

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA  
DO EXTRATO BRUTO, DAS FRAÇÕES E DOS  
COMPOSTOS OBTIDOS DE *Geissospermum vellosii***

---

**Dissertação de Mestrado**

**Juliana de Abreu Werner Tavares**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2008**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO  
EXTRATO BRUTO, DAS FRAÇÕES E DOS COMPOSTOS  
OBTIDOS DE *Geissospermum vellosii***

---

Por

**Juliana de Abreu Werner Tavares**

Dissertação apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia,  
Área de Concentração em Neuropsicofarmacologia e Imunofarmacologia,  
da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS)  
como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Mestre em Farmacologia.**

**Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Juliano Ferreira**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2008**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

A comissão examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

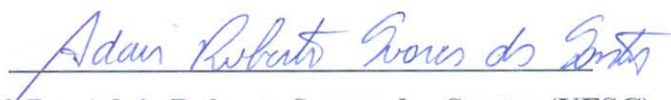
**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO  
EXTRATO BRUTO, DAS FRAÇÕES E DOS COMPOSTOS  
OBTIDOS DE *Geissospermum vellosii***

*Elaborada por*

**Juliana de Abreu Werner Tavares**

Como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Mestre em Farmacologia**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**



**Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos (UFSC)**  
Presidente/Orientador



**Profa. Dra. Michele Rechia Figuera (ULBRA)**



**Profa. Dra. Andreza Fabro de Bem (UFSC)**

Santa Maria, 04 de Novembro de 2008

*“A peculiaridade da maioria das coisas que consideramos frágeis  
é o modo como elas são, na verdade, fortes...  
Até os sonhos, que são as coisas mais intangíveis e delicadas,  
podem se mostrar incrivelmente difíceis de matar.”*

Neil Gaiman  
Coisas Frágeis

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e aos professores pelos conhecimentos transmitidos e aos funcionários pela disposição em ajudar sempre que necessário.

À CAPES, pelo auxílio financeiro, fundamental para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador, Professor Adair Roberto Soares dos Santos, pela disposição em me conduzir desde o principio desta jornada e principalmente pelo conhecimento compartilhado neste tempo de trabalho.

Aos Professores Juliano Ferreira e Luiz Fernando Royes, que estiveram presentes em grande parte deste trabalho, e sem os quais esse não teria sido possível, não apenas pelas orientações como pelos exemplos profissionais.

Ao Professor Obdúlio Miguel e Josiane Dias, pelo fornecimento do extrato, frações e compostos de *G. vellosii* que tiveram sua atividade antinociceptiva avaliada neste trabalho.

Aos colegas de laboratório de Neuropsicofarmacologia que contribuíram de alguma forma na realização deste trabalho, mas em especial à Sara Marchesan, amiga e exemplo de determinação e força.

Aos colegas Daniel, Leidiane, Rodrigo, Denise, Daniela e Patrícia, pela hospitalidade e carinho que certamente tornaram meus dias de experimento em Florianópolis bem mais agradáveis, bem como a todos os alunos do laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação – UFSC.

Às professoras Andreza Fabro de Bem e Michele Rechia Figuera pelas considerações e sugestões visando o aprimoramento deste trabalho.

Aos meus pais, Claudete e Mauro Werner, por terem me dado a vida, e por todos os exemplos e ensinamentos que fizeram de mim o que sou hoje.

Ao meu esposo, Enéias Tavares, por me apoiar e me auxiliar de tantas formas, mas principalmente por me ajudar a encontrar o que busco.

## SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas.....	vii
Lista de Figuras e Tabelas.....	viii
Resumo.....	ix
Abstract.....	x
<b>I.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>4</b>
II.1 <i>Geissospermum vellosii</i> .....	5
II.2 Dor e Nocicepção.....	7
II.3 Envolvimento da Serotonina na Modulação da Dor.....	12
<b>III.OBJETIVOS.....</b>	<b>15</b>
3.1 Objetivo Geral.....	16
3.2 Objetivos Específicos.....	16
<b>IV. ARTIGO.....</b>	<b>17</b>
<b>V. DISCUSSÃO.....</b>	<b>45</b>
<b>VI. CONCLUSÕES .....</b>	<b>51</b>
<b>VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>53</b>
<b>VIII. ANEXO.....</b>	<b>67</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>%</b>	<b>Por cento</b>
<b>&gt;</b>	<b>Maior que</b>
<b>°C</b>	<b>Graus Celsius</b>
<b>µg</b>	<b>Micrograma</b>
<b>5-HT</b>	<b>5-hidroxitriptamina ou Serotonina</b>
<b>5-HT<sub>1</sub></b>	<b>Receptor serotoninérgico do subtipo 1</b>
<b>5-HT<sub>2</sub></b>	<b>Receptor serotoninérgico do subtipo 2</b>
<b>5-HT<sub>3</sub></b>	<b>Receptor serotoninérgico do subtipo 3</b>
<b>CEUA</b>	<b>Comitê de Ética no Uso de Animais</b>
<b>DI<sub>50</sub></b>	<b>Dose inibitória 50%</b>
<b>E.P.M.</b>	<b>Erro padrão da média</b>
<b>g</b>	<b>Gramma</b>
<b>h</b>	<b>Hora</b>
<b>kg</b>	<b>Quilograma</b>
<b>IM</b>	<b>Inibição máxima</b>
<b>i.p.</b>	<b>Intraperitoneal</b>
<b>i.pl.</b>	<b>Intraplantar</b>
<b>s.c.</b>	<b>Subcutânea</b>
<b>v.o.</b>	<b>Via oral</b>
<b>mg</b>	<b>Miligrama</b>
<b>min</b>	<b>Minuto</b>
<b>ml</b>	<b>Mililitro</b>
<b>PCPA</b>	<b>DL-p-clorofenilalanina-metil-éster</b>
<b>SP</b>	<b>Substância P</b>
<b>IMAO</b>	<b>Inibidor da enzima MAO</b>
<b>SSRI</b>	<b>Inibidor seletivo da recaptção de serotonina</b>
<b>PAG</b>	<b>Substância cinzenta periaquedural</b>
<b>AAS</b>	<b>Ácido Acetil Salicílico</b>
<b>SNC</b>	<b>Sistema Nervoso Central</b>



## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

### INTRODUÇÃO

<b>Figura 1:</b> <i>Geissospermum vellosii</i> ou Pau-Pereira.....	6
<b>Figura 2:</b> Diferentes tipos de neurônio sensoriais primários.....	9
<b>Figura 3:</b> Vias de transmissão da dor.....	10

<b>ARTIGO</b> .....	18
---------------------	----

### RESULTS

<b>Figure 1:</b> Molecular structure of alkaloid 12-metoxy-1-methyl-aspidospermidine.....	37
<b>Figure 2:</b> Effects of crude extract (A), dichloromethane fraction (B) or alkaloid 12-metoxy-1-methyl-aspidospermidine (C) obtained from <i>G. vellosii</i> administered orally against acetic acid-induced visceral pain in mice.....	38
<b>Figure 3:</b> Effect of crude extract (1-100 mg/kg) obtained from <i>G. vellosii</i> administered orally against formalin-induced licking (neurogenic phase, panel A, and inflammatory phase, panel B) in mice.....	39
<b>Figure 4:</b> Effect of dichloromethane fraction (1-100 mg/kg) obtained from <i>G. vellosii</i> administered orally against formalin-induced licking (neurogenic phase, panel A, and inflammatory phase, panel B) in mice.....	40
<b>Figure 5:</b> Effect of pre-treatment of animals with PCPA (100 mg/kg, 4 consecutive days, panel A) or WAY100635 (3 mg/kg, panel B) on the antinociceptive profile of dichloromethane fraction (30 mg/kg, p.o.) obtained from <i>G. vellosii</i> administered orally against acetic acid-induced visceral pain in mice.....	41
<b>Table 1:</b> Antinociceptive effects of different fractions obtained from <i>G. vellosii</i> (30 mg/kg) against acetic acid-induced nociception in mice.....	42
<b>Table 2:</b> Effect of crude extract or dichloromethane fraction obtained from <i>G. vellosii</i> on number of crossings in open-field test and on the fall latency or number of falls in rota-rod test in mice.....	43

## RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO EXTRATO BRUTO, DAS FRAÇÕES E DOS COMPOSTOS OBTIDOS DE *Geissospermum vellosii***

Autora: Juliana de Abreu Werner Tavares

Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 04 de Novembro de 2008.

O presente estudo examinou o efeito antinociceptivo de *Geissospermum vellosii* em modelos comportamentais de nociceção. *Geissospermum vellosii* - extrato bruto, frações ou compostos foram administrada por via oral, 60 minutos antes dos testes. O extrato bruto produziu inibição da nociceção inflamatória (segunda fase) induzida por formalina, o que também foi percebido na no teste de contorções induzidas por ácido acético. De todas as frações testadas, a fração diclorometano foi escolhida para a realização da curva dose-resposta, sendo capaz de produzir antinociceção significativa em ambas as fases de formalina e no modelo de nociceção induzida por ácido acético. A antinociceção causada pela fração diclorometano no teste do ácido acético foi significativamente atenuada pelo pré-tratamento dos animais com p-chlorophenilalanina-metil-éster (PCPA, um inibidor da síntese da serotonina, 100 mg/kg uma vez por dia durante 4 dias consecutivos, i.p.) ou com WAY-100635 (antagonista seletivo do receptor 5-HT<sub>1A</sub>, 0,3 mg/kg, s.c.). Em contrapartida, a antinociceção produzida pela fração diclorometano não foi afetada pelo pré-tratamento dos animais com cetanserina (antagonista de receptor 5-HT<sub>2</sub>, 0,3 mg/kg, i.p.) ou ondansetrona (antagonista de receptor 5-HT<sub>3</sub>, 0,5 mg/kg). O composto isolado aspidospermina também foi capaz de reduzir a nociceção no teste de contorções induzidas por ácido acético. Em conjunto, estes resultados indicam que *G. vellosii* produz antinociceção em modelos de nociceção através de mecanismos que envolvem uma interação com receptores 5-HT<sub>1A</sub> do sistema serotoninérgico.

## **ABSTRACT**

Dissertation of Master's Degree  
Post-Graduate Course in Pharmacology  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### **EVALUATION OF ANTONOCICEPTIVE ACTION OF CRUDE EXTRACT, FRACTIONS AND COMPOUNDS OBTAINED OF *Geissospermum vellosii***

Author: Juliana de Abreu Werner Tavares

Advisor: Adair Roberto Soares dos Santos

Place and Date: Santa Maria, 04 de Novembro de 2008.

The present study examined the antinociceptive effects of *Geissospermum vellosii* in chemical behavioral models of nociception. *G. vellosii* crude extract, dichloromethane fraction (1-100 mg/kg), or aspidospermine (0.001-1 mg/kg), were administered by p.o. route, 60 min earlier tests. Crude extract produced inhibition of formalin-induced inflammatory nociception and acetic acid-induced visceral nociception. Dichloromethane fraction was able to produce significant antinociception in both phases of formalin and acetic acid-induced nociception. The antinociception caused by dichloromethane fraction in the acetic acid test was significantly attenuated by i.p. pre-treatment of mice with p-chlorophenylalanine methyl ester (PCPA, an inhibitor of serotonin synthesis, 100 mg/kg once a day for 4 consecutive days), or WAY-100635 (5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist, 0.3 mg/kg). In contrast, *G. vellosii* antinociception was not affected by i.p. pre-treatment of animals with ketanserin (5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist, 0.3 mg/kg) or ondansetron (5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist, 0.5 mg/kg). The isolated compound aspidospermine also was able to reduce the nociception in acetic acid test. Together, these results indicate that *G. vellosii* produces antinociception in models of chemical nociception through mechanisms that involve an interaction with 5-HT<sub>1A</sub> receptor of serotonergic system.

---

## **I. INTRODUÇÃO**

## **I. INTRODUÇÃO**

A fitoterapia constitui uma forma de tratamento medicinal que vem crescendo visivelmente ao longo dos anos. Talvez o principal fator que contribuiu consideravelmente para o crescimento em questão consista na evolução dos estudos científicos, em particular estudos químicos e farmacológicos que comprovam a eficácia destas plantas medicinais, principalmente aquelas já empregadas na medicina popular com finalidades terapêuticas. Estes estudos têm apresentado um papel fundamental no esclarecimento de fenômenos relacionados à biologia celular e molecular, importantes para a descoberta de novos fármacos (CALIXTO et al., 2000).

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) cerca de 65-80% da população mundial que reside em países em desenvolvimento e que vivem em pobreza absoluta, usam frequentemente extratos de plantas medicinais para o tratamento de suas patologias (AKERELE, 1993; FARNSWORTH et al., 1985; GRÜNWARD, 1995; GRÜNWARD & BÜTEL, 1996). No Brasil, 84% das drogas atualmente disponíveis no mercado são importadas e 60% de todas as drogas processadas são consumidas por apenas 23% da população, o que faz com que os remédios caseiros - a base de plantas medicinais - sejam ainda a principal fonte de medicamentos para a maioria do povo brasileiro (ELISABETSKY & WANNMACHER, 1993; ELISABETSKY, 1999). Neste contexto, as plantas medicinais, em especial o uso dos medicamentos fitoterápicos, adquirem importância como agentes terapêuticos e por isso devem ser prioritariamente analisados segundo os métodos modernos disponíveis (LAPA et al., 1999; CALIXTO, 2000).

A *Geissospermum vellosii* é uma árvore encontrada na floresta amazônica, amplamente utilizada pela população nativa de forma terapêutica. Apesar de poucos estudos comprovarem sua atividade biológica, a planta é frequentemente utilizada para o tratamento da malária, febre, distúrbios estomacais, constipação, como estimulante sexual e tratamento da dor (MUÑOZ et al., 2000; DOS SANTOS, 2007; OLIVEIRA, 1983; FERREIRA, 1949; BERTHO, 1931; HENRY, 1949).

A dor está associada a patologias crônicas, podendo levar a incapacitação funcional, perda da produtividade e comprometimento da saúde física dos indivíduos, neste sentido as plantas têm contribuído enormemente na descoberta de novos fármacos utilizados no tratamento da dor (FLECK et al., 2003). Em vista disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o possível efeito antinociceptivo da *G. vellosii* e ampliar os conhecimentos já

existentes sobre a planta, procurando validar a sua utilização na medicina popular, além de investigar o mecanismo de ação das frações obtidas de *G. vellosii*.

---

## **II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## II.1 *Geissospermum vellosii*

A *Geissospermum vellosii* ou *Geissospermum leave*, como é cientificamente conhecida (INDEX KEWENSIS, 1895), é uma árvore de tamanho mediano, amplamente encontrada na floresta tropical amazônica. Esta planta pertence à família Apocynaceae e é conhecida popularmente como “Pau-Pereira” (MANSKE & HOLMES, 1952) ou ainda “Bergibita” (TROPILAB, 2007). A casca dessa árvore é frequentemente utilizada de forma terapêutica pela população nativa, como estimulante sexual e também para o tratamento da malária, febre, distúrbios estomacais, constipação e dor (BERTHO, 1931; DOS SANTOS, 2007; FERREIRA, 1949; HENRY, 1949; MUÑOZ et al., 2000; OLIVEIRA, 1983). Segundo levantamento etnobotânico realizado por Fenner e colaboradores (2006), foi constatado que *G. vellosii* é utilizada ainda no tratamento de sinais e sintomas relacionados a infecções fúngicas e também como anti-séptico. Além disso, foi demonstrado que a planta possui atividade semelhante ao curare, causando relaxamento muscular por inibir a ação da acetilcolina nos receptores nicotínicos da placa motora (FERREIRA, 1949; TANAE et al., 1999; 2004). Estudos prévios demonstraram que o extrato etanólico obtido da *G. vellosii* apresenta propriedade antimalariana (MILLIKEN, 1997). Segundo Costa e colaboradores (2007), uma fração do extrato da planta, rica no alcalóide geissospermina, é capaz de reduzir a amnésia induzida por escopolamina em modelos animais de esQUIVA inibitória e labirinto aquático.

