyanthemum*: a promising new molecular pattern for the development of antidepressant drugs. **Behav Brain Res**, v. 228, n. 1, p. 66-73, 2012. ISSN 1872-7549. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22155486> >.

STOJANOVIĆ, G.; ĐORĐEVIĆ, A.; ŠMELCEROVIĆ, A. Do other *Hypericum* species have medical potential as St. John's wort (*Hypericum perforatum*)? **Curr Med Chem**, v. 20, n. 18, p. 2273-95, 2013. ISSN 1875-533X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23521674> >.

STOLZ, E. D. **Avaliação da atividade antinociceptiva de uliginosina B, um derivado floroglucinol dimérico isolado de espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul**. 2011. p. 71 (MSc). Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS.

STOLZ, E. D. et al. Uliginosin B presents antinociceptive effect mediated by dopaminergic and opioid systems in mice. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 39, n. 1, p. 80-7, 2012. ISSN 1878-4216. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22627196> >.

SUBHAN, F. et al. Antagonism of antinociceptive effect of hydro-ethanolic extract of *Hypericum perforatum* Linn. by a non selective opioid receptor antagonist, naloxone. **Pak J Biol Sci**, v. 10, n. 5, p. 792-6, 2007. ISSN 1028-8880. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19069866> >.

SWEENEY, M.; WHITE, T.; SAWYNOK, J. 5-Hydroxytryptamine releases adenosine from primary afferent nerve terminals in the spinal cord. **Brain Res**, v. 462, n. 2, p. 346-9, Oct 1988. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3191394> >.

\_\_\_\_\_. 5-Hydroxytryptamine releases adenosine and cyclic AMP from primary afferent nerve terminals in the spinal cord in vivo. **Brain Res**, v. 528, n. 1, p. 55-61, 1990. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2173965> >.

TALLARIDA, R. J. Drug synergism: its detection and applications. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 298, n. 3, p. 865-72, 2001. ISSN 0022-3565. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11504778> >.

TEDESCHI, E. et al. Anti-inflammatory actions of St. John's wort: inhibition of human inducible nitric-oxide synthase expression by down-regulating signal transducer and activator of transcription-1alpha (STAT-1alpha) activation. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 307, n. 1, p. 254-61, 2003. ISSN 0022-3565. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12954801> >.

THE BRITISH PAIN SOCIETY. **Opioids for Persistent Pain: Good Practice**. London: The British Pain Society 2010.

TREIBER, K. et al. Hyperforin activates nonselective cation channels (NSCCs). **Br J Pharmacol**, v. 145, n. 1, p. 75-83, 2005. ISSN 0007-1188. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15723093> >.

TRESCOT, A. M. et al. Opioids in the management of chronic non-cancer pain: an update of American Society of the Interventional Pain Physicians' (ASIPP) Guidelines. **Pain Physician**, v. 11, n. 2 Suppl, p. S5-S62, 2008. ISSN 1533-3159. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18443640> >.

TROVATO, A. et al. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Hypericum empetrifolium* Willd. (Guttiferae). **Farmaco**, v. 56, n. 5-7, p. 455-7, 2001. ISSN 0014-827X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11482777> >.

UCHIDA, S. et al. Antinociceptive effects of St. John's wort, *Harpagophytum procumbens* extract and Grape seed proanthocyanidins extract in mice. **Biol Pharm Bull**, v. 31, n. 2, p. 240-5, 2008. ISSN 0918-6158. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18239280> >.

VATTA, M. et al. Endobain E, a brain Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> -ATPase inhibitor, decreases norepinephrine uptake in rat hypothalamus. **Life Sci**, v. 76, n. 4, p. 359-65, Dec 2004. ISSN 0024-3205. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15530498> >.

VIANA, A. **Estudo de moléculas potencialmente antidepressivas e analgésicas de espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul**. 2007. p. 196 (Ph.D.). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

\_\_\_\_\_. **Estudo da atividade psicofarmacológica de espécies de *Hypericum caprifoliatum* Cham & Schledt**. 2002. 119 (MSc). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

VIANA, A. F. et al. *Hypericum caprifoliatum* (Guttiferae) Cham. & Schldt.: a species native to South Brazil with antidepressant-like activity. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 20, n. 6, p. 507-14, 2006. ISSN 0767-3981. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17109644> >.

