

SOFIA JÜRGENSEN

**ESTUDO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NO EFEITO
ANTINOCICEPTIVO DE UMA FRAÇÃO DE ALCALÓIDES OXINDÓLICOS DE
Uncaria tomentosa.**

FLORIANÓPOLIS – SC

2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**ESTUDO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NO EFEITO
ANTINOCICEPTIVO DE UMA FRAÇÃO DE ALCALÓIDES OXINDÓLICOS DE
Uncaria tomentosa.**

SOFIA JÜRGENSEN

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau.

Co-orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos.

FLORIANÓPOLIS – SC

2007

JÜRGENSEN, Sofia. **Estudo dos mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo de uma fração de alcalóides oxindólicos de *Uncaria tomentosa***. Florianópolis, 2007. Xp. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientadora: Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau.
Defesa: 23/02/2007.

O tratamento de camundongos com uma fração de alcalóides oxindólicos de *Uncaria tomentosa* (UT) reduziu significativamente a nocicepção induzida por estímulos químicos e aumentou significativamente a latência de resposta dos animais a estímulos térmicos nocivos, sugerindo possível efeito dos alcalóides sobre o sistema nervoso central. O tratamento com UT foi capaz ainda de inibir a nocicepção induzida pela injeção intratecal de glutamato, NMDA, substância P e pelas citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β . O efeito antinociceptivo de UT no teste da formalina foi atenuado pelo tratamento prévio com cetanserina, um antagonista dos receptores serotoninérgicos 5-HT₂, mas não pelos antagonistas dos receptores opióides (naltrexona), dos receptores muscarínicos (atropina), ou dos receptores adrenérgicos α_1 e α_2 (prazosin e ioimbina, respectivamente). De maneira semelhante, o pré-tratamento com L-arginina, substrato para a enzima óxido nítrico sintase, também não afetou o efeito antinociceptivo de UT no teste da formalina. Estes dados sugerem que a atividade antinociceptiva de UT envolve a ação sobre o sistema serotoninérgico e glutamatérgico, e não sobre os demais sistemas testados.

[*Uncaria tomentosa*] [alcalóides oxindólicos] [nocicepção] [receptores 5-HT₂]
[receptores NMDA]

*Dedico este trabalho aos meus pais, Érico Celso
Gürgensen e Luzia Margareth Wrublesvski Gürgensen,
que me deram a vida e todo o amor necessário para me
tornar uma pessoa feliz e realizada; ao meu marido,
grande amor e melhor amigo, Rafael Fernando Kartke,
companheiro de todos os momentos; à Tereza Gürgensen,
minha irmã querida; e a todos os meus amigos e amigas.*

Agradecimentos

À minha orientadora, professora Dra. Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau, por todos os ensinamentos transmitidos nestes anos de convivência, pelas oportunidades que me deu e pela confiança que em mim depositou.

Ao meu co-orientador, professor Dr. Adair Roberto Soares dos Santos, pela valiosa orientação na condução do trabalho experimental e pela maneira sempre receptiva e carinhosa com que me recebeu em seu laboratório.

Aos professores Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti e Dr. Gustavo Micke pela realização da análise fitoquímica da fração U3.

À minha amiga Sílvia Dal Bó pela ajuda nos experimentos, pelos ensinamentos desde o início da minha iniciação científica, pela orientação na condução dos experimentos e pela credibilidade em minhas capacidades.

Ao Vinícius M. Gadotti, pela contribuição com suas certeiras injeções intratecais.

Aos amigos do laboratório, Ângela Bet, Jarbas M. Siqueira, Karin Scheschowitzsch, Mariana A. Kort, Regina Filippi, Juliana Sandin e Paulo Dias, pela agradável convivência durante todos estes anos.

Aos professores do Departamento de Farmacologia, em especial aos professores Dr. Jamil Assreuy e Dr. Antônio de Pádua Carobez pela amizade e exemplo.

Aos funcionários Diana Lenzi, Rita Maria de Palma, Sandra Regina B. de Oliveira e Pedro Paulo de Souza pelo excelente trabalho que desenvolvem e por sempre nos ajudarem a resolver os problemas do dia-a-dia.

Aos membros da banca da defesa de mestrado, pelas valiosas críticas e sugestões.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	III
LISTA DE TABELAS	I
LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE ABREVIATURAS.....	III
RESUMO.....	V
ABSTRACT.....	VI
1. Introdução.....	1
1.1. <i>Uncaria tomentosa</i>	2
1.2 Dor e nocicepção.....	10
2. Objetivos	23
2.1 Objetivo Geral	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
3. Materiais.....	24
3.1 Animais.....	24
3.2 Drogas e reagentes.....	24
3.3 Material botânico	26
4. Métodos.....	28
4.1 Avaliação da atividade antinociceptiva	28
4.1.1 Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético	28
4.1.2 Teste da nocicepção induzida por formalina.....	28
4.1.3 Teste da nocicepção induzida por capsaicina.....	29
4.1.4 Teste da nocicepção induzida por glutamato.....	30
4.1.5 Teste da retirada da cauda	30
4.1.6 Teste da placa quente.....	31
4.2 Avaliação do desempenho motor.....	31
4.2.1 Teste do <i>Rota rod</i>	31
4.2.2 Teste do campo aberto	32
4.3 Estudo do mecanismo de ação	33
4.3.1 Vias de transmissão nociceptiva	33
4.3.1.1 Participação do sistema L-arginina/óxido nítrico	33
4.3.1.2 Participação do sistema glutamatérgico e substância P a nível espinhal.....	34

4.3.1.3 Participação das citocinas pro-inflamatórias a nível espinhal	35
4.3.2 Vias descendentes inibitórias	35
4.3.2.1 Participação do sistema opióide	35
4.3.2.2 Participação do sistema colinérgico-muscarínico	36
4.3.2.3 Participação do sistema adrenérgico α_1	36
4.3.2.4 Participação do sistema adrenérgico α_2	36
4.3.2.5 Participação do sistema serotoninérgico 5-HT ₂	37
4.3.2.6 Participação dos estoques endógenos de aminas bioativas	37
4.4 Análise estatística	37
5. Resultados	39
5.1 Avaliação da atividade antinociceptiva	39
5.1.1 Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético	39
5.1.2 Teste da nocicepção induzida por formalina	40
5.1.3 Teste da nocicepção induzida por capsaicina	43
5.1.5 Teste da retirada da cauda	46
5.1.6 Teste da placa quente	47
5.2 Avaliação do desempenho motor	48
5.2.1 Teste do <i>Rota rod</i>	48
5.2.2 Teste do campo aberto	49
5.3 Estudo do mecanismo de ação	50
5.3.1.1 Participação do sistema L-arginina/óxido nítrico	50
5.3.1.2 Participação do sistema glutamatérgico e substância P a nível espinhal	50
5.3.1.3 Participação das citocinas pró-inflamatórias a nível espinhal	50
5.3.2.1 Participação do sistema opióide	53
5.3.2.2 Participação do sistema colinérgico-muscarínico	53
5.3.2.3 Participação do sistema adrenérgico α_1	56
5.3.2.4 Participação do sistema adrenérgico α_2	56
5.3.2.5 Participação do sistema serotoninérgico 5-HT ₂	59

5.3.2.6 Participação dos estoques endógenos de aminas bioativas	59
.....	
6. Discussão	62
6.1 Modelos animais de nocicepção	63
6.2 Investigação do mecanismo de ação	68
7. Conclusões	76
8. Referências Bibliográficas	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais alcalóides da <i>Uncaria tomentosa</i> (Willd.) DC.	6
Tabela 2: Comparação entre os valores de DI50, e seus respectivos limites de confiança 95%, resultantes do pré-tratamento (i.p.) com UT em quatro modelos diferentes de nocicepção química em camundongos.....	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Uncaria tomentosa</i> em seu habitat natural.....	2
Figura 2: Estrutura básica dos alcalóides oxindólicos tetracíclicos e pentacíclicos presentes na fração UT.	27
Figura 3: Eletroforetograma da fração UT.....	27
Figura 4: Efeito antinociceptivo de UT administrada via i.p. no teste das contorções abdominais induzidas por injeção i.p. de solução de ácido acético a 0,6 % em camundongos.....	39
Figura 5: Efeito antinociceptivo de UT administrada via i.p. na nocicepção induzida por injeção i.pl. de formalina 2,5 % em camundongos.....	41
Figura 6: Efeito antinociceptivo de UT administrada via p.o. na nocicepção induzida por injeção i.pl. de formalina 2,5 % em camundongos.....	42
Figura 7: Efeito antinociceptivo de UT administrada via i.p. na nocicepção induzida pela injeção i.pl. de capsaicina em camundongos.	43
Figura 8: Efeito antinociceptivo de UT administrada via i.p. na nocicepção induzida pela injeção i.pl. de glutamato em camundongos.	44
Figura 9: Efeito antinociceptivo de UT administrada via i.p. no teste da retirada da cauda em camundongos.....	46
Figura 10: Efeito antinociceptivo de UT administrada via i.p. no teste da placa quente em camundongos.	47
Figura 11: Efeito de UT no desempenho motor de camundongos avaliado no teste do Rota-Rod.	48

Figura 12: Efeito de UT na locomoção espontânea de camundongos avaliada no teste do campo aberto	49
Figura 13: Influência do pré-tratamento de camundongos com L-arginina no efeito antinociceptivo causado por UT no teste da formalina	51
Figura 14: Efeito do pré-tratamento de camundopngos com UT na nocicepção induzida por injeção intratecal de glutamato, NMDA, AMPA, cainato, trans-ACPD ou substância P.	52
Figura 15: Efeito do pré-tratamento de camundopngos com UT na nocicepção induzida por injeção intratecal das citocinas pro-inflamatórias IL-1 β ou TNF- α	52
Figura 16: Influência do pré-tratamento de camundongos com naltrexona, um antagonista dos receptores opióides, no efeito antinociceptivo causado por UT no teste da formalina	54
Figura 17: Influência do pré-tratamento de camundongos com atropina, um antagonista dos receptores colinérgicos muscarínicos, no efeito antinociceptivo causado por UT no teste da formalina.....	55
Figura 18: Influência do pré-tratamento de camundongos com prazosin, um antagonista dos receptores adrenérgicos α_1 , no efeito antinociceptivo causado por UT no teste da formalina.....	57
Figura 19: Influência do pré-tratamento de camundongos com ioimbina, um antagonista dos receptores adrenérgicos α_2 , no efeito antinociceptivo causado por UT no teste da formalina.....	58
Figura 20: Influência do pré-tratamento de camundongos com cetancerina, um antagonista dos receptores serotoninérgicos 5-HT $_2$, no efeito antinociceptivo causado por UT no teste da formalina.....	60
Figura 21: Influência do pré-tratamento de camundongos com reserpina no efeito antinociceptivo causado por UT no teste da formalina.	61

LISTA DE ABREVIATURAS

μm	Micrômetro
m/s	Metros por segundo
5-HT	5-hidroxitriptamina ou serotonina
AAE	Aminoácidos excitatórios
AC	Enzima adenilil ciclase
AMPA	Ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
ATP	Trifosfato de adenosina
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
DAG	Diacilglicerol
DI50	Dose inibitória 50 %
EROS	Espécies reativas de oxigênio
G	Gauge
GABA	Ácido γ-aminobutírico
GC	Guanilato ciclase
GDNF	Fator neurotrófico derivado de células gliais
GMPc	Guanosina-3'-5'-monofosfato cíclico
IB4	Isolectina B4
IL-1β	Interleucina-1β
IP3	1,4,5-trifosfato de inositol
i.p.	Via intraperitoneal
i.pl.	Via intraplantar
i.t.	Via intratecal
L-ARG	L-arginina
L-NOARG	L-nitroarginina
L-NAME	L-NG-nitro-arginina-metil-éster
min	Minutos
NA	Noradrenalina
NMDA	Ácido N-metil-d-aspártico
NO	Óxido nítrico
NOS	Sintase do óxido nítrico

PKC	Proteína-quinase C
PLC	Fosfolipase C
p.o.	Via oral
s	Segundos
s.c.	Via sub-cutânea
SNC	Sistema nervoso central
UT	Fração de alcalóides oxindólicos de <i>Uncaria tomentosa</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
TrKA	Receptores tirosina quinase A
TRPV	Receptor vanilóide de potencial transitório
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina

RESUMO

Uncaria tomentosa (Willd.) DC (Rubiaceae) é uma planta originária da Floresta Amazônica, comumente conhecida como “unha-de-gato”. O uso medicinal da planta por índios peruanos atraiu o interesse científico por suas propriedades curativas, e originou um crescente número de estudos acerca de suas atividades biológicas. Quimicamente, as substâncias de maior interesse presentes na planta são os alcalóides oxindólicos e indólicos. Uma fração padronizada de alcalóides oxindólicos de *U. tomentosa* (UT) foi utilizada neste estudo a fim de caracterizar a sua atividade antinociceptiva em modelos de nocicepção em camundongos. O tratamento dos animais com UT (3-300 mg/kg, i.p.) reduziu de maneira dose-dependente a nocicepção induzida por estímulos químicos como a injeção intraperitoneal de ácido acético e a injeção intraplantar de formalina, glutamato ou capsaicina. O tratamento com UT (300 mg/kg, i.p.) aumentou significativamente a latência de resposta dos animais a estímulos térmicos nocivos (placa quente e retirada da cauda), sugerindo um possível efeito dos alcalóides no sistema nervoso central. O tratamento com UT foi capaz ainda de inibir a nocicepção induzida pela injeção intratecal de glutamato, NMDA, substância P e pelas citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β . O efeito antinociceptivo de UT no teste da formalina foi atenuado pelo tratamento prévio com cetanserina, um antagonista dos receptores serotoninérgicos 5-HT₂, mas não pelos antagonistas dos receptores opióides (naltrexona), dos receptores muscarínicos (atropina), ou dos receptores adrenérgicos α_1 e α_2 (prazosin e ioimbina, respectivamente). De maneira semelhante, o pré-tratamento com L-arginina, substrato para a enzima sintase do óxido nítrico, também não afetou o efeito antinociceptivo de UT no teste da formalina. Estes dados sugerem que a atividade antinociceptiva de UT envolve uma ação no sistema serotoninérgico e glutamatérgico, e não nos demais sistemas investigados.

ABSTRACT

Uncaria tomentosa (Willd.) DC (Rubiaceae) is an indigenous plant of the Amazon rainforest, popularly known as cat's claw. The medicinal use of this plant by Peruvian indians has drawn scientific interest over its healing properties, and gave rise to an increasing number of studies about its biological activities. Chemically, the substances of greatest interest present in this plant are indole and oxindole alkaloids. This study characterizes the antinociceptive activity of a standardized fraction of oxindole alkaloids from *U. tomentosa* (UT) in mouse models of nociception. Pretreatment of animals with UT (3-300 mg/kg, i.p.) decreased, in a dose-dependent way, nociception elicited by chemical stimuli such as the intraperitoneal injection of acetic acid and the intraplantar injection of formalin, glutamate or capsaicin. Treatment with UT (300 mg/kg) significantly increased the latency of animals to respond to thermal noxious stimuli (hot plate and tail flick tests), probably revealing central effects of the alkaloids. Moreover, treatment with UT was able to inhibit nociceptive behavior caused by intratecal injection of glutamate, NMDA, substance P and the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β . The antinociceptive effect of UT (100 mg/kg, i.p.) in the formalin test was abolished by pretreatment with ketanserin, an antagonist of serotonergic 5-HT₂ receptors, but not by antagonists of the opioid receptors (naltrexone), muscarinic cholinergic receptors (atropine), or adrenergic α_1 and α_2 receptors (prazosin and yohimbine, respectively). In a similar way, pre-treatment with L-arginine, a substrate for the nitric oxide synthase enzyme, did not affect the antinociceptive activity of UT in the formalin test. These data suggest that the antinociceptive activity of UT involves an interaction with the serotonergic and the glutamatergic systems, but not with the other systems tested here.

1. Introdução

Plantas medicinais são aquelas que têm uma história de uso tradicional como agente terapêutico. Os fitoterápicos são medicamentos cujos componentes terapeuticamente ativos são exclusivamente plantas ou derivados vegetais, não podendo ter em sua composição a inclusão de substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem associações destas com extratos vegetais (OMS, 2000). O uso de medicamentos fitoterápicos com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico, passou a ser oficialmente reconhecido pela Organização Mundial da Saúde em 1978, que recomendou a difusão, em nível mundial, dos conhecimentos necessários para o seu uso (OMS, 1978).

As propriedades terapêuticas das plantas, bem como o seu uso, são conhecidas e registradas desde os primórdios da civilização. No entanto, somente o avanço da ciência possibilitou a comprovação de tais propriedades a fim de assegurar o devido reconhecimento de sua importância. Dentro da busca pela caracterização farmacológica da ação terapêutica das diversas espécies, está inserido o estudo da *Uncaria tomentosa*. O presente trabalho objetiva o estudo farmacológico de uma fração de alcalóides oxindólicos desta planta medicinal, visando verificar, em ensaios pré-clínicos, propriedades terapêuticas preconizadas popularmente. Estes estudos representam os primeiros passos, os quais são determinantes para estudos mais profundos, visando o desenvolvimento de novos medicamentos a partir de matérias-primas vegetais.

1.1. *Uncaria tomentosa*

Uncaria tomentosa (Willd.) DC pertencente à família *Rubiaceae*, subfamília *Cinchonoideae*. É uma planta arbustiva lenhosa natural das Américas Central e do Sul, comumente encontrada na floresta amazônica. Ela é conhecida popularmente como “unha-de-gato” devido aos aspectos morfológicos de suas folhas modificadas, ou espinhos (Figura 1). É descrito na literatura que índios da tribo peruana Ashanika faziam uso medicinal e religioso de decotos das cascas desta planta, como uma espécie de “remédio miraculoso”, e que, de acordo com a crença deste povo, facilitava aos sacerdotes a comunicação entre os planos físico e espiritual da natureza humana (KEPLINGER et al., 1999). Seu uso terapêutico é normalmente realizado a partir de extratos aquosos das cascas do caule e das raízes, e suas aplicações incluem o tratamento de artrite, reumatismo, abscessos, doenças inflamatórias, febre, alergia, asma, câncer, úlceras gástricas entre outros (LAUS et al., 1997).



Figura 1: *Uncaria tomentosa* em seu habitat natural, como um cipó que cresce sobre as copas das árvores. No detalhe os espinhos que deram origem ao nome popular da planta, Unha-de-gato.

Muitas atividades biológicas já foram descritas para numerosos extratos e frações de *U. tomentosa*, incluindo a atividade antiinflamatória que foi pesquisada *in vitro* e *in vivo*. Foi demonstrado que o extrato bruto de *U. tomentosa* é capaz de: reduzir ulcerações na mucosa gástrica induzidas por indometacina em ratos; produzir a degradação do radical peroxinitrito e reduzir a morte celular por ele induzida; impedir a ativação do fator transcripcional κ -B; impedir a expressão dos genes associados com a inflamação – especificamente impedindo a expressão da isoforma induzível da enzima óxido nítrico sintase (NOS) e, desse modo, atenuar a produção de óxido nítrico; e impedir a produção de TNF- α em células estimuladas com LPS (SANDOVAL-CHACÓN et al., 1998; SANDOVAL et al., 2000, 2002; MILLER et al., 2001; AGUILAR et al., 2002; AKESSON et al., 2003).

O extrato bruto de *U. tomentosa* demonstrou ainda ter efeito antiinflamatório em modelos animais como o edema de pata induzido por carragenina, em ratos e camundongos (AQUINO et al., 1991; AGUILAR et al., 2002). Um estudo clínico avaliou a eficácia de um extrato de *U. tomentosa* no tratamento da artrite reumatóide, mostrando que, após 24 semanas de tratamento, a ocorrência de dor articular reduziu significativamente no grupo tratado (MUR et al., 2002). Há evidências de que o efeito antiinflamatório observado *in vivo* seja decorrente da combinação de compostos presente no extrato, uma vez que um dos estudos mostra que nenhum dos compostos reproduziu o mesmo efeito quando testados isoladamente (AQUINO et al., 1991). Além disso, evidências indicam que o efeito antiinflamatório de *U. tomentosa* é independente do seu conteúdo de alcalóides oxindólicos, devido à pequena quantidade desses compostos nos extratos estudados (SANDOVAL et al., 2002).

A atividade imunoestimulante de extratos e, principalmente, dos alcalóides de *U. tomentosa* tem sido alvo de estudo. Foi demonstrado que o tratamento com os alcalóides oxindólicos pentacíclicos é capaz de aumentar a atividade fagocítica de macrófagos e granulócitos humanos e estimular células endoteliais humanas a liberarem fatores que estimulam a proliferação de linfócitos B e T (WURM, et al., 1998; KEPLINGER et al., 1999). Ainda, estes fatores imunoestimulantes, cuja liberação é estimulada pelos alcalóides oxindólicos, são capazes de inibir a produção de linfoblastos e células da

linhagem linfocítica, o que sugere que estes alcalóides possuem uma atividade imunomodulatória (LEMAIRE et al., 1999).

O uso de produtos fitoterápicos a base de *U. tomentosa* cresceu exponencialmente nas últimas décadas na Europa e Estados Unidos, especialmente com a finalidade de combater o câncer (DE JONG et al., 1999). Apesar da busca pela comprovação científica deste uso ter se desenvolvido consideravelmente, os resultados descritos na literatura ainda apresentam ambigüidades. A análise do potencial antimutagênico de diferentes extratos e frações das cascas de *U. tomentosa* revelou efeito protetor do DNA *in vitro* em cepas de *Salmonella tiphimurum*, possivelmente relacionado à capacidade antioxidante dos extratos (RIZZI et al., 1993). De maneira semelhante, estudos realizados com um extrato comercial de *U. tomentosa* (C-MED-100[®]), praticamente livre de alcalóides, demonstraram efeito reparador do DNA em ratos tratados, expostos à radiação intensa por 3 h (SHENG et al., 2000). A redução do dano e aumento do reparo ao DNA também foram observados nas células de voluntários humanos saudáveis e de um indivíduo submetido à quimioterapia tratados com o mesmo extrato (SHENG et al., 2001). Outro estudo com o mesmo extrato revelou potencial de indução da apoptose e inibição da proliferação em células tumorais em cultura (SHENG et al., 1998). Aparentemente, estes efeitos se devem à presença de ácido quínico neste extrato (SHENG et al., 2005). Recentemente, um estudo mostrou o efeito indutor de apoptose, através da ativação da caspase 3, para o extrato aquoso e fração n-butanólica das cascas de *U. tomentosa*, em diferentes linhagens de células tumorais humanas (DE MARTINO et al., 2006). Alcalóides oxindólicos de *U. tomentosa* testados isoladamente inibiram a proliferação de células linfoblásticas leucêmicas humanas, bem como induziram apoptose (BACHER et al., 2005).

Outros estudos mostram, porém, que o extrato aquoso de *U. tomentosa* possui efeito citoprotetor e antiapoptótico em células epiteliais das mucosas gástrica humana, e também em macrófagos murinos, submetidas ao insulto com agentes oxidantes (SANDOVAL et al., 2000; MILLER et al., 2001). Testes de citotoxicidade em células ovarianas de hamsters chineses e bactérias (*Photobacterium phosphoreum*) demonstraram ausência de toxicidade do extrato aquoso de *U. tomentosa*, nas concentrações utilizadas

(SANTA MARIA et al., 1997). Em outro estudo, os alcalóides uncarinas C, D e E, isolados das cascas da *U. tomentosa*, foram testados em quatro linhagens de células tumorais humanas, sendo que as uncarinas C e D demonstraram fraca toxicidade contra todas as células testadas (MUHAMMAD et al., 2001).

Diversos estudos demonstraram através de ensaios *in vitro* a atividade antioxidante de extratos e frações das cascas e raízes de *U. tomentosa*, que está relacionada à presença de compostos fenólicos, como taninos e taninos condensados (DESMARCHELIER et al., 1997; SANDOVAL et al., 2002; GONÇALVES et al., 2005; PILARSKI et al., 2006). Acredita-se que esta ação seja responsável por parte dos efeitos biológicos de *U. tomentosa*.

Existem relatos na literatura de que extratos de *U. tomentosa* e alguns compostos isolados, como glicosídeos do ácido quinóico, possuem atividade antiviral. Um estudo demonstrou que o éster de (28)- β -D-glucopiranosil- β -D-glucopiranosil é eficaz na prevenção da infecção de células HeLa pelo rinovírus tipo 1B (CERRI et al., 1988; AQUINO et al., 1989).

Apesar das diversas atividades biológicas de *U. tomentosa* já pesquisadas, pouco se estudou a cerca de seus efeitos sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). Existem, porém, alguns trabalhos relacionados aos efeitos dos alcalóides oxindólicos e indólicos presentes em *U. tomentosa* e em outras espécies do gênero, que são de particular interesse para o presente estudo.

Dentre as espécies do gênero *Uncaria*, a *U. tomentosa* é aquela em que se identificou o maior número de compostos (aproximadamente 50 compostos) (revisado por HEITZMAN et al., 2005). Dos compostos oriundos do metabolismo secundário vegetal, a classe mais proeminente encontrada neste gênero é a de alcalóides, que são comumente classificados de acordo com a sua estrutura básica. A família de alcalóides indólicos é a mais numerosa classe de alcalóides vegetais conhecida, da qual os alcalóides oxindólicos representam um dos maiores subgrupos (MARTIN e MORTIMORE, 1990). A *U. tomentosa* possui uma diversidade de alcalóides indólicos e oxindólicos (Tabela 1), sendo que alguns são conhecidos desde a década de 70 (PHILLIPSON et al., 1978; STUPPNER et al., 1992a, 1992b; LAUS e KEPLINGER, 1994; GINKEL, 1996; MUHAMMAD et al., 2001). Além dos alcalóides, as análises fitoquímicas da planta revelaram a presença de

triterpenos pentacíclicos derivados do ácido ursólico, glicosídeos de ácido quinóico, flavonóides, proantocianidinas, esteróides (β -sitosterol, sigmasterol e campesterol) e alguns componentes minoritários (CERRI et al., 1988; AQUINO et al., 1989, 1991, 1997; MUHAMMAD et al., 2001).

Tabela 1: Principais alcalóides da *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC.

	Alcalóides pentacíclicos	Alcalóides tetracíclicos
Alcalóides oxindólicos	Pteropodina Isopteropodina Speciofilina Uncarina F Mitrafilina Isomitrafilina	Rincofilina Isorincofilina Corinoxeína Isocorinoxeína
Alcalóides indólicos	Akuamigina Tetraidroalstonina Isoajmalicina	Hirsutina Diidrocorinanteína Hirsuteína Corinanteína

Fonte: KEPLINGER et al., 1999.

KANG et al. (2002b) reportaram que pteropodina e isopteropodina, os alcalóides oxindólicos pentacíclicos majoritários encontrados nesta espécie, possuem ação modulatória sobre correntes mediadas por serotonina (5-HT) e ACh em receptores serotoninérgicos 5-HT₂ e muscarínicos M1, respectivamente, expressos em ovócitos de rã. De acordo com as evidências eletrofisiológicas apresentadas pelos autores, estes alcalóides possivelmente atuam como agonistas dos receptores 5-HT₂ e M1, e não afetam a função dos receptores glutamatérgicos NMDA, cainato ou receptores glutamatérgicos metabotrópicos.

Alguns dos alcalóides de *U. tomentosa* são também comuns a outras espécies do mesmo gênero, de forma que existem diversos trabalhos relatando atividades biológicas atribuídas a extratos, frações e aos alcalóides isolados destas espécies. Entre as mais importantes encontra-se o estudo da atividade neuroprotetora de espécies do gênero *Uncaria*, utilizadas pela medicina tradicional chinesa e japonesa. Foi demonstrado que o extrato de *U. rhynchophylla* é capaz de bloquear correntes provocadas por NMDA em

experimentos eletrofisiológicos, bem como reduzir a morte neuronal induzida por NMDA (SUN et al., 2003). O mesmo se observou para uma fração de alcalóides de *U. rhynchophylla*, que foi capaz de prevenir a morte neuronal induzida por NMDA e também inibiu o aumento da expressão de genes relacionados à apoptose, como *c-jun*, *p53* e *bax*, também induzido por NMDA (LEE et al., 2003a).

Rincofilina e isorincofilina, os alcalóides oxindólicos tetracíclicos majoritários encontrados nas espécies de *Uncaria*, têm sido amplamente estudados (para revisão ver SHI et al., 2003). Estes compostos possuem ação protetora contra o dano isquêmico a neurônios hipocâmpais em cultura e, juntamente com isocorinoxéina, hirsutina e hirsuteína, reduzem a morte celular induzida por glutamato em neurônios cerebelares em cultura (SHIMADA et al., 1999; KANG et al., 2002a). Evidências obtidas através de experimentos eletrofisiológicos revelaram que tanto rincofilina como isorincofilina possuem ação antagonista sobre receptores muscarínicos M1 e serotoninérgicos 5-HT₂ expressos em ovócitos de rã, bem como reduzem reversivelmente as correntes mediadas por NMDA e glicina em receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, também expressos em ovócitos de rã (KANG et al., 2002, 2004; WATANABE et al., 2003; MATSUMOTO et al., 2005). Esta ação sobre receptores glutamatérgicos NMDA não está aparentemente relacionada com uma interação com os sítios modulatórios das poliaminas, Zn²⁺, prótons ou redox (KANG et al., 2002).

Além dos experimentos *in vitro*, foram relatadas evidências da ação dos alcalóides e extratos de espécies de *Uncaria* no sistema serotoninérgico. Foi observado que a isorincofilina e, em menor grau, a rincofilina, a corinoxéina e a isocorinoxéina, revertem os efeitos comportamentais induzidos por agonistas dos receptores 5-HT_{2A}, em camundongos (MATSUMOTO et al., 2005). Ainda, observou-se que o tratamento agudo e crônico com o extrato aquoso de *U. rhynchophylla* produz efeitos do tipo ansiolítico no labirinto em cruz elevado, em ratos. Este tratamento, entretanto, não causou nenhuma alteração aparente na locomoção espontânea dos animais. O efeito ansiolítico observado foi bloqueado pela administração concomitante de um antagonista dos receptores 5-HT_{1A}, revelando que este é o provável mecanismo de ação das substâncias presentes no extrato (JUNG et al., 2006).

A preparação de ervas da medicina tradicional japonesa *Choto-san*, que inclui espécies do gênero *Uncaria*, e os alcalóides oxindólicos rincofilina e isorincofilina preveniram o prejuízo induzido pelo dano isquêmico da memória espacial e do aprendizado no labirinto aquático, em camundongos (WATANABE et al., 2003). Utilizando um modelo de oclusão parcial das artérias carótidas, MURAKAMI et al. (2005) demonstraram que *Choto-san* também possui efeito em melhorar o déficit na memória espacial e aprendizado causado pela hipoperfusão cerebral crônica, e que este efeito é devido à presença de espécies de *Uncaria* na preparação. Foi também sugerido pelos autores que este efeito é parcialmente mediado pela estimulação de receptores muscarínicos M1.

A atividade locomotora espontânea de camundongos foi significativamente diminuída após a administração oral dos extratos aquosos de *U. rhynchophylla*, *U. sinensis* e *U. macrophylla* e de seus constituintes químicos, os alcalóides indólicos e oxindólicos corinoxéina, corinoxéina B, isorincofilina e geissoschizina-metil-éster. Os autores sugerem que este efeito depressor pode ser decorrente da interação com o sistema dopaminérgico (SAKAKIBARA, et al., 1998, 1999).

Um dos usos populares mais comuns das espécies asiáticas de *Uncaria* é como anti-hipertensivo, através de preparações da medicina tradicional chinesa como o *Gou-teng* (ZHU et al., 1997). Vários estudos descrevem um grande número de alcalóides encontrados em espécies do gênero *Uncaria* como substâncias anti-hipertensivas (CHANG et al., 1989; MASUMIYA et al., 1999; YZURIHARA et al., 2002).

Tanto o extrato aquoso de *U. callophylla* como o seu constituinte isolado diidrocorinateína, reduziram a pressão arterial de ratos normotensos, conscientes ou anestesiados (CHANG et al., 1989). Hirsutina e diidrocorinanteína, dois alcalóides indólicos, possuem efeitos diretos sobre o potencial de ação do músculo cardíaco, através da inibição de múltiplos canais iônicos, o que pode explicar o efeito cronotrópico negativo e a atividade antiarrítmica de ambos os compostos (MASUMIYA et al., 1999). A hirsutina possui também efeito vasorelaxante em anéis isolados de aorta torácica de rato, através do bloqueio de canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes (YANO, et al., 1991; HORIE et al., 1992). O mesmo efeito também foi observado para

outro alcalóide indólico isolado das espécies de *Uncaria*, a geissoschizina-metil-éster, que aparentemente atua através do bloqueio de canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes e de algum mecanismo dependente do endotélio e da geração de óxido nítrico (NO) (YZURIHARA et al., 2002).

Apesar das diversas atividades biológicas já investigadas e descritas para extratos, frações e substâncias isoladas de espécies do gênero *Uncaria*, o estudo da sua atividade antinociceptiva ainda não havia sido descrito até a publicação de parte dos resultados do presente trabalho (JÜRGENSEN et al., 2005). Plantas medicinais contendo alcalóides têm sido utilizadas na medicina tradicional desde épocas remotas. O ópio, por exemplo, extraído do bulbo da papoula (*Papaver somniferum*) tem sido utilizado como remédio para o alívio da dor ao longo de toda a história da humanidade (BISSET et al., 1994; NORN et al., 2005). A morfina, um de seus componentes ativos, foi isolada em 1803 por Friedrich Wilhelm Serturmer (1783 - 1841), dando origem ao estudo de alcalóides como medicamentos (KLOCKGETHER-RADKE, 2002). Outros alcalóides com propriedades analgésicas também têm sido estudados. Como exemplo, a mitraginina, um alcalóide indólico isolado da espécie medicinal tailandesa *Mitragyna speciosa*, teve seu potencial antinociceptivo descrito por MATSUMOTO et al. (1996, 2004), assim como existem outros alcalóides cuja atividade antinociceptiva foi reportada (ELISABETSKY et al., 1995; AMERI, 1998; KÜPELI et al., 2002; VEROTTA et al., 2002).

1.2 Dor e nocicepção

O termo “dor” refere-se à experiência desagradável associada com a lesão tecidual real ou potencial causada por um estímulo nocivo. Como uma experiência, a dor inclui não somente a percepção sensorial de um estímulo, mas também a análise cognitiva e a resposta emocional a eles associadas. Quantificar essa experiência como um todo em animais de laboratório é virtualmente impossível. Por esta razão, costuma-se adotar o termo nocicepção, que se refere aos aspectos menos complexos da dor, e descreve somente as respostas neurais, fisiológicas e comportamentais a estímulos que humanos tipicamente considerariam como dolorosos (WATKINS e MAIER, 2003).

A dor pode ser classificada de acordo com a sua duração, podendo ser designada como dor transitória ou passageira, dor aguda e dor crônica. A dor transitória é evocada pela ativação dos nociceptores na pele ou em outros tecidos do corpo, na ausência de qualquer dano tecidual. Por outro lado, a dor aguda é desencadeada após uma lesão substancial de algum tecido, com ativação dos nociceptores mesmo após a retirada do estímulo nocivo original (LOESER e MELZACK, 1999). A lesão altera a resposta característica dos nociceptores, que se tornam sensibilizados, e respondem mais facilmente a estímulos. Este tipo de dor pode ser visto após um trauma, intervenções cirúrgicas e algumas doenças. Geralmente a dor aguda persiste por apenas alguns dias ou poucas semanas. As dores que persistem durante ou após a recuperação dos tecidos não são mais consideradas de caráter agudo, mas sim crônico. A dor crônica não é caracterizada somente pelo tempo em que ela se apresenta, mas sim pela incapacidade do organismo em restabelecer suas funções fisiológicas (LOESER e MELZACK, 1999).

O aparato sensorial especializado para a percepção da dor é bastante complexo e envolve estruturas que estão presentes desde a pele e órgãos até regiões especializadas do SNC.

A sensação dolorosa tem início com a ativação de neurônios sensoriais primários, denominados de nociceptores, que conduzem informações sensitivas nociceptivas ou não nociceptivas da pele, órgãos e tecidos internos para medula espinhal. Os corpos celulares desses neurônios

estão localizados nos gânglios da raiz dorsal, que são gânglios paravertebrais situados aos pares ao longo da medula espinhal. Os neurônios do gânglio da raiz dorsal emitem projeções axonais em duas direções, à periferia e ao corno dorsal da medula espinhal. Essas projeções, por sua vez, encontram-se organizadas em fibras, as fibras aferentes primárias, que são classificadas dentro de três grupos de acordo com o diâmetro e estrutura da fibra e com a velocidade de condução do impulso: 1) fibras do tipo C que são delgadas (0,4 a 1,2 μm de diâmetro), não-mielinizadas e de baixa velocidade de condução (0,5 a 2 m/s); 2) fibras $A\delta$ que são de médio diâmetro (2 a 6 μm), pouco mielinizadas e possuem velocidade de condução intermediária (12 a 30 m/s); e 3) fibras do tipo $A\beta$ que são de grande diâmetro (mais de 10 μm), mielinizadas e de rápida condução (30 a 100 m/s) (ALMEIDA et al., 2004).

As fibras $A\delta$ e C estão envolvidas, exclusivamente, com a transmissão da informação nociceptiva. As primeiras promovem uma resposta mais rápida que resulta na dor aguda ou de primeira fase que freqüentemente desencadeia um reflexo de retirada, enquanto as segundas são responsáveis por uma dor mais difusa, geralmente, secundária à dor aguda (JULIUS e BASBAUM, 2001). Entretanto, em órgãos internos esta diferenciação não é evidente, a dor caracteriza-se por ser pouco localizada, ou seja, ela se apresenta de maneira difusa (CERVERO, 1995). As fibras do tipo $A\beta$, na ausência de um dano tecidual ou do nervo, respondem somente ao toque, vibração e pressão, além de outros estímulos sensoriais não nociceptivos, como o mecânico de baixa intensidade, enquanto que em uma situação patológica promovem alodínia mecânica (MILLAN, 1999).

Existem dois tipos de nociceptores $A\delta$, e ambos respondem ao estímulo mecânico intenso, mas podem ser distinguidos por sua responsividade diferente ao estímulo térmico ou como são afetados pela lesão tecidual. O tipo I tem condutância rápida e responde fracamente a estímulos térmicos de baixa e alta intensidade e a estímulos químicos. Porém, quando ocorre sensibilização, estas fibras passam a responder a estímulos térmicos de alta intensidade, com respostas sustentadas, de longa duração e latência demorada. Já o tipo II, que é menos comum e de condutância mais lenta, tem um limiar menor para estímulos térmicos que o tipo I, e ainda, responde de

forma mais rápida a estímulos térmicos para altas temperaturas (45 - 53°C) e alguns para frio intenso (- 15°C) (MILLAN, 1999; ALMEIDA et al., 2004).

Dentre as fibras C, destacam-se aquelas que respondem a todos os estímulos nocivos (mecânico, térmico e químico), sendo denominadas de polimodais. As fibras C são agrupadas em, pelo menos, duas populações. Um grupo produz substância P e peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGRP) e expressa receptores de tirosina quinase A (TrKA), que apresentam alta afinidade ao fator de crescimento do nervo (NGF). A outra população expressa receptores purinérgicos P2X3 e para o fator neurotrófico derivado de células gliais (GDNF), além de sítio de ligação para isolectina B₄ (IB₄). Ambas as populações de fibras C respondem a estímulos nocivos semelhantes e expressam o receptor vanilóide TRPV1, sensível à ativação por capsaicina, prótons (H⁺) e calor (BESSION, 1999; JULIUS e BASBAUM, 2001; HUNT e MANTYH, 2001).

Em condições fisiológicas normais, os sinais nociceptivos são gerados apenas por estímulos intensos, sejam eles químicos, mecânicos ou térmicos, que conseqüentemente causam um aumento nas descargas das fibras aferentes primárias. Estes estímulos resultam ainda na liberação local de diversos mediadores químicos, que medeiam, facilitam ou ainda atenuam a transmissão da informação ao SNC. Após a lesão tecidual, esses mediadores podem ser liberados pelos neurônios sensoriais e simpáticos e por células não neuronais como plaquetas, sangüíneas, endoteliais, mastócitos, fibroblastos, células de Schwann, e ainda, num quadro crônico, células inflamatórias (BESSION, 1999). Neurotransmissores e neuromoduladores como a substância P, trifosfato de adenosina (ATP), óxido nítrico (NO), prostaglandinas (PGs), neuropeptídeo Y, colecistocinina, neurotrofinas (fatores de crescimento neural), peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), opióides, adenosina, somatostatina, ACh, H⁺, bradicinina (BK), histamina, 5-HT, noradrenalina (NA), aminoácidos excitatórios (AAEs; glutamato e aspartato) podem ser liberados de diversas fontes após um estímulo capaz de gerar lesão tecidual (BESSION, 1999; MILLAN, 1999; RAJA et al., 1999).

Estes mediadores sensibilizam os nociceptores funcionais ou ativam aqueles que estão latentes, também chamados de nociceptores silenciosos, provocando um aumento no padrão basal das descargas e uma redução dos

limiares de ativação. Também ocorrem mudanças no SNC, particularmente medula espinhal, onde os reflexos e atividade neuronal das células estão aumentados (BESSION, 1999).

A ativação dos nociceptores pelos diversos tipos de estímulos nociceptivos faz com que a informação sensorial seja levada, através das fibras aferentes primárias, ao SNC para que este a processe e responda adequadamente em cada situação. Inicialmente, os impulsos nociceptivos são recebidos pela medula espinhal, mais precisamente pelo seu corno dorsal, que é a área primária de recebimento da maioria das informações somatosensoriais (COGGESHALL e CARLTON, 1997). O corno dorsal da medula espinhal é uma estrutura dividida em lâminas, com base na sua citoarquitetura, sendo que cada lâmina se caracteriza por receber tipos diferentes de informações.