Como outras plantas da família Apocynaceae, a *G. vellosii* tem várias classes de compostos ou metabólicos secundários, em especial os alcalóides. Alcalóides são substâncias derivadas de plantas que contêm em sua fórmula, basicamente nitrogênio, oxigênio, hidrogênio e carbono. Eles também correspondem aos principais agentes naturais com atividade terapêutica. Foi demonstrado que a casca de *G. vellosii* apresenta os alcalóides geissospermina, geissosquizina, geissoschizolina e flavopereirina (ALMEIDA et al., 2007; DOS SANTOS, 2007; HUGHES, 1958). Recentemente, foi mostrado que os compostos flavopereirina, geissoschizolina e geissospermina reduzem a captação de serotonina em sinaptossomas de hipocampo de ratos (BARROS et al., 2006; LIMA-LANDAM et al., 2006). Ainda sobre os alcalóides, foi relatado que a geissosquizina apresenta atividade protetora contra morte neuronal induzida por glutamato, por impedir o influxo de cálcio, além de inibir convulsões induzidas por glutamato (MIMAKI et al, 1997; SHIMADA et al, 1999). Geissosquizina administrada por via oral é capaz de reduzir a atividade locomotora dos animais, aparentemente por interação com o sistema dopaminérgico (SAKAKIBARA et al,



1999). Como visto, apesar da *G. vellosii* ser popularmente utilizada como analgésica, não existem estudos farmacológicos que confirmem esta ação biológica da planta.

**Não disponível por razões de direito autoral**

**Figura 1:** *Geissospermum vellosii* ou Pau-Pereira, como é popularmente conhecido. Árvore encontrada na Floresta Amazônica, e amplamente utilizada - de forma terapêutica - por tribos nativas. Planta pertencente à família Apocynaceae, de tamanho mediano, podendo atingir a altura de até aproximadamente 18 metros de altura (TROPILAB, 2007).

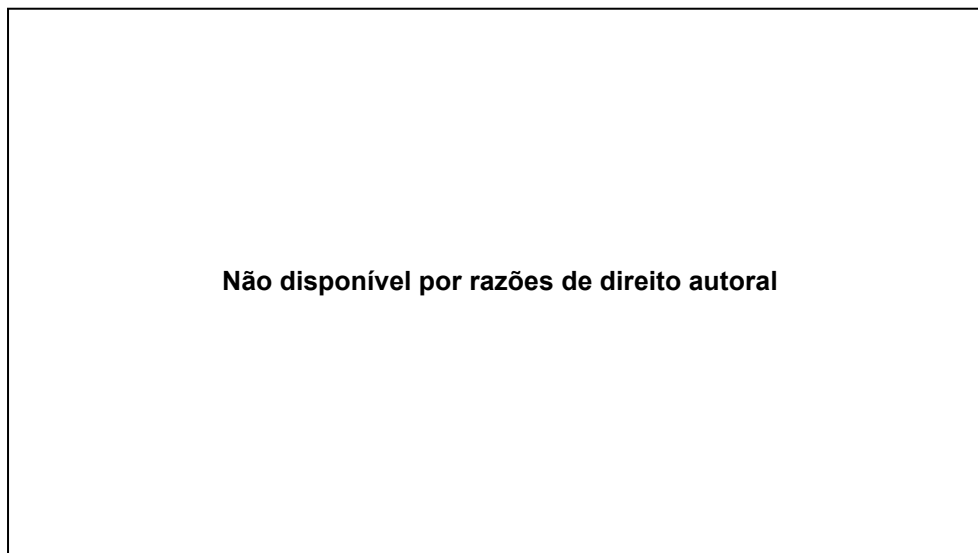
## **II.2 Dor e Nocicepção**

A dor é um sintoma clinicamente importante para a detecção de doenças, e pode ser definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a um dano tecidual potencial ou real, ou ainda descrita em termos que sugerem tal dano (MERSKEY & BOGDUK, 1994). Neste sentido, a dor faz parte de sistemas responsáveis pelo controle da homeostasia do organismo humano, se destacando por atuar como um mecanismo de alerta do corpo, informando que algo está ameaçando seu bem-estar, retendo sua atenção até que a sua

causa tenha sido identificada e afastada (WALL, 1999). A perda da capacidade de sentir dor produz efeitos calamitosos, o que pode ser observado em pacientes portadores de insensibilidade congênita a dor, uma doença hereditária rara. Estes pacientes suportam estímulos dolorosos intensos sem apresentar qualquer reação de recuo, o que pode gerar grandes e irreversíveis lesões (MOGIL et al, 2000). Do ponto de vista fisiológico, a dor aguda serve para propósitos altamente adaptativos, relacionados com a sobrevivência e manutenção da integridade do organismo. Portanto, um dos propósitos da dor aguda seria o de detectar estímulos que podem provocar lesões teciduais, tais como os provocados por objetos cortantes ou excessivamente quentes (WATKINS & MAIER, 2002). Se a dor persiste por mais que alguns dias ou semanas, então passa a ser considerada como dor crônica. Da mesma forma que a dor aguda, a dor crônica também é causada por lesão ou patologia, podendo permanecer mesmo depois da recuperação do indivíduo (LOESER & MELZACK, 1999). Ainda outro propósito da dor é desencadear comportamentos apropriados de recuperação de um membro já lesado, tais como desuso e proteção da área inflamada ou infectada, a fim de promover e facilitar a resolução da lesão tecidual (WATKINS & MAIER, 2002). A dor é uma experiência que envolve não apenas a transdução do estímulo nocivo ambiental, mas também processamento cognitivo e emocional pelo encéfalo (JULIUS & BASBAUM, 2001). Assim, pode-se dizer que a dor é influenciada por fatores tantos fisiológicos quanto psicológicos, e por isso, em animais a dor é avaliada de forma indireta. Neste sentido, o componente fisiológico da dor é denominado de nocicepção, por isso modelos animais de analgesia são de fato modelos de nocicepção, pois é difícil a medida do componente emocional da dor em animais de laboratório (TJØLSEN e HOLE, 1997).

O componente sensorial da dor, denominado nocicepção, depende da ativação de receptores específicos e de vias neuroanatômicas que fazem a comunicação entre o sistema nervoso periférico e o sistema nervoso central de maneira hierárquica (RUSSO & BROSE, 1998). A recepção do estímulo nociceptivo em nível periférico se dá por estruturas específicas situadas nas terminações nervosas de subtipos de fibras sensoriais, denominadas nociceptores. Estes se localizam na porção distal dos neurônios aferentes primários que estão amplamente distribuídos em vários órgãos. Além disso, os nociceptores podem ser ativados por diferentes estímulos, sendo estes térmicos, mecânicos ou químicos (Fig. 2). Desses, a sinalização química é provavelmente a mais comum e a que apresenta as mais diversas formas de geração de sinal nos neurônios sensitivos (BESSION e CHAOUCH, 1987; DRAY, 1997; BESSION, 1999; MILLAN, 1999). No entanto, uma pequena proporção de fibras aferentes, chamados

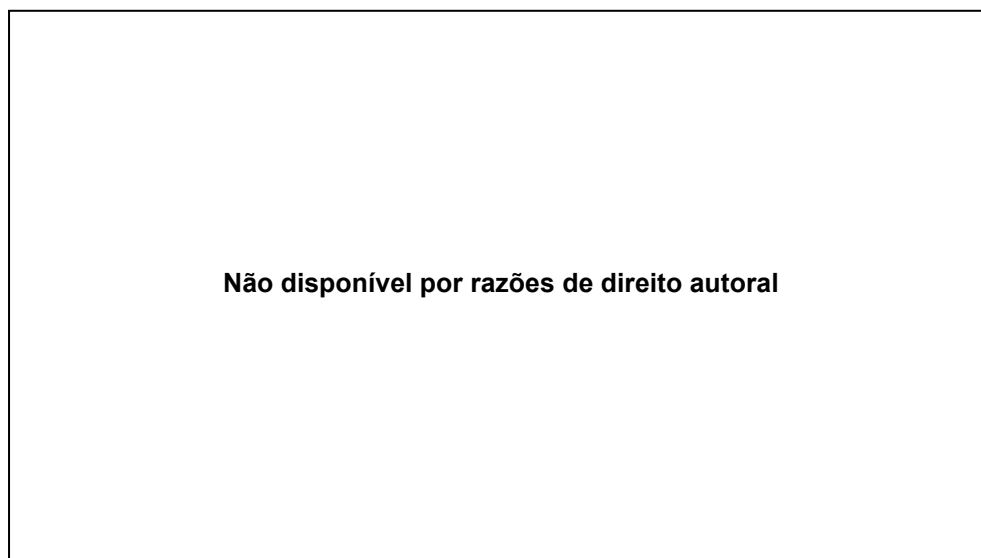
nociceptores silenciosos, podem ser influenciadas por mediadores inflamatórios apresentando atividade espontânea ou as tornando sensibilizadas e respondendo a estímulos sensoriais (JULIUS e BASBAUM, 2001). Os corpos celulares dos neurônios aferentes primários que inervam a maior parte dos tecidos (com exceção da cabeça e pescoço) estão localizados nos gânglios da raiz dorsal, e seus axônios bifurcam-se enviando prolongamentos à medula espinhal e aos tecidos corporais. Os aferentes primários são classificados de acordo com critérios funcionais e anatômicos, entre eles velocidade de condução, diâmetro e grau de mielinização (Fig. 2). Os neurônios mais mielinizados, de maior diâmetro e que apresentam a maior velocidade de condução formam as fibras A $\beta$ . Em situações normais, essas fibras não respondem a estímulos dolorosos, exceto em situação de alodínia, onde uma situação não nociva passa a ser nociva, ou dolorosa, para o indivíduo. Além disso, a estimulação dessas fibras pode aliviar a dor quando são friccionadas (na pele) após alguma lesão. Diferente desses, existem ainda dois outros tipos de aferentes primários responsáveis pela transmissão da sensação dolorosa da periferia à medula espinhal. As fibras de pequeno e médio diâmetro originam a maioria dos nociceptores e incluem as fibras C e A $\delta$ , não mielinizadas e pouco mielinizadas, respectivamente. Quanto à condução da informação, ocorre de forma mais lenta do que aquela observada nas fibras A $\beta$  (Fig. 2). As fibras A $\delta$  transmitem a sensação da periferia ao SNC em uma velocidade entre 12 a 30 m/s, enquanto as fibras C, também conhecidas como fibras polimodais C conduzem o estímulo em uma velocidade entre a 0,5 a 2 m/s. Há ainda uma diferenciação entre os tipos de fibras A $\delta$ , no que diz respeito a divergência de resposta à estimulação térmica ou por lesão tecidual. As fibras A $\delta$  do tipo I respondem a temperaturas inferiores a 53°C, enquanto as fibras A $\delta$  do tipo II respondem a temperaturas menores que 43°C (PLEUVRY, 1996; SHELLEY, 1994; MILLAN, 1999; JULIUS e BASBAUM, 2001). Diante disto, a ativação dos nociceptores pode ocorrer em decorrência de estímulos térmicos que podem ser frio ou calor, estímulos mecânicos com intensidade suficiente para ativar as fibras nociceptivas ou por uma série de irritantes químicos.



**Figura 2:** Diferentes tipos de neurônios sensoriais primários responsáveis pela condução do sinal nociceptivo da periferia ao SNC. Adaptado a partir de Julius e Basbaum, 2001.

Os mediadores químicos liberados após diferentes estímulos fazem com que a informação nociceptiva seja levada através das fibras aferentes ao SNC, para que este a processe e responda adequadamente em cada situação. Inicialmente, os impulsos nociceptivos chegam através dos aferentes primários na medula espinhal, mais precisamente no corno dorsal, área primária de recebimento da maioria das informações somatossensoriais (COGGESHALL e CARLTON, 1997). O corno dorsal da medula é uma estrutura dividida em lâminas. As fibras aferentes primárias C e A $\delta$  têm suas terminações principalmente nas lâminas mais superficiais [lâmina I (zona marginal) e lâminas II (substância gelatinosa)] (BESSON e CHAOUCH, 1987). Nas lâminas superficiais do corno dorsal da medula espinhal, as terminações dos nociceptores liberam vários neurotransmissores (como o glutamato e a SP) que por sua vez irão ativar neurônios secundários, os quais integram e distribuem a informação nociceptiva para áreas supraespinhais (como por exemplo, o tálamo), este processo excitatório também depende de canais de cálcio e sódio, sendo os canais de cálcio os principais reguladores da liberação de neurotransmissores (HILL, 2001). Dessa maneira, a informação nociceptiva alcança as áreas sensoriais do córtex cerebral, onde aspectos como qualidade, intensidade, localização e duração do estímulo nociceptivo serão integrados. Também nessa região componentes afetivos e emocionais serão interpretados e contextualizados, levando à percepção do estímulo nociceptivo e promovendo a resposta adequada que é enviada para a medula espinhal através das vias descendentes (GUYTON, 1992; BESSON, 1999; CRAIG e DOSTROVSKY, 1999; MILLAN 1999; RUSSO & BROSE,

1998; TREEDE et al., 1999). Além disso, a modulação descendente da informação nociceptiva envolve uma série de estruturas cerebrais, como mencionado anteriormente, e sistemas de neurotransmissores dentre os quais podemos mencionar os sistemas opióide, serotoninérgico, noradrenérgico, gabaérgico e canabinóide, entre outros (MILLAN, 2002).



**Figura 3:** Vias de transmissão da dor, desde seu estímulo nocivo até o processamento da informação nociceptiva.

Normalmente, a dor desaparece após a resolução do processo inflamatório ou infeccioso. No entanto, existem situações nas quais o dano tecidual, inflamação ou neuropatias, não são sanadas pelo organismo, ou ainda, mesmo que ocorra a resolução da lesão inicial, a plasticidade neuronal decorrente de doenças persistentes mantém o quadro doloroso. Nestes casos, a dor torna-se crônica e perde o caráter protetor, como mencionado anteriormente em situações agudas. É o que acontece, por exemplo, em doenças inflamatórias persistentes ou após a lesão de nervos (LEVINE & TAIWO, 1994; MILLAN, 1999; RANG et al., 2004; WOOD & DOCHERTY, 1997). Quando ocorre uma lesão tecidual, o organismo aciona mecanismos com o propósito de minimizar o dano e auxiliar a regeneração. Esses mecanismos fazem parte da resposta inflamatória, que é caracterizada por quatro sintomas principais: dor, rubor, calor e tumor, ocasionando eventualmente a perda da função do tecido lesado (GALLIN et al., 1982). Após a ocorrência de uma lesão tecidual, sucede a liberação de mediadores inflamatórios ou resposta inflamatória. Esses mediadores podem ser liberados pelos neurônios sensoriais e simpáticos e também por células não neuronais, como plaquetas,

células sanguíneas, mastócitos, células endoteliais, fibroblastos, células de Schwann e até mesmo pelas próprias células inflamatórias (BESSON, 1997). A presença destas substâncias leva a sensibilização ou ativação de receptores, estado conhecido como sensibilização periférica (STRONG et al, 2002). A sensibilização periférica caracteriza-se por uma diminuição na intensidade do estímulo requerido para atingir o limiar de excitabilidade, por um aumento na frequência das descargas elétricas, por uma diminuição no período de latência e pelo desenvolvimento de atividade espontânea (WELLS, 1989; WALSH, 1997). A existência do estado de sensibilização periférica assegura um permanente estado de alerta do organismo, enquanto se mantém o estímulo doloroso (WALSH, 1997).