\_\_\_\_\_. The antidepressant-like effect of *Hypericum caprifoliatum* Cham & Schlecht (Guttiferae) on forced swimming test results from an inhibition of neuronal monoamine uptake. **Neuropharmacology**, v. 49, n. 7, p. 1042-52, 2005. ISSN 0028-3908. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16040063> >.

\_\_\_\_\_. Antinociceptive activity of *Hypericum caprifoliatum* and *Hypericum polyanthemum* (Guttiferae). **Braz J Med Biol Res**, v. 36, n. 5, p. 631-4, 2003. ISSN 0100-879X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12715083> >.

VON POSER, G. L.; RECH, S. B.; RATES, S. M. K. Chemical and pharmacological aspects of southern brazilian *Hypericum* species. In: Jaime Teixeira da Silva. (Org.). *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology*. Londres: Global Science Books, UK, v. IV, n. 56, p. 510-516, 2006.

WILLIS, W. D.; WESTLUND, K. N. Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. **J Clin Neurophysiol**, v. 14, n. 1, p. 2-31, 1997. ISSN 0736-0258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9013357> >.

WONNEMANN, M.; SINGER, A.; MULLER, W. Inhibition of synaptosomal uptake of H-3-L-glutamate and H-3-GABA by hyperforin, a major constituent of St. John's Wort: The role of amiloride sensitive sodium conductive pathways. **Neuropsychopharmacology**, v. 23, n. 2, p. 188-197, 2000. ISSN 0893-133X.

WU, C. L.; RAJA, S. N. Treatment of acute postoperative pain. **Lancet**, v. 377, n. 9784, p. 2215-25, 2011. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21704871> >.

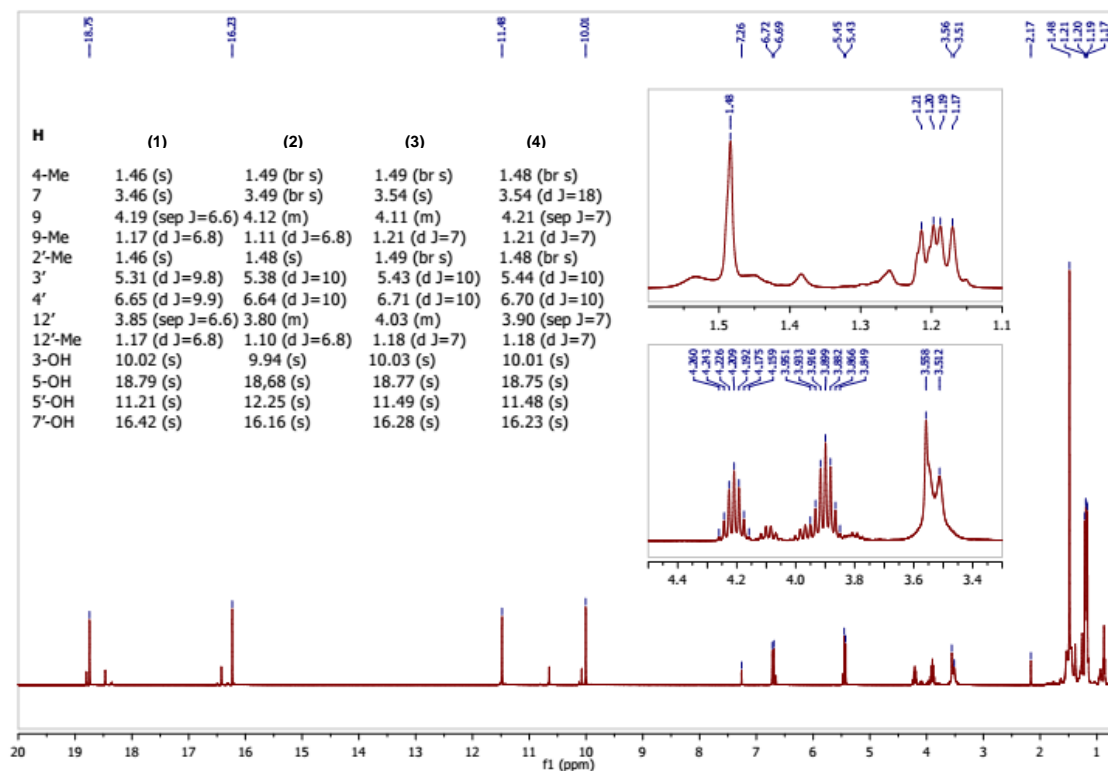
YAŞAR, S. N. et al. Central nervous system activities of *Hypericum origanifolium* extract via GABAergic and opioidergic mechanisms. **Phytother Res**, v. 27, n. 6, p. 877-84, 2013. ISSN 1099-1573. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22903405> >.