Nociceptores aferentes primários (A δ e C) têm suas terminações nervosas localizadas principalmente nas lâminas superficiais, mas também em lâminas mais profundas do corno dorsal da medula. As camadas mais superficiais incluem a zona marginal, ou lâmina I e a substância gelatinosa, ou lâmina II e III, enquanto que as profundas envolvem as lâminas V e VI, além da lâmina X. As fibras A β , que são responsáveis pela transmissão de estímulos inócuos, terminam nas lâminas III e VI (CRAIG, 2003).

No corno dorsal, o estímulo nociceptivo resulta na liberação de neurotransmissores que estimulam diretamente os neurônios de projeção ou por intermediação de interneurônios excitatórios. Além disso, as fibras aferentes primárias também podem ser moduladas por interneurônios inibitórios que irão interagir com os neurônios de projeção, Interneurônios excitatórios ou nos próprios terminais das fibras aferentes primárias, desempenhando um papel muito importante no controle da transmissão nociceptiva (MILLAN, 2002).

A liberação de glutamato resultante da ativação das fibras aferentes primárias é o evento mais importante da excitação neuronal no corno dorsal da medula espinhal. Os receptores glutamatérgicos são divididos em duas famílias diferentes, os receptores ionotrópicos e os receptores metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos são canais iônicos permeáveis a cátions, subdivididos em três tipos que recebem os nomes de seus respectivos agonistas seletivos: ácido N-metil-d-aspartico (NMDA), ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-

isoxazolpropiónico (AMPA) e ácido caínico, ou cainato. Os receptores AMPA e cainato conduzem principalmente os íons Na^+ e K^+ , e os receptores NMDA são permeáveis principalmente ao Ca^{2+} , com menor condutância ao Na^+ . A ativação de receptores AMPA resulta em uma despolarização e dessensibilização rápida, enquanto que a ativação dos receptores cainato produz uma resposta de longa duração e que não sofre dessensibilização (DINGLELINE et al., 1999). O NMDA é o receptor ionotrópico mais finamente regulado, sua ativação depende de cinco fatores diferentes, que consistem de dois sítios de reconhecimento de agonistas diferentes (glutamato e glicina), um sítio regulatório de poliaminas, que promove a ativação, e dois sítios separados de reconhecimento para os íons zinco (Zn^{2+}) e magnésio (Mg^{2+}), que inibem o fluxo iônico. A glicina é um co-agonista necessário para a ativação do receptor NMDA e o Mg^{2+} exerce uma espécie de bloqueio do canal, que é removido após uma despolarização prévia da membrana plasmática. Do mesmo modo que a glicina, concentrações de Mg^{2+} bem menores do que as encontradas no líquido extracelular são suficientes para bloquear as respostas induzidas pelo receptor NMDA (DANYSZ e PARSONS, 1998). Os receptores glutamatérgicos metabotrópicos são funcionalmente acoplados a proteínas-G, e a clonagem molecular já revelou a existência de oito membros desta família, chamados de receptores glutamatérgicos metabotrópicos mGluR1-8. Estes têm sido classificados em três subgrupos, baseados nas semelhanças seqüenciais, mecanismos de transdução de sinal e aspectos farmacológicos (CONN e PIN, 1997).

A substância P é um neurotransmissor da classe das taquicinas, de estrutura peptídica, sintetizada pelos neurônios do DRG e liberada a partir dos terminais centrais e periféricos das fibras-C. Ela é o ligante preferencial endógeno para os os receptores para neurocininas NK1. A ativação destes receptores presentes na membrana dos neurônios de projeção é responsável pela geração de potenciais lentos, que somados contribuem para a permanência da ativação de vias nociceptivas. Desta forma, pode-se dizer que a substância P participa como coadjuvante na transmissão nociceptiva, ao lado dos AAEs. Assim como o glutamato, a substância P exerce não somente ações pós-sinápticas nos neurônios do corno dorsal, mas também ações pré-sinápticas, que determinam uma retro-alimentação positiva da sua própria

liberação a partir dos aferentes primários. Além disso, a substância P e o receptor para neurocininas NK1 estão implicados na manutenção da transmissão nociceptiva, através da formação do fenômeno de recrutamento progressivo de neurônios de projeção, que ocorre em condições de dor persistente (HERRERO, 2000). Diversos estudos demonstram que a liberação de substância P no corno dorsal está sujeita a modulação pela ação do glutamato em seus receptores NMDA pré-sinápticos, cuja ativação pode facilitar a liberação de substância P a partir dos aferentes primários e aumentar os efeitos pós-sinápticos do glutamato na transmissão nociceptiva (LIU et al., 1994, 1997; AFRAH et al., 2001).

O NO é outro importante neurotransmissor que participa da transmissão nociceptiva a nível espinhal. Ele pode ser liberado após a estimulação direta de fibras aferentes primárias de pequeno diâmetro, contribuindo para sua excitabilidade após o estímulo nociceptivo, além de sensibilizar nociceptores. O aumento da concentração de cálcio intracelular causada pela ativação do receptor NMDA estimula a síntese de NO pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) (RIVOT et al. 1999). Depois de sintetizado, o NO ativa a enzima guanilato ciclase (GC), tida como seu receptor fisiológico, que por sua vez converte a guanosina-5'-trifosfato em guanosina-3'-5'-monofosfato cíclico (GMPc). O GMPc, como segundo mensageiro, pode ativar proteínas quinases, canais iônicos e fosfodiesterases. Por ser uma molécula gasosa pequena, muito reativa e que passa através de membranas celulares facilmente, o NO é considerado um “transmissor retrógrado”, isto é, a ativação de algum receptor (NMDA, por exemplo) no neurônio pós-sináptico induz a produção de NO, que pode difundir-se rapidamente até o neurônio pré-sináptico, para modular sua atividade (MOORE et al., 1991; MELLER e GEBHART, 1993).

A população de células do corno dorsal inclui, além de neurônios, as chamadas células da glia, compostas de tipos celulares como os astrócitos, a microglia e os oligodendrócitos. Estas células interagem constantemente com os neurônios, fornecendo sustentação, nutrientes e desempenhando papéis regulatórios essenciais à função sináptica. A ativação persistente das vias nociceptivas pela lesão tecidual periférica, através da contínua liberação de mediadores como glutamato e substância P na fenda sináptica, gera a ativação

de receptores NMDA, que se encontram bloqueados pelo íon Mg^{2+} em condições basais, e a conseqüente produção de NO. Esse panorama de ativação da função sináptica resulta na ação de todos esses neurotransmissores sobre seus respectivos alvos presentes nas células gliais, especialmente microglia e astrócitos. Estas células passam, então, de seu estado quiescente para o estado ativado e começam a produzir e liberar no microambiente ao seu redor outros mediadores, a maioria de natureza inflamatória, como citocinas, prostanoídes, espécies reativas de oxigênio (EROS) e NO. Estes mediadores interagem com os neurônios de maneira a promover a sensibilização dos mesmos, aumentando assim a excitabilidade neuronal. (WATKINS e MAIER, 2003; WHITE et al., 2005). As citocinas pró-inflamatórias, como Interleucina- 1β (IL- 1β) e Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), são rapidamente produzidas nessa cascata neuroinflamatória e exercem efeitos diretos nas células da glia e nos neurônios através de receptores de membrana específicos (CUNHA et al., 1992; SAFIEH-GARABEDIAN et al., 1995). Estes receptores estão normalmente presentes nos aferentes primários e neurônios de projeção, que são tanto ativados quanto sensibilizados por estas citocinas. Por esse motivo, a administração dessas citocinas a animais ou humanos é capaz de produzir dor e hiperalgesia (TADANO et al., 1999; SOMMER e KRESS, 2004).

A partir da medula espinhal a informação nociceptiva é retransmitida rostralmente para estruturas talâmicas, límbicas e corticais, responsáveis pelas respostas afetiva e sensorial-discriminativa da dor (SCHAIBLE e RICHTER, 2004). Neurônios do corno dorsal se projetam para o tálamo através de distintas vias como as clássicas (trato espinotalâmico, os diferentes componentes do trato espinoreticular), o trato espinocervicotalâmico, as fibras pós-sinápticas da coluna dorsal e o trato nociceptivo visceral que se dirige à coluna posterior (BESSON, 1999). A partir de diferentes núcleos do tálamo, os sinais são transmitidos para diversas áreas do córtex sensorial somático, substância cinzenta periaquedutal, hipotálamo, amígdala e cerebelo, onde a informação do contexto presente é integrada com experiências do passado e processada para produzir a percepção da dor e/ou provocar a resposta que é enviada à medula espinhal (CRAIG e DOSTROVSKY, 1999).

A transmissão do sinal nociceptivo está sujeita à modulação por uma variedade de mediadores, que podem atuar de forma facilitatória ou inibitória, dos nociceptores às estruturas cerebrais superiores, responsáveis pela percepção da dor (FÜRST, 1999; MILLAN, 2002).

A teoria de “controle de portão”, descrita inicialmente por R. Melzack, prestou grandes contribuições para o entendimento dos mecanismos centrais da dor. Ela demonstrou que o cérebro age como um sistema ativo, que filtra, seleciona e modula as informações que recebe do ambiente (MELZACK, 1999). Na medula, as informações nociceptivas vindas das vísceras, pele e outros órgãos, estão sujeitas à ação de uma grande variedade de transmissores que irão filtrar e modular a transmissão da informação nociceptiva para o cérebro (BESSON, 1999; FÜRST, 1999; MILLAN, 2002). Estas substâncias moduladoras da resposta nociceptiva poderão, por vezes, atuar como pró- (controle descendente facilitatório) ou antinociceptivas (controle descendente inibitório), dependendo de diversos fatores, tais como o tipo e intensidade do estímulo, região central ativada pelo estímulo, tipo de receptor ativado, entre outros. Por esse motivo, a distinção entre transmissor inibitório ou facilitatório se torna bastante difícil, exigindo estudos específicos para determinada área do SNC, ou para determinado receptor do neurotransmissor em questão. As regiões cerebrais de maior importância nesse processo são: hipotálamo, núcleo parabraquial, núcleo do trato solitário, medula rostroventromedial, o núcleo dorsoreticular da medula, substância cinzenta periaquedutal, e córtex cerebral (MILLAN, 2002). Os neurônios projetados destas áreas (vias descendentes inibitórias ou vias descendentes facilitatórias) contêm os transmissores responsáveis pelo controle descendente da dor e entre eles estão a NA, 5-HT, ACh, ácido γ -aminobutírico (GABA), dopamina, encefalina, dinorfina, endomorfina, adenosina.

Neste contexto, é importante salientar que as vias descendentes inibitórias adrenérgicas e serotoninérgicas são as mais amplamente estudadas, sendo, portanto, NA e 5-HT considerados os principais neurotransmissores inibitórios (FÜRST, 1999; MILLAN, 2002). Os receptores adrenérgicos mais expressivos nas vias descendentes inibitórias são os α_2 (principalmente α_{2A}). Estes receptores estão acoplados à proteína $G_{i/o}$ e provocam a inibição da adenilil ciclase (AC), aumentam as correntes de potássio (K^+) e suprimem as

correntes de cálcio (Ca^{2+}). Estes mecanismos são os responsáveis pela atividade antinociceptiva destes receptores. No corno dorsal, a ativação destes receptores provoca uma redução moderada da estimulação dos neurônios de projeção pelas fibras aferentes primárias, e também uma redução na liberação de transmissores pró-nociceptivos, como a substância P e o glutamato, a partir dos terminais centrais destas (MILLAN, 1997). Os receptores α_2 -adrenérgicos também podem desempenhar a atividade antinociceptiva por permitir interações com outros transmissores como a galanina, GABA e encefalinas, uma vez que as vias descendentes inibitórias adrenérgicas estão co-localizadas com estes transmissores (FÜRST, 1999; MILLAN, 1999). Os receptores α_1 -adrenérgicos também apresentam um papel importante na modulação da nocicepção. Eles são acoplados positivamente a proteína G_q e ativam canais de Ca^{+2} e a fosfolipase C (PLC), mobilizando Ca^{+2} intracelular e, portanto, exercem ação fundamentalmente excitatória sobre a atividade neuronal. Enquanto alguns trabalhos demonstram que os receptores α_1 favorecem a nocicepção, outros apontam efeitos antinociceptivos de seus agonistas. Sabe-se que desempenham papel facilitatório quando localizados nos neurônios de projeção ou nas fibras aferentes primárias, mas também apresentam um papel importante na antinocicepção espinhal provocada pela NA, quando localizados em interneurônios inibitórios (HOWE et al., 1983).

A ativação de fibras descendentes serotoninérgicas correlaciona-se com a concomitante ação da 5-HT de forma pró-nociceptiva (vias descendentes facilitatórias) e antinociceptiva (vias descendentes inibitórias) no corno dorsal da medula (SAWYNOK e REID, 1996; MILLAN, 1999). Dependendo do tipo de receptor, o resultado final de sua ativação pode ser a supressão ou facilitação da nocicepção. Ainda, um mesmo tipo ou subtipo de receptor serotoninérgico pode ter ações diversas conforme a sua localização. A abundante literatura acerca deste assunto mostra que a 5-HT pode ter efeito pró- ou antinociceptivo, conforme o sítio onde ela é aplicada, o modelo experimental escolhido e a dose utilizada (revisado por MILLAN, 2002).

Existem evidências de que a 5-HT aumenta a ação das vias descendentes inibitórias adrenérgicas, revelando um sinergismo das atividades das duas vias descendentes inibitórias na produção da analgesia (FÜRST, 1999). Além disso, é classicamente conhecido que as projeções descendentes

serotoninérgicas exercem um efeito inibitório marcante sobre a transmissão nociceptiva (BASBAUM e FIELDS, 1984; ALHAIDER, 1991a, 1991b). As vias descendentes inibitórias serotoninérgicas modulam a transmissão nociceptiva tanto por atuarem diretamente sobre os neurônios de projeção, como através de interneurônios (ALHAIDER et al., 1991b).

Os receptores para a 5-HT são classificados nos seguintes tipos e subtipos: 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E}, 5-HT_{1F}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT_{5A}, 5-HT₆ e 5-HT₇ (IUPHAR, 2006). Os diferentes mecanismos de transdução de sinal de cada tipo de receptor serotoninérgico permitem a observação de efeitos distintos da 5-HT sobre a atividade neuronal. No que se refere à participação dos receptores serotoninérgicos no controle da nocicepção, pode-se dizer que os tipos mais bem estudados são 5-HT₁, 5-HT₂ e 5-HT₃. Os receptores 5-HT_{1A}, por exemplo, quando localizados nos neurônios de projeção, exercem efeito inibitório sobre a atividade neuronal, devido ao seu acoplamento negativo à AC e indução da abertura de canais de K⁺ (BOESS e MARTIN, 1994). Portanto, esses receptores têm papel importante na analgesia induzida por ativação das vias descendentes inibitórias serotoninérgicas a nível espinhal (BARDIN et al., 2000; BARDIN et al., 2001; COLPAERT et al., 2002). Os receptores 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1F} compartilham o mesmo mecanismo de transdução de sinal do receptor 5-HT_{1A}, possuindo influências igualmente inibitórias sobre a atividade neuronal. Estes três receptores estão intimamente relacionados quanto à localização, sendo que, em relação à atividade antinociceptiva, os receptores 5-HT_{1B} possuem atividade mais expressiva do que os outros dois (MILLAN, 2002).

Os receptores 5-HT₂ exercem uma influência excitatória sobre atividade neuronal, devido ao acoplamento positivo à PLC e atividade inibitória sobre correntes de K⁺ (BOESS e MARTIN, 1994). Periféricamente eles apresentam atividades pró-nociceptivas, entretanto, o posicionamento de receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} em interneurônios inibitórios transforma a sua ação pronociceptiva em um papel antinociceptivo (BARDIN et al., 2000; OBATA et al., 2001; SASAKI et al., 2001). Isto se deve ao fato de que a atividade das fibras aferentes primárias é modulada pela ação de interneurônios inibitórios, encefalinérgicos ou GABA/glicinérgicos, que recebem inervação serotoninérgica descendente (ALHAIDER et al., 1991).

O receptor 5-HT₃ distingue-se drasticamente das outras classes de receptores serotoninérgicos por ser um canal catiônico pentamérico operado por ligante. Sua ativação aumenta a atividade da PLC, reforçando sua influência facilitatória sobre a excitabilidade neuronal (MILLAN, 2002). Sua principal localização no corno dorsal é nas lâminas superficiais, e acredita-se que ele esteja também atuando nos interneurônios inibitórios, um vez que seus agonistas seletivos são capazes de induzir antinocicepção a nível espinhal (SAZAKI et al., 2001).

O sistema dopaminérgico também possui papel importante no controle endógeno da nocicepção, sendo que as vias dopaminérgicas mesolímbica-mesocortical e nigroestriatal estão envolvidas na inibição da nocicepção em nível supra-espinhal. Elas são responsáveis pela ação antinociceptiva central e ainda, por modular os controles descendentes dopaminérgicos, atuando em sua família de receptores D₂, a qual inclui os receptores D₃ e D₄. A estimulação destes receptores leva à inibição da AC, via proteína G_{i/o}. Também há uma supressão das correntes de Ca²⁺ e aumento nas correntes de K⁺, promovendo então uma redução na atividade neuronal (MISSALE et al., 1998). Quando existe a presença de um estímulo nocivo, agudo ou sustentado, ocorre um aumento na taxa de renovação da dopamina no corno dorsal da medula, sugerindo um aumento na atividade das vias descendentes inibitórias dopaminérgicas. Também ocorre aumento nos níveis de dopamina no líquido cérebro-espinhal em certos tipos de dores crônicas (MILLAN, 2002). Vários experimentos realizados com agonistas dopaminérgicos também demonstraram um potencial antinociceptivo das vias dopaminérgicas (JENSEN e YAKSH, 1984; MICHAEL-TITUS et al., 1990).

Numerosos estudos têm indicado um papel do sistema colinérgico central na inibição da nocicepção, seja pela ação de vias descendentes inibitórias colinérgicas, ativação de outras vias descendentes inibitórias, ou pela sua própria liberação de ACh a partir de interneurônios inibitórios localizados no corno dorsal (revisado por MILLAN, 2002). A ACh modula a nocicepção por um padrão complexo de efeitos, mediado via múltiplas classes de receptores, incluindo receptores muscarínicos e nicotínicos. Os receptores muscarínicos M1, M3 e M5 estão positivamente acoplados à proteína G_{q/11}, e sua ativação aumenta a atividade da PLC, enquanto que os receptores M2 e M4 são

acoplados a proteína $G_{i/o}$, refletindo na supressão da atividade da AC e das correntes de Ca^{2+} , e ainda, os receptores M2 ativam os canais de K^+ (MILLAN, 2002). Em contrapartida, os receptores nicotínicos são canais ionotrópicos pentaméricos, permeáveis a cátions, que se dividem em 17 subtipos diferentes. A atividade antinociceptiva da ACh no corno dorsal predominantemente envolve mecanismos muscarínicos. Tem sido descrito na literatura que os receptores M2 e M4 são os principais responsáveis por estes efeitos (WESS et al., 2003).

Existem três tipos majoritários de receptores opióides, os receptores mu (μ), kappa (κ) e delta (δ) (TODD e SPIKE, 1993; COGGESHAL e CARLTON, 1997). Eles estão localizados em vários níveis nas vias de transmissão da dor, como corno dorsal, mesencéfalo e tálamo, e têm sido associados com analgesia espinhal e supra-espinhal. Existem dois subtipos de receptores μ , um responsável pela atividade antinociceptiva (μ_1) e outro (μ_2) responsável pela depressão respiratória induzida por agonistas μ . Os receptores κ estão amplamente presentes nas mesmas áreas que o receptor μ , e, quando ativado, produz analgesia em nível espinhal. Os receptores δ são encontrados geralmente em toda parte do neuro-eixo (FÜRST, 1999). Estes receptores apresentam um padrão homogêneo de mecanismo de transdução: todos são negativamente acoplados a AC, aumentam as correntes de K^+ e suprimem as correntes de Ca^{2+} . Estas ações são responsáveis por suas atividades inibitórias sobre a excitabilidade neuronal (PRZEWOCKI e PRZEWOCKA, 2001).

Os peptídeos opióides (encefalinas, endomorfina, β -endorfinas, melanocortinas e nociceptina) são os ligantes endógenos dos receptores opióides, e participam da modulação do processo nociceptivo. As encefalinas exercem suas ações na substância cinzenta periaquedutal e amígdala através dos receptores δ -opióides, as dinorfinas dos receptores κ -opióides, e as β -endorfinas dos receptores μ -opióides (FÜRST, 1999). As endomorfina por sua vez, apresentam alta afinidade e seletividade para os receptores μ -opióides, de localizações supra-espinhais, como a substância cinzenta periaquedutal e amígdala, apresentando importante papel na modulação do controle descendente da dor (MILLAN, 2002). Além das ações antinociceptivas diretas, os peptídeos opióides podem atuar através de mecanismos indiretos. Existem

relatos sobre a interação entre as vias encefalinérgicas, dopaminérgicas e GABAérgicas na inibição da nocicepção (MICHAEL-TITUS et al., 1990; HUI et al., 2003). A nociceptina é um peptídeo composto de 17 aminoácidos, também chamado de orfanina-Q, atua em receptores opióides tipo 1 (ORL1), também chamado de receptor NOP. Assim como outros peptídeos e receptores opióides, a nociceptina e seu receptor NOP, também estão envolvidos no processamento da nocicepção em regiões do SNC (MILLAN, 2002).

É de fundamental importância para a terapêutica de doenças de origem inflamatória e neuropática a descoberta de medicamentos com propriedades analgésicas. No entanto, a atividade antinociceptiva de *U. tomentosa* ainda não havia sido estudada. A investigação científica dessa propriedade vem colaborar para a validação do uso popular de *U. tomentosa* no tratamento de artrite e outras doenças acompanhadas pelo sintoma da dor. Neste estudo, buscou-se avaliar a atividade antinociceptiva de uma fração de alcalóides oxindólicos de *U. tomentosa*, em modelos de estímulo químico e térmico, e realizou-se uma investigação dos prováveis mecanismos responsáveis pela ação analgésica desta fração.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O presente estudo teve por objetivo avaliar a atividade antinociceptiva de uma fração padronizada de alcalóides oxindólicos de *Uncaria tomentosa* (UT) em ensaios farmacológicos *in vivo*, utilizando diferentes modelos experimentais. Além disso, também constituiu o objetivo deste trabalho investigar alguns dos mecanismos que poderiam estar relacionados à atividade antinociceptiva de UT.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar a atividade antinociceptiva de UT após administração sistêmica frente à nocicepção provocada por estímulos químicos, como o ácido acético, formalina, capsaicina e glutamato, e estímulos térmicos, avaliados nos modelos de retirada da cauda e da placa quente;
- Investigar possíveis efeitos sobre a atividade locomotora dos animais após a administração de UT;
- Investigar a atuação de UT nos mecanismos de transmissão nociceptiva e na ação de alguns de seus principais mediadores, glutamato, substância P, NO e citocinas pró-inflamatórias;
- Investigar a ação de UT nas vias de controle descendente inibitório opióide, colinérgica-muscarínica, adrenérgica α_1 e α_2 e serotoninérgica, assim como avaliar o efeito da depleção de monoaminas sobre o efeito antinociceptivo de UT.

3. Materiais

3.1 Animais

Neste estudo foram utilizados camundongos albinos machos, pesando entre 30 e 35 gramas, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia, CCB – UFSC, em temperatura controlada de 22 ± 2 °C, em ciclo claro/escuro de 12 horas, com livre acesso à água e ração. Antes dos experimentos, os animais permaneceram no laboratório para ambientação durante um período de 24 horas, no mínimo. Os experimentos descritos foram realizados de acordo com as normas éticas para a investigação da dor experimental em animais conscientes, propostas pela IASP (International Association for the Study of Pain) (Zimmermann, 1983). O número de animais e a intensidade dos estímulos utilizados foram os mínimos necessários para demonstrar de forma consistente o efeito dos tratamentos. Além disso, todos os procedimentos experimentais realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e está cadastrado sob o n° 329.

3.2 Drogas e reagentes

- Ácido (\pm)-1-aminociclopentano-*trans*-1,3-dicarboxílico (*trans*-ACPD; Tocris, Cookson Inc., Ellisville, EUA).
- Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionico (AMPA; Tocris, Cookson Inc., Ellisville, EUA).
- Ácido acético glacial PA (Cinética Química, SP, Brasil).
- Ácido ascórbico (Merck, AG Darmstadt, Alemanha).
- Ácido caínico (cainato; Tocris, Cookson Inc., Ellisville, EUA).
- Ácido L-glutâmico (glutamato; Sigma Chemical Co. St. Louis, EUA).
- Ácido N-metil-D-aspartico (NMDA; Tocris, Cookson Inc., Ellisville, EUA).

- Capsaicina (8-metil-N-vanilil-6-nonenamida; Calbiochem, San Diego, EUA)
- Cetanserina (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA).
- Cloridrato de apomorfina (Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA).
- Cloridrato de clomipramina (Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA).
- Cloridrato de clonidina (Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA)
- Cloridrato de fenilefrina (Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA)
- Cloridrato de L-arginina (L-ARG; Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA)
- Cloridrato de morfina (Merck, AG Darmstadt, Alemanha).
- Cloridrato de naltrexona (Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA).
- Cloridrato de NG-nitro-L-arginina (L-NOARG; Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA).
- Cloridrato de prazosin (Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA).
- Cloridrato de ioimbina (Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA).
- Dimetilformamida (Nuclear, SP, Brasil).
- Dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA).
- Fator de necrose Tumoral- α (TNF- α ; R & D Systems, Inc., Minneapolis, MN, EUA)
- Formaldeído PA (Nuclear, SP, Brasil).
- Interleucina-1 β (IL-1 β ; R & D Systems, Inc., Minneapolis, MN, EUA)
- Solução salina tamponada (PBS; NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM e tampão fosfato 10 mM; Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA).
- R-(-)-DOI (R-[-]-2,5-Dimetoxi-4-iodoanfetamina; Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA).
- Reserpina (Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA).
- Substância P (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA)
- Sulfato de Atropina (Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA).

As soluções de drogas administradas por vias parenterais (intraperitoneal ou subcutânea) foram preparadas imediatamente antes do uso em solução salina tamponada (*phosphate buffered solution*, PBS), à exceção de: capsaicina, dissolvida em solução de DMSO a 1%; prazosin, dissolvido em solução de dimetilformamida a 0,2%; e reserpina, dissolvida em solução de

ácido ascórbico a 2%. Para preparação das soluções das drogas administradas por via oral utilizou-se água destilada ao invés de PBS. A solução de glutamato foi tamponada com hidróxido de sódio em quantidade equimolar, a fim de se alcançar o pH fisiológico. Todas as soluções foram preparadas em concentrações adequadas para administração de volumes constantes de 10 mL/kg (vias oral e parenteral), 0,2 mL por animal (via subcutânea), 20 μ L (via intraplantar) e 5 μ L (via intratecal). Os animais dos grupos controle receberam os respectivos veículos com os quais as soluções foram preparadas.

3.3 Material botânico

Uma fração padronizada de alcalóides oxindólicos (UT) obtida da *Uncaria tomentosa* foi utilizada em todos os experimentos. A fração UT foi gentilmente cedida pela indústria Naturia Inc. (Sherbrooke, Canadá). A análise fitoquímica de UT foi realizada pelo Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti, do Departamento de Química da UFSC, através de eletroforese capilar e ressonância magnética nuclear, a partir de uma adaptação do método descrito anteriormente (SEKI et al., 1993; VALENTE et al., 2006). As estruturas dos alcalóides oxindólicos presentes na fração UT estão representadas na Figura 2, sendo que os isômeros compartilham a mesma estrutura plana, diferindo apenas na orientação de seus núcleos quirais. Conforme o eletroforetograma mostrado na Figura 3, os isômeros tetracíclicos correspondem a 30,5 % da fração (16,0% rincofilina (2) e 14,5% isorrincofilina (4)), enquanto 65% representam os isômeros pentacíclicos (2,1% speciofilina (1), 4,1% mitrafilina (3), 25,9% isomitrafilina (5), 4,3% uncarina F (6), 5,1% pteropodina (7) e 23,5% isopteropodina (8)) e 4,5% representam outros alcalóides oxindólicos não-identificados. Em todos os experimentos, as soluções de UT foram preparadas inicialmente por dissolução em Tween-80[®] (Fischer Scientific International), e então por diluição em PBS ou água, a fim de que a concentração final de Tween-80[®] não excedesse 10% e não causasse nenhum efeito *per se*.

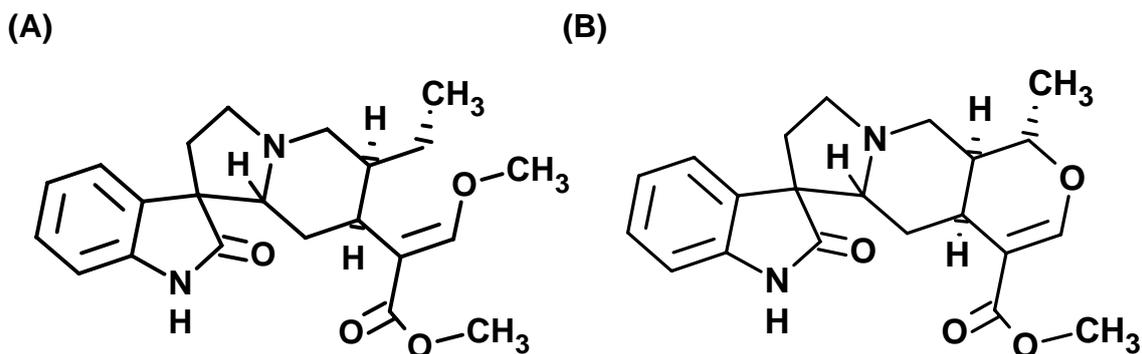


Figura 2: Estrutura básica dos alcalóides oxindólicos tetracíclicos (A) e pentacíclicos (B) presentes na fração UT.

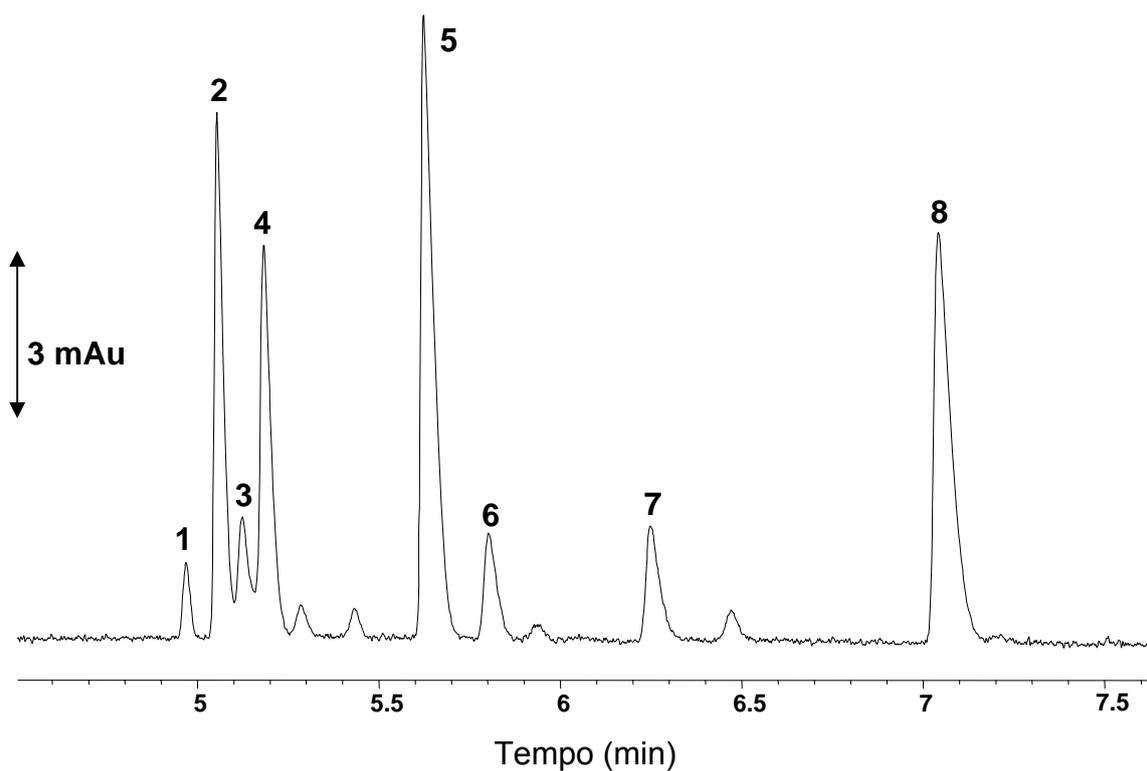


Figura 3: Eletroforetograma da fração UT (400 mg/L) em MeOH:água (20:80 v/v). 1-speciofilina; 2-rincofilina; 3-mitrafilina; 4-isorincofilina; 5-isomitrafalina; 6-uncarina F; 7-pteropodina; 8-isopteropodina. Condições eletroforéticas: capilares de sílica fundida 50 μm d.i., 60 cm comprimento total (51,5 cm ao detector); composição de eletrólitos MES 40 mmol/L, Tris 10 mmol/L, pH 5.6, 20% MeOH (v/v); voltagem de separação 30 kV; injeção hidrodinâmica em 5 s a 50 mbar; temperatura 25 $^{\circ}\text{C}$, detecção a 239 nm.

4. Métodos

4.1 Avaliação da atividade antinociceptiva

4.1.1 Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético

O teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético tem sido amplamente utilizado como ferramenta de triagem na busca por novos agentes analgésicos e antiinflamatórios, pois permite avaliar uma reação comportamental que pode ser considerada um reflexo de dor visceral inflamatória (VYKLIČKY, 1979; TJØLSEN e HOLE, 1997). A injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético produz uma resposta caracterizada por contração dos músculos abdominais, acompanhadas pela extensão do corpo e das patas traseiras (KOSTER et al., 1959). Para se avaliar a ação de UT neste modelo, camundongos foram pré-tratados com as doses de 3, 10, 30 ou 100 mg/kg de UT ou veículo, por via i.p. Trinta minutos depois, os mesmos animais receberam uma injeção i.p. de uma solução de ácido acético a 0,6% em PBS, na proporção de 0,1 mL para cada 10 g de peso corporal. Imediatamente após a injeção de ácido acético, os mesmos foram colocados em caixas de acrílico individuais, com medidas de 15X15X15 cm e espelhos posicionados ao fundo (90°) e abaixo (45°) que permitem a completa visualização do animal, e o número de contorções abdominais desenvolvidas por cada animal foi registrado durante os 20 min subseqüentes.

4.1.2 Teste da nocicepção induzida por formalina

A utilização de formalina como estímulo nociceptivo foi inicialmente descrita por DUBUISSON e DENNIS (1977), e tem sido amplamente difundida como modelo para o estudo da nocicepção em animais. O teste de nocicepção induzida por formalina em camundongos consiste na injeção intraplantar (i.pl.) de uma solução de formalina a 2,5% (equivalente a formaldeído a 0,92%) na pata posterior direita do animal. Este estímulo induz uma resposta comportamental de lambida e mordida da pata injetada, que se manifesta em

duas fases distintas e permite avaliar dois tipos de nocicepção: a primeira fase, causada pela ativação direta de nociceptores periféricos (ativando fibras aferentes primárias), que compreende os 5 min iniciais após a injeção de formalina; e a segunda fase, que é resultante de uma resposta inflamatória tecidual e da sensibilização central dos nociceptores, e que ocorre entre 15 e 30 min após a injeção da formalina (HUNSKAAR e HOLE, 1987; TJØLSEN et al., 1992).

O procedimento foi realizado como descrito anteriormente (HUNSKAAR et al., 1985), com pequenas modificações. Os animais receberam uma injeção de 20 μ L de formalina a 2,5 % na superfície plantar da pata posterior direita e, em seguida, foram colocados individualmente em caixas de acrílico e observados por 30 min. O tempo que os animais despenderam lambendo ou mordendo a pata injetada durante os primeiros 5 min (primeira fase) e nos 15 min finais (segunda fase) foi registrado com o auxílio de um cronômetro e considerado como indicativo de nocicepção. A fim de se avaliar o efeito de UT na nocicepção induzida por formalina, grupos de animais receberam diferentes doses de UT (10, 30, 100, 150 ou 300 mg/kg) ou veículo por via i.p. ou por via oral (p.o.) 30 ou 60 min, respectivamente, antes da indução da nocicepção.

4.1.3 Teste da nocicepção induzida por capsaicina

A injeção subcutânea de capsaicina é capaz de ativar seletivamente as fibras aferentes primárias do tipo C, induzindo a liberação espinal de glutamato e Substância P, com o envolvimento de óxido nítrico (SAKURADA et al., 1996). O procedimento utilizado foi o descrito por SAKURADA et al. (1992), com pequenas modificações (SANTOS e CALIXTO, 1997). Grupos de animais foram tratados com UT em diferentes doses (30, 100 e 300 mg/kg), por via i.p., 30 min antes da injeção de 20 μ L de uma solução PBS contendo capsaicina (1,6 μ g/pata). Em seguida os animais foram colocados em caixas de acrílico, e observados durante os 5 min subseqüentes. O tempo que os animais despenderam lambendo ou mordendo a pata injetada foi registrado com o auxílio de um cronômetro, e considerado como indicativo de nocicepção.

4.1.4 Teste da nociceção induzida por glutamato

Com o objetivo de obter evidências mais diretas a respeito da interação de UT com o sistema glutamatérgico, foi testado seu efeito frente à injeção i.pl. de glutamato. Camundongos foram divididos em grupos e tratados por via i.p. com veículo ou UT nas doses de 3, 10, 30, 100 ou 300 mg/kg, trinta min antes da injeção de 20 μ L de uma solução de glutamato (20 μ mol/pata) na região i.pl. da pata posterior direita. Em seguida, os animais foram colocados em caixas de acrílico e observados por um período de 15 min, iniciados imediatamente após a injeção de glutamato, como descrito anteriormente (BEIRITH et al., 2002). O tempo despendido pelos animais para lambar ou morder a pata injetada foi considerado como indicativo de nociceção.

4.1.5 Teste da retirada da cauda

O teste de retirada da cauda, descrito por D'AMOUR e SMITH (1941), é extensivamente utilizado para o estudo de substâncias com potencial analgésico central. O teste consiste no posicionamento da cauda do animal sobre um feixe de luz, cuja radiação térmica provoca a retirada da cauda num movimento breve e vigoroso. Quando isto acontece, uma célula fotoelétrica desliga a lâmpada e o timer, registrando apenas o tempo em que o animal esteve com a cauda sobre o feixe de luz. A magnitude da latência do reflexo de retirada da cauda fornece um índice do limiar nociceptivo do animal.

Antes da realização do experimento, o aparelho (Analgésímetro Ugo Basile, mod. Tail-Flick DS-20) foi ajustado para que os animais apresentassem um tempo de latência basal para resposta entre 5 e 10 segundos (correspondente à potência de 20 W). A reatividade dos animais foi então avaliada, obtendo-se a medida basal. Trinta minutos depois, grupos de animais foram tratados por via i.p. com veículo ou UT nas doses de 30, 100 ou 300 mg/kg, procedendo-se outra medida (tempo "zero"). As leituras prosseguiram a cada 30 min, até duas horas após o tratamento. Um tempo de corte automático de 20 segundos de exposição da cauda foi adotado a fim de evitar possíveis danos teciduais. Vinte e quatro horas antes, os animais haviam sido selecionados quanto a sua reatividade, a fim de assegurar que todos os que

fossem utilizados exibissem respostas dentro da faixa normal (aproximadamente 12 s).

4.1.6 Teste da placa quente

O teste da placa quente, descrito por EDDY e LEIMBACK (1953), foi utilizado também com o intuito de avaliar a atividade antinociceptiva de UT frente a estímulos térmicos. Este modelo consiste na colocação do animal sobre uma superfície metálica aquecida à temperatura constante, que pode evocar dois tipos de comportamento, lambar as patas ou pular, cuja latência para acontecer pode ser medida em segundos. Ambas as reações são consideradas como respostas integradas em nível supra-espinhal (LE BARS, et al., 2001).

Neste experimento, os animais foram colocados sobre uma superfície aquecida a $56 \pm 1^\circ\text{C}$ e o tempo decorrido até que reagissem lambendo as patas ou pulando foi registrado, fornecendo uma medida de seu limiar nociceptivo. A reatividade dos animais foi medida 30 min após serem tratados por via i.p. com veículo ou UT (doses de 30, 100 ou 300 mg/kg), ou por via s.c. com morfina (10 mg/kg). Um tempo máximo de exposição à superfície aquecida de 30 segundos foi adotado a fim de se evitar possíveis danos teciduais. Vinte e quatro horas antes, os animais haviam sido selecionados quanto a sua reatividade, a fim de assegurar que todos os que foram utilizados exibiam respostas dentro da faixa normal.