### **II.3 Importância da Serotonina na Modulação da Dor**

Desde a publicação da Teoria do Portão em 1965, proposta por Ronald Melzack e Patrick D. Wall, deu-se maior importância ao envolvimento de fatores psicológicos e emocionais na percepção da dor. Segundo esta teoria, os fenômenos da dor são determinados pela interação entre sistema nervoso central (SNC) e periférico. De acordo com os autores, fatores como atenção, emoção e memória são capazes de exercer controle sobre os sinais sensoriais (MELZACK & WALL, 1965).

Basbaum & Fields (1984) realçaram a existência de dois sistemas modulatórios, projetados para a medula espinhal a partir da PAG e das regiões cerebrais adjacentes, que podem ser tanto facilitatórios como inibitórios. O sistema nervoso central tem a capacidade de modular a transmissão de estímulos nociceptivos e assim limitar a percepção de dor, e a serotonina tem uma contribuição importante neste mecanismo de controle por ser o transmissor dos neurônios inibitórios que se originam no núcleo magno da rafe e se projetam ao corno dorsal na medula espinhal (RANG et al., 2004). A transmissão de sinais nociceptivos em mamíferos é controlada por vias modulatórias presentes no corno dorsal e em estruturas mesencefálicas e prosencefálicas (BASBAUM & FIELDS, 1984; BESSON et al., 1987; GEAR et al., 1999). De uma forma geral, as vias descendentes contribuem para a inibição do estímulo nociceptivo e da sensação de dor, constituindo um dos mecanismos de portão que controlam a transmissão do impulso no corno dorsal (BASBAUM & FIELDS, 1994; STRONG et al., 2002). A atividade descendente das vias serotoninérgicas no corno dorsal pode ser modificada sob condições de nocicepção aguda ou prolongada e dor neuropática, e o nível de serotonina (5-HT) espinhal é modificado em pacientes com dor crônica (MILLAN, 1995; VON KNORRING, 1989; WEIL-FUGAZZA, 1989; WOLFE et al., 1997).

A serotonina é quimicamente representada pela 5-hidroxitriptamina (5-HT), sendo também frequentemente designada por este nome. Ela é o transmissor dos neurônios inibitórios que se originam no Núcleo da Rafe e se projetam ao corno dorsal, e também um dos muitos mediadores liberados de plaquetas (humanos e ratos) e mastócitos (ratos) em tecidos lesionados ou inflamados (MCMAHON et al., 1999; RANG et al., 2004). Esse neurotransmissor monoaminérgico é bem conhecido por modular o comportamento, funções cognitivas e autônomas, como a aprendizagem, memória, sono, regulação da temperatura, apetite e humor, e ainda desempenha um importante papel em distúrbios como ansiedade, medo, depressão, agressão, bem como na modulação da dor (GINGRICH et al., 2001;

VERGE et al., 2000). A concentração de serotonina sináptica é controlada diretamente pela recaptação nos terminais pré-sinápticos e assim, bloqueadores do transporte de 5-HT têm sido utilizado com sucesso no tratamento da depressão e da dor crônica (MICO et al., 2006; SATURNINO et al., 2007).

Técnicas de clonagem molecular apresentaram pelo menos quatorze subtipos de receptores para serotonina, que foram agrupados em sete famílias distintas baseada na estrutura molecular, propriedades farmacológicas, ligação à proteína-G e ativação de segundos mensageiros: 5-HT<sub>1</sub> (1A, 1B, 1D, 1E e 1F), 5-HT<sub>2</sub> (2A, 2B e 2C), 5-HT<sub>4</sub> (4a, 4b), 5-HT<sub>5</sub> (5A, 5B), 5-HT<sub>6</sub> e 5-HT<sub>7</sub> receptores acoplados à proteína-G, enquanto que os receptores 5-HT<sub>3</sub> (3A, 3B) estão acoplados à canais iônicos (BARNES et al.; 1999, HOYER et al., 2002; RAYMOND et al., 2001). No cérebro de ratos pré-natais, os receptores de 5-HT são expressos por neurônios e neuroglia ao longo das vias serotoninérgicas, cada um com um subtipo de receptor 5-HT exibindo padrões específicos de desenvolvimento de expressão, dependendo do estágio de desenvolvimento e região de distribuição do receptor (BORELLA et al., 1997; HELLENDALL et al., 1992; LAUDER et al., 1993, 1996; MORILAK et al., 1993; RHO et al., 2001; ROTH et al., 1991; RUIZ et al., 1999; TALLEY et al., 1997; TALLEY et al., 2000; VERGE et al, 2000; ZEC et al, 1996).

Na medida em que os mecanismos serotoninérgicos no corno dorsal exercem simultaneamente ações antinociceptivas e pronociceptivas via diferentes subtipos de receptores de 5-HT, é concebível que um aumento da atividade desta última contribui para a sensibilização a dor (MILLAN, 1995, 1997). Além disso, a estimulação de neurônios serotoninérgicos projetados para o corno dorsal a partir dos núcleos da rafe no tronco cerebral resulta em uma excitação bifásica e influência inibitória sobre neurônios do corno dorsal (ZHUO E GEBHART, 1997). A serotonina desempenha um papel variado na regulação da nocicepção devido a suas múltiplas ações em diferentes níveis, resultado da sua interação com os vários subtipos de receptores, que algumas vezes mediam ações opostas, bem como pela interação com outros mediadores endógenos (SAWYNOK, 1997). A presença generalizada de receptores 5-HT<sub>1A</sub> no corno dorsal e núcleo da rafe, bem como em áreas corticais e límbicas sugere um possível envolvimento destes receptores na modulação da dor, nos estados emocionais e cognição (HENSLER et al., 1991; MILLAN, 2002; SCHREIBER, 1993). Em particular, o núcleo da rafe pode desempenhar um papel crucial na integração da nocicepção e dos processos afetivos (WANG et al., 1994). No núcleo da rafe, receptores 5-HT<sub>1A</sub> estão localizados nos corpos celulares e dendritos de fibras serotoninérgicas e funcionam como



auto-receptores (DE MONTIGNY et al., 1984). Nas áreas terminais da inervação serotoninérgica, os receptores 5-HT<sub>1A</sub> estão localizados pós-sinápticamente, portanto diferentes ações podem ser derivadas da ativação ou bloqueio destes receptores em diferentes níveis, produzindo uma melhora da eficácia de vários fármacos como analgésicos, tais como o paracetamol, antidepressivos e opiáceos (HENSLER et al., 1991; RIAD et al., 2000). A facilitação ou inibição descendente pode ocorrer através de diferentes ações e subtipos de receptores de serotonina. Normalmente drogas bloqueadoras dos receptores de 5-HT mediam a facilitação descendente, contrariamente aquelas que ativam os subtipos receptores de 5-HT, geralmente mediam a inibição descendente (ZHUO, 2005).

Vários autores têm sugerido que a síndrome da dor crônica resulta da depleção de serotonina no cérebro, particularmente no núcleo da rafe, o que resulta em diminuição da atividade dos sistemas serotoninérgicos descendentes que inibem a dor. É possível que este tipo de dor e a depressão compartilhem os mesmos substratos fisiológicos e anatômicos, representados pelo sistema de punição do cérebro onde a 5-HT interage com outros sistemas de neurotransmissores. Entre eles destacam-se o sistema opióide. É bem conhecido que as vias serotoninérgicas descendentes são ativadas por opióides endógenos (para revisão ver BRANDÃO, 1999). É importante mencionar que alguns tipos de dores, principalmente as dores crônicas, também podem ser controladas com fármacos antidepressivos (MILLAN, 1999; KORZENIEWSKA-RYBICKA & PLAZNIK, 1998). Apesar dos mecanismos de ação analgésica dos antidepressivos permanecerem pouco esclarecidos, os mesmos apresentam importante ação antinociceptiva (analgésica) quando testados em diferentes modelos experimentais de nocicepção. Além disso, recentemente foi demonstrado que o antidepressivo Venlafaxina apresenta importante efeito analgésico em pacientes diabéticos com dor neuropática (ROWBOTHAM et al., 2004).

Tendo em vista a participação das vias serotoninérgicas na modulação da dor, foi um dos objetivos deste trabalho avaliar se a atividade antinociceptiva de *G. vellosii* poderia ocorrer por esta via modulatória.

---

### **III. OBJETIVOS**

### **III.1. Objetivo Geral**

Verificar a ação antinociceptiva do extrato bruto, frações e compostos obtidos de *G. vellosii* através de modelos de nocicepção em camundongos, bem como avaliar o possível mecanismo de ação.

### **III.2. Objetivos Específicos**

1. Avaliar a ação antinociceptiva do extrato bruto, das frações e de compostos de *G. vellosii* nos modelos de nocicepção de contorções induzidas por ácido acético, bem como o modelo da formalina, em camundongos.
2. Verificar o efeito de *G. vellosii* sobre a atividade motora e exploratória em camundongos nos testes do campo aberto e cilindro giratório.
3. Investigar se a ação antinociceptiva da fração diclorometano de *G. vellosii* pode estar relacionada ao envolvimento do sistema serotoninérgico, utilizando um pré-tratamento dos animais com antagonistas de receptores serotoninérgico.



Artigo submetido à Journal of Ethnopharmacology

**Evidence for a Role of 5-HT<sub>1A</sub> receptor on antinociceptive action from *Geissospermum vellosii***

Juliana A.T. Werner<sup>a</sup>, Sara M. Oliveira<sup>b</sup>, Daniel F. Martins<sup>c</sup>, Leidiane Mazzardo<sup>c</sup>, Josiane de F.G. Dias<sup>d</sup>, Ana L. L. Lordello<sup>d</sup>, Miguel G. Obdúlio<sup>d</sup>, Luiz Fernando Royes<sup>e</sup>, Juliano Ferreira<sup>b</sup>, Adair R.S. Santos<sup>c\*</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

<sup>b</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil

<sup>c</sup>Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

<sup>d</sup>Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil

<sup>e</sup>Departamento de Métodos e Técnicas Desportivas, Centro de Educação Física e Desportos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

\*Corresponding author

Adair Roberto Soares dos Santos

Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade, Florianópolis, Santa Catarina CEP: 88040-900, Brazil

Fone: +55 48 3721 9352/206; Fax: +55 48 3721 9672

E-mail addresses: [arssantos@ccb.ufsc.br](mailto:arssantos@ccb.ufsc.br)

**Abstract**

Ethnopharmacological relevance: *Geissospermum vellosii* is a tree widely found throughout the Amazonic forest and frequently used by the native population for painful disorders. Aim of the study: The present study examined the antinociceptive effects of *G. vellosii* in behavioral models of nociception. Materials, Methods and Results: Oral administration of crude extract of *G. vellosii* or its dichloromethane fraction (1-100 mg/kg) inhibited formalin-induced inflammatory nociception and acetic acid-induced visceral nociception. The antinociceptive effect of *G. vellosii* was unrelated with motor dysfunctions. Furthermore, the alkaloid 12-metoxy-1-methyl-aspidospermidine (0.001-1 mg/kg), isolated from dichloromethane fraction, also produced antinociception. The antinociception caused by dichloromethane fraction was significantly attenuated by pre-treatment of mice with p-chlorophenylalanine methyl ester (PCPA, an inhibitor of serotonin synthesis, 100 mg/kg once a day for 4 consecutive days) and WAY-100635 (a 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist, 0.3 mg/kg). In contrast, dichloromethane fraction antinociception was not affected by pre-treatment of animals with ketanserin (a 5-HT<sub>2</sub> receptor antagonist, 0.3 mg/kg) or ondansetron (a 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist, 0.5 mg/kg). Conclusions: Together, these results indicate that *G. vellosii* produces antinociception through an interaction with 5-HT<sub>1A</sub> receptors. Furthermore, the alkaloid 12-metoxy-1-methyl-aspidospermidine contributes to the antinociceptive properties reported for *G. vellosii*. The antinociceptive action demonstrated in the present study supports the ethnomedical uses of this plant.

**Keywords:** alkaloids; formalin; acetic acid; mice; serotonergic system

## 1. Introduction

The *Geissospermum vellosii* or *Geissospermum leave*, as it is scientifically known, is a medium-sized tree, widely found throughout the Amazonic forest. This plant belongs to the family Apocynaceae and is popularly known as “Pau-Pereira” (Manske and Holmes, 1952). The bark of this tree is frequently used by the native population therapeutically for malaria, liver pain, fever, stomach disorders, constipation and as sexual stimulant (Muñoz et al., 2000; Dos Santos, 2007). Like other plants of the family Apocynaceae, *G. vellosii* has several classes of compounds, particularly alkaloids. Indeed, it was shown that the bark of *G. vellosii* presents the alkaloids geissospermine, geissosquizine geissoschizoline and flavopereirine (Hughes and Rapoport, 1958; Dos Santos, 2007; Almeida et al., 2007). According to Costa et al. (2006), a geissospermine-rich fraction originated from bark’s stem extract of the plant is able to reduce amnesia induced by scopolamine in animal models of inhibitory avoidance and in the water maze. Recently, it was showed that the compounds flavopereirine, geissoschizoline and geissospermine reduce the uptake of serotonin by synaptosomes from rat hippocampus (Lima-Landmam et al., 2006).

It is well known that serotonin (5-HT) pathways within the CNS arise from a series of nuclei situated in the midline of the brain stem, the raphe nuclei, which represent the richest source of neuronal 5-HT synthesized in the mammalian brain (Fields et al., 1991; Millan, 2002). In addition, several studies have shown that the bulb spinal serotonin system may suppress incoming noxious input to the spinal cord and inhibit pain transmission (Basbaum and Fields, 1984; Alhaider et al., 1991; Millan, 1995). Moreover, the multiple 5-HT receptor types within the spinal cord appear to fulfill different roles in the control of nociception, reflecting their contrasting patterns of coupling to intracellular transduction mechanisms (Millan, 1995; Bardin et al., 2000). The

activities of 5-HT receptors are complex and sometimes even contrasting, and can depend on: (1) the receptor subtype being activated, (2) the relative contributions of pre-versus postsynaptic actions of receptors, (3) the nociceptive paradigm in terms of quality and intensity of stimulus (Sawynok and Reid, 1996; Millan, 2002), and (4) the dose-related effect, which can be pro- or antinociceptive, of agonists and antagonists of serotonergic receptor subtypes (Hylden and Wilcox, 1983). Several pieces of evidence point to 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>3</sub> receptors modulating nociceptive transmission, as activation of these receptors in the spinal cord produces antinociception in the formalin test and other models of pain (Bardin et al., 2000; Sasaki et al., 2001; Millan, 2002). Taking into account the biological activities of *G. vellosii* and its possible involvement with the serotonergic systems, it is surprising that no pharmacological study has been carried out on the possible antinociceptive effects of the *G. vellosii* up to now. Here, we have therefore examined the possible antinociceptive action of the crude extract and fractions obtained from *G. vellosii* in chemical models of nociception in mice. Attempts have been made to further investigate the possible involvement of the serotonergic systems in the antinociceptive action of *G. vellosii* extract. In addition, we also analysed the possible antinociceptive effect of the alkaloid 12-metoxo-1-methyl-aspidospermidine isolated from this plant.

