

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

Avaliação do perfil psicofarmacológico de psicotina isolada de  
*Psychotria umbellata* (Rubiaceae)

FERNANDA LIMA BOTH

**PORTO ALEGRE, 2005**

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

Avaliação do perfil psicofarmacológico de psicotina isolada de  
*Psychotria umbellata* (Rubiaceae)

Tese apresentada por **Fernanda Lima Both**  
para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR  
em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Elaine Elisabetsky

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado – Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos – da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 03.10.2005, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Carla Dalmaz  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Ionara Rodrigues Siqueira  
Universidade Integrada do Vale do Taquari

Profa. Dr. Tânia Alves Amador  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Thereza Christina Monteiro de Lima Nogueira  
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dr. Vera Maria Steffen  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

B749a Both, Fernanda Lima

Avaliação do perfil psicofarmacológico de psicotatina isolada de *Psychotria umbellata* (Rubiaceae)/ Fernanda Lima Both – Porto Alegre: UFRGS, 2005. – 133 p.: il., gráf., tab.

Tese (doutorado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. *Psychotria umbellata*. 2. psicotatina. 3. alcalóides indólicos. 4. receptores serotoninérgicos. 5. receptores glutamatérgicos. I. Elisabetsky, Elaine. II. Título

CDU: 615.214:582.972

Bibliotecárias responsáveis: Margarida Maria Cordeiro F. Ferreira – CRB10/480

Este trabalho foi desenvolvido com a orientação da Profa. Dra. Elaine Elisabetsky, no Laboratório de Etnofarmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A pesquisa foi financiada pelo CNPq.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha mãe, Solange, a Tatiana, Marcos, Vó, a distância não foi suficiente para diminuir o apoio, o carinho nas horas complicadas e, principalmente, o amor;

Ao meu pai, Agostinho, que sempre me incentivou, me deu apoio e compreensão em todas as horas;

Ao meu noivo Eduardo e Henrique, os dois homens da minha pequena família, que sempre me deram força para continuar o meu caminho;

À Elaine Elisabetsky, pela orientação, apoio, estímulo e compreensão nos meus maus momentos;

À Mirna por ter me proporcionado ser bolsista do Departamento e, assim, seguir meus estudos na Pós Graduação;

À amigona, parceira Adri, que durante estes anos foi muito mais que colega de trabalho;

Ao paciente Ângelo, excelente amigo e colega de trabalho, sempre ajudando e quebrando meus "galhos" no computador, me ensinando as coisas mais simples;

À Lisi, amiga e bolsista de Iniciação Científica, que participou em diferentes etapas deste "nosso" trabalho;

A todas as "mulheres" do Laboratório de Etnofarmaco, Eliane, Juliana, Viviane, Greice, Sabrina, Bárbara, Valquíria, Natália, Pauline, pela amizade, apoio e carinho;

Aos professores do Departamento de Farmacologia;

Às funcionárias do Programa de Pós-Graduação em da Farmácia pelo auxílio;

Aos cidadãos brasileiros que pagam seus impostos e que contribuem para a formação de novos profissionais nas universidades públicas.

## SUMÁRIO

	Página
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	
.....	vi
ii	
<b>LISTA DE TABELAS</b>	xi
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	
.....	xi
i	
<b>RESUMO</b>	xiv
<b>ABSTRACT</b>	
.....	xv
i	
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
1.1. CONTRIBUIÇÃO DA FLORA PARA A FARMACOLOGIA	1
1.2 ALCALÓIDES INDÓLICOS	4
1.2.1 ASPECTOS QUÍMICOS	4
1.2.2 PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS	9
1.2.2.1 SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL	9
1.2.2.2 COMO ANALGÉSICOS E ANTIINFLAMATÓRIOS	12
1.2.2.3 NO TRATAMENTO DE CÂNCER	13
1.2.2.4 COMO ANTIOXIDANTES E NEUROPTOTETORES	13
1.3. O GÊNERO <i>Psychotria</i>	16
1.3.1 <i>Psychotria umbelata</i> (Vell.)	20
1.4 TRANSTORNOS MENTAIS	21
1.4.1. ANSIEDADE: BASES NEURAIIS, FARMACOTERAPIA E MODELOS COMPORTAMENTAIS	23

1.4.2. DEPRESSÃO: BASES NEURAIIS, FARMACOTERAPIA E MODELOS COMPORTAMENTAIS .....	26
1.4.3. ESQUIZOFRENIA: BASES NEURAIIS, FARMACOTERAPIA E MODELOS COMPORTAMENTAIS .....	30
<b>2. HIPÓTESE DE TRABALHO</b> .....	36
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	38
3.1. OBJETIVO GERAL.....	38
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	38
<b>4. ARTIGOS CIENTÍFICOS</b> .....	41
4.1. PSYCHOPHARMACOLOGICAL PROFILE OF THE ALKALOID PSYCHOLLATINE AS A 5HT <sub>2A/C</sub> SEROTONIN MODULATOR. <b>Journal of Natural Products</b> , v. 68, n. 3, p. 374-380, 2005 .....	41
4.1.1. INTRODUÇÃO.....	41
4.1.2. OBJETIVOS.....	42
4.1.3. ARTIGO .....	43
4.2. ROLE OF GLUTAMATE AND DOPAMINE RECEPTORS IN THE PSYCHOPHARMACOLOGICAL PROFILE OF THE INDOLE ALKALOID PSYCHOLLATINE. <b>Journal of Natural Products</b> , <i>in press</i> .....	50
4.2.1. INTRODUÇÃO.....	50
4.2.2. OBJETIVOS.....	52
4.2.3. ARTIGO.....	53
4.3. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E PRÓ-OXIDANTE DO ALCALÓIDE INDOL-MONOTERPÊNICO PSICOLATINA ISOLADO DE <i>Psychotria umbellata</i> . (a ser submetido para <b>Life Science</b> , anexo 2).....	69
4.3.1. INTRODUÇÃO.....	69
4.3.2. OBJETIVOS.....	70
4.4. TOXICIDADE AGUDA INDUZIDA PELO ALCALÓIDE INDOL-	

MONOTERPÊNICO PSICOLATINA ISOLADO DE <i>Psychotria umbellata</i> Vell. (submetido à <b>Toxicon</b> , anexo 3).....	71
4.4.1. INTRODUÇÃO.....	71
4.4.2. OBJETIVOS.....	71
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	72
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	83
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	86
<b>8. ANEXOS</b> .....	103
ANEXO 1 Antioxidative and Prooxidative Activity of the Indolmonoterpene Alkaloid Psychollatine from <i>Psychotria umbellate</i> . Fernanda L. Both, Ionara R. Siqueira, Vitor A. Kerber, Amélia T. Henriques and Elaine Elisabetsky. <b>Life Science</b> , <i>to be submitted</i> , 2005.	

ANEXO 2 Acute Toxicity Induced by Psychollatine, an Indole  
Monoterpene Alkaloid, Isolated from *Psychotria umbellata* Fernanda L.  
Both, Lisiane Meneghini, Vitor A. Kerber, Amélia T. Henriques and Elaine  
Elisabetsky. **Toxicon**, *submitted*, 2005.



## LISTA DE FIGURAS

	Páginas
<b>INTRODUÇÃO</b>	
Figura 1- Biossíntese dos alcalóides indol-monoterpênicos.....	5
Figura 2 - Estruturas moleculares dos diversos tipos de alcalóides formados .....	7
Figura 3 - Tipos de alcalóides indol-monoterpênicos a partir da condensação de secologanina com sua amina correspondente .....	7
Figura 4 - Estrutura molecular de psicotina .....	21
<b>ARTIGOS CIENTÍFICOS</b>	
<b>ARTIGO 4.1</b>	
Figura 1 - Effects of psychollatine in the hole-board test. Number of head-dips (a), number of squares crosses (b), and rearings (c).....	44
Figura 2 - Effects of psychollatine and antagonists (picrotoxin and ritanserin) in the hole-board test. Number of head-dips (a), number of squares crosses (b), and number of rearings (c).....	45
Figura 3 - Effects of diazepam and psychollatine on the behavior of mice in the light-dark test. Latency of the first entry (a) and amount of time spent by mice in the light area (b).....	45

Figura 4 - Effects of diazepam and psychollatine on the behavior of mice in the light-dark test with antagonists. Latency of the first entry (a) and amount of time spent by mice in the light area (b) .....	45
Figura 5 - Effects of benzodiazepine (diazepam), psychollatine, and respective vehicle (PPG and saline) on potentiation of barbiturate sleeping tim .....	46
Figura 6 - Effects of benzodiazepine (diazepam), psychollatine, and respective vehicle (PPG and saline) on spontaneous locomotor activity .	46
Figura 7 - Effects of diazepam, phenobarbital and psychollatine on PTZ-induced convulsions .....	46
Figura 8 - Effects of imipramine, fluoxetine, MK-801 and psychollatine on time of immobility in forced swimming test .....	46
Figura 9 - Effects of scopolamine and psychollatine on the oxotremorine-induced tremor .....	46
Figura 10 - Effect of psychollatine given <i>ip</i> 30min prior to training (A) and immediately posttraining (B) on test performance of adult mice trained in step-down inhibitory avoidance (0.3mA footshock, 24h training-test interval).....	47

#### ARTIGO 4.2

Figura 1 - Effect of psychollatine on spontaneous locomotion (2a) and MK-801-induced hyperlocomotion (2b).....	59
--	----

Figura 2 - Effect of psychollatine and classical antipsychotic chlorpromazine on amphetamine-induced lethality in grouped mice.....	61
Figura 3 - Effect of psychollatine, classical antipsychotic chlorpromazine and MK-801 on apomorphine-induced climbing behavior in mice.....	62

## DISCUSSÃO

Figura 1- Interação entre o sistema serotoninérgico e dopaminérgico.....	74
Figura 2 - Interação entre o sistema glutamatérgico e dopaminérgico.....	76
Figura 3 - Interação entre o sistema serotoninérgico e glutamatérgico.....	78
Figura 4 - Possíveis mecanismos de ação de psicolatina.....	81
Figura 5 - Possíveis atividades farmacológicas e mecanismos de ação de psicolatina.....	81

## ANEXOS

### ARTIGO 4.3

Figura 1- Molecular structure of psychollatine and serotonin.....	ANEXO 1
---	---------

Figura 2 - Effects of psychollatine on free radical content, using DCFH-DA as a probe in brain areas, cortex (cx) and hippocampi (hc).....	ANEXO 1
Figura 3 - Effects of psychollatine on total antioxidant reactivity (TAR) levels from cortex (cx) and hippocampi (hc) from saline and psychollatine 7.5 and 30 mg/kg.....	ANEXO 1
Figura 4 - Effects of psychollatine on lipid peroxidation assay (TBARS).....	ANEXO 1
Figura 5 - Contents of tyrosine in brain structures, cortex (cx) and hippocampi (hc) from saline and psychollatine (PSY) 7.5 and 30 mg/kg.....	ANEXO 1
Figura 6 - Contents of tryptophan in brain structures, cortex (cx) and hippocampi (hc) from saline and psychollatine (PSY) 7.5 and 30mg/kg.....	ANEXO 1

## LISTA DE TABELAS

Páginas

### INTRODUÇÃO

Tabela 1- Alcalóides indólicos economicamente importantes para a indústria farmacêutica e seus usos terapêuticos.....	15
---	----

### ARTIGOS CIENTÍFICOS

#### ARTIGO 4.2

Tabela 1- Effect of psychollatine against NMDA-induced seizures.....	58
--	----

### ANEXOS

#### ARTIGO 4.4

Tabela 1 – Toxicity signs following i.p. administration of psychollatine or saline mice.....	ANEXO 2
Tabela 2 - Cumulative death during the period of 24h following the i.p. administration of psychollatine or saline to mice.....	ANEXO 2
Tabela 3 - Ptose scores following i.p. administration of psychollatine or saline to mice.....	ANEXO 2

Tabela 4 - Locomotor activity scores following i.p. administration of  
psychollatine or saline to  
mice.....ANEXO 2

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACH	Acetilcolina
AINES	Antiinflamatórios não esteroidais
AMPA	Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico
CID	Classificação estatística internacional de doenças
DA	Dopamina
DCF	Conteúdo de radicais livres
DMT	Dimetiltriptamina
ECG	Eletroencefalograma
GABA	Ácido gama-amino butírico
5-HIAA	Ácido 5-hidroxiindolacético
5-HT	Serotonina
IMAOs	Inibidores da monoaminooxidase
ISRSs	Inibidores da recaptção de serotonina
LSD	Ácido lisérgico
LTP	Potencial de longa duração
MAO	Monoaminooxidase
MK-801	Dizocilpina
NA	Noradrenalina
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
NMR	Núcleo magno da rafe
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCP	Fenciclidina
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SNC	Sistema nervoso central
TAR	Reatividade antioxidante total
TBARs	Ensaio de Peroxidação lipídica

TCA	Antidepressivos tricíclicos
TIR	Oxidação dos resíduos de tirosina
TRI	Oxidação dos resíduos de triptofano



## RESUMO

Palavras chave: *Psychotria umbellata*, psicolatina, ansiolítico, antidepressivo, antipsicótico, antioxidante, receptores NMDA, 5-HT<sub>2A/C</sub>, DA.

Estudos prévios mostraram que psicolatina (o alcalóide indol-monoterpênico, isolado de *Psychotria umbellata* (Vell.)) possui moderada atividade analgésica em modelos experimentais de dor que envolvem a participação de receptores opióides e glutamatérgicos do tipo NMDA. Visto que a psicolatina encontra-se em grande quantidade nesta espécie, e que receptores NMDA estão envolvidos em uma grande variedade de processos, incluindo memória, plasticidade neural, ansiedade e depressão, este estudo buscou avaliar o perfil psicofarmacológico de psicolatina, bem como seus efeitos centrais ou interações com alguns sistemas neurotransmissores como receptores glutamatérgicos NMDA, serotoninérgico (5-HT), dopaminérgico (DA), gabaérgico (GABA) e colinérgico (Ach). Em dois modelos comportamentais de ansiedade, a psicolatina mostrou atividade ansiolítica revertida pela administração prévia de ritanserina (antagonista serotoninérgico 5-HT<sub>2A/C</sub>), sendo, portanto, esta ação relacionada à modulação destes receptores. A psicolatina não parece interferir com receptores GABAérgicos, já que a atividade ansiolítica não foi revertida por picrotoxina e também porque a psicolatina não mostrou atividade anticonvulsivante no modelo das convulsões induzidas por pentilenotetrazol. A psicolatina também apresentou atividade antidepressiva e amnésica, atividades que também estão relacionadas à modulação de receptores serotoninérgicos. Além disso, a psicolatina protege animais das convulsões induzidas por NMDA, além de reverter a hiperlocomoção induzida por dizocilpina, sugerindo que o mecanismo de ação de psicolatina também envolve o glutamato. A inibição do comportamento de escalada induzida por apomorfina e a proteção à letalidade induzida por anfetamina podem ser resultantes da modulação indireta de receptores dopaminérgicos exercida pelo glutamato e pela serotonina. A

psicolatina modifica diferentemente o estado oxidativo basal em distintas áreas cerebrais de camundongos; aumentando a capacidade antioxidante total no hipocampo e no córtex, mas a formação de radicais livres sendo reduzida apenas no córtex. Esses resultados são consistentes com o relato de atividade antioxidante de derivados indólicos. A psicolatina administrada agudamente por via oral não apresentou nenhum sinal de toxicidade até 1g/kg; por via intraperitoneal, sinais de toxicidade só estão presentes em doses bem maiores do que as que apresentam os efeitos acima mencionados. Conclui-se que a psicolatina apresenta um padrão psicofarmacológico semelhante a drogas que modulam receptores NMDA e 5-HT, os quais tem papel proeminente em diversos distúrbios psiquiátricos e neurológicos. Assim, o presente estudo reforça a idéia de que este alcalóide indol-monoterpênico pode ser explorado como modelo estrutural para o desenvolvimento de drogas que atuem nestes subtipos de receptores.

## ABSTRACT

*Psychotria umbellata*: psychopharmacological profile of psychollatine alkaloid.

Key words: *Psychotria umbellata*, psychollatine, anxiolytic, antidepressive, antipsychotic, antioxidant, NMDA, 5-HT<sub>2A/C</sub>, DA receptors.

We have previously shown that psychollatine, an indole monoterpene alkaloid, isolated from *Psychotria umbellata* (Vell.) possess mild analgesic activity in experimental pain models involving the participation of opioid and NMDA glutamate receptors. Considering that psychollatine is abundant in this plant species and that NMDA receptors are involved in a number of neuronal processes, including memory, neural plasticity, anxiety and depression, this study aimed to understand the psychopharmacological profile of psychollatine, as well as its central effects or interactions with some neurotransmitter systems like glutamatergic NMDA, serotonergic (5-HT), dopaminergic (DA), gabaergic (GABA) and cholinergic (Ach) receptors. Psychollatine presented anxiolytic activities in two behavioral models of anxiety; the activity being reversed by previous administration of 5-HT<sub>2A/C</sub> serotonergic antagonist (ritanserin), suggesting the participation of these receptors. Psychollatine does not seem to interfere with GABAergic receptors, given the anxiolytic activity was not prevented by picrotoxin and that psychollatine did not act as anticonvulsant against pentilenetetrazol. Psychollatine also presented antidepressant and amnesic activities, both effects related to serotonergic receptors. Psychollatine protects mice against NMDA induced convulsions, and prevents dizocilpine-induced hyperlocomotion, suggesting that its mechanism of action also involve glutamate. The inhibition of apomorphine-induced climbing and protection of amphetamine-induced lethality by psychollatine may be the result of an indirect modulation of dopaminergic neurons exerted by glutamate and serotonin. Psychollatine differently alters the oxidative stress in distinct mice brain regions; psychollatine increased the total antioxidant capacity in hippocampus and cortex,

but the production of free radical was reduced only in the cortex. These results are consistent with reports of antioxidant activity of indole derivatives. The acute oral administration of psychollatine does not induce toxicity up to 1g/kg; intraperitoneally, and signs of toxicity are present in doses bigger than those inducing the effects above mentioned. In conclusion, psychollatine presents a psychopharmacological profile compatible to drugs that modulate serotonin and glutamate NMDA receptors, neurotransmitters known to have a prominent role in diverse psychiatric and neurologic disorders. Therefore, the study reinforces the idea that this monoterpene indol alkaloid can be further explored as a structural model for developing drugs that modulate these receptors.

# **1 INTRODUÇÃO**

## **1.1 CONTRIBUIÇÃO DA FLORA PARA A FARMACOLOGIA**

Desde os primórdios da civilização, com as práticas nômades e, posteriormente com o advento e desenvolvimento da agricultura que permitiu a fixação de grupos populacionais em determinadas regiões não precisando recorrer às migrações para a sobrevivência; o manejo do meio ambiente permitiu ao homem adquirir uma relação muito intensa com as plantas, não apenas para a obtenção constante de alimento para suprir as necessidades básicas da população ou de material para abrigo temporário, mas também utilizando sua intuição e inteligência passou a diferenciar as diversas espécies vegetais que eram tóxicas, medicinais ou alimentícias (ENGELKE, 2003).

Além da identificação, desenvolveram técnicas de extração e conservação de partes de plantas, como folhas e raízes. A utilização de plantas medicinais como fonte de alívio para doenças pode ser percebida em documentos de civilizações muito antigas na China, Índia e Europa. Acredita-se, portanto, que as farmacopéias tradicionais foram elaboradas ao longo de muitos séculos de experimentação (ELISABETSKY; SETZER, 1985) onde o conhecimento empírico acumulado foi preservado e transmitido às futuras gerações.

O reino vegetal é muito rico em compostos químicos, que podem ser produtos de desvios nas rotas biossintéticas. Estes compostos chamados de metabólitos secundários, como taninos e alcalóides, muitas vezes possuem função defensiva agindo como repelentes aos predadores (fungos, insetos, vírus), por serem indigestos, ou mesmo tóxicos. Metabólitos secundários podem, igualmente, auxiliar na competição de espécies por ambientes comuns ou também ajudar na reprodução vegetal com atrativo aos polinizadores (ELISABETSKY;

SHANLEY,1994). A biogênese destes compostos está sob controle genético, mas deve-se considerar que fatores ambientais, como o tipo de solo, época de ano e estágio de desenvolvimento do vegetal influenciam na produção e acumulação dos metabólitos secundários (BEGON *et al.*, 1987; HARBORNE, 1990).

Com isto, o reino vegetal tem sido reconhecido como um manancial de novas substâncias com potencial terapêutico. Os primeiros isolamentos de princípios ativos datam do século XIX, sendo atualmente observada a existência de inúmeros medicamentos derivados de plantas (HAMBURGER; HOSTETTMANN,1991; CURTIS-PRIOR *et al.*,1999).

O uso de plantas medicinais brasileiras por populações indígenas foi descrito por descobridores portugueses em 1500 (PETROVICK *et al.* 1999), sendo ainda amplamente comum no Brasil, tanto no meio rural quanto urbano. Este fato é bastante propício tendo em vista que o Brasil é rico em recurso genético e, devido a diferenças climáticas, desenvolvem-se aqui diversas formações vegetais (Floresta Amazônica, Floresta Atlântica, Cerrado entre outras). Igualmente observa-se do ponto de vista cultural, que o desenvolvimento do conhecimento a respeito destas plantas medicinais deve-se ao conjunto da sabedoria tradicional das populações indígenas destacando o guaraná (*Paullinia cupana* H.B.K., Sapindaceae) ou contribuições trazidas por povos imigrantes da Europa (camomila, *Matricaria chamomilla* L., Asteraceae), Ásia (confrei, *Symphytum officinale* L., Boraginaceae) e África (erva-guiné, *Petiveria alliacea* L., Phytolaccaceae; SIMÕES *et al.*, 1995).

A Organização Mundial da Saúde estima que 65-80% da população mundial utiliza, de algum modo, plantas tradicionais para suprir as necessidades de assistência médica primária. Já que não há hospitais adequados e médicos treinados, a destruição da floresta acarreta a extinção da fonte primária de saúde destas populações (BALICK, 1990; CALIXTO, 2000).

Igualmente, observa-se que um grande número de pessoas nos países desenvolvidos estão usando terapias alternativas como, por exemplo, produtos fitoterápicos como preventivos ou auxiliares no tratamento de doenças (YAMADA, 1998).

São inúmeros os compostos extraídos de plantas usados na terapêutica ou derivados da molécula natural com estrutura remodelada dando origem a um composto com maior atividade. Conforme FARNSWORTH (1990), os medicamentos derivados de plantas mais utilizadas na medicina contemporânea são (em ordem alfabética): atropina, bromelina, cafeína, quimopapaína, codeína, deslanosídeo, digitoxina, digoxina, emetina, efedrina, morfina, papaverina, fisostigmina, pilocarpina, quinidina, quinina, reserpina, escopolamina, teofilina, tubocurarina, vimblastina e vincristina. Com base no uso e no papel inestimável que estas drogas tem no alívio do sofrimento humano, justifica-se a continuidade de pesquisas que busquem novas e melhores drogas derivadas de plantas.

Muitas drogas originárias de plantas são usadas sem modificações estruturais (por exemplo, os alcalóides vinblastina e vincristina extraídos de *Catharantus roseus* L. Don, Apocinaceae). Compostos extraídos de plantas também têm sido uma fonte de matéria-prima para medicamentos semi-sintéticos. Além disso, compostos tais como, mescalina, os canabinóides, ioimbina, forskolina e muitos outros agentes derivados de plantas são importantes ferramentas em farmacologia e bioquímica (FARNSWORTH, 1990).

Em um estudo realizado por O'NEILL (1998), identificou-se as 20 substâncias mais vendidas no mundo em 1995, sendo que 11 destes produtos listados continham um ingrediente ativo com uma estrutura baseada em componentes encontrados na natureza; este grupo de medicamentos contribuiu com 16,53 bilhões de dólares no mercado farmacêutico mundial. Mesmo assim, o

potencial das plantas superiores como fonte de novos medicamentos ainda é pouco explorado.

## **1.2 ALCALÓIDES INDÓLICOS**

### **1.2.1 ASPECTOS QUÍMICOS**

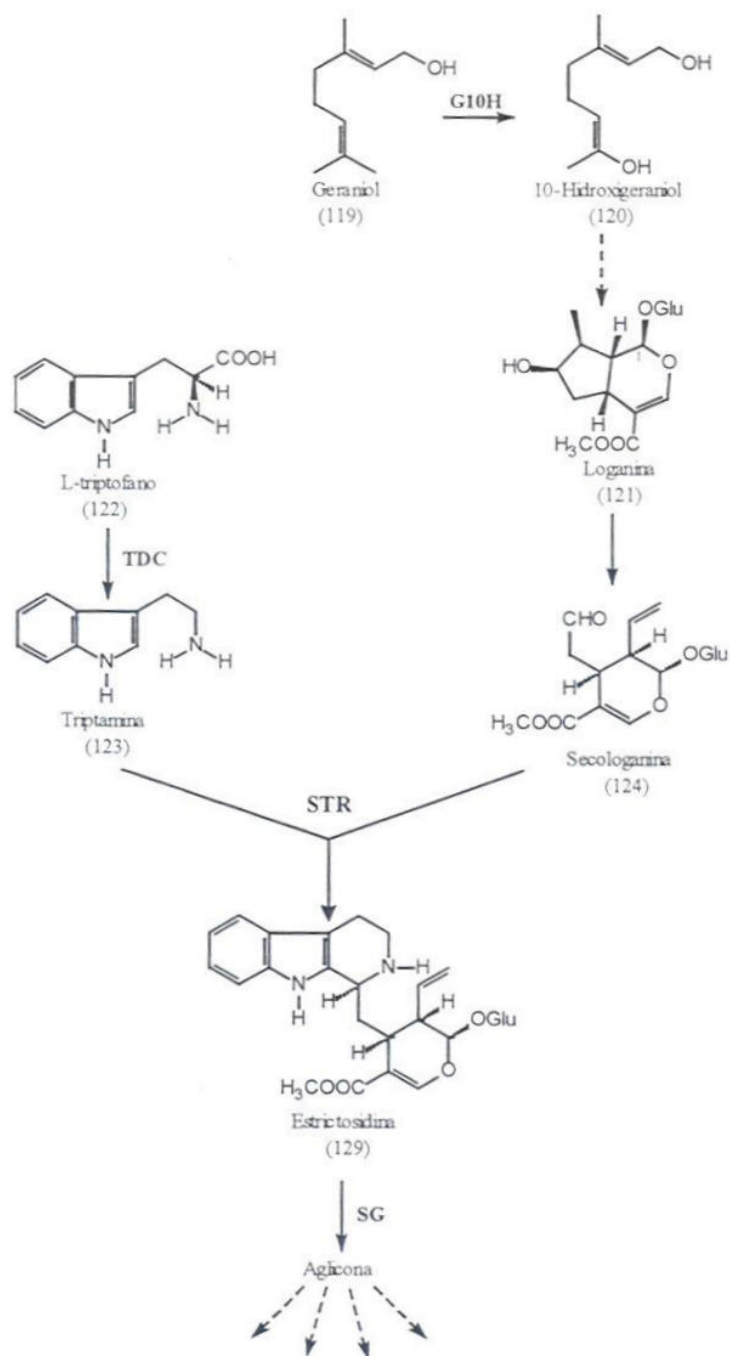
Os alcalóides são um vasto grupo de metabólitos secundários, possuindo uma variedade estrutural comparável a dos terpenóides. Representam cerca de 20 % das substâncias naturais (taninos, flavonóides) e são extremamente importantes nas áreas da indústria química e farmacêutica (BRUNETON, 1993).

