

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
NEUROCIÊNCIAS

**Avaliação da atividade antinociceptiva de uliginosina B, um derivado floroglucinol  
dimérico isolado de espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul**

Dissertação de Mestrado

Eveline Dischkaln Stolz

Porto Alegre

1/2011

II

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
NEUROCIÊNCIAS

**Avaliação da atividade antinociceptiva de uliginosina B, um derivado floroglucinol  
dimérico isolado de espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul**

Eveline Dischkaln Stolz

Orientador: Profa. Dr. Stela Maris Kuze Rates

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Neurociências da Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul, como requisito  
para a obtenção do grau de Mestre.

Porto Alegre

1/2011

*Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.*

Leonardo da Vinci

**AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora Stela, meu especial agradecimento pelo apoio constante, confiança, ensinamentos, paciência e principalmente por acreditar na minha capacidade.

À Alice Viana, que mesmo não tendo nenhuma obrigação formal atuou como minha co-orientadora, ensinando, propondo experimentos, fazendo críticas, sugestões e correções de publicações e também servindo como um exemplo de pesquisador.

Aos meus pais, Paulo e Bea, que sempre abdicaram de seus sonhos para proporcionar a realização dos meus. Muito obrigada pela educação, amor, carinho, dedicação e pelas lições de vida, fundamentais para minha formação. A vocês dedico tudo que conquistei.

Ao meu noivo Ale, 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 irmão Vini, pelo incentivo e compreensão constante na busca dos meus objetivos.

À minha família e amigos, que muitas vezes sem compreender o motivo das minhas ausências sempre me apoiaram e incentivaram. Obrigada também pelos bons momentos de descontração. Agradeço em especial à minha dinda Cintia e minha tia Dalila, que foram meu porto seguro aqui em Porto Alegre.

Aos colegas de mestrado, pelos bons momentos vivenciados e solidariedade constante. Em especial a Josi, minha amiga querida, que chorou, riu, adoeceu e brigou junto comigo, a cada etapa do mestrado. Os momentos de incentivo, psicanálise, amizade, diversão e companheirismo estarão registrados eternamente.

A profa. Gilsane von Poser, pelos conselhos, sugestões, ensinamentos e discussões.

As colegas do laboratório de Psicofarmacologia: Dessa, Liz, Desa, Ana, Fe, Camila, Luisa Salles, Mile, Gilda e ao Gusti pela amizade, carinho, compreensão,

conselhos, auxílio nos experimentos e principalmente aos bons momentos de convivência.

Aos ICs que passaram Lu Grazziotin e Luisa Wild, e ao sobrevivente Diego, pelo auxílio nos experimentos e pela amizade.

Aos colegas do laboratório de Farmacognosia, em especial, Simone, Maikon, Sati e Jú, que me ensinaram o pouco que sei sobre isolamento e foram bons amigos e confidentes.

À Rose, pelo auxílio antes e após os experimentos e pelo cuidado com os animais.

Aos membros da banca, por aceitarem meu convite e pela colaboração com esta dissertação.

Aos professores e funcionários do PPG Neurociências, pela formação proporcionada.

Ao CNPq, pela bolsa concedida durante os dois anos de realização deste mestrado.

**SUMÁRIO**

<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>VIII</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>X</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO 1: ARTIGO .....</b>	<b>9</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>51</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>69</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

DAMGO: [D-Ala<sup>2</sup>, N-MePhe<sup>4</sup>, Gly-ol] - o *enkephalin*;

GABA: *gamma-aminobutyric acid* (ácido gama-aminobutírico);

GTP $\gamma$ S: *guanosine-5'-O-(3-thio) triphosphate* (guanosina-5'-O-(-tiol) trifosfato);

HP1: 6-isobutiril-5,7-dimetoxi-2,2-dimetil-benzopirano;

HP2: 7-hidroxi-6-isobutiril-5-metoxi-2,2-dimetil-benzopirano;

HP3: 5-hidroxi-6-isobutiril-7-metoxi-2,2-dimetil-benzopirano;

SCH 23390: R(+)-8-chloro-2,3,4,5-tetrahydro-3-methyl-5-phenyl-1H-3-benzazepine-7-ol.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01	<i>Hypericum caprifoliatum</i> (A) e <i>Hypericum perforatum</i> (B).....	6
Figura 02	Figura 2: Estrutura de compostos isolados de espécies de <i>Hypericum</i> nativas do sul do Brasil: (A) hiperosideo; (B) HP1; (C) hiperbrasilol B; (D) uliginosina B.....	8



**RESUMO**

A uliginosina B é um derivado floroglucinol dimérico identificado em espécies de *Hypericum* nativas do sul do Brasil, como *H. polyanthemum* e *H. caprifoliatum*. Extratos lipofílicos destas duas espécies apresentaram efeito antinociceptivo em roedores, este efeito foi bloqueado por naloxona. Além disso, estudos *in vitro* mostraram que a uliginosina B inibe a recaptação sinaptossomal de monoaminas, com maior potência para dopamina. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito antinociceptivo da uliginosina B na placa aquecida e no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos, bem como avaliar o envolvimento do sistema opioide e neurotransmissão dopaminérgica usando antagonismos farmacológicos *in vivo* e ensaios de radioligação. O tratamento com uliginosina B (90 mg/kg, p.o.) apresentou efeito antinociceptivo nos testes da placa aquecida e das contorções abdominais. O efeito da uliginosina B sobre a nocicepção térmica foi dose-dependente (5-90 mg/kg, i.p.) e ocorreu em doses que não prejudicaram a coordenação motora (15 mg/kg, i.p.; 90 mg/kg, p.o.). A administração de uliginosina B em dose elevada (90 mg / kg, i.p.) apresentou efeito atáxico no rota-rod. Os efeitos antinociceptivo e atáxico parecem ser mediados por receptores distintos, pois o efeito na placa aquecida foi completamente abolido por naloxona (uliginosina B 15 mg/kg, i.p.) e sulpirida (uliginosina B 15 mg/kg i.p. e 90 mg/kg, i.p.), mas ele não foi alterado por SCH 23390, enquanto o déficit motor induzido por uliginosina B (90 mg/kg, i.p.) no rotarod foi completamente abolido por naloxona e parcialmente bloqueado por sulpirida e SCH 23390. Entretanto, a ativação destes receptores parece ser indireta, uma vez que *in vitro* a uliginosina B não alterou a ligação [<sup>35</sup>S]-GTPγS em membranas de tálamo e corpo estriado, nem afetou a ligação [<sup>3</sup>H]-naloxona, [<sup>3</sup>H]-SCH 23390 e [<sup>3</sup>H]-sulpirida aos seus receptores em preparados de membrana de prosencéfalo e corpo estriado, respectivamente. Assim, provavelmente, pelo menos parte dos efeitos observados para a uliginosina B são devido à sua capacidade de inibir a recaptação de monoaminas com conseqüente ativação de receptores dopaminérgicos e estimulação indireta do sistema opioide.

**Palavras-chave:** uliginosina B; floroglucinol; antinociceptivo; *Hypericum*.

**ABSTRACT**

Uliginosin B is the main phloroglucinol from *Hypericum polyanthemum* and *H. caprifoliatum* (vegetal species from South Brazil) that possess antinociceptive effect blocked by naloxone in rodents. Furthermore uliginosin B inhibits monoamine reuptake in rat brain, especially dopamine. The aim of this study was to assess the antinociceptive effect of uliginosin B in the hot-plate and acetic acid induced writhing, in mice, as well as to evaluate the involvement of opioid system and dopaminergic neurotransmission by using in vivo pharmacological antagonisms and bindings assays. Uliginosin B (90 mg/kg, p.o.) presented antinociceptive effect in hot-plate and abdominal writhing tests. The uliginosin B effect on thermal nociception was dose-dependent (5-90 mg/kg, i.p.) and occurred at doses that did not impair the motor coordination (15 mg/kg, i.p.; 90 mg/kg, p.o.). At higher dose (90 mg/kg, i.p.) uliginosin B also presented ataxic effect in the rotarod apparatus. The antinociceptive and ataxic effects seem to be mediated by distinct receptors since the effect on the hot-plate was completely abolished by naloxone (uliginosin B 15 mg/kg, i.p.) and sulpiride (uliginosin B 15 mg/kg, i.p. and 90 mg/kg, i.p) but it was unaffected by SCH 23390, whereas the impairment induced by uliginosin B (90 mg/kg, i.p.) on the mice rotarod performance was completely prevented by naloxone and partially by sulpiride and SCH 23390. However, receptors activation seems to be indirect in any case because uliginosin B did not alter [<sup>35</sup>S]-GTPγS binding in the thalamus and striatum, nor affected [<sup>3</sup>H]-naloxone, [<sup>3</sup>H]-SCH 23390 and [<sup>3</sup>H]-sulpiride binding in rat forebrain and striata membranes. Thus, probably the effects of uliginosin B are at least in part due to its ability to inhibit monoamine reuptake with consequent activation of dopamine receptors and indirect stimulation of opioid system.