## **2. Material and methods**

### **2.1. Animals**

Experiments were conducted using male Swiss mice (20-30 g), housed at 22±2°C under a 12-h light/12-h dark cycle (lights on at 06:00) and with access to food and water *ad libitum*. Animals were acclimatized to the laboratory for at least 1 h before testing and were used only once throughout the experiments. The experiments were performed after approval



of the protocol by the Institutional Ethics Committee and were carried out in accordance with the current guidelines for the care of laboratory animals and the ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals (Zimmermann, 1983). The numbers of animals and intensities of noxious stimuli used were the minimum necessary to demonstrate the consistent effects of the drug treatments.

## **2.2. Preparation of the crude extract, fraction and isolated compound from *G. vellosii***

The *G. vellosii* (Apocynaceae) was collected in the northeast of Brazil in November 2007. It was identified by comparison with exsiccate (number 36060) from *G. vellosii* deposited at the Botanical Garden from Curitiba, PR, Brazil. Ground bark of *G. vellosii* (3.8 kg) was air-dried, powdered and submitted to Soxhlet extraction in absolute ethanol until exhaustion. The crude extract was filtered and submitted to evaporation under reduced pressure until reduction to 1/5 of its initial volume. The crude extract (62.10 g% of solids) was submitted to partition liquid-liquid in Soxhlet with dichloromethane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), ethyl acetate (EtOAc) and butanol (n-BuOH) resulting in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (40.77 g% of solids), EtOAc (16.34 g% of solids), n-BuOH (5.75 g% of solids) fractions, and remaining aqueous fraction (27.56 g% of solids). The CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction (66.75 g) was submitted to chromatography through an appropriate column using changeable phases (hexane, dichloromethane and methanol) with a rate flow of 1 mL/minute. This column isolated the alkaloid identified through RMN 13C and 1H as 12-methoxy-1-methyl-aspidospermidine (0.48 %, Figure 1).

## **2.3. Abdominal constriction response caused by intraperitoneal injection of acetic acid**

The abdominal constrictions were induced according to procedures previously described and resulted in contraction of the abdomen together with a stretching of the hind

limbs in response to an intraperitoneal injection of acetic acid (0.6%) at the time of the test (Santos et al., 1999). First, the mice were pre-treated by oral route with the crude extract, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt, n-BuOH or aqueous fractions (30 mg/kg) 60 min before testing. Control animals received the same volume of vehicle (10 ml/kg, p.o.). In another set of experiments, mice were pre-treated with *G. vellosii* crude extract, dichloromethane fraction (1-100 mg/kg) or alkaloid (0.001-1 mg/kg) by p.o. routes, 60 min before the irritant injection. Control animals received a similar volume of vehicle (10 ml/kg). After the challenge, the mice were individually placed into glass cylinders of 20 cm diameter, and the abdominal constrictions were counted cumulatively over a period of 30 min. Antinociceptive activity was expressed as the reduction in the number of abdominal constrictions, i.e. the difference between control animals (mice pre-treated with vehicle) and animals pre-treated with drugs.

#### **2.4. Formalin-induced nociception**

The procedure used was essentially the same as that previously described (Santos and Calixto, 1997; Santos et al., 1999). Animals received 20 µl of a 2.5% formalin solution (0.92% formaldehyde) made up in saline, injected i.pl. into the ventral surface of the right hindpaw. Animals were observed from 0 to 5 min (neurogenic phase) and from 15 to 30 min (inflammatory phase) and the time spent licking the injected paw was recorded with a chronometer and considered as indicative of nociception. Animals received *G. vellosii* crude extract (1-100 mg/kg, p.o.) or dichloromethane fraction (1-100 mg/kg, p.o.) 60 min beforehand. Control animals received vehicle (10 ml/kg, p.o.). After i.pl. injection of formalin, the animals were immediately placed in a glass cylinder 20 cm in diameter, and the time spent licking the injected paw was recorded.

## **2.5. Measurement of motor performance and locomotor activity**

In order to evaluate the possible non-specific muscle relaxant or sedative effects of *G. vellosii* crude extract or dichloromethane fraction, mice were submitted to the rota-rod task (Godoy et al., 2004) and open field test (Rodrigues et al., 2002). The rota-rod apparatus consists of a bar with a diameter of 3.7 cm, subdivided into four compartments by 25 cm-diameter disks. Twenty-four hours before the experiments, all animals were trained on the rota-rod until they could remain in the apparatus for 60 seconds without falling. On the day of experiment, the animals were treated with *G. vellosii* crude extract or dichloromethane fraction (10-100 mg/kg, p.o.) and 60 minutes after were tested in the rota-rod test. The latency to fall and number of falls were recorded during a 240 second interval.

## **2.6. Analysis of possible involvement of the serotonergic systems in the antinociceptive action of *G. vellosii***

In order to investigate the participation of the serotonergic system in the antinociceptive action of *G. vellosii* in the acetic acid test, mice were pre-treated with WAY-100635 (0.3 mg/kg, s.c., a selective 5-HT<sub>1</sub> receptor antagonist), ketanserin (0.3 mg/kg, i.p., a selective 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist), ondansetron (0.5 mg/kg, i.p., a 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist) or vehicle (10 ml/kg, i.p.). After 20 min, they received dichloromethane fraction (30 mg/kg, p.o.) or vehicle injection and 60 min later, the acetic acid (Takeshita and Yamagushi, 1995; Bhargava and Saha, 2001; Duman et al., 2004). Another group of animals was pre-treated with vehicle and after 20 min they received dichloromethane or vehicle, 60 min before acetic acid injection. In a separate series of experiments, in order to investigate the possible contribution of the endogenous serotonin in the antinociceptive action of *G. vellosii* in the acetic acid test, animals were

pre-treated with p-chlorophenylalanine methyl ester (PCPA, 100 mg/kg, i.p., an inhibitor of serotonin synthesis) or with vehicle, once a day, for 4 consecutive days. Then, animals received an injection of dichloromethane fraction (30 mg/kg, p.o.) or vehicle 20 min after the last PCPA or vehicle injection and were tested in the acetic acid test 60 min later (Santos et al., 1999).

## **2.7. Drugs**

The following substances were used: acetic acid and formaldehyde (Merck, Darmstadt, Germany); p-chlorophenylalanine methyl ester hydrochloride (PCPA), N-{2-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl}-N-(2-pyridinyl)cyclohexanecarboxamide (WAY-100635 / Sigma Chemical Co., St. Louis, USA); ketanserin tartarate (Tocris Cookson Inc., Ellisville, USA); ondansetron hydrochloride (Cristália, São Paulo, Brazil). Drugs were dissolved only in saline, with the exception of *G. vellosii* that was dissolved in saline and tween (80%). The final concentration of tween did not exceed 10% and did not cause any “per se” effect.

## **2.8. Statistical analysis**

The results are presented as mean  $\pm$ S.E.M., except the ID<sub>50</sub> values (i.e., the dose of *G. vellosii* crude extract, fraction or alkaloid reducing the nociceptive response by 50% relative to the control value), which are reported as geometric means accompanied by their respective 95% confidence limits. The ID<sub>50</sub> value was determined by nonlinear regression from individual experiments using Graph-Pad software (GraphPad software, San Diego, CA, USA). The statistical significance of differences between groups was detected by ANOVA followed by Student Newman-Keuls’ test. P-values less than 0.05 (P<0.05) were considered as indicative of significance.

### 3. Results

#### 3.1. Abdominal constriction response caused by intraperitoneal injection of acetic acid

Oral administration of animals with crude extract and fractions (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc, n-BuOH and aqueous fractions), in the dose of 30 mg/kg, given 60 min beforehand, did not produce any irritation by itself (result not shown), but caused a significant reduction of the number of abdominal constrictions induced by acetic acid in mice in relation to control group (Table 1). As can be observed, except for the aqueous fraction, the crude extract and the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc and n-BuOH fractions presented similar effectiveness; however, the phytochemical study demonstrated that the crude extract and the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction presented the largest results if compared to the other fractions. In addition, the antinociceptive action was more pronounced in the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction. For this reason, we decided to further investigate this fraction's antinociceptive action and perform a phytochemical analysis to determine its active components. In addition, the results depicted in Fig. 2A show that the crude extract of *G. vellosii* (1-100 mg/kg, p.o.) produced dose-related inhibition of acetic acid-induced abdominal constrictions in mice, with ID<sub>50</sub> value (and their respective 95% confidence limits) of 26.3 (6.8-101.4) mg/kg and inhibition of 62 ± 11% at the dose of 30 mg/kg. Moreover, the oral treatment with the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction (1-100 mg/kg) also produced dose-related inhibition of the acetic acid-induced abdominal constrictions in mice, with ID<sub>50</sub> value of 9.8 (2.9-32.8) mg/kg and inhibition of 73 ± 5% with the dose of 30 mg/kg (Fig. 2B). Interestingly, when the alkaloid isolated from *G. vellosii* was administered p.o. to mice, it produced dose-related inhibition of acetic acid-induced abdominal constrictions with ID<sub>50</sub> value of 27.4 (4.8-155.3) µg/kg and the peak of inhibition observed was 77 ± 8% (Fig. 2C). In addition, the alkaloid had a 358-fold greater potency than the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction when analysed in the acetic acid test.

### 3.2. Formalin-induced nociception

The results presented in Fig. 3 (A and B) show that crude extract of *G. vellosii* (1-100 mg/kg, p.o.) also produced dose-related inhibition only in the inflammatory phase of formalin-induced nociception, with ID<sub>50</sub> value of 2.1 (0.6-7.0) mg/kg and the inhibition of 79 ± 5% at the dose of 100 mg/kg. Moreover, the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction in the same doses resulted in a graded and significant inhibition of both neurogenic and inflammatory phases of formalin-induced nociception. The ID<sub>50</sub> values and the inhibition for the neurogenic and inflammatory phases were: 22.6 (7.1-71.4) and 4.4 (1.9-9.9) mg/kg and 63 ± 5 and 84 ± 9%, respectively (Fig. 4 A and B).

### 3.3. Analysis of serotonergic system on action of *G. vellosii*

The results depicted in Fig. 5A show that the previous treatment of mice with PCPA (100 mg/kg, i.p., for 4 consecutive days) also produced significant inhibition of the antinociception caused by the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction (30 mg/kg, p.o.) against acetic acid-induced pain. In addition, treatment of mice with WAY-100635 (0.3 mg/kg, s.c.), but not with ketanserine (0.3 mg/kg, i.p.) or ondansetron (0.5 mg/kg, i.p.), significantly reversed the antinociception caused by CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction (30 mg/kg, p.o.) against acetic acid-induced nociception (Fig. 5B and results not shown).

### 3.4. Analysis of possible interaction of *G. vellosii* with locomotor activity

The treatment of animals with crude extract or the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction of *G. vellosii* in high dose (100 mg/kg, p.o.), but not in low doses (10 or 30 mg/kg, p.o.), caused significant reduction of the locomotor activity in the open-field test when compared with animals that received vehicle (control group) (Table 2). However, the same treatment of animals with

crude extract or the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction of *G. vellosii* (10 to 100 mg/kg, p.o.) did not affect the motor performance in the rota-rod task (Table 2).

#### 4. Discussion

Pain is one of the most prevalent conditions that limits productivity and diminishes quality of life. Although there is an arsenal of effective and widely used analgesics, there is some concern regarding their safety and side-effects, which make their clinical use problematic (Jage, 2005; Whittle, 2003). Herbal drugs have been used since ancient times as medicines for the treatment of a range of diseases. Medicinal plants have played a key role in world health. In spite of the great advances observed in modern medicine in recent decades, plants still make an important contribution to health care. Medicinal plants are distributed worldwide, but they are most abundant in tropical countries. Over the past decade, interest in drugs derived from higher plants, specially the phytotherapeutic ones, has increased expressively.

A considerable number of studies have suggested that extracts or active principles obtained from *Geissospermum vellosii* have been used in various countries as popular medicine for the treatment of a variety of illnesses, such as malaria, liver pain, fever, stomach disorders, constipation and as sexual stimulant (Muñoz et al., 2000; Dos Santos, 2007). However, in spite of the fact that the extract from *G. vellosii* has been suggested to produce analgesic effect, the putative antinociceptive activities of the extract or active principles obtained from the *G. vellosii* as well as its mechanisms of action have not yet been demonstrated.

In the present study, we aimed to evaluate the antinociceptive effects of *Geissospermum vellosii* crude extract, fractions and compound against chemical models of nociception in mice. Moreover, we investigated some mechanisms related to its

antinociceptive action and some possible side-effects induced by crude extract or the dichloromethane fraction.

The results reported here indicate that oral administration of crude extract or the dichloromethane fraction produced marked and dose-related antinociception when assessed in acetic acid-induced visceral pain. To our knowledge this is the first report of this kind in the literature. Furthermore, the chemical studies carried out on this dichloromethane fraction allowed us to isolate the alkaloid 12-methoxy-1-methyl-aspidospermidine in *G. vellosii*, which seems to be responsible, for the antinociceptive properties reported for the dichloromethane fraction of *G. vellosii*. Moreover, at the ID<sub>50</sub> level, this alkaloid had a 358-fold greater potency than the dichloromethane fraction when analysed in the acetic acid test. In addition, the acetic acid-induced writhing reaction in mice, described as a typical model of inflammatory pain, has long been used as a screening tool for the assessment of analgesic or anti-inflammatory properties of new agents (Vinegar et al., 1979; Tjølsen and Hole, 1997). At the cellular level, protons depolarize sensory neurons by directly activating a non-selective cationic channel localized on cutaneous, visceral and other types of nocisponsive peripheral afferent C fibres (Reeh and Kress, 2001; Julius and Basbaum, 2001).

Also of interest are the results showing that the dichloromethane fraction, but not the crude extract, obtained of *G. vellosii* is largely effective in preventing both the neurogenic (early phase) and inflammatory (late phase) pain responses caused by formalin injection in mice. The neurogenic pain is caused by direct activation of nociceptive nerve terminals, while the inflammatory pain is mediated by a combination of peripheral input and spinal cord sensitization (Tjølsen et al., 1992). Furthermore, it has been shown that injection of formalin in rodents produces a significant increase in spinal levels of different mediators, such as excitatory amino acids, PGE<sub>2</sub>, nitric oxide,



tachykinin, kinins, among other peptides (Tjølsen et al., 1992; Malmberg and Yaksh, 1995, Santos and Calixto, 1997; Santos et al., 1998). Likewise, these data suggest that the dichloromethane fraction, differently from the crude extract, contains active principles that are effective in reducing both the neurogenic and inflammatory pain induced by formalin.