No reino vegetal, os alcalóides encontram-se distribuídos em diversas famílias, destacando-se Apocinaceae, Solanaceae, Papaveraceae, Loganiaceae e Rubiaceae. Juntamente com Apocinaceae e Loganiaceae, a família Rubiaceae se caracteriza pela produção de alcalóides indólicos, isoquinolínicos; com raras exceções em Apocinaceae, as Rubiaceae são as únicas plantas com a capacidade de rearranjar o cromóforo indólico originando estruturas quinolínicas (PELLETIER, 1970).

Os compostos indólicos são uma extensa família de compostos presentes em bactérias, plantas e animais. Geralmente, estes compostos estão relacionados com o metabolismo do triptofano e apresentam substituições em diferentes posições do anel indólico (CANO *et al.*, 2003). Os alcalóides indólicos possuem um anel indólico em sua estrutura, uma versátil estrutura heterocíclica descoberta em 1866, e encontrada em um considerável número de produtos medicinais derivados de plantas (WILLIAMS, 2001). Nos animais, os compostos indólicos mais significantes são aqueles relacionados com a melatonina, um hormônio que é sintetizado a partir da serotonina (5-HT) pela glândula pineal de vertebrados, incluindo humanos (CANO *et al.*, 2003).



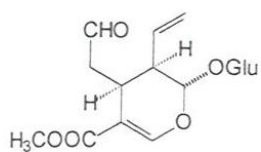
A principal característica dos alcalóides indol-monoterpênicos é sua origem biossintética comum. Todos os compostos conhecidos provêm de um precursor único: a estrictosidina produzida pela condensação de uma molécula de triptamina com um aldeído terpênico, o secologanosídeo, elaborado via geraniol, a partir das moléculas do ácido mevalônico (Fig. 1; BRUNETON, 1991).



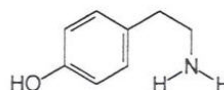
**Figura 1:** Biossíntese dos alcalóides indol-monoterpênicos

A condensação do iridóide secologanina (1) com um aminoácido, ou sua amina correspondente, gera uma grande variedade de alcalóides (Fig. 2). A família Rubiaceae pode condensar secologanina com: tiramina (2) produzindo

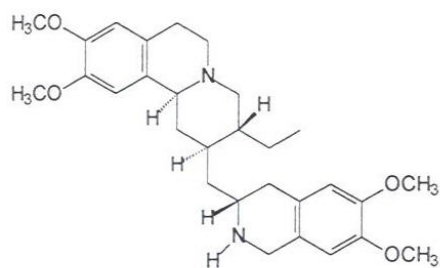
alcalóides isoquinolínicos do tipo emetina (3); triptamina (4), formando alcalóides indol-monoterpênicos derivados da strictosidina (5); L-triptofano (6), formando alcalóides indol-carboxílicos como a carboxi-corinantina (7). Além disso, também podem condensar a secologanina com uma unidade triptamínica e uma tiramínica formando alcalóides diméricos, como a tubulosina (8), ou duas unidades triptamínicas formando alcalóides do grupo das roxburginas (9) (BRUNETON, 1991).



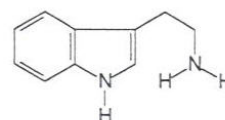
(1)



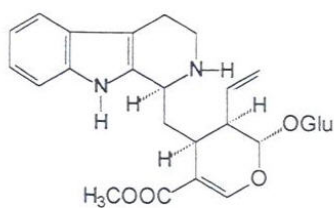
(2)



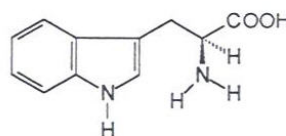
(3)



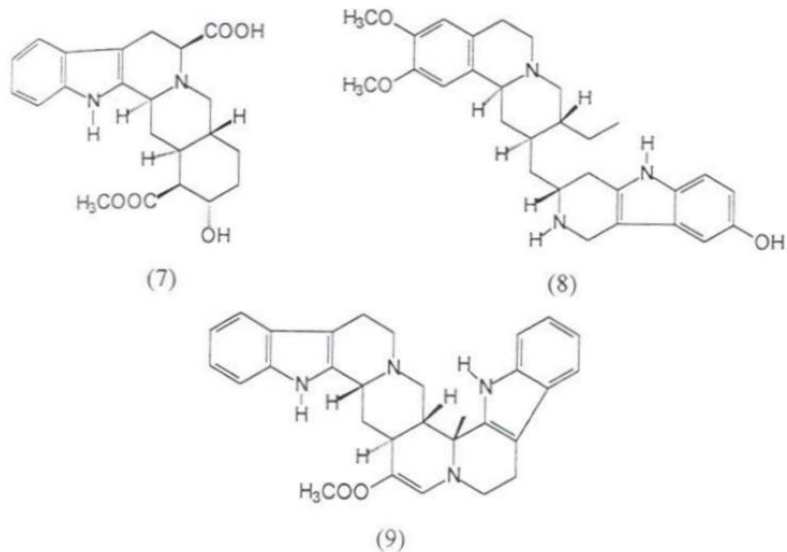
(4)



(5)

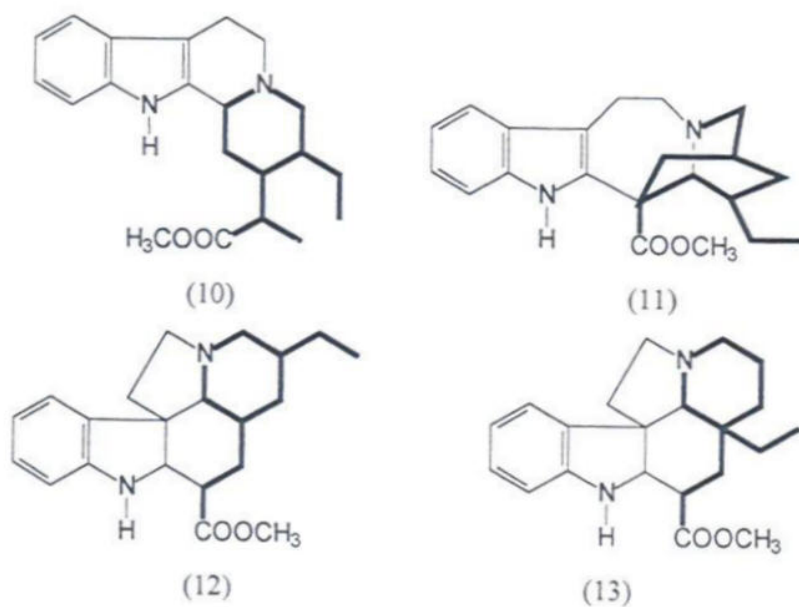


(6)



**Figura 2:** Estruturas moleculares dos diversos tipos de alcalóides formados a partir da condensação de secologanina com sua amina correspondente.

Os alcalóides indol-monoterpênicos originam-se principalmente pela hidrólise da estRICTOSIDINA, levando a três tipos principais (Fig. 3): tipo I – corinano (10), tipo II – ibogano (11) e pseudoapidospermano (12) e tipo III – apidospermano (13).



### **Figura 3:** Tipos de alcalóides indol-monoterpênicos

Nas Rubiaceas, 37 dos 500 gêneros que compõe esta família sintetizam alcalóides. Dos 37 gêneros que produzem alcalóides, 22 sintetizam indol-monoterpenos. Devido a sua importância terapêutica, estas substâncias são as mais profundamente investigadas quanto à rota de formação. Este estudo tem sido feito utilizando-se culturas de células de *C. roseus* em suspensão (BRUNETON, 1991).

O grupo de alcalóides derivados do triptofano é sem dúvida o grupo de alcalóides de maior amplitude. Esse grupo começou a ser estudado com mais atenção a partir do isolamento de reserpina, um composto anti-hipertensivo e tranqüilizante, de *Rauwolfia serpentina* Benth. (Apocinaceae) e pelas propriedades antitumorais de alcalóides isolados de *C. roseus* (BRUNETON, 1991).

Apesar do triptofano ser o precursor de quase todos os alcalóides indólicos, raramente é o único; assim, segundo a natureza do fragmento que origina o restante da molécula, os alcalóides se diferenciarão em  $\beta$ -carbolínicos, alcalóides derivados do esere (eserina e fisostigmina), alcalóides derivados da ergolina e alcalóides indol-monoterpênicos (BRUNETON, 1991).

Estes alcalóides, que incorporam em C<sub>9</sub>-C<sub>10</sub> uma unidade derivada do geraniol, se limitam a oito famílias botânicas e quase todas as estruturas descritas são analisadas a partir de três famílias de Gamopétalas: Apocinaceae, Loganiaceae e Rubiaceae. Este grupo inclui alcalóides em que o reagrupamento tardio substitui o núcleo quinoleínico no lugar do indólico (BRUNETON, 1991).

Esquemáticamente pode-se agrupar a maioria dos alcalóides indólicos conhecidos em quatro esqueletos base: corinanteano, estricnano, aspidospermano e ibogano, sendo que os quatro derivam da strictosidina. A partir desses quatro esqueletos fundamentais se conhecem muitas dezenas de variações (BRUNETON, 1991).

Nas Rubiáceas, o secologanosídeo pode combinar-se com:

- duas moléculas de dopamina (DA) (ex.: emetina);
- uma molécula de dopamina e uma molécula de triptamina (ex.: tubulosina);
- uma molécula de triptofano (ex.: alcalóides da *Adina*);
- duas moléculas de triptamina (ex.: roxburginas).
- uma molécula de triptamina, que é o caso mais comum. Neste caso formam-se alcalóides do tipo Ia (ioimbanos, heteroioimbanos) como nas Apocinaceas e nas Loganiaceas.

Conhecem-se mais de 1.000 alcalóides pertencentes às três famílias acima citadas, e sua diversidade estrutural é assombrosa apesar de todos apresentarem uma estreita afinidade biossintética (BRUNETON, 1991).

## **1.2.2 PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS**

### **1.2.2.1 SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL**

A maioria dos alcalóides indólicos derivados da triptamina e os  $\beta$ -carbolínicos possuem propriedades alucinógenas e estão classificados dentro da classe dos psicodislépticos. Um dos exemplos mais bem conhecidos é a bebida conhecida como Ayahuasca preparada a partir de *Banisteriopsis caapi* Spr. ex Briesb. (Malpighiaceae) juntamente com uma mistura de várias plantas, sendo a mais conhecida *Psychotria viridis* Ruiz et Pavón (Rubiaceae). Os principais componentes de *B. caapi* são alcalóides indólicos  $\beta$ -carbolínicos conhecidos como harmina e harmalina, que são potentes inibidores da monoamino-oxidase A (MAO-A). Como inibidores da MAO, os  $\beta$ -carbolínicos aumentam os níveis cerebrais de serotonina e os efeitos sedativos obtidos com altas doses de  $\beta$ -carbolínicos podem resultar do bloqueio da deaminação da serotonina (McKENNA, 2004). A ação

primária dos  $\beta$ -carbolínicos na bebida é a sua inibição da MAO periférica, a qual protege a dimetiltriptamina – DMT (um dos compostos de *P. viridis*) da degradação periférica, tornando-a ativa por via oral. Assim, os princípios ativos de uma planta ( $\beta$ -carbolínicos) são utilizados para possibilitar a atividade oral dos princípios psicoativos de outra planta (DMT) (McKENNA, 2004).

Substâncias  $\beta$ -carbolínicas exercem uma grande variedade de efeitos neurofarmacológicos e biológicos. Além de serem inibidores competitivos, seletivos e reversíveis da MAO-A; os  $\beta$ -carbolínicos inibem competitivamente a recaptação de 5-HT, DA, adrenalina e noradrenalina em sinaptossomas, interferindo com a biossíntese das aminas biogênicas. Além disso, esses compostos também possuem a capacidade de ligarem-se a receptores benzodiazepínicos, provavelmente atuando como agonistas inversos, produzindo crises epiléticas, as quais são revertidas por diazepam (McKENNA *et al.*, 2004).

Além dos alcalóides  $\beta$ -carbolínicos, outros alcalóides indólicos como psilocina e psilocibina isolados de *Psilocybe sp.* também são alucinógenos (BRUNETON, 1991).

Além disso,  $\beta$ -carbolinas são alcalóides indólicos tricíclicos que estão intimamente relacionados com triptaminas, tanto biossinteticamente quanto farmacologicamente (McKENNA *et al.*, 2004). Para muitos autores, a maioria dos compostos alucinógenos citados acima tem em comum uma relação estrutural com serotonina e teriam um efeito de agonista competitivo sobre receptores específicos para serotonina (BRUNETON, 1991).

Várias outras plantas possuem alcalóides indólicos que apresentam ações farmacológicas sobre o SNC. *Passiflora incarnata* L. e *Passiflora edulis* L. (Passifloraceae), nativa das áreas tropicais quentes da América, são exemplos de plantas medicinais conhecidas por possuírem alcalóides indólicos como harmano,

harmina, harmalina, harmol e harmalol. Suas partes aéreas são tradicionalmente utilizadas para o tratamento de ansiedade, insônia, dor e neuralgia (SOULIMANI *et al.*, 1997). Estudos comportamentais foram realizados, tanto em ratos como em camundongos, utilizando extratos etanólico (*P. edulis*), aquoso e metanólico (*P. incarnata*), demonstrando ação ansiolítica e sedativa. No entanto, parece que os alcalóides indólicos, que tem por característica a inibição da MAO, ficam sendo caracterizados como os principais constituintes bioativos, enquanto que os flavonóides (como crisina) possuindo papel depressor sobre o SNC (DHAWAN *et al.*, 2004).

Outra planta que apresenta atividade no SNC é *Tabernanthe iboga* Baillon (Apocinaceae). Preparações de raízes de iboga têm sido usadas há séculos por nativos do Gabão (África), tanto na medicina tradicional quanto em rituais religiosos, como estimulantes e afrodisíacos (GOUTAREL *et al.*, 1993) e, durante anos, foi comercializada na França como Lambèrene®, uma preparação indicada como estimulante físico e mental. A partir das raízes deste arbusto africano, isolou-se um alcalóide indólico psicoativo chamado ibogaína que apresenta suposta atividade antiaditiva para várias drogas de abuso (psicoestimulantes, opióides). A eficácia de ibogaína no tratamento da dependência de opióides e cocaína em humanos foi confirmada em estudos pré-clínicos por pesquisadores americanos, canadenses e holandeses (LOTSOF, 1995).

Na Nigéria, o alcalóide indólico alstonina é o componente principal de um remédio preparado à base de plantas e tradicionalmente usado para tratar transtornos mentais (COSTA-CAMPOS *et al.*, 1999). Em diversos modelos comportamentais em camundongos (catalepsia por haloperidol, letalidade por anfetamina e estereotipia por anfetamina e apomorfina) a alstonina apresentou propriedades antipsicóticas com perfil semelhante aos antipsicóticos atípicos (clozapina e sulpiride) (COSTA-CAMPOS *et al.*, 1998). Além disso, este alcalóide



também apresentou atividade ansiolítica em modelos comportamentais (BOURIN *et al.*, 2001; COSTA-CAMPOS *et al.*, 2004).

A *Rauwolfia serpentina* é utilizada na medicina Ayurvédica no tratamento de diarreias e como antitérmico. Também é utilizada nas picadas de serpentes e no tratamento de transtornos mentais e epilepsias. Dentre os alcalóides desta planta destacam-se a reserpina, a ajmalina e a ajmalicina, a alstonina e a serpentina (BRUNETON, 1991).

A Reserpina é um anti-hipertensivo e neuroléptico. A sua atividade deve-se a depleção de noradrenalina nas fibras simpáticas pós-ganglionares do SNA e SNC e a inibição da recaptação desse neurotransmissor. Ajmalicina é um alcalóide que pode ser extraído de várias espécies do gênero *Catharanthus*, podendo ser utilizada sozinha ou em associação com outras drogas para o tratamento de distúrbios comportamentais, psíquicos e vasculares cerebrais (BRUNETON, 1991).

Algumas espécies do gênero *Strychnos* como *Nux vomica* ou *Strychnos nux-vomica* L. (Loganiaceae) contém estricnina, um potente estimulante do sistema nervoso central e convulsivante, que estimula os centros respiratórios e cardiovasculares, provocando hipertensão e bradicardia (BRUNETON, 1991).

#### **1.2.2.2 COMO ANALGÉSICOS E ANTIINFLAMATÓRIOS**

Outras plantas contendo alcalóides indólicos e utilizadas tradicionalmente como analgésicos e/ou antiinflamatório incluem a *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. (Rubiaceae), a *Mitragyna speciosa* Korth (Rubiaceae) e o *Gelsemium sempervirens* L. (Loganiaceae).

A *Uncaria tomentosa*, comumente conhecida como “unha-de-gato”, é uma planta medicinal da floresta amazônica muito utilizada por indígenas para o tratamento de inflamação crônica, incluindo artrite (PISCOYA *et al.*, 2001). No Peru, sua casca tem sido tradicionalmente usada no tratamento de várias doenças,

como infecções virais, câncer, úlceras gástricas, artrite e outros distúrbios inflamatórios (AGUILAR *et al.*, 2002). As ações farmacológicas da “unha-de-gato” incluem propriedades antioxidantes, atividade anti-inflamatória, imunomoduladora, citoprotetora, propriedades antimutagênicas e efeito anti-hipertensivo, bem como na prevenção de isquemia cerebral (WILLIAMS, 2001).

A *Mitragyna speciosa* é utilizada popularmente na tradição Thai como analgésico. A Mitraginina, seu principal alcalóide, bem como seus derivados sintéticos, exibem atividade analgésica mediada por receptores opióides, com a participação dos receptores  $\mu$ ,  $\delta$  e  $\kappa$  (TAKAYAMA *et al.*, 2002).

A tintura de *Gelsemium sempervirens*, por sua vez, é utilizada como analgésica e antiespasmódica. Essa tintura contém o alcalóide indol-monoterpênico conhecido como sempervirina. O extrato dessa planta também é associado ao de *Valeriana sp.* para o tratamento de “angústia e palpitações” (BRUNETON, 1991).

### **1.2.2.3 NO TRATAMENTO DE CÂNCER**

Apesar de todas as interessantes atividades farmacológicas acima relatadas, sem dúvida um dos maiores impactos de fármacos derivados de plantas foi provavelmente na área antitumoral, onde alcalóides indólicos, como vinblastina e vincristina isolados de *C. roseus* e seus derivados sintéticos, são hoje utilizados no tratamento de diversos tipos de câncer, melhorando dramaticamente a eficácia da quimioterapia (RASKIN *et al.*, 2002).

### **1.2.3.4 COMO ANTIOXIDANTES E NEUROPROTETORES**

Além de atividade antitumoral, outros estudos demonstraram que a produção de alcalóides em culturas celulares de *C. roseus* apresentaram atividade antioxidante (LEMÉNAGER *et al.*, 2004).

Os compostos indólicos também interferem com as espécies reativas de oxigênio criando um grupo farmacológico e químico distinto (STOLC, 1999).

Assim, a vincamina, outro alcalóide indólico isolado de *C. roseus* é utilizado no tratamento de acidentes vasculares cerebrais e traumatismos cranianos devido ao aumento do fluxo sanguíneo cerebral (BRUNETON, 1991).

A Vinpocetina, um derivado sintético da vincamina, originalmente descrita como um vasodilatador cerebral, possui um efeito neuroprotetor em vários modelos experimentais, reduzindo a lesão neuronal que ocorre em condições de hipóxia ou isquemia. Este composto reduz em leitos cerebrais a viscosidade do sangue e a agregação plaquetária. Além disso, a vinpocetina apresenta efeitos protetores em relação à morte celular induzida por várias excitotoxinas e inibe a citotoxicidade do glutamato em neurônios cerebrocorticais, além de possuir propriedades anticonvulsivantes importantes (PEREIRA *et al.*, 2003). Sua ação protetora está relacionada com a inibição de canais de Na<sup>+</sup> voltagem-dependentes e com a inibição indireta dos processos moleculares iniciados pelo aumento dos níveis de Ca<sup>2+</sup> intracelular (TRETTER; ADAM-VIZI, 1998). Além disso, demonstrou-se que a vinpocetina atenua a resposta ao NMDA em oócitos, reduz a ligação do AMPA a membranas corticais, inibe a liberação de acetilcolina estimulada por aminoácidos excitatórios e protege os neurônios cerebrocorticais da excitotoxicidade (KANEKO *et al.*, 1991).

A Vinpocetina atenua a toxicidade induzida pelos peptídeos sintéticos da proteína β-amilóide em linhagens celulares, mantendo a capacidade redutora celular e protegendo da acumulação de espécies reativas de oxigênio. Esta atividade protetora da vinpocetina em relação à toxicidade induzida pelos peptídeos da β-amilóide parece resultar da sua capacidade antioxidante capaz de neutralizar radicais livres e a peroxidação lipídica (PEREIRA *et al.*, 2003). A Stobadina, outro

composto indólico sintético (composto  $\beta$ - carbolínico), possui pronunciadas ações antioxidantes ou sequestradoras de radicais (STOLC, 1999).

Os fármacos antiinflamatórios não-esteroidais (AINES) como indometacina e etadolaco são derivados indólicos e tem similaridade estrutural com os derivados indólicos endógenos como melatonina, serotonina, triptamina e triptofano. Estes compostos bloqueiam a síntese de prostaglandinas por inibição não seletiva da ciclooxigenase 1 e 2 (COX-1 e COX-2). No entanto, tem sido sugerido que a atividade antiinflamatória dos AINES possa ser parcialmente devido a sua habilidade de sequestrar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, sendo que este efeito antioxidante também foi observado com vários outros derivados indólicos sintéticos (FERNANDES *et al.*, 2004).

Vários outros alcalóides indólicos economicamente importantes, usados diretamente ou como precursores de medicamentos pela indústria farmacêutica, podem ser vistos na tabela 1.

**Tabela 1:** Alcalóides indólicos economicamente importantes para a indústria farmacêutica e seus usos terapêuticos:

Alcalóides	Fonte	Uso(s) terapêutico(s)	Referência(s)
Camptotencina	<i>Camptotheca acuminata</i> Decne (Nyssaceae)	Antineoplásico	Siram, <i>et al.</i> , 2005
Fisostigmina	<i>Physostigma venenosum</i> Balfor (Fabaceae)	Colinérgico	Zhao, <i>et al.</i> , 2004
Reserpina	<i>Rauwolfia serpentina</i> L. (Apocinaceae)	Anti-hipertensivo, psicotrópico	Brunetton, 1991
Yoimbina	<i>Pausinystalia yoimbe</i> K. (Rubiaceae)	Afrodisíaco	Brunetton, 1991
Vimblasatina	e <i>Catharantus roseus</i> L. (Apocinaceae)	Antineoplásico	Raskin, <i>et al.</i> , 2002
Vincristina			
Ibogaína	<i>Tabernanthe iboga</i>	Antiaditivo	Lotsof, 1995

Assim, pode-se observar que os compostos indólicos são encontrados em uma grande variedade de plantas e utilizados pela população para uma grande

variedade de objetivos. Muitos deles encontrando-se em uso clínico e outros estão sendo pesquisados para o tratamento de diversas patologias.

### 1.3 O GÊNERO *Psychotria*

A subfamília *Rubioideae* é distribuída em 15 tribos, sendo que a *Psychotrieae* é a maior delas, com aproximadamente 50 gêneros e ampla distribuição em toda a zona tropical (LIBOT *et al.*, 1987). A tribo *Psychotriae* faz parte de ecossistemas de todos os tipos de matas do Rio Grande do Sul, principalmente de matas tropicais, e está representada por espécies de hábito predominantemente arbustivo e, menos freqüentemente, por espécies de hábito arbóreo e herbáceo (SMITH; DOWNS, 1956).

Pertencente à tribo *Psychotrieae*, o gênero *Psychotria* tem 1400 espécies descritas (WITHERUP *et al.*, 1994), das quais possivelmente 800 são válidas. A classificação do gênero é difícil e não há certezas em relação aos limites genéricos. O gênero *Psychotria* está estreitamente relacionado ao gênero *Palicourea*, com o qual muitas das espécies têm sido unidas. Também apresenta grande analogia com *Calycodendron* e *Calycosia* (LOPES, 1998). A maior controvérsia é encontrada quanto à distinção entre os gêneros *Cephaelis* e *Psychotria*. Alguns autores como ROBBRECHT (1988) separam estes dois gêneros, enquanto que outros como TAYLOR (1997) não encontram evidências suficientes para considerar *Cephaelis* como gênero distinto. TAYLOR (1997) inclui a maior parte das espécies antes consideradas *Cephaelis* em *Psychotria*, algumas em *Palicourea*, e raras em *Faramea*, *Rudgea*, *Geophila*, *Ixora* e *Pagamea*. O gênero *Cephaelis* (*sensu* ROBBRECHT, 1988) produz alcalóides tetraidroisoquinolino-monoterpênicos, cujo aminoácido de origem é a tirosina, sendo o único gênero da tribo *Psychotriae* a sintetizar este tipo de alcalóide (HEMINGWAY; PHILLIPSON, 1980).