4.2 Avaliação do desempenho motor

4.2.1 Teste do *Rota rod*

Com o objetivo de verificar possíveis efeitos relaxantes musculares não específicos ou sedativos produzidos por UT sobre os sistemas nervoso central ou periférico, que pudessem interferir na avaliação da nocicepção, os animais tiveram o seu desempenho motor avaliado no teste do rota-rod, como descrito anteriormente por ROSLAND et al., (1990). O aparelho de *rota-rod*

(Ugo Basile, mod. 7600) consiste em um cilindro de 2,5 cm de diâmetro, dividido em 4 compartimentos. O cilindro foi automaticamente configurado para girar a uma velocidade constante de 22 rotações por minuto (R.P.M.). Os animais foram selecionados 24 horas antes do experimento, sendo desprezados aqueles que não permaneceram pelo menos 60 s no aparelho. Os animais foram tratados nas doses de 100 e 300 mg/kg, por via i.p. e 30 min depois foram submetidos ao teste. Estas doses foram escolhidas para verificar se a dose utilizada para elucidar o mecanismo antinociceptivo, bem como uma dose três vezes maior, seriam capazes de produzir efeitos inespecíficos. Os resultados foram expressos como o tempo (s) que os animais permaneceram sobre o cilindro giratório. Um tempo máximo de permanência na barra giratória de 60 segundos foi utilizado.

4.2.2 Teste do campo aberto

O teste do campo aberto foi realizado com a finalidade de avaliar o efeito de UT na locomoção espontânea e atividade exploratória dos animais. Para tanto, camundongos foram tratados por via i.p. com 3, 10, 30 ou 100 mg/kg de UT e após 30 min foram colocados individualmente no centro de uma arena aberta, constituída de placas de acrílico, fundo branco de medidas 30 x 30 x 30 cm, dividido por linhas pretas em quadrados de 10 x 10 cm, e paredes transparentes. A arena foi mantida em uma sala isolada com iluminação fraca (12 lux) e monitorada através de uma câmera de vídeo. Ao explorar a arena, o animal transita sobre os quadrados marcados no chão da mesma, e o número de quadrados que ele cruza é contado pelo experimentador, fornecendo um indicativo quantitativo da locomoção espontânea. O número de cruzamentos totais e de comportamentos exploratórios do tipo levantar as patas dianteiras apoiado nas patas traseiras (*rearing*) foram contados durante os 5 min iniciais.

4.3 Estudo do mecanismo de ação

A fim de se investigar os possíveis mecanismos pelos quais a UT exerce seu efeito antinociceptivo, diferentes ferramentas farmacológicas foram empregadas e, à exceção dos itens 3.6.1.2 e 3.6.1.3, o teste da formalina foi utilizado como modelo para avaliar a nocicepção, conforme descrito no item 3.4.2. Este modelo foi escolhido devido à especificidade e sensibilidade que apresenta na avaliação da resposta nociceptiva (LE BARS et al., 2001). Neste grupo de experimentos foi utilizada a dose de 100 mg/kg de UT, que corresponde aproximadamente à dose efetiva que promove 50% do efeito máximo (DE50), quando administrada por via i.p., na primeira e segunda fase da nocicepção induzida por formalina. Em todos os experimentos os animais foram tratados com UT 30 min antes da injeção i.pl. de formalina ou da injeção i.t. dos aminoácidos excitatórios e das citocinas pró-inflamatórias. A escolha das doses das outras substâncias utilizadas foi baseada em dados da literatura e experimentos previamente padronizados em nosso laboratório.

Foram investigadas as vias de transmissão nociceptiva e alguns de seus principais mediadores, glutamato, substância P, NO e citocinas pró-inflamatórias, bem como as vias descendentes inibitórias opióide, colinérgica-muscarínica, adrenérgica α_1 e α_2 e serotoninérgica. Em relação a estas, investigou-se também o efeito da depleção de monoaminas sobre o efeito antinociceptivo de UT.

4.3.1 Vias de transmissão nociceptiva

4.3.1.1 Participação do sistema L-arginina/óxido nítrico

Para avaliar se parte da atividade antinociceptiva apresentada pela UT envolve a inibição da via L-arginina/óxido nítrico, os camundongos foram pré-tratados com L-arginina (substrato para a enzima sintase do óxido nítrico; NOS; 600 mg/kg, i.p.) e, após 15 min, com UT (100 mg/kg, i.p.), L-NOARG (inibidor da enzima NOS, 75 mg/kg, i.p.) ou veículo (VAZ et al., 1996; BEIRITH et al., 1998). Decorridos 30 min do último tratamento, os animais foram submetidos ao teste da formalina. Os grupos controle foram tratados somente

com UT (100 mg/kg, i.p.), L-NOARG (75 mg/kg, i.p.) ou veículo, 30 min antes da indução da nocicepção.

4.3.1.2 Participação do sistema glutamatérgico e substância P ao nível espinhal

Na tentativa de se obter evidências mais diretas a respeito da interação de UT com os receptores glutamatérgicos, investigou-se o efeito do pré-tratamento com UT no comportamento nociceptivo induzido por injeção i.t. de agonistas dos receptores glutamatérgicos e substância P.

As injeções i.t. foram realizadas em animais conscientes conforme descrito anteriormente por HYLDEN e WILCOX (1980). Animais pré-tratados com UT na dose de 100 mg/kg por via i.p., 30 min antes, foram imobilizados manualmente e uma agulha de insulina (30 G) fixada a um tubo de polietileno e conectada a uma microseringa de 50 μ L foi introduzida no espaço subaracnóideo, entre as vértebras L₅ e L₆, para a injeção de 5 μ L de glutamato (aminoácido excitatório e agonista endógeno dos receptores glutamatérgicos, 175 nmol/sítio), NMDA (agonista seletivo dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo NMDA, 450 pmol/sítio), AMPA (agonista seletivo dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo AMPA, 135 pmol/sítio), cainato (agonista seletivo dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo cainato, 110 pmol/sítio), *trans*-ACPD (agonista dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos, 50 nmol/sítio), substância P (peptídeo endógeno agonista dos receptores NK1, 100 pmol/sítio) (SCHEIDT et al., 2002; GADOTTI et al., 2006). Cada injeção foi realizada durante um período de 5 segundos e a resposta comportamental, que corresponde a lambar, coçar ou morder os membros posteriores, foi cronometrada durante períodos de tempo pré-determinados conforme a resposta desencadeada por cada agente: *trans*-ACPD: 15 min; NMDA e substância P: 5 min; cainato: 4 min; glutamato: 3 min e AMPA: 1 min (SCHEIDT et al., 2002; GADOTTI et al., 2006).

4.3.1.3 Participação das citocinas pro-inflamatórias a nível espinhal

Conforme descrito anteriormente, as citocinas são capazes de induzirem respostas comportamentais nociceptivas quando injetadas por via intratecal em camundongos (ROBERTSON et al., 1997; TADANO et al., 1999). A fim de se investigar a ação de UT frente à nocicepção induzida pela injeção i.t. das citocinas pró-inflamatórias Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α ; 0.1 pg/sítio) e Interleucina-1 β (IL-1 β ; 1.0 pg/sítio), animais foram pré-tratados com UT (100 mg/kg, i.p.) ou veículo 30 min antes da indução da nocicepção. A injeção i.t. foi realizada conforme o método descrito no item 3.6.1.2. Imediatamente após a injeção das citocinas, os camundongos foram colocados em caixas individuais de observação, e a resposta nociceptiva correspondente a lambar, coçar ou morder os membros posteriores foi registrada cumulativamente em segundos durante 15 min. As doses de IL-1 β e TNF- α e o tempo de avaliação utilizados neste estudo foram baseados em experimentos padronizados previamente no laboratório.

4.3.2 Vias descendentes inibitórias

4.3.2.1 Participação do sistema opióide

Com a intenção de verificar se a atividade antinociceptiva de UT envolve a participação de receptores opióides, os camundongos foram pré-tratados com naltrexona (antagonista opióide não seletivo, 1 mg/kg, i.p.) e após 15 min os animais foram tratados com UT (100 mg/kg, i.p.), morfina (agonista opióide não seletivo 5 mg/kg, i.p.) ou veículo (WALKER et al., 1999a). Decorridos 30 min, os animais foram submetidos ao teste da formalina. Os grupos controle receberam veículo no lugar de naltrexona, seguido dos mesmos tratamentos com UT, morfina ou veículo, 30 min antes da indução da nocicepção.

4.3.2.2 Participação do sistema colinérgico-muscarínico

A fim de se avaliar a participação das vias descendentes inibitórias colinérgicas-muscarínicas, camundongos foram pré-tratados com atropina (antagonista não-seletivo dos receptores muscarínicos; 0,1 mg/kg; i.p.) e, após 15 min, com UT (100 mg/kg; i.p.) ou veículo. Decorridos 30 min deste último tratamento os animais foram submetidos ao teste da formalina. Os grupos controle receberam veículo no lugar de atropina, seguido dos mesmos tratamentos com UT ou veículo, 30 min antes da indução da nocicepção.

4.3.2.3 Participação do sistema adrenérgico α_1

Para avaliar a participação de mecanismos envolvendo receptores adrenérgicos α_1 na atividade antinociceptiva de UT os camundongos foram pré-tratados com prazosin (antagonista seletivo dos receptores α_1 , 0,15 mg/kg, i.p.) e após 15 min os animais foram tratados com UT (100 mg/kg, i.p.), fenilefrina (agonista seletivo dos receptores α_1 , 10 mg/kg, i.p.) ou veículo (SANTOS et al. 1995). Decorridos 30 min, os animais foram submetidos ao teste da formalina. Os grupos controle receberam veículo no lugar de prazosin, seguido dos mesmos tratamentos com UT, fenilefrina ou veículo 30 min antes da indução da nocicepção.

4.3.2.4 Participação do sistema adrenérgico α_2

Para avaliar a participação de mecanismos envolvendo receptores adrenérgicos α_2 no efeito antinociceptivo de UT, os camundongos foram pré-tratados com ioimbina (antagonista seletivo dos receptores α_2 , 0,15 mg/kg, i.p.) e após 15 min os animais foram tratados com UT (100 mg/kg, i.p.), clonidina (agonista seletivo dos receptores α_2 , 0,1 mg/kg, i.p.) ou veículo (SANTOS et al., 1995). Após 30 min, os animais foram submetidos ao teste da formalina. Os grupos controle receberam veículo no lugar de ioimbina, seguido dos mesmos tratamentos com UT, clonidina ou veículo 30 min antes da indução da nocicepção.

4.3.2.5 Participação do sistema serotoninérgico 5-HT₂

Para determinar a possível participação dos receptores serotoninérgicos 5-HT₂ na atividade antinociceptiva de UT, camundongos foram pré-tratados com cetanserina (antagonista seletivo dos receptores 5-HT₂, 1 mg/kg, i.p.) e após 15 min os animais foram tratados com UT (100 mg/kg, i.p.), DOI (agonista seletivo dos receptores 5-HT₂, 1 mg/kg, i.p.) ou veículo. Após 30 min, os animais foram submetidos ao teste da formalina. Os grupos controle receberam veículo no lugar de cetanserina, seguido dos mesmos tratamentos com UT, DOI ou veículo 30 min antes da indução da nocicepção.

4.3.2.6 Participação dos estoques endógenos de aminas bioativas

Para avaliar se a atividade antinociceptiva de UT depende da liberação de monoaminas dos terminais neuronais pré-sinápticos, os animais foram pré-tratados com reserpina (substância que inibe a captação vesicular de monoaminas e, portanto, a formação de estoques vesiculares de neurotransmissor; 5 mg/kg, i.p.) 24 horas antes do tratamento com UT (100 mg/kg, i.p.), clomipramina (inibidor da recaptção neuronal de monoaminas, 10 mg/kg, i.p.) ou veículo (OCHI et al., 2002). Após 30 min os animais tratados com UT ou veículo foram submetidos ao teste da formalina, enquanto os animais tratados com clomipramina foram submetidos ao mesmo teste 60 min depois do tratamento. Os grupos controle receberam veículo no lugar de reserpina, seguido dos mesmos tratamentos 30 min (UT ou veículo) ou 60 min (clomipramina) antes da indução da nocicepção.

4.4 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.), exceto os valores de DI50 (doses que reduziram as respostas em 50% em relação ao grupo controle), que são apresentadas como médias geométricas acompanhadas pelos seus respectivos limites de confiança, ao nível de 95%. As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram

detectadas com teste T de Student ou análise de variância (ANOVA de uma via) seguida pelos testes de Dunnett ou Student-Newman-Keuls quando indicados. Os valores de p menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância. A análise estatística foi realizada através dos programas Graph Pad Instat[®] 3.01 e Graph Pad Prism[®] 3.00.

5. Resultados

5.1 Avaliação da atividade antinociceptiva

5.1.1 Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético

Os resultados apresentados na Figura 4 demonstram que UT, quando administrada por via i.p. 30 min antes da injeção de ácido acético, produziu inibição significativa e dependente da dose das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. As doses de 10, 30 e 100 mg/kg inibiram as contorções em 54, 72 e 97 %, respectivamente, quando comparado ao grupo controle (23 ± 3 contorções). A DI50 obtida a partir da regressão linear, juntamente com seu intervalo de confiança 95 %, foi de 12,78 (5,80 – 19,76) mg/kg. ANOVA revelou um efeito significativo do tratamento [$F(4,43) = 10,175$; $P < 0,0001$].

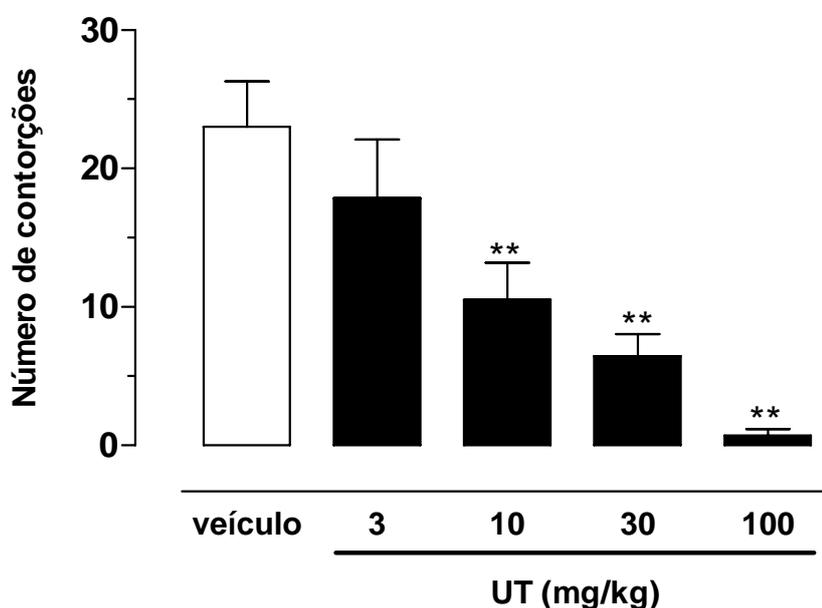


Figura 4: Efeito do pré-tratamento (30 min; i.p.) dos animais com veículo (grupo controle) ou UT nas doses de 3, 10, 30 e 100 mg/kg no teste das contorções abdominais induzidas por injeção i.p. de solução de ácido acético a 0,6 % (10 mL/kg). Cada barra representa a média do número de contorções desenvolvidas nos 20 min iniciais por 6-8 animais e as linhas verticais os E.P.M. **p < 0,01 representa as diferenças estatisticamente significativas dos grupos, quando comparado com o grupo controle (ANOVA seguido de Dunnett).

5.1.2 Teste da nociceção induzida por formalina

O tratamento de camundongos com diferentes doses de UT (10 – 300 mg/kg) pelas vias i.p. e p.o., 30 ou 60 min, respectivamente, antes da injeção i.pl. de formalina, foi capaz de reduzir significativamente e de maneira dose-dependente o tempo de reatividade dos animais em ambas as fases do teste. As doses de 10, 30, 100, 150 e 300 mg/kg, administradas i.p., causaram respectivamente inibições médias de 8, 30, 33, 65 e 94%, na primeira fase (Figura 5A), e de 28, 36, 41, 94 e 100%, na segunda fase (Figura 5B), quando comparadas ao grupo controle (primeira fase: $71,1 \pm 2,8$ s; segunda fase: $208,6 \pm 9,7$ s). As DI50 calculadas através de regressão linear, juntamente com seus respectivos limites de confiança 95 %, foram 107,11 (88,12 – 126,10) para a primeira fase e 95,25 (71,33 – 119,17) para a segunda fase. ANOVA revelou um efeito significativo do tratamento em ambas as fases [$F(5,50) = 45,716$ (primeira fase) e $F(5,59) = 48,208$ (segunda fase); $P < 0,0001$].

Quando administradas p.o. as doses 30, 100, 150 e 300 mg/kg causaram, respectivamente, inibições médias de 29, 52, 60 e 71 % na primeira fase (Figura 6A) e 16, 86, 88 e 100 % na segunda fase (Figura 6B), comparadas ao grupo controle (primeira fase: $79,3 \pm 7,3$ s; segunda fase: $290,4 \pm 36,3$ s). As DI50 calculadas através de regressão linear, juntamente com seus respectivos limites de confiança 95 %, foram 92,00 (37,42 – 146,58) mg/kg para a primeira fase e 49,33 (30,34 – 68,32) mg/kg para a segunda fase. ANOVA revelou um efeito significativo do tratamento em ambas as fases [$F(4,34) = 10,414$ (primeira fase) e $F(4,31) = 23,554$ (segunda fase); $P < 0,0001$].

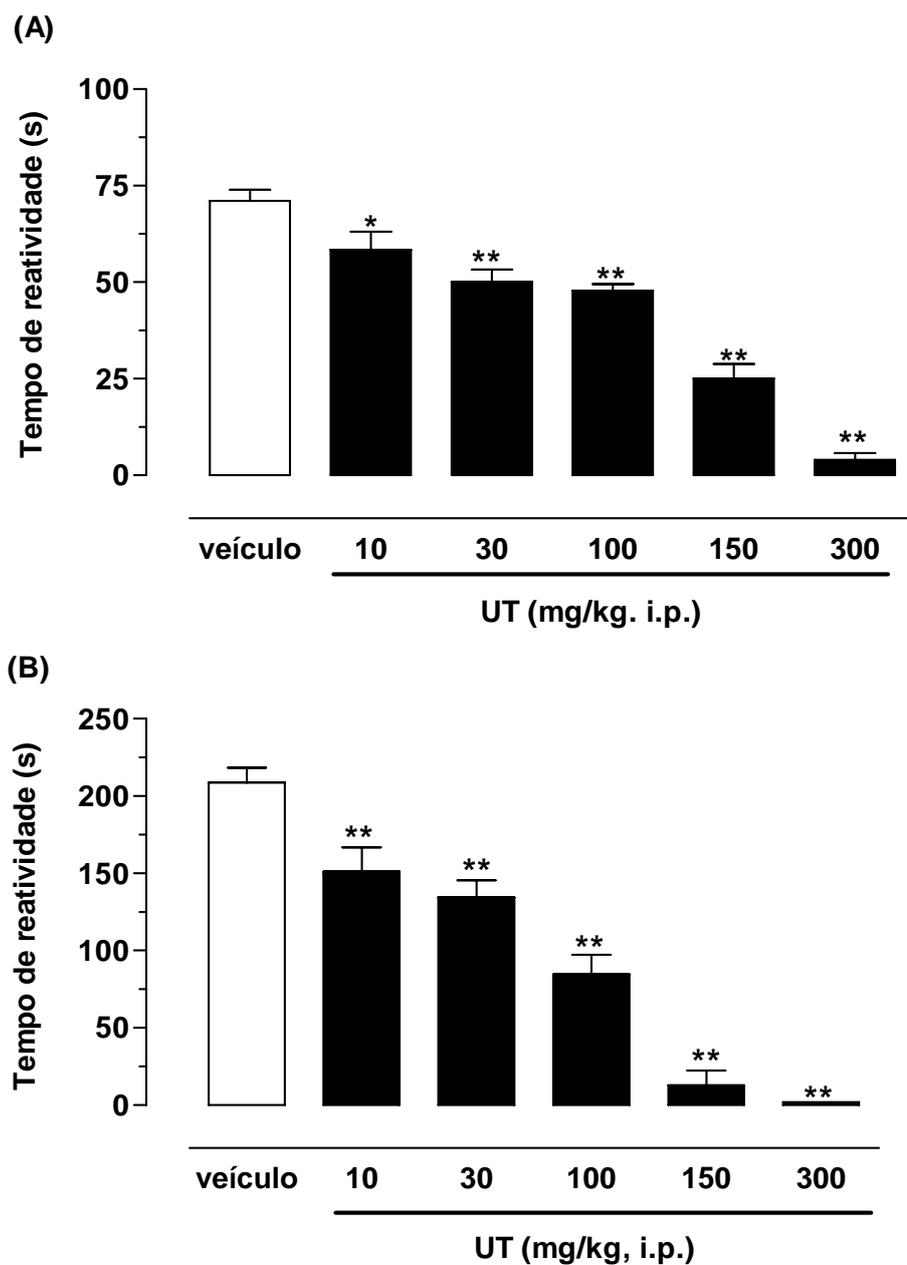


Figura 5: Efeito do pré-tratamento (30 min; i.p.) dos animais com veículo (grupo controle) ou UT nas doses de 10, 30, 100, 150 e 300 mg/kg sobre a primeira (A; 0 a 5 min) e segunda (B; 15 a 30 min) fase da nocicepção induzida por injeção i.pl. de formalina 2,5 % (20 μ L/pata). Cada barra representa a média do tempo de reatividade de 6-8 animais e as linhas verticais os E.P.M. ** $p < 0,01$ representa as diferenças estatisticamente significativas dos grupos, quando comparado com o grupo controle (ANOVA seguido de Dunnett).

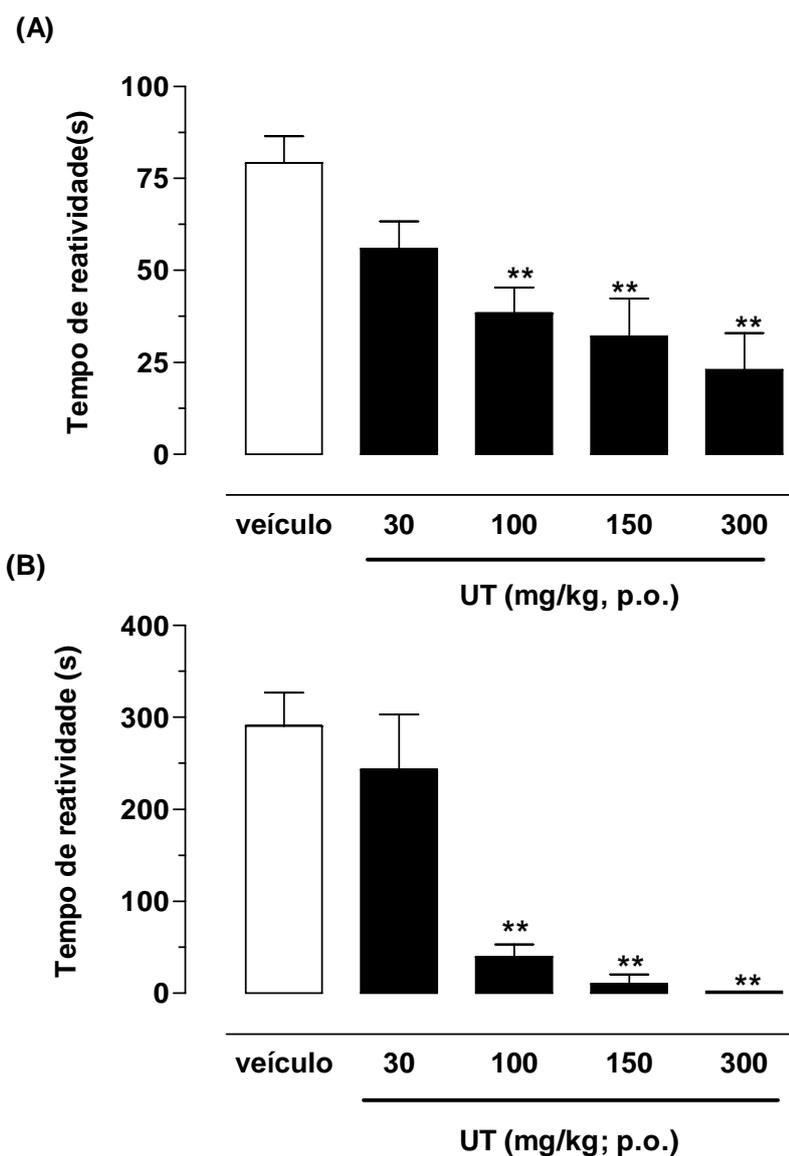


Figura 6: Efeito do pré-tratamento (60 min; p.o.) dos animais com veículo (grupo controle) ou UT nas doses de 30, 100, 150 e 300 mg/kg sobre a primeira (A; 0 a 5 min) e segunda (B; 15 a 30 min) fase da nocicepção induzida por injeção i.pl. de formalina 2,5 % (20 μ L/pata). Cada barra representa a média do tempo de reatividade de 6-8 animais e as linhas verticais os E.P.M. ** $p < 0,01$ representa as diferenças estatisticamente significativas dos grupos, quando comparado com o grupo controle (ANOVA seguido de Dunnett).

5.1.3 Teste da nociceção induzida por capsaicina

Quando comparados ao grupo controle (29 ± 1 s), os animais tratados com UT nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg (i.p.) apresentaram redução significativa de aproximadamente 11, 66 e 94 %, respectivamente, da resposta nociceptiva induzida pela injeção i.pl. de capsaicina, 30 min depois do tratamento (Figura 7). A DI50 calculada através de regressão linear, juntamente com seu limite de confiança 95 %, foi de 68,5 (44,97– 92,03) mg/kg. ANOVA revelou um efeito significativo do tratamento [$F(3,23) = 48,019$; $P < 0,0001$].

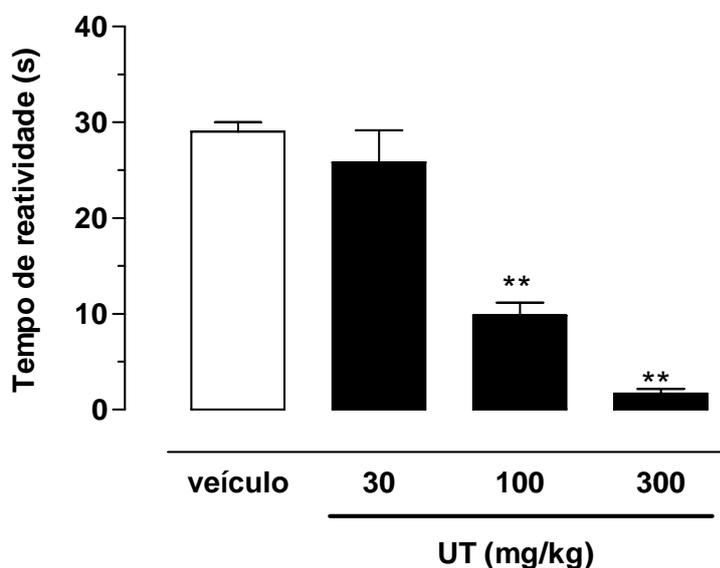


Figura 7: Efeito do pré-tratamento (30 min; i.p.) dos animais com veículo (grupo controle) ou UT nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg sobre a nociceção induzida por injeção i.pl. de capsaicina (1,6 μ g/pata; 20 μ L). Cada barra representa a média do tempo de reatividade dos 6-8 animais durante os 5 min iniciais \pm E.P.M. ** $p < 0,01$ representa as diferenças estatisticamente significativas dos grupos, quando comparado com o grupo controle (ANOVA seguido de Dunnett).

5.1.4 Teste da nociceção induzida por glutamato

O tratamento sistêmico dos animais com UT nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg (i.p.) inibiu significativamente a nociceção induzida pela injeção i.pl. de glutamato em aproximadamente 35, 58 e 93 %, respectivamente (Figura 8). A DI50 calculada, juntamente com seu respectivo limite de confiança 95 %, foi de 58,00 (44,50 – 71,80) mg/kg. ANOVA revelou um efeito significativo do tratamento [$F(4,30) = 36,241$; $P < 0,0001$].

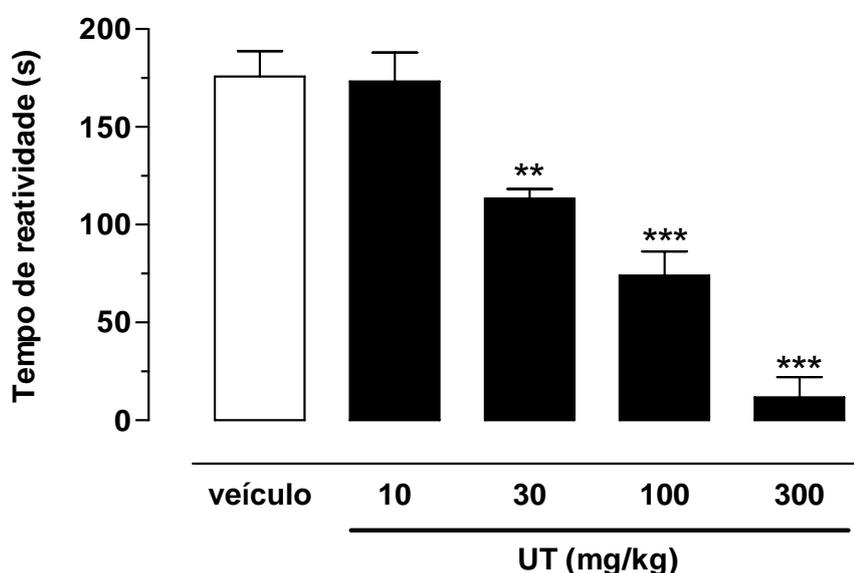


Figura 8: Efeito do pré-tratamento (30 min; i.p.) dos animais com veículo (grupo controle) ou UT nas doses de 10, 30, 100 e 300 mg/kg sobre a nociceção induzida pela injeção i.pl. de glutamato (10 μ mol/pata), em camundongos. Cada barra representa a média do tempo de reatividade (s) de 6-8 animais durante os 15 min iniciais \pm E.P.M. ** $p < 0,01$ representa as diferenças estatisticamente significativas dos grupos, quando comparados com o grupo controle (ANOVA seguido de Dunnett).

O tratamento com UT demonstrou-se efetivo frente aos diferentes modelos de indução de nocicepção através de estímulos químicos utilizados. Entretanto, pode-se observar que o efeito apresentado por UT difere quanto à potência nos testes que utilizam substâncias irritantes para indução da nocicepção (Tabela 2). UT demonstrou ser mais potente no modelo das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, seguido do teste do glutamato, teste da capsaicina, teste da formalina (2ª fase, via oral), teste da formalina (1ª fase, via oral), teste da formalina (2ª fase, via i.p.) e teste da formalina (1ª fase, via i.p.). Esta diferença provavelmente está associada ao tipo do irritante químico e também as diferença da intensidade e de neurotransmissores envolvidos na ativação das fibras sensoriais responsáveis pela transmissão sensorial.

Tabela 2: Comparação entre os valores de DI50, e seus respectivos limites de confiança 95%, resultantes do pré-tratamento (i.p.) com UT em quatro modelos diferentes de nocicepção química em camundongos.

Modelo	DI50 com respectivo limite de confiança 95% (mg/kg)
Contorções Abdominais	12.78 (5.80 – 19.76)
Teste do Glutamato i.pl.	58.16 (44.49 – 71.84)
Teste da Capsaicina	68.5 (44.97 – 92.03)
Teste da Formalina – 2ª fase (i.p.)	95.25 (71.33 – 119.17)
Teste da Formalina – 1ª fase (i.p.)	107.11 (88.12 – 126.10)
Teste da Formalina – 2ª fase (p.o.)	49,33 (30,34 – 68,30)
Teste da Formalina – 1ª fase (p.o.)	92,00 (37,42 – 146,58)

5.1.5 Teste da retirada da cauda

A Figura 9 mostra o efeito do tratamento dos animais com UT nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg (i.p.) sobre a resposta de retirada da cauda, no teste do *tail flick*, ao decorrer do tempo. A latência de retirada da cauda dos animais tratados com a dose de 300 mg/kg aumentou significativamente 120 min depois (em aproximadamente 90 %). Além disso, os resultados indicam que as doses de 30 e 100 mg/kg não alteraram a latência de retirada da cauda dos animais submetidos ao teste. ANOVA revelou um efeito significativo do tratamento [$F(3,26) = 6,243$; $P = 0,0029$].

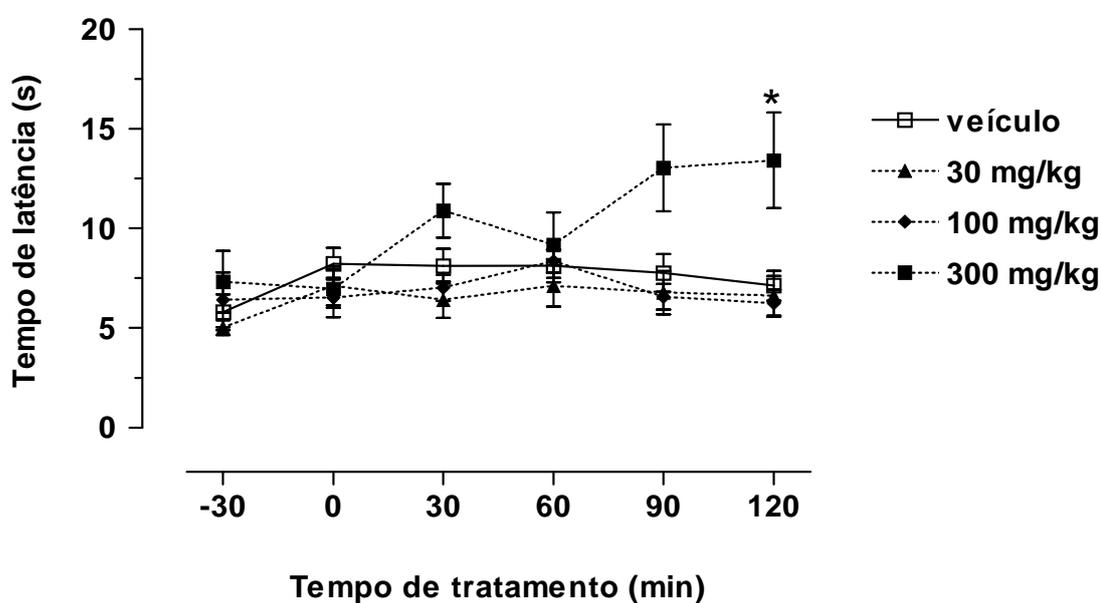


Figura 9: Efeito do tratamento com UT (30, 100 e 300 mg/kg, i.p.) na latência para retirada da cauda, em camundongos. Os animais foram avaliados quanto à latência (s) de retirada da cauda posicionada sobre um feixe de luz (20 W) 30 min antes, imediatamente antes e nos tempos 30, 60, 90 e 120 min após o tratamento com UT. Cada barra representa a média de 6-8 animais \pm EPM. * $p < 0,05$ representa as diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados com UT e o grupo controle, que recebeu apenas veículo (ANOVA seguido de Dunnett).

5.1.6 Teste da placa quente

A Figura 10 demonstra que o tratamento dos animais com UT na dose de 300 mg/kg, 30 min antes por via i.p., aumentou de maneira significativa (aproximadamente 157 %) a latência de resposta dos animais ao estímulo térmico do teste da placa quente, comparado ao grupo controle ($9,4 \pm 1,0$ s). Da mesma forma, os animais tratados com morfina (10 mg/kg, i.p.) 30 min antes, tiveram a reatividade reduzida significativamente. ANOVA revelou um efeito significativo do tratamento [$F(4,30) = 12,976$; $P < 0,0001$].

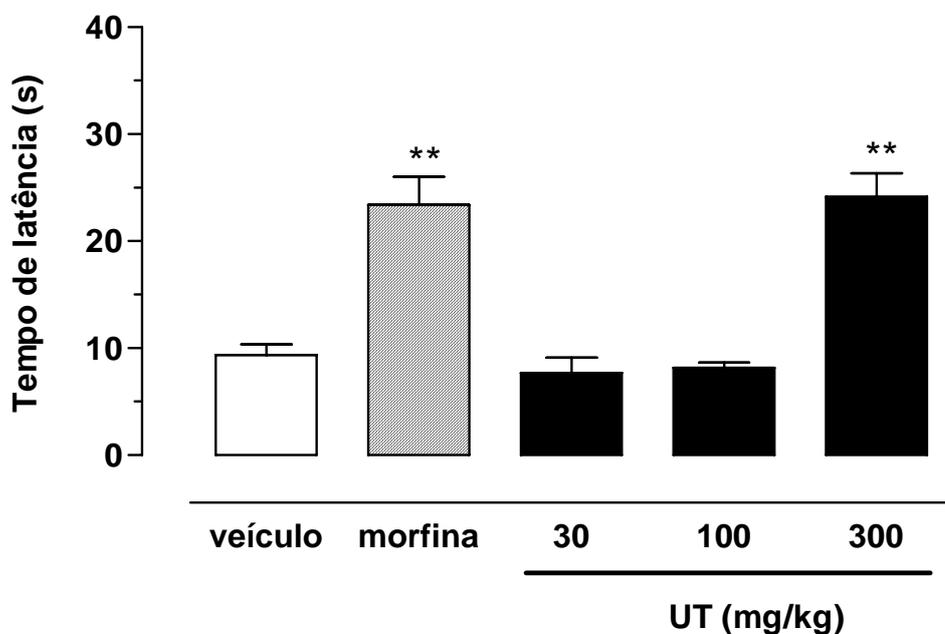


Figura 10: Efeito de UT (30, 100 e 300 mg/kg, i.p.) e morfina (10 mg/kg, s.c.), administrados 30 min antes, sobre o teste da placa quente em camundongos. A latência dos animais para pular, lambem ou sacudir as patas após serem colocados sobre uma superfície a 56°C foi medida (s). Cada barra representa a latência média de 6-10 animais \pm EPM. ** $p < 0,01$ representa diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados e o grupo controle, que recebeu apenas veículo (ANOVA seguido de Dunnett).

5.2 Avaliação do desempenho motor

5.2.1 Teste do *Rota rod*

O tratamento de camundongos com UT (100 e 300 mg/kg, i.p.), 30 min antes, não causou alteração significativa do desempenho motor em comparação com o grupo controle, quando avaliado o tempo de permanência na barra rotatória do aparelho de *rota-rod* (Figura 11).

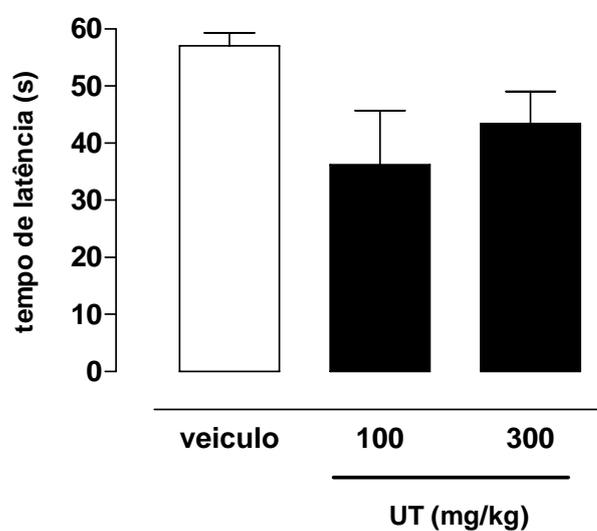


Figura 11: Avaliação do desempenho motor de animais tratados com UT (100 e 300 mg/kg, i.p.) 30 min antes do teste do *Rota-Rod*. Cada barra representa a média do tempo de permanência (s) de 8-10 animais \pm E.P.M. (ANOVA).

5.2.2 Teste do campo aberto

A atividade locomotora espontânea dos animais tratados com UT, avaliada pelos parâmetros de número de cruzamentos (Figura 12A) e de *rearing* (Figura 12B) no modelo do campo aberto, foi significativamente alterada pela dose de 100 mg/kg, administrada por via i.p. 30 min antes da exposição do animal à arena.

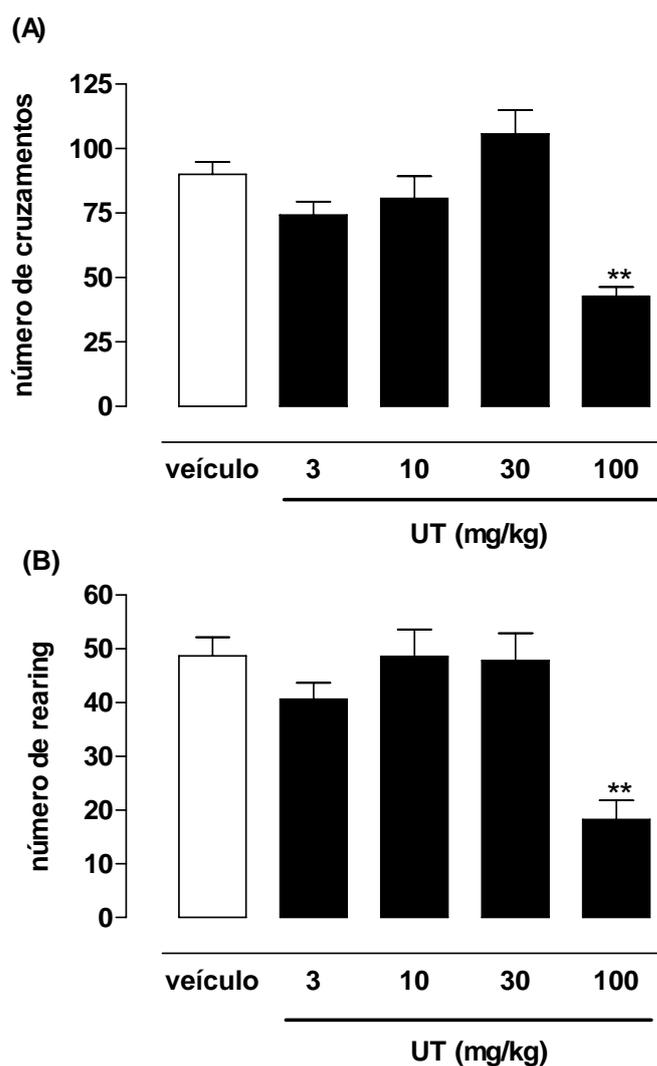


Figura 12: Efeito do tratamento com veículo (grupo controle) ou UT (3 – 100 mg/kg; i.p.) sobre a locomoção espontânea de camundongos expostos ao teste do campo aberto por um período de 5 min. As barras verticais representam a média de cruzamentos totais (A) ou de rearing (B) de 8 a 10 animais, e as linhas verticais os respectivos EPM. ** $p < 0,05$ representa diferenças estatisticamente significativas do grupo controle (ANOVA seguido de Dunnett).