ZHOU, C. et al. Hyperforin, the active component of St. John's wort, induces IL-8 expression in human intestinal epithelial cells via a MAPK-dependent, NF-kappa independent pathway. **J Clin Immunol**, v. 24, n. 6, p. 623-36, 2004. ISSN 0271-9142. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15622447> >.

**ANEXOS**



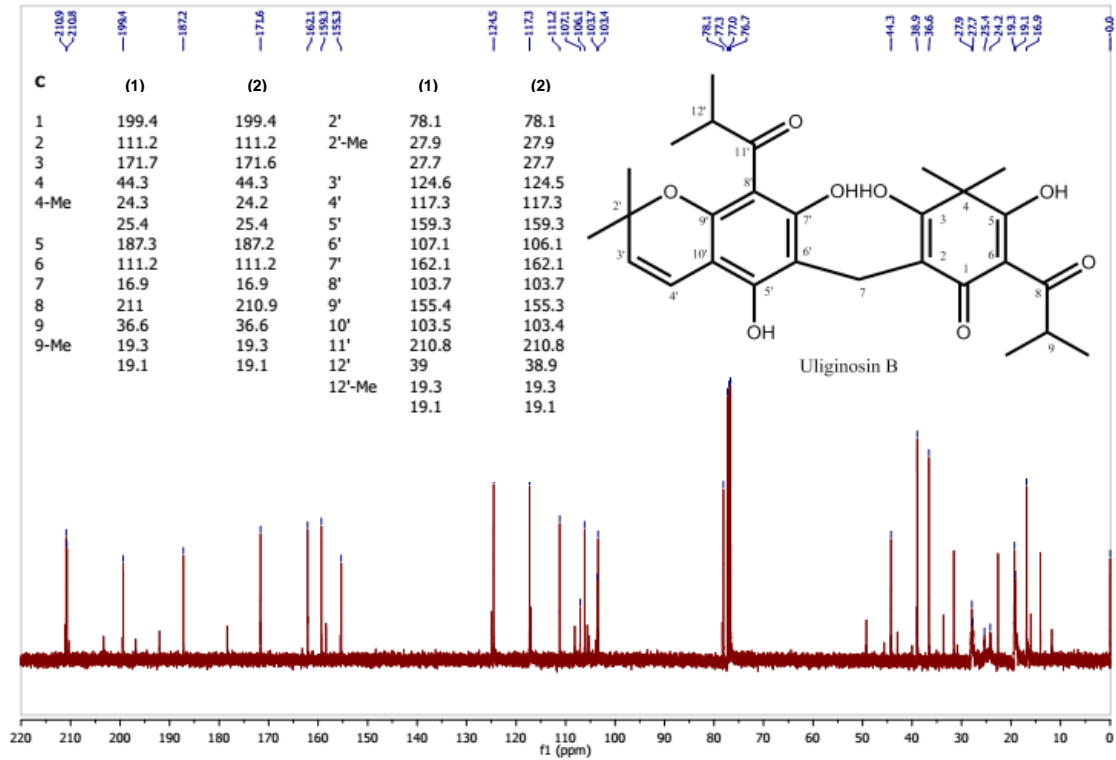
**Anexo I: Espectro de RMN H<sup>1</sup> de uliginosina B. (1)** RMN H<sup>1</sup> descrito por Parker e Johnson (1968) em equipamento 56 MHz. **(2)** RMN H<sup>1</sup> descrito por Nör (2006) em equipamento 400 MHz. RMN H<sup>1</sup> para os dados experimentais obtidos em equipamento de 60 MHz **(3)** e 400 MHz **(4)**.







**Anexo II: Espectro de RMN C<sup>13</sup> de uliginosina B. (1) RMN C<sup>13</sup> descrito por Nör (2006) em equipamento 100 MHz. (2) RMN C<sup>13</sup> para os dados experimentais obtidos em equipamento 400 MHz.**





**Anexo III: Perfil cromatografico da uliginosina B (HPLC-UV).** Condições cromatográficas: coluna Waters Nova-Pack C18, 60A (4  $\mu\text{m}$ ; 3,9 x 150 mm); sistema solvente isocrático (95%  $\text{CH}_3\text{CN}$ ; 5%  $\text{H}_2\text{O}$ ; 0.01% TFA); fluxo de 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ ; detecção a 220 nm a temperatura ambiente.