O gênero *Psychotria* é constituído de dois subgêneros principais: *Psychotria* e *Heteropsychotria*, os quais têm sido combinados, pois a diferenciação das numerosas espécies é difícil. Em *Cephaelis* ocorre a formação de alcalóides

isoquinolínicos do tipo emetina; no entanto, os alcalóides característicos da tribo Psychotrieae são os poli-indolínicos não iridóidicos, os quais não foram encontrados no subgênero *Heteropsychotria*. A partir destas observações, consideram-se que os alcalóides poderão mostrar-se úteis como marcadores quimiotaxonômicos (LOPES, 1998).

O gênero *Psychotria* é conhecido pela presença de alcalóides cujo aminoácido de origem é o triptofano. Estes são, na maior parte, indol não-iridóidicos, com destaque no grupo dos triptamínicos (NN-dimetiltriptamina, N-metiltriptamina), poli-indólicos (chimonantina, meso-chimonantina, hodgkinsina, psicotridina, iso-psicotridina A, B e C, quadrigemina A, B e C) ou derivados metiltriptamínicos e  $\beta$ -carbolinas (tetraidro- $\beta$ -carbolina) (RIVIER; LINDGREN, 1972; HEMINGWAY; PHILIPSON, 1980), não havendo relação com monoterpenos. Uma exceção é a espécie *Psychotria correae* (Dwyer & MV Hayden) & CM Taylor que produz alcalóides indol-iridóidicos, derivados da strictosidina. Igualmente, a espécie *P. leiocarpa* Cham. et Schlecht produz N,  $\beta$ -D-glicopiranosilvincosamida, um alcalóide indol-iridóidico, N-glicosilado (VAN DE SANTOS, 1999).

No outro gênero estreitamente relacionado, *Palicourea*, além de alcalóides polindólicos isolados em *P. fendleri* Standl., *P. domingensis* Jacq. e *P. alpina* Sw. também foram encontrados alcalóides indol-monoterpênicos tipo strictosidina em *P. alpina* e *P. marcgravii* Muell. Arg., todos derivados do triptofano (KERBER, 1999). As espécies de *Palicourea* apresentam alcalóides polipirrolidinoindólicos e derivados da strictosidina, sendo todos esses biossintetizados a partir do aminoácido triptofano (VAN DE SANTOS, 1999).

Para algumas espécies, tais como a *P. granadensis* Benth e *P. tomentosa* (Aubl.) Müll. Arg. , foi relatada a presença de emetina (WILLAMAN; SCHUBERT, 1961), o que indica um grupo com características comuns. Por outro

lado, *P. correae* (*Cephaelis correae sensu* ROBBRECHT, 1988) e *Cephaelis dichroa* (*Psychotria dichroa* Standl., *sensu* TAYLOR, 1997) aparentam possuir uma maior proximidade com *Palicourea* pela produção de alcalóides tipo indol-monoterpêno.

Um estudo sistemático mais aprofundado das espécies de *Psychotria*, *Palicourea* e *Cephaelis*, considerando características anatomo-fisiológicas acompanhadas de dados químicos, especialmente a produção de alcalóides, poderia eventualmente eliminar as exceções encontradas e contribuir para uma melhor definição taxonômica dos gêneros da tribo *Psychotrieae* (KERBER, 1999).

Em um estudo taxonômico da tribo Psychotrieae no Estado do Rio Grande do Sul, DILLENBURG e PORTO (1985) constataram a presença de dez espécies do gênero *Psychotria*: *P. carthagenensis* Jacq., *P. birotula* Smith & Downs mut. char., *P. myriantha* Müll. Arg., *P. leiocarpa* Cham. et Schlecht., *P. nitidula* Cham. et Schlecht., *P. brachyceras* Müll. Arg., *P. tenerior* (Cham.) Mull. Arg., *P. brachypoda* (Mull. Arg.) Britton, *P. kleinni* Smith & Downs e *P. suterella* Mull. Arg. Ocorrem no interior das matas fazendo parte do estrato inferior das florestas, apresentam o caráter esciófito e seletivo-hignófito, ou seja, ocorrem em locais sombreados e preferem solos relativamente úmidos.

A revisão sobre a química destes gêneros mostrou uma certa variedade de substâncias, predominando os alcalóides, em especial do tipo polindólico, indol-monoterpenos e tetraidroisoquinolinomonoterpenos.

Os estudos etnofarmacológicos abrangem 10% das espécies de *Psychotria* conhecidas e foram realizados com plantas de diferentes origens geográficas, mostrando que elas são utilizadas na medicina tradicional para uma grande variedade de indicações terapêuticas (ADJIBADÉ, 1989; LEAL; ELISABETSKY, 1996b). Os mais freqüentes usos internos referem-se a afecções do aparelho reprodutor feminino, além do emprego como auxiliar no pré- e pós-



parto, doenças dos brônquios e distúrbios gastrintestinais. Quanto ao uso externo, têm sido relatado usos em afecções cutâneas, "tumores", úlceras, distúrbios oculares, como cataplasmas e banhos no tratamento de febre e em casos de dores de cabeça e dores de ouvido (ADJIBADÉ, 1989; LAGIS *et al.*, 1993; PERRY, 1980). Não parecem existir padrões de indicações terapêuticas regionais, exceto quanto a *Psychotria* da América do Sul, usada como aditivo a bebidas alucinógenas (LEAL, 1994).

A presença de alcalóides e outras substâncias bioativas no gênero *Psychotria* têm despertado grande interesse. No Brasil, principalmente, a pesquisa desse gênero foi motivada pelo uso de duas espécies, *P. viridis* e *P. carthagenensis*, junto com o decocto de *B. caapi*, na preparação do daime, uma bebida alucinógena, utilizada para fins religiosos e medicinal pelos caboclos da Amazônia (McKENNA *et al.*, 1984; LIWSYZ *et al.*, 1992).

A análise de *P. viridis*, permitiu caracterizar a dimetil-triptamina e traços de metil-triptamina (RIVIER; LINGREEN, 1972). Curiosamente, folhas de *P. carthagenensis* não apresentaram alcalóides, sugerindo que a sua atividade na bebida (daime) seja devida a outras substâncias não identificadas (LEAL; ELISABETSKY, 1996a), ou que houve problemas na identificação feita na década de 70.

A *Psychotria colorata* (Willd., ex R & S) Müell. Arg. (VEROTTA *et al.*, 1998) é tradicionalmente usada como analgésica por caboclos da Amazônia (ELISABETSKY; CASTILHOS, 1990; ELISABETSKY *et al.*, 1995). Extratos da espécie foram avaliados em testes comportamentais (testes nociceptivos térmicos e não-térmicos), e o extrato alcaloídico das flores demonstrou atividade analgésica dose-dependente e reversível por naloxona. Mostrou-se dessa forma que há uma base racional para o uso de *P. colorata* como um analgésico caseiro (ELISABETSKY *et al.*, 1995).

Investigações fitoquímicas realizadas com o extrato alcaloídico de folhas e flores de *P. colorata* levaram à identificação de isocalicantina, calicantina, quadrigemina C e 3a(R), 3a'(R)-dideidroisocalicantina, quimonantina, hodgkinsina e psicotridina (ELISABETSKY *et al.*, 1997; VEROTTA *et al.*, 1998). Estudos *in vivo* (placa quente e retirada da cauda ao estímulo térmico) e *in vitro* (*binding*) demonstraram que hodgkinsina apresenta atividade analgésica com duplo mecanismo de ação: a ativação de receptores opiáceos e o antagonismo de receptores glutamatérgicos N- Metil-D-Aspartato (NMDA) (AMADOR *et al.*, 2000). A psicotridina, também mostrou atividade analgésica, porém envolvendo apenas os receptores glutamatérgicos NMDA (AMADOR *et al.*, 2001). Esses dados justificaram a continuidade da busca por novos compostos analgésicos em espécies de *Psychotria*, numa abordagem que associa a etnofarmacologia com a quimiotaxonomia (ELISABETSKY *et al.*, 1997).

Outras espécies de *Psychotria* nativas do Estado do Rio Grande do Sul (*P. leiocarpa*, *P. myriantha*, *P. suterella*, *P. brachyceras*, *P. umbellata* Vell. e *P. carthagenensis*) foram investigadas quanto a toxicidade e ao efeito analgésico (extratos etanólicos) em camundongos. Na avaliação da analgesia, por retirada da cauda ao estímulo térmico, o extrato de *P. umbellata* foi o único a apresentar atividade dose-dependente e reversível por naloxona (LEAL, 1994; LEAL; ELISABETSKY, 1996b).

### **1.3.1 *Psychotria umbellata* (Vell.)**

*Psychotria umbellata* Vell. é o nome correto para as espécies referidas na literatura como *Palicourea brachypoda* (Muell. Arg.) Smith et Downs (SMITH; DOWNS, 1956) ou *Psychotria brachypoda* (Muell. Arg.) Britton (DILLENBURG; PORTO, 1985). A espécie é um arbusto, 1-3 m de altura, crescendo no interior de florestas tropicais e subtropicais do Brasil (SMITH; DOWNS, 1956). Estende-se de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul, onde ela é

restrita à região costal mais ao norte, no limite sul da chamada Floresta Tropical Atlântica (DILLENBURG; PORTO, 1985). Segundo os botânicos Marcos Sobral (Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS) e Gert Hatschbach (Museu Botânico Municipal de Curitiba – PR) esta espécie muitas vezes é descrita como *Palicourea umbellata* sendo considerada limítrofe entre os gêneros.

As substâncias isoladas de *P. umbellata* apresentam padrão de espectro RMN do  $^3\text{H}$  típicos para alcalóides indol-monoterpênicos. No entanto, os alcalóides encontrados em *P. umbellata* não apresentam a característica vinila terminal; em seu lugar, apresentam uma dupla ligação interna a um anel pentânico, sugerindo a condensação de um iridóide do tipo geniposídeo com a triptamina, resultando no isolamento da substância inédita denominada psicolatina, encontrada majoritariamente nas folhas secas (~ 1,3% m/m) (KERBER, 1999).

Além de psicolatina (Figura 4), também foram isolados outros três alcalóides, porém em bem menor quantidade: 3,4-deidro-18,19- $\beta$ -epoxi-15,20-*epi*-umbelatina (0,024% m/m da planta seca), N –[1-(2- $\alpha$ -hidroxipropil)]-umbelatina (0,043% m/m da planta seca) e N –[1-(2- $\beta$ -hidroxipropil)]-umbelatina (0,029% m/m da planta seca).

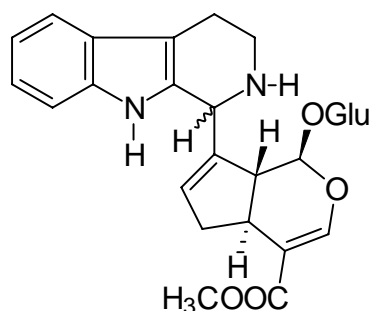


Figura 4: Estrutura molecular de psicolatina

## 1.4 TRANSTORNOS MENTAIS

Os Transtornos Mentais, alguns referidos como Doenças ou Distúrbios Mentais, abrangem todos os tipos de doenças que afetam a mente. Alterações do pensamento (em sua forma, velocidade, conteúdo, etc), delírios, alucinações, alterações do humor, com depressão, euforia ou irritabilidade, liberação de agressividade, incapacidade de execução de tarefas cotidianas e, principalmente, a não-percepção da sua própria doença são as principais manifestações dos transtornos mentais (GARFIELD, 2003). Essas manifestações podem ocorrer de forma súbita ou lenta, ocasionalmente acompanhadas de alterações motoras, como incoordenação dos movimentos dos olhos ou dos membros.

Podem ser classificados como Transtornos Mentais a esquizofrenia, a depressão, transtornos de ansiedade e os transtornos relacionados ao uso de substâncias psicoativas. Os transtornos mentais podem ser gerados por alterações genéticas, pressões ambientais, desequilíbrios bioquímicos, intoxicações, infecções ou, geralmente, por combinação desses fatores. O levantamento da Organização Mundial da Saúde (OMS) acentua o peso da pobreza, expressa por meio do desemprego, do baixo nível de educação e de privações de toda a ordem, como outros fatores. Porém, qualquer estresse externo intenso, como guerras, ou ligados às condições de trabalho, como tensão, angústia, competitividade ou rejeição, quando excessivas e duradouras favorecem o surgimento dos distúrbios mentais (ALARCON; AGUILAR-GAXIOLA, 2000; DEMYTTENAERE *et al.*, 2004).

A incidência destas doenças é bastante alta no mundo, incluindo o Brasil (GOLDBERG; LECRUBIER, 1995). Os transtornos mentais afetam homens e mulheres de várias idades, ricos e pobres, áreas urbanas ou rurais, e a idéia de que distúrbios mentais são problemas restritos a áreas industrializadas e relativamente ricas é bastante equivocada (PATEL; KLEINMAN, 2003).

Recentes dados da OMS mostram que condições neuropsiquiátricas que abrangem alguns distúrbios mentais têm uma prevalência global de cerca de 12% dos adultos (OMS, 2001). Estima-se que 450 milhões de pessoas no mundo sofram de afecções neuropsiquiátricas. Quando se consideram todos os transtornos incluídos na Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Correlatos de Saúde da OMS (CID-10), as taxas de prevalência são ainda maiores: pesquisas mostram que mais de 25% da população, tanto de países desenvolvidos como em desenvolvimento, apresentam um ou mais transtornos mentais e comportamentais (REGIER *et al.* 2002; WELLS *et al.* 1989; ALMEIDA FILHO *et al.* 1997), sendo que a prevalência geral de Transtornos Mentais é, aproximadamente, a mesma no sexo masculino e no feminino.

Na América Latina um dos maiores problemas é a falta de acesso a medicamentos ou a tratamentos, mais do que a prevalência elevada dos distúrbios psiquiátricos (DEMYTTENAERE *et al.*, 2004). Os dados sobre o Brasil ainda são incompletos, porém sugerem que a prevalência de problemas psiquiátricos deve situar-se mais próxima dos 26% dos Estados Unidos do que dos 8,8% do Japão (ANDRADE *et al.*, 2003).

Estudos apontam que a maior barreira ao tratamento não é a perspectiva de discriminação, mas sim os custos dos medicamentos, consultas e exames ou da locomoção até os centros de atendimento médico. No Brasil, que tem na depressão o distúrbio mental mais comum, sendo metade dos casos crônicos, os custos com medicamentos tornam-se um empecilho ao tratamento (WANG *et al.*, 2003, 2004; DE ALMEIDA-FLECK *et al.*, 2005).

#### **1.4.1 ANSIEDADE: BASES NEURAIS, FARMACOTERAPIA E MODELOS COMPORTAMENTAIS**

Ansiedade é um dos distúrbios psiquiátricos mais comuns e custa aos Estados Unidos mais que a depressão. Os distúrbios de ansiedade mais prevalentes são o distúrbio de ansiedade generalizada, o transtorno obsessivo-compulsivo, o distúrbio de estresse pós-traumático, o de ansiedade social, as fobias e ataques de pânico. No entanto, menos de um terço da população recebe tratamento adequado, e 43% das pessoas com distúrbios de ansiedade também são depressivas ou fazem uso de algum tipo de droga de abuso (JONES; BLACKBURN, 2002). Além disso, os agentes ansiolíticos estão entre as substâncias prescritas com maior frequência e utilizadas regularmente por mais de 10% da população na maioria dos países desenvolvidos (RANG *et al.*, 2001).

Os medicamentos comumente utilizados para tratar a ansiedade incluem benzodiazepínicos ou antidepressivos que atuam e/ou modulam a atividade do ácido-gama-amino-butírico (GABA), da serotonina (5-HT) e/ou antagonistas dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos (BENEYTEZ, *et al.*, 1998).

Os benzodiazepínicos, atuando através da modulação positiva dos receptores GABA<sub>A</sub> e facilitando a abertura dos canais de cloreto, têm sua eficácia estabelecida no tratamento da ansiedade e da insônia. Embora relativamente seguros no tratamento de ansiedade patológica, os benzodiazepínicos possuem um número considerável de efeitos colaterais que incluem sedação, ataxia, relaxamento muscular, perda de memória, potenciação dos efeitos do álcool e barbitúricos e desenvolvimento de tolerância e dependência, além de um significativo potencial para o abuso (KELLEY *et al.*, 2003, GRIEBEL *et al.*, 1997).

Além das vias do GABA, muitos outros transmissores e moduladores foram implicados na ansiedade e nos distúrbios do pânico, particularmente a serotonina. A serotonina tem sido implicada em vários distúrbios psiquiátricos e neurológicos, incluindo ansiedade (BENEYTEZ, *et al.*,

1998). Ao longo dos anos o efeito ansiolítico de fármacos que atuam em receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2C</sub> tem sido revelado tanto em modelos comportamentais condicionados, quanto em modelos etológicos (BOURIN *et al.*, 2001). A buspirona, um potente agonista nos receptores 5-HT<sub>1A</sub>, usada no tratamento de ansiedade crônica, não causa sedação e possui pouco potencial para abuso. No entanto, sua eficácia tem sido questionada, além de ser ineficaz no controle dos episódios de pânico (BENEYTEZ, *et al.*, 1998).

Além dos agonistas 5-HT<sub>1A</sub>, os fármacos que atuam sobre outros receptores de serotonina também podem ser úteis como agentes ansiolíticos. Os inibidores da recaptção de 5-HT, como a fluoxetina, bem como os inibidores mistos da captação de 5-HT/noradrenalina, que são utilizados principalmente como agentes antidepressivos, também são eficazes em alguns distúrbios de ansiedade, bem como nos episódios de pânico (RANG *et al.*, 2001).

Os antagonistas dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos, como o propranolol, são utilizados no tratamento de algumas formas de ansiedade, particularmente quando os sintomas físicos são incômodos, como sudorese, tremor e taquicardia. Entretanto, sua eficácia depende mais do bloqueio das respostas simpáticas periféricas do que de qualquer efeito central (RANG *et al.*, 2001).

Em animais, medo e aversão resultam em inibição comportamental, que ocorre em resposta a acontecimentos ambientais que são novos (RANG *et al.*, 2001). Essa inibição comportamental pode assumir a forma de imobilidade. Para avaliar a ansiedade em roedores, em geral os animais são expostos a condições ansiogênicas: ambiente novo (labirinto em cruz elevado, interação social, campo aberto, placa perfurada, claro-escuro) ou situações de conflito (teste de punição de Vogel) (MALMBERG-AIELLO *et al.*, 2002). Tais procedimentos tem sido usados para estudar as propriedades ansiolíticas de uma grande variedade de compostos, especialmente benzodiazepínicos.

A novidade de uma situação desconhecida pode provocar ansiedade e/ou medo. Tais estados podem ser avaliados pela intensidade de comportamentos em camundongos em uma área desconhecida, quantidade de consumo de comida desconhecida ou pela interação social com animais estranhos (HASCÖET; BOURIN, 1998).

O teste da placa perfurada (*hole-board model*) tem sido usado para avaliar as propriedades ansiolíticas/ansiógenicas de fármacos (TAKEDA *et al.*, 1998). Este modelo tem a vantagem de permitir medir concomitantemente atividade exploratória (número de espreitamentos) e atividade locomotora, sendo útil para avaliar efeitos sedativos (FILE; PELLOW, 1985; TAKEDA *et al.*, 1998).

O teste de claro-escuro (*light/dark test*) é baseado no conflito entre a tendência natural dos camundongos de explorar um novo ambiente e a aversão dos roedores por espaços muito iluminados. Neste modelo, cinco parâmetros são avaliados para acessar o perfil ansiolítico de novos fármacos: a latência para o primeiro cruzamento do compartimento claro para o escuro, o número de cruzamentos entre os dois compartimentos (exploração), movimento dentro de cada compartimento, o tempo de permanência no lado claro ou escuro e o número de levantamentos (*rearing*) (LEPICARD *et al.*, 2000). A administração de fármacos ansiolíticos leva a um aumento do tempo de permanência na área clara, aumento do número de levantamentos e cruzamentos, e um aumento na latência do primeiro cruzamento do claro para o escuro (GARD *et al.*, 2001). O número de cruzamentos entre os dois compartimentos é o parâmetro mais controverso, a latência para o primeiro cruzamento, muitas vezes é difícil de avaliar, porém o tempo de permanência no compartimento claro parece ser o melhor parâmetro para avaliar as propriedades ansiolíticas (HASCÖET; BOURIN, 1998). O teste de claro-escuro tem se mostrado extremamente útil para avaliar uma série de compostos ansiolíticos, incluindo esteróides neuroativos (GARD *et al.*, 2001), e ligantes de receptor 5-HT<sub>1A</sub> (GRIEBEL *et al.*, 1997).



## **1.4.2 DEPRESSÃO: BASES NEURAIIS, FARMACOTERAPIA E MODELOS COMPORTAMENTAIS**

O estudo de medicamentos antidepressivos possui uma enorme relevância uma vez que os distúrbios depressivos são doenças psiquiátricas heterogêneas, acompanhadas de muitos problemas físicos, mentais e emocionais, e possuem alta prevalência na comunidade geral. Supõe-se que cerca de 6% da população encontra-se em um estado de depressão (prevalência do momento), e aproximadamente 10 % da população desenvolverá a depressão ao longo da vida (prevalência ao longo da vida). Ocorre prevalentemente entre os 30 e 60 anos, principalmente em mulheres e estima-se que apenas um quarto dos deprimidos procurará ajuda médica de pessoal especializado (HOLLISTER, 1994; KOROLKOVAS, 1994; FRY, 1987; ZANINI; OGA, 1985).

A diferenciação entre os sintomas que configuram um quadro patológico depressivo muitas vezes é difícil de ser realizada. As características individuais variam muito de paciente para paciente, tornando difícil o diagnóstico. É necessário primariamente separar um distúrbio depressivo (patológico) da reação de tristeza normal do indivíduo a algum fator desencadeante "corriqueiro" da vida, como a perda de um ente querido, uma separação, a perda de emprego, etc. Essa "depressão" será auto-limitada, e com o tempo, a ajuda de familiares e amigos, será superada e involuirá (ZANINI; OGA, 1985).

Antidepressivos são fármacos intensamente utilizados na terapêutica, e possuem um amplo espectro de aplicações clínicas. São usados como tranqüilizantes, na profilaxia de dor crônica, na síndrome do pânico, na bulimia nervosa, no distúrbio obsessivo-compulsivo e, principalmente, nos tratamentos dos distúrbios depressivos (COQUOZ *et al.*, 1991; DOMINGUEZ, 1992).

O tratamento farmacológico com antidepressivos tem por objetivo melhorar o humor dos pacientes deprimidos, assim como seus estados mentais. Eles diminuem a intensidade dos sintomas depressivos e aceleram a velocidade de normalização do paciente (KOROLKOVAS, 1994).

A categoria de fármacos utilizada como antidepressivos engloba os chamados antidepressivos "clássicos", que são os Tricíclicos (TCAs) e os Inibidores da Monoaminoxidase (IMAOs), e os chamados antidepressivos "atípicos" ou os de "segunda geração", que são os Inibidores Seletivos da Recaptação da Serotonina (ISRSs) e outros fármacos heterogêneos (KOROLKOVAS, 1994).

As bases neuroquímicas que explicam os distúrbios depressivos não estão totalmente elucidadas. Várias teorias foram propostas baseadas nos mecanismos de ação dos antidepressivos, sendo que a hipótese catecolaminérgica postulava que um déficit de noradrenalina (NA) no SNC era o responsável pela depressão; assim, a ação dos antidepressivos estaria relacionada à capacidade de aumentar a oferta de NA na fenda sináptica, por diminuição da recaptação (antidepressivos tricíclicos) ou por inibição da degradação (IMAOs). Entretanto, essa teoria foi contestada com base em várias observações. Alguns fármacos são potentes bloqueadores da recaptação de NA (como a cocaína e anfetaminas), porém não são antidepressivos eficazes. Além disso, a inibição da recaptação da NA ocorre algumas horas após a ingestão dos antidepressivos, porém a resposta terapêutica leva semanas para começar (GRAEFF, 1989; KETY, 1970; MORENO; MORENO, 1995; ORLAND; SALTMAN, 1989; ROTH, 1995).

Enquanto os pesquisadores norte-americanos defendiam a hipótese noradrenérgica, os europeus atribuíam as doenças afetivas a distúrbios serotoninérgicos. A hipótese das indolaminas postulava que um déficit funcional no neurotransmissor 5-HT produziria sintomas depressivos, e que os antidepressivos

agiriam aumentando a atividade da serotonina através da inibição da recaptação da mesma. Essa hipótese foi também contestada com as mesmas bases que a noradrenérgica (GRAEFF, 1989; MORENO; MORENO, 1995; ORLAND; SALTMAN, 1989; ROTH, 1995).

Nos últimos anos, os pesquisadores chegaram ao consenso de que a depressão é um distúrbio heterogêneo, caracterizado por um complexo número de alterações em vários sistemas de receptores e neurotransmissores do SNC. Tal conclusão tem resultado em inúmeras hipóteses sobre a sensibilidade dos receptores, que sugerem que o tratamento com antidepressivos, a longo prazo, pode reduzir a sensibilidade de certos receptores ( $\beta_1$  ou  $\alpha_2$ -adrenérgicos e 5-HT) ou aumentar a sensibilidade de outros receptores (5-HT<sub>1</sub>) e estas alterações podem estar relacionadas aos mecanismos de ação e aos efeitos terapêuticos dos tratamentos com antidepressivos. Especificamente essas mudanças no SNC parecem consistir em alterações pré-sinápticas na síntese, liberação, metabolismo e ou captação de neurotransmissores, bem como nos receptores pós-sinápticos, transdução (proteína G), segundos mensageiros (ciclases e sistema fosfatidilinositol) e ou irregularidades no transporte de íons. Disfunções em outros sistemas neurohumorais (dopamina, acetilcolina, neuropeptídeos) também são apontados como responsáveis pela gênese dos distúrbios depressivos (GRAEFF, 1989; LEONARD, 1992; MORENO; MORENO, 1995; ORLAND; SALTMAN, 1989; ROTH, 1995).