5.3 Estudo do mecanismo de ação

5.3.1 Vias de transmissão nociceptiva

5.3.1.1 Participação do sistema L-arginina/óxido nítrico

Os resultados demonstrados na Figura 13 sugerem que a via de neurotransmissão do óxido nítrico não parece estar diretamente envolvida no mecanismo de ação de UT, pois a administração de L-ARG não foi capaz de reverter a ação antinociceptiva de UT na nocicepção induzida pela formalina. Em comparação, a administração de L-ARG reverteu completamente a ação antinociceptiva de L-NOARG. ANOVA revelou um efeito significativo do tratamento [$F(5,38) = 17,121$ (primeira fase) e $F(5,37) = 30,777$ (segunda fase); $P < 0,0001$].

5.3.1.2 Participação do sistema glutamatérgico e substância P a nível espinhal

O pré-tratamento dos animais com UT (100 mg/kg, i.p.) inibiu significativamente a nocicepção induzida por injeção i.t. de glutamato, NMDA e substância P, em aproximadamente 87 ± 8 , 96 ± 2 e 68 ± 15 %, respectivamente. Em contrapartida, o mesmo não se observou nas respostas induzidas por cainato, AMPA ou *trans*-ACPD (Figura 14). Estes dados sugerem um envolvimento do sistema glutamatérgico no efeito antinociceptivo de UT, possivelmente através da inibição dos receptores NMDA.

5.3.1.3 Participação das citocinas pró-inflamatórias a nível espinhal

As respostas nociceptivas induzidas pela injeção i.t. de IL-1 β (225 ± 32 s) ou TNF- α (275 ± 18 s) foram significativamente inibidas pelo pré-tratamento dos animais com UT (100 mg/kg, i.p.), em aproximadamente 96 ± 3 e 92 ± 6 %, respectivamente (

Figura 15).

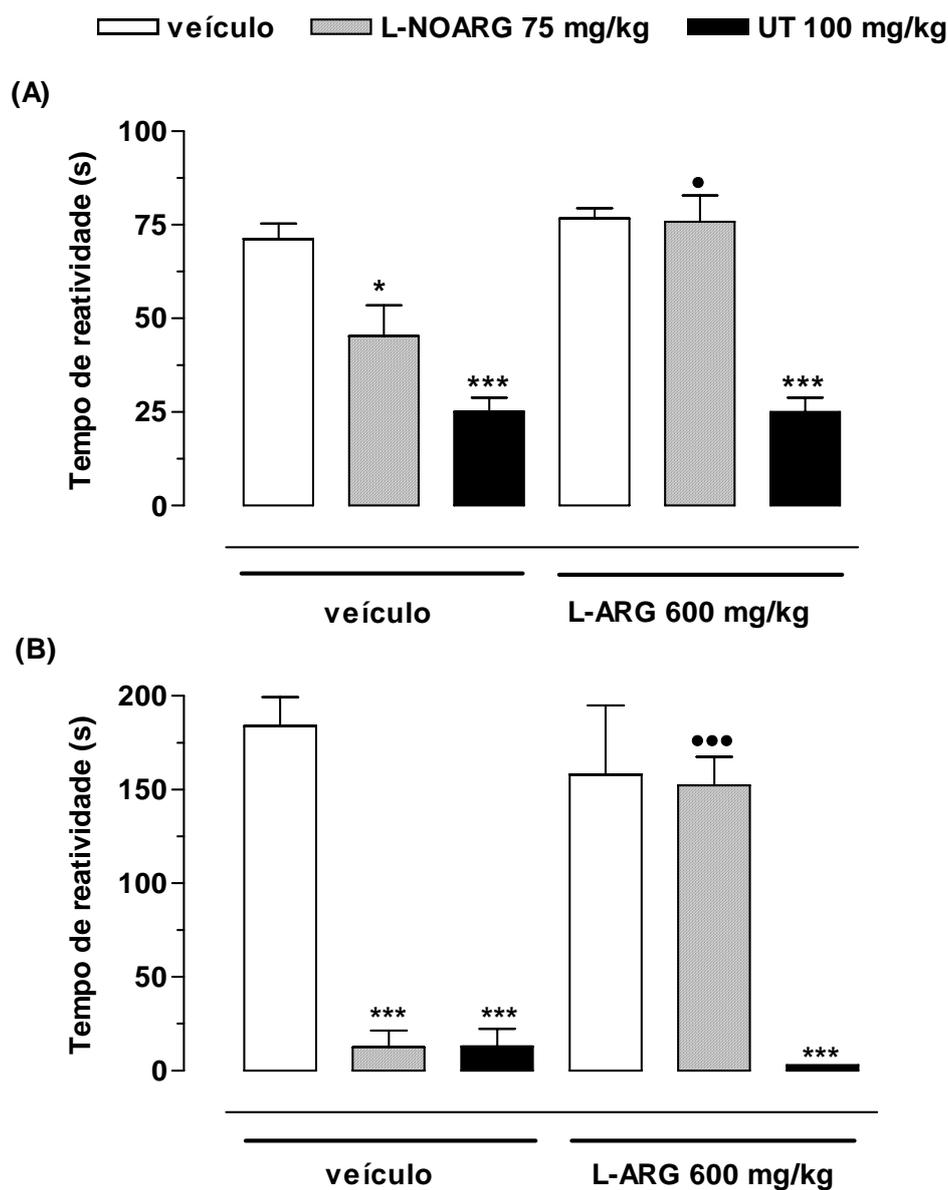


Figura 13: Influência do pré-tratamento com L-arginina (L-ARG; 600 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo causado por UT (100 mg/kg, i.p.) ou L-nitroarginina (L-NOARG; 75 mg/kg, i.p.) em relação à primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção i.pl. formalina 2,5%. Cada barra representa a média do tempo de reatividade (s) de 6 – 8 animais por grupo \pm EPM. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados e o grupo controle (apenas veículo), enquanto * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados com L-NOARG na ausência e na presença de L-ARG (ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls).

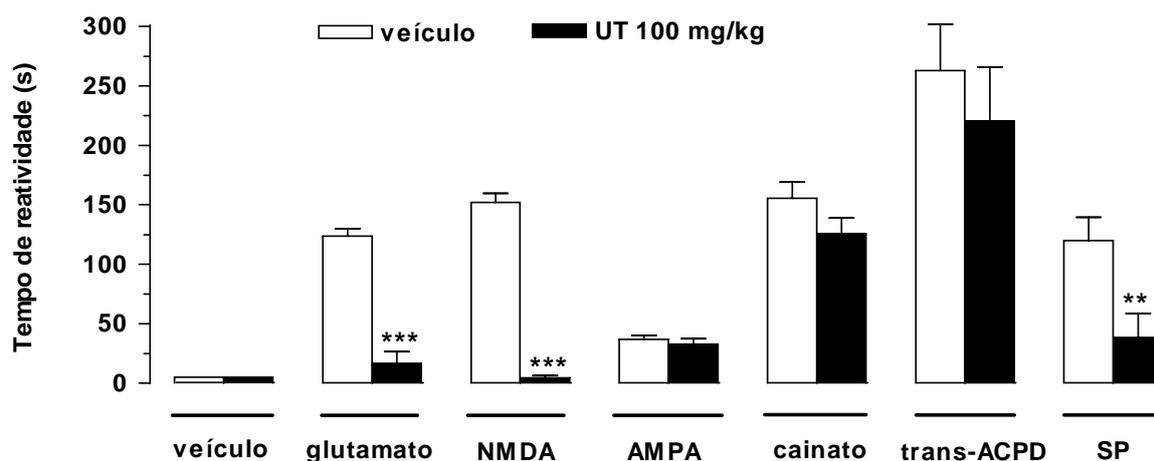


Figura 14: Efeito de UT (100 mg/kg, i.p.) na resposta comportamental nociceptiva induzida por injeção intratecal de glutamato (175 nmol/sítio), NMDA (450 pmol/ sítio), AMPA (135 pmol/ sítio), cainato (110 pmol/ sítio), *trans*-ACPD (ACPD; 50 nmol/ sítio) e substância P (SP; 100 pmol/ sítio), em camundongos. As barras verticais representam media de 6–10 animais \pm E.P.M. $**p < 0.01$ e $***p < 0.001$ representam diferenças estatisticamente significativas em relação ao respectivo grupo controle (veículo) (Teste t de Student).

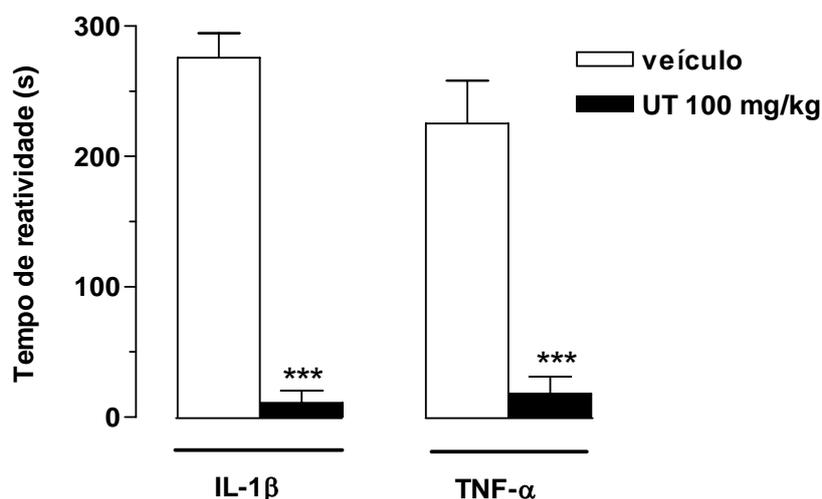


Figura 15: Efeito de UT (100 mg/kg; i.p.; 30 min) sobre a resposta comportamental nociceptiva induzida por injeção intratecal das citocinas pro-inflamatórias interleucina-1 β (IL-1 β ; 1.0 pg/ sítio) ou fator de necrose tumoral- α (TNF- α ; 0.1 pg/ sítio) em camundongos. As barras verticais representam a reatividade média (s) de 6-10 animais \pm E.P.M. $***p < 0.001$ representa diferença estatisticamente significativa em comparação ao respectivo grupo controle (veículo) (Teste t de Student).

5.3.2 Vias descendentes inibitórias

5.3.2.1 Participação do sistema opióide

O pré-tratamento dos animais com naltrexona (1 mg/kg, i.p.) causou reversão completa do efeito antinociceptivo da morfina (5 mg/kg, i.p.), porém, não afetou o efeito antinociceptivo causado pelo tratamento com UT (100 mg/kg, i.p.), na nocicepção induzida pela formalina (Figura 16). Estes resultados indicam ser improvável o envolvimento direto do sistema opióide no efeito antinociceptivo de UT. ANOVA revelou um efeito significativo do tratamento [$F(5,53) = 21,931$ (primeira fase) e $F(5,55) = 52,801$ (segunda fase); $P < 0,0001$].

5.3.2.2 Participação do sistema colinérgico-muscarínico

O possível envolvimento dos receptores muscarínicos no efeito antinociceptivo de UT foi testado através da administração de atropina (0,1 mg/kg, i.p.) aos animais, 15 min antes do tratamento com UT (100 mg/kg, i.p.). Conforme os dados apresentados na Figura 17, o pré-tratamento com atropina não reverteu o efeito antinociceptivo de UT em nenhuma das fases da nocicepção induzida por formalina, sugerindo que este mecanismo provavelmente não está envolvido neste efeito. ANOVA revelou um efeito significativo do tratamento [$F(3,26) = 19,165$ (primeira fase) e $F(3,23) = 40,077$ (segunda fase); $P < 0,0001$].

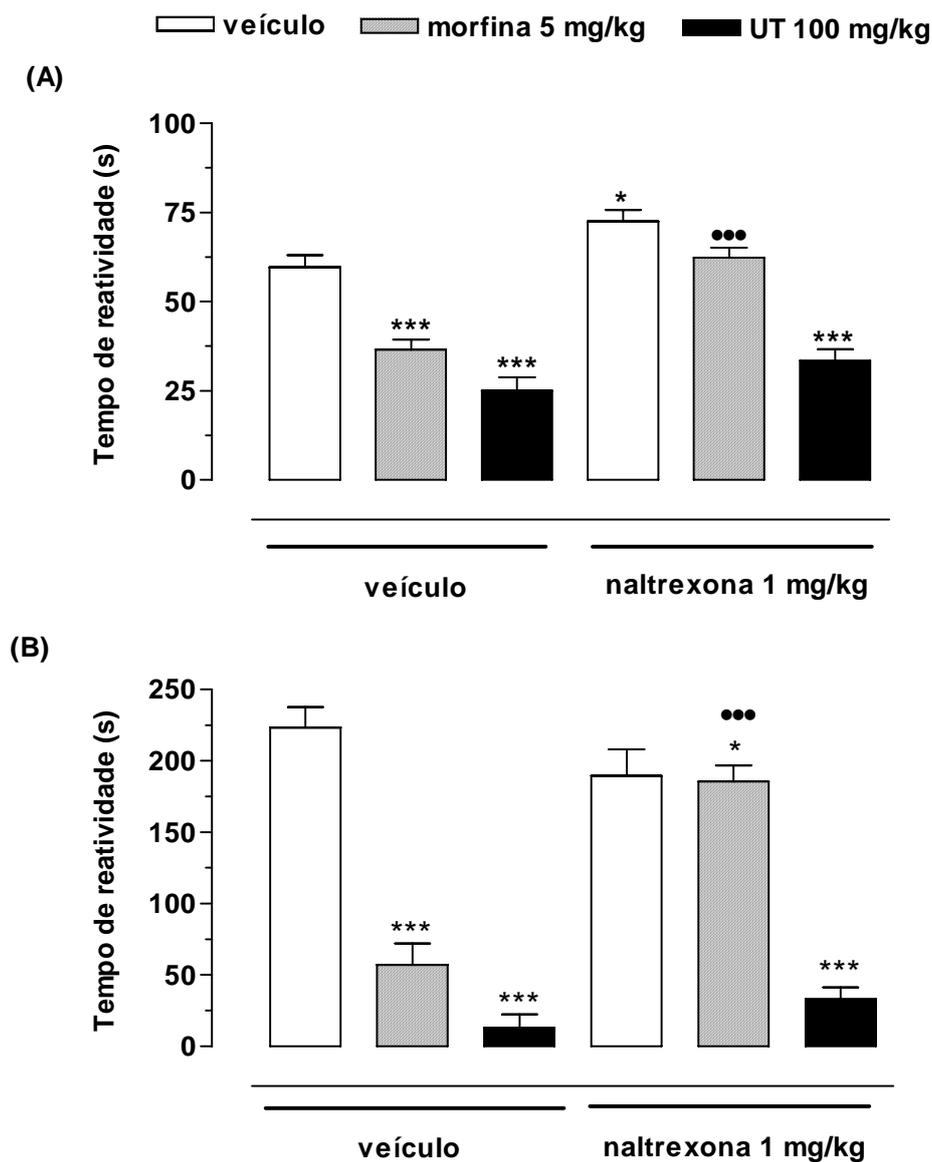


Figura 16: Influência do pré-tratamento com naltrexona (1 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo causado por UT (100 mg/kg, i.p.) ou morfina (5 mg/kg, i.p.) em relação à primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção i.p. de formalina 2,5%. Cada barra representa a média do tempo de reatividade (s) de 6 – 8 animais por grupo \pm EPM. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ representam as diferenças estaticamente significativas entre os grupos tratados e o grupo controle (apenas veículo), enquanto *** $p < 0.001$ representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com morfina na ausência e na presença de naltrexona (ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls).

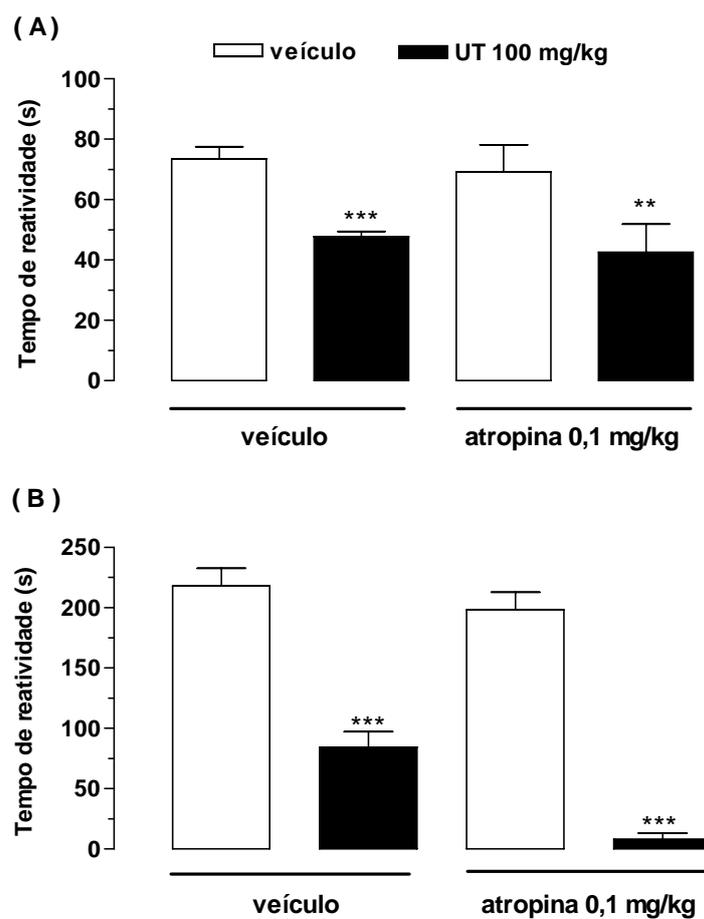


Figura 17: Influência do pré-tratamento com atropina (0,1 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo causado por UT (100 mg/kg, i.p.) em relação à primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção i.pl. de formalina 2,5%. Cada barra representa a média do tempo de reatividade (s) de 6 – 10 animais por grupo \pm EPM. *** $p < 0,001$ representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o grupo controle (apenas veículo) (ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls).

5.3.2.3 Participação do sistema adrenérgico α_1

Conforme os resultados da Figura 18, o pré-tratamento dos animais com prazosin (0,15 mg/kg, i.p.) causou completa reversão do efeito antinociceptivo apresentado pela fenilefrina (10 mg/kg, i.p.), na nocicepção induzida por formalina. Em contrapartida o prazosin não foi capaz de alterar o perfil de resposta dos animais tratados com UT (100 mg/kg, i.p.). Estes dados fornecem indícios para se sugerir que os receptores adrenérgicos α_1 não estão diretamente envolvidos no mecanismo de ação de UT. ANOVA revelou um efeito significativo do tratamento [$F(5,38) = 21,207$ (primeira fase) e $F(5,43) = 48,955$ (segunda fase); $P < 0,0001$].

5.3.2.4 Participação do sistema adrenérgico α_2

De acordo com os dados apresentados na Figura 19, a ioimbina (0,15 mg/kg, i.p.) não foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo produzido por UT (100 mg/kg, i.p.). Em contrapartida, o pré-tratamento com ioimbina causou completa reversão do efeito antinociceptivo produzido pela clonidina (0,1 mg/kg, i.p.), na nocicepção induzida por formalina. Estes dados fornecem indícios para se sugerir que, assim como os receptores adrenérgicos α_1 , os receptores α_2 não estão diretamente envolvidos no mecanismo de ação de UT. ANOVA revelou um efeito significativo do tratamento [$F(5,35) = 29,286$ (primeira fase) e $F(5,35) = 46,997$ (segunda fase); $P < 0,0001$].

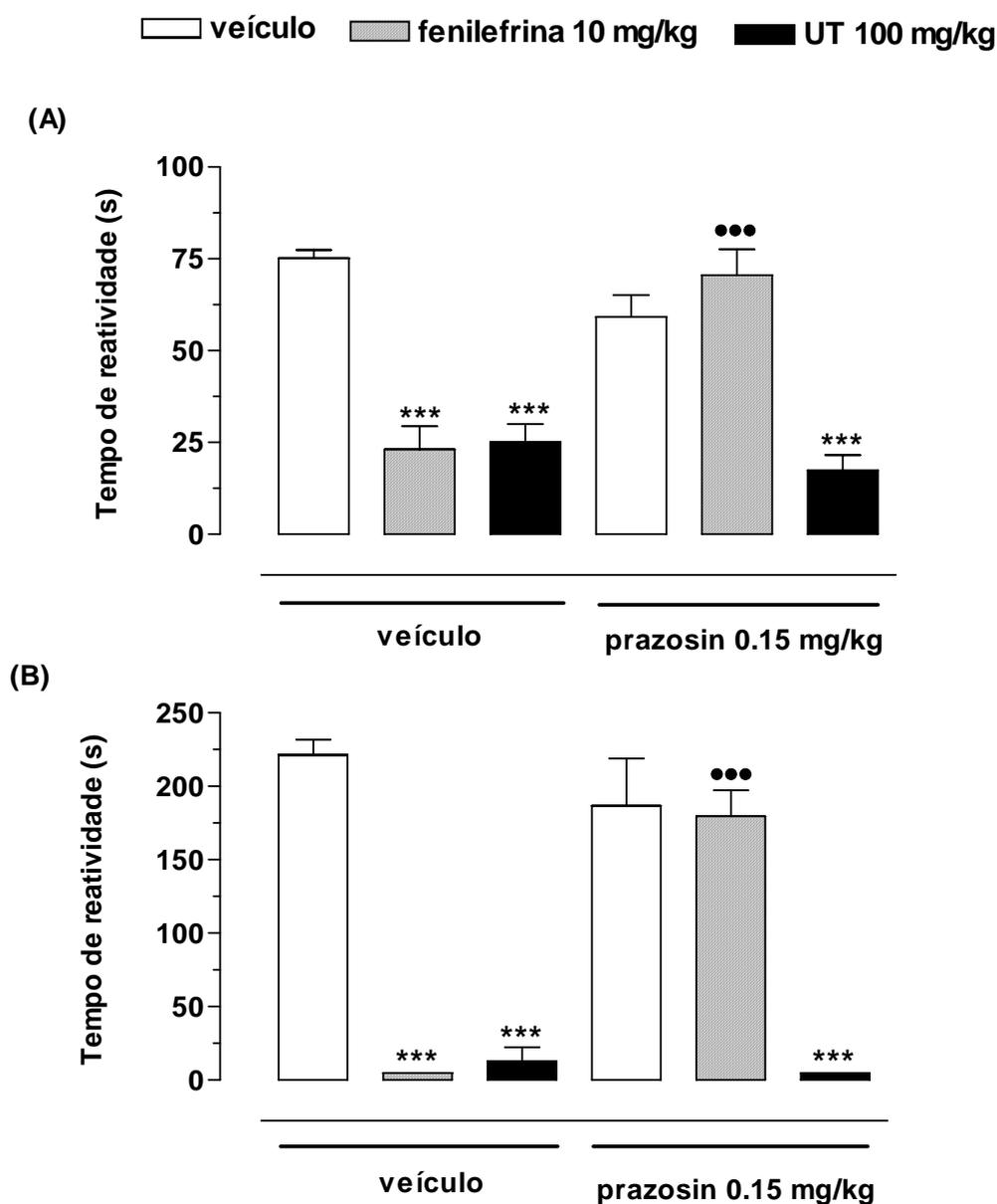


Figura 18: Influência do pré-tratamento com prazosin (0,15 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo causado por UT (100 mg/kg, i.p.) ou fenilefrina (10 mg/kg, i.p.) em relação à primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção i.pl. de formalina 2,5%. Cada barra representa a média do tempo de reatividade (s) de 6 – 10 animais por grupo \pm EPM. *** $p < 0,001$ representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o grupo controle (apenas veículo), enquanto *** $p < 0,001$ representa diferença estatisticamente significativa entre grupos tratados com fenilefrina na ausência e na presença de prazosin (ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls).

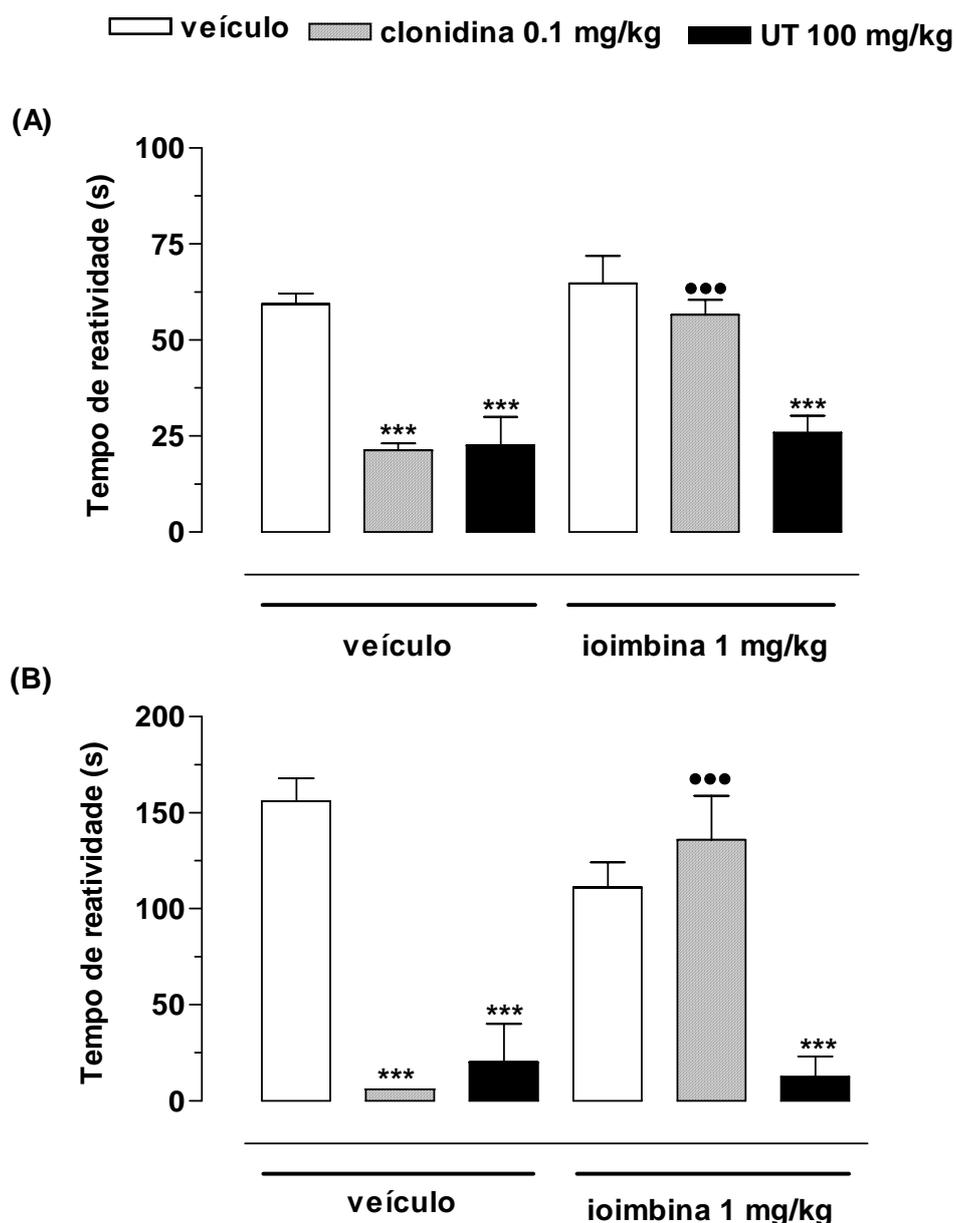


Figura 19: Influência do pré-tratamento com ioimbina (0,15 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo causado por UT (100 mg/kg, i.p.) ou clonidina (0,1 mg/kg, i.p.) em relação à primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção i.pl. de formalina 2,5%. Cada barra representa a média do tempo de reatividade (s) de 6 – 10 animais por grupo \pm EPM. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ representa diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados e o grupo controle (apenas veículo), enquanto * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados com clonidina na ausência e na presença de ioimbina (ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls).

5.3.2.5 Participação do sistema serotoninérgico 5-HT₂

O pré-tratamento dos animais com cetanserina (1 mg/kg, i.p.) reverteu o efeito antinociceptivo de DOI (1 mg/kg, i.p.), usado como controle positivo. Interessantemente, o pré-tratamento com cetanserina também foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo de UT (100 mg/kg, i.p.), marcadamente na segunda fase da nocicepção induzida por formalina, evidenciando o envolvimento de mecanismos serotoninérgicos neste efeito (Figura 20). ANOVA revelou um efeito significativo do tratamento [$F(5,40) = 19,001$ (primeira fase) e $F(5,39) = 20,991$ (segunda fase); $P < 0,0001$].

5.3.2.6 Participação dos estoques endógenos de aminas bioativas

O tratamento dos animais com reserpina (5 mg/kg, i.p.), 24 horas antes do teste da formalina, causou um aumento significativo da reatividade dos animais na segunda fase do teste (Figura 21 B). Ainda, o mesmo tratamento foi capaz de abolir o efeito antinociceptivo da clomipramina (10 mg/kg, i.p.), em ambas as fases da nocicepção (Figura 21 A e B). Em comparação, o tratamento 24 h antes com reserpina não alterou a resposta dos animais tratados com UT (100 mg/kg, i.p.) na nocicepção induzida pela formalina (Figura 21 A e B). Estes dados indicam que a ação antinociceptiva de UT é independente da presença de estoques vesiculares de monoaminas. ANOVA revelou um efeito significativo do tratamento [$F(5,36) = 19,280$ (primeira fase) e $F(5,38) = 116,68$ (segunda fase); $P < 0,0001$].

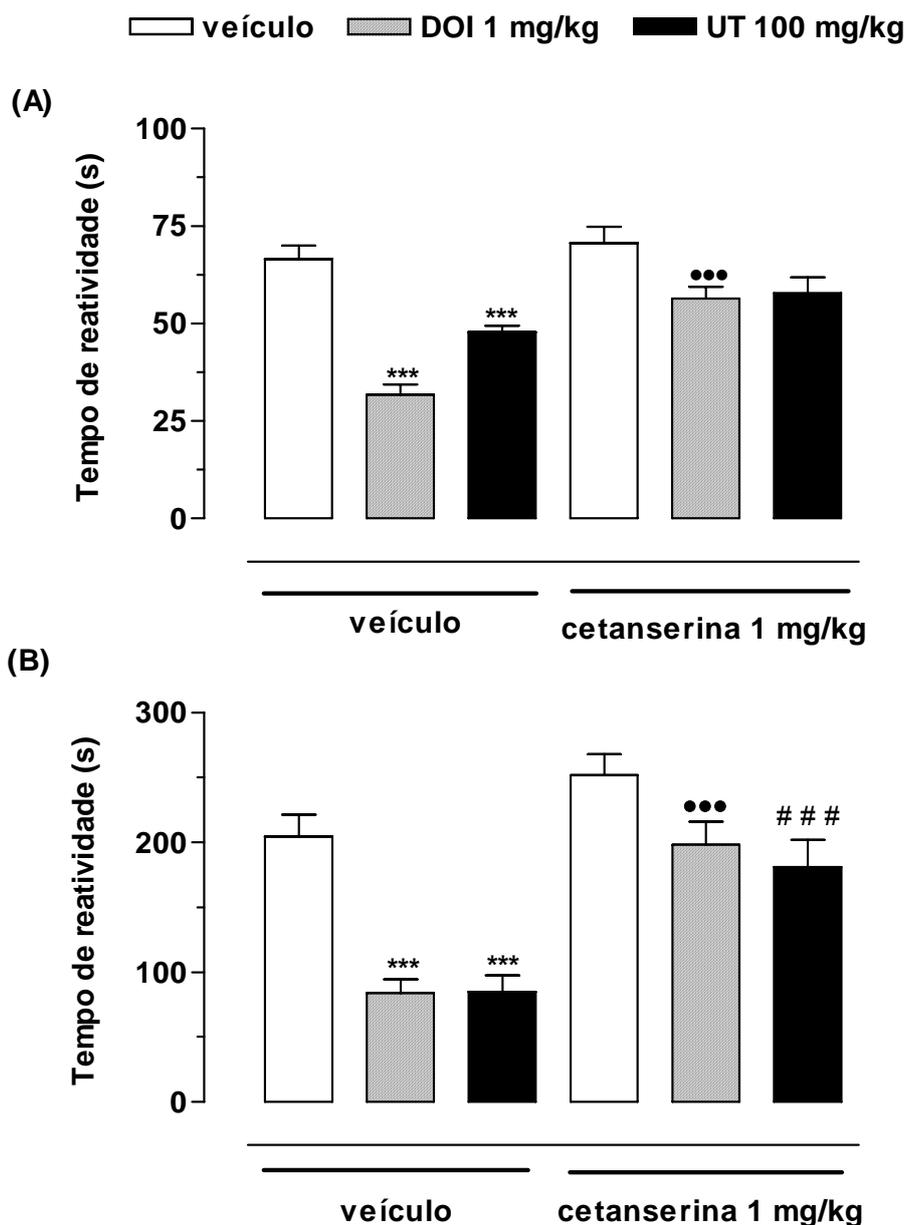


Figura 20: Influência do pré-tratamento com cetanserina (1 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo causado por UT (100 mg/kg, i.p.) ou DOI (1 mg/kg, i.p.) em relação à primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção i.pl. de formalina 2,5%. Cada barra representa a média do tempo de reatividade (s) de 6 – 10 animais por grupo \pm EPM. *** $p < 0,001$ representa diferença estaticamente significativa entre os grupos tratados e o grupo controle (apenas veículo), enquanto *** $p < 0,001$ representa diferença estaticamente significativa entre os grupos tratados com DOI na ausência e na presença de cetanserina, e ### $p < 0.001$ representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com UT na ausência e na presença de cetanserina (ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls).

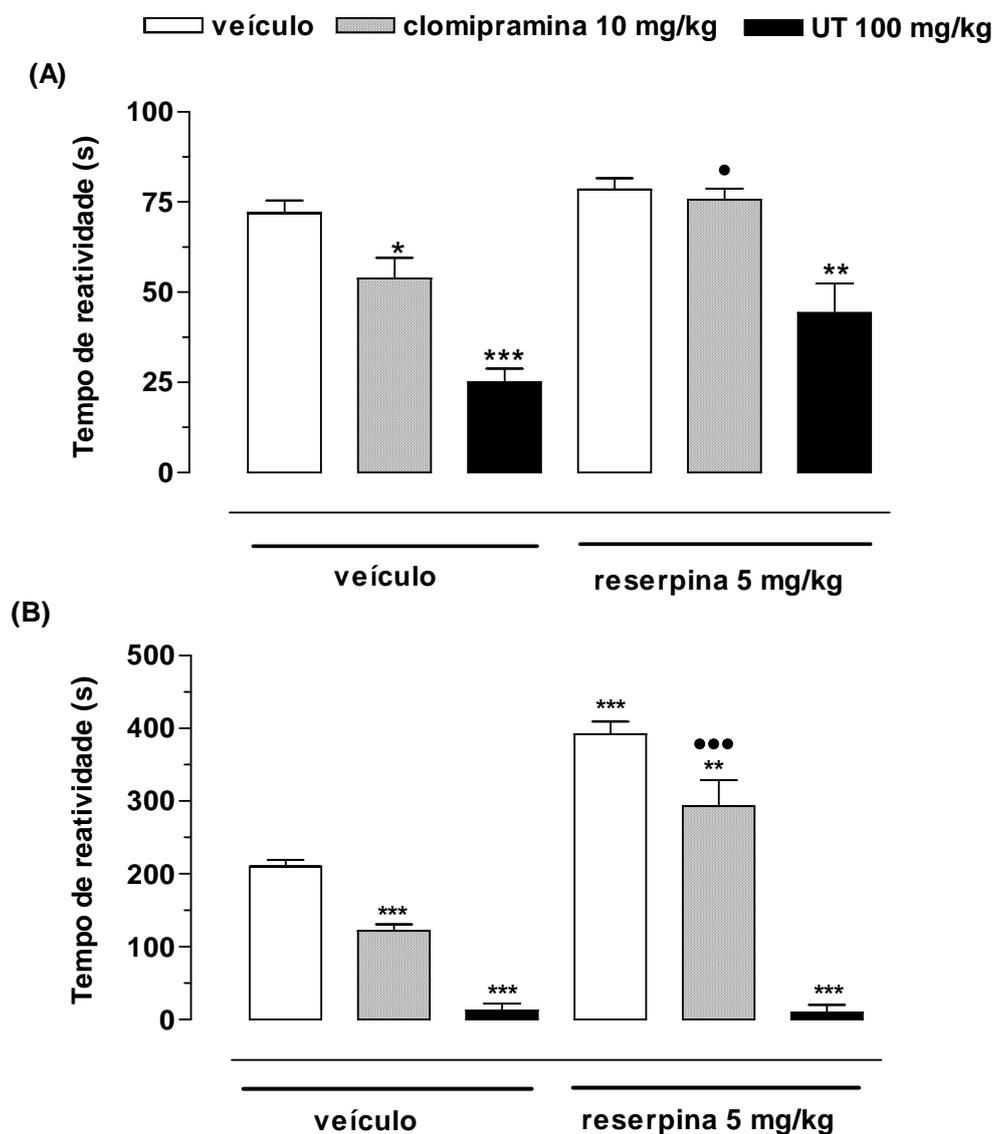


Figura 21: Influência do pré-tratamento com reserpina (5 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo causado por UT (100 mg/kg, i.p.) ou clomipramina (10 mg/kg, i.p.) em relação à primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção i.pl. de formalina 2,5%. Cada barra representa a média do tempo de reatividade (s) de 6-10 animais por grupo \pm EPM. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados e o grupo controle (apenas veículo), enquanto *** $p < 0,001$ representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com clomipramina, na ausência e na presença de reserpina (ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls).

6. Discussão

Nas últimas três décadas o consumo mundial de “Unha-de-gato” (*Uncaria tomentosa*) cresceu exponencialmente, após a descoberta por cientistas europeus de seu uso medicinal nas tribos indígenas do Peru. A exportação da planta para mais de trinta países atingiu um pico de 726 toneladas em 1996, refletindo a crescente busca por chás, comprimidos e cápsulas a base de “Unha-de-gato” (IRENA, 1996). A exploração descontrolada e extrativista das reservas naturais da planta suscitou a criação de movimentos de preservação da espécie e da floresta em que ela se desenvolve, bem como motivou a intervenção política de órgãos governamentais do Peru, maior exportador da matéria-prima vegetal em questão (DE JONG et al., 1999).

O estudo metuculoso das atividades biológicas e dos constituintes químicos das plantas medicinais é extremamente importante, não somente para validar o uso popular das mesmas, mas também para a descoberta de novas substâncias com potencial terapêutico. No caso da *U. tomentosa*, diversas atividades que já foram cientificamente investigadas e descritas servem de subsídio para a prescrição e uso de medicamentos fitoterápicos, em sua maioria compostos de extratos aquosos ou hidroalcoólicos, ou apenas as cascas *in natura* ou processadas (DE JONG et al., 1999). É importante se observar que neste tipo de produto, a composição química pode variar, porém a quantidade de alcalóides é invariavelmente baixa (< 5%) (LAUS et al., 1997). Desta forma, é preciso analisar cautelosamente os trabalhos que relatam atividades biológicas de *U. tomentosa* quanto ao tipo de extrato ou fração utilizada, pois a maioria refere-se a extratos aquosos e hidroalcoólicos, e somente alguns a compostos isolados.

Neste trabalho demonstrou-se, através de experimentos comportamentais, o efeito antinociceptivo de uma fração composta exclusivamente por alcalóides oxindólicos de *U. tomentosa*, em camundongos. Observou-se que o tratamento prévio dos animais com doses variadas de UT possui efeito antinociceptivo dependente da dose em modelos experimentais que empregam estímulos químicos e térmicos. Além disso, investigaram-se

alguns dos mecanismos conhecidos de controle da nocicepção, a fim de se identificar os possíveis alvos de ação de UT.

6.1 Modelos animais de nocicepção

Vários modelos de indução de nocicepção em animais são conhecidos e podem ser utilizados para a avaliação da atividade analgésica de diversas substâncias. Estes modelos consistem em proporcionar um estímulo nocivo ao animal, que pode ser de origem térmica, química, elétrica ou mecânica e posterior observação do comportamento do animal frente ao estímulo (LE BARS et al., 2001).