**Keywords:** uliginosin B; phloroglucinol; antinociceptive; *Hypericum*.

# **INTRODUÇÃO**

Na busca por novos agentes terapêuticos é reconhecida a grande diversidade química oferecida pelos produtos naturais. Muitos exemplos de fármacos, amplamente empregados na terapêutica, obtidos de fontes naturais podem ser citados: vincristina, utilizada no tratamento de leucemia infantil e linfomas; paclitaxel, utilizado no tratamento de câncer de ovário e pescoço; galantamina, utilizada no tratamento de Alzheimer; morfina, potente analgésico de ação central; entre outros (Rates, 2001).

Floroglucinois são moléculas presentes em diversas espécies vegetais, entre elas *Humulus lupulus*, *Elaphoglossum* sp., *Hypericum perforatum* (*St. Johns' wort*) e outras espécies do gênero *Hypericum*. Este grupo de moléculas apresenta atividades biológicas, tais como antimicrobiana (Jayasurya et al., 1991; Rocha et al., 1995, Saddiqe et al., 2010), ansiolítica (Zanoli et al., 2005), antidepressiva (Linde et al., 2008; Viana et al., 2005) e antinociceptiva (Adbel-Salam, 2005; Galeotti et al., 2010a).

A atividade antidepressiva de *H. perforatum*, já utilizado na clínica, é atribuída à presença de flavonóides, hipericina (naftodiantrona) e hiperforina (floroglucinol) (Linde et al., 1996, 2008; Whiskey et al., 2001; Kasper e Dienel, 2002; Röder et al. 2004, Butterweck e Schimidt, 2007; Caccia e Gobbi, 2009; Nahrstedt e Butterweck, 2010). A potencial atividade antidepressiva de espécies de *Hypericum* nativas do estado do Rio Grande do Sul (Brasil) também vem sendo estudada. Extratos lipofílicos de *H. polyanthemum* e *H. caprifoliatum* foram ativos em um modelo animal preditivo para atividade antidepressiva (Daudt et al., 2000; Viana, 2007). Esta atividade parece depender da ativação da neurotransmissão dopaminérgica (Viana et al., 2005; Rates et al., 2010). Estudos visando elucidar o mecanismo de ação antidepressiva demonstraram que estes extratos, bem como uma fração enriquecida em derivados floroglucinois diméricos obtida de *H. caprifoliatum* inibem a recaptação de monoaminas de modo concentração-dependente, especialmente de dopamina. Porém, diferente dos antidepressivos disponíveis no mercado, este aumento de dopamina, serotonina e noradrenalina na fenda sináptica não ocorre devido à ligação aos transportadores monoaminérgicos (Rates et al., 2010; Viana et al., 2005 e 2006). Além disto, em ensaios *ex-vivo*, *H. polyanthemum* e *H. caprifoliatum* alteraram a ligação [<sup>3</sup>H]-GTPγS estimulada por monoaminas à proteína G (Rates et al., 2010). Este conjunto de dados permite sugerir que *H. polyanthemum* e *H. caprifoliatum* apresentam potencial efeito

antidepressivo por aumentar a disponibilidade de monoaminas e estimular a ligação delas aos seus receptores (Viana, 2007).

Na clínica fármacos antidepressivos são comumente empregados no tratamento da dor crônica (Morgan e Franklin, 1991; Frussa-Filho et al., 1996; Altier e Steward, 1998; Gilbert e Franklin, 2001; Amr e Yousef, 2010; Bradley et al., 2010; Skljarevski et al., 2010). Sabe-se que antidepressivos tricíclicos (inibidores da recaptação de monoaminas) são o tratamento mais eficiente para a dor neuropática quando comparados aos inibidores seletivos da recaptação da serotonina, anticonvulsivantes, capsaicina e analgésicos opioides (Sindrup e Jensen, 1999; Duffy, 2010; Finnerup et al., 2010; Garcia et al., 2010). A amitriptilina (antidepressivo tricíclico) inibe a hiperalgisia mecânica em roedores submetidos à lesão do nervo periférico enquanto analgésicos como a indometacina (inibidor da ciclooxigenase) e morfina (analgésico opioide) não apresentam efeito (Yasuda et al., 2005). Além disto, a amitriptilina também reverte a hiperalgisia mecânica induzida por lesão da medula espinhal (Densmore et al., 2010). Outros antidepressivos, como desipramina (antidepressivo tricíclico) e maprotilina (antidepressivo tetracíclico) apresentam efeito antinociceptivo no teste da placa aquecida (Ripoll et al., 2006). Autores ainda apontam a interação entre antidepressivos monoaminérgicos e o sistema opioide como mediadores da antinocicepção. Parece que antidepressivos induzem a liberação de peptídeos opioides endógenos responsáveis pelo efeito antinociceptivo (Gray et al., 1998; Wattiez et al., 2011).

É neste contexto que se insere a pesquisa do gênero *Hypericum*. Estudos relatam atividade antinociceptiva para *H. perforatum* no teste do reflexo de retirada da cauda (Öztürk et al., 1996, Kumar et al., 2001), na placa aquecida, no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético (Galeotti et al., 2010a; Kumar et al., 2001) e em modelos de dor neuropática (Galeotti et al., 2010b). Entretanto, outro estudo mostrou que o extrato hidroalcólico de *H. perforatum* não apresentou efeito nos testes do reflexo de retirada da cauda e placa aquecida (Gambara et al., 1999).

O tratamento com um extrato comercial de *H. perforatum* padronizado em hipericina (0,3%) e hiperforina (3,2%) demonstrou efeito antinociceptivo no teste da formalina, este efeito não foi prevenido pelo tratamento com naloxona (antagonista de receptores opioides) (Uchida et al., 2008). Por outro lado, este mesmo extrato parece interagir com o sistema opioide por potencializar o efeito antinociceptivo da morfina

(Uchida et al., 2008). Outro estudo mostrou que o efeito antinociceptivo demonstrado para *H. perforatum* no teste das contorções induzidas por ácido acético foi bloqueado por naloxona (Subhan et al., 2007). Além da atividade antinociceptiva também foi relatada atividade anti-inflamatória para *H. perforatum* (Tedeschi et al., 2003; Hammer et al., 2007 e 2010).

Estudos foram realizados com os principais compostos isolados de *H. perforatum*. Ensaios de radioligação demonstraram afinidade da hipericina por receptores  $\sigma$ , com 48% de inibição da ligação específica (Raffa, 1998). Atividade antinociceptiva foi descrita para hipericina no teste da placa aquecida e no teste das contorções abdominais. Este efeito parece depender da inibição da atividade da proteína cinase C (PKC) e é inalterado pelo pré-tratamento com antagonista de receptores opioides (naloxona) (Galeotti et al., 2010a). Recentemente, Galeotti e colaboradores (2010b) também sugeriram que a hipericina é a responsável pelos efeitos de um extrato padronizado de *H. perforatum* em modelos animais de dor neuropática e que a sua atividade sobre PKC está na base deste efeito. Porém, um estudo em humanos com dor neuropática, usando medicamento padronizado em hipericina, não mostrou diferença em relação ao placebo (Sindrup et al., 2000).

Para a hiperforina, derivado floroglucinol de *H. perforatum*, experimentos *in vitro* indicaram um possível efeito antinociceptivo, uma vez que ela bloqueia canais de sódio e inibe receptores dependentes de ATP envolvidos na transdução do estímulo de dor (Kristhal et al., 2001). Recentemente, o efeito antinociceptivo da hiperforina foi confirmado no teste da placa aquecida e no teste das contorções abdominais. Este efeito parece depender da ativação do sistema opioide (Galeotti et al., 2010a). Embora Gobbi e Mennini (2001) mostraram, em ensaios *in vitro*, que a hiperforina e análogos não se ligam a receptores do tipo  $\sigma$  (Mennini e Gobbi, 2004), enquanto o trimetoxibenzoato de hiperforina, testado *ex vivo*, reduz a ligação a estes mesmos receptores (Pirona et al., 2002, Cervo et al., 2004).