Sabe-se que as ações farmacológicas dos tricíclicos vão além da inibição da recaptação da NA e da 5-HT. Eles provocam também efeitos adversos relacionados a inibição dos receptores  $\alpha$ -adrenérgicos (o que causa hipotensão postural, alterações do eletroencefalograma), inibição dos receptores muscarínicos de acetilcolina (o que provoca efeitos anticolinérgicos como boca seca, alterações de acomodação visual, retenção urinária, diminuição do peristaltismo e taquicardia). A sedação, que era atribuída somente a efeitos serotoninérgicos e

anticolinérgicos, também pode ser atribuída às ações anti-histamínicas ( $H_1$ ) dos tricíclicos. Uma explicação para a afinidade a esses receptores seria a semelhança estrutural dos tricíclicos com os antipsicóticos fenotiazínicos. No entanto, eles não bloqueiam os receptores de dopamina, não causando sintomas extra-piramidais (GRAEFF, 1989; HOLLISTER, 1994; KOROLKOVAS, 1994; SCHATZBERG; COLE, 1993). Esses compostos vieram substituir os inibidores da monoaminoxidase com sucesso, principalmente devido a menor toxicidade e maior segurança em relação a esses (BALDESSARINI, 1996; HOLLISTER, 1994).

Devido aos efeitos colaterais indesejáveis dos antidepressivos clássicos acima mencionados, foram desenvolvidas pesquisas a fim de encontrar medicamentos mais efetivos e eficazes para o tratamento da depressão. No final da década de 1980, foi lançada há 30 anos pelo laboratório Eli Lilly, a fluoxetina (Prozac®), um novo fármaco que prometia as vantagens esperadas. A categoria de fármacos antidepressivos foi então ampliada assustadoramente com a introdução na terapêutica de vários compostos novos nos últimos anos. Designou-se os mesmos como sendo antidepressivos "atípicos", que englobam fármacos com uma maior seletividade de ação em um determinado sistema, os Inibidores Seletivos da Recaptação da Serotonina (ISRSs), cujos principais exemplos são sertralina, fluoxetina, fluvoxamina, paroxetina e citalopram, e outros, que são fármacos heterogêneos quanto aos mecanismos de ação e também em relação às suas estruturas, como mianserina, maprotilina, amoxapina, tradozona e bupropiona (CHETLEY, 1994; LEONARD, 1992).

Os ISRSs são pouco tóxicos em sobredosagens, e estas, quando ocorrem, dificilmente levam à letalidade, causando como sintomas principais, tremores, tonturas, náuseas, dores abdominais e bradicardia (CHETLEY, 1994; WILDE, 1993). Os principais efeitos colaterais relatados para os ISRSs estão relacionados às conseqüências causadas pelo aumento nos níveis de 5-HT, cujos principais constam de distúrbios gastrintestinais, como náusea e diarreias e de

distúrbios nervosos, como agitação, insônia, sonolência, ansiedade, dores de cabeça, anorexia, tonturas, tremores e disfunções sexuais. Estes efeitos variam em incidência conforme o ISRSs, e não foram totalmente elucidados os mecanismos farmacológicos envolvidos (CHETLEY, 1994; WILDE, 1993).

Recentemente, muita atenção tem sido devotada para o sistema glutamatérgico e para antagonistas de receptor NMDA em particular (ROGÓZ *et al.*, 2002). Propriedades antidepressivas para estes compostos foram sugeridas há 10 anos, indicando que o complexo do receptor NMDA esteja envolvido na patogênese da depressão; compostos que reduzam a transmissão nestes receptores, como antagonistas competitivos e não-competitivos do receptor NMDA mostraram efeito antidepressivo tanto em testes pré-clínicos como clínicos (MANTOVANI *et al.*, 2003).

O quadro depressivo é difícil de ser mimetizado em animais. No entanto, existem vários modelos comportamentais preditivos para avaliar novas drogas com potencial atividade antidepressiva. Tanto o teste de nado forçado como o teste de suspensão da cauda são amplamente aceitos como modelos de depressão, e são utilizados para estudar novas drogas antidepressivas, já que eles são sensíveis para todas as principais classes de drogas antidepressivas incluindo tricíclicos, ISRSs, inibidores da MAO e atípicos, como antagonistas de receptor NMDA (ROSA *et al.*, 2003).

### **1.4.3 ESQUIZOFRENIA: BASES NEURAIS, FARMACOTERAPIA E MODELOS COMPORTAMENTAIS**

Esquizofrenia é um transtorno psiquiátrico grave, descrita pela primeira vez como "dementia praecox" por Kraepelin, em 1919, e que começa tipicamente perto do fim da adolescência ou no início da idade adulta. A esquizofrenia é a mais freqüente das psicoses caracterizando-se por distúrbios do

pensamento como delírios de perseguição e a perda das conexões lógicas de idéias, distúrbios da percepção (acompanhada principalmente por alucinações auditivas), emoções embotadas ou impróprias a uma dada situação, excessiva timidez e isolamento social, e mesmo alterações na motricidade (como agitação ou, ao contrário, imobilidade; ANDREASSEN, 1997).

Na esquizofrenia a primeira hipótese levantada a respeito de uma disfunção neuroquímica foi a dopaminérgica, na década de 50, basicamente em função do mecanismo de ação dos antipsicóticos então disponíveis (MATTHYSE, 1973). Dada a predominante localização de terminais dopaminérgicos e de receptores  $D_2$  em regiões subcorticais; como o estriado e o núcleo accumbens, a clássica hipótese dopaminérgica da esquizofrenia concentrou interesse principalmente nestas regiões subcorticais (CARLSSON; LINDQVIST, 1963).

A visão atual predominante sobre esta hipótese é de que o sistema dopaminérgico na esquizofrenia pode estar caracterizado por um desequilíbrio cortical/subcortical. Neste desequilíbrio projeções de dopamina subcortical mesolímbica poderiam estar hiperativas, resultando numa hiperestimulação de receptores  $D_2$  e sintomas positivos, enquanto que as projeções de dopamina mesocortical para o córtex pré-frontal poderiam estar hipoativas, resultando numa hipoestimulação de receptores  $D_1$ , sintomas negativos e comprometimento cognitivo (ABI-DARGHAM; MOORE, 2003).

Uma forte evidência que reforça a hipótese dopaminérgica é de que drogas que liberam dopamina, como a anfetamina, produzem distúrbios comportamentais semelhantes ao comportamento de pacientes esquizofrênicos. Entretanto, é improvável a hipótese de que um único neurotransmissor seja capaz de explicar as bases biológicas de cada uma das mais heterogêneas formas da esquizofrenia (HIETALA; SYVALAHTI, 1996). Como a anfetamina interfere não só na transmissão dopaminérgica, como também na transmissão de noradrenalina,

induzindo um aumento da atividade noradrenérgica, levantou-se a hipótese de que poderia também ocorrer uma hiperatividade noradrenérgica na esquizofrenia. Essa hipótese tem sido corroborada por um aumento nos níveis de noradrenalina encontrado no fluido cerebrospinal de cérebros de esquizofrênicos analisados pós-morte, principalmente nos tipos paranóico ou com sintomas predominantemente negativos (KEMALI *et al.*, 1982). Também foram constatados níveis elevados de noradrenalina em fluido cerebrospinal de esquizofrênicos que receberam tratamento com haloperidol (YAMAMOTO *et al.*, 1994).

A hipótese de que a psicose induzida pelo ácido lisérgico (LSD) e a psicose esquizofrênica são relacionadas a uma disfunção no sistema serotoninérgico central, formulada na década de 50 por WOOLLEY e SHAW (1957), foi a primeira teoria testável na psiquiatria biológica. O interesse na relação entre serotonina e esquizofrenia tem crescido à medida que se descobriu que os agentes que atuam bloqueando receptores serotoninérgicos tais como clozapina, olanzapina e risperidona, exercem efeitos terapêuticos nesta doença (IQBAL; VAN PRAAG, 1995). Esses antipsicóticos atípicos têm significantes efeitos não apenas sobre subtipos de receptores serotoninérgicos (5-HT<sub>2A/C</sub>, 5-HT<sub>6</sub> and 5-HT<sub>7</sub>), mas também sobre receptores dopaminérgicos,  $\alpha_1$ -adrenérgicos, histaminérgicos, muscarínicos e receptores glutamatérgicos NMDA (SHIM *et al.*, 1999; SVENSSON, 2000; BREESE *et al.*, 2002).

Uma hipótese mais recente sobre as bases bioquímicas da esquizofrenia propõe uma hipofunção do sistema transmissor glutamatérgico na patofisiologia desta doença. Esta hipótese se baseia em várias evidências de dados neuroquímicos obtidos em humanos assim como observações clínicas. Um exemplo destas evidências é a ação psicotomimética de drogas que bloqueiam receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, que sugere uma associação entre psicose e glutamato. Alguns destes fármacos, como a fenciclidina e cetamina, causam

sintomas psicóticos muito semelhantes aos sintomas esquizofrênicos, até mesmo sintomas negativos (OLNEY; FARBER, 1995).

Outra hipótese atual é a de que a patofisiologia da esquizofrenia possa estar associada a várias alterações bioquímicas que resultariam numa hipofunção adenosinérgica. Adenosina é um neuromodulador do sistema purinérgico que modula negativamente a atividade de diversos neurotransmissores como a dopamina e o glutamato (BRUNDEGE; DUNWIDDIE, 1997). Os receptores de adenosina do tipo A<sub>1</sub> quando ativados inibem a liberação de glutamato e dopamina, e inibem a atividade neuronal através de hiperpolarização pré-sináptica. Através da ativação dos receptores do tipo A<sub>2</sub>, a adenosina possui um importante efeito modulador sobre a transmissão dopaminérgica (FERRÉ, 1997). Estudos comportamentais pré-clínicos demonstraram que agonistas dos receptores adenosinérgicos do tipo A<sub>1</sub> produzem importantes efeitos anticonvulsivantes, ansiolíticos, sedativos e antipsicóticos (BRUNDEGE; DUNWIDDIE, 1997), enquanto que agonistas dos receptores do tipo A<sub>2</sub> apresentam um perfil psicofarmacológico particularmente semelhante a antipsicótico (FERRÉ, 1997; RIMONDINI *et al.*, 1997). A partir destes dados foi proposto por LARA e SOUZA (2000) que alterações envolvendo o sistema purinérgico, mais especificamente uma redução da atividade adenosinérgica, poderiam estar implicadas na fisiopatologia da esquizofrenia.

A esquizofrenia é uma doença para a qual devem ser levadas em conta todas as abordagens terapêuticas relevantes. Idealmente a terapia farmacológica deve estar sempre associada à terapia psicossocial com objetivo de treinamento de habilidades para facilitar a vida em sociedade e aumentar a capacidade de trabalho (SHIRAKAWA *et al.*, 2001).

A descoberta dos primeiros fármacos antipsicóticos em 1952 é o marco da psicofarmacologia contemporânea. Os primeiros medicamentos usados



para o tratamento da esquizofrenia são hoje os chamados antipsicóticos clássicos, também conhecidos como neurolépticos (RANG *et al.*, 2001).

Esses compostos, sendo haloperidol e clorpromazina alguns exemplos, têm como mecanismo de ação principal o bloqueio dos receptores dopaminérgicos, principalmente os do tipo D<sub>2</sub>. Poucos psiquiatras discutem o valor desses agentes no controle dos sintomas positivos da doença, pois em grande parte dos casos, são eficazes em prevenir a reincidência dos sintomas psicóticos (KAPUR; MAMO, 2003). Porém, a maioria dos antipsicóticos desenvolvidos antes da década de 80 induz graves efeitos extrapiramidais, como parkinsonismo, distonias, acatisia e discinesia tardia, em até 75% dos pacientes (KEEPERS *et al.*, 1983). Além disso, esses antipsicóticos apresentam pouco ou nenhum efeito no controle de sintomas negativos primários (KANE; MAYERHOFF, 1989).

Novos fármacos antipsicóticos foram desenvolvidos nas últimas duas décadas com perfil clínico diferente dos agentes clássicos e com menos efeitos adversos. Esses novos fármacos são denominados de atípicos, sendo a sulpirida, clozapina, olanzapina, risperidona e quetiapina alguns exemplos (RANG *et al.*, 2001). Antipsicóticos atípicos são compostos que têm pequena propensão a induzir efeitos extrapiramidais e apresentam efeitos sobre os sintomas negativos que os agentes clássicos não afetam (MELTZER, 1995). Soma-se a essas características, a superioridade dos antipsicóticos atípicos em tratar os pacientes refratários, sendo esta a sua principal característica (BELMAKER; BERSUDSKY, 2003). Outra característica é a de que os atípicos não aumentam os níveis de prolactina, como fazem os clássicos, tampouco induzem a chamada síndrome neuroléptica. Porém, os antipsicóticos atípicos não estão livres de induzir efeitos adversos. Estes caracterizam-se por sedação, hipotensão ortostática, ganho de peso e distúrbios sexuais (SHIRAKAWA *et al.*, 2001). Além desses, a clozapina provoca agranulocitose em 3-5% dos pacientes, com grave risco de morte (BHANJI *et al.*, 2003).

Existem vários modelos comportamentais para selecionar novos fármacos antipsicóticos típicos e atípicos. A maioria das drogas utilizadas mimetiza tanto sintomas positivos da doença por aumentar os níveis de DA diretamente (apomorfina) ou indiretamente (anfetamina) e negativos da doença por bloquear receptores dopaminérgicos (haloperidol).

No teste de letalidade induzido por anfetamina, o aumento da letalidade em animais agrupados é prevenido por antipsicóticos (típicos e atípicos), mas não por tranqüilizantes (ex. barbitúricos e benzodiazepínicos) (BOURIN *et al.*, 1986). A eficácia de antipsicóticos neste modelo está relacionada a sua habilidade em bloquear receptores D<sub>2</sub> (BOURIN *et al.*, 1986; GIFFORD *et al.*, 2000; BALL *et al.*, 2003), uma característica comum para todos os fármacos antipsicóticos efetivos.

O antagonismo da escalada induzida por apomorfina é um dos testes mais utilizados para predizer propriedades antagonistas dopaminérgicas *in vivo* (COSTENTIN *et al.*, 1975; PROTAIS *et al.*, 1976; KIM *et al.*, 1999). Camundongos tratados com apomorfina, um agonista misto D<sub>1</sub>/D<sub>2</sub> que estimula receptores dopaminérgicos pós-sinápticos no estriado, tendem a adotar uma posição vertical ao longo das barras da gaiola (BATTISTI *et al.*, 2000); comportamento este mediado pela ativação de receptores D1 e D2 (MOORE; AXTON, 1988).

## 2. HIPÓTESE DE TRABALHO

Em estudos anteriores, psicolatina apresentou moderada atividade analgésica dose-dependente e parcialmente reversível por naloxona utilizando modelos de dor induzidos por estímulos térmicos (teste da placa quente e teste da retirada da cauda ao estímulo térmico) e químicos (capsaicina e formalina). Os resultados desse trabalho sugeriram que psicolatina possui um duplo mecanismo de ação, envolvendo a ativação de receptores opióides e o antagonismo de receptor glutamatérgico NMDA. A co-administração de psicolatina com MK-801 em doses não efetivas *per se* produz um efeito semelhante as doses analgésicas administradas isoladamente, demonstrando que essas drogas quando co-administradas tem efeito sinérgico potencializando suas ações (BOTH, 2001, BOTH *et al.*, 2002).

O receptor glutamatérgico NMDA está amplamente distribuído no sistema nervoso e há evidências abundantes que este receptor tenha importante papel em grande número de processos fisiológicos e patológicos. Dentre os processos que envolvem o receptor NMDA incluem-se desenvolvimento, aprendizagem e memória, plasticidade, dor (PERKINS; DRAY, 1996), ansiedade (FILE, 1996) e depressão (MANTOVANI *et al.*, 2003). Uma disfunção deste sistema pode levar a vários distúrbios neurológicos, incluindo epilepsia (MELDRUM, 1990; DINGLELINE *et al.*, 1991) e doenças neurodegenerativas como a Doença de Huntington e a Doença de Alzheimer (GRENNAMYRE *et al.*, 1985; PROCTER *et al.*, 1988).

Sendo a psicolatina um alcalóide abundante na natureza, com estrutura química nova e peculiar e biologicamente ativo, justifica-se dar continuidade à investigação de sua atividade biológica, especialmente a relacionada com antagonismo de receptores NMDA (N-Metil-D-Aspartato), bem

como outros importantes receptores que modulam diversas atividades do sistema nervoso central (SNC), como receptores serotoninérgicos (5-HT), dopaminérgicos (DA), gabaérgicos (GABA) e colinérgicos (Ach).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

Esse estudo teve como objetivo geral dar continuidade à investigação do perfil psicofarmacológico de psicolatina, contribuindo para o esclarecimento da participação dos sistemas serotoninérgico, glutamatérgico, dopaminérgico, gabaérgico e colinérgico em seu mecanismo de ação, para que futuramente, tais interações possam servir como modelo estrutural e de mecanismo de ação para o desenvolvimento de drogas para os diversos distúrbios comportamentais.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

I) Verificar os efeitos de psicolatina nos modelos comportamentais de placa perfurada e claro/escuro, usados para detecção de atividade ansiolítica.

II) Averiguar o mecanismo de ação do efeito ansiolítico de psicolatina, investigando sua interação com antagonistas serotoninérgicos e GABAérgicos nos modelos da placa perfurada e claro/escuro.

III) Verificar o efeito de psicolatina no modelo comportamental do nado forçado, usado na detecção de atividade antidepressiva.

IV) Avaliar o possível efeito de psicolatina no teste de proteção de convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ).

V) Avaliar o efeito de psicolatina sobre a sedação utilizando o teste de potenciação do sono barbitúrico.

VI) Verificar a interferência de psiclatina com a locomoção dos animais através do teste de atividade locomotora espontânea.

VII) Investigar os efeitos de psiclatina sobre a modulação da memória de curta e longa duração nos processos de aquisição, consolidação e evocação usando o paradigma de esQUIVA inibitória.

VIII) Investigar os efeitos de psiclatina sobre o sistema colinérgico no teste de tremor induzido por oxotremorina.

IX) Investigar o efeito de psiclatina sobre comportamentos modulados pelo sistema glutamatérgico, por meio do modelo de hiperlocomoção induzida por MK-801 e de convulsão induzida por NMDA.

X) Avaliar a interferência de psiclatina sobre o comportamento modulado pelo sistema dopaminérgico, por meio do modelo de letalidade induzida por anfetamina e por meio do comportamento de escalada induzida por apomorfina.

XI) Verificar a DL50 e sinais de toxicidade aguda em animais tratados com psiclatina.

XII) Além da avaliação de uma possível interferência de psiclatina sobre os vários sistemas de neurotransmissores do SNC utilizando modelos comportamentais, também se buscou avaliar o efeito de psiclatina sobre os parâmetros de estresse oxidativo utilizando o conteúdo de radicais livres (DCF), a reatividade antioxidante total (TAR), o ensaio de peroxidação lipídica (TBARS) e a oxidação dos resíduos de triptofano (TRI) e tirosina (TIR) no córtex e hipocampo já que inúmeros compostos indólicos possuem atividade antioxidante e neuroprotetora.

## 4 ARTIGOS CIENTÍFICOS

### 4.1 Perfil Psicofarmacológico do Alcalóide Psicolatina como Modulador Serotonérgico 5HT<sub>2A/C</sub> (*J. Nat. Prod.*, v. 68, n. 3, p. 374-380, 2005).

#### 4.1.1 INTRODUÇÃO

Estudos anteriores mostraram que psicolatina apresenta moderada atividade analgésica dose-dependente. O mecanismo de ação parece ser a ativação de receptores opióides e o antagonismo de receptores NMDA (BOTH *et al.*, 2002).

Atualmente existem várias evidências da relação entre o sistema opióide e o sistema glutamatérgico (WIESENFELD-HALLIN, 1998). Diversos estudos examinaram o envolvimento de receptores NMDA no desenvolvimento de tolerância e dependência a opióides. Antagonistas NMDA co-administrados com morfina reduzem a tolerância ao efeito analgésico (TRUJILLO; AKIL, 1991; BEN-ELIYAHU, 1992; ELLIOTT *et al.*, 1999; PRICE *et al.*, 2000).

Antagonistas de receptor NMDA também podem modular a renovação das monoaminas no SNC e esta ação pode ser a responsável pelas propriedades antidepressivas dos antagonistas NMDA (SKOLNICK, 1999). Foi demonstrado, por exemplo, que MK-801 aumenta a liberação e influencia a renovação de serotonina em várias regiões cerebrais, incluindo hipocampo e estriado (YAN *et al.*, 1997). Além disso, os efeitos psicoestimulantes e psicotomiméticos de MK-801 e fenciclidina (PCP) são atenuados por antagonistas específicos de receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2A</sub>, sugerindo que 5-HT está envolvido no comportamento estereotipado produzido por MK-801. Além do receptor 5-HT<sub>2A</sub>, um grande número de estudos indica que MK-801 também pode influenciar outros receptores serotonérgicos. Tanto o aumento na densidade de receptores 5-HT<sub>1A</sub> depois de uma única

administração de MK-801, quanto o aumento do RNAm de receptores 5-HT<sub>6</sub> e 5-HT<sub>7</sub> foram demonstrados (WEDZONY *et al.*, 2000).

Por este alcalóide apresentar atividade biológica e a participação de receptores NMDA a avaliação de seu perfil psicofarmacológico, bem como a participação de outros receptores, como serotonina torna-se interessante.

#### **4.1.2 OBJETIVOS**

Este trabalho teve, portanto, o objetivo de avaliar os efeitos de psicotatina sobre diversos modelos comportamentais envolvendo a participação de receptores serotoninérgicos e GABAérgicos.



**Psychopharmacological profile of the alkaloid psychollatine as a 5HT<sub>2A/C</sub> serotonin modulator.**

Fernanda L. Both<sup>1,2</sup>, Lisiane Meneghini<sup>2</sup>, Vitor A. Kerber<sup>3</sup>, Amélia T. Henriques<sup>1</sup> and Elaine Elisabetsky\*<sup>1,2</sup>

1Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, Brazil;

2 Laboratório de Etnofarmacologia, Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, Brazil;

3 Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR, Brazil

*Address correspondence to:* Elaine Elisabetsky, Caixa Postal 5072, 90041-970, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel/Fax: (+)55 51 3316 3121; E-mail: elisasky@vortex.ufrgs.br

## **Abstract**

Behavioural effects of psychollatine, a new glycoside indole monoterpene alkaloid isolated from *Psychotria umbellata*, was investigated in models of anxiety, depression, memory, tremor and sedation related to 5-HT and/or GABA neurotransmission. The GABA antagonist picrotoxin and the 5-HT<sub>2</sub> antagonist ritanserin were used to examine the role of GABA and 5-HT<sub>2</sub> receptors in psychollatine-induced effects. In the light/dark and hole-board models of anxiety, diazepam (0.75 mg/kg) and psychollatine (7.5 and 15 mg/kg) showed anxiolytic-like effect at doses that do not increase sleeping time nor alter spontaneous locomotor activity. The anxiolytic effect of psychollatine was prevented by prior administration of ritanserin, but not of picrotoxin, indicating that 5-HT<sub>2</sub> but not GABA receptors are implicated. In the forced swimming model of depression, psychollatine (3 and 7.5 mg/kg) effects were comparable to the antidepressants imipramine (15 mg/kg) and fluoxetine (20 mg/kg). Psychollatine suppressed oxotremorine-induced tremors in all doses. In the step-down learning paradigm, diazepam (0.85 mg/kg), MK-801 (0.15 mg/kg) and psychollatine 100 mg/kg impaired the acquisition of learning and memory consolidation, without interfering with retrieval. It is concluded that psychollatine is a bioactive alkaloid and that its effects at the central nervous system involve serotonergic 5HT<sub>2A/C</sub> receptors.

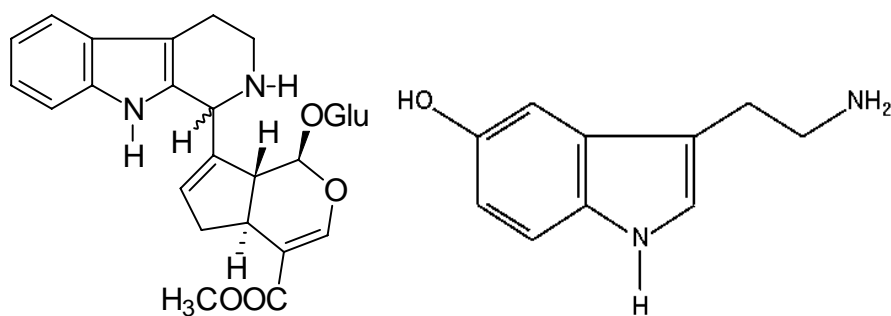
## Introduction

Since its discovery over 50 years ago, serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) has been a long-standing target of intense research, in both academia and the pharmaceutical industry<sup>1</sup>. Current efforts focus on the identification of more potent and selective ligands for different receptor subtypes, aiming to enhance drug treatments with fewer side effects for a variety of disorders<sup>2</sup>, as well as understanding the diverse role of serotonin in the fine-tuning of various body functions. 5-HT has been shown to have a multitude of different physiological actions, and this is not surprising given the nature of the 5-HT neuronal system and the variety of different 5-HT receptors<sup>1</sup>. Currently, seven families of 5-HT receptors have been recognized<sup>2</sup>.