O teste das contorções abdominais é um modelo amplamente empregado na triagem de compostos com potencial atividade analgésica e antiinflamatória, pois se trata de um experimento de fácil realização e que possui uma elevada sensibilidade na detecção de tais atividades. A injeção i.p. de ácido acético provoca uma resposta comportamental característica, que é considerada um reflexo de dor visceral (VYKLYCKY, 1979; TJØLSEN e HOLE, 1997). Esta dor é decorrente, em parte, da ativação de nociceptores por mediadores pró-nociceptivos liberados em resposta à lesão tecidual provocada pelo baixo pH, tais como NA, bradicinina, prostanoídes, 5-HT e histamina, além de citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-8, liberadas por macrófagos e outras células residentes, (DUARTE et al., 1988; RIBEIRO et al., 2000; IKEDA et al., 2001). Outra contribuição importante reside na ativação direta dos nociceptores pelos prótons, através da abertura de uma ampla variedade de canais de cátions não-seletivos, como os receptores TRPV1, presentes nas terminações periféricas cutâneas e viscerais dos aferentes primários (IKEDA et al., 2001; REEH e KRESS, 2001). Neste modelo, o pré-tratamento com UT foi capaz de reduzir de maneira significativa e dose dependente o número de contorções abdominais, apresentando uma DI50 de 12,78 mg/kg e reduzindo drasticamente as contorções abdominais na dose mais elevada (100 mg/kg).

Este método, apesar de ser considerado bastante sensível por permitir a identificação de substâncias com baixo poder analgésico, é também pouco específico. Em parte, isto se deve ao fato de o teste ser sensível a substâncias com ação antinociceptiva que agem tanto no SNC, quanto no

sistema nervoso periférico, dificultando qualquer tipo de distinção (BENTLEY et al., 1981). Além disso, a resposta comportamental induzida pela injeção de ácido acético pode ainda ser inibida por antagonistas adrenérgicos e substâncias com ação relaxante muscular ou sedativa, o que conduz à interpretação errônea dos resultados (LE BARS et al., 2001). Para contornar esta particularidade do teste, UT foi analisado em outros modelos animais de nocicepção e também no teste de motilidade Rota rod. Este teste não demonstrou qualquer alteração significativa da função locomotora dos animais tratados com UT, mesmo nas doses mais elevadas.

A fim de se obter evidências mais específicas sobre a atividade antinociceptiva de UT, foram realizados outros testes de nocicepção induzida por estímulos químicos. Entre estes, encontra-se o teste da formalina, que é um teste clássico de nocicepção, sensível às diferentes classes de substâncias antinociceptivas. O teste, que consiste na injeção i.pl. de uma solução de formalina, provoca uma resposta comportamental bifásica, cujos mecanismos fisiológicos já foram bastante investigados e descritos (TJØLSEN et al., 1992). As duas fases da resposta à formalina têm mediação química e mecanismos modulatório distintos, apresentando diferenças marcantes quanto à sua sensibilidade às substâncias analgésicas (HUNSKAAR e HOLE, 1987; TJØLSEN et al., 1992; GUY e ABBOT, 1992). A primeira fase da nocicepção inicia-se imediatamente após a injeção de formalina e perdura por cerca de 5 min. Acredita-se que nesta fase ocorra uma estimulação direta dos nociceptores, predominantemente das fibras-C, com a participação da substância P, glutamato e bradicinina (SHIBATA et al., 1989). Esta fase é sensível apenas a analgésicos que atuam sobre o SNC (HUNSKAAR e HOLE, 1987). À primeira fase segue-se um período de quiescência, ou interfase, que dura em torno de dez minutos e é resultante da inibição ativa da excitabilidade dos nociceptores (HENRY et al., 1999). A segunda fase da nocicepção, que se inicia a partir dos quinze minutos após a injeção de formalina, é resultante de dois componentes: a sensibilização central dos nociceptores e neurônios de segunda ordem, e a ação de mediadores inflamatórios, como a histamina, 5-HT, bradicinina e a prostaglandina, liberados em decorrência da lesão tecidual (TJØLSEN et al., 1992; HOLE e TJØLSEN, 1993). Esta segunda fase da

nocicepção pode ser inibida tanto por antiinflamatórios não-esteroidais, como por substâncias que atuam no SNC (HUNSKAAR e HOLE, 1987).

O teste da formalina produz um estímulo nociceptivo de caráter tônico e moderado, que persiste por alguns minutos, e do qual o animal não pode se esquivar. Portanto, costuma-se associar este modelo ao que mais se assemelha à condição clínica de dor, sendo um modelo útil para a investigação de fármacos analgésicos em potencial (TJØLSEN et al., 1992). Dentro deste contexto, os resultados que mostram que o pré-tratamento com UT, pelas vias p.o. e i.p., reduziu significativamente e de maneira dose-dependente a reatividade dos animais em ambas as fases do teste da formalina, indica a possibilidade do seu uso terapêutico como analgésico. Além disso, os resultados sugerem que, em parte, os alcalóides de UT estariam atuando em mecanismos centrais, uma vez que o controle da primeira fase da nocicepção induzida pela formalina é realizado exclusivamente no SNC. No entanto, outros experimentos são necessários para a confirmação desta hipótese.

O efeito de UT quando administrado por via p.o. foi similar ao efeito demonstrado com a administração i.p. Ainda que os tempos de pré-tratamento tenham diferido, sendo de 60 min no primeiro caso e de 30 min no segundo, observou-se uma absorção oral satisfatória de UT, sugerindo que os compostos presentes na fração possuem boa biodisponibilidade.

Assim como a formalina, a capsaicina também é um importante agente irritante utilizado para indução de nocicepção. A capsaicina é a substância irritante presente na pimenta vermelha que, quando aplicada na pele ou injetada em animais adultos, evoca uma reação inicial de dor violenta, com subsequente dessensibilização que pode permanecer por semanas. Ela serve como ferramenta farmacológica valiosa para o estudo das fibras do tipo C e A δ por excitar seletivamente estas fibras (JANCSÓ et al., 1981; SAKURADA et al., 1992). A ativação dos nociceptores pela capsaicina se dá pela sua ligação a receptores vanilóides TRPV1, que consiste em um canal iônico permeável ao cálcio e ao sódio que também pode ser ativado pelo calor (> 43°C) ou por redução do pH (BEVAN e SZOLCSÁNYI, 1990; CATERINA et al., 1997; TOMINAGA et al., 1998; CLAPHAN, 2003). O influxo de cátions (Na⁺ e Ca⁺²) produz a despolarização e excitação dos neurônios causando a liberação de neuropeptídeos, tais como taquicinas e o CGRP, aminoácidos

excitatórios (aspartato e glutamato), óxido nítrico e mediadores pró-inflamatórios a partir dos terminais periféricos (SAKURADA et al., 1992, 1996, 2003). Assim como no teste da formalina, a administração de UT por via i.p. foi capaz de inibir a resposta nociceptiva evocada pela capsaicina de maneira dependente da dose, com inibição de 94% na maior dose testada (300 mg/kg).

Os modelos da retirada da cauda e placa quente utilizam estímulos térmicos potencialmente nocivos para evocar as reações de retirada da cauda e lambida da pata, respectivamente. Estes estímulos caracterizam uma dor transitória, ou seja, de curta duração, em que ocorre principalmente a ativação de fibras A δ sem necessariamente haver dano tecidual (YEOMANS e PROUDFIT, 1996). Por esse motivo, não são equivalentes a nenhum tipo de patologia humana, cujos quadros de dor são desencadeados principalmente por fibras C, mais sensíveis ao fenômeno de sensibilização (STEEN, et al. 1992). Ainda assim, estes modelos são úteis, pois permitem o estudo de substâncias com ação analgésica em nível central, como opióides e anestésicos gerais (WALKER et al., 1999b; LE BARS et al., 2001).

O estímulo térmico nocivo provoca uma resposta rápida, proporcional à frequência de ativação e classe de fibras ativadas (YAKSH, 1999). A transição da sensação de calor para a de dor em queimação ocorre na maioria das espécies a aproximadamente 45° C. Esta temperatura correlaciona-se com o limiar de ativação dos nociceptores polimodais, que são fibras-C (e algumas A δ), e respondem a estímulos nocivos de origem química, térmica e mecânica. Algumas fibras A δ são chamadas de “termo-nociceptores”, pois são relativamente insensíveis a estímulos mecânicos e possuem limiar de ativação superior a 53° C, sendo particularmente responsáveis pela percepção de estímulos térmicos nocivos (REICHLING e LEVINE, 2000). Estas fibras são estimuladas após a ativação dos receptores vanilóides dos tipos TRPV1 (VR1) e TRPV2 (VRL-1), que são canais de cátions relativamente não-seletivos, responsáveis pela despolarização dos neurônios em resposta ao aumento na temperatura. Mais especificamente, em fibras-C receptores TRPV1 são responsáveis por mediar a nocicepção a 45° C, enquanto em fibras-A δ receptores TRPV2 são responsáveis pela ativação a temperaturas elevadas (>50° C) (CATERINA et al., 1997).

O tratamento dos animais com UT demonstrou-se efetivo também nos testes de nocicepção térmica. Conforme discutido acima, a dose de UT necessária para aumentar significativamente a latência dos animais nestes modelos foi aproximadamente dez vezes maior que aquelas que produziram inibição significativa nos testes de indução da nocicepção por agentes químicos. No entanto, esta disparidade já era esperada, devido à conhecida diferença de sensibilidade entre os modelos de estímulo químico e térmico. Isto também é observado para outros analgésicos, como a morfina, cuja dose efetiva nos modelos de estímulo térmico é dezesseis vezes maior do que no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético (HAMMOND, 1989). Sabe-se que a morfina diminui as respostas no corno dorsal produzidas por fibras-C mais facilmente do que as produzidas por fibras-A δ , e que a ativação destas é predominante nos testes que utilizam estímulos térmicos nocivos (LE BARS et al., 1976, 2001). Ainda, é importante ressaltar que os resultados obtidos nos testes da placa quente e da retirada da cauda sugerem uma importante participação de mecanismos centrais na mediação da atividade antinociceptiva demonstrada por UT.

Quando injetado por via i.pl., o glutamato induz um comportamento característico de nocicepção de rápido início e curta duração, semelhante àquele provocado pela formalina, durante a primeira fase, e pela capsaicina (BEIRITH et al., 2002). Este efeito do glutamato é mediado por receptores glutamatérgicos NMDA e não-NMDA, nos níveis periférico, espinhal e supra-espinhal, através de mecanismos dependentes da via L-ARG/NO e da participação de neurocininas e cininas, ativando receptores NK e B₂, respectivamente (AULT e HILDEBRAND, 1993; BEIRITH et al., 2002, 2003). No teste de nocicepção induzida pela injeção i.pl. de glutamato observou-se que o pré-tratamento com UT reduziu a reatividade dos animais, apresentando uma DI50 de 58 mg/kg. Portanto, ao inibir a nocicepção induzida por injeção i.pl. de glutamato, UT pode estar interagindo com o sistema glutamatérgico, inibindo os receptores presentes nas vias sensoriais nos níveis periférico, central, ou sinergicamente em ambos. Ainda, é necessário considerar que esse efeito pode ser resultado de uma inibição da percepção da nocicepção, mediada por outro mecanismo.

Ao se investigar experimentalmente o efeito de uma substância em modelos animais, cujo parâmetro analisado se manifeste através de uma resposta comportamental, é necessário se investigar também a possibilidade desta substância produzir os efeitos sedativo ou relaxante-muscular. No caso da nocicepção, a integridade da função locomotora é necessária para que o animal consiga produzir a resposta comportamental de acordo com a intensidade do estímulo aplicado (LE BARS et al., 2001). O tratamento sistêmico dos animais com UT em doses elevadas (300 mg/kg) não produziu alteração significativa de sua função locomotora, avaliada através do teste do Rota-rod.

No entanto, quando expostos ao teste do campo aberto, os animais tratados com a dose de 100 mg/kg já demonstraram uma redução significativa da locomoção espontânea e do comportamento exploratório. Não se pode descartar a hipótese de que este efeito interfira de alguma maneira na avaliação da resposta nociceptiva nos modelos utilizados. Porém, é preciso observar que diversos analgésicos que exercem ação sobre o SNC possuem o efeito colateral de causar sedação. Entre os exemplos empregados na clínica, encontram-se os analgésicos opióides, a memantina e a ketamina, antagonistas dos receptores NMDA (BENNET, 2000; PARSONS, 2001)

6.2 Investigação do mecanismo de ação

O mecanismo neurofisiológico de transmissão da informação nociceptiva é realizado basicamente em três etapas: 1) a ativação periférica dos nociceptores e condução do impulso gerado até o SNC, 2) a transmissão da informação através da sinapse do corno dorsal entre o terminal das fibras aferentes primárias e os neurônios de projeção, e 3) a condução deste impulso até os centros superiores do SNC, onde se dá a percepção consciente da dor. Estas etapas estão sujeitas à modulação sináptica pela ação de diversos neurotransmissores excitatórios e inibitórios.

Do ponto de vista clínico, existem duas estratégias para se explorar os mecanismos endógenos de transmissão nociceptiva e se alcançar analgesia a nível central. Primeiramente, os mecanismos ascendentes de transmissão ou o controle descendente facilitatório podem ser interrompidos, impedindo ou

dificultando a chegada da informação nociceptiva aos centros superiores do SNC. Em segundo lugar, os mecanismos endógenos de controle descendente inibitório podem ser estimulados, e exercerem a função da primeira estratégia.

Os resultados obtidos nos diferentes modelos de indução de nocicepção discutidos acima sugerem que UT produz efeito antinociceptivo através da interferência no processamento central de impulsos nociceptivos ou, possivelmente, através dos mecanismos descendentes que controlam a transmissão nociceptiva. Sabe-se, no entanto, que a simples realização dos modelos utilizados para avaliar a nocicepção em animais de laboratório não permite inferir sobre detalhes de tais mecanismos. Para tanto, é necessário o uso de ferramentas farmacológicas que atuem em diferentes estágios do processamento das vias de informação nociceptiva. Por este motivo, foram realizados experimentos para investigação do mecanismo de ação de UT. O modelo da nocicepção induzida pela formalina foi utilizado para este fim devido à sensibilidade e especificidade em transmissão nociceptiva que este modelo apresenta (LE BARS et al., 2001). Além disso, este teste já foi bastante utilizado para investigações de mecanismos de ação, utilizando-se diversas substâncias com diferentes funções, bem como estimulação elétrica ou lesões em determinadas regiões do SNC e a ação de anestésicos locais (TJØLSEN et al., 1992).

A liberação de glutamato resultante dos impulsos que chegam através dos aferentes primários é o evento mais importante para a excitação dos neurônios do corno dorsal da medula espinhal (CODERRE e MELZACK, 1992). O glutamato age inicialmente através de receptores do tipo AMPA, produzindo uma rápida despolarização que remove o bloqueio basal do poro dos receptores NMDA pelos íons Mg^{2+} . É bem estabelecido que a ativação dos receptores NMDA promove o influxo de cálcio, que conduz a uma despolarização mais duradoura e a eventos intracelulares. Entre estes estão: ativação de proteína-quinases, mobilização do Ca^{2+} intracelular, indução de transcrição gênica e produção de mediadores nociceptivos e/ou inflamatórios, como PG e NO (HILL, 2001). Estes mediadores, por sua vez, aumentam a excitabilidade neuronal e provocam a liberação adicional de neurotransmissores e, conseqüentemente, a ativação das vias nociceptivas (HILL, 2001; MILLAN, 1999).

Investigou-se inicialmente a participação do sistema de transmissão L-ARG/NO na atividade antinociceptiva de UT. Sabe-se que a produção de NO está relacionada com a transmissão nociceptiva, a partir da ação de diversos mediadores pró-inflamatórios (MILLAN, 1999; 2002). Além disso, a liberação espinal de NO interfere com a nocicepção em vários níveis de transmissão e modulação desta resposta (MELLER e GEBHART, 1993). MOORE et al (1991) demonstraram que o inibidor da enzima NOS, L-NG-nitro-arginina-metil-éster (L-NAME), administrado pelas vias sistêmica e central, possui efeito antinociceptivo em ambas as fases da nocicepção induzida pela formalina. Da mesma forma, os resultados obtidos na presente investigação demonstraram que o inibidor da enzima NOS, L-NOARG, causou inibição da nocicepção no teste da formalina, em camundongos. O pré-tratamento dos animais com uma dose elevada de L-ARG, substrato para a enzima NOS, reverte o efeito antinociceptivo causado por L-NOARG. Entretanto, o pré-tratamento dos animais com L-ARG não foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo demonstrado por UT, sugerindo que o sistema L-ARG/NO não está diretamente envolvido neste efeito.

Os resultados observados no teste da nocicepção induzida por injeção i.pl. de glutamato suscitaram a continuidade da investigação do possível envolvimento dos alcalóides de UT com os receptores glutamatérgicos, através dos testes de indução da nocicepção por injeção i.t. de glutamato e substância P. O pré-tratamento sistêmico dos animais com UT inibiu o comportamento nociceptivo induzido pela injeção i.t. de glutamato, devido, possivelmente, a um efeito inibitório sobre a transmissão glutamatérgica no nível do corno dorsal. Para confirmação desta hipótese e também para verificar se este efeito está relacionado especificamente a algum receptor, agonistas seletivos dos diferentes tipos de receptores glutamatérgicos, ionotrópicos e metabotrópicos, foram injetados também por via i.t., produzindo cada um uma resposta comportamental nociceptiva específica. Os resultados mostram que o pré-tratamento sistêmico dos animais com UT foi eficaz em inibir a resposta induzida por NMDA, mas não por AMPA, cainato ou trans-ACPD (agonista dos receptores metabotrópicos). Estes dados interessantemente sugerem que os alcalóides de UT ao inibirem seletivamente a resposta induzida por NMDA atuam também de maneira seletiva sobre este

tipo de receptor glutamatérgico, e não sobre receptores dos tipos AMPA, cainato, ou receptores metabotrópicos. Além da transmissão sináptica, os receptores NMDA participam do fenômeno de sensibilização central dos nociceptores, processo crucial para a formação da dor persistente, constituindo, desta forma, um importante alvo para a ação de fármacos analgésicos (para revisão ver: BENNETT, 2000).

Conforme descrito por HYLLEN e WILCOX (1981), a injeção i.t. de substância P provocou nos animais um comportamento de coçar e morder a região caudal do corpo. O pré-tratamento dos animais com UT causou inibição significativa desta resposta, o que pode ser considerado mais um indicativo da ação inibitória deste sobre os receptores NMDA a nível espinhal. A resposta nociceptiva induzida pela SP é parcialmente mediada pela ativação desta classe de receptores, uma vez que seus efeitos despolarizantes induzem a remoção do bloqueio do receptor NMDA pelo íon Mg^{2+} e sua subsequente ativação (LIU et al., 1997; WU et al., 2004). De fato, estudos indicam que substância P e AAE encontram-se co-localizados em algumas fibras aferentes nociceptivas (DE BIASI e RUSKTONI, 1988). Além disso, nas sinapses do corno dorsal da medula espinhal existe uma interação marcante entre receptores NK1 e NMDA (URBAN et al., 1994a, 1994b). De acordo com o modelo proposto, a ativação de proteínas G acopladas ao receptor NK1 induz os seguintes eventos intracelulares: produção de diacilglicerol (DAG) e inositol-1,4,5-trifosfato (IP3), ativação da proteína-quinase C (PKC), fosforilação do receptor NMDA e conseqüente remoção do bloqueio deste pelo íon Mg^{2+} , aumento da concentração intracelular de cálcio (CHEN e HUANG, 1992). Em última instância, estes eventos intracelulares conduzem ao aumento da expressão de receptores NMDA e de SP (OHTORI et al., 2002).

Portanto, a partir dos resultados obtidos pode-se sugerir que o efeito antinociceptivo de UT é em parte decorrente da inibição seletiva dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, no nível espinhal. Esta suposição está de acordo com os dados existentes na literatura, que mostram através de experimentos eletrofisiológicos que os alcalóides oxindólicos rincofilina e isorincofilina inibem reversivelmente correntes mediadas por NMDA em receptores glutamatérgicos expressos em ovócitos de rã (KANG et al., 2002a). Neste contexto, o presente estudo apresenta, pela primeira vez, evidências

comportamentais da ação inibitória dos alcalóides oxindólicos de *U. tomentosa* sobre os receptores glutamatérgicos do tipo NMDA.

Citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , e IFN- γ são capazes de induzir comportamento nociceptivo quando injetadas por via i.t., na ausência de estímulo periférico nocivo (ROBERTSON et al., 1997; TADANO et al., 1999; CHOI et al., 2003). Este efeito está relacionado à ativação de terminais pré e pós-sinápticos, provocando respectivamente a liberação de glutamato e substância P, a ativação de neurônios das vias ascendentes nociceptivas e, em última instância, a percepção da dor (TADANO et al., 1999). O pré-tratamento dos animais com UT foi capaz de reduzir significativamente a nocicepção induzida pela injeção i.t. de IL-1 β e TNF- α . Este efeito pode ser decorrente da ação direta sobre receptores de citocinas, ou indireta, através da inibição da continuidade da transmissão nociceptiva. Em sintonia com dados da literatura e com os resultados descritos acima, acredita-se que o efeito observado neste experimento seja possivelmente resultante de uma ação inibitória sobre a transmissão glutamatérgica. Esta ação pode ainda ser pós-sináptica, inibindo a transmissão glutamatérgica via receptores NMDA a nível espinhal, ou pré-sináptica, através da inibição da liberação de glutamato e substância P a partir dos terminais centrais dos aferentes primários.

Quando observados em conjunto, os resultados dos testes de indução de nocicepção por injeção i.t. de glutamato, agonistas seletivos dos receptores glutamatérgicos, substância P e citocinas sugerem que a ação antinociceptiva de UT é decorrente, ao menos em parte, da inibição dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA no nível espinhal.

O primeiro mecanismo inibitório a ser estudado foi o relacionado aos receptores opióides. Este mecanismo é importante, pois a ativação destes receptores é efetiva em reduzir a nocicepção induzida nos diferentes modelos animais conhecidos (WALKER et al., 1999a; LE BARS et al., 2001). Além disso, os receptores opióides (μ , κ e δ) estão localizados em vários níveis da transmissão da dor (FÜRST, 1999), sendo responsáveis pelas ações antinociceptivas diretas e indiretas dos agonistas opióides (MICHAEL-TITUS et al., 1990; HUI et al., 2003; LEE et al., 2003b). Nos experimentos realizados neste trabalho, observa-se que a morfina aplicada por via i.p. apresentou atividade antinociceptiva pronunciada em ambas as fases da nocicepção

induzida pela formalina e que o tratamento prévio dos animais com naltrexona, um antagonista dos receptores opióides, reverteu a antinocicepção induzida pela morfina. Entretanto, a naltrexona não foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo de UT, sugerindo, assim, que os receptores opióides não estão envolvidos na mediação desta atividade, no modelo da formalina.

Em seguida, buscou-se estudar a possível participação das vias descendentes inibitórias mais amplamente estudadas, a adrenérgica e a serotoninérgica, na atividade antinociceptiva de UT. Estas vias desempenham um importante papel no controle do impulso nociceptivo, atuando de maneira bastante importante na inibição da transmissão da informação nociceptiva.

As projeções de neurônios adrenérgicos ao corno dorsal, desempenham ações diversas, pró ou antinociceptivas, através da ação da NA sobre seus receptores, conforme o tipo de receptor ativado e sua localização. A ativação dos receptores inibitórios α_2 pós-sinápticos no corno dorsal provoca uma redução moderada da estimulação dos neurônios de projeção pelas fibras aferentes primárias, e também uma redução na liberação de transmissores pró-nociceptivos, como a substância P e o glutamato, a partir de seus terminais (MILLAN et al., 1999). Desta forma, a ativação espinal destes receptores constitui uma importante estratégia terapêutica, e agonistas seletivos α_2 têm sido amplamente utilizados na clínica (EISENACH, 1994). Em contrapartida, receptores adrenérgicos α_1 são essencialmente excitatórios, dado seu acoplamento positivo à PLC e correntes de Ca^{2+} e sua ação inibitória sobre correntes de K^+ , e desempenham papel facilitatório quando localizados nos neurônios de projeção ou nas fibras aferentes primárias. Porém, esses receptores também apresentam um papel importante na antinocicepção espinal provocada pela NA, quando localizados em interneurônios inibitórios (HOWE et al., 1983). Conforme descrito na literatura e também observado em nossos experimentos, a atividade antinociceptiva da fenilefrina é bloqueada pela administração prévia do prazosin, no teste da formalina (TASKER et al., 1992). Da mesma forma a ioimbina foi capaz de reverter a ação antinociceptiva da clonidina no teste da formalina. Porém, ambos os tratamentos com os antagonistas α_1 e α_2 não reverteram o efeito antinociceptivo de UT, quando avaliada no teste da formalina, indicando possivelmente que o efeito

antinociceptivo de UT não se deve a mecanismos adrenérgicos mediados através destes receptores.

Os receptores 5-HT₂ exercem uma influência excitatória sobre atividade neuronal, devido ao acoplamento positivo à PLC e atividade inibitória sobre correntes de K⁺ (BOESS e MARTIN, 1994). Entretanto, quando localizados em interneurônios inibitórios da medula espinhal, a ativação dos receptores 5-HT₂ tem ação antinociceptiva, pois induz a liberação de neurotransmissores inibitórios como o GABA e as encefalinas (ALHAIDER et al., 1991; BARDIN et al., 2000; OBATA et al., 2001; SASAKI et al., 2001; MILLAN, 2002). A administração sistêmica de DOI, um agonista dos receptores 5-HT₂, tem efeito antinociceptivo no teste da formalina, que pode ser revertido pela administração prévia de cetanserina, um antagonista dos receptores 5-HT₂. Os resultados deste estudo sugerem que UT produz um efeito antinociceptivo que é, em parte, mediado por uma interação com receptores 5-HT₂. Isto se deve ao fato de que a administração de cetanserina foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo de UT no teste da formalina, em camundongos. Outros tipos de receptores serotoninérgicos ainda podem estar envolvidos na atividade antinociceptiva de UT, uma vez que somente os receptores 5-HT₂ foram estudados no presente trabalho.

Além disso, a ação dos alcalóides de UT parece ser diretamente sobre os receptores serotoninérgicos, e não dependente dos estoques endógenos de 5-HT, uma vez que o pré-tratamento dos animais com reserpina não impediu o efeito antinociceptivo. A reserpina depleta os estoques endógenos de monoaminas por impedir o seu transporte vesicular, o que, em condições normais, tem efeito exarcebante sobre a nocicepção induzida pela formalina. Sob essas circunstâncias, os antidepressivos inibidores da recaptação de monoaminas perdem seus efeitos antinociceptivos (DALBÓ et al., 2006). Outras evidências vêm corroborar com esta hipótese. Um estudo de KANG et al. (2002b) já havia estabelecido uma correlação entre alcalóides oxindólicos de *U. tomentosa* e receptores 5-HT₂. O estudo mostrou que a pteropodina e a isopteropodina, dois alcalóides oxindólicos pentacíclicos isolados da *U. tomentosa* e presentes na fração UT, produziram um aumento marcante nas correntes induzidas por 5-HT em receptores 5-HT₂ expressos em ovócitos de rã. Um outro estudo mostra através de experimentos

comportamentais e eletrofisiológicos que a rincofilina e a isorincofilina, dois alcalóides oxindólicos tetracíclicos de *U. tomentosa* também presentes na fração UT, suprimem a atividade central dos receptores 5-HT₂, atuando possivelmente como antagonistas competitivos do sítio receptor 5-HT_{2A} (MATSUMOTO et al., 2005).

Ainda, um trabalho de KANATANI et al. (1985) mostra que os alcalóides oxindólicos corinanteína, diidrocorinanteína, e geissoschizina-metil-éster reduzem a ligação da [³H]5-HT a preparações de membranas do cérebro de ratos. Além disso, no mesmo trabalho os autores demonstraram que estes alcalóides atuam como agonistas parciais dos receptores serotoninérgicos, em preparação de íleo de cobaia isolado. Tanto os alcalóides oxindólicos como a 5-HT, possuem um núcleo indólico e ambos são naturalmente sintetizados a partir do L-triptofano, o que pode justificar a semelhança estrutural e de ação (KITAJIMA et al., 2002).

É provável que exista uma relação entre estrutura e atividade por trás da diferença observada entre as ações positiva versus negativa dos alcalóides oxindólicos pentacíclicos e tetracíclicos, respectivamente, sobre a função dos receptores 5-HT₂. Essa variação na estrutura tridimensional dos alcalóides oxindólicos produzindo uma diversidade de efeitos farmacológicos já foi também observada em relação ao efeito imunoestimulante de *U. tomentosa*. Demonstrou-se que os alcalóides oxindólicos tetracíclicos são capazes de antagonizar a atividade imunoestimulante dos alcalóides oxindólicos pentacíclicos (KEPLINGER et al., 1999; LAUS e WURST, 2003).

Desta forma, o presente estudo complementa os dados da literatura, demonstrando pela primeira vez a atividade antinociceptiva de *U. tomentosa* e dos alcalóides oxindólicos obtidos a partir desta planta, em animais. Este estudo ainda vai além, apresentando evidências comportamentais do efeito dos alcalóides oxindólicos de *U. tomentosa* sobre os sistemas de neurotransmissão serotoninérgica e glutamatérgica. Uma investigação mais aprofundada destes mecanismos pode ter implicações futuras para a terapêutica, não somente no campo da dor, mas também de outras patologias em que estes sistemas estejam envolvidos.

7. Conclusões

Os resultados do presente trabalho indicam que:

- UT apresenta atividade antinociceptiva em camundongos após administração intraperitoneal e oral, em modelos de estímulo químico e térmico, sendo que a intensidade do efeito é dependente do modelo e da dose utilizada;
- O efeito antinociceptivo de UT é mediado, ao menos em parte, por uma ação sobre o SNC;
- A atividade antinociceptiva de UT envolve, em parte, a ativação da via descendente inibitória serotoninérgica, possivelmente através da ação direta sobre receptores 5-HT₂ espinhais;
- Parte da ação antinociceptiva de UT deve-se à inibição dos mecanismos que envolvem receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, a nível espinhal;
- As vias descendentes inibitórias que envolvem receptores opióides, receptores α_1 e α_2 adrenérgicos, e receptores colinérgicos muscarínicos, bem como a via L-arginina / óxido nítrico, não participam da ação antinociceptiva de UT;
- O tratamento dos animais com UT não produz disfunção motora nem possui atividade relaxante muscular, mas possui efeito sedativo e reduz a locomoção espontânea, em camundongos.

8. Referências Bibliográficas

- Afrah, A.W.; Stiller, C.O.; Olgart, L.; Brodin, E.; Gustafsson, H. Involvement of spinal N-methyl-D-aspartate receptors in capsaicin-induced in vivo release of substance P in the rat dorsal horn. **Neurosci. Lett.** 316: 83-86, 2001.
- Aguilar, J.L.; Rojas, P.; Marcelo, A.; Plaza, A.; Bauer, R.; Reininger, E.; Klaas, C.A.; Merfort, I. Anti-inflammatory activity of two different extracts of *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae). **J. Ethnopharmacol.** 81: 271-276, 2002.
- Akesson, C.; Lindgren, H.; Pero, R.W.; Leanderson, T.; Ivars, F. An extract of *Uncaria tomentosa* inhibiting cell division and NF- κ B activity without inducing cell death. **Int. Immunopharmacol.** 3: 1889-1900, 2003.
- Alhaider, A.A. Antinociceptive effect of ketanserin in mice: involvement of supraspinal 5-HT₂ receptors in nociceptive transmission. **Brain Res.** 543: 335– 340, 1991a.
- Alhaider, A.A.; Lei, S.Z.; Wilcox, G.L. Spinal 5-HT₃ receptor-mediated antinociception: possible release of GABA. **J. Neurosci.** 11: 1881– 1888, 1991b.
- Almeida, T.F.; Roizenblatt, S.; Tufik, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Res.** 1000: 40-56, 2004.
- Ameri, A. The effects of Aconitum alkaloids on the central nervous system. **Prog. Neurobiol.** 56: 211-235, 1998.
- Aquino, R.; De Simone, F.; Pizza, C. Plant metabolites, structure *in vitro* antiviral activity of quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa* and *Guettarda platypoda*. **J. Nat. Prod.** 52: 679-685, 1989.
- Aquino, R.; De Feo, V.; De Simone, F.; Pizza, C.; Cirino, G. Plant metabolites, new compounds and anti-inflammatory activity of *Uncaria tomentosa*. **J. Nat. Prod.** 54: 453-459, 1991.
- Aquino, R.; De Tommasi, N.; De Simone, F.; Pizza, C. Triterpenes and quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa*. **Phytochemistry** 45; 1035-1040, 1997.
- Ault, B.; Hildebrand, L.M. L-glutamate activates peripheral nociceptors. **Agents Actions** 39: 142-144, 1993.
- Bardin, L.; Lavarenne, J.; Eschalier, A. Serotonin receptor subtypes involved in the spinal antinociceptive effect of 5-HT in rats. **Pain** 86: 11 – 8, 2000.
- Bardin, L.; Tarayre, J.; Koek, W.; Colpaert, F.C. In the formalin model of tonic nociceptive pain, 8-OH-DPAT produces 5-HT_{1A} receptor-mediated, behaviorally specific analgesia. **Eur. J. Pharmacol.** 421: 109-114, 2001.

- Basbaum, A.I.; Fields, H.L. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. **Annu. Rev. Neurosci.** 7: 309– 338, 1984.
- Beirith, A.; Santos, A.R.; Rodrigues, A.L.; Creczynski-Pasa, T.B.; Calixto, J.B. Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyron in formalin, capsaicin and glutamate tests. Study of the mechanism of action. **Eur. J. Pharmacol.** 345: 233-245, 1998.
- Beirith, A.; Santos, A.R.; Calixto, J.B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Res.** 924: 219-228, 2002.
- Beirith, A.; Santos, A.R.; Calixto, J.B. The role of neuropeptides and capsaicin-sensitive fibres in glutamate-induced nociception and paw oedema in mice. **Brain Res.** 969: 110-116, 2003.
- Bennett, G.J. Update on the Neurophysiology of Pain Transmission and Modulation: Focus on the NMDA-Receptor. **J. Pain Symptom Manage.** 19: S2-6, 2000.
- Bentley, G.A.; Newton, S.H.; Starr, J. Evidence for an action of morphine and enkephalin on sensory nerve endings in the mouse peritoneum. **Br. J. Pharmacol.** 73: 325-333, 1981.
- Besson, J.M. The neurobiology of pain. **Lancet** 353: 1610-1615, 1999.
- Bevan, S.; Szolcsanyi, J. Sensory neuron-specific actions of capsaicin: mechanisms and applications. **Trends Pharmacol. Sci.** 11: 330-333, 1990.
- Bisset, N.G.; Bruhn, J.G.; Curto, S.; Holmstedt, B.; Nyman, U.; Zenk, M.H. Was opium known in 18th dynasty ancient Egypt? An examination of materials from the tomb of the chief royal architect Kha. **J. Ethnopharmacol.** 41: 99-114, 1994.
- Boess, F.G.; Martin, I.L. Molecular biology of 5-HT receptors. **Neuropharmacology** 33: 275–317, 1994.
- Caterina, M.J.; Schumacher, M.A.; Tominaga, M.; Rosen, T.A.; Levine, J.D.; Julius, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature** 389: 816– 824, 1997.
- Cerri, R. New quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa*. **J. Nat. Prod.** 51; 257-261, 1988.
- Cervero, F. What is a nociceptor-specific cell? **Pain** 62: 123-125, 1995.
- Chang, P.; Koh, Y.K.; Geh, S.L.; Soepadmo, E.; Goh, S.H.; Wong, A.K. Cardiovascular effects in the rat of dihydrocorynantheine isolated from *Uncaria callophylla*. **J. Ethnopharmacol.** 25: 213–215, 1989.

- Chen, L.; Huang, L.Y.M. Protein kinase C reduces Mg block of NMDA-receptor channels as a mechanism of modulation. **Nature** 356: 521-523, 1992.
- Choi, S.S.; Han, K.J.; Lee, J.K.; Lee, H.K.; Han, E.J.; Kim, D.H.; Suh, H.W. Antinociceptive mechanisms of orally administered decursinol in the mouse. **Life Sci.** 73: 471-485, 2003.
- Clapham, D.E. TRP channels as cellular sensors. **Nature** 426: 517-524, 2003.
- Coderre, T.J.; Melzack, R. The contribution of excitatory amino acids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury. **J. Neurosci.** 12: 3665-3670, 1992.
- Coggeshall, R.E.; Carlton, S.M. Receptor localization in the mammalian dorsal horn and primary afferent neurons. **Brain Res. Rev.** 24: 28-66, 1997.
- Conn, P.J.; Pin, J.P. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 37: 205-237, 1997.
- Craig, A.D. Pain mechanisms: Labeled lines versus convergence in central processing. **Annu. Rev. Neurosci.** 26: 1-30, 2003.
- Cunha, F.Q.; Poole, S.; Lorenzetti, B.B.; Ferreira, S.H. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.** 107: 660-664, 1992.
- D'amour, F.E.; Smith, D.L. A method for determining loss of pain sensation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 72: 74-79, 1941.
- Dalbo, S.; Jurgensen, S.; Horst, H.; Soethe, D.N.; Santos, A.R.; Pizzolatti, M.G.; Ribeiro-do-Valle, R.M. Analysis of the antinociceptive effect of the proanthocyanidin-rich fraction obtained from *Croton celtidifolius* barks: Evidence for a role of the dopaminergic system. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 85: 317-323, 2006.
- Danysz, W.; Parsons, C.G. Glycine and N-methyl-D-aspartate receptors: physiological significance and possible therapeutic applications. **Pharmacol. Rev.** 50: 597-664, 1998.
- De Biasi, S.; Rustioni, A. Glutamate and substance P coexist in primary afferent terminals in the superficial laminae of spinal cord. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 85: 7820-7824, 1988.
- De Jong, W.; Melnyk, M.; Lozano, L.A.; Rosales, M.; Garcia, M. Uña de gato: fate and future of a Peruvian forest resource. Center for International Forestry Research, Indonesia. **CIFOR Occasional Paper** 22: 1-14, 1999.
- De Martino, L.; Martinot, J.I.; Franceschelli, S.; Leone, A.; Pizza, C.; De Feo, V. Proapoptotic effect of *Uncaria tomentosa* extracts. **J. Ethnopharmacol.** 107: 91-94, 2006.

- Desmarchelier, C.; Mongelli, E.; Coussio, J.; Ciccia, G. Evaluation of the in vitro antioxidant activity in extracts of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. **Phytother. Res.** 11: 254–256, 1997.
- Dingledine, R.; Borges, K.; Bowie, D.; Traynelis, S.F. The glutamate receptor ion channels. **Pharmacol. Rev.** 51: 7-61, 1999.
- Duarte, I.D.; Nakamura, M.; Ferreira, S.H. Participation of the sympathetic system in acetic acid-induced writhing in mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 21: 341-343, 1988.
- Eddy, N.B.; Leimbach, D. Syntetic analgesics II. Dithienil-butenyl and dithienylbutylamines. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 107: 385-393, 1953.
- Eisenach, J.C. Alpha2 agonists and analgesia. **Exp. Opin. Invest. Drugs** 3: 1005–1010, 1994.
- Elisabetsky, E.; Amador, T.A.; Albuquerque, R.R.; Nunes, D.S.; Carvalho, A.C.T. Analgesic activity of *Psychotria colorata* (Willd. ex R. & S.) Muell. Arg. alkaloids. **J. Ethnopharmacol.** 48: 77-83, 1995.
- Fürst, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Res. Bull.** 48; 129-141, 1999.
- Gadotti V.M.; Tibola, D.; Pazcuk, A.F.; Rodrigues, A.L.S.; Calixto, J.B.; Santos, A.R.S. Contribution of spinal glutamatergic receptors to the antinociception caused by agmatine in mice. **Brain Res.** 1093: 116-122, 2006.
- Ginkel, A. Identification of the alkaloids and flavonoids from *Uncaria tomentosa* bark by TLC in quality control. **Phytother Res.** 10: 18-19, 1996.
- Gonçalves, C.; Dinis, T.; Batista, M.T. Antioxidant properties of proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa* bark decoction: a mechanism for anti-inflammatory activity. **Phytochemistry** 66: 89-98, 2005.
- Guy, E.R.; Abbott, F.V. The behavioral response to formalin in preweanling rats. **Pain** 51: 81-90, 1992.
- Hammond, D.L. Inference of pain and its modulation from simple behaviors. In: Chapman, C.R., Loeser, J.D. editors. **Issues in Pain Measurement: Advances in Pain Research and Therapy.** Raven Press: New York. vol 12, pp 69–91, 1989.
- Henry, J.L.; Yashpal, K.; Pitcher, G.M.; Coderre, T.J. Physiological evidence that the interphase in the formalin test is due to active inhibition. **Pain** 82: 57–63, 1999.
- Herrero, J.F.; Laird, J.M.; Lopez-Garcia, J.A. Wind-up of spinal cord neurones and pain sensation: much ado about something? **Prog. Neurobiol.** 61: 169-203, 2000.