Ainda foi relatada atividade anti-inflamatória para a hiperforina (Schempp et al., 2003). Este acilfloroglucinol parece atuar inibindo linfócitos T (Schempp et al., 2000), ciclooxigenase-1, lipoxigenase-5 (Albert et al., 2002), interleucina-8 (Zhou et al., 2004) e outros fatores pró-inflamatórios (Medina et al., 2006).

Sabe-se também que a hiperforina apresenta efeito antidepressivo, possivelmente por inibir a recaptação sinaptossomal de monoaminas, glutamato e ácido gama-aminobutírico (GABA) (Chatterjee et al., 1998a,b, 1999; Gobbi et al., 1999; Müller et al., 1998, 2001; Wonnemman et al., 2000) com eficácia semelhante (Müller, 2003). Este mecanismo multireceptor pode estar associado a mudanças adaptativas nos receptores (Beerhues, 2007) geradas pela ativação de canais iônicos não-seletivos (Marsh e Davies, 2002, Treiber et al., 2005) que alteram as concentrações intracelulares dos íons sódio, potássio e cálcio (Fisunov et al., 2000; Singer et al., 1999). Estas mudanças na homeostase afetam a sinalização via proteína G acoplada aos receptores metabotrópicos envolvidos no efeito antidepressivo da hiperforina (Feisst e Werz, 2004).

Outras espécies de *Hypericum*, tais como *H. calycinum*, *H. grandifolium* e *H. triquetifolium* demonstraram atividade antinociceptiva nos modelos animais: teste do reflexo de retirada da cauda, teste da formalina e teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético (Apaydin et al., 1999; Bonkanka et al., 2011; Özturk et al., 1996). *H. brasiliense* e *H. cordatum* apresentaram atividade no teste da placa aquecida e no teste do reflexo de retirada da cauda (Mendes et al., 2002). As espécies *H. canariense*, *H. glandulosum*, *H. reflexum*, *H. empetrifolium* e *H. brasiliense* demonstraram efeito antinociceptivo em testes como reflexo de retirada da cauda, inibição das contorções abdominais e placa aquecida, e também demonstraram atividade anti-inflamatória, em testes de edema de pata ou orelha induzido por diferentes agentes algogênicos (Trovato et al., 2001; Rabanal et al., 2005; Sanchez-Mateo et al., 2002; Perazzo et al., 2008).

Estudos preliminares do efeito antinociceptivo de espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul (Brasil) foram positivos para extratos metanólico e lipofílico de *H. caprifoliatum* no teste da placa aquecida (Viana et al., 2003). Além disto, o extrato ciclo-hexânico foi capaz de reduzir o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. Também foi verificado que o extrato ciclo-hexânico de *H. polyanthemum* apresenta efeito antinociceptivo no teste da placa aquecida e no teste de contorções abdominais induzida por ácido acético (Haas et al., 2010; Viana et al., 2003). Ambos os extratos tiveram seus efeitos na placa aquecida prevenidos pelo pré-tratamento com naloxona, mostrando que a ativação do sistema opioide é importante para o efeito antinociceptivo (Haas et al., 2010; Viana et al., 2003). Embora ensaios *ex*

*vivo* tenham mostrado que estes mesmos extratos lipofílicos não alteram a ligação [<sup>35</sup>S]-GTPγS estimulada por DAMGO (um peptídeo opioide sintético) em preparados de membrana de tálamo de ratos (Viana, 2007; Rates et al., 2010).

Espécies de *Hypericum* nativas do sul do Brasil apresentam xantonas, flavonoides, benzopiranos e derivados floroglucinois como os principais responsáveis pelas atividades biológicas. Os derivados floroglucinois são estruturas diméricas formadas por um ácido filicinico e uma porção floroglucinol. Os compostos diméricos frequentemente apresentam um núcleo benzopirano, formado pela ciclização de uma unidade prenila com um grupo hidroxil adjacente. Em algumas espécies brasileiras de *Hypericum* também é comum a ocorrência de compostos formados pelo núcleo benzopirano na forma de um monômero. Normalmente, benzopiranos livre ou cromenos são raros em espécies de *Hypericum*, estes compostos foram isolados apenas de algumas espécies, como *H. revolutum* Vahl. (Décosterd et al., 1986). Moléculas com esse padrão estrutural tem sido propostos como marcadores quimiotaxonômicos para as espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul (Brasil), pois diferem dos acilfloroglucinois hiperforina e ad-hiperforina, presentes em *H. perforatum* (Europa), que possuem um esqueleto biciclononano prenilado (von Poser et al., 2006). Além disto, as espécies de *Hypericum* nativas do sul do Brasil (Figura 1A) não apresentam glândulas negras (Ferraz et al., 2002), responsáveis pela produção de hipericina e pseudohipericina em outras espécies, como *H. perforatum* (Figura 1B) (Robson, 1990).

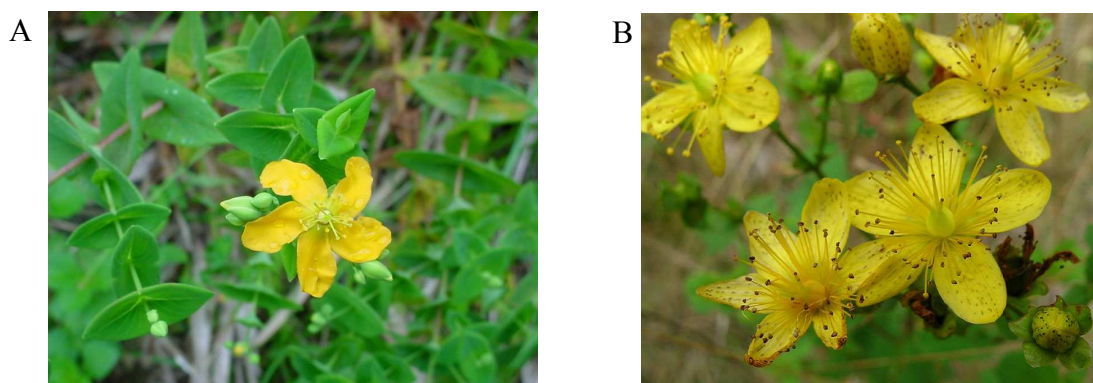


Figura 01: *Hypericum caprifoliatum* (A) e *Hypericum perforatum* (B).

Algumas destas substâncias apresentaram atividade antidepressiva e antinociceptiva. O flavonóide hiperosídeo (Figura 2A), abundante em espécies de



*Hypericum*, apresentou atividade do tipo antidepressiva dependente da neurotransmissão dopaminérgica em roedores (Haas et al., 2011). Neste mesmo estudo Haas e colaboradores (2011) mostraram que o tratamento com hiperosídeo não apresenta efeito antinociceptivo nos testes das contorções induzidas por ácido acético e placa aquecida, embora Rylsky e colaboradores (1979) tenham demonstrado efeito na placa aquecida em doses menores de hiperosídeo.

O benzopirano HP1 (Figura 2B), isolado de *H. polyanthemum* (Ferraz et al., 2001), apresentou efeito antinociceptivo nos testes das contorções abdominais e na placa aquecida. A ação antinociceptiva foi bloqueada pela pré-administração de naloxona no modelo da placa aquecida (Haas et al., 2010). Estes resultados indicam que o HP1 pode estar contribuindo para o efeito antinociceptivo mediado pelo sistema opioide previamente relatado para *H. polyanthemum* (Viana et al., 2003).

O hiperbrasilol B (Figura 2C) um derivado floroglucinol dimérico obtido de *H. caprifoliatum* e *H. connatum*, apresentou efeito em um modelo animal preditivo para a atividade antidepressiva. Este composto também apresentou efeito antinociceptivo no teste da placa aquecida em doses que não comprometem a coordenação motora avaliada no aparato rota-rod (Stolz et al., 2010).