While early research on 5-HT was focused on its functions in peripheral tissues, a large proportion of current research exploit 5-HT pharmacology for therapeutic benefit associated with CNS functions<sup>1</sup>. 5-HT neurons originate in the hindbrain in a relatively circumscribed area, but send projections to most parts of the brain<sup>3</sup>. Furthermore, 5-HT is known to interact with other neurotransmitter systems, the literature being particularly rich regarding interactions between 5-HT and dopamine, and 5-HT and glutamate systems<sup>4,1</sup>.

The discovery of the selective 5-HT reuptake inhibitors represented an incremental step in the development of antidepressant drugs, and they are now the drugs of choice in treating depression<sup>1</sup>. Moreover, it has been long accepted that the regulation of fear and anxiety is strongly associated with the central  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) and serotonergic (5-HT) systems<sup>5</sup>. A substantial amount of data has been accumulated on the role of various serotonin receptor subtypes in anxiety. Anxiolytic-like effects of drugs targeting serotonin 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2C</sub> receptors have been revealed by conditioned procedures as well as ethological-based models<sup>6</sup>. Antagonism of the 5-HT<sub>3</sub> receptor also induces anxiolytic effects in various models of anxiety, and selective 5-HT<sub>3</sub> antagonists such as ondansetron and zacopride have anxiolytic profiles in rodents and potential clinical application in the treatment of generalized anxiety and panic disorders<sup>7,8</sup>. Recently, however, the significance of other neurotransmitter systems (such as cholinergic, dopaminergic and glutamatergic) in modulating emotional behavior has received attention<sup>9</sup>.

Serotonergic projections arising from the raphe nuclei innervate limbic (amygdala and hippocampus) and cortical areas known to be involved with cognition and processing of emotional events<sup>10</sup>. 5-HT<sub>1</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors are present in areas associated with learning and memory processes<sup>11,12</sup>, although there is no consensus on the effects of enhancing or lessening serotonergic activity on mnemonic processes; differences in tasks and receptor sub-types appear to be relevant for any given outcome<sup>10, 11,12, 13</sup>.



Psychollatine

5-hydroxytryptamine (serotonin)

Psychollatine (formerly known as umbellatine) is an indol-monoterpene alkaloid (isolated from *Psychotria umbellata* Vell., Rubiaceae) structurally related to serotonin. The present study was undertaken to further investigate the psychopharmacological profile of psychollatine, by using the mouse light/dark and hole-board models, forced swimming test, step-down inhibitory avoidance and oxotremorine-induced tremors. Locomotion, barbiturate sleeping time and anticonvulsant activity (PTZ) were also examined. The role of 5-HT and GABA receptors in psychollatine mode of action were further evaluated.

## Results and Discussion

In evolutionary terms, 5-HT is one of the oldest neurotransmitters and has been implicated in the etiology of numerous disease states<sup>2</sup>. Serotonin has been implicated in the regulation of nociception, motor behavior, endocrine secretions, cardiovascular function, appetite, as well as in several psychiatric and neurological disorders<sup>14</sup>. Furthermore, 5-HT has been suggested to play a significant role in cognitive processes<sup>11, 15</sup>.

The 5-HT<sub>1A</sub> and 5HT<sub>2A/C</sub> receptor subtypes are especially relevant in this discussion, given its implication in both anxiety and depression<sup>14, 16</sup> as well as with learning and memory processes<sup>12</sup>.

Diverse physiological and behavioral effects consequent to the stimulation of 5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>2A/C</sub> receptors have been reported<sup>11</sup>; for instance ritanserin, a non-selective 5-HT<sub>2A/2C</sub> receptor antagonist, was shown to be effective in improving several anxiety disorders, including panic and generalized anxiety<sup>17</sup>. Increased 5-HT activity in the brain (e.g., through agonists RU-24969 and *m*CPP) has been shown to induce spatial learning deficits, while decreased activity (e.g., antagonists ketanserin and ritanserin) improve consolidation of spatial discrimination, suggesting that drugs that stimulate or block the 5-HT<sub>1B</sub> and/or 5-HT<sub>2A/2C</sub> receptors impaired or enhanced spatial learning, respectively<sup>11</sup>. Nevertheless, ritanserin and mianserin were shown to be prejudicial in conditioned eye blink in rabbits<sup>18</sup>, while ritanserin impaired elevated T-maze inhibitory avoidance in rats<sup>19</sup>, suggesting differential roles of serotonin receptors in diverse learning paradigms.

*Hole-board:* The hole-board model is used to identify and evaluate the anxiolytic/anxiogenic properties of drugs<sup>20</sup>. As expected diazepam 0.75 mg/kg increased the number of head-dips ( $F_{(2,50)} = 51.14$ ;  $P \leq 0.01$ ), crossings ( $F_{(2,50)} = 89.93$ ;  $P \leq 0.01$ ) and rearings ( $F_{(2,50)} = 10.91$ ;  $P \leq 0.01$ ) (Fig. 2a, 2b and 2c respectively). Psychollatine 7.5 and 15 mg/kg also increased the number of head-dips ( $F_{(5,85)} = 30.73$ ;  $P \leq 0.01$ ), crossings ( $F_{(5,85)} = 17.57$ ;  $P \leq 0.01$ ) and rearings ( $F_{(5,85)} = 12.99$ ;  $P \leq 0.05$ ) (Fig. 1a, 1b and 1c respectively). The highest psychollatine dose (200 mg/kg) significantly reduced the number of head-dips and crossings ( $P \leq 0.01$ ) (Fig. 1a and 1b). None of the treated groups significantly differed from controls regarding latency to the first head-dip (data not shown). Pre treatment with picrotoxin reversed the effects of diazepam (Fig. 2a, 2b and 2c) but not those of psychollatine in this model; pre treatment with ritanserin reversed the effects of psychollatine on head-dips ( $F_{(2,27)} = 20.52$ ;  $P \leq 0.01$ ), crossings ( $F_{(2,27)} = 8.12$ ;  $P \leq 0.01$ ) and rearings ( $F_{(2,27)} = 6.27$ ;  $P \leq 0.01$ ) (Fig. 2a, 2b and 2c).

Figure 1a

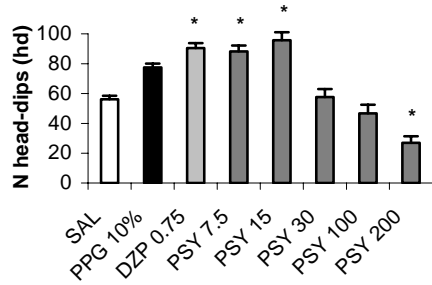


Figure 1b

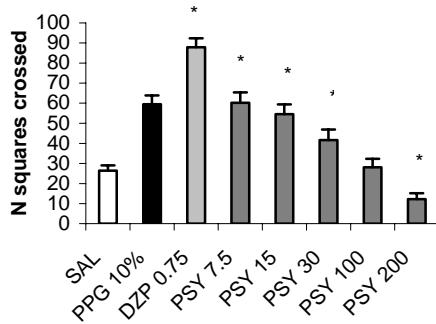
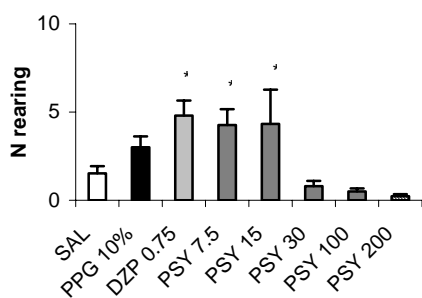


Figure 1c



**Figure 1.** Effects of psychollatine in the hole-board test. Number of head-dips (a), number of squares crosses (b) and number of rearings (c). SAL, saline; PPG 10%, propylene glycol 10%; DZP 0.75, diazepam 0.75 mg/kg; PSY 7.5, 15, 30, 100 and 200, psychollatine 7.5, 15,

30, 100 and 200 mg/kg. Each column represents the mean  $\pm$  SEM (N = 15). ANOVA \* =  $P < 0.05$  and \*\* =  $P < 0.01$  compared with controls.

Figure 2a

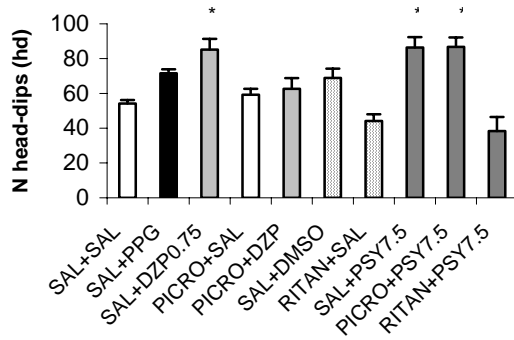


Figure 2b

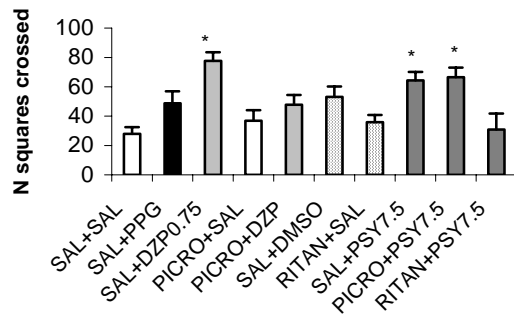
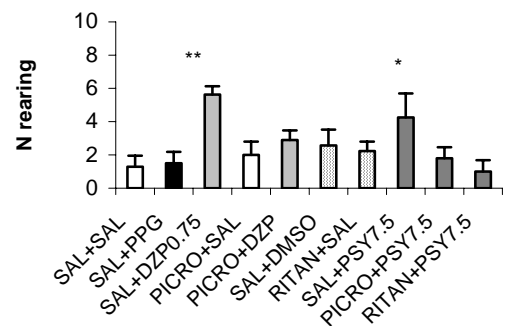


Figure 2c



**Figure 2.** Effects of psychollatine and antagonists (picrotoxin and ritanserin) in the hole-board test. Number of head-dips (a), number of squares crosses (b) and number of rearings (c). SAL, saline; PPG, propylene glycol 10%; DMSO, Dimethyl sulphoxide; DZP 0.75, diazepam 0.75 mg/kg; PSY 7.5, psychollatine 7.5 mg/kg; PICRO, picrotoxin 1 mg/kg; RITAN, ritanserin 2 mg/kg. Each column represents the mean  $\pm$  SEM (N = 8-14). ANOVA \* =  $P < 0.05$  and \*\* =  $P < 0.01$  compared with controls.

Results from hole-board show that diazepam and psychollatine have a clear and consistent effect (increased number) on head-dipping behavior (the key parameter), at doses that did not produce sedation. The effects of diazepam were prevented by pre treatment with the GABA antagonist picrotoxin, whereas the effects of psychollatine were antagonized by the 5HT<sub>2A/C</sub> antagonist ritanserin.

*Light-dark model:* The light/dark model is a widely accepted animal model of anxiety<sup>21</sup>. Diazepam 0.85 mg/kg significantly lengthened ( $F_{(2,60)} = 12.14, P \leq 0.01$ ) the time spent in the lighted compartment, as well as the latency ( $F_{(2,60)} = 16.86, P \leq 0.01$ ) to the first entry in the dark compartment (Fig. 3a and 3b). Likewise, psychollatine 7.5 mg/kg increased the time ( $F_{(5,114)} = 6.51, P \leq 0.05$ ) spent in the light area, and the latency ( $F_{(5,114)} = 11.64, P \leq 0.01$ ) to the first entry in the dark compartment (Fig. 3a and 3b). No significant differences were seen in the number of transitions between compartments among the various groups (data not shown). Pre treatment with picrotoxin reversed the effects of diazepam, but not those of psychollatine (Fig. 4a and 4b). Pre treatment with ritanserin reversed the effects of psychollatine on the time spent in the light area ( $F_{(2,22)} = 7.45; P \leq 0.01$ ) and the latency to the first entry in the dark compartment ( $F_{(2,22)} = 2.32, P \leq 0.05$ ) (Fig. 4a and 4b).

Figure 3a



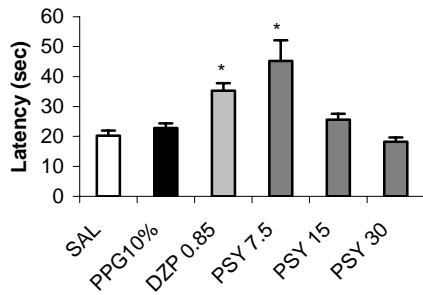
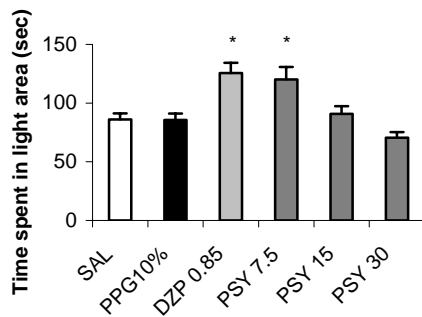


Figure 3b



**Figure 3.** Effects of diazepam and psychollatine on the behavior of mice in the light-dark test. Latency of the first entry (a) and the amount of time spent by mice in the light area (b). SAL, saline; PPG, propylene glycol 10%; DZP 0.85, diazepam 0.85 mg/kg; PSY 7.5,15 and 30; psychollatine 7.5, 15 and 30 mg/kg. Each column represents the mean  $\pm$  SEM (N = 19-22). ANOVA \* =  $P < 0.05$  and \*\* =  $P < 0.01$  compared with controls.

Figure 4a

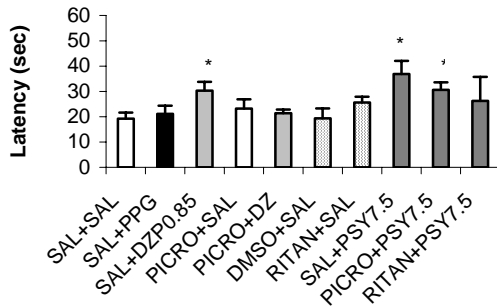
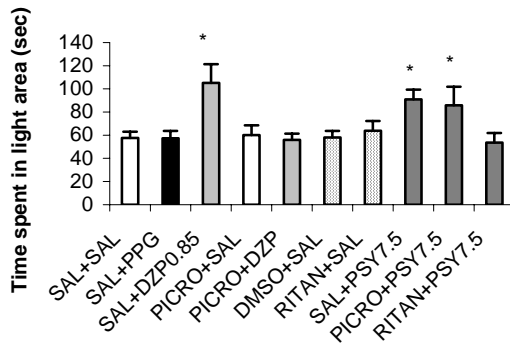


Figure 4b

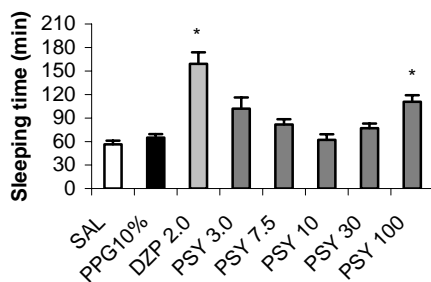


**Figure 4.** Effects of diazepam and psychollatine on the behavior of mice in the light-dark test with antagonists. Latency of the first entry (a) and the amount of time spent by mice in the light area (b). SAL, saline; PPG, propylene glycol 10%; DMSO, Dimethyl sulphoxide; DZO 0.85, diazepam 0.85 mg/kg; PSY 7.5, psychollatine 7.5 mg/kg; PICRO, picrotoxin 1 mg/kg; RITAN, ritanserin 2 mg/kg. Each column represents the mean  $\pm$  SEM (N = 8-10). ANOVA \* =  $P < 0.05$  and \*\* =  $P < 0.01$  compared with controls.

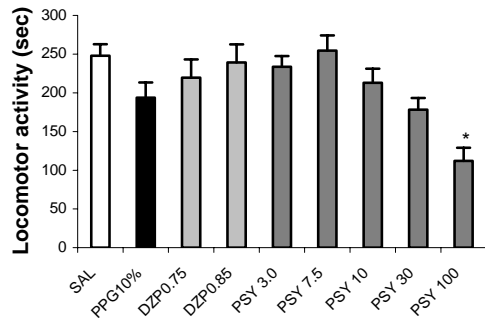
In the light/dark model, results were consistent with those obtained with hole-board. Diazepam and psychollatine behaved as anxiolytics, markedly increasing the time spent in the lit box. Again, the effects of diazepam were prevented by pre treatment with the GABA antagonist picrotoxin, whereas the effects of psychollatine were antagonized by the 5HT<sub>2A/C</sub> antagonist ritanserin. This data suggests that 5-HT<sub>2A/C</sub> receptors are involved

in the anxiolytic properties of psychollatine. This result is consistent with the fact that psychollatine and serotonin are structurally related.

*Potentiation of barbiturate sleeping time and Spontaneous locomotor activity:* In order to check distinguish anxiolytic activity from general sedation, the following experiments were conducted. Psychollatine 100 mg/kg ( $F_{(5,59)} = 6,55, P \leq 0.01$ ) and diazepam 2 mg/kg ( $F_{(2,29)} = 45.19, P \leq 0.01$ ) increased pentobarbital-induced sleeping time (Fig. 5). As can be seen in Fig 6, saline, psychollatine (3, 7.5, 10 and 30 mg/kg), diazepam (0.75 and 0.85 mg/kg) did not interfere with the spontaneous locomotion, whereas psychollatine 100 mg/kg reduced locomotion [ $F_{(5,78)} = 10.427, P < 0.01$ ].



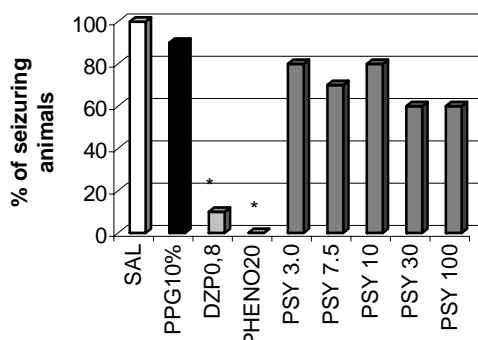
**Figure 5.** Effects of benzodiazepine (Diazepam), psychollatine, and respective vehicle (PPG and saline) on potentiation of barbiturate sleeping time. SAL, saline; PPG, propylene glycol 10%; DZP 2.0, diazepam 2 mg/kg; PSY 3.0, 7.5, 10, 30 and 100, psychollatine 3, 7.5, 10, 30 and 100 mg/kg. Each column represents the mean  $\pm$  SEM (N = 9-12). ANOVA \* =  $P < 0.05$  and \*\* =  $P < 0.01$  compared with controls.



**Figure 6.** Effects of benzodiazepine (Diazepam), psychollatine, and respective vehicle (PPG and saline) on spontaneous locomotor activity. SAL, saline; PPG, propylene glycol 10%; DZP 0.75 and 0.85, diazepam 0.75 and 0.85 mg/kg; PSY 3.0, 7.5, 10, 30 and 100, psychollatine 3, 7.5, 10, 30 and 100 mg/kg. Each column represents the mean  $\pm$  SEM (N = 9-12). ANOVA \* =  $P < 0.05$  and \*\* =  $P < 0.01$  compared with controls.

Higher doses of psychollatine induces sedative effects, including potentiation of barbiturate sleeping time (100 mg/kg), marked inhibition of spontaneous ambulation (100 mg/kg), and deficits in rota-rod performance (200 mg/kg)<sup>22</sup>. Sedative doses are distinctly separated from the anxiolytic dose-range (7.5 – 15 mg/kg).

*PTZ induced convulsions:* As can be seen at Fig. 7, 100% and 90% of control animals (saline and PPG, respectively) presented seizures within 60 min after PTZ treatment. Both diazepam 0.8 mg/kg (10%,  $P \leq 0.05$ ) and phenobarbital 20 mg/kg (0 %,  $P \leq 0.05$ ) protected mice from PTZ convulsions, whereas psychollatine was devoid of effect.

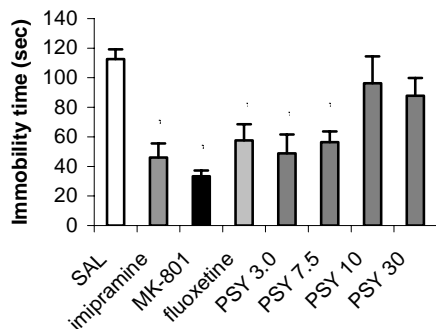


**Figure 7.** Effects of diazepam, phenobarbital and psychollatine on PTZ-induced convulsions. SAL, saline, PPG, propylene glycol 10%; DZP 0.8, diazepam 0.8 mg/kg; PHENO 20, phenobarbital 20 mg/kg, PSY 3.0, 7.5, 10, 30 and 100, psychollatine 3, 7.5, 10, 30 and 100 mg/kg. N = 10. Fischer \* =  $P < 0.05$  and \*\* =  $P < 0.01$  compared with controls.

The facts that psychollatine does not behave as anticonvulsant against pentylenetetrazole, nor has its anxiolytic effects altered by pre treatment with picrotoxin, suggest that GABA receptors do not play a significant role in the behavioral effects of psychollatine.

As discussed above, in addition to anxiety, the serotonergic system has been implicated in the modulation of depression<sup>14,16</sup> and cognition<sup>11,12, 15</sup>. Consequently, psychollatine effects were evaluated in the following relevant models.

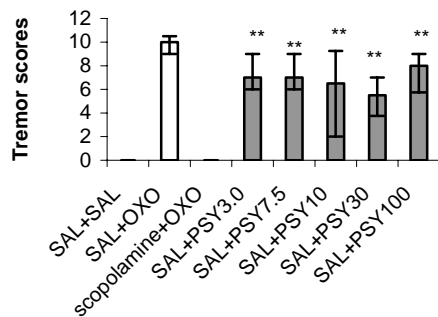
*Forced swimming test:* Psychollatine at doses of 3 ( $48.88 \pm 12.73$  s) and 7.5 mg/kg ( $56.41 \pm 7.22$  s) significantly ( $P < 0.05$ ) decreased the duration of immobility when compared with saline ( $112.53 \pm 6.73$  s). Higher doses (10 and 30 mg/kg) of psychollatine were devoid of effect. MK-801 0.15 mg/kg ( $33.36 \pm 3.94$  s), imipramine 15 mg/kg ( $46.05 \pm 9.43$  s) and fluoxetine 20 mg/kg ( $57.61 \pm 10.88$  s) also reduced ( $P < 0.05$ ) the duration of immobility (Fig. 8).



**Figure 8.** Effects of imipramine, fluoxetine, MK-801 and psychollatine on time of immobility in forced swimming test. PSY 3.0, 7.5, 10 and 30= psychollatine 3, 7.5, 10 and 30 mg/kg. Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. (N=10). ANOVA\* =  $P < 0.05$  compared with saline.

Psychollatine (at doses that do not affect locomotion), as well as fluoxetine and imipramine, significantly reduced the total duration of immobility in the forced swimming test in mice, commonly used to predict clinical efficacy of several antidepressants<sup>23</sup>.

*Oxotremorine-induced tremors:* Oxotremorine is a potent muscarinic agonist, and its tremorigenic activity seems to be primarily mediated through central cholinergic stimulation<sup>24</sup>. Psychollatine at 3 mg/kg (7 [6-9]), 7.5 mg/kg (7 [6-9]), 10 mg/kg (6.5 [2-9.25]), 30 mg/kg (5.5 [3.75-7]) and 100 mg/kg (8[5.75-9]), and scopolamine 3 mg/kg (0 [0-0]) suppress tremors in oxotremorine-treated mice when compared with saline (10 [9-11.5]). The effect of psychollatine was not dose-dependent (Fig. 9).

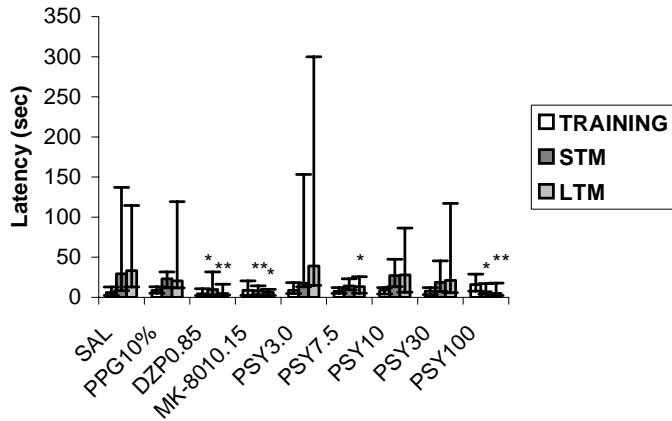


**Figure 9.** Effects of scopolamine and psychollatine on the oxotremorine-induced tremor. Scopolamine 3 mg/kg; OXO, oxotremorine 0.5 mg/kh; PSY 3.0, 7.5, 10, 30 and 100, psychollatine 3, 7.5, 10, 30 and 100 mg/kg. Each column represents the median (interquartile ranges) of training (light columns) or test (dark columns) session latencies \*\*  $P < 0.01$  significant difference compared with saline + oxotremorine in Mann-Whitney U test, following Kruskal-Wallis.

*Step-down inhibitory avoidance:*

*Short term memory (STM):* Diazepam 0.85 mg/kg (9.65 s[3.05-31.55]), MK-801 0.15 mg/kg (8.4 s[2.85-14.32]) and only the higher psychollatine dose (100 mg/kg) (6.8 s[3.85-17]) significantly reduced ( $P < 0.01$ ) the latency during aquisition testing when compared with saline (29.2 s[8.4-137]) (Figure 10a). When tested for effects in memory retention diazepam 0.85 mg/kg (8.3 s[7.2-15.5]), MK-801 0.15 mg/kg (16.5 s[8.2-22.6]) and psychollatine 3 mg/kg (11.8 s[5-21.9]), 7.5 mg/kg (9.6 s[4.45-19.37]), 10 mg/kg (11.55 s[4.87-19.92]) and 30 mg/kg (12.8 s[4.47-34.17]) also caused a significant ( $P < 0.01$ ) reduction in step-down latency when compared with saline (21.4 s[12.3-80]) (Figure 10b). No one treatment induced differences in retrieval (data not shown).