As mentioned in the introduction, the serotonergic system plays a very important role in the control of pain. In addition, several clinical and preclinical studies have found that antidepressant drugs are able to produce marked analgesia in humans and animals (Millan, 2002; Rojas-Corrales et al., 2003). Furthermore, it has been reported that antidepressant drugs, like imipramine and amitriptyline, revealed analgesic activity in acetic acid-induced pain at doses that did not induce any detectable motor impairment, and when given by oral route produced potent analgesic effect of similar magnitude to that after intraperitoneal administration (Korzeniewska-Rybicka and Plaznik, 1998). Recently, it has been shown that some alkaloids isolated from *G. vellosii* reduced the serotonin uptake by rat synaptosomes in vitro (Lima-Landman et al., 2006). Together, these findings strongly suggest that the serotonergic system could indeed be involved in the antinociceptive effects of the dichloromethane fraction from *G. vellosii* in mice. In fact, the results of the present study show that dichloromethane fraction produces antinociception that appears to be mediated by the serotonergic system, especially through the stimulation of 5-HT<sub>1</sub> receptors. This assertion is supported by the demonstration that 1) depletion of endogenous serotonin with the tryptophan hydroxylase inhibitor PCPA, at a dose known to decrease the cortical content of serotonin and to significantly reverse the morphine antinociception, largely antagonized the antinociceptive action of the dichloromethane fraction (Santos et al., 1999; Mendes et al., 2000; Dailly et al., 2006); 2) selective antagonists of 5-HT<sub>1A</sub> receptors, namely WAY100635, consistently reversed the antinociception caused by systemic administration of the dichloromethane fraction

when analysed against the acetic acid-induced pain; in marked contrast, selective antagonists of 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>3</sub> receptors, namely ketanserin and ondansetron, respectively, appear not to account to any large extent for the antinociceptive action of the dichloromethane fraction when analyzed in the visceral model of nociception induced by acetic acid. Furthermore, several studies have demonstrated the involvement of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the mechanism of action of many classes of antidepressant drugs, including tricyclics, SSRIs (selective serotonin reuptake inhibitors) and MAOi (monoamine oxidase inhibitors) (Hensler, 2002). Thus, our data clearly indicate that in the model of visceral pain, the antinociceptive action of *G. vellosii* dichloromethane fraction was reduced by a selective 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist, which suggests that 5-HT<sub>1A</sub> receptor stimulation by *G. vellosii* dichloromethane fraction produces analgesic-like effect. The stimulation of 5-HT<sub>1</sub> receptor responsible for the antinociception induced by *G. vellosii* dichloromethane fraction could occur in somatic, post-synaptic or pre-synaptic receptors. Although in our study we did not measure the concentration of 5-HT to verify its successful depletion, PCPA (an inhibitor of tryptophan hydroxylase) treatment used in the present study produces partial but highly significant reductions on brain 5-HT levels, while noradrenaline and dopamine levels are not affected (Redrobe et al., 1998a, 1998b). Considering that PCPA, which acts pre-synaptically (Luscombe et al., 1993), prevented the antinociceptive-like effect of *G. vellosii* dichloromethane fraction in animal models of nociception, it is concluded that the antinociceptive effect of *G. vellosii* dichloromethane fraction requires an intact pre-synaptic 5-HT system. However, we cannot rule out the involvement of post-synaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptors in its analgesic-like effect.

Recently, it was reported that the alkaloid geissospermine isolated from *G. vellosii* acts as relaxing skeletal muscle drug by acting in nicotinic receptors (Tanae et al., 2006). Moreover, geissosquizine isolated from *G. vellosii* significantly reduces the locomotor

---

activity in the open-field test, apparently mediated by central dopaminergic system (Shimada et al., 1999). To determine whether the decrease of nociceptive behaviors could be due to a neuromuscular blockade caused by treatment with *G. vellosii* and to avoid misinterpretation of our antinociceptive results, the open-field and rota-rod tests were carried out. As indicated, animals showed changes in the open field test only with higher tested dose of *G. vellosii* crude extract and dichloromethane fraction, and the same was not observed in the rota-rod test. These results suggest that the decrease on number of crossings may be occurring for some other reason rather than the neuromuscular blockade, since neuromuscular blocker reduces motor performance not only in the open-field test, but also in the rota-rod test (Moreira et al., 2000; de Souza et al., 2001). Moreover, since the maximal antinociceptive effect of *G. vellosii* crude extract and dichloromethane fraction was obtained in the dose of 30 mg/kg, it may be suggested that the antinociceptive action of *G. vellosii* is unrelated to motor dysfunctions.

In summary, the results of the present study demonstrate for the first time that the extract and fractions obtained from *G. vellosii*, especially the crude extract and the dichloromethane fraction, exerts a pronounced antinociception against chemical models (acetic acid and formalin) of nociception in mice at a dose that does not interfere with motor performance. In addition, the antinociceptive effect of the dichloromethane fraction involves an interaction with the serotonergic (through 5-HT<sub>1A</sub>, but not 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>3</sub>, receptors) system. Furthermore, the alkaloid isolated and identified as 12-methoxy-1-methyl-aspidospermidine contributes to the explanation of the antinociceptive properties reported for the *G. vellosii*. Finally, the antinociceptive action demonstrated in the present study supports, at least in part, the ethnomedical uses of this plant.

**Acknowledgements**

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência (PRONEX), Fundação de Apoio à Pesquisa Científica Tecnológica do Estado de Santa Catarina (FAPESC) and Financiadora de Estudos e Projetos [FINEP, Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net)], Brazil

**References**

- Alhaider, A.A., Lei, S.Z., Wilcox, G.L., 1991. Spinal 5-HT<sub>3</sub> receptor-mediated antinociception: possible release of GABA. *Journal of Neuroscience* 11, 1881-8.
- Almeida, M.R., Lima, J.A., Dos Santos, N.P., Pinto, A.C., 2007. Pereirina: O primeiro Alclóide isolado no Brasil. *Ciência Hoje* 240, 26-31.
- Basbaum, A.I., Fields, H.L., 1984. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annual Review of Neuroscience* 7, 309–338.
- Bardin, L., Schmidt, J., Alloui, A., Eschalier, A., 2000. Effect of intrathecal administration of serotonin in chronic pain models in rats. *European Journal of Pharmacology* 409, 37-43.
- Bhargava, V.K., Saha, L., 2001. Serotonergic mechanism in imipramine induced antinociception in rat tail flick test. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology* 45, 107-110.
- Costa, R.S., Lima, J.A., Pinto, A.C., Rocha, M.S., 2006. Fração de extrato de *geissospermum vellosii* reverte a amnésia induzida por escopolamina em camundongos. In: *Federação de Sociedades de Biologia Experimental Abstracts*, p. 13.075.
- Dailly E, Chenu F, Petit-Demoulière B, Bourin M., 2006. Specificity and efficacy of noradrenaline, serotonin depletion in discrete brain areas of Swiss mice by neurotoxins. *Journal of Neuroscience Methods* 150:111-5.
- De Souza, F. R., Figuera, M.R., Lima, T.T., de Bastiani, J., Barcellos, I.B., Almeida, C.E., de Oliveira, M.R., Bonacorso, H.G., Flores, A.E., de Mello, C.F., 2001. 3-Methyl-5-hydroxy-5-trichloromethyl-1H-1-pyrazolcarboxamide induces antinociception. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 68, 525-30.
- Dos Santos, N.P., 2007. Passando da doutrina à prática: Ezequiel Corrêa dos Santos e a farmácia nacional. *Química nova* 4, 1038-1045.

- Duman, E.N., Kesim, M., Kadioglu, M., Yaris, E., Kalyoncu, N.I., 2004. Possible involvement of opioidergic and serotonergic mechanisms in antinociceptive effect of paroxetine in acute pain. *Journal of Pharmacological Sciences* 94, 161-165.
- Fields, H.L., Heinricher, M.M., Mason, P., 1991. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. *Annual Review of Neuroscience* 14, 219-245.
- Godoy, M.C.M., Figuera, M.R., Flores, A.E., Rubin, M.A., Oliveira, M.R., Zanatta, N., Martins, M.A.P., Bonacorso, H.G., Mello, C.F., 2004.  $\alpha$ 2-Adrenoceptors and 5-HT receptors mediate the antinociceptive effect of new pyrazoles, but not of dipyrone. *European Journal of Pharmacology* 496, 93-97.
- Hensler, J.G., 2002. Differential regulation of 5-HT<sub>1A</sub> receptors-G protein interactions in brain following chronic antidepressant administration. *Neuropsychopharmacology* 26, 565-573.
- Hughes, N.A., Rapoport, H., 1958. Flavopereirine, an Alkaloid of *Geissospermum vellosii*. *Organic and Biological Chemistry* 80, 1604-1609.
- Hylden, J.L., Wilcox, G.L., 1983. Intrathecal serotonin in mice: analgesia and inhibition of a spinal action of substance P. *Life Science* 33, 789-95.
- Jage, J., 2005. Opioid tolerance and dependence. Do they matter? *European Journal of Pain* 9, 157-162.
- Julius, D., Basbaum, A.I., 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413, 203-10.
- Korzeniewska-Rybicka, I., Plaznik, A., 1998. Analgesic Effect of Antidepressant Drugs. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 59, 331-338.
- Lima-Landman, M.R.T., Tanae, M.M., Souccar, C., De Lima, T.C.M., Lapa, A.J., 2006. Alkaloids from medicinal *Geissospermum* species inhibit serotonin (5HT) up-take by rat hippocampal synaptosomes. *Acta Pharmacologica Sinica* 27, 347.
- Luscombe, G.P., Martin, K.F., Hutchins, L.J., Gosden, J., Heal, D.J., 1993. Mediation of the antidepressant-like effect of 8-OH-DPAT in mice by postsynaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *British Journal of Pharmacology* 108, 669-677.
- Malmberg, A.B., Yaksh, T.L., 1995. The effect of morphine on formalin-evoked behaviour and spinal release of excitatory amino acids and prostaglandin E<sub>2</sub> using microdialysis in conscious rats. *British Journal of Pharmacology* 114, 1069-75.
- Manske, R.H.F., Holmes, H.L., 1952. *The alkaloids chemistry and physiology*. New York: Academic Press Inc, 369-481.
- Mendes, G.L., Santos, A.R.S., Malheiros, A., Filho, V.C., Yunes, R.A., Calixto, J.B., 2000. Assessment of mechanisms involved in antinociception caused by sesquiterpene polygodial. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 292, 164-172.
- Millan, M.J., 1995. Serotonin and pain: a reappraisal of its role in the light of receptor

multiplicity. *Pain* 7, 409–419.

Millan, M.J., 2002. Descending control of pain. *Progress in Neurobiology* 66, 355-474.

Moreira, E.G., et al., 2000. Gabaergic-benzodiazepine system is involved in the crotoxin-induced anxiogenic effect. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 65, 7-13.

Muñoz, V., Sauvain, M., Bourdy, G., Callapa, J., Bergeron, S., Rojas, I., Bravo, J.A., Balderrama, L., Ortiz, B., Gimenez, A., Deharo, E., 2000. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part I. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Chacobo Indians. *Journal of Ethnopharmacology* 69, 127-37.

Redrobe, J.P., Bourin, M., Colombel, M.C., Baker, G.B., 1998. Dose-dependent noradrenergic and serotonergic properties of venlafaxine in animal models indicative of antidepressant activity. *Psychopharmacology* 138, 1–8.

Redrobe, J.P., Bourin, M., Colombel, M.C., Baker, G.B., 1998. Psychopharmacological profile of the selective serotonin reuptake inhibitor, paroxetine: implication of noradrenergic and serotonergic mechanisms. *Journal of Psychopharmacology* 12, 348–355.

Reeh, P.W., Kress, M., 2001. Molecular physiology of proton transduction in nociceptors. *Current Opinion on Pharmacology* 1, 45-51.

Rodrigues, A.L.S., Da Silva, G.L., Mateussi, A.S., Fernandes, E.S., Miguel, O.G., Yunes, R.A., Calixto, J.B., Santos, A.R.S., 2002. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. *Life Science* 70, 1347-1358.

Rojas-Corrales, M.O., Casas, J., Moreno-Brea, M.R., Gibert-Rahola, J., Mico, J.A., 2003. Antinociceptive effects of tricyclic antidepressants and their noradrenergic metabolites. *European Neuropsychopharmacology* 13, 355-63.

Santos, A.R.S., Calixto, J.B., 1997. Ruthenium red and capsazepine antinociceptive effect in formalin and capsaicin models of pain in mice. *Neuroscience Letters* 235, 73-6.

Santos, A.R., Vedana, E.M., De Freitas, G.A., 1998. Antinociceptive effect of meloxicam, in neurogenic and inflammatory nociceptive models in mice. *Inflammation Research* 47, 302-7.

Santos, A.R.S., Miguel, O.G., Yunes, R.A., Calixto, J.B., 1999. Antinociceptive properties of the new alkaloid, cis-8, 10-di-Npropyllobelidiol hydrochloride dihydrate isolated from *Siphocampylus verticillatus*: evidence for the mechanism of action. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 289, 417-426.

Sasaki, M., Ishizaki, K., Obata, H., Goto, F., 2001. Effects of 5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>3</sub> receptors on the modulation of nociceptive transmission in rat spinal cord according to the formalin test. *European Journal of Pharmacology* 424, 45-52.

Sawynok, J., Reid, A., 1996. Interactions of descending serotonergic systems with other

neurotransmitters in the modulation of nociception. *Behavior Brain Research* 73, 63-8.

Shimada, Y., Goto, H., Sakakibara, I., Kubo, M., Sasaki, H., Terasaka, K., 1999. Evaluation of the protective effects of alkaloids isolated from the hooks and stems of *Uncaria sinesis* on glutamate-induced neuronal death in cultured cerebellar granule cells from rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 51, 715-722.

Takeshita, N., Yamaguchi, I., 1995. Meta-chlorophenylpiperazine attenuates formalin-induced nociceptive responses through 5-HT<sub>1/2</sub> receptors in both normal and diabetic mice. *British Journal of Pharmacology* 116, 3133-3138.

Tanae, M.M., Souccar, C., Lapa, A.J., Lima-Landman, M.T.R., 2006. . Molecular interaction of *Geissospermum's* alkaloids with alpha 7 or muscle-type nicotinic receptors (nAChR) subtypes and with acetylcholinesterase (AChE). *Acta Pharmacologica Sinica* 27, 347.

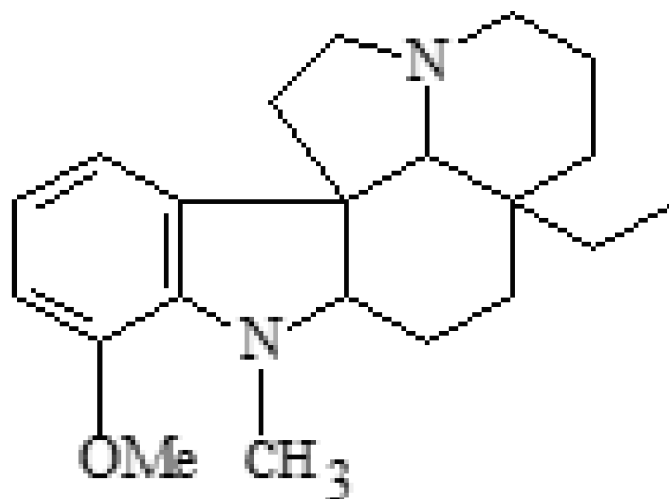
Tjølsen, A., Berge, O.G., Hunskaar, S., Rosland, J.H., Hole, K., 1992. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 51, 5-17.

Tjølsen, A., Hole, K., 1997. Animal Models of Analgesia. In: Dickenson, A., Besson, J., M. editors. *The Pharmacology of Pain*, Vol.130/I., Springer: Verlag, Berlin, 1-20.

Vinegar, R., Truax, J.F., Selph, J.L., Jonhston, P.R., 1979. Antagonism of pain and Hyperalgesia. *Anti-inflammatory Drugs*. In: Vane, JR, Ferreira, SH, editors. *Handbook of Experimental Pharmacology*. Vol. 50/II,. Springer: Verlag, Berlin, 208-222.