A uliginosina B (Figura 2D), um derivado floroglucinol dimérico identificado em *H. myrianthum* (Ferraz et al., 2002), *H. carinatum*, *H. polyanthemum* (Nör et al., 2004) e *H. caprifoliatum* (Nör et al., 2007), teve recentemente sua estrutura tridimensional elucidada por Leal e colaboradores (2010), apresentou efeito preditivo para a atividade antidepressiva no teste do nado forçado. Este efeito foi abolido pelo pré-tratamento com SCH 23990 e sulpirida, indicando o envolvimento dos receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> no efeito antidepressivo (Rates et al., 2010; Viana, 2007). Estes resultados corroboram com ensaios *in vitro* realizados para a uliginosina B, mostrando que ela inibe a recaptção sinaptossomal de monoaminas, especialmente dopamina (Rates et al., 2010).

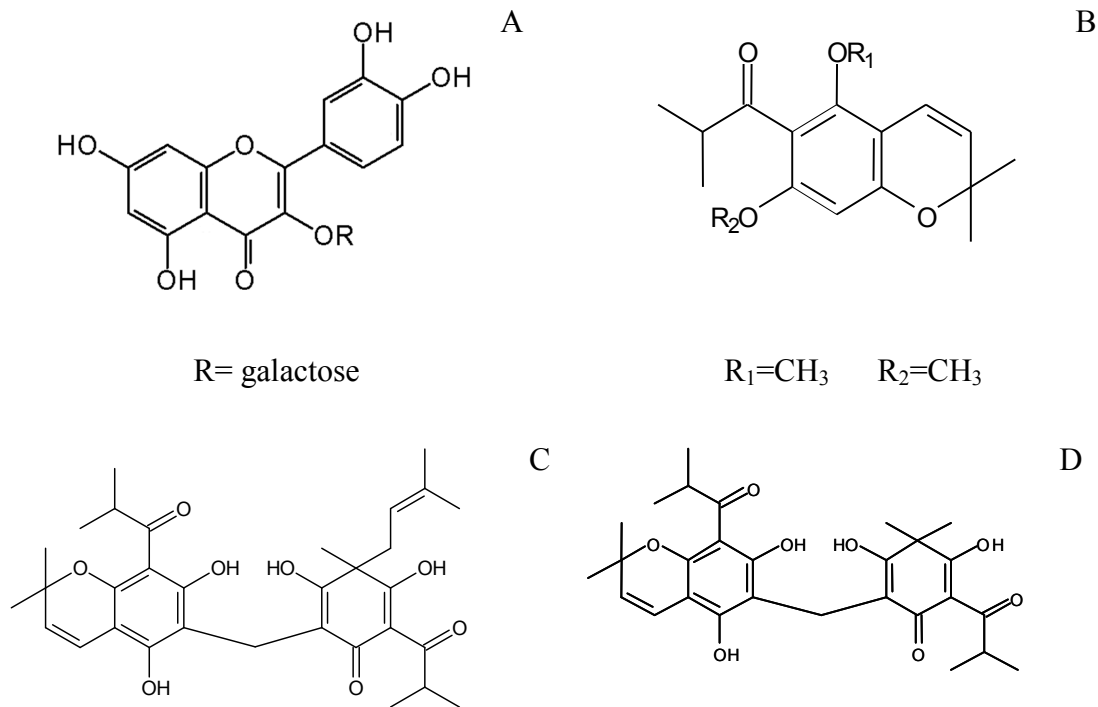


Figura 2: Estrutura de compostos isolados de espécies de *Hypericum* nativas do sul do Brasil: (A) hiperosídeo; (B) HP1; (C) hiperbrasilol B; (D) uliginosina B.

Assim, o objetivo deste estudo foi investigar o possível envolvimento da uliginosina B na atividade antinociceptiva demonstrada para *H. polyanthemum* e *H. caprifoliatum* nos testes da placa aquecida e das contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos, bem como avaliar o mecanismo de ação antinociceptiva da uliginosina B, através da manipulação farmacológica dos sistemas opioide e da neurotransmissão dopaminérgica na placa aquecida e no rota-rod e em ensaios de radioligação a receptores opioides e dopaminérgicos. Os ensaios *in vivo* foram realizados no Laboratório de Psicofarmacologia Experimental da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Brasil e os experimentos *in vitro* foram realizados na Unité de Neuropsychopharmacologie Expérimentale da Université de Rouen – France, sob supervisão do Dr. Jean Claude do Rego.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Nesta dissertação foi realizado um estudo sobre o efeito antinociceptivo da uliginosina B, um derivado floroglucinol presente em espécies de *Hypericum* nativas do sul do Brasil. Demonstramos que o tratamento com uliginosina B via oral reduz o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. Este modelo de nocicepção periférica é frequentemente usado para triagem de novos compostos com potencial ação antinociceptiva, embora seja um teste inespecífico para detecção de analgésicos, uma vez que bloqueadores adrenérgicos, anti-histamínicos, relaxantes musculares, inibidores da monoamina oxidase e neurolépticos também inibem as contorções abdominais (Le Bars et al., 2001). Por outro lado, o modelo da placa aquecida apresenta maior seletividade para substâncias que atuam a nível supra-espinhal, como analgésicos opioides (Le Bars et al., 2001). Neste modelo, os grupos tratados com uliginosina B (15 mg/kg, i.p. e 90mg/kg, v.o.) apresentaram efeito antinociceptivo, em doses que não comprometem a performance motora no rota-rod. Além disto, uliginosina B (i.p.) apresentou efeito antinociceptivo dose-resposta na placa aquecida, sendo 10mg/kg (i.p.) a menor dose efetiva e 15 mg/kg (i.p.) o platô do efeito.

Na investigação dos sistemas de neurotransmissão envolvidos observamos que o efeito antinociceptivo do grupo tratado com uliginosina B 15 mg/kg (i.p.) foi abolido pelo pré-tratamento com naloxona (antagonista inespecífico dos receptores opioides), indicando o envolvimento do sistema opioide. Este resultado nos permite sugerir que a uliginosina B participa do efeito antinociceptivo descrito para *H. caprifoliatum* e *H. polyanthemum*, também bloqueados por naloxona (Viana et al., 2003; Haas et al., 2010). Interessantemente, o pré-tratamento com naloxona não alterou o efeito antinociceptivo do grupo tratado com uliginosina B 90 mg/kg (i.p.), indicando que outros mecanismos também devem estar envolvidos.

O pré-tratamento com SCH 23390 não modificou o efeito antinociceptivo da uliginosina B, uma vez que não afetou o tempo de latência dos camundongos para pular ou lambe uma das patas posteriores, indicando que os receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub> não estão envolvidos no efeito antinociceptivo da uliginosina B. Enquanto o pré-tratamento com sulpirida bloqueou o efeito antinociceptivo de uliginosina B 15 e 90 mg/kg (i.p.), mostrando que os receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub>/D<sub>4</sub> também contribuem para o efeito antinociceptivo. O envolvimento dos receptores dopaminérgicos no efeito anti-imobilidade dos extratos de *H. caprifoliatum* e *H.*

*polyanthemum* no teste do nado forçado havia sido previamente demonstrado por nosso grupo (Viana et al., 2005, 2006 e 2007), este resultado sugere que os efeitos antinociceptivo e anti-imobilidade podem estar relacionados.

O tratamento com uliginosina B (90 mg/kg, i.p.) em doses elevadas, cerca de dez vezes a mínima dose efetiva, provocou efeito atáxico nos camundongos, reduzindo o tempo de permanência e aumentando o número de quedas no rota-rod. Sabe-se que este efeito pode ser indicio de neurotoxicidade (Pearl et al., 1969). Este prejuízo motor causado pelo tratamento com uliginosina B (90 mg/kg, i.p.) foi completamente abolido pelo pré-tratamento com naloxona e parcialmente bloqueado por SCH 23390 e sulpirida, mostrando que tanto a ativação do sistema opioide quando a ativação dos receptores dopaminérgicos das famílias D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> são importantes para o efeito motor.

A partir destes dados, é razoável supor que receptores opioides e dopaminérgicos apresentam importância distinta para o efeito antinociceptivo e comprometimento motor induzidos pela administração aguda de uliginosina B em camundongos. Nossos resultados mostram que a ativação dos receptores D<sub>1</sub> é fundamental apenas para o efeito motor, enquanto os receptores D<sub>2</sub> e opioides estão envolvidos em ambos os efeitos. Contudo, ainda é cedo para descartarmos o envolvimento de todos esses receptores no efeito motor e antinociceptivo. Nossos resultados indicam que de acordo com a dose de uliginosina B testada e modelo animal utilizado as respostas são diferentes, então estes achados podem estar associados apenas a uma questão de sensibilidade das drogas.