Figure 10a

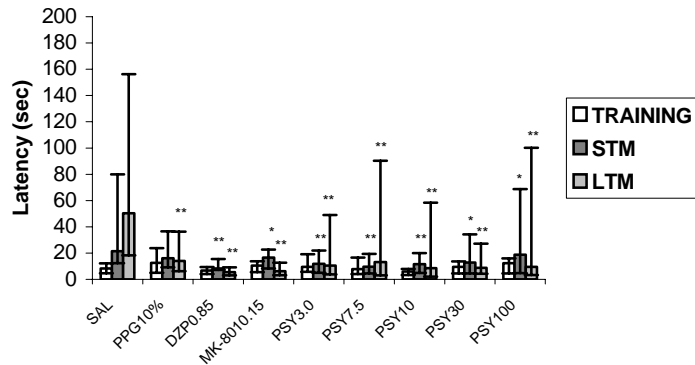


**Figure 10.** Effect of psychollatine given *ip* 30min prior to training (A) and immediately posttraining (B) on test performance of adult mice trained in step-down inhibitory avoidance (0.3mA footshock, 24h training-test interval). N=20 per group. Each column represents the median (interquartile ranges) of training (light columns) or test (dark columns) session latencies, for long term memory (LTM) and short term memory (STM).\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  significant difference compared with controls in Mann-Whitney U test, following Kruskal-Wallis.

*Long term memory (LTM):* Diazepam 0.85 mg/kg (4.75 s[3-16.32]), MK-801 0.15 mg/kg (6 s[2.42-9.95]) and psychollatine 7.5 mg/kg (13.4 s[5.12-25.72] and 100 mg/kg (5 s[2.3-17.57]) significantly reduced ( $P < 0.01$ ) the latency during acquisition testing when compared with saline (33.2 s[13-114.6]) (Figure 10a). When tested for effects in memory retention diazepam 0.85 mg/kg (5.4 s[3-9.10]), MK-801 0.15 mg/kg (6.2 s[3.1-12.70]) and psychollatine 7.5 mg/kg (13.1 s[3.02-90.325]) and 100 mg/kg (9.5 s[3.225-100.175]) also caused a significant ( $P < 0.01$ ) reduction in step-down latency when compared with saline (50.3 s[18.20-156.3]) (Figure 10b). No differences in retrieval were found after treatments data not shown).



Figure 10b



It has been suggested that cross talk between central serotonergic and cholinergic systems play a critical role in mnemonic processes<sup>13</sup>. The hippocampal cholinergic tone may be modulated via 5-HT<sub>1A</sub> receptor, the serotonin 5-HT<sub>1A</sub> agonist 8-OH-DPAT stimulates the release of acetylcholine in the hippocampus<sup>25</sup>, and fluoxetine reverses scopolamine-induced cognitive deficit<sup>11</sup>. Several reports have indicated that tricyclic antidepressants, including clomipramine and imipramine, as well as selective serotonin reuptake inhibitors, like paroxetine, inhibit oxotremorine-induced tremor<sup>26</sup>, and this anticholinergic activity may be responsible for the antidepressants unwanted side effects in memory<sup>27</sup>. The overall effect of agents that primarily interfere with serotonergic receptors on the cholinergic system is, therefore, intricate. In the case of psychollatine, its effects on oxotremorine-induced tremors and memory suggest an overall depression of cholinergic transmission. The possibility that psychollatine-induced amnesia is the result of its modulation of serotonin per se can not be ruled out at this point.

It has been accepted that changes in the serotonergic transmission can interfere with learning acquisition and memory consolidation; in fact, the brain structures implicated in learning and memory processes contain a large number of 5-HT receptors, as well as other neurotransmission systems<sup>28</sup>. Tricyclic antidepressants such as imipramine and amitryptiline, but not the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine, have been reported to induce amnesia in passive avoidance and maze performance in mice<sup>26</sup>. In this study psychollatine impaired acquisition and consolidation memory processes in the step-down inhibitory avoidance, without affecting memory retrieval. This pattern is

compatible with those obtained with 5-HT agonists<sup>11</sup> and antagonists<sup>19</sup>, muscarinic antagonists<sup>29</sup>, and NMDA glutamate antagonists<sup>30</sup> as described in many studies. The data here presented suggest that psychollatine interferes with serotonergic transmission and possibly with the cholinergic systems. Considering the previously reported analgesic effect of psychollatine in the capsaicin model, and its synergism with MK-801, a potential role of NMDA receptors in psychollatine amnesic effect has to be taken into account<sup>22</sup>.

Complete pictures of the molecular mechanism underlying the effects of psychollatine as anxiolytic, antidepressive and amnesic remain to be elucidated. However, this study adds to the idea that the indole monoterpene alkaloid psychollatine deserves further investigation as a useful template to develop selective sub-types ligands for 5-HT receptors.

## **Experimental Section**

### **General Experimental Procedure**

Diazepam, sodium pentobarbital, ritanserin, picrotoxin, phenobarbital and propylene glycol (PPG) were acquired from Sigma; dimethyl sulphoxide (DMSO) from Delaware; pentylenetetrazol (PTZ) from Knoll A.G-Ludwingshafen/Rheno; MK-801 was acquired from RBI. Drugs and vehicles were administered intraperitoneally, except for PTZ given subcutaneously, always as 0.1 mL/ 10g of body weight. Diazepam (0.75, 0.85 and 2 mg/kg) was suspended in propylene glycol 10% (v/v). Ritanserin (2.0 mg/kg) was suspended in DMSO 10% (v/v). Psychollatine (3, 7.5, 10, 30, 100 and 200 mg/kg) was solubilized in one or a few drops (20-60 µL) of HCl (1N), the final volume completed with saline and the pH adjusted (7.0) with a few drops of NaOH (1N). Sodium pentobarbital (40 mg/kg), PTZ (88 mg/kg), phenobarbital (20 mg/kg), picrotoxin (1.0 mg/kg), MK-801 (0.15 and 0.25 mg/kg), scopolamine (3 mg/kg) and oxotremorine (0.5 mg/kg) were diluted in saline. Control groups received saline (NaCl 0.9%), PPG (10%) or DMSO (10%) as appropriate.

*Psychotria umbellata* Vell.(Rubiaceae) leaves were collected and identified by Gert Hatchbach, in February 1995; a voucher (MBM 48571) has been deposited at the herbarium of the Museu Botânico Municipal de Curitiba (PR, Brazil).

Dried leaves (100g) were extracted with EtOH at room temperature 3-times, each for a week. The extract was concentrated under vacuum at 40°C to a dark green syrup. The syrup

was dissolved in HCl 2% (0.5L) and partitioned with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The acid solution was alkalinized with NH<sub>4</sub>OH 25% until pH = 10 and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. From the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extract 954 mg of a colorless amorphous compound was precipitated. Purity of the compound was checked by TLC with silica gel 60F254 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH/NH<sub>3</sub> vapor - 85:15 - R<sub>f</sub> = 0.2) and HPLC (column: NOVAPACK C18 150 mm x 3.9 mm - Waters; MeOH:H<sub>2</sub>O - 50:50 as eluent and a Photo Diode Array as detector; R<sub>t</sub> = 2.13 min).

*Animals.* Experiments were performed with male adult mice (CF1), acquired from Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) with 2 months of age. Animals were maintained in our own facilities (22°±1°C, 12 h light/dark cycle, free access to food [Nuvilab CR1] and water) for at least two weeks before experiments. All procedures were carried out according to institutional policies on experimental animal handling.

*Hole-board model.* The hole-board apparatus (Ugo Basile, Italy) consisted of a grey Perspex panel (40x40x40 cm, 2.2 cm thick) with 16 equidistant holes (3 cm in diameter) in the floor. Photocells below the surface of the holes provided measures of the number of head-dips. The board was positioned 15 cm above the table and divided (with black water-resistant marker) in 16 squares of 10x10 cm. The method was adapted from Takeda *et al.* (1998)<sup>20</sup>. Mice were transported to the dimly lit laboratory at least 1 h prior to testing. The animals were divided into ten groups (N = 15) and treatments (saline, PPG, DMSO, diazepam and psychollatine) administered intraperitoneally 30 min prior to the testing. After 30 min each animal was individually placed in the center of the board (facing away from the observer) and the following parameters were noted for 5 min: the latency to the first head-dip measured using a stopwatch; number of head-dips; the number of rearings and spontaneous movements (number of squares crossed with all four paws). To verify the influence of the different receptors, the antagonists ritanserin and picrotoxin were administered 30 min before psychollatine (7.5mg/kg). Statistical analysis involved an initial one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Student Newman Keuls (SNK) test.

*Light/dark model.* This model of anxiety was based on that described by Misslin *et al.* (1989)<sup>31</sup> and consists of an open-topped rectangular box (48 x 29 x 46 cm high), divided into a small (19 x 29 cm) and a large (29 x 29 cm) area. The mice could move from one box

to the other through an open door ( 7 x 7 cm) between the two boxes. The small compartment was painted black and provided only with room illumination, whereas the larger compartment was painted white and brightly illuminated with a 60-W (400lx) light source. Mice were transported to the experimental room, lit by a single dim red light, at least 1 h prior to testing. The animals were divided into ten groups (N = 8-15) and treatments (saline, PPG, DMSO, diazepam and psychollatine) administered intraperitoneally 30 min prior to testing. After 30 min each animal was individually placed in the center of the illuminated box, facing the entrance to the dark box and the following parameters were noted for 5 min: the latency of the first crossing, the amount of time spent in the light area, and total number of crossings from one compartment to the other. To verify the influence of the different receptors, ritanserin and picrotoxin were administered 30 min before psychollatine (7.5mg/kg). Statistical analysis involved an initial one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Student Newman Keuls (SNK) test.

*PTZ induced convulsions.* Mice were divided in five groups (n=10) and test drugs (saline, PPG, diazepam, phenobarbital and psychollatine) were given IP. After 30 min mice received PTZ (88 mg/kg s.c.). Following PTZ injection, animals were individually placed in transparent acrylic chambers (20 x 20 x 20 cm) and observed during 60 minutes for the presence of clonic convulsions lasting more than 3 seconds<sup>32</sup>. Data was analysed through the Fisher's exact test.

*Potentiation of barbiturate sleeping time.* Thirty minutes after treatment with saline, PPG, diazepam and psychollatine (3 - 100 mg/kg) groups of eight mice (N=9-12) were treated IP with 40 mg/kg of sodium pentobarbital. The sleeping time (time elapsed between loss and recuperation of righting reflex) was recorded. The adopted criterion for recuperation of righting reflex was that animals have to regain their normal posture for three consecutive times when challenged to remain on their backs<sup>33</sup>. Statistical analysis involved an initial one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Student Newman Keuls (SNK) test.

*Spontaneous locomotor activity.* The method was adapted from Creese *et al.* (1976)<sup>34</sup>. Activity cages (Albarsch Electronic Equipment, 45 x 25 x 20 cm) equipped with 3 parallels photocells automatically record number of crossings. Animals were individually habituated to an activity cage for 10 minutes before receiving the following treatments (n=10-16):

saline, psychollatine (3 - 100 mg/kg) and diazepam (0.75 and 0.85 mg/kg). 30 minutes after treatments the animals returned to the activity cages and crossings were recorded for 15 min. Statistical analysis involved an initial one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Student Newman Keuls (SNK).

*Forced swimming test.* We followed the method of Porsolt et al (1977)<sup>23</sup> as modified by Sunal et al. (1994)<sup>35</sup>. Mice were individually forced to swim in an open cylindrical container (diameter 30 cm, height 25 cm), containing 20 cm of water at  $25 \pm 1$  °C for 6 min. The duration of immobility was recorded during the last 4 min of the 6 min testing period. After vigorous activity, swimming attempts cease and the animal adopts a characteristic immobile posture. A mouse is judged to be immobile when it floats in an upright position and makes only small movements to keep its head above water. At the end of the session mice were removed and dried with a towel. Statistical analysis involved an initial one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Student Newman Keuls (SNK) test.

*Oxotremorine-induced tremors.* Saline, scopolamine and psychollatine (3, 7.5, 10, 30 and 100 mg/kg) were administered i.p. to mice 30 minutes before an oxotremorine (0.5 mg/kg) injection. For observation, mice were individually placed in transparent acrylic cages (20 x 20 x 20 cm) immediately after oxotremorine administration; tremors was scored visually at 5 min intervals for 30 min using the following a rating scale: 0 = no tremors, 1 = intermittent moderate tremors, and 2 = continuous severe tremors. Data is expressed as the total sum scores obtained in 30 min<sup>36</sup> and are expressed as median (interquartile ranges). Data were analyzed by Kruskal-Wallis non-parametric analysis of variance; comparisons between groups were run using Mann-Whitney U-test (two-tailed).

*Step-down inhibitory avoidance.* The test used was adapted from Netto and Izquierdo (1985)<sup>37</sup> and from Maurice et al. (1994)<sup>29</sup>. Mice were habituated in the dim lighted room for at least 30 minutes before the experiments. The inhibitory avoidance training apparatus was a plastic box with 30 x 30x 40cm, with a platform (5 x 5 x 4 cm) fixed in the center of the grid floor. Each mouse was placed on the platform and the latency to step-down (four paws on the grid), was automatically recorded in training and test sessions. In the training session, the mouse received a 0.3 mA scrambled foot shock for 15 s, upon stepping down. Animals exhibiting step down latencies greater than 30 s in training were excluded from

experiments; less than 5% of the animals met this exclusion criterion. The test session was performed 24h later, with the same procedure except that no shock was administered after stepping down; an upper cut-off time of 300 s was set.

Drugs (saline, PPG 10%, MK-801, diazepam or psychollatine) were administered intraperitoneally (*ip*) as follows: 30 min before training, to evaluate effects on task acquisition (in this case no exclusion criteria was applied); immediately after training, to evaluate effects on memory consolidation and 30 min before testing, to assess memory retrieval. The step-down latencies are expressed as median (interquartile ranges). Data were analyzed by Kruskal-Wallis non-parametric analysis of variance; comparisons between groups were run using Mann-Whitney U-test (two-tailed). Comparisons between training and test sessions within each group were made by the Wilcoxon test. Spearman-rank correlation coefficient was used to check dose-effect associations.

### **Acknowledgements**

This study was supported by grants from CNPq (EE, ATH and FLB), and financial support from CNPq and PROPESQ.

### **References and Notes**

- (1) Jones, B.; Blackburn, T. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2002**, 71, 555-568.
- (2) Hoyer, D.; Hannon, J.P.; Martin, G.R. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2002**, 71, 533-554.
- (3) Azmitia, E.C.; Whitaker-Azmitia P.M. *J. Clin. Psychiatry.* **1991**, 52(12), 4-16.
- (4) Costa-Campos, L.; Dassoler, S.C.; Rigo, A.P.; Iwu, M.; Elisabetsky, E. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2004**, 77(3), 481-489.
- (5) File, S.E. *Neuropharmacol.* **1987**, 26(7B):877-886.
- (6) Bourin, M.; Dhonnchadha, B.A.N.; Colombel, M.C.; Hascoët, M.; et al. *Behav. Brain Research.* **2001**, 124, 87-95.
- (7) Kelley, S.P.; Bratt, A.M.; Hodge, C.W. *Eur. J. Pharmacol.* **2003**, 461, 19-25.
- (8) Freeman, III.A.M.; Westphal, J.R.; Norris, G.T.; Roggero, B.A. *Depress. Anxiety.* **1997**, 5, 140-141.
- (9) Nakamura, K.; Kurasawa, M. *Eur J Pharmacol* **2001**, 420:33-43.
- (10) Misane, I.; Ögren, S.O. *Neuropsychopharmacology.* **2000**, 22(2), 168-190.
- (11) Meneses, A.; Hong, E. *Behav. Brain Res.* **1997**, 87, 105-110.

- (12) Khalifa, E. A. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2003**, 75, 755-762.
- (13) Solana-Figueroa, R.; Salado-Castillo, R.; Quirarte, L.G.; Galindo, E.L.; Prado-Alcalá A.R. *Life Sci.* **2002**, 71, 391-399.
- (14) Beneytez, M.E.; López Rodríguez, M.L.; Rosado, M.L.; Morcillo, M.J.; et al. *Eur. J. Pharmacol.* **1998**, 344, 127-135.
- (15) Liang, K.C. *Eur. J. Neurosci.* **1999**, 11, 1491-1500.
- (16) Fletcher, A.; Forster, E.A.; Bill, D.J.; Brown, G.; et al. *Behav. Brain Res.* **1996**, **73**, 337-353.
- (17) Celeumans, D.L.; Hoppenbrouwers, M.L.; Gelders, Y.G. and Reyntjens, A.J. *Pharmacopsychiatry.* **1985**, 18, 303-305.
- (18) Harvey, J.A. *Learn. Mem.* **2003**, 10, 355-362.
- (19) Zangrossi Jr., H.; Viana, M.B.; Zanoveli, J.; Bueno, C.; Nogueira, R.L.; Graeff, F.G. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2001**, 25, 637-645.
- (20) Takeda, H.; Tsuji, M.; Matsumiya, T. *Eur. J. Pharmacol.* **1998**, 350, 21-29.
- (21) Gard, P.R.; Haigh, S.J.; Cambursano, P.T.; Warrington, C.A. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2001**, 69, 35-40.
- (22) Both, F.L.; Kerber, V.A.; Henriques, A.T.; Elisabetsky, E.. *Pharmaceutical Biol.* **2002**, 40(5), 336-341.
- (23) Porsolt, R.D.; Bertin, A.; Jalfre, M. *Archives Internationales de Pharmacodynamic et de Theroapie.* **1977**, 229, 327-336.
- (24) Fukuzaki, K.; Kamenosono, T.; Nagata, R. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2000**, 65(3), 503-508.
- (25) Lazaris, A.; Bertrand, F.; Lazarus, C.; Galani, R.; Stemmelin, J.; Poirier, R.; Kelche, C.; Cassel, J-C. *Brain Res.* **2003**, 967, 181-190.
- (26) Fujishiro, J.; Imanishi, T.; Onozawa, K.; Tsushima, M. *Eur. J. Pharmacol.* **2002**, 454, 183-188.
- (27) Jain, N.N.; Ohal, C.C.; Shroff, S.K.; Bhutada, R.H.; Somani, R.S.; Kasture, V.S.; Kasture, S.B. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2003**, 75, 529-536.
- (28) Breese, R.G.; Knapp, J.D.; Moy, S.S. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2002**, 26, 441-455.
- (29) Maurice, T.; Hiramatsu, M.; Itoh, J.; Kameyama, T.; Hasegawa, T.; Nabeshima, T. *Brain Res.* **1994**, 647, 44-56.

- (30) Hlinák, Z.; Krejčí, I. *Behav. Brain Res.* **2002**, 131, 221-225.
- (31) Misslin, R.; Belzung, C.; Vogel, E. *Behav. Process.* **1989**, 8, 119-132.
- (32) Clark, C.R. *Epilepsia.* **1988**, 29, 198-203.
- (33) Yamamoto, I.; Kimura, T.; Tateoka, Y.; Watanabe, K.; Kang Ho, I. *Life Sci.* **1987**, 41, 2791-2797.
- (34) Creese, I.; Burt, D.R.; Snyder, S.H. *Science.* **1976**, 192, 481-483.
- (35) Sunal, R.; Gümüşel, B.; Kayaalp, S.O. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1994**, 49(4), 891-896.
- (36) Shuto, H.; Kataoka, Y.; Kanaya, A.; Matsunaga, K.; Sueyasu, M.; Oishi, R. *Eur. J. Pharmacol.* **1998**, 341, 33-37.
- (37) Netto, C.A.; Izquierdo, I. *Behav. Neural Biol.* **1985**, 43, 327-330.

## **4.2 Papel dos Receptores Glutamatérgicos e Dopaminérgicos no Perfil Psicofarmacológico do Alcalóide Indol-monoterpênico Psicolatina (*J. Nat. Prod.*, *in press*).**

### **4.2.1 INTRODUÇÃO**

O glutamato é um importante neurotransmissor excitatório e está envolvido não somente na transmissão sináptica rápida, mas também no desenvolvimento e manutenção de potenciais de longa duração (LTP), diretamente associados aos processos de maturação cerebral, aprendizado e memória, considerados como exemplos de plasticidade sináptica (GREENAMYRE; PORTER,



1994; LIPTON; ROSENBERG, 1994; MELDRUM, 1994; AMADIO *et al.*, 2004). Além disso, existem vários estudos implicando os receptores NMDA na patogênese dos distúrbios afetivos, como ansiedade e depressão (ADAMEC *et al.*, 1999; ROSA *et al.*, 2003), dor (PERKINS; DRAY, 1996), além de ter papel central na isquemia hipóxica, epilepsia (LATYSHEVA; RAYEVSKY, 2003) e distúrbios neurodegenerativos (Doença de Huntington, Parkinson, Alzheimer, etc; SCHWARCZ; MELDRUM, 1985).

O atual entendimento sobre a esquizofrenia admite que dopamina não é o único neurotransmissor em desequilíbrio e que outros neurotransmissores (noradrenalina, serotonina, acetilcolina, glutamato e GABA) podem contribuir significativamente na expressão deste distúrbio (CARLSSOM *et al.*, 1999). De acordo com esta observação, além das doenças neurológicas neurodegenerativas, das desordens afetivas e do desenvolvimento da epileptogênese, o sistema glutamatérgico também está envolvido na esquizofrenia. Acredita-se que a esquizofrenia tenha um componente neurodesenvolvimental, resultando em anormalidades no desenvolvimento cerebral e, particularmente, na maturação do sistema glutamatérgico (LATYSHEVA; RAYEVSKY, 2003), crucial para a sinalização axonal durante o crescimento (RAKIC *et al.*, 1994).

Pacientes esquizofrênicos apresentam acentuado déficit cognitivo, sendo que este depende, em parte, da plasticidade neuronal mediada pelos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (DAW *et al.*, 1993). Além disso, os receptores NMDA podem ser importantes no processo que leva a um bloqueio sináptico visto em adolescentes, idade de início da esquizofrenia (FEINBERG, 1990). Também na esquizofrenia verifica-se uma redução da matéria cinzenta em várias regiões do cérebro e tem sido sugerido que esta redução pode ser resultado da neurotoxicidade mediada pelos receptores NMDA (ZIPURSKY *et al.*, 1992).

Muitos dos comportamentos observados com antagonistas de receptor NMDA podem ser resultado do *cross talk* destes fármacos com vários sistemas neurotransmissores. Drogas antagonistas NMDA induzem um desequilíbrio dopaminérgico semelhante ao padrão visto na esquizofrenia, e isto é possível já que há uma interação entre os sistemas dopaminérgico e glutamatérgico (BRESSAN; PILOWSKY, 2003). A liberação de DA no estriado está sob influência tônica excitatória de glutamato. Foi demonstrado que o aumento dos níveis extracelulares de glutamato induzido por um bloqueador da recaptação de glutamato no núcleo acumbens produziu uma redução da liberação de DA na mesma região cerebral; sendo a redução dependente de receptores NMDA. Alguns resultados têm demonstrado que antagonistas NMDA, como PCP e MK-801, aumentam a liberação de DA no núcleo acumbens, estimulam a atividade da maioria dos neurônios dopaminérgicos mesolímbicos dentro da área tegmental ventral (RADA *et al.*, 2003).

Antagonistas não competitivos do receptor NMDA, tal como MK-801, produzem hiperatividade locomotora, comportamento estereotipado e ataxia em roedores. Tanto a hiperatividade quanto o comportamento estereotipado podem ser abolidos por depleção de DA das vesículas neuronais por reserpina ou pela administração de antagonistas dopaminérgicos, indicando que os principais efeitos comportamentais de MK-801 são dependentes de DA (YAN *et al.*, 1997).

#### **4.2.2 OBJETIVOS**

Considerando as propriedades farmacológicas identificadas para psiclatina, que parecem envolver a participação de NMDA, e a importância deste receptor, este trabalho teve por objetivo investigar os efeitos de psiclatina em modelos comportamentais relacionados a receptores glutamatérgicos e dopaminérgicos.

## **Role of Glutamate and Dopamine Receptors in the Psychopharmacological Profile of the Indole Alkaloid Psychollatine**

Fernanda L. Both,<sup>†,‡</sup> Lisiane Meneghini,<sup>‡</sup> Vitor A. Kerber,<sup>§</sup> Amélia T. Henriques,<sup>†</sup> and Elaine Elisabetsky,<sup>\*†,‡</sup>

*Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, Brazil; Laboratório de Etnofarmacologia, Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, Brazil;*

*Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR, Brazil*

\*Author to whom correspondence should be addressed. Tel/Fax: 55 51 3316 3121.  
E-mail: [elaine.elisabetsky@gmail.com](mailto:elaine.elisabetsky@gmail.com)

<sup>1</sup>Dedicated to Dr. Norman R. Farnsworth of the University of Illinois at Chicago for his pioneering work on bioactive natural products.

<sup>†</sup> Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

<sup>‡</sup> Laboratório de Etnofarmacologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

<sup>§</sup> Universidade Federal do Paraná

## Abstract

Psychollatine (**1**), a new glycoside indole monoterpene alkaloid isolated from *Psychotria umbellata*, has shown an interesting psychopharmacological profile. This study aimed to investigate the role of NMDA glutamate and dopamine receptors in mediating the properties of **1**. Psychollatine (**1**) was assessed for NMDA-induced seizures, MK-801 induced hyperlocomotion, amphetamine-induced lethality, and apomorphine-induced climbing behavior in mice. Psychollatine (**1**) (100 mg/kg) and MK-801 (0.3 mg/kg) prevented NMDA-induced seizures ( $P < 0.01$ ), while **1** (100 mg/kg) attenuated the MK-801-induced hyperlocomotion ( $P < 0.05$ ). Compound **1** (3 and 10 mg/kg), as well as chlorpromazine (4 mg/kg) prevented amphetamine-induced lethality ( $P < 0.05$ ). Finally, **1** (10 mg/kg) ( $P < 0.05$ ), MK-801 (0.2 mg/kg) ( $P < 0.01$ ), and chlorpromazine (4 mg/kg) ( $P < 0.01$ ) attenuated apomorphine-induced climbing behavior. The present results strongly support the involvement of NMDA glutamate receptors in the mode of action of psychollatine (**1**).