- Hill, R.G. Molecular basis for the perception of pain. **Neuroscientist** 7: 282-292, 2001.
- Hole, K.; Tjølsen, A. The tail-flick and formalin tests in rodents: changes in skin temperature as a confounding factor. **Pain** 53: 247-254, 1993.
- Horie, S.; Yano, S.; Aimi, N.; Sakai, S.; Watanabe, K. Effects of hirsutine, an antihypertensive indole alkaloid from *Uncaria rhynchophylla*, on intracellular calcium in rat thoracic aorta. **Life Sci.** 50: 491-498, 1992.
- Howe, J.R.; Wang, J.T.; Yaksh, T.L. Selective antagonism of the antinociceptive effect of intrathecally applied α -adrenergic agonists by intrathecal prazosin and intrathecal yohimbine. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 224: 552-558, 1983.
- Hui, L.I.; Le, W.U.; Yun-Qing, L.I. Opioid peptides modulate the response of neurons of the superficial laminae of the rat spinal dorsal horn to GABA. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 307: 730-736, 2003.
- Hunskar, S.; Hole, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain** 30: 103-114, 1987.
- Hunskar, S.; Fasmer, O.B.; Hole, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **J. Neurosci. Methods** 14: 69-73, 1985.
- Hunt, S.P.; Mantyh, P.W. The molecular dynamics of pain control. **Nat. Rev. Neurosci.** 2: 83-91, 2001.
- Hylden, J.L.; Wilcox, G.L. Intrathecal morphine in mice: a new technique. **Eur. J. Pharmacol.** 67: 313-316, 1980.
- Hylden, J.L.; Wilcox, G.L. Intrathecal substance P elicits a caudally-directed biting and scratching behavior in mice. **Brain Res.** 217: 212-215, 1981.
- Ikeda, Y.; Ueno, A.; Naraba, H.; Oh-ishi, S. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanooids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Sci.** 69: 2911-2919, 2001.
- INRENA. 1996. Anuario estadístico de exportaciones de flora y fauna silvestres, Año 1995. Instituto Nacional de Recursos Naturales, Ministerio de Agricultura, Lima, Peru.
- IUPHAR, International Union of Basic and Clinical Pharmacology. (2006) IUPHAR Receptor Database. Disponível em www.iuphar-db.org. Acessado em 17/01/2007.
- Jancsó, G.; Hokfelt, T.; Lundberg, J.M.; Kiraly, E.; Halasz, N.; Nilsson, G.; Terenius, L.; Rehfeld, J.; Steinbusch, H.; Verhofstad, A.; Elde, R.; Said, S.; Brown, M. Immunohistochemical studies on the effect of capsaicin on spinal and medullary peptide and monoamine neurons using antisera to substance P, gastrin/CCK, somatostatin, VIP, enkephalin, neurotensin and 5-hydroxytryptamine. **J. Neurocytol.** 10: 963-980, 1981.

- Jensen, T.S.; Yaksh, T.L. Effects of an intrathecal dopamine agonist, apomorphine, on thermal and chemical evoked noxious responses in rats. **Brain Res.** 296: 285-293, 1984.
- Julius, D.; Basbaum, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature** 413: 203-210, 2001.
- Jung, J.W.; Ahn, N.Y.; Oh, H.R.; Lee, B.K.; Lee, K.J.; Kim, S.Y.; Cheong, J.H.; Ryu, J.H. Anxiolytic effects of the aqueous extract of *Uncaria rhynchophylla*. **J. Ethnopharmacol.** 108: 193-197, 2006.
- Jürgensen, S.; DalBó, S.; Angers, P.; Santos, A.R.S; Ribeiro-doValle, R.M. Involvement of 5-HT₂ receptors in the antinociceptive effect of *Uncaria tomentosa*. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 81: 466-477, 2005.
- Kanatani, H.; Kohda, H.; Yamasaki, K.; Hotta, I.; Nakata, Y.; Segawa, T.; Yamanaka, E.; Aimi, N.; Sakai, S. The active principles of the branchlet and hook of *Uncaria sinensis* Oliv. examined with a 5-hydroxytryptamine receptor binding assay. **J. Pharm. Pharmacol.** 37: 401-404, 1985.
- Kang, T.H.; Murakami, Y.; Matsumoto, K.; Takayama, H.; Kitajima, M.; Aimi, N.; Watanabe, H. Rhynchophylline and isorhynchophylline inhibit NMDA receptors expressed in *Xenopus* oocytes. **Eur. J. Pharmacol.** 455: 27-34, 2002a.
- Kang, T.; Matsumoto, K.; Tohda, M.; Murakami, Y.; Takayama, H.; Kitajima, M.; Aimi, N.; Watanabe, H. Pteropodine and isopteropodine positively modulate the function of rat muscarinic M₁ and 5-HT₂ receptors expressed in *Xenopus* oocyte. **Eur. J. Pharmacol.** 444: 39– 45, 2002b.
- Kang, T.H.; Murakami, Y.; Takayama, H.; Kitajima, M.; Aimi, N.; Watanabe, H.; Matsumoto, K. Protective effect of rhynchophylline and isorhynchophylline on in vitro ischemia-induced neuronal damage in the hippocampus: putative neurotransmitter receptors involved in their action. **Life Sci.** 76; 331-343, 2004.
- Keplinger, K.; Laus, G.; Wurm, M.; Dierich, M.P.; Teppner, H. *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. – ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical results. **J. Ethnopharmacol.** 64: 23-34, 1999.
- Kitajima, M.; Yokoya, M.; Takayama H.; Aimi, N. Synthesis and absolute configuration of a new 3,4-dihydro-beta-carboline-type alkaloid, 3,4-dehydro-5(S)-5-carboxystrictosidine, isolated from Peruvian Una de Gato (*Uncaria tomentosa*). **Chem. Pharm. Bull.** 50; 1376– 1378, 2002.
- Klockgether-Radke, A.P. F. W. Serturmer and the discovery of morphine. 200 years of pain therapy with opioids. **Anesthesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther.** 37: 244-249, 2002.
- Koster, R.; Anderson, M.; Beer, E.J. Acetic acid for analgesic screening. **Fed. Proc.** 18: 412, 1959.

- Küpeli, E.; Koşar, M.; Yeşilada, E.; Başer, K.H.C.; Başer, C. A comparative study on the anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effects of isoquinoline alkaloids from the roots of Turkish Berberis species. **Life Sci.** 72: 645–657, 2002.
- Laus, G.; Keplinger, D. Separation of stereoisomeric oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* by high performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. A.** 662: 243-249, 1994.
- Laus, G.; Brössner, D.; Keplinger, K. Alkaloids of Peruvian *Uncaria tomentosa*. **Phytochemistry** 45: 855-860, 1997.
- Laus, G.; Wurst, K. X-ray crystal structure analysis of oxindole alkaloids. **Helvetica Chimica Acta** 86: 181–187, 2003.
- Le Bars, D.; Guilbaud, G.; Jurna, I.; Besson, J.M. Differential effects of morphine on responses of dorsal horn lamina V type cells elicited by A and C fiber stimulation in the spinal cat. **Brain Res.** 115: 518– 524, 1976.
- Le Bars, D.; Gozariu, M.; Cadden, S.W. Animal models of nociception. **Pharmacol. Rev.** 53: 597-652, 2001.
- Lee, J.; Son, D.; Lee, P.; Kim, S.Y.; Kim, H.; Kim, C.J.; Lim, E. Alkaloid fraction of *Uncaria rhynchophylla* protects against N-methyl-D-aspartate-induced apoptosis in rat hippocampal slices. **Neurosci. Lett.** 348: 51-55, 2003.
- Lee, J.J.; Hahm, E.T.; Min, B.I.; Han, S.H.; Cho, J.J.; Cho, Y.W. Roles of protein kinase A and C in the opioid potentiation of the GABA_A response in rat periaqueductal gray neuron. **Neuropharmacology** 44: 573-583, 2003.
- Lemaire, I.; Assinewe, V.; Cano, P.; Awang, D.V.C.; Arnason, J.T. Stimulation of interleukin-1 and -6 production in alveolar macrophages by the neotropical liana, *Uncaria tomentosa* (Una de Gato). **J. Ethnopharmacol.** 64: 109-115, 1999.
- Liu, H.; Wang, H.; Sheng, M.; Jan, L.Y.; Jan, Y.N.; Basbaum, A.I. Evidence for presynaptic N-methyl-D-aspartate autoreceptors in the spinal cord dorsal horn. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 91: 8383-8387, 1994.
- Liu, H.; Mantyh, P.W.; Basbaum, A.I. NMDA-receptor regulation of substance P release from primary afferent nociceptors. **Nature** 386: 721-724, 1997.
- Loeser, J.D.; Melzack, R. Pain: an overview. **Lancet** 353: 1607-1609, 1999.
- Martin, S.F.; Mortimore, M. New methods for the synthesis of oxindole alkaloids. Total synthesis of isopteropodine and pteropodine. **Tetrahedron Lett.** 31: 4557-4560, 1990.
- Masumiya, H.; Saitoh, T.; Tanaka, Y.; Horie, S.; Aimi, N.; Takayama, H.; Tanaka, H.; Shigenobu, K. Effects of hirsutine and dihydrocorynantheine on

- the action potentials of sino-atrial node; atrium and ventricle. **Life. Sci.** 65: 2333-2341, 1999.
- Matsumoto, K.; Mizowaki, M.; Suchitra, T.; Takayama, H.; Sakai, S.; Aimi, N.; Watanabe, H. Antinociceptive action of mitragynine in mice: evidence for the involvement of supraspinal opioid receptors. **Life. Sci.** 59: 1149-1155, 1996.
- Matsumoto, K.; Horie, S.; Ishikawa, H.; Takayama, H.; Aimi, N.; Ponglux, D.; Watanabe, H. Antinociceptive effect of 7-hydroxymitragynine in mice: discovery of an orally active opioid analgesic from the Thai medicinal herb *Mitragyna speciosa*. **Life. Sci.** 74: 2144-2155, 2004.
- Matsumoto, K.; Morishige, R.; Murakami, Y.; Tohda, M.; Takayama, H.; Sakakibara, I.; Watanabe, H. Suppressive effects of isorhynchophylline on 5-HT_{2A} receptor function in the brain: Behavioural and electrophysiological studies. **Eur. J. Pharmacol.** 517: 191-199, 2005.
- Mayer, M.L. Glutamate receptor ion channels. **Curr. Opinion Neurobiol.** 15: 282-288, 2005.
- Melzack, R. From the gate to the neuromatrix. **Pain S6**: S121-126, 1999.
- Meller, S.T.; Gebhart, G.F. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. **Pain** 52: 127-36, 1993.
- Michael-Titus, A.; Boussemame, R.; Costentin, J. Stimulation of D₂ receptors induces an analgesia involving an opioidergic but non enkephalinergic link. **Eur. J. Pharmacol.** 187: 201-207, 1990.
- Millan, M.J.; Girardon, S.; Bervoets, K. 8-OH-DPAT-induced spontaneous tail-flicks in the rat are facilitated by the selective serotonin (5-HT)_{2C} agonist, RO 60-0175: blockade of its actions by the novel 5-HT_{2C} receptor antagonist SB 206,553. **Neuropharmacology** 36: 743-745, 1997.
- Millan, M.J.; Seguin, L.; Honoré, P.; Girardon, S.; Bervoets, K. Pro and antinociceptive actions of serotonin (5-HT)_{1A} agonists and antagonists in rodents: relationship to algometric paradigm. **Behav. Brain Res.** 73: 69-77, 1995.
- Millan, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Prog. Neurobiol.** 57: 1-164, 1999.
- Millan, M.J. Descending control of pain. **Prog. Neurobiol.** 66: 355-474, 2002.
- Miller, M.J.S.; Angeles, F.M.; Reuter, B.K.; Bobrowski, P.; Sandoval, M. Dietary antioxidants protect gut epithelial cells from oxidant-induced apoptosis. **BMC Complement. Altern. Med.** 1: 11, 2001.
- Missale, C.; Nash, S.R.; Robinson, S.W.; Jaber, M.; Caron, M.G. Dopamine receptors: from structure to function. **Physiol. Rev.** 78: 189-225, 1998.

- Moore, P.K.; Oluyomi, A.O.; Babbedge, R.C.; Wallace, P.; Hart, S.L. L-NG-nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. **Br. J. Pharmacol.** 102: 198-202, 1991.
- Muhammad, I.; Dunbar, D.C.; Khan, R.A.; Ganzera, M.; Khan, I.A. Investigation of uña de gato 7-deoxyloganic acid and ¹⁵N NMR spectroscopic studies on pentacyclic oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa*. **Phytochemistry** 57: 781-785, 2001.
- Mur, E.; Hartig, F.; Eibl, G.; Schirmer, M. Randomized double blind trial of an extract from the pentacyclic alkaloid-chemotype of *Uncaria tomentosa* for the treatment of rheumatoid arthritis. **J. Rheumatol.** 29: 678-681, 2002.
- Murakami, Y.; Zhao, Q.; Harada, K.; Tohda, M.; Watanabe, H.; Matsumoto, K. Choto-san, a Kampo formula, improves chronic cerebral hypoperfusion-induced spatial learning deficit via stimulation of muscarinic M1 receptor. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 81: 616-625, 2005.
- Norn, S.; Kruse, P.R.; Kruse, E. History of opium poppy and morphine. **Dan. Medicinhist. Arbog.** 33: 171-184, 2005.
- Obata, H.; Saito, S.; Sasaki, M.; Ishizaki, K.; Goto, F. Antiallodynic effect of intrathecally administered 5-HT₂ agonists in rats with nerve ligation. **Pain** 90: 173-179, 2001.
- Ochi, T.; Ohkubo, Y.; Mutoh, S. The spinal antinociceptive effect of kyotorphin in mice: involvement of the descending noradrenergic and serotonergic systems. **Neurosci. Lett.** 329: 193-196, 2002.
- Ohtori, S.; Takahashi, K.; Ino, H.; Chiba, T.; Yamagata, M.; Sameda, H.; Moriya, H. Up-regulation of substance P and NMDA receptor mRNA in dorsal horn and preganglionic sympathetic neurons during adjuvant-induced noxious stimulation in rats. **Ann. Anat.** 184: 71-76, 2002.
- Organização Mundial da Saúde – OMS. Declaration of Alma-Ata. International Conference on Primary Health Care, Alma-Ata, USSR, 6-12 de Setembro (1978).
- Organização Mundial da Saúde – OMS. General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine. (2000).
- Parsons, C.G. NMDA receptors as targets for drug action in neuropathic pain. **Eur. J. Pharmacol.** 429: 71-78, 2001.
- Phillipson, J.D.; Hemingway, S.R.; Ridsdale, C.E. Alkaloids of *Uncaria*. Part V. Their occurrence and chemotaxonomy. **Lloydia** 41: 503-570, 1978.
- Prezewocki, R.; Przewocka, B. Opioids in chronic pain. **Eur. J. Pharmacol.** 429: 79-91, 2001.

- Raja, S.N.; Meyer, R.A.; Ringkamp, M.; Campbell, J.N. Peripheral neural mechanisms of nociception. In: Wall, P.D.; Melzack, R. **Textbook of pain**. Churchill Livingstone : Londres, p. 1-8, 1999.
- Reeh, P.W.; Kress, M. Molecular physiology of proton transduction in nociceptors. **Curr. Opin. Pharmacol.** 1: 45-51, 2001.
- Reichling, D.B.; Levine, J.D. In hot pursuit of the elusive heat transducers. **Neuron** 26: 555-558, 2000.
- Ribeiro, R.A.; Vale, M.L.; Thomazzi, S.M.; Paschoalato, A.B.; Poole, S.; Ferreira, S.H.; Cunha, F.Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **Eur. J. Pharmacol.** 387: 111-118, 2000.
- Rivot, J.P.; Sousa, A.; Montagne-Clavel, J.; Besson, J.M. Nitric oxide (NO) release by glutamate and NMDA in the dorsal horn of the spinal cord: an in vivo electrochemical approach in the rat. **Brain Res.** 821: 101-110, 1999.
- Rizzi, R.; Re, F.; Bianchi, A.; De Feo, V.; De Simone, F.; Bianchi, L.; Stivala, L.A. Mutagenic and antimutagenic activities of *Uncaria tomentosa* and its extracts. **J. Ethnopharmacol.** 38: 63-77, 1993.
- Robertson, B.; Xu, X.J.; Hao, J.X.; Wiesenfeld-Hallin, Z.; Mhlanga, J.; Grant, G.; Kristensson, K. Interferon-gamma receptors in nociceptive pathways: role in neuropathic pain-related behaviour. **Neuroreport** 8: 1311-1316, 1997.
- Safieh-Garabedian, B.; Poole, S.; Allchorne, A.; Winter, J.; Woolf, C.J. Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.** 115: 1265-1275, 1995.
- Sakakibara, I.; Takahashi, H.; Terabayashi, S.; Yuzurihara, M.; Kubo, M.; Ishige, A.; Higuchi, M.; Komatsu, Y.; Okada, M.; Maruno, M.; Biqiang, C.; Jiang, H.X. Effect of oxindole alkaloids from the hooks of *Uncaria macrophylla* on thiopental induced hypnosis. **Phytomedicine** 5: 83-86, 1998.
- Sakakibara, I.; Terabayashi, S.; Kubo, M.; Higuchi, M.; Komatsu, Y.; Okada, M.; Taki, K.; Kamei, J. Effect on locomotion of indole alkaloids from the hooks of *Uncaria* plants. **Phytomedicine** 6: 163-168, 1999.
- Sakurada, T.; Katsumata, K.; Tan-no, K.; Saturada, S.; Kisara, K. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. **Neuropharmacology** 31: 1279-1285, 1992.
- Sakurada, T.; Sugiyama, A.; Sakurada, C.; Tanno, K.; Sakurada, S.; Kisara, K.; Hara, A.; Abiko, Y. Involvement of nitric oxide in spinally mediated capsaicin- and glutamate-induced behavioural responses in the mouse. **Neurochem. Int.** 29: 271-278, 1996.

- Sandoval, M.; Charbonnet, R.M.; Okuhama, N.N.; Trentacosti, A.M.; Miller, M.J.S. Cat's claw inhibits TNF α production and scavenges free radicals: role in cytoprotection. **Free Radic. Biol. Med.** 29: 71-78, 2000.
- Sandoval, M.; Okuhama, N.N.; Zhang, X.-J.; Condezo, L.A.; Lao, J.; Angeles, F.M.; Musah, R.A.; Bobrowski, P.; Miller, M.J.S. Anti-inflammatory and antioxidant activities of cat's claw (*Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis*) are independent of their alkaloid content. **Phytomedicine** 9: 325-337, 2002.
- Sandoval-Chacón, M.; Thompson, J.H.; Zhang, X.J.; Liu, X.; Mannick, E.E.; Sadowska-Krowicka, H.; Charbonnet, R.M.; Clark, D.A.; Miller, M.J.S. Anti-inflammatory actions of cat's claw: the role of NF- κ B. **Aliment Pharmacol. Ther.** 12: 1279-1289, 1998.
- Santa Maria, A.; Lopez, A.; Diaz, M.M.; Alban, J.; Galan de Mera, A.; Vicente Orellana, J.A.; Pozuelo, J.M. Evaluation of the toxicity of *Uncaria tomentosa* by bioassays in vitro. **J. Ethnopharmacol.** 57: 183-187, 1997.
- Santos, A.R.S.; Filho, V.C.; Yunes, R.A.; Calixto, J.B. Analysis of the mechanisms underlying the antinociceptive effect of the extracts of plants from the genus *Phyllanthus*. **Gen. Pharmacol.** 26: 1499-1506, 1995.
- Santos, A.R.S.; Calixto, J.B. Ruthenium red and capsazepine antinociceptive effect in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neurosci. Lett.** 235: 73-76, 1992.
- Sasaki, M.; Ishizaki, K.; Obata, H.; Goto, F. Effects of 5-HT₂ and 5-HT₃ receptors on the modulation of nociceptive transmission in rat spinal cord according to the formalin test. **Eur. J. Pharmacol.** 424: 45-52, 2001.
- Sawynok, J.; Reid, A. Interactions of descending serotonergic systems with other neurotransmitters in the modulation of nociception. **Behav. Brain Res.** 73: 63-68, 1996.
- Schaible, H.G.; Richter, F. Pathophysiology of pain. **Langenbecks. Arch. Surg.** 389: 237-243, 2004.
- Scheidt, C.; Santos, A.R.; Ferreira, J.; Malheiros, A.; Cechinel-Filho, V.; Yunes, R.A.; Calixto, J.B. Evidence for the involvement of glutamatergic receptors in the antinociception caused in mice by the sesquiterpene drimaniol. **Neuropharmacology** 43: 340-347, 2002.
- Seki, H.; Takayama, H.; Aimi, N.; Sakai, S.I.; Ponglux, D. A Nuclear magnetic resonance study on eleven stereoisomers of heteroyohimbine-type oxindole alkaloids. **Chem. Pharm. Bull.** 41: 2077-2086, 1993.
- Sheng, Y.; Pero, R.W.; Amiri, A.; Bryngelsson, C. Induction of apoptosis and inhibition of proliferation in human tumor cells treated with extracts of *Uncaria tomentosa*. **Anticancer Res.** 18: 3363-3368, 1998.

- Sheng, Y.; Bryngelsson, C.; Pero, R.W. Enhanced DNA repair, immune function and reduced toxicity of C-MED-100, a novel aqueous extract from *Uncaria tomentosa*. **J. Ethnopharmacol.** 69: 115-126, 2000.
- Sheng, Y.; Li, L.; Holmgren, K.; Pero, R.W. DNA repair enhancement of aqueous extracts of *Uncaria tomentosa* in a human volunteer study. **Phytomedicine** 8: 275-282, 2001.
- Sheng, Y.; Akesson, C.; Holmgren, K.; Bryngelsson, C.; Giamapa, V.; Pero, R.W. An active ingredient of Cat's Claw water extracts identification and efficacy of quinic acid. **J. Ethnopharmacol.** 96: 577-584, 2005.
- Shi, J.S.; Yu, J.X.; Chen, X.P.; Xu, R.X. Pharmacological actions of Uncaria alkaloids, rhynchophylline and isorhynchophylline. **Acta. Pharmacol. Sin.** 24: 97-101, 2003.
- Shibata, M.; Ohkubo, T.; Takahashi, H.; Inoki, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain** 38: 347-352, 1989.
- Shimada, Y.; Goto, H.; Itoh, T.; Sakakibara, I.; Kubo, M.; Sasaki, H.; Terasawa, K. 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. **J. Pharm. Pharmacol.** 51: 715-722, 1999.
- Sommer, C.; Kress, M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. **Neurosci. Lett.** 361: 184-187, 2004.
- Steen, K.H.; Reeh, P.W.; Anton, F.; Handwerker, H.O. Protons selectively induce lasting excitation and sensitization to mechanical stimulation of nociceptors in rat skin, in vitro. **J. Neurosci.** 12: 86-95, 1992.
- Stuppner, H.; Sturm, S.; Konwalinka, G. HPLC analysis of the main oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa*. **Chromatographia** 34: 597-600, 1992.
- Stuppner, H.; Sturm, S.; Konwalinka, G. Capillary electrophoretic analysis of oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa*. **J. Chromatogr.** 609: 375-380, 1992.
- Sun, X.; Chan, L.; Gong, X.; Sucher, N. N-methyl-D-aspartate receptor antagonist activity in traditional Chinese stroke medicines. **Neurosignals** 12: 31-38, 2003.
- Tadano, T.; Namioka, M.; Nakagawasai, O.; Tan-No, K.; Matsushima, K.; Endo, Y.; Kisara, K. Induction of nociceptive responses by intrathecal injection of interleukin-1 in mice. **Life. Sci.** 65: 255-261, 1999.
- Tasker, R.A.; Connell, B.J.; Yole, M.J. Systemic injections of alpha-1 adrenergic agonists produce antinociception in the formalin test. **Pain** 49: 383-391, 1992.

- Tjølsen, A.; Berge, O.G.; Hunskaar, S.; Rosland, J.H.; Hole, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain** 51: 5-17, 1992.
- Tjølsen, A.; Hole, K. Animal models of analgesia. In: Dickenson, A., Besson, J., editors. **The pharmacology of pain** (Handbook of experimental pharmacology), vol. 30/I. Berlin Springer Verlag; 1997. p. 1 – 20.
- Todd, A.J.; Spike, R.C. The localization of classical transmitters and neuropeptides within neurons in laminae I-III of the mammalian spinal dorsal horn. **Prog. Neurobiol.** 41: 609-645, 1993.
- Tominaga, M.; Caterina, M.J.; Malmberg, A.B.; Rosen, T.A.; Gilbert, H.; Skinner, K.; Raumann, B.E.; Basbaum, A.I.; Julius, D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. **Neuron** 21: 531-543, 1998.
- Urban, L.; Naeem, S.; Dray, A. Tachykinin induced regulation of excitatory amino acid responses in the rat spinal cord in vitro. **Neurosci. Lett.** 168: 185-188, 1994.
- Urban, L.; Thompson, S.W.N.; Dray, A. Modulation of spinal excitability: co-operation between neurokinin and excitatory amino acid neurotransmitters. **Trends. Neurosci.** 17: 432-438, 1994.
- Valente, L.M.M.; Alves, F.F.; Bezerra, G.M.; Almeida, M.B.S.; Rosário, S.L.; Mazzei, J.L.; D'Avila, L.A.; Siani, A.C. Desenvolvimento e aplicação de metodologia por cromatografia em camada delgada para determinação do perfil de alcalóides oxindólicos pentacíclicos nas espécies sul americana do gênero *Uncaria*. **Braz. J. Pharmacogn.** 16: 216-223, 2006.
- Verotta, A; Orsini, F; Sbacchi, M; Scheidler, MA; Amadorc, TA; Elisabetsky, E. Synthesis and antinociceptive activity of chimonanthines and pyrrolidinoindoline-type alkaloids. **Bioorg. Med. Chem.** 10: 2133-2142, 2002.
- Vyklicky, L. Techniques for the study of pain in animals. **Adv. Pain Res. Ther.** 3: 727-745, 1979.
- Vaz, Z.R.; Filho, V.C.; Yunes, R.A.; Calixto, J.B. Antinociceptive action of 2-(4-bromobenzoyl)-3-methyl-4,6-dimethoxy benzofuran, a novel xanthoxyline derivative on chemical and thermal models of nociception in mice. **J Pharmacol. Exp. Ther.** 278: 304-312, 1996.
- Walker, E.A.; Tiano, M.J.; Benyas, S.I.; Dykstra, L.A.; Picker, M.J. Naltrexone and beta-funaltrexamine antagonism of the antinociceptive and response rate-decreasing effects of morphine, dezocine, and dpropoxyphene. **Psychopharmacology** 144: 45-53, 1999.
- Walker, K.; Fox, A.J.; Urban, L.A. Animal models for pain research. **Mol. Med. Today** 5: 319-321, 1999.

- Watanabe, H.; Zhao, Q.; Matsumoto, K.; Tohda, M.; Murakami, Y.; Zhang, S.H.; Kang, T.H.; Mahakunakorn, P.; Maruyama, Y.; Sakakibara, I.; Aimi, N.; Takayama, H. Pharmacological evidence for antimentia effect of Chotosan (Gouteng-san), a traditional Kampo medicine. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 75: 635-643, 2003.
- Watkins, L.R.; Maier, S.F. Glia: a novel drug discovery target for clinical pain. **Nat. Rev. Drug Disc.** 2: 973-985, 2003.
- Wess, J.; Duttaroy, A.; Gomeza, J.; Zhang, W.; Yamada, M.; Felder, C.C.; Bernardini, N.; Reeh, P.W. Muscarinic receptor subtypes mediating central and peripheral antinociception studied with muscarinic receptor knockout mice: a review. **Life Sci.** 72: 2047-2054, 2003.
- White, F.A.; Bhangoo, S.K.; Miller, R.J. Chemokines: Integrators of pain and inflammation. **Nat. Rev. Drug Discov.** 4: 834-844, 2005.
- Wu, Z.Z.; Guan, B.C.; Li, Z.W.; Yang, Q.; Liu, C.J.; Chen, J.G. Sustained potentiation by substance P of NMDA-activated current in rat primary sensory neurons. **Brain Res.** 1010: 117-126, 2004.
- Wurm, M.; Kacani, L.; Laus, G.; Keplinger, K.; Dierich, M.P. Pentacyclic oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* induce human endothelial cells to release a lymphocyte-proliferationregulating factor. **Planta Med.** 64: 701-704, 1998.
- Yano, S.; Horiuchi, H.; Horie, S.; Aimi, N.; Sakai, S.; Watanabe, K. Ca²⁺ channel blocking effects of hirsutine, an indole alkaloid from *Uncaria* genus, in the isolated rat aorta. **Planta Med.** 57: 403-405, 1991.
- Yaksh, T.L. Spinal systems and pain processing: development of novel analgesic drugs with mechanistically defined models. **Trends Pharmacol. Sci.** 20: 329-337, 1999.
- Yeomans, D.C.; Proudfit, H.K. Nociceptive responses to high and low rates of noxious cutaneous heating are mediated by different nociceptors in the rat: electrophysiological evidence. **Pain** 68: 141-150, 1996.
- Yuzurihara, M.; Ikarashi, Y.; Goto, K.; Sakakibara, I.; Hayakawa, T.; Sasaki, H. Geissoschizine methyl ether, an indole alkaloid extracted from *Uncaria Ramulus et Uncus*, is a potent vasorelaxant of isolated rat aorta. **Eur. J. Pharmacol.** 444: 183-189, 2002.
- Zhu, M.; Phillipson, J.D.; Yu, H.; Greengrass, P.M.; Norman, N.G. Application of radioligand-receptor binding assays in the search for the active principles of the traditional Chinese medicine *Gouteng*. **Phytother. Res.** 11: 231-236, 1997.
- Zimmermann, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain** 16: 109-110, 1983.

9. Anexos

- Jürgensen, S.; DalBó, S.; Angers, P.; Santos, A.R.S; Ribeiro-doValle, R.M. Involvement of 5-HT₂ receptors in the antinociceptive effect of *Uncaria tomentosa*. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 81: 466-477, 2005.
- Jürgensen, S.; Gadotti, V.M.; Micke, G.A.; Pizzolatti, M.G.; Santos, A.R.S.; Ribeiro-do-Valle, R.M. Involvement of the glutamatergic system in the antinociceptive effect of an alkaloid fraction from *Uncaria tomentosa*. Manuscrito submetido para publicação no *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*.

Involvement of 5-HT₂ receptors in the antinociceptive effect of *Uncaria tomentosa*

Sofia Jürgensen^a, Sílvia DalBó^a, Paul Angers^b, Adair Roberto Soares Santos^c, Rosa Maria Ribeiro-do-Valle^{a,*}

^aDepartamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

^bDepartment of Food Science and Nutrition, Université Laval, Sainte-Foy, Québec, Canada

^cDepartamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

Received 24 November 2004; received in revised form 22 March 2005; accepted 15 April 2005

Available online 23 May 2005

Abstract

Uncaria tomentosa (Willd.) DC (Rubiaceae) is a vine that grows in the Amazon rainforest. Its bark decoctions are used by Peruvian Indians to treat several diseases. Chemically, it consists mainly of oxindole alkaloids. An industrial fraction of *U. tomentosa* (UT fraction), containing 95% oxindole alkaloids, was used in this study in order to characterize its antinociceptive activity in chemical (acetic acid-induced abdominal writhing, formalin and capsaicin tests) and thermal (tail-flick and hot-plate tests) models of nociception in mice. UT fraction given by the i.p. route dose-dependently suppressed the behavioural response to the chemical stimuli in the models indicated and increased latencies in the thermal stimuli models. The antinociception caused by UT fraction in the formalin test was significantly attenuated by i.p. treatment of mice with ketanserin (5-HT₂ receptor antagonist), but was not affected by naltrexone (opioid receptor antagonist), atropine (a nonselective muscarinic antagonist), L-arginine (precursor of nitric oxide), prazosin (α 1-adrenoceptor antagonist), yohimbine (α 2-adrenoceptor antagonist), and reserpine (a monoamine depleter). Together, these results indicate that UT fraction produces dose-related antinociception in several models of chemical and thermal pain through mechanisms that involve an interaction with 5-HT₂ receptors.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: *Uncaria tomentosa*; Antinociception; 5-HT₂ receptors; Mechanism of action

1. Introduction

Uncaria tomentosa (Willd.) DC (Rubiaceae) is a woody liana, indigenous to the Amazon rainforest. It is commonly known as cat's claw or *uña de gato* due to its morphological aspects. South American Indians have reportedly used decoctions of the barks in folk medicine as a "miraculous" remedy (Keplinger et al., 1999). Its applications include the treatment of arthritis, rheumatism, abscesses, inflammations, fever, allergy, asthma, cancer, gastric ulcer, contraception, menstrual irregularity, recov-

ery from childbirth, and skin impurities (Laus et al., 1997).

Many biological activities have been described for numerous extracts of *Uncaria tomentosa* (UT). The anti-inflammatory activity has been assayed in vitro and in vivo. It was demonstrated that an aqueous extract of UT was able to minimize rat mucosal injury in the indomethacin-induced intestinal inflammation, deplete peroxynitrite and attenuate peroxynitrite-induced cell death, prevent the activation of the transcription factor NF- κ B, inhibit the expression of inducible genes associated with inflammation—specifically negating the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and thereby attenuating NO production (Sandoval-Chacón et al., 1998; Aguilar et al., 2002; Akesson et al., 2003). Extracts and fractions of UT were also bioassayed by the carrageenan-induced oedema test in rat paw, and the

* Corresponding author. Centro de Ciências Biológicas-Bloco D, caixa postal 476, Campus Universitário-Trindade, Florianópolis, SC, Brazil, CEP 88049-900. Tel.: +55 48 331 9491; fax: +55 48 3375479.

E-mail address: ribeiro@farmaco.ufsc.br (R.M. Ribeiro-do-Valle).

most active fractions were isolated and analysed for their chemical constituents; however, all the resulting compounds were found to be inactive in this model at the tested doses, which suggests that the strong anti-inflammatory action of UT observed in other studies was due to a combination of compounds (Aquino et al., 1991). Decoctions of the bark of UT showed an antimutagenic effect in vitro, and were able to inhibit the epithelial cell death in response to oxidant stress (Rizzi et al., 1993; Miller et al., 2001). Antioxidant properties have also been described (Sandoval et al., 2000). Furthermore, it was found that UT extracts can have an immunostimulant action and enhance DNA repair capability (Lemaire et al., 1999; Sheng et al., 2000a,b).

Phytochemical analyses of *Uncaria tomentosa* root bark have revealed the presence of triterpenes, quinovic acid glycosides, some minor constituents and alkaloids (Aquino et al., 1989, 1997). Alkaloids are usually divided into classes according to their main chemical structure. The indole family is the most numerous plant alkaloid class, and oxindole alkaloids represent one of the major subgroups of this class (Martin and Mortimore, 1990). Six main pentacyclic oxindole alkaloids are found in UT: pteropodine and isopteropodine as major alkaloids, together with mitraphylline, isomitraphylline, speciophylline and uncarine F (Stuppner et al., 1992a,b; Laus and Keplinger, 1994; Ginkel, 1996). Other isomers – uncarines C, D and E – were also reported in lower quantities (Muhammad et al., 2001). In vitro cytotoxic activity of isolated oxindole alkaloids was observed against four human cell lines (Muhammad et al., 2001). In addition, antiviral activity of *U. tomentosa* has also been described, as some quinovic acid glycosides found in UT barks have shown an antiviral effect against cell infection with DNA viruses (Aquino et al., 1989).

Alkaloid compounds, such as morphine, have been extensively used in human history to alleviate pain. Mitragynine, an indole alkaloid from the Thai medicinal plant *Mitragyna speciosa*, had its antinociceptive activity described by Matsumoto et al., (1996, 2004), and there is an extensive literature describing the antinociceptive activity of other alkaloids (Elisabetsky et al., 1995; Ameri, 1998; Küpeli et al., 2002; Verotta et al., 2002). However, no previous correlation between the alkaloids of *Uncaria tomentosa* and antinociceptive activity has been reported so far. In this study, we have examined in detail the antinociceptive properties of UT in chemical and thermal models of nociception in mice and also some of the mechanisms that might potentially underlie this activity.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male Swiss mice weighing 35–40 g were used in all experiments. Animals were housed under standard light/

dark cycle (12 h each) and temperature (22 ± 2 °C) and acclimatized to the laboratory for at least an hour before the tests. Food and water were available ad libitum. The experiments were performed after approval of the protocol by the Institutional Ethics Committee and were carried out in accordance with the National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals (Publication No. 85-23, revised 1985) 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. Drugs

Formalin (Nuclear, SP, Brazil), acetic acid (Cinética Química, SP, Brazil), capsaicin (8-methyl-*N*-vanillyl-6-nonenamide; Calbiochem, San Diego, USA), atropine sulphate, chlorimipramine hydrochloride, clonidine hydrochloride, ketanserin, L-arginine (L-ARG), N^G-nitro-L-arginine (L-NOARG), naltrexone hydrochloride, phenylephrine hydrochloride, prazosin hydrochloride, reserpine, R(-)-DOI (R-[-]-2,5-Dimethoxy-4-iodoamphetamine), yohimbine (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), ascorbic acid and morphine hydrochloride (Merck AG, Darmstadt, Germany) were dissolved in PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM and phosphate buffer 10 mM; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Capsaicin was dissolved in 1% dimethylsulphoxide (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) and PBS. Reserpine was dissolved in 2% ascorbic acid solution. Prazosin was dissolved in 0.2% dimethylformamide (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) solution.

An industrial standardised *Uncaria tomentosa* fraction (UT fraction) containing 95% oxindole alkaloids was used in all experiments. Plant material was collected in Pozuzo area, in Peru. The following stereoisomers were identified by HPLC method: speciophylline, uncarine f, mitraphylline, isomitraphylline, pteropodine, rhynchophylline, isorhynchophylline and isopteropodine, accounting for 95% of the sample (m/m). In order to be administered by i.p. route, the fraction was dissolved in Tween-80 (Fischer Scientific International) and then diluted with PBS in order to obtain a 10% Tween-80 solution. The final concentration of Tween-80 did not exceed 10% and did not cause any “per se” effect. Control animals received vehicle only (10 mL/kg i.p.).

2.3. The abdominal writhing test

The writhing test was carried out according to the method previously described by Koster et al. (1959). Animals were pre-treated intraperitoneally (i.p) with the UT fraction at the following doses: 3, 10, 30 and 100 mg/kg administered 30 min before the induction of nociception. 0.6% acetic acid solution was injected i.p. (10 mL/kg) and the animals were placed in an acrylic observation chamber (12 × 12 × 25 cm). The number of writhing responses

(abdominal cramps) was counted in 20 min after the injection of acetic acid.

2.4. The capsaicin test

The procedure used was similar to that described previously (Santos and Calixto, 1997). The noxious stimulus consisted of 20 μ L of a capsaicin solution (1.6 μ g/paw prepared in PBS) injected i.pl. in the ventral surface of the right hind paw. Immediately after the injection, animals were placed in an acrylic observation chamber and observed for 5 min. The time spent licking and biting the injected paw was measured with a stopwatch and considered as an indication of nociception. Animals were pre-treated with doses of the UT fraction (30, 100 and 300 mg/kg, i.p.), administered 30 min before the induction of nociception.

2.5. The formalin test

The procedure used was essentially the same as that previously described by Hunskaar et al. (1985) with minor modifications. A 20- μ L aliquot of 2.5% formalin solution (0.92% formaldehyde) made up in PBS was injected intraplantarly (i.pl.) in the right hind paw of the animal. Subsequently to the formalin injection, animals were placed in an acrylic observation chamber, and the time spent licking or biting the injected paw was measured with a stopwatch and considered as a quantitative indication of nociception. The early phase of the nociceptive response normally peaks from 0 to 5 min and the late phase from 15 to 30 min after formalin injection, which represents the direct effect of formalin on nociceptors and inflammatory nociceptive responses, respectively (Hunskaar and Hole, 1987; Tjølsen et al., 1992). Animals were pre-treated intraperitoneally (i.p.) with the UT fraction (10–300 mg/kg) administered 30 min before the formalin injection.

2.6. The tail-flick test

A radiant heat tail-flick analgesiometer was used to measure response latencies according to the method described previously by D'Amour and Smith (1941), with minor modifications. In this model, animals respond to a focused heat stimulus by flicking or removing their tail, exposing a photocell that is situated immediately below it. The intensity of radiant heat was adjusted so that the animal flicked its tail within 5 to 10 s (20 W). The reaction time of each animal was recorded 30 min before the administration of UT fraction (100 and 300 mg/kg, i.p.) and 30, 60, 90 and 120 min after the treatment. An automatic 20 s cut-off was used to minimize tissue damage. Animals were selected 24 h previously on the basis of their reactivity in the test to ensure that all those used exhibited responses within the normal range.

2.7. The hot-plate test

The hot-plate test used to measure response latencies was carried out according to the method described by Eddy and Leimbach (1953), with minor modifications. In this experiment, the hot-plate (Ugo Basile, model-DS 37) was maintained at $56\pm 1^\circ\text{C}$. Animals were placed in a glass cylinder of 24-cm diameter on the heated surface, and the time between placement and shaking or licking of the paws or jumping was recorded as the index of response latency. The reaction time was recorded 30 min after administration of UT fraction (30, 100 and 300 mg/kg, i.p.) or morphine (10 mg/kg, s.c.). An automatic 30 s cut-off was used to minimize tissue damage. Animals were selected 24 h previously on the basis of their reactivity in the test to ensure that all those used exhibited responses within the normal range.

2.8. Assessment of locomotor activity

In order to investigate the possible non-specific muscle relaxant or sedative effects of UT fraction, mice were tested on the rota-rod (Rosland et al., 1990). The apparatus consisted of a bar with a diameter of 2.5 cm, subdivided into four compartments. The bar rotated at a constant speed of 22 revolutions per minute and animals were evaluated for the time spent to fall from the bar. The animals were selected 24 h previously by eliminating those mice that did not remain on the bar for 60 s. Animals were treated with UT fraction (100 and 300 mg/kg, i.p.) or the same volume of vehicle (10 mL/kg, i.p.), 30 min before being tested. Results are expressed as the times for which animals remained on the rota-rod bar. The cut-off time used was 60 s.

2.9. Investigation of the mechanism of action

To address some of the mechanisms by which UT fraction causes antinociception in the formalin-induced nociception, animals were treated with different drugs through several routes of administration. The choice of the doses of each drug was based on previous data in the literature or on preliminary experiments carried out in our laboratory (not shown). The formalin test was chosen for this purpose because of the specificity and sensitivity in nociception transmission that this model provides (Le Bars et al., 2001).