Ainda com o objetivo de avaliar o efeito da uliginosina B sobre receptores dopaminérgicos e opioide foram realizados ensaios *in vitro*. A uliginosina B não foi capaz de estimular a ligação [<sup>35</sup>S]-GTPγS em preparados de membranas de tálamo (enriquecida em receptores opioides) e corpo estriado (enriquecida em receptores dopaminérgicos) de ratos. Uma vez que a ligação [<sup>35</sup>S]-GTPγS à proteína G ocorre apenas na presença de agonistas do receptor de interesse, podemos concluir que a uliginosina B não é um agonista direto dos receptores opioides ou dopaminérgicos. Além disto, ensaios de radioligação mostraram que a uliginosina B não desloca a ligação de [<sup>3</sup>H]-naloxona a receptores opioides em preparados de membrana do prosencéfalo nem deslocaram a ligação de [<sup>3</sup>H]-SCH 23390 ou [<sup>3</sup>H]-sulpirida a receptores dopaminérgicos em preparados do corpo estriado de ratos. Estes dados

permitem afirmar que a uliginosina B além de não ativar também não se liga a receptores dopaminérgicos e opioides. Deste modo, os efeitos antinociceptivo e atáxico observados são indiretos ou resultado da ação de um metabólito formado após administração *in vivo* da uliginosina B. Para descartar o envolvimento de metabólitos como mediadores dos efeitos *in vivo* estão previstos estudos de farmacocinética da uliginosina B (i.p. e v.o.), que permitem a identificação e quantificação deste floroglucinol e de seus metabólitos a nível periférico e central.

Embora Apesar da uliginosina B não se ligar a receptores dopaminérgicos, Viana (2007) demonstrou que este floroglucinol inibe a recaptação sinaptossomal de monoaminas, com maior potência para dopamina. Assim, o efeito dopaminérgico relatado para a uliginosina B neste trabalho, pode ser resultado deste aumento de dopamina na fenda sináptica. Estudos sugerem o envolvimento da via dopaminérgica mesolímbica na supressão da dor tônica (Altier e Stewart, 1998). Além disto, outros autores mostraram que agonistas dopaminérgicos ou drogas que aumentam a disponibilidade de dopamina ativam o sistema opioide, possivelmente através do aumento na liberação de peptídeos opioides endógenos (Gray et al., 1998; Kamei e Saitoh, 1996; Millan, 2002; Soderman et al., 2009; Zarrindast et al, 1999). Ação semelhante pode estar implicada nos resultados obtidos com o tratamento com uliginosina B. Para confirmar estes achados estão planejados estudos de microdiálise em ratos acordados para verificar a liberação de dopamina em diferentes estruturas encefálicas, bem como avaliar se o tratamento com uliginosina B induz aumento na liberação de peptídeos opioides endógenos.

Os resultados desta pesquisa, somados a estudos prévios do nosso grupo para espécies de *Hypericum* sulbrasileiras mostram que compostos fenólicos com núcleo benzopirano, como a uliginosina B, são um padrão estrutural com atividade no sistema nervoso central. Vários estudos corroboram com esta conclusão: uma fração enriquecida em derivados floroglucinois obtida de *H. caprifoliatum* apresentou efeito preditivo de atividade antidepressiva no teste do nado forçado (Viana et al., 2005, 2006); a uliginosina B e o hiperbrasilol B além da atividade antidepressiva também apresentaram efeito antinociceptivo (Viana, 2007; Stolz et al., 2010); HP1 também demonstrou efeito antinociceptivo (Haas et al., 2010). Além destes compostos já testados, espécies brasileiras de *Hypericum* apresentam outras substâncias com este mesmo padrão

estrutural, como monômeros de benzopirano, benzofenonas, xantonas e derivados diméricos de floroglucinol (Ferraz et al., 2001; von Poser et al., 2006).

Diversas outras moléculas naturais ou sintéticas que apresentam o núcleo benzopirano têm atividades farmacológicas, como anti-inflamatório, antitérmico (Prasanna et al., 2004; Eissa et al., 2009), inibidor da cicloxigenase (Gierse et al., 2008) e inibidor de reflexos neurovasculares induzidos no nervo trigêmeo (Parsons et al., 2001). Além disto, estudos clínicos relatam o uso de derivados floroglucinol para o tratamento da dor em síndromes do colón irritável e ardência bucal (Cargill et al., 1992; Ducrotte et al., 2005; Jafri et al., 2006; Chassany et al. 2007; Sardella et al., 2008).

De tal modo, podemos sugerir que derivados de floroglucinol e monômeros de benzopirano representam um padrão molecular promissor para o desenvolvimento de antidepressivos e analgésicos. Neste contexto, nossos resultados corroboram a idéia de que substâncias derivadas de plantas têm papel revelante como fonte de novas substâncias com mecanismos de ação inovadores (Calixto et al., 2000; Rates, 2001; Rollinger et al. , 2006).

Em conclusão, nossos resultados mostram que a uliginosina B induz efeito antinociceptivo e atáxico dependentes das doses e vias testas. Os dados *in vivo* indicam que receptores opioides e D<sub>2</sub> estão envolvidos em ambos efeitos, enquanto os receptores D<sub>1</sub> parecem ser importantes apenas para o efeito atáxico. Contudo, ensaios *in vitro* mostraram que a uliginosina B não se liga nem ativa receptores dopaminérgicos e opioides. Baseando-se em estudos anteriores (Viana et al., 2005; Viana, 2007), o efeito antinociceptivo e atáxico da uliginosina B pode ser resultado do aumento de monoaminas na fenda sináptica ou ainda ação de um metabólito nestas vias. Estes resultados somados a outras pesquisas do nosso grupo fornecem evidências de que o esqueleto de benzopirano merece mais estudos. Este padrão estrutural pode representar uma nova classe de fármacos para o tratamento da dor e da depressão.

**REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS**



- Adbel-Salam, O.M., 2005. Anti-inflammatory, antinociceptive, and gastric effects of *Hypericum perforatum* in rats. *Scientific World Journal*. 5, 586-595.
- Albert, D., Zundorf, I., Dingermann, T., Müller, W.E., Steinhilber, D., Werz, O., 2002. Hyperforin is a dual inhibitor of cyclooxygenase-1 and 5- lipoxygenase. *Bioch Pharmacol*. 64 (12), 1767-1775.
- Altier, N., Stewart, J., 1998. Dopamine receptor antagonists in the nucleus accumbens attenuate analgesia induced by ventral tegmental area substance P or morphine and by nucleus accumbens amphetamine. *JPET*. 285, 208-215.
- Amr, Y.M., Yousef, A.A., 2010. Evaluation of efficacy of the perioperative administration of venlafaxine or gabapentin on acute and chronic postmastectomy pain. *Clin J Pain*. 26(5), 381-385.
- Apaydin, S., Zeybek, U., Ince, I., Elgin, G., Karamenderes, C., Ozturk, B., Tuglular, I., 1999. *Hypericum triquetifolium* Turra. extract exhibits antinociceptive activity in the mouse. *J Ethnopharmacol*. 67, 307-312.
- Beerhues, L., 2007. Molecules of interest: Hyperforin. *Phytochemistry*. 67, 2201-2207.
- Bonkanka, C.X., Sanchez-Mateo, C.C., Rabanal, R.M., 2011. Antinociceptive activity of *Hypericum grandifolium* Choisy in mice. *J Nat Med*. 65, 122-128.
- Bradley, L.A., Wohlreich, M.M., Wang, F., Gaynor, P.J., Robinson, M.J., D'Souza, D.N., Mease, P.J., 2010. Pain response profile of patients with fibromyalgia treated with duloxetine. *Clin J Pain*. 26(6), 498-504.
- Butterweck, V., Schmidt, M., 2007. St. John's wort: role of active compounds for its mechanism of action and efficacy. *Wien Med Wochenschr*. 157(13-14), 356-361.
- Caccia, S., Gobbi, M., 2009. St. John's wort components and the brain: uptake, concentrations reached and the mechanisms underlying pharmacological effects. *Curr Drug Metab*. 10(9),1055-1065.
- Calixto, J.B., Beirith, A., Ferreira, J., Santos, A.R., Filho, V.C., Yunes, R.A., 2000. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. *Phytother Res*, 14(6), 401-418.