## Introduction

There are a number of reasons to investigate drugs that modulate NMDA glutamate receptors. The role of *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamate receptors is recognized as being crucial in synaptic plasticity and long-term potentiation, neurophysiological processes thought to underlie learning and memory.<sup>1,2</sup> Additionally, a growing body of evidence suggests the antagonism of the NMDA receptor as a potential mechanism of action for anxiolytic<sup>3,4</sup> and antidepressant drugs.<sup>5-7</sup> Moreover, dizocilpine (MK-801) (a potent and selective non-competitive antagonist of NMDA receptors)<sup>8</sup> has been shown to interfere with the development of tolerance and behavioral responses induced by a variety of drugs of abuse including cocaine,<sup>9</sup> morphine,<sup>10</sup> nicotine,<sup>11</sup> diazepam,<sup>12</sup> and ethanol.<sup>13</sup> NMDA receptors have also been implicated in a variety of neuropathological conditions including ischemia, epilepsy, various neurodegenerative diseases, and psychiatric illness, including schizophrenia.<sup>2,13</sup>

Along with the older and revised dopamine (DA) hypothesis of schizophrenia, a hypoglutamatergic state is one of the major current explanatory hypotheses for the pathophysiology of this psychiatric condition.<sup>14,15</sup> The hypoglutamatergic hypothesis originated from the observation that non-competitive NMDA antagonists such as phencyclidine (PCP), ketamine, and MK-801, in elevated doses, mimic schizophrenia in volunteers, and exacerbate symptoms in schizophrenic patients.<sup>16</sup> The DA hypothesis suggests that patients with schizophrenia have elevated levels of dopaminergic neurotransmission, congruent with the observation that all drugs effective in treating schizophrenia share the common feature of blocking dopamine D<sub>2</sub> receptors to some extent.<sup>17</sup> However, the dysfunction of dopamine may occur only in a subpopulation of patients suffering from this heterogeneous disorder.

The current understanding of schizophrenia allows for the fact that dopamine is not the only malfunctioning neurotransmitter, and that other

neurotransmitters (e.g., noradrenaline, serotonin, acetylcholine, glutamate and GABA) may likewise present aberrant behavior.<sup>18</sup>

DA neurons seem to be physiologically regulated by glutamatergic neurons.<sup>15,19</sup> Systemic or local administration of PCP or MK-801 severely disrupts the afferent regulation of midbrain DA neuronal activity, and largely alters the functioning of, for instance, the mesocortical and mesolimbic DA neurons.<sup>14,18</sup> Several other studies have shown that MK-801 indirectly stimulates DA release and turnover in the brain, and such increased DA states are thought to mediate the conditioned place preference effects of MK-801;<sup>20</sup> the same reasoning would apply to the complex behavioral syndrome characterized by increased locomotion, stereotypy, and impaired motor coordination that follows MK-801 administration to rodents.<sup>21</sup> All these effects are attenuated by D<sub>1</sub> and D<sub>2/3</sub> agonists or antagonists that inhibit DAergic activity either through presynaptic or postsynaptic mechanisms.<sup>20,22</sup>

However, some studies provide data that non-dopaminergic systems mediate the actions of NMDA antagonists,<sup>23-25</sup> pointing to the involvement of neurotransmitter systems other than dopamine in the central properties of NMDA antagonists. In fact, in various brain regions, including the prefrontal cortex, the hippocampus and the raphe, NMDA antagonism stimulates serotonin (5-HT) turnover and release more consistently than the modulation of dopaminergic activity, demonstrating a close relationship of NMDA with serotonergic activity.<sup>15,18,26,27</sup> The psychotomimetic effects of NMDA antagonists can also be attenuated or blocked by partial 5-HT<sub>2A</sub> agonists, and selective 5-HT<sub>2A</sub> antagonists.<sup>8</sup> It has been proposed that NMDA antagonists induce serotonin release, which in turn activates 5-HT<sub>2A</sub> receptors on glutamatergic neurons in the cortex, resulting in glutamate release.<sup>25,27</sup> This direct link between the serotonergic and glutamatergic systems is thought to be the basis for the observed decreased sensitization to NMDA antagonists for a persistent period after cessation of chronic exposure to antipsychotics.<sup>15</sup>

The genus *Psychotria* L. (Rubiaceae) has been subjected to considerable prior chemical and pharmacological investigation, revealing the presence of bioactive alkaloids.<sup>28-31</sup> Psychollatine (formerly known as umbellatine **1**) is an indole-monoterpene alkaloid, isolated from *Psychotria umbellata* Vell. (Rubiaceae).<sup>32</sup> Psychollatine exhibits psychopharmacological activities, including mild analgesic effects against a number of algogenic stimuli,<sup>33</sup> and anxiolytic, antidepressive, and amnesic effects<sup>34</sup> in mice models; these data indicate that this compound modulates different neurotransmitter systems, including NMDA, opioid and 5-HT<sub>2A/C</sub> receptors.

The present study has further investigated the role of NMDA and dopamine receptors in the mode of action of psychollatine (**1**), through the analysis its effects on NMDA-induced seizures, MK-801-induced hyperlocomotion, apomorphine-induced climbing, and amphetamine-induced lethality in grouped mice.

## **Results and Discussion**

Newer atypical antipsychotic agents, such as clozapine, olanzapine, and risperidone, have significant effects not only on dopamine receptor subtypes, but also on serotonergic receptors (5-HT<sub>2A/C</sub>, 5-HT<sub>6</sub> and 5-HT<sub>7</sub>),  $\alpha_1$ -adrenergic, histaminergic, muscarinic, and NMDA glutamate receptors.<sup>13-15</sup> Accordingly, there is ample evidence that in addition to dopamine and serotonin receptors, other neurotransmitter systems, such as adrenergic and cholinergic, are also involved in the behavioral psychotomimetic syndrome induced by NMDA antagonists.<sup>26,35</sup> Adding to previously observed effects,<sup>34</sup> this study shows that psychollatine (**1**) interferes with behaviors known to be mediated by glutamate NMDA and dopamine central receptors.

**NMDA-induced Seizures.** Psychollatine (**1**, 100 mg/kg) and MK-801 (0.3 mg/kg) reduced the incidence of NMDA seizures. A significant delay in seizure onset was



observed only in mice treated with the intermediate dose (75 mg/kg) of **1** ( $P < 0.05$ ) (Table 1). Psychollatine 75 and 100 mg/kg, and MK-801 0.3 mg/kg, significantly protected mice from NMDA-induced fatal seizures ( $P < 0.01$ ). These results suggested a moderate but significant antagonist effect of **1** on NMDA receptors.

Table 1

Effect of psychollatine against NMDA-induced seizures

Treatment (mg/kg)+ NMDA (15C	Seizures Incidence	Seizure Latency (s)	Fatality Incidence
Saline	16/22	540±84.14	15/22
MK-801 (0.3)	7/21##	360±32.07	0/21##
Psychollatine (50)	12/22	850±115.32	9/22
Psychollatine (75)	10/20	1020±146.15*	6/20##
Psychollatine (100)	7/19##	857.14±133.34	6/19##

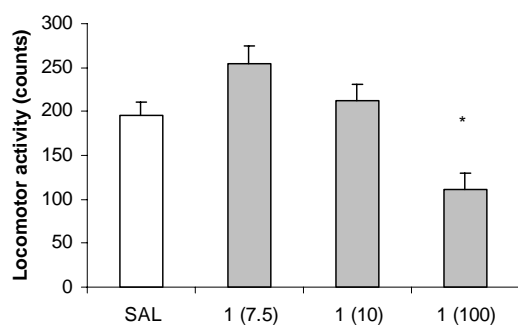
**Latencies are expressed as mean ± SE.\*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$  vs. the control group (ANOVA); ##  $P < 0.01$  vs. the control group, Fischer's Exact Test.**

**MK-801-induced Hyperactivity.** The stimulant properties of MK-801 on locomotion have been accepted as a glutamatergic hypofunction animal model of psychosis that seems to be of clinical relevance, and may be of value in the search for new antipsychotic agents.<sup>16</sup> Typical and atypical antipsychotic agents inhibit MK-801-induced locomotion.<sup>16,36,37</sup> Our data demonstrate that psychollatine (**1**) at 7.5 mg/kg [ $F_{(2,40)} = 3.9$ ,  $P < 0.05$ ] and 10 mg/kg [ $F_{(2,39)} = 8.7$ ,  $P < 0.05$ ] significantly reduced MK-801-induced hiperlocomotion [ $F_{(2,40)} = 19.3$ ,  $P < 0.05$ ] at doses that per se had no effect on locomotion.<sup>34</sup> Compound **1** at 100 mg/kg [ $F_{(2,38)} = 10.1$ ,  $P$

<0.05] prevented MK-801-induced hyperactivity (Fig. 1b), and significantly reduced locomotion on its own (Fig. 1a).

The analgesic effects of psychollatine (**1**) and its synergistic action with MK-801 against capsaicin-induced pain suggested that **1** acts as a NMDA antagonist.<sup>33</sup> The present results may also be understood as a consequence of NMDA antagonism, since acute and chronic administration of NMDA antagonists facilitate glutamate release,<sup>38-41</sup> thus minimizing some NMDA antagonist related behaviors.<sup>38</sup> It has been suggested that glutamate is released as a compensatory response to NMDA blockade; the released glutamate, by acting at non-NMDA receptors, cause changes in behaviors elicited by NMDA antagonists.<sup>15,38</sup> Although GABA receptors have been previously shown to be irrelevant for psychollatine (**1**)<sup>34</sup> effects, the possibility that **1** reverses MK801-induced hyperlocomotion by acting in low doses as a partial NMDA agonist can not be ruled out.

**a**



**b**

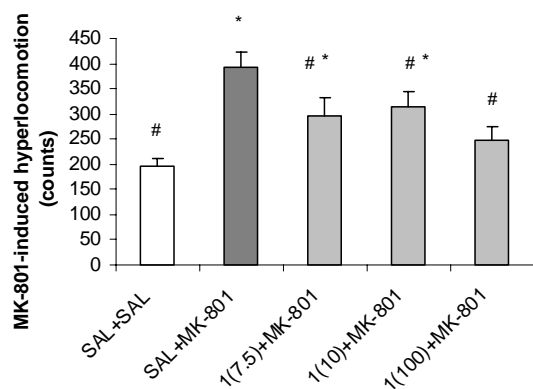


Figure 1. Effect of psychollatine (**1**) on spontaneous locomotion (1a), and on MK-801-induced hyperlocomotion (1b). SAL, saline 0.9%; dosages in mg/kg are indicated after the treatments. Each column represents the mean  $\pm$  SEM (N = 9-12). \* =  $P < 0.05$  compared with SAL+SAL, and #  $P < 0.05$  compared with SAL+MK-801, ANOVA/SNK.

An alternative interpretation of these results is an indirect modulation of DA and 5-HT receptors via psychollatine (**1**) NMDA antagonism.<sup>41</sup> It has been demonstrated that the motor stimulatory effects of PCP or MK-801 may be understood as the result of an increased nigrostriatal dopaminergic tone.<sup>17</sup> It was also verified that the NMDA antagonist-induced hyperactivity is mediated via 5-HT<sub>2A</sub> receptor activation, and 5-HT<sub>2</sub> receptor antagonists (like clozapine and ritanserin), are effective in preventing NMDA-induced hyperlocomotion.<sup>14,42,43</sup> It has been suggested that these serotonergic antagonists could specifically restore the impaired burst firing in mesocortical neurons caused by systemic administration of psychotomimetic NMDA- antagonists (such as PCP and MK-801) attenuating the locomotor activity.<sup>14,36,42</sup> In fact, we have previously reported that **1** acts as a 5HT<sub>2A/C</sub> modulator, with patterns compatible with mixed agonist or inverse agonist.<sup>34</sup> Therefore, a direct psychollatine (**1**) action as a serotonin modulator as the basis for reducing NMDA-induced hyperlocomotion should not be ruled out.

**Protection of Lethality Induced by Amphetamine in Grouped Mice.** The increased lethality induced by amphetamine in grouped mice is prevented by antipsychotics (older and atypical), but not tranquilizers (e.g., barbiturates and benzodiazepines).<sup>44</sup> The effectiveness of antipsychotics in this model is related to their ability to block D<sub>2</sub> receptors,<sup>44-46</sup> a common feature to all effective antipsychotic medication. As it can be seen in Figure 2 chlorpromazine was active, whereas diazepam inactive. Psychollatine (**1**, 3 and 10 mg/kg) significantly protected grouped mice from amphetamine-induced lethality, whereas 30 and 100 mg/kg were ineffective (Fig. 2), indicating that this alkaloid may interfere with dopamine receptors in lower doses. The lack of effect of higher doses of **1** needs further clarification, but bell shaped dose-responses curves have been previously observed with dopamine and amphetamine related behaviors.<sup>47-49</sup>

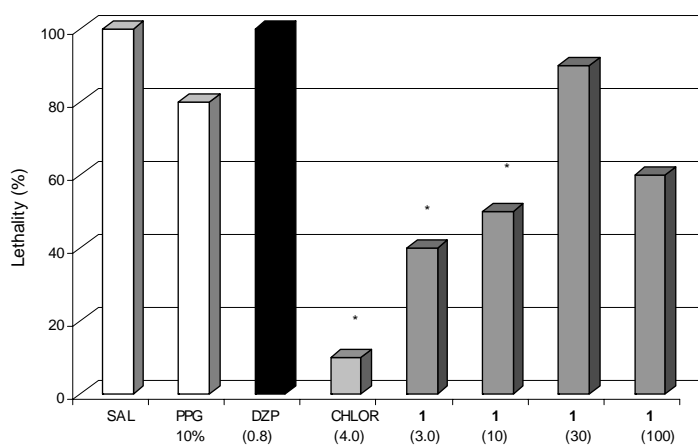


Figure 2. Effect of psychollatine (**1**) and chlorpromazine on amphetamine-induced lethality in grouped mice. PPG10%, propylene glycol; DZP, diazepam; CHLORP, chlorpromazine; dosages in mg/kg are indicated after the treatments. N = 10. \* =  $P < 0.05$  compared with controls, Fischer.

**Apomorphine-induced Climbing.** Antagonism of apomorphine-induced climbing is one of the most widely used tests to predict dopamine antagonist properties in vivo.<sup>21,50,51</sup> Mice treated with apomorphine, a mixed D<sub>1</sub>/D<sub>2</sub> agonist that stimulates postsynaptic dopamine receptors in the striatum, tend to adopt a vertical position along the walls of the cage;<sup>52</sup> the behavior is thought to be mediated by D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> activation.<sup>53</sup> As expected, chlorpromazine (4 mg/kg) inhibited apomorphine-induced climbing behavior (0[0 - 1],  $P < 0.01$ ), when compared to control group (8[6 - 9],  $P < 0.01$ ) (Fig. 3). Psychollatine (**1**, 10 mg/kg) and MK-801 (0.2 mg/kg) inhibited apomorphine-induced climbing behavior (5.5[3.25 - 7]  $P < 0.05$ , 2[1 - 3]  $P < 0.01$ , respectively), although to a lesser extent in comparison with chlorpromazine. Psychollatine inhibition of apomorphine-induced climbing could result from D<sub>1</sub>/D<sub>2</sub> dopaminergic antagonism, but also by a dopaminergic modulation via glutamate NMDA receptors.<sup>21</sup> The effect of compound **1** was not dose-dependent, conceivably related to an optimal level of NMDA antagonism relevant for post synaptic dopamine receptor antagonism.

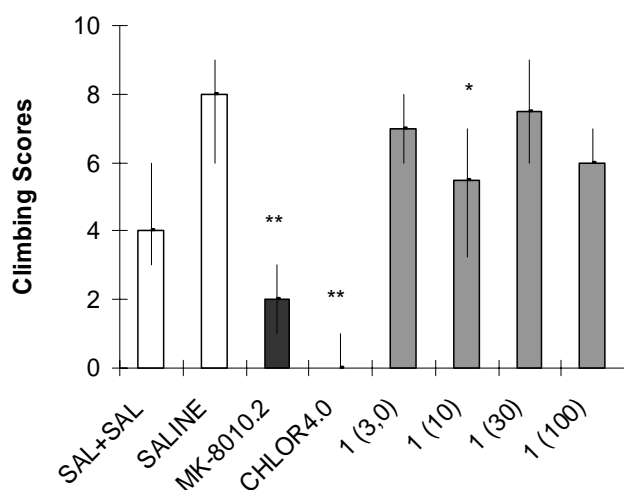


Figure 3. Effect of psychollatine (**1**), chlorpromazine, and MK-801 on apomorphine-induced climbing behavior in mice. SAL+SAL = saline+saline; SAL, saline+apomorphine; CHLORP, chlorpromazine+apomorphine; dosages in mg/kg

are indicated after the treatments. N = 11-14. \*\*  $P < 0.05$  and \* $P < 0.01$  compared with saline+apomorphine, Mann-Whitney/Kruskal-Wallis.

In recent years, cross talk among glutamate, 5-HT, and DA systems have been well documented.<sup>20,27,54-56</sup> Considering the current and previously reported results,<sup>33,34</sup> the overall data suggest that the behavioral effects of psychollatine (**1**) are related to its interference with the NMDA, 5-HT and DA receptor cross talk. Undoubtedly, binding studies would be useful to further clarify the molecular mechanism of psychollatine (**1**) and its complex dose-effect pattern. Given that interactions at multiple receptors ( $D_2$ , 5-HT<sub>2</sub>,  $\alpha 1$ -adrenoceptor, NMDA) seem to be the key factors that vary the effectiveness of novel atypical agents in negative symptoms of schizophrenia as well as minimum extra pyramidal adverse effects,<sup>13</sup> it can be argued that psychollatine (**1**) is a potential antipsychotic. Nevertheless, its general profile indicates few advantages compared to known drugs (e.g., an amnesic effect). However, this study supports the further investigation of the indole monoterpene alkaloid psychollatine (**1**) as an interesting template for the development of new psychoactive drugs.

### **Experimental Section**

**General Experimental Procedures.** Diazepam (DZP), *N*-methyl-D-aspartate (NMDA), and propylene glycol (PPG) were acquired from Sigma; MK-801 was acquired from RBI (USA). Drugs and vehicles were administered intraperitoneally (i.p.), except for apomorphine given subcutaneously (s.c.), as 0.1 mL/ 10g of body weight. Diazepam (0.8 mg/kg) was suspended in propylene glycol 10% (v/v). Psychollatine (**1**, 3 - 100 mg/kg) was solubilized in one or a few drops (20-60  $\mu$ L) of HCl (1 N); the final volume was adjusted with saline, and the pH adjusted (7.0) with a few drops of NaOH (1 N). NMDA (150 mg/kg), MK-801 (0.2 - 0.3 mg/kg), amphetamine (12.5 mg/kg), chlorpromazine (4.0 mg/kg), and apomorphine (2 mg/kg) were diluted in saline. Control groups received saline (NaCl 0.9%) or PPG (10%) as appropriate.

**Plant Material.** *Psychotria umbellata* Vell. (Rubiaceae) leaves were collected at Torres (Rio Grande do Sul, Brazil) in February 2003; voucher material (MBM 48571) has been deposited at the herbarium of the Museu Botânico Municipal de Curitiba (PR, Brazil).

**Extraction and Isolation.** The procedures used for isolating psychollatine (**1**) were detailed elsewhere;<sup>34</sup> **1** exhibited physical and spectroscopic data consistent with literature values.<sup>32,34</sup>

**Animals.** Experiments were performed with male adult mice (CF1), acquired from Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) at 2 months of age. Animals were maintained in our own facilities [22±1 °C, 12 h light/dark cycle, free access to food (Nuvilab CR1) and water] for at least two weeks before the experiments. All procedures were carried out according to institutional policies on experimental animal handling.

**NMDA-Induced Seizures.** NMDA was administered at 150 mg/kg (i.p.). MK-801 0.3 mg/kg, saline and psychollatine (**1**, 50, 75 and 100 mg/kg) were given i.p. 30 min before the administration of NMDA. Immediately after administration of the NMDA, animals were individually placed in acrylic cages, and the occurrence of seizure observed for 30 min. A full seizure was recorded when clonic movements of the limbs were observed, accompanied by loss of righting reflex. The presence of convulsions, latency to the first convulsive episode, and lethality were noted.<sup>57</sup> Each experimental group consisted of at least 10 animals. Fisher's exact test was used for statistical analysis.

**MK-801-induced Hyperactivity.** The method was adapted from Ninan and Kulkarni.<sup>58</sup> Locomotion activity was measured by using activity cages. Mice ( $n=10$ -

25) were treated with saline or psychollatine (1, 7.5, 10 and 100 mg/kg), and 30 min later received MK-801 (0.25 mg/kg). Thirty minutes after MK-801 administration, mice were placed individually in the activity cages, and the motor activity was recorded for 5 min, starting 2 min after the mice were placed in the cage. Statistical analysis involved an initial one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Student Newman Keuls (SNK).

**Protection of Lethality by Amphetamine in Grouped Mice.** Mice were divided in groups of 10, and received amphetamine (12.5 mg/kg, i.p) before being placed in small boxes (19.0 x 9.0 x 9.5 cm). Chlorpromazine (4 mg/kg) and psychollatine (1, 3 – 100 mg/kg) were given i.p. 30 min before amphetamine. Lethality was noted 24 h after amphetamine administration.<sup>44</sup> Fisher's exact test was used for statistical analysis.

**Apomorphine-induced Climbing Behavior.** The method was adapted from Pinsky et al.<sup>59</sup> Saline (0.9%), MK-801 (0.2 mg/kg), chlorpromazine (4.0 mg/kg) and psychollatine (1, 3 - 100 mg/kg) were administered (i.p.) to mice ( $n=11-14$ ) 30 min before the injection of apomorphine 2 mg/kg (s.c.). Immediately after being injected with apomorphine, the mice were placed individually into cylindrical individual cages (diameter, 12 cm; height, 14 cm) with the floor and wall consisting of metal bars (0.2 cm diameter; separated by 1-cm gaps). Climbing behavior was measured by an observer at 5, 10, 15, 20, 25 and 30 min after apomorphine administration. Climbing behavior was scored for 1 min during the observation periods, and the highest rating observed during this 1-min was used in the calculations. Scores were as follows: four paws on the floor (0 point), fore-feet holding the wall at 45° (1 point), fore-feet holding the wall at 90° (2 points), and all four paws holding the wall (3 points), with a maximum of 18 points. The scores are expressed as median (interquartile ranges), and analyzed by Kruskal-Wallis followed by Mann-Whitney U-test (two-tailed).



**Acknowledgment.** This study was supported by grants from CNPq (E.E., A.T.H., and F.L.B.), and financial support from CNPq.

## References and Notes

- (1) Fraser, C. N.; Cooke, M. J.; Fisher A.; Thompson, I. D.; Stone, T. W. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **1996**, *6*, 311-316.
- (2) Constantine-Paton, M.; Cline, H. T. *Curr. Opin. Neurobiol.* **1998**, *8*, 139-148.
- (3) Gatch, M. B.; Wallis, C. J.; Lal, H. *Alcohol* **1999**, *19*, 207-211.
- (4) Adamec, R. E.; Burton, P.; Shallow, T.; Budgell, J. *Physiol Behav.* **1999**, *65*, 723-737.
- (5) Sckolnick, P. *Eur. J. Pharmacol.* **1999**, *375*, 31-40.
- (6) Rogóz, Z.; Skuza, G.; Maj, J.; Danysz, W. *Neuropharmacol.* **2002**, *42*, 1024-1030.
- (7) Rada, P.; Moreno, S. A.; Tucci, S.; Gonzalez, L. E.; Harrison, T.; Chau, D.,T.; Hoebel, B.,G.; Hernandez, L. *Neuroscience* **2003**, *119*, 557-565.
- (8) Yan, Q.; Reith, M. E. A.; Jobe, P. C.; Dailey, J. W. *Brain Res.* **1997**, *765*, 149-158.
- (9) De Montis, M. G.; Devoto, P.; Meloni, D.; Gambarana, C.; Giori, G.; Tagliamonte, A. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1992**, *42*, 179-182.
- (10) Trujillo, K. A.; Akil, H. *Science* **1991**, *251*, 85-87.
- (11) Shoaib, M.; Stolerman, I. P. *J. Psychopharmacol.* **1996**, *10*, 214-218.
- (12) File, S. E.; Fernandes, C. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1994**, *47*, 823-826.
- (13) Shim, S. S.; Grant, E. R.; Singh, S.; Gallagher, M. J.; Lynch, D. R. *Neurochem. Int.* **1999**, *34*, 167-175.
- (14) Svensson, T. *Brain Res. Rev.* **2000**, *31*, 320-329.
- (15) Breese, G. R.; Knapp, D. J.; Moy, S. S. *Neurosci. Behav. Rev.* **2002**, *26*, 441-455.