In order to investigate the participation of the opioid system in the antinociceptive effect of UT fraction, mice were pre-treated with naltrexone (1 mg/kg, i.p., a non-selective opioid receptor antagonist), and after 15 min, the animals received an injection of UT fraction (100 mg/kg, i.p.), morphine (5 mg/kg, i.p., used as positive control) or vehicle. Another group of animals was pre-treated with vehicle and after 20 min received UT fraction, morphine, or vehicle, 30 min before formalin injection.

Table 1

Comparison between ID₅₀ values, and their respective 95% confidence limit, of pre-treatment (i.p.) with UT fraction in three chemical models of nociception in mice

Assay	ID ₅₀ value and 95% confidence limit (mg/kg)
Abdominal writhing test	12.78 (5.80–19.76)
Capsaicin test	68.5 (44.97–92.03)
Formalin test–1st phase	107.11 (88.12–126.10)
Formalin test–2nd phase	95.25 (71.33–119.17)

To investigate the possible involvement of the muscarinic system in the antinociceptive action of UT fraction, mice were pre-treated with atropine (a nonselective muscarinic antagonist, 0.1 mg/kg, i.p.), and after 15 min, they received UT fraction (100 mg/kg, i.p.) or vehicle injection, before being subjected to the formalin test 30 min later. Another group of animals was pre-treated with vehicle and after 20 min, they received UT fraction or vehicle, 30 min before formalin injection.

To examine the possible participation of the adrenergic system in the antinociceptive effect of UT fraction, animals were pre-treated with prazosin (an α_1 -adrenoreceptor antagonist, 0.15 mg/kg, i.p.) or with yohimbine (an α_2 -adrenoreceptor antagonist, 1.0 mg/kg, i.p.), and after 15 min, the animals received UT fraction (100 mg/kg, i.p.), phenylephrine (an α_1 -adrenoreceptor agonist, 10 mg/kg, i.p.), clonidine (an α_2 -adrenoreceptor agonist, 0.1 mg/kg, i.p.), or vehicle injection. Other groups of animals were pre-treated with vehicle (10 mg/kg, i.p.), and after 20 min received UT fraction, phenylephrine, clonidine, or vehicle injection 30 min before formalin injection.

To investigate the role played by the nitric oxide-L-arginine pathway in the antinociception caused by UT fraction in the formalin test, mice were pre-treated with L-arginine (L-ARG; 600 mg/kg, i.p., a nitric oxide precursor) and after 20 min, they received UT fraction (100 mg/kg, i.p.), N^G-nitro-L-arginine (L-NOARG, 75 mg/kg, i.p., a nitric oxide synthase inhibitor) or vehicle. Another group of animals was pre-treated with vehicle and after 20 min received UT fraction, L-NOARG, or vehicle, 30 min before the formalin test.

We next investigated the possible role played by reserpine in the antinociceptive effect of UT fraction in the formalin test. For this purpose, mice were pre-treated with reserpine (5 mg/kg, i.p., a catecholamine depleter), and after 24 h, the animals received an injection of UT fraction (100 mg/kg, i.p.), chlorimipramine (1.0 mg/kg, i.p., a monoamines reuptake inhibitor) or vehicle. Another group of animals was pre-treated with vehicle and after 24 h received UT fraction, chlorimipramine, or vehicle, 30 min before formalin injection.

Finally, to explore the possible participation of the serotonergic system in the antinociceptive action of UT fraction, mice were pre-treated with ketanserin (a 5-HT₂ receptor antagonist, 1.0 mg/kg, i.p.), and after 20 min, the animals received UT fraction (100 mg/kg, i.p.), DOI (a

selective 5-HT_{2A} receptor agonist, 1.0 mg/kg, i.p.), or vehicle. Other groups of animals were pre-treated with vehicle, and after 20 min received UT fraction, DOI, or vehicle injection 30 min before formalin injection.

2.10. Statistical analysis

The results were expressed as mean \pm standard error of mean (SEM). Statistically significant differences between groups were measured using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test or Student–Newman–Keuls' test. The geometric mean ID₅₀ values (Table 1), accompanied by their respective 95% confidence limits, were determined by non-linear regression from individual experiments using “Graph Pad Prism Software.” Unpaired Student's *t* test with Welch correction was used in the analysis of rota-rod data.

3. Results

3.1. The abdominal writhing test

The pre-treatment of animals with UT fraction caused a significant reduction in the number of abdominal writhing

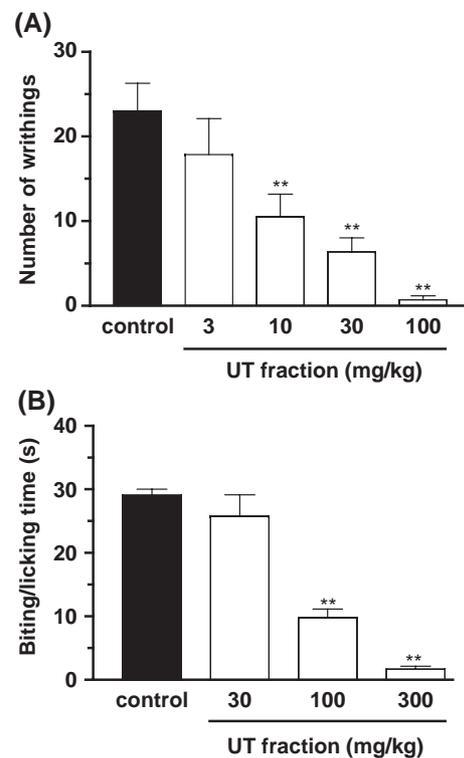


Fig. 1. (A) Effect of pre-treatment with UT extract at the doses of 3, 10, 30 and 100 mg/kg, i.p. in the abdominal writhing test induced with i.p. (10 mL/kg) injection of 0.6% acetic acid solution. (B) Effect of pre-treatment with UT extract at the doses of 30, 100 and 300 mg/kg, i.p. in the capsaicin test. Each column represents the number of cramps or the reactivity time (time spent licking/biting injected paw) of six animals per group as mean \pm standard error of mean (SEM). ***p* < 0.01.

responses of approximately 54, 72 and 97%, at the doses of 10, 30 and 100 mg/kg i.p., respectively, when compared to vehicle-treated control (23 ± 3.3 writhing responses) (Fig. 1A). ANOVA found extremely significant effects between groups [$F(4,43)=10.175$, $P<0.0001$].

3.2. The capsaicin test

In the capsaicin test, animals that had been pre-treated i.p. with UT fraction at the doses of 30, 100 and 300 mg/kg (Fig. 1B) showed a statistically significant reduction in the response to the noxious stimulus of approximately 11, 66 and 94%, respectively, when compared to vehicle-treated control response (29 ± 1.0 s). ANOVA considered extremely significant effects between groups [$F(3,23)=48.019$, $P<0.0001$].

3.3. The formalin test

The pre-treatment of animals with varying doses of UT fraction significantly reduced the time spent licking or biting the injected paw in the formalin test. The percentages of inhibition for the doses of 10, 30, 100, 150 and 300 mg/kg in the early phase (Fig. 2A) were 8, 30, 33, 65 and 94%, while the corresponding values for the second phase were 28, 36, 41, 94 and 100%, respectively (Fig. 2B). Control values for the early and late phases were 71.1 ± 2.8 s and

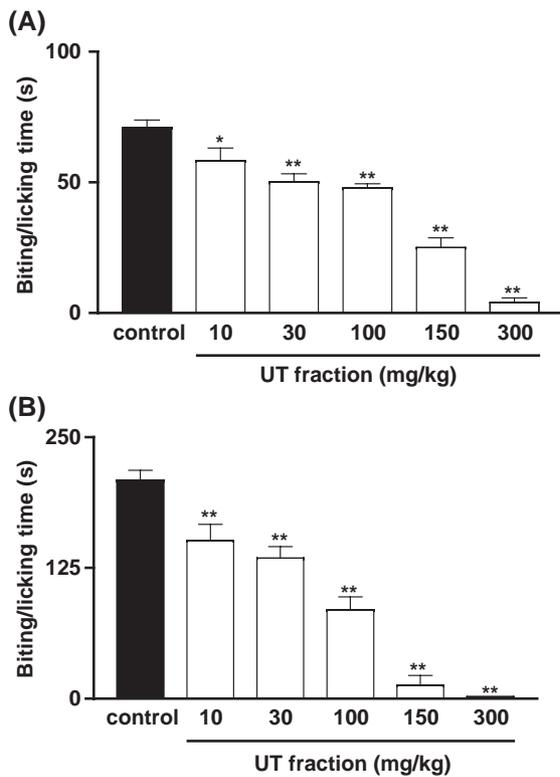


Fig. 2. Effect of pre-treatment with UT extract at the doses of 10, 30, 100, 150 and 300 mg/kg, i.p., in both phases of the formalin test. Each column represents reactivity time (time spent licking/biting injected paw) of 6–10 animals per group as mean \pm SEM. * $p<0.05$ and ** $p<0.01$.

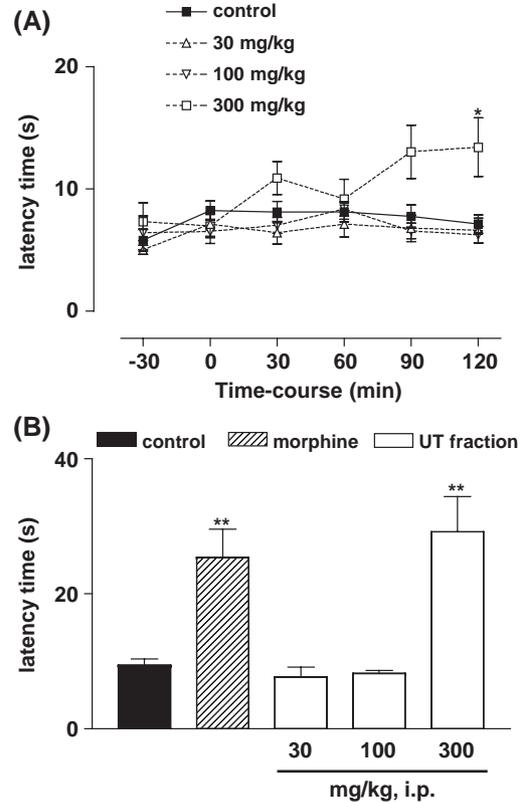


Fig. 3. Effect of pre-treatment with UT extract at the doses of 30, 100 and 300 mg/kg, i.p., or morphine (10 mg/kg, s.c.) in the tail-flick test (A) or in the hot-plate test (B). Each column represents the latency (s) expressed as mean \pm SEM of six animals per group. ** $p<0.01$.

208.6 ± 9.7 s, respectively. ANOVA considered extremely significant effects between groups in both phases [$F(5,50)=45.716$ (first phase) and $F(5,59)=48.208$ (second phase), $P<0.0001$].

3.4. Tail-flick and hot-plate tests

In the tail-flick test, the treatment of animals with UT fraction at the dose of 300 mg/kg caused a significant increase of 192% in the latency, 120 min later (Fig. 3A). ANOVA considered very significant effects between groups [$F(3,26)=6.243$, $P=0.0029$]. Control latency was 7.3 ± 1.5 s. Similarly, treatment with UT fraction at the dose of 300 mg/kg increased the latency in the hot-plate test by about 311% (Fig. 3B). ANOVA considered extremely significant effects between groups [$F(4,30)=12.976$, $P<0.0001$]. Control value was 9.4 ± 1.0 s.

3.5. Assessment of locomotor activity

Treatment of animals with UT fraction at the doses of 100 and 300 mg/kg, given by i.p. route, did not significantly affect the motor response of animals. The mean performance in the rota-rod test was 36.2 ± 9.5 s (control value 50.5 ± 9.5 s) and 43.4 ± 5.6 s (control value 57.0 ± 2.3 s) in the presence of the 100 and 300 mg/kg doses of the tested fraction,

respectively ($n=10$ each group; data not shown). The two-tailed P values were 0.3134 and 0.0659 for the groups treated with 100 and 300 mg/kg of UT fraction, respectively.

3.6. Analysis of possible mechanism of action of UT fraction

3.6.1. Opioids

The results presented in Fig. 4 show that the pre-treatment of mice with naltrexone (a nonselective opioid antagonist, 1.0 mg/kg, i.p.), given 15 min earlier, did not significantly modify the antinociception caused by UT fraction against either phase of formalin-induced nociception. However, under the same conditions, naltrexone completely reversed the antinociception caused by morphine (5 mg/kg, s.c.) in the formalin test (Fig. 4). ANOVA considered extremely significant effects between groups in both phases [$F(5,53)=21.931$ (first phase) and $F(5,55)=52.801$ (second phase), $P<0.0001$].

3.6.2. Cholinergic mechanisms

The previous treatment of animals with atropine (a nonselective muscarinic antagonist, 0.1 mg/kg, i.p.), given 20 min earlier, did not significantly modify the antinociception caused by UT fraction in either phase of formalin-

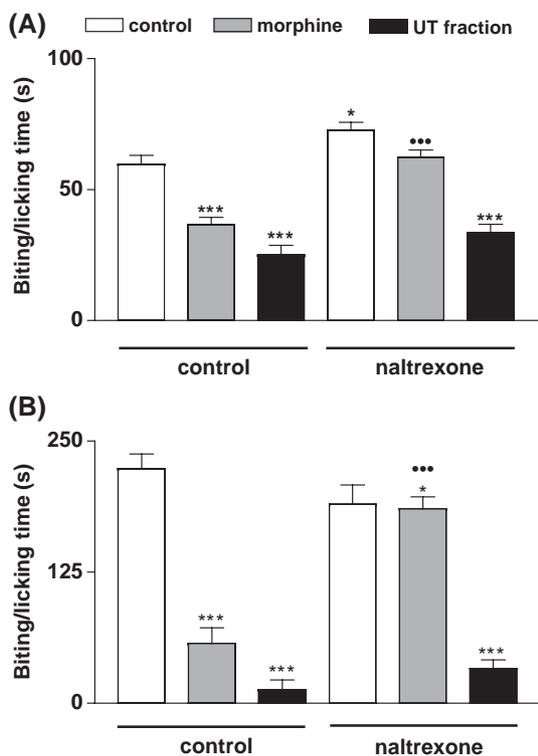


Fig. 4. Influence of the pre-treatment of animals with naltrexone (1 mg/kg, i.p.) on the antinociception caused by UT extract (100 mg/kg, i.p.) or morphine (5 mg/kg, i.p.) in phases 1 and 2 of the formalin test. Each column represents the reactivity time of 6–10 animals per group as mean \pm SEM. * $p<0.05$ and *** $p<0.001$ represent the statistical differences between treated groups and control group (vehicle only), while *** $p<0.001$ represents the statistical difference between groups treated with morphine in the absence and presence of naltrexone.

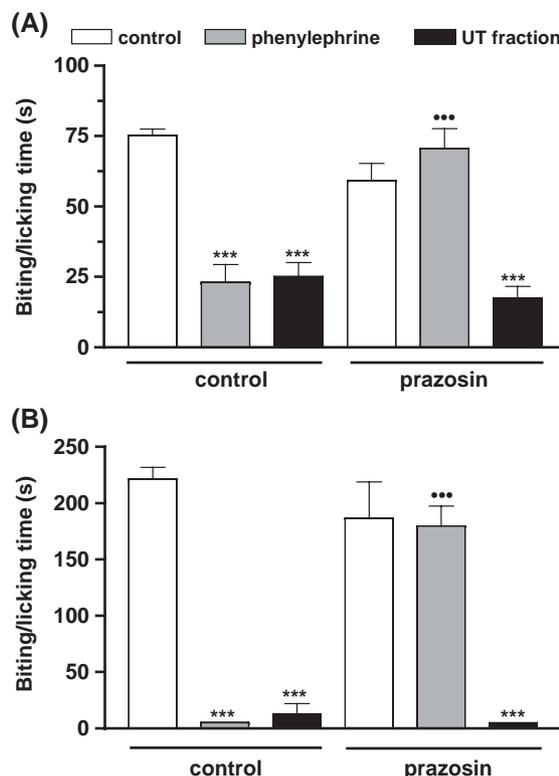


Fig. 5. Influence of the pre-treatment of animals with prazosin (0.15 mg/kg, i.p.) on the antinociception caused by UT extract (100 mg/kg, i.p.) or phenylephrine (10 mg/kg, i.p.) in phases 1 and 2 of the formalin test. Each column represents the reactivity time of 6–10 animals per group as mean \pm SEM. *** $p<0.001$ represents the statistical difference between treated groups and control group (vehicle only), while *** $p<0.001$ represents the statistical difference between groups treated with phenylephrine in the absence and presence of prazosin.

induced nociception (results not shown). ANOVA considered extremely significant effects between groups in both phases [$F(3,26)=19.165$ (first phase) and $F(3,23)=40.077$ (second phase), $P<0.0001$].

3.6.3. α -Adrenergic mechanisms

The treatment of mice with prazosin (an α_1 -selective antagonist, 0.15 mg/kg, i.p.) or yohimbine (an α_2 -selective antagonist, 1.0 mg/kg, i.p.), 20 min before, significantly reversed the antinociception caused by phenylephrine (an α_1 -selective agonist, 1.0 mg/kg, i.p.) or clonidine (an α_2 -selective agonist, 0.1 mg/kg, i.p.), but did not significantly change the antinociception caused by UT fraction in both phases of the formalin test (Figs. 5 and 6). ANOVA considered extremely significant effects between groups in both phases for α_1 [$F(5,38)=21.207$ (first phase) and $F(5,43)=48.955$ (second phase), $P<0.0001$] and α_2 [$F(5,35)=29.286$ (first phase) and $F(5,35)=46.997$ (second phase), $P<0.0001$].

3.6.4. NO system

The results presented in Fig. 7 show that the pre-treatment of mice with the nitric oxide precursor L-ARG

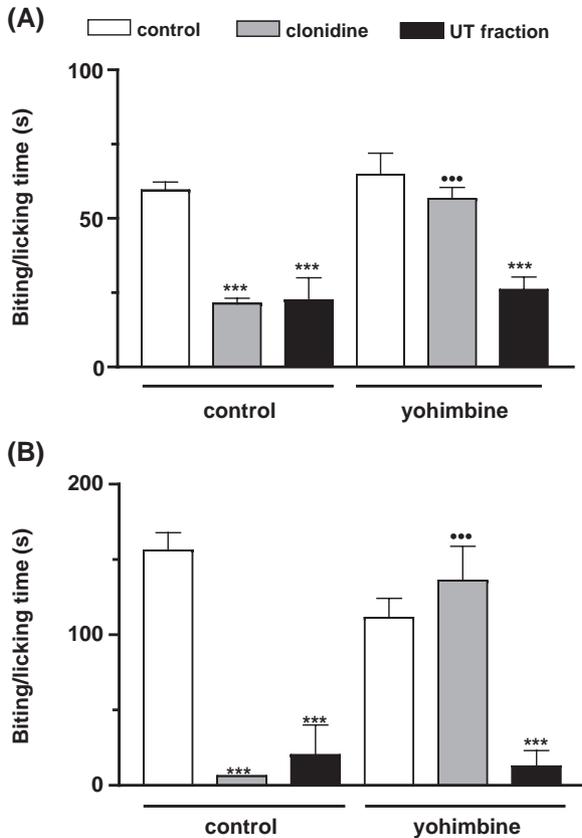


Fig. 6. Influence of the pre-treatment of animals with yohimbine (1.0 mg/kg, i.p.) on the antinociception caused by UT extract (100 mg/kg, i.p.) or clonidine (0.1 mg/kg, i.p.) in the first and second phases of the formalin test. Each column represents the reactivity time of 6–10 animals per group as mean \pm SEM. * p < 0.05 and *** p < 0.001 represent the statistical differences between treated groups and control group (vehicle only), while * p < 0.05 and *** p < 0.001 represent the statistical differences between groups treated with clonidine in the absence and presence of yohimbine.

(600 mg/kg, i.p.), given 20 min earlier, completely reversed the antinociception caused by L-NOARG (a nitric oxide synthase enzyme inhibitor, 75 mg/kg, i.p.), when analysed against both phases of the formalin test. However, under the same conditions, L-ARG did not significantly modify the antinociception caused by UT fraction in the formalin test (Fig. 7). ANOVA considered extremely significant effects between groups in both phases [$F(5,38)=17.121$ (first phase) and $F(5,37)=30.777$ (second phase), $P < 0.0001$].

3.6.5. Biogenic amines

Fig. 8 shows that the pre-treatment of animals with reserpine (5 mg/kg, i.p.), 24 h before, caused a significant inhibition of chlorimipramine (10 mg/kg, i.p.)-induced antinociception when assessed against both phases of formalin-induced pain. Under the same conditions, reserpine did not significantly modify the antinociception caused by UT fraction in the formalin test. ANOVA considered extremely significant effects between groups in both phases [$F(5,36)=19.280$ (first phase) and $F(5,38)=116.68$ (second phase), $P < 0.0001$].

3.6.6. 5-HT systems

Finally, the treatment of animals with ketanserin (1.0 mg/kg, i.p.) given 20 min before, completely reversed the antinociception caused by DOI (1.0 mg/kg, i.p.) against formalin-induced licking (Fig. 9). Under the same conditions, ketanserin treatment significantly antagonised the antinociceptive action of the UT fraction in the formalin test (Fig. 9). ANOVA considered extremely significant effects between groups in both phases [$F(5,40)=19.001$ (first phase) and $F(5,39)=20.991$ (second phase), $P < 0.0001$].

4. Discussion

The present study demonstrates that systemic (i.p.) administration of UT fraction elicits a dose-dependent inhibition of the nociceptive behavioural response in mice submitted to chemical and thermal pain-inducing stimuli. The most relevant findings in the work are that (1) i.p. administration of UT fraction causes significant inhibition against both phases of the pain response to the intraplantar injection of formalin, and against the nociception caused by activation of vanilloid receptors by capsaicin in the mouse

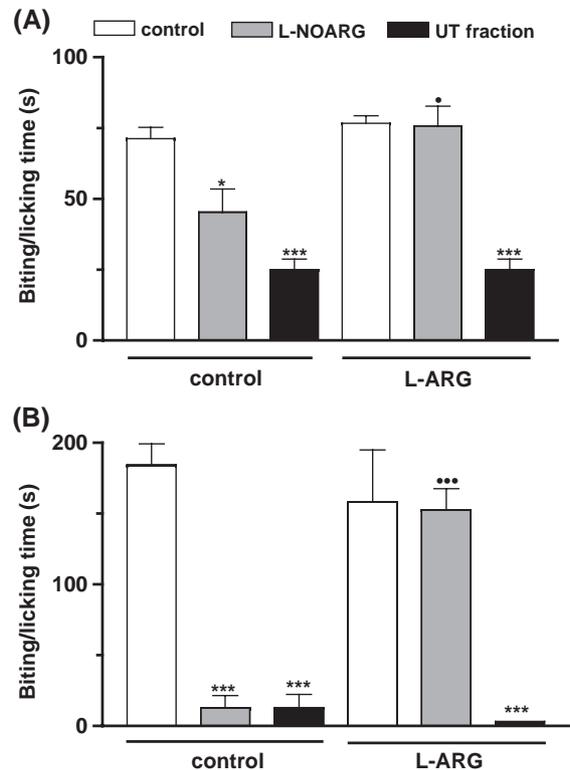


Fig. 7. Influence of the pre-treatment of animals with L-ARG (100 mg/kg, i.p.) on the antinociception caused by UT extract (100 mg/kg, i.p.) or L-NOARG (75 mg/kg, i.p.) in phases 1 and 2 of the formalin test. Each column represents the reactivity time of 6–10 animals per group as mean \pm SEM. * p < 0.05 and *** p < 0.001 represent the statistical differences between treated groups and control group (vehicle only), while * p < 0.05 and *** p < 0.001 represent the statistical differences between groups treated with L-NOARG in the absence and presence of L-ARG.

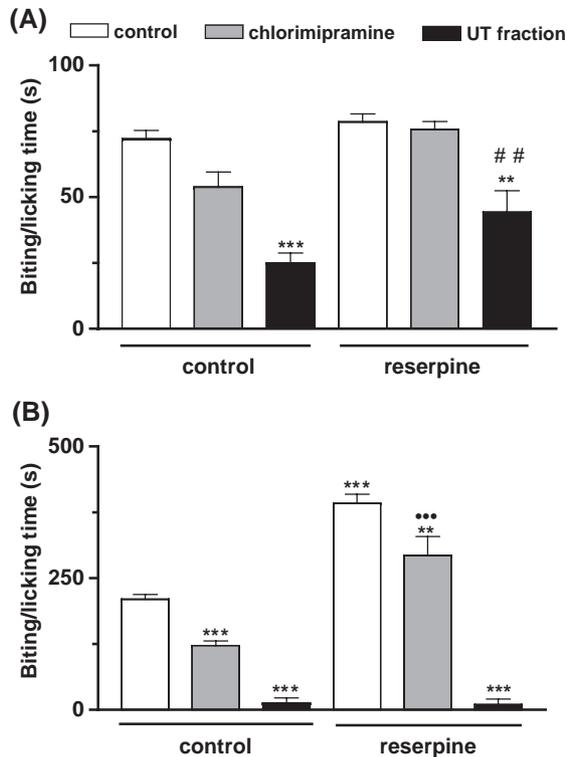


Fig. 8. Influence of the pre-treatment of animals with reserpine (5 mg/kg, i.p.) on the antinociception caused by UT extract (100 mg/kg, i.p.) or chlorimipramine (10 mg/kg, i.p.) in phases 1 and 2 of the formalin test. Each column represents the reactivity time of 6–10 animals per group as mean \pm SEM. ** p < 0.01 and *** p < 0.001 represent the statistical differences between treated groups and control group (vehicle only), while *** p < 0.001 represents the statistical difference between groups treated with chlorimipramine in the absence and presence of reserpine, and ## p < 0.01 represents the statistical difference between groups treated with UT extract in the absence and presence of reserpine.

paw; (2) the antinociceptive action of UT fraction in the formalin test was significantly reversed by i.p. pre-treatment of animals with ketanserin, but not naltrexone, atropine, prazosin, yohimbine, L-arginine, or reserpine; (3) UT fraction was effective at increasing the response latency of animals in both thermal nociceptive models (tail-flick and hot-plate tests); and (4) the dose of UT fraction that caused significant antinociception did not produce any statistically significant motor dysfunction or any detectable side effect (see data).

4.1. Profile of antinociceptive activity

A considerable number of studies have suggested that extracts or isolated compounds obtained from *Uncaria tomentosa* have a broad spectrum of biological activities, including anti-inflammatory, antioxidant, antiviral, antimutagenic, anticancer, and immunomodulatory activities (Miller et al., 2001; Sandoval-Chacón et al., 1998; Sandoval et al., 2000; Akesson et al., 2003). In addition, it has been shown that *Uncaria tomentosa* is a remarkably potent inhibitor of NF- κ B and is an effective inhibitor of TNF- α

gene expression in vitro and in vivo (Sandoval-Chacón et al., 1998; Akesson et al., 2003). However, in spite of the considerable amount of data regarding the anti-inflammatory effects of UT, the putative antinociceptive activity of UT as well as its mechanisms of action in rodents had not been reported.

The results reported here indicate that i.p. administration of UT fraction, at doses that did not produce any statistically significant motor dysfunction or any detectable side effect, produced marked and dose-related antinociception when assessed in acetic acid-induced visceral nociception. The acetic acid-induced writhing test in mice produces a type of nociceptive response that can be considered a visceral inflammatory pain reflex, and has long been used as a screening tool for the assessment of analgesic or anti-inflammatory properties of new agents (Vyklícky, 1979; Tjølsen and Hole, 1997). At the cellular level, protons depolarize sensory neurones by directly activating a non-selective cationic channel localized on cutaneous, visceral and other types of nociceptive peripheral afferent C-fibres

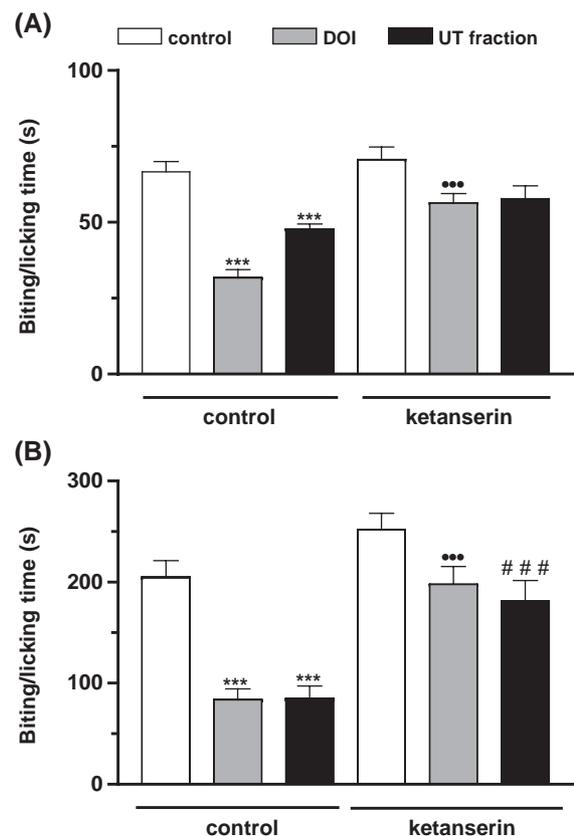


Fig. 9. Influence of the pre-treatment of animals with ketanserin (1 mg/kg, i.p.) on the antinociception caused by UT extract (100 mg/kg, i.p.) or DOI (1 mg/kg, i.p.) in phases 1 and 2 of the formalin test. Each column represents the reactivity time of 6–10 animals per group as mean \pm SEM. *** p < 0.001 represents the statistical difference between treated groups and control group (vehicle only), while *** p < 0.001 represents the statistical difference between groups treated with DOI in the absence and presence of ketanserin, and ### p < 0.001 represents the statistical difference between groups treated with UT extract in the absence and presence of ketanserin.

(Reeh and Kress, 2001; Julius and Basbaum, 2001). This method shows good sensitivity, as it allows for the effects of weak analgesics, but shows poor specificity because the abdominal writhing response may be suppressed by muscle relaxants and other drugs, leaving scope for the misinterpretation of results (Le Bars et al., 2001). This can be avoided by complementing the test with other models of nociception and a motility test. For this reason, UT fraction was examined for its inhibitory action on motility in the rota-rod test. It showed no statistically significant interference in motility patterns at a dose that produced complete suppression of the writhing response.

Another important finding is the demonstration that i.p. administration of UT fraction produces a dose-dependent antinociceptive effect on the capsaicin-induced paw licking response, which is very similar to the abdominal writhing test. Capsaicin is regarded as a valuable pharmacological tool for studying a subset of mammalian primary sensory C-fibres and A δ afferent neurones, including polymodal nociceptors and warm thermoceptors (for review, see Holzer, 1991; Jancso, 1992). In addition, it has been proposed that capsaicin-induced nociception is brought about by activation of the capsaicin receptor, also known as the vanilloid receptor (VR), termed VR subtype 1 (VR1), which is a ligand-gated nonselective cation channel in primary sensory neurones (Caterina et al., 1997; Tominaga et al., 1998). Studies have shown that, in the periphery, capsaicin evokes the release of neuropeptides, excitatory amino acids (glutamate and aspartate), nitric oxide and pro-inflammatory mediators that transmit nociceptive information to the spinal cord (Sakurada et al., 1992, 1996, 2003). Therefore, the suppression of the capsaicin-induced acute pain response and of the acetic acid-induced abdominal writhing response, caused by treatment with UT fraction, is complementary indication that the antinociceptive action of this plant is strongly observed when the noxious stimulus is conducted mainly by C-fibres.

In the formalin test, UT fraction caused significant and dose-related antinociception when administered by i.p. route against both early and late phases of the pain response in mice. These two phases of manifested behavioural response differ in origin of the neuronal impulse: the first is acute and represents the direct chemical stimulation of nociceptors, while the second is tonic and may result from the peripheral inflammatory process (Hunskar and Hole, 1987) possibly associated with a centrally-mediated facilitation (Martindale et al., 2001). Experimental data indicate that formalin predominantly evokes activity in C-fibres (Tjølsen et al., 1992), although in the first phase of pain A δ -fibres are thought to be responsible for fast nociceptive transmission (Julius and Basbaum, 2001). The major transmission pathway for inflammatory pain has been documented as that comprising peripheral polymodal receptors around small vessels that signal to the CNS via afferent C-fibres entering the dorsal horn (Kumazawa et al., 1996). Recently, Ribeiro et al. (2000) demonstrated that the nociceptive activity of

acetic acid may be due to the release of cytokines, such as TNF- α , interleukin-1 β and interleukin-8, by resident peritoneal macrophages and mast cells. Thus, the antinociceptive action of UT may be due, at least in part, to inhibition of the release of TNF- α and other cytokines by resident local cells. However, this possibility, in the case of UT fraction, remains to be tested in future studies. The formalin test is a satisfactory and comprehensive model for evaluating the antinociceptive activity of drugs, and since UT fraction was effective at inhibiting both phases of pain, it can be suggested that it has great potential as an analgesic drug.

Another interesting result of the current study was the fact that i.p. administration of UT fraction produced a significant antinociception in thermal models of nociception: the tail-flick and the hot-plate tests. We observed a significant increase in the reaction time of animals in both models, but only for the group treated with the highest dose of 300 mg/kg, while in the nociception caused by acetic acid and formalin, ten times-lower doses were able to efficiently inhibit the nociceptive response with the same statistical significance. This disparity, however, was expected, due to a similar dose-profile of other analgesics in these models in mice. It is known, for example, that thermal stimuli models are less sensitive to morphine than other models such as the acetic acid-induced writhing test and, therefore, the effective dose of morphine in the former is sixteen times greater than in the latter one. Morphine depresses responses in the dorsal horn, produced by C-fibres, more easily than it depresses those produced by A δ -fibres (Le Bars et al., 1976, 2001), hence, drugs with similar profiles can be compared with morphine on the basis of the selectivity of fibres on which they act.

The tail-flick is considered to be a spinal reflex, but the mechanism of response could also involve higher neural structures (Jensen and Yaksh, 1986). The hot-plate test produces, at constant temperature, two kinds of behavioural response, which are paw licking and jumping. Both of these are considered to be supraspinally-integrated responses (Chapman et al., 1985).

4.2. Mechanisms of action

Further experiments were undertaken to elucidate the molecular mechanism by which UT fraction exerted its antinociceptive activity. The present results lead to the conclusion that the opioid system is unlikely to be involved. This is drawn from the fact that pre-treatment of animals with naltrexone, a nonselective opioid receptor antagonist, completely inhibited the antinociceptive effect of morphine but not the action of UT fraction. Furthermore, the results of the present study provide consistent evidence to suggest that the L-arginine nitric oxide pathway is unlikely to be involved in the antinociceptive action of UT fraction. This evidence derives from the fact that pre-treatment of animals with the substrate for NOS, L-arginine, significantly reversed the antinociception caused by L-NOARG (a known

inhibitor of NOS), but not the antinociceptive action of UT fraction, in the formalin test.

Furthermore, the results of the present study provide consistent evidence that antinociception elicited by the UT fraction is independent of the activation of important endogenous analgesic systems, namely cholinergic and noradrenergic systems. In fact, the treatment of animals with atropine, a nonselective muscarinic antagonist, failed to interfere with UT fraction-induced antinociception when assessed in the formalin model of pain. Moreover, the α_1 and α_2 -adrenoceptors appear unlikely to be involved in the antinociceptive action of UT fraction, evidenced by the fact that selective antagonists of these receptors failed to alter the antinociception caused by treatment with UT fraction, in conditions where they produce significant inhibition of the antinociception caused by the respective selective agonists.

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 synthesised in the mammalian brain (Fields et al., 1991; Millan, 2002). In addition, several studies have shown that the bulbospinal serotonin system may suppress incoming noxious input to the spinal cord and inhibit pain transmission (Basbaum and Fields, 1984; Alhaider, 1991). Descending serotonergic pathways modulate the activity of projection neurons directly, as well as via interneurons (Alhaider et al., 1991). The multiple 5-HT receptor types within the spinal cord appear to fulfil 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, and (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-HT₂ and 5-HT₃ receptors modulating nociceptive transmission, as activation of these receptors in the spinal cord produces antinociception in the formalin test and other models (Bardin et al., 2000; Sasaki et al., 2001; Millan, 2002). Furthermore, the results of the present study show that UT fraction produces antinociception that appears to be mediated by an interaction with 5-HT₂ receptors. This assertion is supported by the demonstration that a selective antagonist of 5-HT_{2A} receptors, namely ketanserin, consistently reversed the antinociception caused by both systemic administration of UT fraction and DOI, a 5-HT₂ receptor agonist, when analysed in the formalin test in mice. In addition, another important finding regarding the activity of UT alkaloids on serotonergic receptors is our result showing that pre-treatment of mice with reserpine, 24 h prior to the treatment with UT fraction, was not able to prevent the

antinociceptive effect of the latter. Reserpine depletes monoamines stores, which, in normal conditions, exacerbates nociceptive behaviour in formalin-induced nociception. Therefore, it is likely that these alkaloids exert their action independently from endogenous 5-HT. Kang et al. (2002) had previously demonstrated an interaction between oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* and 5-HT₂ receptors. That study showed that pteropodine and isopteropodine, both pentacyclic oxindole alkaloids identified and isolated from this plant (Laus et al., 1997), markedly enhanced the current responses evoked by serotonin on 5-HT₂ receptors expressed in *Xenopus* oocytes. Thus, the present findings extend literature data and show that UT fraction may be able to directly interact with 5-HT₂ receptors, rather than releasing endogenous 5-HT from nerve terminals of the descending monoaminergic neurones, and this results in blockade of the nociceptive information transmission in the spinal cord.

Kitajima et al. (2002) developed a study of the chemical synthesis of a monoterpene glucoindole alkaloid 3,4-dehydro-5(S)-5-carboxystrictosidine, which was isolated from Peruvian *Uncaria tomentosa*. The structure of the compound was established by the synthesis from secologanin and L-tryptophan through a Bishler–Napieralski reaction. It has been long known that L-tryptophan is the natural precursor for the biosynthesis of indolamine 5-HT, or serotonin, as well as being the precursor molecule for the plant biosynthesis of all indole alkaloids. All of these pieces of evidence lead to a possible relationship between the chemical structure of compounds and biological activity.

It is important to state that the total pentacyclic oxindole alkaloid concentration of UT fraction is 95% (m/m) and this percentage contains the six main oxindole alkaloids described by other authors as characteristic of *Uncaria tomentosa* (Laus and Keplinger, 1994). We believe that it represents a special opportunity for characterizing its biological activity and diminishes the possibility of interference from other chemical substances.

In conclusion, the data from the present study show that UT fraction exerts pronounced systemic antinociception in chemical (acetic acid-, formalin-, and capsaicin-induced pain) and thermal (hot-plate and tail-flick test) models of nociception in the mouse at a dose that does not interfere with the locomotor activity of animals. In addition, antinociceptive effect of UT fraction involves an interaction with serotonergic (specifically 5-HT₂) systems, but not with opioidergic nor noradrenergic systems nor the L-arginine nitric oxide pathway. Furthermore, the antinociceptive action demonstrated in the present study supports, at least partly, the ethnomedical uses of this plant.

5. Conclusions

Uncaria tomentosa is a very important plant from the ethnopharmacological point of view, since it has spread

from therapeutic and prophylactic application by native South American Indians to commercial use around the world. The characterization of its biological activities is, therefore, of major importance. This study reveals a potent antinociceptive activity of an alkaloid-rich fraction of this plant and an involvement of serotonergic mechanisms in this activity.

Acknowledgement

The authors would like to thank CNPq–Conselho Nacional de Pesquisa for financial support.