Cargill, G., Salin, B., Lubin, S., Kohler, F., Coste, T., Rautureau, J., 1992. Effect of phloroglucinol on recto sigmoid motility stimulated by a test meal. Study in patients with irritable bowel syndrome. *Presse Med.* 21(1), 19-23.

Cervo, L., Mennini, T., Rozio, M., Canetta, S., Burbassi, S., Guiso, G., Pirona, L., Riva, A., Morazzoni, P., Caccia, S., Gobbi, M., 2005. Potential antidepressant properties of IDN 5491 (hyperforin-trimethoxybenzoate), a semisynthetic ester of hyperforin. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 15 (2), 211-218.

Chassany, O., Bonaz, B., Bruley, D.E.S., Varannes, S., Bueno, L., Cargill, G., Coffin, B., Ducrotté, P., Grangé, V., 2007. Acute exacerbation of pain in irritable bowel syndrome: efficacy of phloroglucinol/trimethylphloroglucinol. A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Aliment Pharmacol Ther.* 25(9), 1115-1123.

Chatterjee, S., Filippov, V., Lishko, P., Maximyuk, O., Noldner, M., Krishtal, O., 1999. Hyperforin attenuates various ionic conductance mechanisms in the isolated hippocampal neurons of rat. *Life Sci.* 65, 2395-2405.

Chatterjee, S.S., Bhattacharya, S.K., Wonnemann, M., Singer, A., Müller, W.E., 1998a. Hyperforin as a possible antidepressant component of *Hypericum* extracts. *Life Sci.* 63 (6), 499-510.

Chatterjee, S.S., Noldner, M., Koch, E., Erdelmeier, C., 1998b. Antidepressant activity of *Hypericum perforatum* and hyperforin: the neglected possibility. *Pharmacopsychiatry* 31 (Suppl. 1), 7-15.

Daudt, R., von Poser, G.L., Neves, G., Rates, S.M.K., 2000. Screening for the antidepressant activity of some species of *Hypericum* from South Brazil. *Phytother Res.* 15, 344-346.

Décosterd, L. A., Stoeckli-Evan, H., Mnsonthi, J. D., Hostettmann, K., 1986. A new antifungal chromene and related dichromene from *Hypericum revolutum*. *Planta Med.* 52, 429.

Densmore, V.S., Kalous, A., Keast, J.R., Osborne, P.B., 2010. Above-level mechanical hyperalgesia in rats develops after incomplete spinal cord injury but not after cord

transection, and is reversed by amitriptyline, morphine and gabapentin. *Pain*. 151, 184-193.

Ducrotte, P., Dapoigny, M., Bonaz, B., Siproudhis, L., 2005. Symptomatic efficacy of beidellitic montmorillonite in irritable bowel syndrome: a randomized, controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther*. 21(4), 435-444.

Duffy, R.L., 2010. Low back pain: an approach to diagnosis and management. *Prim Care*. 37(4):729-41, vi.

Eissa, A.A.M., Farag, N.A.H., Soliman, G.A.H., 2009. Synthesis, biological evaluation and docking studies of novel benzopyranone congeners for their expected activity as anti-inflammatory, analgesic and antipyretic agents. *Bioorg Med Chem* 2009; 17: 5059–5070.

Feisst, C., Werz, O., 2004. Suppression of receptor-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization and functional leukocyte responses by hyperforin. *Bioch Pharmacol*. 67 (8), 1531-1539.

Ferraz, A.B.F., Bordignon, S.A.L., Staats, C., Schripsema, J., von Poser, G.L., 2001. Benzopyrans from *Hypericum polyanthemum*. *Phytochemistry*, 57, 1227-1230.

Ferraz, A.B.F., Schripsema, J., Pohlmann, A.R., von Poser, G.L., 2002. Uliginosin B from *Hypericum myrianthum* Cham. & Schltdl. *Biochem Syst Ecol*. 30, 989-991.

Finnerup, N.B., Sindrup, S.H., Jensen, T.S., 2010. The evidence for pharmacological treatment of neuropathic pain. *Pain*. 150, 573–581.

Fisunov, A., Lozovaya, N., Tsintsadze, T., Chatterjee, S., Noldner, M., Krishtal, O., 2000. Hyperforin modulates gating of P-type  $\text{Ca}^{2+}$  current in cerebellar Purkinje neurons. *Pflugers Arch*. 440, 427- 434.

Frussa-Filho, R., Rocha, J.B., Conceição, I.M., Mello, C.F., Perreira, M.E., 1996. Effects of dopaminergic agents on visceral pain measured by the mouse writhing test. *Archives internationales de pharmacodynamie therapie*. 331 (1), 74-93.

Galeotti, N., Vivoli, E., Bilia, A.R., Bergonzi, M.A., Bartolini, A., Ghelardin, C.A., 2010a. Prolonged protein kinase C-mediated, opioid-related antinociceptive effect of St John's wort in mice. *J Pain*. 11, 149-159.

Galeotti, N., Vivoli, E., Bilia, A.R., Vincieri, F.F., Ghelardini, C., 2010b. St. John's Wort reduces neuropathic pain through a hypericin-mediated inhibition of the protein kinase C  $\alpha$  and  $\epsilon$  activity. *Biochem Pharmacol.* 79, 1327-1336.

Gambara, C., Ghiglieri, O., Tolu, P., Montis, M.G., Giachetti, D., Bombardelli, E., Tagliamonte, A., 1999. Efficacy of an *Hypericum perforatum* (St John's wort) extract in preventing and reverting a condition of escape deficit in rats. *Neuropsychopharmacol.* 21 (2), 247-257.

Garcia, X., del Valle, J., Escribano, E., Domenech, J., Queralt, J., 2010. Analgesic and antiallodynic effects of antidepressants after infiltration into the rat. *Pharmacol.* 86(4):216-23.

Gierse, J., Nickols, M., Leahy, K., Warner, J., Zhang, Y., Cortes-Burgos, L., Carter, J., Seibert, K., Masferrer, J., 2008. Evaluation of COX-1/COX-2 selectivity and potency of a new class of COX-2 inhibitors. *Eur J Pharmacol.* 588, 93-98.

Gilbert, A.K., Franklin, K.B.J., 2001. Characterization of the analgesic properties of nifedipine in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 68(4), 783-787.

Gobbi, M., Dalla Valle, F., Ciapparelli, C., Diomedea, L., Morazzoni, P., Verotta, L., Caccia, S., Cervo, L., Mennini, T., 1999. *Hypericum perforatum* L. extract does not inhibit 5-HT transporter in rat brain cortex. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology.* 360 (3), 262-269.

Gobbi, M., Mennini, T., 2001. Is St John's wort a 'Prozac-like' herbal antidepressant? *Trends Pharmacol Sci.* 22(11), 557-559.

Gray, A.M., Spencer, P.S.J., Sewell, R.D.E., 1998. The involvement of the opioidergic system in the antinociceptive mechanism of action of antidepressant compounds. *Brit J Pharmacol.* 124, 669-674.

Haas, J.S.; Stolz, E.D.; Betti, A.H.; Stein, A.C.; Schripsema, J.; von Poser, G.L.; Rates, S.M.K., 2011. The anti-immobility effect of hyperoside on the forced swimming test in rats is mediated by the D2-like receptors activation. *Planta Med.* 77(4), 334-339.