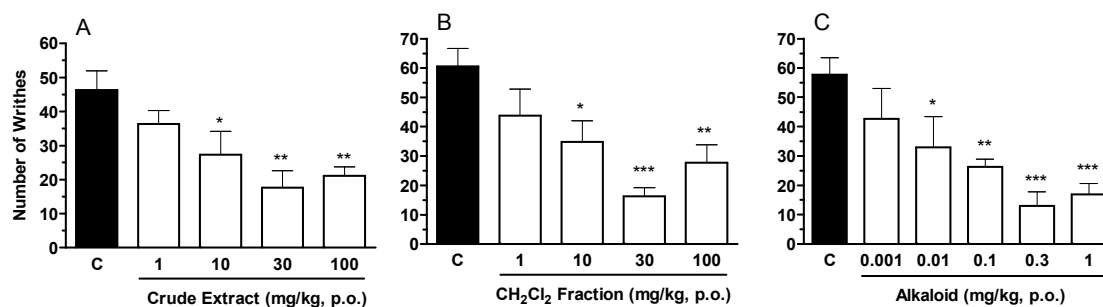
Whittle, B.J.T., 2003. Gastrointestinal effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Fundamental and Clinical Pharmacology* 17, 301–313.

Zimmermann, M., 1983. Ethical Guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109-110.

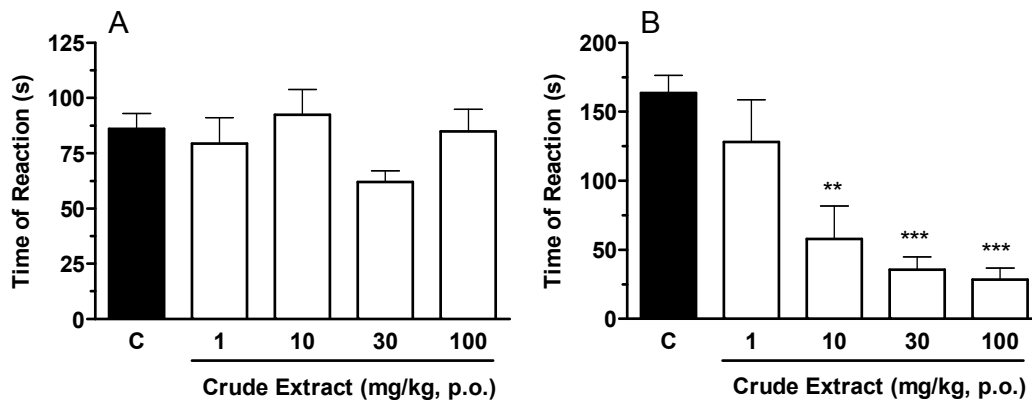


**Figure 1:** Molecular structure of alkaloid 12-methoxy-1-methyl-aspidospermidine.

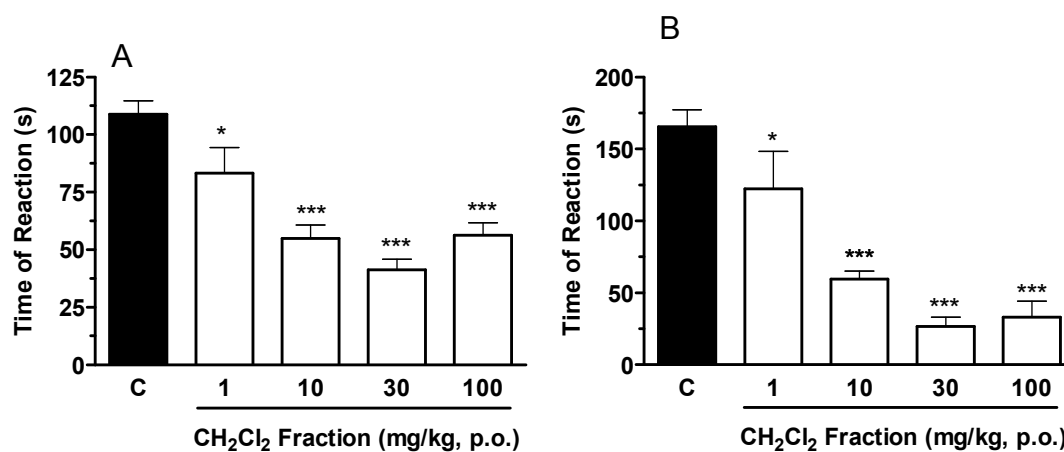




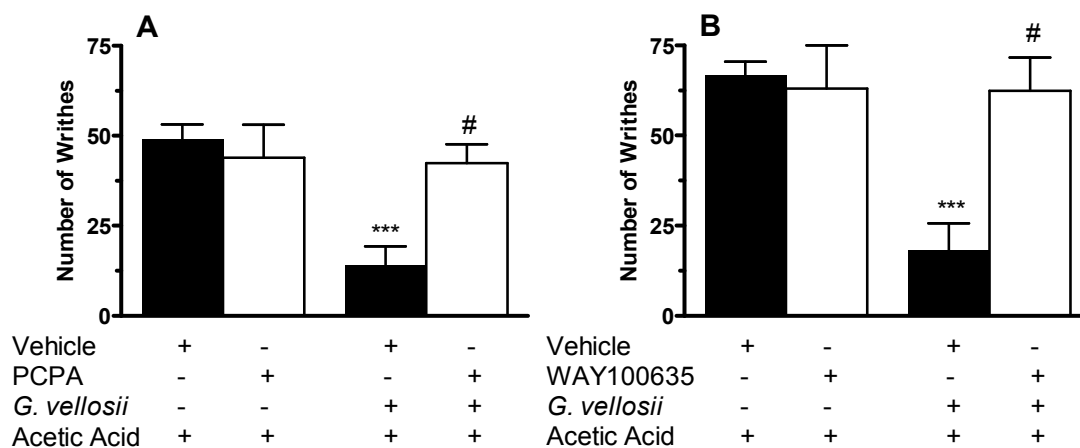
**Figure 2:** Effects of crude extract (A), dichloromethane fraction (B) or alkaloid 12-metoxyl-1-methyl-aspidospermidine (C) obtained from *G. vellosii* administered orally against acetic acid-induced visceral pain in mice. Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 10-11 animals. Control value (C) indicates the animals treated with vehicle and the asterisks denote the significance levels, when compared with control groups (one-way ANOVA followed by Student Newman-Keuls' test) \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .



**Figure 3:** Effect of crude extract (1-100 mg/kg) obtained from *G. vellosii* administered orally against formalin-induced licking (neurogenic phase, panel A, and inflammatory phase, panel B) in mice. Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 10-11 animals. Control values (C) indicate the animals injected with vehicle and the asterisks denote the significance levels, when compared with control groups (one-way ANOVA followed by Student Newman-Keuls test)  $**P < 0.01$ .



**Figure 4:** Effect of dichloromethane fraction (1-100 mg/kg) obtained from *G. vellosii* administered orally against formalin-induced licking (neurogenic phase, panel A, and inflammatory phase, panel B) in mice. Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 10-12 animals. Control values (C) indicate the animals injected with vehicle and the asterisks denote the significance levels, when compared with control groups (one-way ANOVA followed by Student Newman-Keuls test) \*P<0.05 ; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001;



**Figure 5:** Effect of pre-treatment of animals with PCPA (100 mg/kg, 4 consecutive days, panel A) or WAY100635 (3 mg/kg, panel B) on the antinociceptive profile of dichloromethane fraction (30 mg/kg, p.o.) obtained from *G. vellosii* administered orally against acetic acid-induced visceral pain in mice. Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 10-12 animals. The symbols report the significance level \*\*\*P <0.01 compared with control group (animals injected with the vehicle alone) and #P <0.001 compared with *G. vellosii* treatment (one-way ANOVA followed by Student Newman-Keuls test).

**Table 1:** Antinociceptive effects of different fractions obtained from *G. vellosii* (30 mg/kg) against acetic acid-induced nociception in mice.

Treatment	Abdominal constrictions <sup>a</sup>	Inhibition (%)
Vehicle (10 ml/kg)	41.9 ± 5.0	–
Crude extract fraction	17.6 ± 5.0**	62 ± 11
n-Butanol fraction	14.4 ± 3.0***	66 ± 8
Ethyl acetate fraction	13.9 ± 4.0***	67 ± 10
Dichloromethane fraction	10.8 ± 3.0***	74 ± 8
Aqueous fraction	23.0 ± 5.0**	45 ± 12

Mice were treated with extract or fractions 60 min (p.o.) before acetic acid administration. Data represents the mean ± S.E.M. of 10-12 animals. The symbols report the significance level \*\*P <0.01 and \*\*\*P <0.01 compared with control group (animals injected with the vehicle alone) (one-way ANOVA followed by Student Newman-Keuls test).

**Table 2:** Effect of crude extract or dichloromethane fraction obtained from *G. vellosii* on number of crossings in open-field test and on the fall latency or number of falls in rota-rod test in mice.

Treatment	Open-field test		Rota-rod test	
	Crossing	Fall latency	Number of falls	
Vehicle (10 ml/kg)	56 ± 5	141 ± 46	0.5 ± 0.2	
Crude Extract (10 mg/kg)	54 ± 8	89 ± 37	0.8 ± 0.1	
Crude Extract (30 mg/kg)	80 ± 2	141 ± 45	0.5 ± 0.2	
Crude Extract (100 mg/kg)	38 ± 3*	163 ± 49	0.3 ± 0.2	
Dichloromethane (10 mg/kg)	57 ± 9	203 ± 37	0.2 ± 0.2	
Dichloromethane (30 mg/kg)	50 ± 3	125 ± 51	0.5 ± 0.2	
Dichloromethane (100 mg/kg)	35 ± 4*	135 ± 47	1.2 ± 0.6	

Mice were treated with extract or fractions 60 min (p.o.) before open-field or rota-rod tests. Data represents the mean ± S.E.M. of 6 animals. The symbols report the significance level \*P <0.05 compared with control group (animals injected with the vehicle alone) (one-way ANOVA followed by Student Newman-Keuls test).

**Carta referente à submissão do artigo**

Manuscript Draft

Manuscript Number: JEP-D-08-01808

Title: Evidence for a Role of 5-HT1A receptor on antinociceptive action from *Geissospermum vellosii*

Article Type: Full Length Article

Corresponding Author: Dr Adair Roberto Soares Santos, PhD

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal de Santa Catarina

First Author: Juliana A Werner, MSc Student

Order of Authors: Juliana A Werner, MSc Student; Sara M Oliveira, MSc Student; Daniel F Daniel F. Martins, MSc Student; Leidiane Mazzardo, MSc Student; Josiane F Dias, PhD Student; Obdulio G Miguel, PhD; Ana L Lordello, MsC Student; Luiz F Royes, PhD; Juliano Ferreira; Adair Roberto Soares Santos, PhD

---

## **V. DISCUSSÃO**



A dor é uma das mais predominantes condições que diminuem a qualidade de vida e limitam a produtividade das pessoas. Embora tenhamos um arsenal de medidas eficazes e analgésicos amplamente utilizados, existem ainda algumas preocupações relativas à sua segurança e efeitos colaterais, que podem tornar o uso clínico um tanto problemático (JAGE, 2005; WHITTLE, 2003). Plantas têm sido utilizadas desde os tempos antigos como medicamentos para o tratamento de uma série de doenças. Plantas medicinais têm desempenhado um papel fundamental nas pesquisas em saúde. Apesar dos grandes avanços observados na medicina moderna nas últimas décadas, as plantas continuam a dar uma importante contribuição para os cuidados de saúde. Plantas com atividades medicinais encontram-se distribuídas em todo o mundo, sendo mais abundantes em países tropicais. Ao longo da última década, o interesse em fármacos derivados de plantas superiores, especialmente os fitoterápicos, aumentou expressivamente. Estima-se que cerca de 25% de todos os medicamentos modernos são, direta ou indiretamente, derivados de plantas superiores (CRAGG et al., 1997; DE SMET, 1997; FARNSWORTH & MORRIS, 1976; SHU, 1998). No presente estudo, tivemos por objetivo avaliar os efeitos antinociceptivos de *Geissospermum vellosii* - extrato bruto, frações e compostos – em modelos de nocicepção em camundongos. Além de investigar o papel do mecanismo serotoninérgico nesta ação antinociceptiva, bem como alguns possíveis efeitos adversos induzidos pela administração oral do extrato bruto ou fração diclorometano da *G. vellosii*.

O teste de contorções abdominais consiste na observação da resposta produzida por uma injeção intraperitoneal de ácido acético em camundongos. Esta resposta é caracterizada por “fortes contorções da musculatura abdominal acompanhado por estiramento do corpo com extensão das patas traseiras” (VANDERWENDE & MARGOLIN, 1956). O número de contorções é reduzido com doses relativamente baixas de narcóticos analgésicos ou antipiréticos. Suas potências foram congruentes com os seus efeitos analgésicos em seres humanos (KEITH et al., 1989). Também tem sido relatado que drogas antidepressivas, como a imipramina e a amitriptilina, produzem atividade analgésica no teste de contorções induzidas por ácido acético, em doses que não causam nenhum comprometimento motor, e quando administrado por via oral produz efeito em potência semelhante àquela alcançada por administração intraperitoneal (KORZENIEWSKA-RYBICKA & PLAZNIK, 1998). Depois de avaliar a ação antinociceptiva do extrato bruto de *G. vellosii*, foram avaliadas as diferentes frações obtidas de *G. vellosii* no modelo de contorções induzidas por ácido acético.

Posterior a isso, foi escolhida a fração diclorometano que apresentou o melhor rendimento durante o fracionamento, para realizar a curva dose-resposta desta fração. Tendo obtido resultados de antinocicepção superiores àqueles encontrados com o extrato bruto, decidimos isolar os compostos ativos presentes nesta fração, o que resultou no composto aspidospermina. Esse também apresentou potente efeito antinociceptivo no teste de contorções induzidas por ácido acético. Como este teste é suscetível a resultados falso-positivos, confirmamos nossos resultados de ação antinociceptiva de *G. vellosii* no modelo de nocicepção induzida por formalina.

A injeção de formalina provoca uma resposta nociceptiva aguda caracterizada pela lambida da pata por aproximadamente 5 minutos, denominada fase neurogênica ou primeira fase, e após um período quiescente de 10 minutos, a mesma resposta nociceptiva pode ser observada por um período adicional de aproximadamente 15 minutos, fase então denominada de inflamatória ou segunda fase. A segunda fase está associada com extravasamento de plasma e liberação de mediadores inflamatórios. Os medicamentos podem ser avaliados pela sua capacidade de suprimir a resposta nociceptiva na primeira e na segunda fase do teste. Geralmente os fármacos opióides são eficazes na primeira fase do teste, enquanto que a resposta nociceptiva durante a segunda fase da formalina é diminuída não apenas por opióides, mas também por esteróides e analgésicos não esteróides (DAMAS & LIEGEOIS, 1999; DUBUISSON & DENNIS, 1977; HUNSKAAR & HOLE, 1987; TAYLOR et al., 2000). A ação de fármacos analgésicos é diferente nas fases neurogênica e inflamatória. Os opióides que agem centralmente na sua maior parte, inibem ambas as fases de modo similar (HUNSKAAR & HOLE, 1987; SHIBATA et al., 1989). No entanto, analgésicos não opióides, incluindo dipirona, que têm sítios de ação centrais e periféricos, produzem efeito antinociceptivo em ambas as fases do teste da formalina, mas particularmente na segunda fase, onde a dor é inibida por doses menores do que as necessárias para inibir a nocicepção na primeira fase (SHIBATA et al., 1989). Similar aos analgésicos não opióides, verificamos que *G. vellosii*, especialmente a fração diclorometano, diminuiu a nocicepção em ambas as fases do teste da formalina, com melhor potência na fase inflamatória.