References

- Aguilar JL, Rojas P, Marcelo A, Plaza A, Bauer R, Reininger E, et al. Anti-inflammatory activity of two different extracts of *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae). *J Ethnopharmacol* 2002;81:271–6.
- Akesson C, Lindgren H, Pero RW, Leanderson T, Ivars F. An extract of *Uncaria tomentosa* inhibiting cell division and NF- κ B activity without inducing cell death. *Int Immunopharmacol* 2003;3:1889–900.
- Alhaider AA. Antinociceptive effect of ketanserin in mice: involvement of supraspinal 5-HT₂ receptors in nociceptive transmission. *Brain Res* 1991;543:335–40.
- Alhaider AA, Lei SZ, Wilcox GL. Spinal 5-HT₃ receptor-mediated antinociception: possible release of GABA. *J Neurosci* 1991;11:1881–8.
- Ameri A. The effects of Aconitum alkaloids on the central nervous system. *Prog Neurobiol* 1998;56:211–35.
- Aquino R, De Simone F, Pizzi C. Plant metabolites, structure in vitro antiviral activity of quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa* and *Guettarda platypoda*. *J Nat Prod* 1989;52:679–85.
- Aquino R, De Feo V, De Simone F, Pizzi C, Cirino G. Plant metabolites, new compounds and anti-inflammatory activity of *Uncaria tomentosa*. *J Nat Prod* 1991;54:453–9.
- Aquino R, De Tommasi N, De Simone F, Pizzi C. Triterpenes and quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa*. *Phytochemistry* 1997;45(5):1035–40.
- Bardin L, Lavarenne J, Eschalier A. Serotonin receptor subtypes involved in the spinal antinociceptive effect of 5-HT in rats. *Pain* 2000;86:11–8.
- Basbaum AI, Fields HL. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annu Rev Neurosci* 1984;7:309–38.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997;389:816–24.
- Chapman CR, Casey KL, Dubner R, Foley KM, Graceley RH, Reading AE. Pain measurement: an overview. *Pain* 1985;22:1–31.
- D'Amour FE, Smith DL. A method for determining loss of pain sensation. *J Pharmacol Exp Ther* 1941;72:74–9.
- Eddy NB, Leimbach D. Synthetic analgesics: II. Dithienylbutenyl and dithienylbutylamines. *J Pharmacol Exp Ther* 1953;107:385–93.
- Elisabetsky E, Amador TA, Albuquerque RR, Nunes DS, Carvalho ACT. Analgesic activity of *Psychotria colorata* (Willd ex R and S) Muell Arg alkaloids. *J Ethnopharmacol* 1995;48:77–83.
- Fields HL, Heinricher MM, Mason P. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. *Annu Rev Neurosci* 1991;14:219–45.
- Ginkel A. Identification of the alkaloids and flavonoids from *Uncaria tomentosa* bark by TLC in quality control. *Phytother Res* 1996;10:18–9.
- Holzer P. Capsaicin as a tool for studying sensory neuron functions. *Adv Exp Med Biol* 1991;298:3–16.
- Hunnskaar S, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 1987;30:103–14.
- Hunnskaar S, Fasmer OB, Hole K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *J Neurosci Methods* 1985;14:69–73.
- Hyliden JL, Wilcox GL. Intrathecal serotonin in mice: analgesia and inhibition of a spinal action of substance P. *Life Sci* 1983;33:789–95.
- Jancso G. Pathobiological reactions of C-fibre primary sensory neurones to peripheral nerve injury. *Exp Physiol* 1992;77:405–31.
- Jensen TS, Yaksh TL. Examination of spinal monoamine receptors through which brainstem opiate-sensitive systems act in the rat. *Brain Res* 1986;363:99–113.
- Julius D, Basbaum AI. Mechanisms molecular of nociception. *Nature* 2001;413:203–10.
- Kang T, Matsumoto K, Tohda M, Murakami Y, Takayama H, Kitajima M, et al. Pteropodine and isopteropodine positively modulate the function of rat muscarinic M1 and 5-HT₂ receptors expressed in *Xenopus* oocyte. *Eur J Pharmacol* 2002;444:39–45.
- Keplinger K, Laus G, Wurm M, Dierich MP, Teppner H. *Uncaria tomentosa* (Willd) DC—ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical results. *J Ethnopharmacol* 1999;64:23–34.
- Kitajima M, Yokoya M, Takayama H, Aimi N. Synthesis and absolute configuration of a new 3,4-dihydro-beta-carboline-type alkaloid, 3,4-dehydro-5(S)-5-carboxystricoidine, isolated from Peruvian *Una de gato* (*Uncaria tomentosa*). *Chem Pharm Bull* 2002;50:1376–8.
- Koster R, Anderson M, Beer EJ. Acetic acid for analgesic screening. *Fed Proc* 1959;18:412.
- Kumazawa T, Mizumura K, Koda H, Fukusako H. EP receptor subtypes implicated in the PGE₂-induced sensitization of polymodal receptors in response to bradykinin and heat. *J Neurophysiol* 1996;75:2361–8.
- Küpel E, Koşar M, Yeşilada E, Başer KHC, Başer C. A comparative study on the anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effects of isoquinoline alkaloids from the roots of Turkish *Berberis* species. *Life Sci* 2002;72:645–57.
- Laus G, Keplinger D. Separation of stereoisomeric oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* by high performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1994;662:243–9.
- Laus G, Brössner D, Keplinger K. Alkaloids of Peruvian *Uncaria tomentosa*. *Phytochemistry* 1997;45:855–60.
- Le Bars D, Guilbaud G, Jurna I, Besson JM. Differential effects of morphine on responses of dorsal horn lamina V type cells elicited by A and C fiber stimulation in the spinal cat. *Brain Res* 1976;115:518–24.
- Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev* 2001;53:597–652.
- Lemaire I, Assinew V, Cano P, Awang DVC, Arnason JT. Stimulation of interleukin-1 and -6 production in alveolar macrophages by the neotropical liana, *Uncaria tomentosa* (Uña de gato). *J Ethnopharmacol* 1999;64:109–15.
- Martin SF, Mortimore M. New methods for the synthesis of oxindole alkaloids Total synthesis of isopteropodine and pteropodine. *Tetrahedron Lett* 1990;31:4557–60.
- Martindale J, Bland-Ward PA, Chessell IP. Inhibition of C-fibre mediated sensory transmission in the rat following intraplantar formalin. *Neurosci Lett* 2001;316:33–6.
- Matsumoto K, Mizowaki M, Suchitra T, Takayama H, Sakai S, Aimi N, et al. Antinociceptive action of mitragynine in mice: evidence for the involvement of supraspinal opioid receptors. *Life Sci* 1996;59:1149–55.
- Matsumoto K, Horie S, Ishikawa H, Takayama H, Aimi N, Ponglux D, et al. Antinociceptive effect of 7-hydroxymitragynine in mice: discovery of an orally active opioid analgesic from the Thai medicinal herb *Mitragyna speciosa*. *Life Sci* 2004;74:2144–55.
- Millan MJ. Serotonin (5-HT) and pain: a reappraisal of its role in the light of receptor multiplicity. *Semin Neurosci* 1995;7:409–19.

- Millan MJ. Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 2002;66:355–474.
- Miller MJS, Angeles FM, Reuter BK, Bobrowski P, Sandoval M. Dietary antioxidants protect gut epithelial cells from oxidant-induced apoptosis. *BMC Complement Altern Med* 2001;1:11.
- Muhammad I, Dunbar DC, Khan RA, Ganzera M, Khan IA. Investigation of uña de gato 7-deoxyloganic acid and ¹⁵N NMR spectroscopic studies on pentacyclic oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa*. *Phytochemistry* 2001;57:781–5.
- Reeh PW, Kress M. Molecular physiology of proton transduction in nociceptors. *Curr Opin Pharmacol* 2001;1:45–51.
- Ribeiro RA, Vale ML, Thomazzi FM, Paschoalato ABP, Poole S, Ferreira SH, et al. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *Eur J Pharmacol* 2000;387:111–8.
- Rizzi R, Re F, Bianchi A, De Feo V, De Simone F, Bianchi L, et al. Mutagenic and antimutagenic activities of *Uncaria tomentosa* and its extracts. *J Ethnopharmacol* 1993;38:63–77.
- Rosland JH, Hunskaar S, Hole K. Diazepam attenuates morphine antinociception test-dependently in mice. *Pharmacol Toxicol* 1990;66:382–6.
- Sakurada T, Katsumata K, Tan-no K, Saturada S, Kisara K. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. *Neuropharmacology* 1992;31:1279–85.
- Sakurada T, Sugiyama A, Sakurada C, Tanno K, Sakurada S, Kisara K, et al. Involvement of nitric oxide in spinally mediated capsaicin- and glutamate-induced behavioural responses in the mouse. *Neurochem Int* 1996;29:271–8.
- Sakurada T, Matsumura T, Moriyama T, Sakurada C, Ueno S, Sakurada S. Differential effects of intraplantar capsaizepine and ruthenium red on capsaicin-induced desensitization in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2003;75:115–21.
- Sandoval M, Charbonnet RM, Okuhama NN, Trentacosti AM, Miller MJS. Cat's claw inhibits TNF α production and scavenges free radicals: role in cytoprotection. *Free Radic Biol Med* 2000;29:71–8.
- Sandoval-Chacón M, Thompson JH, Zhang XJ, Liu X, Mannick EE, Sadowska-Krowicka H, et al. Anti-inflammatory actions of cat's claw: the role of NF- κ B. *Aliment Pharmacol Ther* 1998;12:1279–89.
- Santos ARS, Calixto JB. Ruthenium red and capsaizepine antinociceptive effect in formalin and capsaicin models of pain in mice. *Neurosci Lett* 1997;235:73–6.
- Sasaki M, Ishizaki K, Obata H, Goto F. Effects of 5-HT₂ and 5-HT₃ receptors on the modulation of nociceptive transmission in rat spinal cord according to the formalin test. *Eur J Pharmacol* 2001;424:45–52.
- Sawynok J, Reid A. Interactions of descending serotonergic systems with other neurotransmitters in the modulation of nociception. *Behav Brain Res* 1996;73:63–8.
- Sheng Y, Pero RW, Wagner H. Treatment of chemotherapy-induced leukopenia in a rat model with aqueous extract from *Uncaria tomentosa*. *Phytomedicine* 2000a;7:137–43.
- Sheng Y, Bryngelsson C, Pero RW. Enhanced DNA repair, immune function and reduced toxicity of C-MED-100™, a novel aqueous extract from *Uncaria tomentosa*. *J Ethnopharmacol* 2000b;69:115–26.
- Stuppner H, Sturm S, Konwalinka G. HPLC analysis of the main oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa*. *Chromatographia* 1992a;34:597–600.
- Stuppner H, Sturm S, Konwalinka G. Capillary electrophoretic analysis of oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa*. *J Chromatogr* 1992b;609:375–80.
- Tjølsen A, Hole K. Animal models of analgesia. In: Dickenson A, Besson J, editors. *The pharmacology of pain (Handbook of experimental pharmacology)*, vol. 30/I. Berlin: Springer Verlag; 1997. p. 1–20.
- Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 1992;51:5–17.
- Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, et al. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 1998;21:531–43.
- Verotta A, Orsini F, Sbacchi M, Scheidler MA, Amadorc TA, Elisabetsky E. Synthesis and antinociceptive activity of chimonanthines and pyrrolidinoindoline-type alkaloids. *Bioorg Med Chem* 2002;10:2133–42.
- Vyklicky L. Techniques for the study of pain in animals. *Adv Pain Res Ther* 1979;3:727–45.
- Zimmermann P. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983;16:109–10.

Title: Involvement of the glutamatergic system in the antinociceptive effect of an oxindole alkaloids fraction from *Uncaria tomentosa*.

Sofia Jürgensen^a, Vinícius M. Gadotti^b, Gustavo A. Micke^c, Moacir G. Pizzolatti^d, Adair Roberto Soares Santos^e, Rosa Maria Ribeiro-do-Valle^f.

Corresponding Author: Rosa Maria Ribeiro-do-Valle

Address: Departamento de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas - Bloco D, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário – Trindade, Florianópolis, SC, Brazil. CEP 88049-900.

phone: +55 48 331-9491 Fax: +55 48 3375479 e-mail: ribeiro@farmaco.ufsc.br

ABSTRACT

PURPOSE: This study was designed to evaluate the role of the glutamatergic system and the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α in the antinociception elicited by UT fraction, an oxindole alkaloids-rich fraction from *Uncaria tomentosa*. **METHODS:** Male Swiss mice were treated by intraperitoneal (i.p.) route with UT fraction (10 – 300 mg/kg) and 30 min later received an intraplantar (i.pl.) injection of glutamate (20 μ mol/paw), followed by 15 min of observation and counting of paw licking time. The role of spinal glutamatergic receptors and pro-inflammatory cytokines was investigated by injecting either glutamate, NMDA, AMPA, kainate, trans-ACPD (an agonist of metabotropic glutamate receptors), substance P, TNF- α or IL-1 β , by intrathecal (i.t.) route, in mice treated with 100 mg/kg of UT fraction (i.p.), 30 min earlier. Nociception evoked by each agent was measured by counting biting behavior time. **RESULTS:** The pre-treatment with UT fraction inhibited i.pl. glutamate-induced nociception with a mean ID50 value of 58.0 (44.5 – 71.8) mg/kg. Moreover, pre-treatment with 100 mg/kg also caused marked inhibition of the nociceptive biting response induced by i.t. administration of glutamate, NMDA and substance P (by 87 \pm 8, 96 \pm 2 and 68 \pm 15 %, respectively), without affecting nociceptive responses induced by AMPA, kainate or trans-ACPD. At the same dose, UT fraction also inhibited the biting responses induced by i.t. injection of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α (by 96 \pm 3 and 92 \pm 6 %, respectively). **CONCLUSION:** Together, these results provide experimental evidence indicating that UT fraction produces central analgesia in mice, and the inhibition of spinal glutamatergic NMDA receptors seems to contribute to the mechanisms underlying this action.

^a Department of Pharmacology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

^b Department of Physiological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

^c Department of Chemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

^d Department of Chemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

^e Department of Physiological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

^f Department of Pharmacology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

INTRODUCTION

Uncaria tomentosa (Willd.) DC (Rubiaceae) is a woody liana, indigenous to the Amazon rainforest. It is commonly known as cat's claw or *uña de gato* due to its morphological aspects. South American Indians have reportedly used decoctions of the barks in folk medicine, and its applications include the treatment of arthritis, rheumatism, abscesses, inflammations, fever, allergy, asthma, cancer, gastric ulcer and others (1).

Among many biological activities described for several extracts, fractions and isolated compounds of *U. tomentosa* are: anti-inflammatory, antimutagenic, antioxidant, immunostimulant, antiviral, gastroprotective and anti-amnesic (2). Previously, our group reported that a fraction composed of oxindole alkaloids from *U. tomentosa* exhibited antinociceptive effects in thermal and chemical models of nociception in mice through mechanisms that involve an interaction with 5-HT₂ receptors (3).

Oxindole alkaloids are found in several species of the genus *Uncaria*, including *U. tomentosa*, which is the species with the largest number of identified compounds (2). Previous correlations between oxindole alkaloids and the glutamatergic system include reports that an extract and an alkaloid fraction from *U. rhynchophylla* reduced glutamate- and NMDA-induced neuronal death (4, 5). Rhynchophylline and isorhynchophylline, the major tetracyclic oxindole alkaloid components of *Uncaria* species, have been extensively studied (6). These compounds exerted protective activity against ischemic damage to hippocampal neurons *in vitro* and reversibly reduced NMDA-induced currents in NMDA receptors expressed in oocyte membranes (7, 8). However, no behavioral evidence for this interaction of oxindole alkaloids with the glutamatergic NMDA receptors has been shown.

Nowadays it is well established that glutamate displays an important role in peripheral and central nociceptive transmission. Besides, glutamate is the main neurotransmitter present in primary

sensory afferents, which are responsible for the conduction of the nociceptive stimulus from the periphery to the spinal cord (9). Glutamate is centrally released in the spinal cord and activates specific receptors present in dorsal horn neurons, which constitute the ascending pathways that carry nociceptive information to supraspinal areas. The glutamatergic receptors are divided in two different classes, the ionotropic (types AMPA, kainate and NMDA) and the metabotropic (mGluR1-8) receptors (10).

The activation of peripheral nociceptors, caused by tissue injury or inflammation, induces the co-release of glutamate and the pro-nociceptive tachykinin substance P from central terminals of C-fibres, causing the activation of NK1 receptors in second order spinal neurons (9). Substance P and glutamate exert not only direct postsynaptic actions on intrinsic dorsal horn neurons, but also positive feedback actions to enhance its own release from primary afferent terminals. Besides, there is a great body of evidence implicating these transmitters in maintaining nociceptive transmission, through wind-up phenomenon, in cases of persistent pain (11).

Central release of glutamate and substance P during nociceptive stimulation is capable of activating glial cells that, once activated, release pro-inflammatory cytokines such as Interleukin-1 β (IL-1 β) and Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α). Through specific cell-surface receptors normally present on primary afferent neurons, IL-1 β and TNF- α activate or sensitize nociceptors, producing pain and hyperalgesia, (12).

Therefore, considering the importance of glutamate receptors in the process of pain production and maintenance, this study was designed to investigate the role played by peripheral and spinal glutamate receptors in the antinociception caused by a standardized alkaloid fraction from *U. tomentosa* (UT fraction), against the nociceptive response induced by i.pl. injection of glutamate and i.t. injection of glutamate or glutamatergic receptor selective agonists, in mice. Additionally, we

sought to investigate whether UT fraction intervened in the nociceptive behavior caused by i.t. injection of substance P and the pro-inflammatory cytokines, IL-1 β and TNF- α .

MATERIALS AND METHODS

Animals

All experiments were conducted using male Swiss mice (30–35 g), housed at 22 ± 2 °C under a 12-h light/12-h dark cycle and with free access to food and water. Animals were acclimatized to the laboratory for at least 1 h before testing and were used only once. The experiments were performed after approval of the protocol by the Institutional Ethics Committee under protocol no.329, and were carried out in accordance with the Ethical Guidelines for Investigations of Experimental Pain in Conscious Animals (13).

Drugs

The substances used were: L-glutamic acid hydrochloride, substance P and phosphate buffered saline solution (PBS) (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA); kainic acid (kainate), (\pm)- 1-aminocyclopentane-*trans*-1,3-dicarboxylic acid (*trans*-ACPD), α -amino-3-hydroxy-5 methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) and *N*-methyl-d-aspartic acid (NMDA) (Tocris, Cookson Inc., Ellisville, USA); IL-1 β and TNF- α (R & D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA). All drugs were dissolved immediately before administration in PBS, and glutamate solution was buffered with sodium hydroxide, in equimolar quantities, in order to reach physiologic pH. Control animals received vehicle only (10 ml/kg i.p.).

Plant material

UT fraction, a standardized fraction obtained from *U. tomentosa* composed exclusively of oxindole alkaloids, was used in all experiments, as reported before (3). UT fraction was analyzed by capillary electrophoresis and nuclear magnetic resonance, through adaptation of the method described previously (14, 15). As shown in the electropherogram (Figure 1), tetracyclic oxindole alkaloids account for 30.5% of the fraction (rhynchophylline (2) 16.0% and isorhynchophylline (4) 14.5%), while 65% represent pentacyclic oxindole alkaloids (2.1% speciophylline (1), 4.1% mytraphylline (3), 25.9% isomytraphylline (5), 4.3% uncarine F (6), 5.1% pteropodine (7) and 23.5% isopteropodine (8)) and 4.5% represent the unidentified oxindole alkaloids. UT fraction was dissolved in Tween-80[®] (Fisher Scientific International) and then diluted with PBS, so that the final concentration of Tween-80[®] did not exceed 10% and did not cause any per se effect.

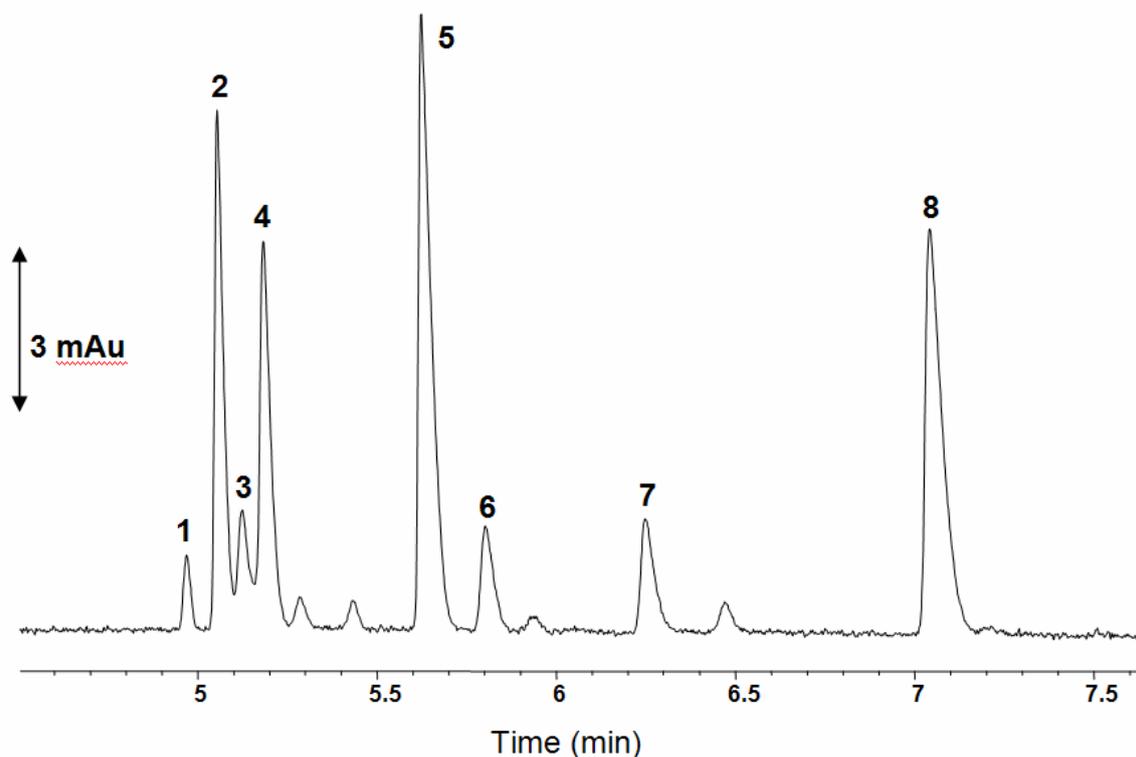


Figure 1: Electropherogram of UT fraction (400 mg/l) in MeOH:water (20:80 v/v). 1- speciophylline; 2- rhynchophylline; 3-mytraphylline; 4- isorhynchophylline; 5- isomitraphylline; 6- uncarine F; 7- pteropodine; 8-isopteropodine. Electrophoretic conditions: fused-silica capillary 50 μm i.d., 60 cm total length (51.5 cm to detector); electrolyte composition MES 40 mM, Tris 10 mM, pH 5.6, 20%

MeOH (v/v); separation voltage 30 kV; hydrodynamic injection 5 s at 50 mbar; temperature 25 °C, detection at 239 nm.

Glutamate-induced nociception

In order to investigate the possible interaction of UT fraction with the glutamatergic system, animals treated with UT fraction (10-300 mg/kg, i.p.) or vehicle (n = 6 – 8 per group) received 30 minutes later an injection of 20 µl of glutamate solution (20 µM) in the ventral surface of the right hind paw. Following glutamate injection, each animal was observed individually for 15 min and the amount of time spent licking or biting the injected paw was measured. The method used was similar to that described previously (16).

Spinal excitatory amino acids- and substance P-induced biting response

In an attempt to provide more direct evidence concerning the interaction of UT fraction with the glutamatergic receptors, we separately investigated whether or not UT fraction (100 mg/kg, i.p., 30 min beforehand) was able to antagonize the biting response induced by i.t. injection of glutamate, selective agonists of glutamatergic receptor types or substance P. Injections were given to waking animals using the method described by Hylden and Wilcox (17). Animals (n = 6 – 8 per group) received over a period of 5 seconds an i.t. injection of 5 µl of vehicle solution, glutamate (175 nmol/site), AMPA (135 pmol/site), NMDA (450 pmol/site), kainate (110 pmol/site), trans-ACPD (50 nmol/site) or substance P (100 pmol/site). The nociceptive response elicited by each agent was quantified as the amount of time the animal spent biting or licking the flanks, hindlimbs or the tail (reactivity time), and evaluated following local post-injections for pre-determined periods of time: vehicle - 15 min; trans-ACPD - 5 min; NMDA and substance P - 5 min; kainate - 4 min; glutamate - 3 min and AMPA - 1 min, as described previously (18, 19).

Pro-inflammatory cytokines-induced biting response

As previously reported, cytokines are able to induce nociceptive behavioral responses when injected i.t. in mice (20, 21). Animals treated with UT fraction (10-300 mg/kg, i.p.) or vehicle (n = 6 – 8 per group) received 30 minutes later an i.t. injection of TNF- α (0.1 pg/site) or IL-1 β (1.0 pg/site), and were observed individually for 15 min. The reactivity time was measured with a stopwatch. The doses of IL-1 β and TNF- α and time of evaluation used in this study had been previously determined in our laboratory (data not shown).

Statistical Analysis

The results are presented as mean \pm SEM except the ID₅₀ value, which is reported as geometric mean accompanied by respective 95% confidence limit. The ID₅₀ value was determined by linear regression from individual experiments. Comparisons between experimental and control groups were performed by Student's T-test or one-way ANOVA followed by Newman-Keuls' test when appropriate. *P*-values less than 0.05 (*P*<0.05) were considered as indicative of significance. The analyses were performed using Prism 4[©] (GraphPad software, Inc., San Diego, CA, USA).

RESULTS

The systemic (i.p.) pre-treatment of animals with UT fraction at 30, 100 and 300 mg/kg inhibited by 36, 58 and 93%, respectively, the nociceptive behavior induced by i.pl. injection of glutamate (control mean: 176 \pm 13 s) (Figure 2). The calculated mean ID₅₀ value was 58 (44.5 – 71.8) mg/kg. ANOVA found significant effects between groups (F(4,30)=36.241, *P* <0.0001).

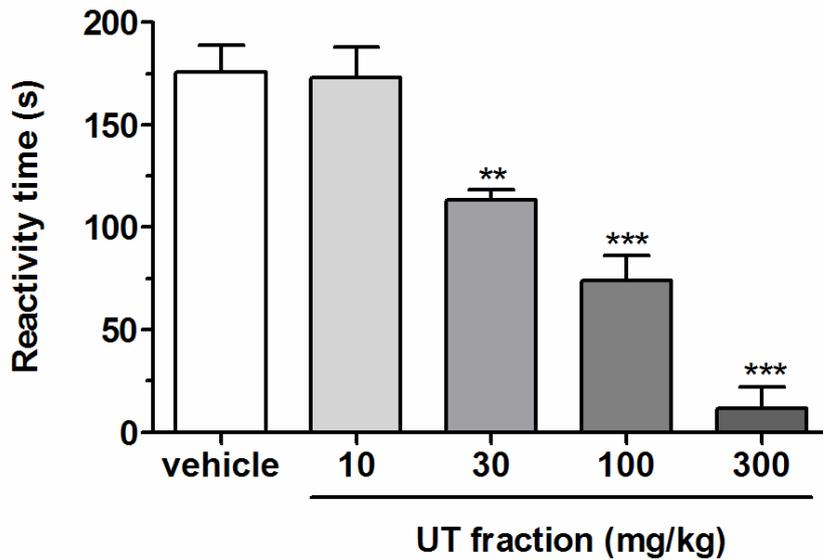


Figure 2: Dose-dependent inhibition of nociceptive behavior (reactivity time) exerted by pretreatment with UT fraction (10-300 mg/kg, i.p. 30 min), in the nociception induced by intraplantar injection of glutamate (20 μ mol/paw) in mice. Each group represents the mean of 6–8 animals and the vertical lines indicate the S.E.M. Asterisks denote the significance levels in comparison with control (vehicle) group values (one way-ANOVA, followed by Newman-Keuls' test); ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

Figure 3 shows that the biting responses induced by glutamate (124 ± 6 s), NMDA (152 ± 7 s) and substance P (120 ± 20 s), were significantly inhibited (by 87 ± 8 , 96 ± 2 and 68 ± 15 %, respectively) by pre-treatment of animals with UT fraction (100 mg/kg, i.p.). In contrast, at the same dose, UT fraction had no significant effect against kainate, AMPA or *trans*-ACPD-mediated biting response.

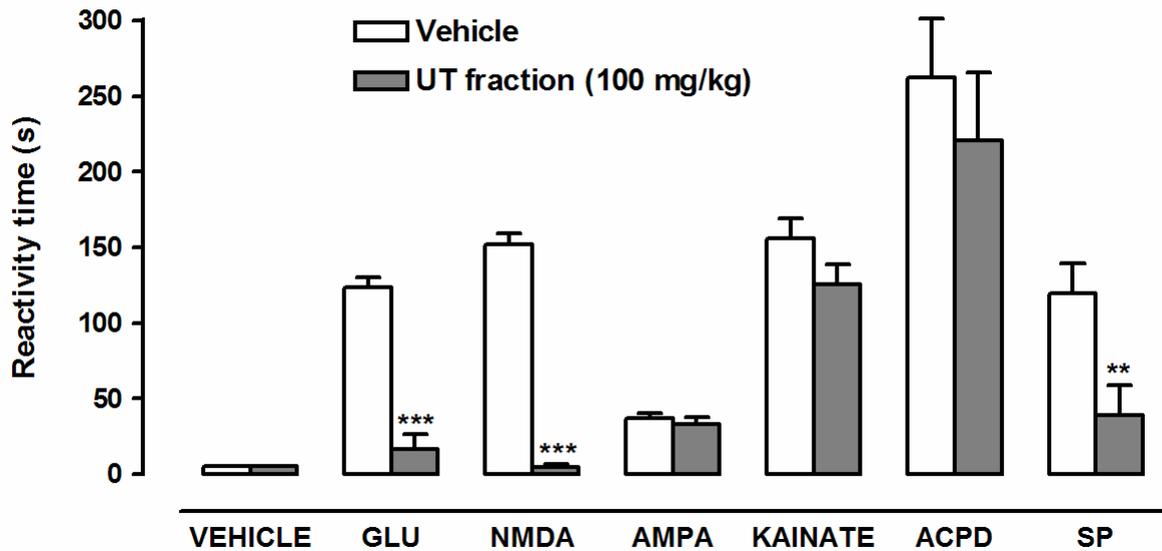


Figure 3: Effect of UT fraction (100 mg/kg) administered intraperitoneally on the biting response (reactivity time) caused by intrathecal injection of vehicle, glutamate (175 nmol/site), NMDA (450 pmol/site), AMPA (135 pmol/site), kainate (110 pmol/site), *trans*-ACPD (ACPD; 50 nmol/site) or substance P (100 pmol/site) in mice. Each group represents the mean of 6–8 animals and the vertical lines indicate the S.E.M. Asterisks denote the significance levels in comparison with control (vehicle) group values (Student’s T-test); ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

The biting responses induced by i.t. injection of IL-1 β (225 ± 32 s) and TNF- α (275 ± 18 s) were strongly inhibited by pre-treatment of animals with 100 mg/kg of UT fraction (by 96 ± 3 and 92 ± 6 %, respectively) (Figure 4).

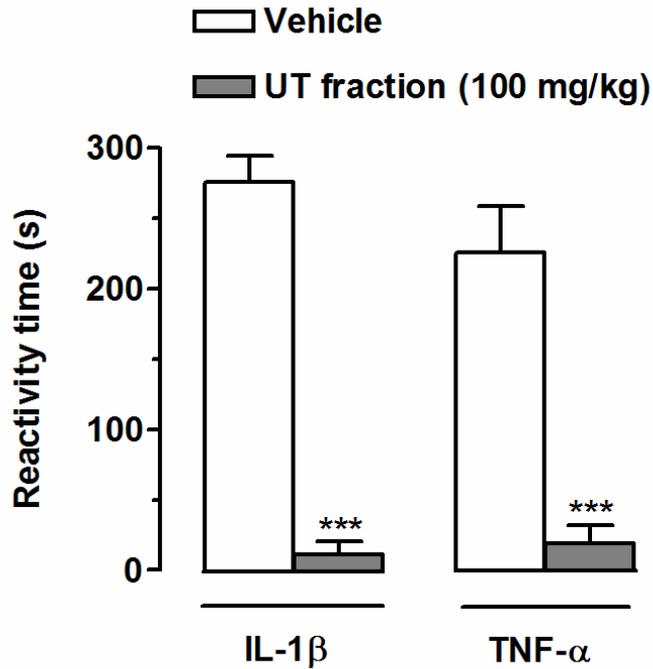


Figure 4: Effect of UT fraction (100 mg/kg) or vehicle administered intraperitoneally on the biting response (reactivity time) caused by intrathecal injection of pro-inflammatory cytokines Interleukin-1 β (IL-1 β ; 1.0 pg/site) or Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α ; 0.1 pg/site) in mice. Each group represents the mean of 6–8 animals and the vertical lines indicate the S.E.M. Asterisks denote the significance levels in comparison with control group values (Student's T-test); *** $P < 0.001$.

DISCUSSION

The present study demonstrates that systemic administration of UT fraction, an oxindole alkaloids-containing fraction from *U. tomentosa*, elicits a dose-dependant inhibition of the i.pl. glutamate-induced nociceptive response in mice. Beirith et al. (16) have found that this response appears to involve peripheral, spinal and supraspinal sites of action, and is greatly mediated by both NMDA and non-NMDA receptors as well as by the release of nitric oxide or by some nitric oxide-related substances. Moreover, there is evidence of the presence of NMDA and non-NMDA receptors in small, unmyelinated sensory nerve terminals in the skin (22). This model is thought to reproduce certain forms of pain associated with inflammation (16).

The release of glutamate is the most important event controlling the excitation of neurons within the dorsal horn of the spinal cord, as a result of impulses arriving from primary afferent fibers. Glutamate acts initially through AMPA receptors, producing a rapid depolarization that removes the basal blockade of NMDA receptor channel pore by Mg^{2+} ions. It is well established that activation of the NMDA receptor promotes calcium influx that leads to a longer lasting depolarization and post-receptor events (10).

Systemic treatment with UT fraction inhibited the nociceptive transmission at the spinal cord level, assessed by the i.t. glutamate-induced biting test. Thus, the possibility that UT fraction exerts antinociceptive effect by inhibiting glutamatergic transmission at the spinal level can be considered. To investigate if this action was receptor-specific, selective agonists of each type of glutamatergic receptors, ionotropic and metabotropic, were used. The results showed that UT fraction selectively inhibited the biting response induced by NMDA, but not by any of the other tested glutamatergic agonists. This fact suggests that oxindole alkaloids from UT fraction may exert antinociceptive activity through the inhibition of NMDA receptor-mediated cellular events, at the spinal cord level. Besides normal synaptic transmission, NMDA glutamatergic receptors also participate in the phenomenon of central sensitization of nociceptors, a key step in the process of persistent pain formation. This way, the NMDA receptor becomes an important target for the development of analgesic drugs (23).

The i.t. injection of substance P activates NK1 receptors causing projection neurons to discharge and, therefore, elicits nociceptive behavior of biting and scratching (24). Substance P and glutamate are co-localized in certain nociceptive afferent fibers and depolarization in these fibers leads to the release of both neurotransmitters in the dorsal horn (25). Furthermore, there is an interaction between NK1 and NMDA receptors in the dorsal horn, in which the responses mediated by one receptor can be enhanced by the activation of the other (26, 27). Therefore, glutamatergic transmission, through the activation of NMDA receptors, is partly responsible for substance P-induced

pain behavior (28). Systemic administration of UT fraction, at the tested dose, significantly inhibited nociceptive response induced by substance P, reinforcing the hypothesis that the alkaloids of UT fraction inhibit spinal NMDA receptors.

The i.t. injection of cytokines, such as TNF- α , IL-1 α , IL-1 β and IFN- γ , induces nociceptive behavior that is partly mediated through the activation of central nerve terminals and subsequent induction of glutamate and substance P release (20, 21). This study shows that UT fraction was able to inhibit the nociceptive behaviour induced by i.t. injection of IL-1 β and TNF- α . There are two ways of interpreting this result. One possibility is that the oxindole alkaloids present in UT fraction directly inhibit the action of cytokines, preventing them from depolarizing projection neurons and primary afferents. The other is that the alkaloids inhibit the further activation of projection neurons by glutamate, through the inhibition of NMDA receptors. The second hypothesis seems more plausible, since no previous correlation has been established between oxindole alkaloids and the inhibition of the cytokine receptor function. Moreover, the anti-inflammatory effect of *U. tomentosa* extracts appears to be independent of its alkaloid content (29). Therefore, it is suggested that the inhibition of the cytokines-induced biting behaviour is due to the antagonism of glutamatergic transmission at the spinal level.

U. tomentosa is a very important plant from the ethnopharmacological point of view, since it has spread from therapeutic and prophylactic application by native South American Indians to commercial use around the world. The characterization of its biological activities is, therefore, of major importance. The present findings extend previous data of our group and presents, for the first time, behavioral evidence for the inhibition of NMDA receptors by oxindole alkaloids from *U. tomentosa*. This effect is likely due to the presence of rhynchophylline and isorhynchophylline in UT fraction, since it was reported that these alkaloids act as antagonists of the NMDA receptor function (7). Although its precise site of action remains unclear, the inhibition of the glutamatergic NMDA receptors is likely to be responsible for the greater part of the antinociceptive action of UT fraction.

Finally, the antinociceptive action demonstrated in the present study supports, at least in part, the ethnomedical uses of this plant.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Apoio a Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina (FAPESC), Brazil.

REFERENCES

- (1) Keplinger K, Laus G, Wurm M, Dierich MP and Teppner H. *Uncaria tomentosa* (Willd) DC - ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical results. *J Ethnopharmacol*, 64: 23-34, 1999.
- (2) Heitzman ME, Neto CC, Winiarz E, Vaisberg AJ and Hammond GB. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). *Phytochemistry*, 66: 5-29, 2005.
- (3) Jürgensen S, DalBó S, Angers P, Santos ARS and Ribeiro-doValle RM. Involvement of 5-HT₂ receptors in the antinociceptive effect of *Uncaria tomentosa*. *Pharmacol Biochem Behav*, 81: 466-477, 2005.
- (4) Lee J, Son D, Lee P, Kim SY, Kim H, Kim CJ et al. Alkaloid fraction of *Uncaria rhynchophylla* protects against N-methyl-D-aspartate-induced apoptosis in rat hippocampal slices. *Neurosci Lett*, 348: 51-55, 2003.
- (5) Sun X, Chan LN, Gong X and Sucher NJ. N-methyl-D-aspartate receptor antagonist activity in traditional Chinese stroke medicines. *Neurosignals*, 12: 31-38, 2003.
- (6) Shi JS, Yu JX, Chen XP and Xu RX. Pharmacological actions of *Uncaria* alkaloids, rhynchophylline and isorhynchophylline. *Acta Pharmacol Sin*, 24: 97-101, 2003.

- (7) Kang TH, Murakami Y, Matsumoto K, Takayama H, Kitajima M, Aimi N et al. Rhynchophylline and isorhynchophylline inhibit NMDA receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Eur J Pharmacol*, 455: 27-34, 2002.
- (8) Kang TH, Murakami Y, Takayama H, Kitajima M, Aimi N, Watanabe H et al. Protective effect of rhynchophylline and isorhynchophylline on in vitro ischemia-induced neuronal damage in the hippocampus: putative neurotransmitter receptors involved in their action. *Life Sci*, 76: 331-343, 2004.
- (9) Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol*, 57: 1-164, 1999.
- (10) Hill RG. Molecular basis for the perception of pain. *Neuroscientist*, 7: 282-292, 2001.
- (11) Herrero JF, Laird JM and Lopez-Garcia JA. Wind-up of spinal cord neurons and pain sensation: much ado about something? *Prog Neurobiol*, 61: 169-203, 2000.
- (12) Wieseler-Frank J, Maier SF, Watkins LR. Central proinflammatory cytokines and pain enhancement. *Neurosignals*, 14: 166-174, 2005.
- (13) Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, 16: 109-110, 1983.
- (14) Seki H, Takayama H, Aimi N, Sakai SI and Ponglux D. A Nuclear magnetic resonance study on eleven stereoisomers of heteroyohimbine-type oxindole alkaloids. *Chem Pharm Bull*, 41: 2077-2086, 1993.
- (15) Valente LMM, Alves FF, Bezerra GM, Almeida MBS, Rosário SL, Mazzei JL et al. Desenvolvimento e aplicação de metodologia por cromatografia em camada delgada para determinação do perfil de alcalóides oxindólicos pentacíclicos nas espécies sul americana do gênero *Uncaria*. *Braz J Pharmacogn*, 16: 216-223, 2006.
- (16) Beirith A, Santos ARS and Calixto JB. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. *Brain Res*, 924: 219-228, 2002.
- (17) Hylden JL and Wilcox GL. Intrathecal morphine in mice: a new technique. *Eur J Pharmacol*, 67: 313-316, 1980.
- (18) Scheidt C, Santos AR, Ferreira J, Malheiros A, Cechinel-Filho V, Yunes RA et al. Evidence for the involvement of glutamatergic receptors in the antinociception caused in mice by the sesquiterpene drimaniol. *Neuropharmacology*, 43: 340-347, 2002.

- (19) Gadotti VM, Tibola D, Pazcuk AF, Rodrigues ALS, Calixto JB and Santos ARS. Contribution of spinal glutamatergic receptors to the antinociception caused by agmatine in mice. *Brain Res*, 1093: 116-122, 2006.
- (20) Robertson B, Xu XJ, Hao JX, Wiesenfeld-Hallin Z, Mhlanga J, Grant G et al. Interferon-gamma receptors in nociceptive pathways: role in neuropathic pain-related behavior. *Neuroreport* , 8: 1311-1316, 1997.
- (21) Tadano T, Namioka M, Nakagawasai O, Tan-No K, Matsushima K, Endo Y et al. Induction of nociceptive responses by intrathecal injection of interleukin-1 in mice. *Life Sci*, 65: 255-261, 1999.
- (22) Ault B and Hildebrand LM. L-glutamate activates peripheral nociceptors. *Agents Actions*, 39: 142-144, 1993.
- (23) Bennett GJ. Update on the Neurophysiology of Pain Transmission and Modulation: Focus on the NMDA-Receptor. *J Pain Symptom Manage*, 19: S2-6, 2000.
- (24) Hylden JL and Wilcox GL. Intrathecal substance P elicits a caudally-directed biting and scratching behavior in mice. *Brain Res*, 217: 212-215, 1981.
- (25) Debiasi S and Rustioni A. Glutamate and substance P coexist in primary afferent terminals in the superficial laminae of spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85: 7820-7824, 1988.
- (26) Urban L, Thompson SWN, Dray A. Modulation of spinal excitability: co-operation between neurokinin and excitatory amino acid neurotransmitters. *Trends Neurosci* 1994; 17: 432-38.
- (27) Cumberbatch MJ, Chizh BA, Headley PM. Modulation of excitatory amino acid responses by tachykinins and selective tachykinin receptor agonists in the rat spinal cord. *Br J Pharmacol* 1995; 115: 1005 -12.
- (28) Liu H, Mantyh PW, Basbaum AI. NMDA-receptor regulation of substance P release from primary afferent nociceptors. *Nature* 1997; 386: 721-4.
- (29) Sandoval M, Okuhama NN, Zhang XJ, Condezo LA, Lao J, Angeles FM et al. Anti-inflammatory and antioxidant activities of cat's claw (*Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis*) are independent of their alkaloid content. *Phytomedicine* 2002; 9: 325–37.