- Haas, J.S., Viana, A.F., Heckler, A.P., von Poser, G.L., Rates, S.M.K., 2010. The antinociceptive effect of a benzopyran (HP1) isolated from *Hypericum polyanthemum* in mice hot-plate test is blocked by naloxone. *Planta Med.* 76, 1419-1423.
- Hammer, K.D.P., Hillwig, M.L., Solco, A.K.S., Dixon, P.M., Delate, K., Murphy, P.A., Wurtele, E.S., Birt, D.F., 2007. Inhibition of prostaglandin E2 production by anti-inflammatory *Hypericum perforatum* extracts and constituents in RAW264.7 mouse macrophage cells. *J. Agric. Food Chem.* 55, 7323-7331.
- Hammer, K.D.P., Yum, M.Y., Dixon, P.M., Birt, D.F., 2010. 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. *Phytochem.* 71, 716-725.
- Jafri, W., Yakoob, J., Hussain, S., Jafri, N., Islam, M., 2006. Phloroglucinol in irritable bowel syndrome. *J. Pak. Med. Assoc.* 56(1), 5-8.
- Jayasuriya, H., Clark, A.M., Mcchesney, J.D., 1991. New antimicrobial filicinic acid derivatives from *Hypericum drummondii*. *J Nat Prod.* 54, 1314-1320.
- Kamei, J., Saitoh, A. 1996. Involvement of dopamine D2 receptor-mediated functions in the modulation of morphine-induced antinociception in diabetic mouse. *Neuropharmacol.* 35 (3), 213-278.
- Kasper, S., Dienel, A., 2002. Cluster analysis of symptoms during antidepressant treatment with *Hypericum* extract in mildly to moderately depression outpatients. *Psychopharmacol.* 164, 301-308.
- Kristhal, O., Lozovaya, N., Fisunov, A., Tsintsadze, T., Pankratov, Y., Kapanitsa, M., Chatterjee, S.S., 2001. Modulation of ion channels in rat neurons by the constituents of *Hypericum perforatum*. *Pharmacopsych.* 34(1), 74-82.
- Kumar, V., Singh, P.N., Muruganandam, A.V., Bhattacharya, S.K., 2001. Effect of Indian *Hypericum perforatum* Linn on animal models of cognitive dysfunction. *J Ethnopharmacol.* 72, 119-128.

- Le Bars, D., Gozariu, M., Cadden, S.W., 2001. Animal Models of Nociception. *Pharmacol Rev.* 53, 597-652.
- Leal, K.Z., Yoneda, J.D., Lindgren, E.B., Pinheiro, C.B., Corrêa, A.L., França, H.S., 2010. Conformational analysis of phloroglucinols from *Hypericum brasiliense* by using X-ray diffraction and molecular modeling. *J. Braz. Chem. Soc.* 21(5), 837-841.
- Linde, K., 2009a. St. John's Wort – an Overview. *Forsch Komplementmed.* 16,146-155.
- Linde, K., Berner, M.M., Kriston, L., 2008. St John's wort for major depression. *J Oral Pathol Med.* 37(7), 395-401.
- Linde, K., Berner, M.M., Kriston, L., 2009b. St John's wort for major depression (Review). *The Cochrane Collaboration.* 1, 1-151.
- Linde, K., Ramirez, G., Mulrow, C.D., Pauls, A., Weidenhammer, W., Melchart, D., 1996. St. John's Wort for depression – An overview and meta-analysis of randomized clinical trials. *Brit Med J.* 313, 253-258.
- Marsh, W., Davies, J., 2002. The involvement of sodium and calcium ions in the release of amino acid neurotransmitters from mouse cortical slices elicited by hyperforin. *Life Sci.* 71, 2645-2655.
- Medina, M.A., Martínez-Poveda, B., Amores-Sánchez, M.I., Quesada, A.R., 2006. Hyperforin: More than an antidepressant bioactive compound? *Life Sci.* 79, 105-111.
- Mendes, F.R., Mattei, R., Carlini E.L.A., 2002. Activity of *Hypericum brasiliense* and *Hypericum cordatum* on central nervous system in rodents. *Fitoterapy.* 73, 462-471.
- Mennini, T., Gobbi, M., 2004. The antidepressant mechanism of *Hypericum perforatum*. *Life Sci.* 75, 1021-1027.
- Millan, M.J., 2002. Descending control of pain. *Prog Neurobiol.* 66, 355-474.
- Morgan, M.J., Franklin, K.B.J., 1991. Dopamine receptor subtypes and formalin test analgesia. *Pharmacol Biochem Behav.* 40 (2), 317-322
- Müller, W.E., 2003. Current St. John's wort research from mode of action to clinical efficacy. *Pharmacol. Res.* 47, 101–109.

Müller, W.E., Singer, A., Wonnemann, M., 2001. Hyperforin – antidepressant activity by a novel mechanism of action. *Pharmacopsych.* 34, 98-102.

Müller, W.E., Singer, A., Wonnemann, M., Hafner, U., Rolli, M., Schafer, C., 1998. Hyperforin represents the neurotransmitter reuptake inhibiting constituent of *Hypericum* extract. *Pharmacopsychiatry* 31 (Suppl. 1), 16–21.

Nahrstedt, A., Butterweck, V., 2010. Lessons learned from herbal medicinal products: the example of St. John's wort (perpendicular). *J Nat Prod.* 73(5), 1015-1021.

Nör, C., Albring, D., Ferraz, A.B.F., Schripsema, J., Pires, V., Sonnet, P., Guillaume, D., von Poser, G.L., 2004. Phloroglucinol derivatives from four *Hypericum* species belonging to the Trigynobrathys section. *Biochem Syst Ecol.* 32, 517-519.

Nör, C., Bernardi, A.P.M, Haas, J.S., Schripsema, J., Rech, S.B, von Poser, G.L., 2007. Phenolic constituents of *Hypericum* flowers. *Nat Prod Com.* 3, 237-240.

Öztürk, Y., Aydin, S., Beis, R., Baser, K.H.C., Berberoglu, H., 1996. Effects of *Hypericum perforatum* L. and *Hypericum calycinum* L. extracts on the central nervous system in mice. *Phytomed.* 3(2), 139-146.

Parsons, A.A., Bingham, S., Raval, P., Read, S., Thompson, M., Upton, N., 2001. Tonabersat (SB-220453) a novel benzopyran with anticonvulsant properties attenuates trigeminal nerve-induced neurovascular reflexes. *Br J Pharmacol.* 132, 1549-1557.

Pearl, J., Stander, H., McKean, D.B., 1969. Effects of analgesics and other drugs on mice in phenylquinone and rotorod tests. *J Pharmacol Exp Ther.* 167, 9-13.

Perazzo, F.F., Lima, L.M., Padilha, M.M., Rocha, L.M, Sousa, P.J.C., Carvalho, J.C., 2008. Anti-inflammatory and analgesic activities of *Hypericum brasiliense* (Willd) standardized extract. *Braz J Pharmacog.* 18(3), 320-325.

Pirona, L., Funicello, M., Ekalle Soppo, C.B., Cervo, L., Bombardelli, E., Morazzoni, P., Mennini, T., Gobbi, M., 2002. Studi sul possibile meccanismo d'azione dell'iperico, una pianta medicinale con propriety antidepressive. XIII Congresso della Societa Italiana di Neuropsicofarmacologia, Milano.

Prasanna, S., Manivannan, E., Chaturvedi, S.C., 2004. Quantitative structure–activity relationship analysis of a series of 2,3-diaryl benzopyran analogues as novel selective cyclooxygenase-2 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 14, 4005-4011.

Rabanal, R.M., Bonkanka, C.X., Hernandez-Perez, M., Sanchez-Mateo, C.C., 2005. Analgesic and topical anti-inflammatory activity of *Hypericum canariense* L. and *Hypericum glandulosum* Ait. *J Ethnopharmacol.* 96(3), 591-596.

Raffa, R.B., 1998. Screen of receptor and uptake-site of hipericin component of St John's wort reveals receptor binding. *Life Sci,* 62 (16), 265-270.

Rates, S.M.K., 2001. Uso Racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de farmacognosia. *Rev Bras Farmacog.* 11(2), 57-69.

Rates, S.M.K., von Poser, G.L., Viana, A.F., Costentin, J., do Rego, J.C., 2010. 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*. Patent Number: WO2010092162-A1. Available: [http://apps.isiknowledge.com/full\\_record.do?product=UA&search\\_mode=GeneralSearch&qid=1&SID=R2hB38fLgGEIa5afGCB&page=1&doc=1&colname=DII](http://apps.isiknowledge.com/full_record.do?product=UA&search_mode=GeneralSearch&qid=1&SID=R2hB38fLgGEIa5afGCB&page=1&doc=1&colname=DII). Accessed in January of 2010.

Ripoll, N., Hascoët, M., Bourin, M., 2006. The four-plates test: Anxiolytic or analgesic paradigm? *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 30, 873-880.

Robson, N.K.B., 1990. Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae) 8. Section 29. Brathys (Part 2) and 30. Trigynobrathys. *Bulletin of the British Museum (Botany),* 20: 1-151.