Estudos prévios demonstraram que alguns alcalóides isolados de *G. vellosii* reduzem a captação de serotonina em sinaptossomas de rato *in vitro* (LIMA-LANDMAN et al., 2006). Devido a isso, procuramos investigar o papel do sistema serotoninérgico no efeito antinociceptivo de *G. vellosii*. Nossos resultados

demonstraram que o sistema serotoninérgico - especialmente pela estimulação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>, mas não 5-HT<sub>2</sub> ou 5-HT<sub>3</sub> - é responsável pela ação antinociceptiva da fração diclorometano de *G. vellosii*. Esta afirmação é sustentada pela demonstração de que: 1) a depleção de serotonina endógena causada por PCPA, inibidor da triptofano hidroxilase, numa dose que se sabe causar diminuição do conteúdo de serotonina no SNC, reverteu amplamente o efeito antinociceptivo da fração diclorometano da *G. vellosii*. 2) antagonistas seletivos de receptores 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>3</sub>, cetanserina e ondansetrona, respectivamente, parecem não estar envolvidos na resposta antinociceptiva da fração diclorometano quando analisados no modelo de nocicepção induzida por ácido acético. 3) Em contraste, o antagonista seletivo do receptor 5-HT<sub>1A</sub>, WAY-100635, reverteu a antinocicepção causado pela administração sistêmica da fração diclorometano.

É conhecido que as vias serotoninérgicas (5-HT) no SNC originam-se a partir de uma série de núcleos situados na linha média do tronco cerebral, o núcleo da rafe, os quais representam a mais rica fonte de 5-HT neuronal sintetizados no cérebro de mamíferos (FIELDS et al., 1991; MILLAN, 2002). O núcleo dorsal da rafe (DRN) tem sido implicado na modulação da dor e o núcleo magno da rafe (MRN), que é provavelmente o mais importante núcleo serotoninérgico, exerce um papel importante na modulação da transmissão da dor (FIELDS & BASBAUM, 1984; MILLAN, 2002). As fibras serotoninérgicas descendentes originam-se no núcleo da rafe e findam no corno dorsal da medula espinhal. Tais fibras inibem as respostas de neurônios de largo diâmetro para os sinais nociceptivos que são transportados por fibras aferentes primárias Aδ e C (GJERSTAD et al., 1996). Os receptores 5-HT<sub>1</sub> estão localizados tanto em auto-receptores somáticos sobre esses neurônios do tronco cerebral, bem como de pós-sinápticamente em neurônios do corno dorsal (Barnes e Sharp, 1999; Daval et al., 1987). A estimulação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> por agonistas seletivos foi reportada tanto para aumentar como para inibir as reações dolorosas, dependendo do modelo animal de nocicepção (MILLAN, 1995). Normalmente, agonistas seletivos do receptor 5-HT<sub>1A</sub> produzem antinocicepção em modelos químicos do nocicepção (AOKI et al., 2006). Além disso, vários estudos têm demonstrado o envolvimento dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> no mecanismo de ação antidepressivo em várias classes de antidepressivos, incluindo tricíclicos, inibidores da recaptação de serotonina (SSRIs) e inibidores da MAO (IMAO) (HENSLER, 2002). Nossos dados indicam claramente que, no modelo de nocicepção induzida por ácido acético, a ação antinociceptiva da fração diclorometano

de *G. vellosii* foi revertida por antagonista seletivo do receptor 5-HT<sub>1A</sub>, o que sugere que é a estimulação do receptor 5-HT<sub>1A</sub> por meio da administração da fração diclorometano de *G. vellosii* é responsável pelo efeito analgésico. A estimulação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>, responsáveis pela antinocicepção induzida pela fração diclorometano de *G. vellosii* poderia ocorrer em receptores somáticos, pós-sinápticos ou pré-sinápticos. Embora não tenhamos verificado a concentração de 5-HT, a fim de confirmar a sua depleção, o tratamento com PCPA (inibidor da triptofano hidroxilase) utilizado no presente estudo, produz reduções parciais nos níveis de 5-HT, embora altamente significativas, enquanto que os níveis de dopamina e noradrenalina não são afetados (REDROBE et al., 1998a, 1998b). Considerando que PCPA, que age pré-sinápticamente (LUSCOMBE et al., 1993) e que pode impedir o efeito antinociceptivo da fração diclorometano de *G. vellosii* em modelos animais de nocicepção, concluímos que o efeito antinociceptivo da fração diclorometano de *G. Vellosii* requer um sistema 5-HT pré-sináptico intacto. No entanto, não podemos excluir a participação de receptores 5-HT<sub>1A</sub> pós-sinápticos, no seu efeito analgésico.

Recentemente foi relatado que o alcalóide geissospermina isolado de *G. vellosii* atua como relaxante muscular por se ligar a receptores nicotínicos (TANAE et al., 1999, 2004). Além disso, geissosquizina isolada de *G. vellosii* reduz significativamente a atividade locomotora no teste de campo aberto, aparentemente mediada pelo sistema central dopaminérgico (SHIMADA et al., 1999). Para determinar se a redução do comportamento nociceptivo poderia ser devido a um bloqueio neuromuscular ou hipolocomoção causado pelo tratamento com *G. vellosii*, afim de evitar interpretações incorretas dos nossos resultados antinociceptivos, foram realizados os testes de campo aberto e cilindro giratório. Como indicado, os animais apresentaram alterações comportamentais no teste de campo aberto apenas nas maiores doses de *G. vellosii* - extrato bruto e fração diclorometano (100 mg/kg) – mas a mesma alteração não foi observada no teste de cilindro giratório. Estes resultados sugerem que a diminuição no número de cruzamentos pode ter ocorrido por algum outro motivo que não o bloqueio neuromuscular, uma vez que bloqueadores neuromusculares produziria alterações no desempenho motor não só no teste de campo aberto, mas também no teste de cilindro giratório (DE SOUZA et al., 2001; MOREIRA et al., 2000). Além disso, sendo que o efeito antinociceptivo máximo de *G. vellosii*, tanto do extrato bruto quanto da fração diclorometano, foi obtido na dose de 30 mg/kg, podemos sugerir que a ação antinociceptiva de *G. vellosii* não está relacionada com disfunções motoras.

O composto aspidospermina foi isolado a primeira vez a partir da casca da *Aspidosperma quebracho* e das folhas de *Vallesia glabra* (WITKOP B, 1948). Neste trabalho, nós mostramos pela primeira vez a partir de seu isolamento da *G. vellosii*. São descritas algumas atividades biológicas para aspidospermina, incluindo atividade antiplasmódio e antitripanosoma (GALARRETA et al., 2008; MITAINE-OFFER et al., 2002). Tem sido mostrado que aspidospermina possui atividade de bloqueador adrenérgico para uma variedade de tecidos urogenitais e também apresenta um considerável efeito citotóxico (DEUTSCH et al., 1994; STURDÍKOVÁ et al., 1986). Estendemos estes dados mostrando que aspidospermina, bem como os outros compostos testados, têm uma potente ação antinociceptiva (ANEXO I). Visto que seu rendimento é 0,23% na fração diclorometano, este alcalóide pode ser responsável pela ação antinociceptiva de *G. vellosii*. Um dado surpreendente obtido em nosso estudo foi a grande potência do composto aspidospermina quando comparado com analgésicos já utilizados na clínica como AAS, paracetamol e morfina.

Portanto, no presente trabalho nós verificamos a atividade antinociceptiva da *G. vellosii*, o que valida o seu uso popular como planta analgésica. Além disso, foi surpreendente a atividade antinociceptiva exercida pelo composto 12-metoxi-1-methyl-aspidospermidine isolado da fração diclorometano de *G. vellosii*, que manifestou importante capacidade analgésica, sendo um composto em potencial para desenvolvimento de um novo fármaco analgésico.

---

## **VI. CONCLUSÃO**

Tendo em vista os resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

1. A *G. vellosii* – extrato bruto, frações ou compostos – foi capaz de produzir acentuada antinocicepção nos modelos químicos de nocicepção induzidos por formalina e ácido acético.
2. A *G. vellosii*, tanto o tratamento com a fração diclorometano como com extrato bruto, não provocou efeitos colaterais locomotores significativos nas doses antinociceptivas efetivas (30 mg/kg) no teste de campo aberto ou teste do cilindro giratório.
3. Sugerimos que o sistema serotoninérgico, em especial por meio do receptor 5-HT<sub>1A</sub>, tem um importante papel na nocicepção induzida por *G. vellosii*.
4. De acordo com sua utilização popular enquanto analgésica, nosso estudo pôde validar esta atividade antinociceptiva em modelos animais de nocicepção.

---

## **VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



AKERELE, O. Summary of WHO guidelines for the assessment of herbal medicines. **Herbal Gram**, 28:13-19, 1993.

ALMEIDA, M. R. Et al. Pereirina: O primeiro Alclóide isolado no Brasil. **Ciência Hoje**, 240:26-31, 2007.

AOKI, M. et al. Antidepressants enhance the antinociceptive effects of carbamazepine in the acetic acid-induced writhing test in mice. **European Journal of Pharmacology**, 550:78-83, 2006.

BARROS, J. S. et al. A captação de serotonina por alcalóides de *Geissospermum laeve* Vell.Baill. In: Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, 19, 2006, Salvador. **Anais do XIX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**. Salvador, 2006.

BARNES, N. M.; SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacology**, 38:1083-1152, 1999.

BASBAUM, A. I.; FIELDS, H. L. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. **Annual Review of Neuroscience**, 7:309-338, 1984.

BESSON, J. M.; CHAOUCH, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. **Physiological Review**, 67: 67-186, 1987.

BESSON, J. M. The neurobiology of pain. **Lancet**, 353:1610-1615, 1999.

BERTO, A.; VON SCHUCKMANN, G. **Ber**, 64: 278, 1931.

BORELLA, A.; BINDRA, M.; WHITAKER-AZMITIA, P. M. Role of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor in development of the neonatal rat brain: preliminary behavioral studies. **Neuropharmacology**, 36:445-450, 1997.

BRANDAO, M. L. Dores Crônicas. In: **Neurobiologia das doenças mentais**. 5. ed.

São Paulo: Lemos Editorial, 1999. 179-197p.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 33:179-189, 2000.

COGGESHALL, R. E.; CARLTON, S. M. Receptor localization in the mammalian dorsal horn and primary afferent neurons. **Brain Research Review**, 24: 28-66, 1997.

COSTA, R. S. et al. Fração de extrato de *geissospermum vellosii* reverte a amnésia induzida por escopolamina em camundongos. In: Reunião anual da FESBE, 21, 2006, Águas de Lindóia - SP. **Anais da XXI Reunião anual da FESBE**, 2006.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products**, 60:52-60, 1997.

CRAIG, A. D.; DOSTROVSKY, J. O. Differential projections of thermoreceptive and nociceptive lamina I trigeminothalamic and spinothalamic neurons in the cat. **Journal of Neurophysiology**, 86(2):856-70, 2001.

DAMAS, J.; LIÉGEOIS, J. F. The inflammatory reaction induced by formalin in the rat paw. **Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology**, 359(3):220-7, 1999.

DEUTSCH, H. F. Et al. Isolation and biological activity of aspidospermine and quebrachamine from an *Aspidosperma* tree source. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 12(10):1283-7, 1994.

DE MONTIGNY, C.; BLIER, P.; CHAPUT, Y. Electrophysiologically-identified serotonin receptors in the rat CNS. Effect of antidepressant treatment. **Neuropharmacology**, 23: 511-1520, 1984.

DE SMET, P. A. The role of plant derived drugs and herbal medicines in healthcare.

- Drugs**, 54:801-840, 1997.
- DE SOUZA, F. R. et al. 3-Methyl-5-hydroxy-5-trichloromethyl-1H-1-pyrazolcarboxamide induces antinociception. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 68:525-30, 2001.
- DOS SANTOS, N. P. et al. Passando da doutrina à prática: Ezequiel Corrêa dos Santos e a farmácia nacional. **Química Nova**, 4:1038-1045, 2007.
- DRAY, A. Peripheral Mediators of Pain. In: Dickenson, A., Besson, J., -M., editors. **The Pharmacology of Pain**. Vol.130/I., Springer: Verlag, Berlin. 1997. 21-41p.
- DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. The formalin test: a quantitative study of analgesic effects of morphine, meperidine and brainstem stimulation in rats and cats. **Pain**, 4:161-174, 1977.
- ELISABETSKY, E.; WANNMACHER, L. The status of ethnopharmacology in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, 38:137-143, 1993.
- ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. *In: Farmacognosia: da planta ao medicamento/* Organizados por Simões, C.M.O. et al. Porto Alegre/ Florianópolis: ed. Universidade/UFRGS/ed. da UFSC, 1999.87-89p.
- FARNSWORTH, N. R. et al. Medicinal plants in therapy. **Bulletin of WHO**, 63:965-981, 1985.
- FARNSWORTH, N. R.; MORRIS, R. W. Higher plants - the sleeping giant of drug development. **American Journal of Pharmaceutical Education**, 148:46-52, 1976.
- FENNER, R. et al. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 42:369-394, 2006.

- FERREIRA, R. **Brasil-med**, 63:131, 1949.
- FIELDS, H. L.; HEINRICHER, M. M.; MASON, P. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. **Annual Review Neuroscience**, 14:219–245, 1991.
- FLECK, M. P. A. Et al. Diretrizes da Associação Médica Brasileira para o tratamento da depressão. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, 25(2):114-122, 2003.
- GALARRETA, B. C. et al. The use of natural product scaffolds as leads in the search for trypanothione reductase inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 16:6689-95, 2008.
- GALLIN, J. I. et al. Human neutrophil-specific granule deficiency: a model to assess the role of neutrophil-specific granules in the evolution of the inflammatory response. **Blood**, 59:1317-29, 1982.
- GEAR, R. W.; ALEY, K. O.; LEVINE, J. D. Pain-induced analgesia mediated by mesolimbic reward circuits. **Journal of Neuroscience**, 19:175-7181, 1999.
- GINGRICH, J. A.; HEN, R. Dissecting the role of the serotonin system in neuropsychiatric disorders using knockout mice. **Psychopharmacology**, 155:1-10, 2001.
- GJERSTAD, J.; TJOLSEN, A.; HOLE, K. The effect of 5-HT<sub>1A</sub> receptor stimulation on nociceptive dorsal horn neurones in rats. **European Journal of Pharmacology**, 318:315–321, 1996.
- GRUNWALD, J. The European phytomedicines market: figures, trends, analysis. **Herbal Gram**, 34: 60-65, 1995.
- GRUNWALD, J.; BUTTEL, K. The European phytotherapeutics market: figures, trends, analyses. **Drugs Made in Germany** 39: 6-11, 1996.

- GUYTON, A. C. Sensações somáticas:II. Dor, cefaléia e sensações térmicas. In:Guyton AC. **Tratado de fisiologia médica**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. 1992. 458-467p.
- HELLENDALL, R.P. et al. Detection of serotonin receptor transcripts in the developing nervous system. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, 5:299-310, 1992.
- HENSLER, J. G.; KOVACHICH, G. B.; FRAZER, A. A quantitative autoradiographic study of serotonin<sub>1A</sub> receptor regulation. Effect of 5,7-dihydroxytryptamine and antidepressant treatments. **Neuropsychopharmacology**, 4:131-144, 1991.
- HENSLER, J. G. Differential regulation of 5-HT<sub>1A</sub> receptors-G protein interactions in brain following chronic antidepressant administration. **Neuropsychopharmacology**, 26:565–573, 2002.
- HENRY, T. A. **The plant Alkaloids**. 4 edição. Blakiston Co, Philadelphia, 1949.
- HILL, R. G. Molecular basis for the perception of pain. **Neuroscientist**, 7:282-292, 2001.
- HOYER, D.; HANNON, J. P.; MARTIN, G. R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 71: 533-554, 2002.
- HUGHES, N. A.; RAPOPORT, H. Flavopereirine, an Alkaloid of *Geissospermum vellosii*. **Organic and Biological Chemistry**, 80:1604-1609, 1958.
- HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, 30:103–114, 1987.
- INDEX KEWENSIS. **Oxford University Press**, 1895. 179p.

- JAGE, J. Opioid tolerance and dependence. Do they matter? **European Journal of Pain**, 9:157–162, 2005.
- JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, 2001 413:203-10, 2001.
- KEITH, B. J.; ABBOTT, F.; ABBOTT, F. V. Techniques for assessing the effects of drugs on nociceptive responses. In: Boulton AA, Baker GB, Greenshaw AJ. **NeuroMethods 13 Psychopharmacology**. Clifton, New Jersey: Humana Press; 1989. 145-198p.
- KORZENIEWSKA-RYBICKA, I.; PLAZNIK, A. Analgesic Effect of Antidepressant Drugs. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 59(2):331–338, 1998.
- LAPA, A. J. et al. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**/Organizado por Simões, C.M.O. et al. Porto Alegre/Florianópolis: ed. Universidade/UFRGS/ed. Da UFSC, 1999. 181-196p.
- LAUDER, J. M. Neurotransmitters as growth regulatory signals: role of receptors and second messengers. **Trends in Neuroscience**, 16:233-240, 1993.
- LAUDER, J. M.; LIU, J.; GRAYSON, D. R. Quantitative analysis of 5-HT<sub>1A</sub> receptor mRNA from embryonic rat brain by competitive RT-PCR. **Society for Neuroscience**. 22: 539, 1996.
- LEVINE, J. D.; TAIWO, Y. O. Opioid receptor subtype mediating peripheral antinociception. **APS Journal**, 2(1):72-76, 1994.
- LIMA-LANDMAN, M. T. R. et al. Alkaloids from medicinal *Geissospermum* species inhibit serotonin (5HT) uptake by rat hippocampal synaptosomes. **Acta Pharmacologica Sinica**, 27:347, 2006.

- LOESER, J. D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **Lancet**, 353:1607-1609, 1999.
- LUSCOMBE, G. P. et al. Mediation of the antidepressant-like effect of 8-OH-DPAT in mice by postsynaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptors, **British Journal of Pharmacology**, 108:669–677, 1993.
- MANSKE, R. H. F.; HOLMES, H. L. **The alkaloids chemistry and physiology**. New York: Academic Press Inc, 1952. 369-481p.
- MCMAHON, S. B. et al. Inflammatory mediators and modulators of pain. In: Wall PD, Melzack R. **Textbook of pain**. Churchill Livingstone: Londres, 1999. 49-72p.
- MELZACK R.; WALL P. Pain mechanisms: a new theory. **Science**, 150: 971-9, 1965.
- MERSKEY, H.; BOGDUK, N. (Eds). **Classification of Chronic Pain: Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definitions of Pain Terms**, 2nd ed. Seattle: IASP Press, 1994.
- MICO, J. A. et al. The role of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in research strategy for extensive pain treatment. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, 6(18):1997-2003, 2006.
- MILLAN, M. J. Serotonin and pain: a reappraisal of its role in the light of receptor multiplicity. **Pain**, 7:409–419, 1995.
- MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, 57:1-164, 1999.
- MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, 66:355-474, 2002.
- MILLIKEN, W. Traditional antimalarial medicine in Roaramia, Brazil. **Economic Botany**, 51:212-237, 1997.

- MIMAKI Y. et al. Anti-convulsion effects of choto-san and chotoko (*Uncariae Uncis cam Ramlus*) in mice, and identification of the active principles. **Yakugaku Zasshi**, 117(12):1011-21, 1997.
- MITAINE-OFFER, A. C. Et al. Antiplasmodial activity of aspidosperma indole alkaloids. **Phytomedicine**, 9(2):142-5, 2002.
- MOGIL, J. S. et al. Disparate spinal and supraspinal opioid antinociceptive responses in beta-endorphin-deficient mutant mice. **Neuroscience**, 101(3):709-17, 2000.
- MOREIRA, E. G. et al. Gabaergic-benzodiazepine system is involved in the crotoxin-induced anxiogenic effect. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 65(1):7-13, 2000.
- MORILAK, D. A.; CIARANELLO, R. D. Ontogeny of 5-hydroxytryptamine<sub>2</sub> receptor immunoreactivity in the developing rat brain. **Neuroscience**, 55:869-880, 1993.
- MUÑOZ, V. et al. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part I. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Chacobo Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, 69(2):127-37, 2000.
- OLIVEIRA, F.M.M. *Vegetaes Tônicos*. Rio de Janeiro: **Typografia da Revista do Exército Brasileiro**, 1883. 142p.
- PLEUVRY, B. J.; LAURETTI, G. R. Biochemical aspects of chronic pain and its relationship to treatment. **Pharmacology and Therapeutics**, 71:313-324, 1996.
- RANG, H. P. Et al. Hormônios locais, inflamação e reações imunológicas. Em: **Farmacologia**. Elsevier, 5:246-275, 2004.
- RAYMOND, J.R. et al. Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. **Pharmacology and Therapeutics**, 92:179-212, 2001.



REDROBE, J. P. et al. Dose-dependent noradrenergic and serotonergic properties of venlafaxine in animal models indicative of antidepressant activity. **Psychopharmacology**, 138:1–8, 1998.

REDROBE, J. P. et al. Psychopharmacological profile of the selective serotonin reuptake inhibitor, paroxetine: implication of noradrenergic and serotonergic mechanisms. **J. Psychopharmacology**, 12:348–355, 1998.

RHO, J. M.; STOREY, T. W. Molecular ontogeny of major neurotransmitter receptor systems in the mammalian central nervous system: norepinephrine, dopamine, serotonin, acetylcholine, and glycine. **Journal of Child Neurology**, 16:271-280, 2001.

RIAD, M. et al. Somatodendritic localization of 5-HT<sub>1A</sub> and preterminal axonal localization of 5-HT<sub>1B</sub> serotonin receptors in adult rat brain. **Journal of Comparative Neurology**, 417: 181-194, 2000.

ROWBOTHAM, M.C. et al. Venlafaxine extended release in the treatment of painful diabetic neuropathy: a double-blind, placebo-controlled study. **Pain**, 110:697–706, 2004.

ROTH, B. L.; HAMBLIN, M. W.; CIARANELLO, R. D. Developmental regulation of 5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>1c</sub> mRNA and receptor levels. **Developmental Brain Research**, 58: 51-58, 1991.

RUIZ, G. et al. Plasticity of 5-hydroxytryptamine(1B) receptors during postnatal development in the rat visual cortex. **International Journal of Developmental Neuroscience**, 17:305-315, 1999.

RUSSO, C. M.; BROSE, W. Chronic Pain. **Annual Review of Medicine**, 49:123-133, 1998.

- SAKAKIBARA, I. et al. Effect on locomotion of indole alkaloids from the hooks of uncaria plants. **Phytomedicine**, 6(3):163-168, 1999.
- SATURNINO C.; BUONERBA M. F.; CAPASSO A. Design of Molecules Acting on the Serotonin Receptors. **Letters in Drug Design & Discovery**, 4:365-367, 2007.
- SAWYNOK, J. Modulation of nociception by descending serotonergic projections. In "**Handbook of Experimental Pharmacology: Serotonergic neurons and 5-HT receptors in the CNS**" (H. G. Baumgarten; M. Göthert, eds.); Springer-Verlag; Berlin, 1997; pp. 637-653.
- SCHREIBER, R.; DE VRY, J. 5-HT<sub>1A</sub> receptor ligands in animal models of anxiety, impulsivity and depression: multiple mechanisms of action? **Program of Neuropsychopharmacology Biological Psychiatry** 17:87-104, 1993.
- SHELLEY, A.; CROSS, M. D. Pathophysiology of pain. **Mayo Clinic Proceedings**, 69: 375-383, 1994.
- SHIBATA, M. et al. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, 38:347-352, 1989.
- SHIMADA, Y. et al. Evaluation of the protective effects of alkaloids isolated from the hooks and stems of *Uncaria sinensis* on glutamate-induced neuronal death in cultured cerebellar granule cells from rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 51(6):715-722, 1999.
- SHU, Y. Z. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. **Journal of Natural Products**, 61:1053-1071, 1998.
- STURDÍKOVÁ, M. et al. New compounds with cytotoxic and antitumor effects. Part 6: Monomeric indole alkaloids of *vinca minor* L. and their effect on P388 cells. **Pharmazie**, 41(4):270-2, 1986.

STRONG J. et al. **Pain: A Textbook for Therapist**. New York: Churchill: Livingstone, 2002.

TAYLOR, B.; VAN DE WAL, B. Safety of celecoxib vs other nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **JAMA**, 284(24):3123-4, 2000.

TALLEY, E. M.; SADR, N. N; BAYLISS, D. A. Postnatal development of serotonergic innervation, 5-HT1A receptor expression, and 5-HT responses in rat motoneurons. **The Journal of Neuroscience**, 17:4473-4485, 1997.

TALLEY, E. M.; BAYLISS, D. A. Postnatal development of 5-HT1A receptor expression in rat somatic motoneurons. **Developmental Brain Research**, 122:1-10, 2000.

TANAE, M.M. et al. Liberação da geissospermina, alcalóide isolado do pau-pereira (*Geissospermum vellosii*) no músculo esquelético. In: Reunião anual da FESBE, 14, 1999, Caxambú. **Anais da XIV Reunião anual da FESBE**. Caxambú, p. 387, 1999.

TANAE, M.M. et al. Interação de Geissospermina, alcalóide isolado do pau pereira (*Geissospermum laeve*), com receptores nicotínicos musculares. In: Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 18, 2004, Manaus. **Livro de Resumos**. Manaus, p.431, 2004.

TJØLSEN, A.; HOLE, K. Animal Models of Analgesia. In: Dickenson, A., Besson, J., -M. editors. **The Pharmacology of Pain**, Vol.130/I., Springer: Verlag, Berlin, 1997. 1-20p.

TREEDE, R. D. et al. Pain-related evoked potentials from parasylvian cortex in humans. **Electroencephalographic Clinical Neurophysiology Supplement**, 49:250-4, 1999.

TROPILAB INC. Disponível em <<http://www.tropilab.com/bergibita.html>> Acesso em: 29 mar 2007 às 15h20min.

- VANDERWENDE, C.; MARGOLIN, S. Analgesic tests based upon experimentally induced acute abdominal pain in rats. **Federal Probation**, 15:494, 1956.
- VERGE, D.; CALAS, A. Serotonergic neurons and serotonin receptors: gains from cytochemical approaches. **Journal of Chemistry and Neuroanatomy**, 18:41-56, 2000.
- WANG, Q. P.; NAKAI, Y. The dorsal raphe: an important nucleus in pain modulation. **Brain Research Bulletin**, 34:575-585, 1994.
- VON KNORRING, L. et al. [3H]imipramine binding in idiopathic pain syndromes. Basal values and changes after treatment with antidepressants. **Pain**, 38(3):261-7, 1989.
- WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states. **Physiology Review**, 82(4):981-1011, 2002.
- WALL, P. D. Introduction to the fourth edition. In: Wall PD, Melzack R. **Textbook of pain**. Churchill Livingstone: Londres, 1999. 1-8p.
- WALSH, D. J. Personal history: the pipes of Pain. **Neurology**, 65(12):1997, 2005.
- WEIL-FUGAZZA, J. et al. Age-related changes in dopaminergic and serotonergic indices in the rat forebrain. **Neurobiology of Aging**, 10(2):187-90, 1989.
- WELLS K. B. et al. The functioning and well-being of depressed patients: results from the medical outcomes study. **JAMA**, 262:916-9, 1989.
- WHITTLE, B. J. T. Gastrointestinal effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, 17:301-313, 2003.

WITKOP B. Aspidospermine. **Journal of the American Chemical Society**, 70(11):3712-6, 1948.

WOOD, J. N.; DOCHERTY, R. J. Chemical activation of sensory neurons. **Annual Review of Physiology**, 59:457–482, 1997.

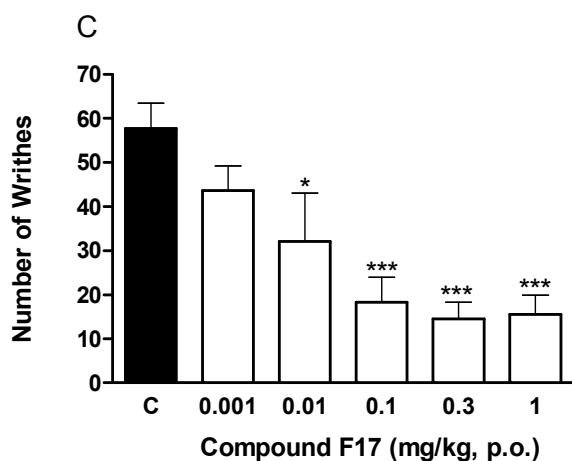
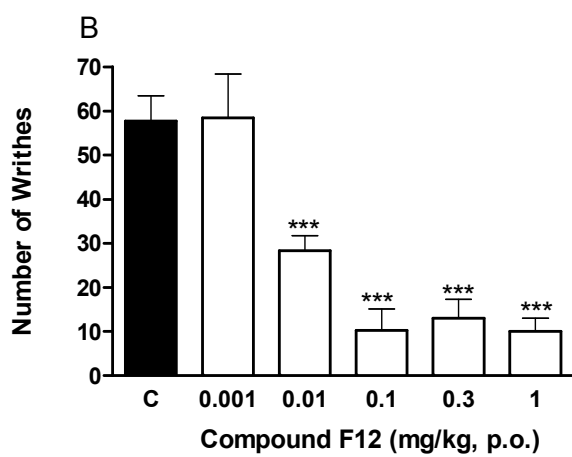
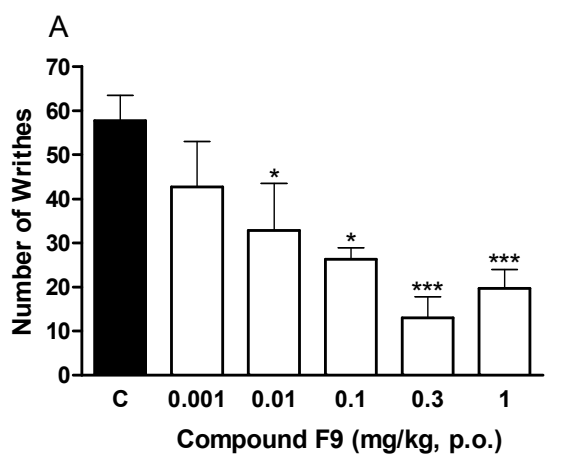
WOLFE, F. The prognosis of rheumatoid arthritis: assessment of disease activity and disease severity in the clinic. **American Journal of Medicine**, 103(6A):12-18, 1997.

WOOD, J. N.; DOCHERTY, R. Chemical activators of sensory neurons. **Annual Review of Physiology**, 59:457-82, 1997.

ZEC, N. et al. Developmental changes in [3H]lysergic acid diethylamide ([3H]LSD) binding to serotonin receptors in the human brainstem. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, 55:114-126, 1996.

ZHUO, M. Targeting Central Plasticity: A New Direction of Finding Painkillers. **Current Pharmaceutical Design**, 11:2797-2807, 2005.

ZHUO, M.; GEBHART, G. F. Modulation of Noxious and Non-Noxious Spinal Mechanical Transmission From the Rostral Medial Medulla in the Rat. **Journal of Neurophysiology**, 88: 2928–2941, 2002.



**ANEXO I:** Avaliação da atividade antinociceptiva de compostos isolados de *G. vellosii*. O composto F9 foi identificado como 12-metoxi-1-metil-aspidospermidine