Rocha, L., Marston, A., Potterat, O., Kaplan, MA., Stoeckli-Evans, H., Hostettmann, K., 1995. Antibacterial phloroglucinols and flavonoids from *Hypericum brasiliense*. *Phytochem.* 40, 1447-1452.

Röder, C., Schaefer, M., Leucht, S., 2004. Meta-Analyse zu wirksamkeit und verträglichkeit der behandlung der leichten und mittelschweren depression mit johanniskraut. *Fortschr Neurol Psychiatr.* 72, 330-343.



Rollinger, J.M., Langer, T., Stuppner, H., 2006. Strategies for efficient lead structure discovery from natural products. *Cur Med Chem.* 13, 1491-1507.

Rylski, M., Duriasz-Rowinka, H., Rewerski, W., 1979. The analgesic action of some flavonoids in the hot plate test. *Acta Physiol Pol.* 30, 385-388.

Saddiqe, Z., Naeem, I., Maimoona, A., 2010. A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. *J. Ethnopharmacol.* 131, 511-521.

Sanchez-Mateo, C.C., Prado, B., Rabanal, R.M., 2002. Antidepressant effects of the methanol extracts of several *Hypericum* species from the Canary Islands. *J Ethnopharmacol.* 79, 119-127.

Sardella, A., Lodi, G., Demarosi, F., Tarozzi, M., Canegallo, L., Carrassi, A., 2008. *Hypericum perforatum* extract in burning mouth syndrome: a randomized placebo-controlled study. *J Oral Pathol Med.* 37(7), 395-401.

Schempp, C.M., Hezel, S., Simon, C., 2003. Topical treatment of atopic dermatitis with *Hypericum* cream: a randomised, placebo-controlled, double-blind half-side comparison study. *Hautarzt* 54, 248-253.

Schempp, C.M., Winghofer, B., Ludtke, R., Simon-Haarhaus, B., Schopf, E., Simon, J.C., 2000. Topical application of St John's wort (*Hypericum perforatum* L.) and of its metabolite hyperforin inhibits the allostimulatory capacity of epidermal cells. *Brit J Dermatology.* 142 (5), 979-984.

Sindrup, S.H., Madsen, C., Bach, F.W., Gram, L.F., Jensen, T.S., 2000. St. John's wort has no effect on pain in polyneuropathy. *Pain.* 91, 361-365.

Sindrupa, S.H., Jensen, T.S., 1999. Efficacy of pharmacological treatments of neuropathic pain: an update and effect related to mechanism of drug action. *Pain.* 83, 389-400.

Singer, A., Wonnemann, M., Müller, W.E., 1999. Hyperforin, a major antidepressant constituent of St. John's wort, inhibits serotonin uptake by elevating free intracellular  $\text{Na}^+$ . *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290, 1363-1368.

Skljarevski, V., Desaiyah, D., Liu-Seifert, H., Zhang, Q., Chappell, A.S., Detke, M.J., Iyengar, S., Atkinson, J.H., Backonja, M., 2010. Efficacy and safety of duloxetine in patients with chronic low back pain. *Spine (Phila Pa 1976)*. 35(13), 578-85.

Soderman, A.R., Unterwald, E.M., 2009. Cocaine-induced mu opioid receptor occupancy within the striatum is mediated by dopamine D2 receptors. *Brain Res.* 1296, 63-71.

Stolz, E.D., Cargnin, S., Centurião, F.B., Braga, A., von Poser, G.L., Rates, S.M.K., 2010. Hyperbrasilol B presents antinociceptive and antidepressant-like effects in mice. *Anais do XXI Simpósio de plantas medicinais do Brasil*.

Subhan, F., Khan, M., Ibrar, M., Nazar-ul-Islam, Khan, A., Gilani, A.H., 2007. Antagonism of antinociceptive effect of hydro-ethanolic extract of *Hypericum perforatum* Linn. By a non selective opioid receptor antagonist, naloxone. *Pakistan J Biol Sci.* 10 (5), 792-796.

Tedeschi, E., Menegazzi, M., Margotto, D., Suzuki, H., Förstermann, U., Kleinert, H., 2003. 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-1 (STAT-1) activation. *JPET.* 307, 254-261.

Treiber, K., Singer, A., Henke, B., Müller, W.E., 2005. Hyperforin activates nonselective cation channels (NSCCs). *Br. J. Pharmacol.* 145, 75-83.

Trovato, A., Raneri, E., Kouladis, M., Tzakou, O., Taviano, M.F., Galati, E.M., 2001. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Hypericum empertrifolium* Willd. (Guttiferae). *II Farmaco.* 56, 455-457.

Uchida, S., Hirai, K., Hatanaka, J., Hanato, J., Umegaki, K., Yamada, S., 2008. Antinociceptive effects of St. John's Wort, *Harpagophytum Procumbens* extract and grape seed proanthocyanidins extract in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 31(2), 240-245.

Viana, A.F., 2007. Estudo de moléculas potencialmente antidepressivas e analgésicas de espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul. Tese de Doutorado. Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, UFRGS.

Viana, A.F., do Rego, J.C., Munari, L., Dourmap, N., Heckler, A.P., Dalla Costa, T., von Poser, G.L, Costentin, J., Rates, S.M.K., 2006. *Hypericum caprifoliatum* (Guttiferae) Cham. & Schltld.: a species native to South Brazil with antidepressant-like activity. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 20, 507-514.

Viana, A.F., do Rego, J.C., von Poser, G.L., Ferraz, A., Heckler, A.P., Constantin, J., Rates, S.M.K., 2005. The antidepressant-like effect of *Hypericum caprifoliatum* Cham. & Schlecht. (Guttiferae) on forced swimming test results from an inhibition of neuronal monoamine uptake. *Neuropharmacol.* 49, 1042-1052.

Viana, A.F., Heckler, A.P., Fenner, R., Rates, S.M.K., 2003. Analgesic activity of *Hypericum caprifoliatum* and *Hypericum polyanthemum* (Guttiferae). *Braz. J. Med. Biol. Research.* 36 (5), 631-634.

von Poser, G.L, Rech, S.B., Rates, S.M.K., 2006 Chemical and pharmacological aspects of Southern Brazilian *Hypericum* species. Global Science Books, UK, 510-516.

Wattiez, A.S., Libert, F., Privat, A.M., Loiodice, S., Fialip, J., Eschalier, A., Courteix, C., 2011. Evidence for a differential opioidergic involvement in the analgesic effect of antidepressants: prediction for efficacy in animal models of neuropathic pain? *Br J Pharmacol.* doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01297.x.

Whiskey, E., Werneke, U., Taylor, D., 2001. A systematic review and meta-analysis of *Hypericum perforatum* in depression: a comprehensive clinical review. *Int Clin Psychopharmacol.* 16, 239-252.

Wonnemann, M., Singer, A., Müller, W.E., 2000. Inhibition of synaptosomal uptake of 3H-L-glutamate and 3H-GABA by hyperforin, a major constituent of St. John's wort: The role of amiloride sensitive sodium conductive pathways. *Neuropsychopharmacol.* 23(2), 188-197.

Yasuda, T., Mikia, S., Yoshinagaa, N., Senbab, E., 2005. Effects of amitriptyline and gabapentin on bilateral hyperalgesia observed in an animal model of unilateral axotomy. *Pain.* 115, 161–170.

Zanoli, P., Rivasi, M., Zavatti, M., Brusiani, F., Baraldi, M., 2005. New insight in the neuropharmacological activity of *Humulus lupulus* L. J. Ethnopharmacol. 102, 102–106.

Zarrindast, M.R., Nassiri-Rad, S., Pazouki, M., 1999. Effects of dopaminergic agents on antinociception in formalin test. Gen Pharmacol. 32, 517-522.

Zhou, S., Chan, E., Pan, S.Q., Huang, M., Lee, E.J., 2004. Pharmacokinetic interactions of drugs with St John's wort. J Psychopharmacol. 18(2), 262-276.

**ANEXOS**

**ANEXOS**

Anexo 01 Artigo publicado através da participação em outro projeto..... 40

Anexo 01:

Haas, J.S., Stolz E.D., Betti, A.H., Stein, A.C., Schripsema, J, von Poser, G.L., Rates, S.M.K., 2011. The anti-immobility effect of hyperoside on the forced swimming test in rats is mediated by the D2-like receptors activation. *Planta med.* 77(4), 334-339.