- (16) Abi-Saab, W. M.; D'Souza, D. C.; Moghddam, B.; Krystal, J. H. *Pharmacopsychiatry* **1998**, *31*, 104-109.
- (17) Mohn, A. R.; Gainetdinov, R. R.; Caron, M. G.; Ko, H. *Cell* **1999**, *98*, 427-436.
- (18) Carlsson, A.; Waters, N.; Carlsson, M. L. *Biol. Psychiatry* **1999**, *46*, 1388-1395.
- (19) Zhang, J.; Chiodo, L. A.; Freeman, A. S. *Brain Res.* **1992**, *590*, 153-163.
- (20) Cook, C. D.; Newman, J. L.; Winfree, J. C. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2004**, *77*, 309-318.
- (21) Kim, H. S.; Rhee, G. S.; Oh, S.; Park, W. K. *Behav. Brain Res.* **1999**, *100*, 135-142.
- (22) Chausmer, A. L.; Katz, J. L. *Psychopharmacology* **2001**, *155*, 69-77.
- (23) Aghajanian, G. K.; Marek, G. J. *Brain Res.* **1999**, *825*, 161-171.
- (24) Carlsson, A.; Waters, N.; Waters, S. S.; Carlsson, M. L. *Brain Res. Rev.* **2000**, *31*, 342-349.
- (25) Marek, G. J.; Wright, R. A.; Schoepp, D. D.; Monn, J. A.; Aghajanian, G. K. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, *292*, 76-87.
- (26) Löscher, W.; Annies, R.; Hönack, D. *Neurosci. Lett.* **1991**, *128*, 191-194.
- (27) Aghajanian, G. K.; Marek, G. J. *Brain Res. Rev.* **2000**, *31*, 302-312.
- (28) Schultes, R. E.; Raffauf, R. F. Dioscorides Press: Portland 1990; pp 392-396.
- (29) Amador, T. A.; Verotta, L.; Nunes, D. S.; Elisabetsky, E. *Planta Med.* **2000**, *66*, 1-3.
- (30) Amador, T. A.; Verotta, L.; Nunes, D. S.; Elisabetsky, E. *Phytomedicine* **2001**, *8*, 202-206.
- (31) Verotta, L.; Orsini, F.; Sbacchi, M.; Scheidler, M. A.; Amador, T. A.; Elisabetsky, E. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 2133-2142.
- (32) Lopes, S. O.; Von Poser, G. L.; Kerber, V. A.; De Santos, L. V.; Moreno, P. R. H.; Ferreira, L.; Farias, F. M.; Sobral, M. E. G.; Zuanazi, J. S.; Henriques, A. T. *Biochem. Syst. Ecol.* **2004**, *32*, 1187-1195.

- (33) Both, F. L.; Kerber, V. A.; Henriques, A. T.; Elisabetsky, E. *Pharm. Biol.* **2002**, *40*, 336-341.
- (34) Both, F. L.; Meneguini, L.; Kerber V. A.; Henriques, A. T.; Elisabetsky, E. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 374-380.
- (35) Ramoa, A. S.; Alkondon, M.; Aracava, Y.; Irons, J.; Lunt, G. G.; Deshpande, S. S.; Wonnacott, S.; Aronstam, R. S.; Albuquerque, E. X. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1990**, *254*, 71-82.
- (36) O'Neill, M. F.; Hicks, C. A.; Cardwell, G. P.; Parameswaran, T.; O'Meal, M. J. *J. Psychopharmacol.* **1997**, *11S*, A79.
- (37) Andiné, P.; Widermark, N.; Axelsson, R.; Nyberg, G.; Olofsson, U.; Martensson, E.; Sandberg, M. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, *290*, 1393-1408.
- (38) Moghaddam, B.; Adams, B.; Verma, A.; Daly, D. *J. Neurosci.* **1997**, *17*, 2921-2927.
- (39) Krystal, J. H.; Belger, A.; D'Souza, C.; Anand, A.; Charney, D. S.; Aghajanian, G. K.; Moghaddam, B. *Neuropsychopharmacol.* **1999**, *21*(S6), S143-S157.
- (40) Krystal, J. H.; Anand, A.; Moghaddam, B. *Arch. Gen. Psychiat.* **2002**, *59*, 663-664.
- (41) Olney, J. W.; Farb, N. B. *Arch. Gen. Psychiat.* **1995**, *52*, 998-1007.
- (42) Smith, J. A.; Boyer-Millar, C.; Goudie, A. J. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1999**, *64*, 429-433.
- (43) Adams, B. W.; Moghaddam, B. *Biol. Psychiat.* **2001**, *50*, 750-757.
- (44) Bourin, M.; Poisson, L.; Larousse, C. *Neuropsychobiol.* **1986**, *19*, 93-96.
- (45) Ball, K. T.; Budreau, D.; Rebec, G. V. *Brain Res.* **2003**, *994*, 203-15.
- (46) Gifford, A. N.; Park, M. H.; Kash, T. L. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* **2000**, *362*, 413-418.
- (47) Mogilnicka, E.; Boissard, C. G.; Delini-Stula, A. *Neuropharmacology* **1984**, *23*, 19- 22.
- (48) Antoniou, K., Kafetzopoulos, E., Papadopoulou-Daifoti, Z., Hyphantis, T., Marselos,

- M. Neurosci. Biobehav. Rev.* **1998**, 23, 189-196.
- (49) Costa-Campos, L.; Lara, D. R., Nunes, D. S., Elisabetsky, E. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1998**, 60, 133-141.
- (50) Costentin, J.; Protais, P.; Schwartz, J. C. *Nature* **1975**, 257, 405-407.
- (51) Protais, P.; Costentin, J. ; Schwartz, J. C. *Psychopharmacology* **1976**, 50, 1-6.
- (52) Battisti, J. J.; Uretsky, N. J.; Wallace, L. J. *Behav. Brain Res.* **2000**, 114, 167-174.
- (53) Moore, N. A.; Axton, M. S. *Psychopharmacology* **1988**, 94, 263-266.
- (54) Di Matteo, V.; Cacchio, M.; Di Giulio, C.; Espósito, E. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2002**, 71, 727-734.
- (55) Costa-Campos, L.; Dassoler, S. C.; Rigo, A. P.; Iwu, M.; Elisabetsky, E. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2004**, 77, 481-489.
- (56) Alex, K. D.; Yavarian, G. J.; McFarlane, H. G.; Pluto, C. P.; Pehek, E. A. *Synapse* **2005**, 55, 242-251.
- (57) Decollagne, S.; Tomas, A.; Lecerf, C.; Adamowicz, E.; Seman, M. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1997**, 58, 261-268.
- (58) Ninan, I.; Kulkarni, S. K. *Eur. J. Pharmacol.* **1998**, 358, 111-16.
- (59) Pinsky, C. *Neurosci. Biobehav. Ver.* **1988**, 12, 195-198.

### **4.3 Atividade Antioxidante e Pró-oxidante do Alcalóide Indol-Monoterpênico Psicolatina Isolado de *Psychotria umbellata* (a ser submetido para *Life Science*).**

#### **4.3.1 INTRODUÇÃO**

Espécies reativas de oxigênio ou *reactive oxygen species* (ROS) e espécies reativas de nitrogênio ou *reactive nitrogen species* (RNS) são produzidas durante o metabolismo normal, especialmente durante a respiração celular (FERNANDES *et al.*, 2004, EL-SHERBINY *et al.*, 2003). A superprodução contínua de ROS e de NOS, e/ou a redução das defesas antioxidantes (estresse oxidativo) pode induzir dano cerebral, tanto diretamente através da interação e destruição das proteínas celulares, lipídios e DNA, ou indiretamente por afetar as vias de sinalização celular normais e regulação gênica (LI *et al.*, 2002, SUN *et al.*, 2002). Este dano contínuo contribui para o desenvolvimento de diversas doenças crônicas do sistema nervoso central, como derrame, neurotrauma e isquemias cerebrais crônicas (EL-SHERBINY *et al.*, 2003).

Vários produtos podem desempenhar um importante papel dentro deste contexto em dois aspectos: aumentando a atividade dos recursos antioxidantes celulares originais ou neutralizando os radicais livres (SUN *et al.*, 2002). Entre os compostos que interferem com os efeitos das ROS, os derivados indólicos constituem um grupo farmacológico e químico distinto (STOLC, 1999).

Dentre os alcalóides indólicos usados em terapia, talvez os mais conhecidos sejam vimblastina e vincristina. Amplamente utilizados no tratamento de diversos tipos de câncer (RASKIN *et al.*, 2002). Além da atividade antitumoral, outros estudos demonstraram que alcalóides produzidos em culturas de *Catharantus* apresentaram atividade antioxidante (LEMÉNAGER *et al.*, 2004).

Derivados sintéticos do alcalóide vincamina, como a vimpocetina, possuem efeito neuroprotetor em vários modelos experimentais. A vimpocetina apresenta efeitos protetores em relação à morte celular induzida por várias excitotoxinas e inibe a citotoxicidade do glutamato em neurônios cerebrocorticais (PEREIRA *et al.*, 2003).

Triptofano, serotonina e melatonina, derivados indólicos comuns em tecidos biológicos (WÖLFLER *et al.*, 1999), são potentes seqüestradores de radicais hidroxil (STOLC, 1999; CANO *et al.*, 2003).

Devidos aos efeitos antioxidantes e neuroprotetores de alcalóides indólicos, tanto derivados de plantas como de animais, tornou-se interessante avaliar o efeito de psicolatina quanto ao seu potencial antioxidante.

#### **4.3.2. OBJETIVOS**

Este trabalho teve por objetivo avaliar os possíveis efeitos antioxidantes de psicolatina sobre diversos parâmetros de estresse oxidativo.

Para tanto, foram utilizados o conteúdo de radicais livres (DCF), a reatividade antioxidante total (TAR), o ensaio de peroxidação lipídica (TBARS) e a oxidação dos resíduos de triptofano (TRI) e tirosina (TIR) no córtex e hipocampo de camundongos tratados com psicolatina (vide anexo 1).

#### **4.4 Toxicidade Aguda Induzida pelo Alcalóide Indol-Monoterpênico Psicolatina Isolado de *Psychotria umbellata* Vell. (submetido à *Toxicon*, 2005).**

##### **4.4.1 INTRODUÇÃO**

Alguns medicamentos fitoterápicos têm uma longa história que resulta da soma de conhecimentos e experiências em diferentes culturas onde têm sido usados para manutenção da saúde, assim como para a prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças físicas e mentais (WHEELWRIGHT, 1994). Entretanto, no Brasil, os dados existentes são insuficientes para garantir a qualidade, eficácia e segurança da grande maioria dos nossos fitoterápicos (FERREIRA, 1998; CALIXTO, 2000). A idéia de que o “natural não faz mal” é falsa e prejudicial à população desinformada. As plantas contêm centenas de constituintes, alguns dos quais são altamente tóxicos. Portanto, mesmo que os efeitos colaterais dos fitomedicamentos sejam menos freqüentes e graves do que os medicamentos sintéticos, ensaios devem ser realizados para confirmar a sua segurança (MORAES *et al.*, 2003).

O ensaio de toxicidade aguda é uma etapa inicial para a avaliação do perfil toxicológico de produtos naturais, podendo sugerir o mecanismo de toxicidade envolvido na absorção dos mesmos pela via sistêmica e oral. Este ensaio é indispensável para o estabelecimento de doses a serem utilizadas em estudos subcrônicos (PERES *et al.*, 2003).

##### **4.4.2. OBJETIVOS**

Este trabalho teve por objetivo verificar a DL50 e sinais de toxicidade aguda em animais tratados com psicolatina (vide anexo 2).

## 5 DISCUSSÃO

Desde os tempos mais antigos o reino vegetal tem sido reconhecido como uma fonte de novas substâncias terapêuticas. Atualmente observa-se a existência de medicamentos derivados de plantas, sendo formulados a partir da molécula natural, da remodelação da sua estrutura ou como fonte de matéria-prima para medicamentos semi-sintéticos dando origem a compostos com maior atividade terapêutica (HAMBURGER; HOSTETTMANN,1991; CURTIS-PRIOR *et al.*,1999). Além disso, os compostos extraídos de plantas representam importantes ferramentas em farmacologia e bioquímica (FARNSWORTH, 1990).

Por essa razão, pela grande importância que as plantas tem no alívio do sofrimento humano causado por diversas doenças e também baseado em dados de 1995 que mostram que nos 11 produtos mais vendidos, pelo menos um ingrediente ativo com estrutura baseada em componentes na natureza era encontrado, justifica-se a continuidade de pesquisas que busquem novas e melhores drogas derivadas de plantas.

A psicolatina é um alcalóide indol-monoterpênico isolado de *Psychotria umbellata*. Assim como outros alcalóides isolados de *Psychotria*, como a hodgkinsina e a psicotridina (AMADOR *et al.*, 2000, 2001), a psicolatina apresentou atividade analgésica dose-dependente em modelos de dor induzida por estímulos térmicos (placa quente e teste da retirada da cauda ao estímulo térmico) e químicos (capsaicina e formalina). Embora a atividade analgésica seja moderada e em doses próximas as que causam sinais de toxicidade, o mecanismo de ação despertou interesse já que parece envolver a ativação de receptores opiáceos e o antagonismo de receptores glutamatérgicos NMDA (BOTH *et al.*, 2002).

O glutamato está implicado em muitas das ações relacionadas à serotonina (5-HT), principalmente na patogênese dos distúrbios afetivos, tais como



ansiedade e depressão (ADAMEC *et al.*, 1999; ROSA *et al.*, 2003). Processos como aprendizado e memória também implicam a participação do glutamato (AMADIO *et al.*, 2004), além de 5-HT (MENESES; HONG, 1997; LIANG, 1999), sendo os subtipos de receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5HT<sub>2A/C</sub> especialmente relevantes nesta discussão (FLETCHER *et al.*, 1996; BENEYTEZ *et al.*, 1998; KHALIFA, 2003).

Considerando a importância dos receptores glutamatérgico e serotoninérgico e ao fato de ser este alcalóide de fácil obtenção, esse trabalho teve o objetivo de complementar o perfil psicofarmacológico de psiclatina bem como dar início à elucidação de seus possíveis mecanismos de ação.

Considerando que o efeito ansiolítico da psiclatina em dois modelos comportamentais (teste da placa perfurada e claro/escuro) foi revertido por administração prévia de ritanserina (antagonista dos subtipos de receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2A/C</sub>; ver artigo científico, 4.1), parece claro que estes receptores estão implicados nesta propriedade de psiclatina. Receptores serotoninérgicos também podem estar implicados na atividade antidepressiva observada em animais tratados com psiclatina (modelo de nado forçado), e ainda indiretamente modular a função dopaminérgica explicando o resultado obtido no teste da letalidade induzida por anfetamina em animais agrupados e escalada por induzida por apomorfina (artigo científico, 4.2 e figura 1).

A modulação indireta de serotonina sobre o sistema dopaminérgico pode ser explicada através de diversos estudos. Apesar de todos concordarem que a função dopaminérgica mesencefálica é crítica para um funcionamento normal do cérebro e que está bem estabelecido o controle do sistema serotoninérgico sobre a atividade de neurônios dopaminérgicos; existem dados controversos na literatura, aonde a influência de serotonina em neurônios dopaminérgicos, parece ser específica dependendo da via neuronal considerada. ALEX *et al.* (2005) mostraram que agonistas inversos e antagonistas de 5-HT<sub>2C</sub> injetados diretamente no estriado e

córtex pré-frontal aumentam a liberação de dopamina no estriado, mas não no córtex pré-frontal; os autores sugerem que receptores 5-HT<sub>2C</sub> do estriado inibem a liberação de dopamina na via nigroestriatal. No entanto, DI MATTEO *et al.* (2002), investigando o papel de antagonistas 5-HT<sub>2C</sub> no controle de funções dopaminérgicas, mostraram claramente que estes antagonistas aumentam a liberação de dopamina na área mesocorticolímbica. A administração de agonistas inversos 5-HT<sub>2C</sub> também aumenta a liberação de dopamina no córtex pré-frontal (GOBERT *et al.*, 2000; PEHEK *et al.*, 2001; MELTZER, 2003). Outros autores mostram que a liberação de dopamina induzida por antagonistas serotoninérgicos no córtex pré-frontal é também dependente de receptores 5HT<sub>1A</sub> (CHUNG *et al.*, 2004; BONACORSO *et al.*, 2002). Recentemente, mostrou-se que a liberação de dopamina em neurônios mesencefálicos está permanentemente sob o controle de receptores 5HT<sub>2C</sub> que exerceriam esta função constitutivamente (DEURWAERDÈRE *et al.*, 2004; figura 1).

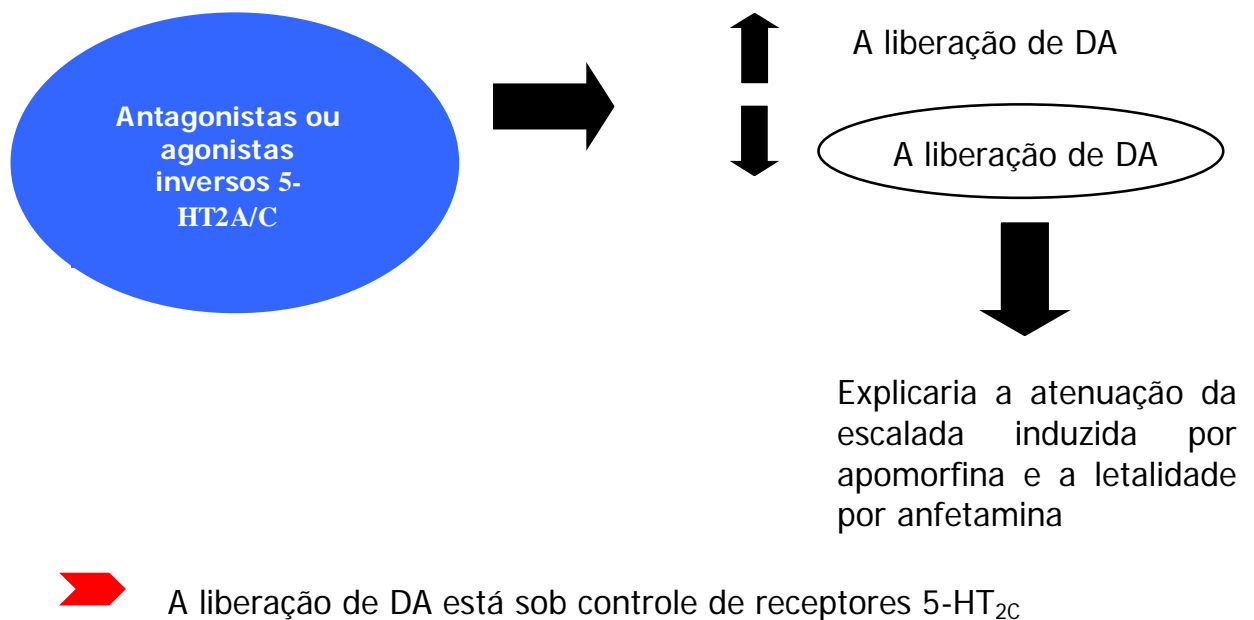


Figura 1: Interação entre o sistema serotoninérgico e dopaminérgico.

O aumento da letalidade induzida por anfetamina, fármaco que atua pré-sinápticamente para aumentar a transmissão dopaminérgica, é prevenida por antipsicóticos, mas não por tranquilizantes (e.x., barbitúricos e benzodiazepínicos) (BOURIN *et al.*, 1986; BATTISTI *et al.*, 2000). A psiclatina, assim como a clorpromazina, preveniram significativamente a letalidade (artigo científico, 4.2). A habilidade de psiclatina em reduzir a letalidade pode ser explicada pela sua modulação sobre receptores 5-HT, NMDA e dopaminérgicos, visto que este efeito preventivo está relacionado à habilidade de antipsicóticos em bloquear receptores D<sub>2</sub> (BOURIN *et al.*, 1986; figura 1 e 2).

O antagonismo do comportamento de escalada induzida por apomorfina é um dos testes mais utilizados como preditivo de propriedades antagonistas dopaminérgicas *in vivo* (KIM *et al.*, 1999). Neste teste, apomorfina, agonista misto D<sub>1</sub>/D<sub>2</sub>, diretamente ativa receptores dopaminérgicos pós-sinápticos no estriado (BATTISTI *et al.*, 2000). A psiclatina reduziu o comportamento de escalada sugerindo antagonismo de receptores dopaminérgicos e/ou uma modulação glutamatérgica e 5-HT da função dopaminérgica em receptores pós sinápticos D<sub>1</sub>/D<sub>2</sub> (artigo científico, 4.2 e figura 1 e 2).

A modulação da função glutamatérgica sobre o sistema dopaminérgico também pode ser entendido como o resultado de um antagonismo dos receptores NMDA (MOGHADDAM *et al.*, 1997; BREESE *et al.*, 2002) pela psiclatina, sugerido pela analgesia no teste de capsaicina, onde a psiclatina apresentou sinergismo de ação com MK-801 e pelo bloqueio de convulsões induzidas por NMDA.

Como visto no artigo científico 4.2, a psiclatina reduziu o aparecimento de convulsões induzidas por NMDA. Além disso, a psiclatina, bem como MK-801 protegeram os animais da morte em comparação com o grupo

controle. A psiclatina em doses menores reduziu a hiperlocomoção induzida por MK-801 e na maior dose preveniu a hiperatividade (artigo científico, 4.2).

Este alcalóide preveniu comportamentos que são mediados por receptores glutamatérgicos NMDA e dopaminérgicos no sistema nervoso central. Os efeitos de psiclatina no teste de convulsões induzidos por NMDA sugerem um moderado, porém significativo efeito antagonista de psiclatina sobre receptores NMDA.

A modulação da função glutamatérgica sobre o sistema dopaminérgico que explicaria alguns dos efeitos de psiclatina apóiam-se em dados de literatura que demonstram que uma única dose de MK-801 tem ação antidopaminérgica, resultando na inibição do comportamento de escalada induzida por apomorfina (agonista dopaminérgico D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>; KIM *et al.*, 1996). Embora se saiba que o glutamato tem papel facilitador pré-sináptico em terminais dopaminérgicos induzindo a liberação de DA (CARLSSON; CARLSSON, 1990), o fato de antagonistas NMDA bloquearem o comportamento de escalada induzida por agonista dopaminérgico sugere que glutamato possa também modular a função dopaminérgica em nível pós sináptico (KIM *et al.*, 1996).

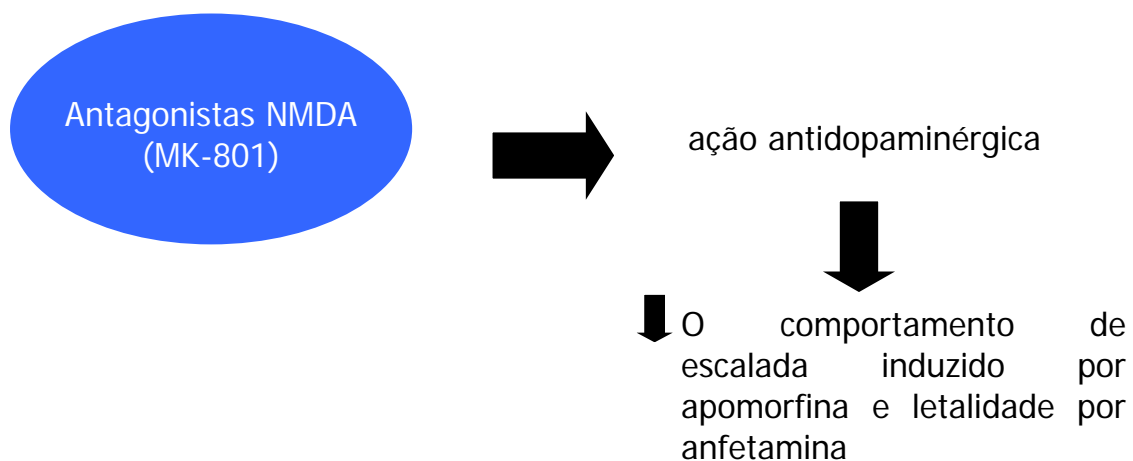


Figura 2: Interação entre o sistema glutamatérgico e dopaminérgico.

Vários estudos demonstram que a administração aguda e crônica de antagonistas NMDA também facilitam a liberação de glutamato minimizando a locomoção e comportamentos estereotipados induzidos por MK-801, por uma resposta compensatória ao bloqueio dos receptores NMDA (MOGHADDAM *et al.*, 1997; BREESE *et al.*, 2002). O efeito de psiclatina em inibir o comportamento de hipelocomoção induzido por MK-801 em doses que sozinhas não tem efeito sobre a atividade locomotora (BOTH *et al.*, 2005) pode ser devido a este fator.

Estes resultados sobre a hiperlocomoção induzida por MK-801 sugerem que além da participação direta de receptores NMDA, outros receptores também podem estar envolvidos, como receptores dopaminérgicos e serotoninérgicos (BOTH *et al.*, 2005), visto que tem sido demonstrado que os efeitos estimulatórios de fenciclidina (PCP) ou MK-801 podem ser explicados pela desinibição do tônus dopaminérgico nigrestriatal direta ou indiretamente (MOHN *et al.*, 1999). Além disso, outros estudos verificaram que a hiperatividade induzida por antagonistas NMDA é mediada via ativação de receptores 5-HT<sub>2A</sub> (SMITH *et al.*, 1999; SVENSSON, 2000; figura 3), sugerindo que sistemas não-dopaminérgicos também estão implicados nas ações de antagonistas NMDA (CARLSSON *et al.*, 2000; MAREK *et al.*, 2000).

Os efeitos psicoestimulantes e psicotomiméticos de antagonistas NMDA (MK-801 e PCP) também podem ser atenuados ou bloqueados por agonistas parciais 5-HT<sub>2A</sub> e antagonistas seletivos 5-HT<sub>2A</sub> (YAN *et al.*, 1997, SMITH *et al.*, 1999; SVENSSON, 2000). Em várias regiões cerebrais (incluindo córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e rafe) antagonistas NMDA estimulam a liberação e o *turn-over* de serotonina mais consistentemente do que a modulação da atividade dopaminérgica (LÖSCHER *et al.*, 1991; YAN *et al.*, 1997; CARLSSON *et al.*, 1999; BREESE *et al.*, 2002). Foi sugerido que esta modulação da função serotoninérgica seria a responsável pelas propriedades antidepressivas de antagonistas NMDA (SKOLNICK, 1999). Por sua vez, também tem sido proposto que a liberação

de serotonina induzida por antagonistas NMDA ativaria receptores 5-HT<sub>2A</sub> em neurônios glutamatérgicos no córtex resultando na liberação de glutamato (MAREK *et al.*, 2000). Assim se entenderia porque agonistas 5-HT<sub>2</sub> diminuem os efeitos psicotomiméticos de antagonistas NMDA (ARVANOV; WANG, 1998). Esta relação direta e complexa entre os sistemas serotoninérgico e glutamatérgico parece ser a base para a redução da sensibilidade a antagonistas NMDA observada por longos períodos após a retirada de antipsicóticos ingeridos cronicamente (BREESE *et al.*, 2002; figura 3).

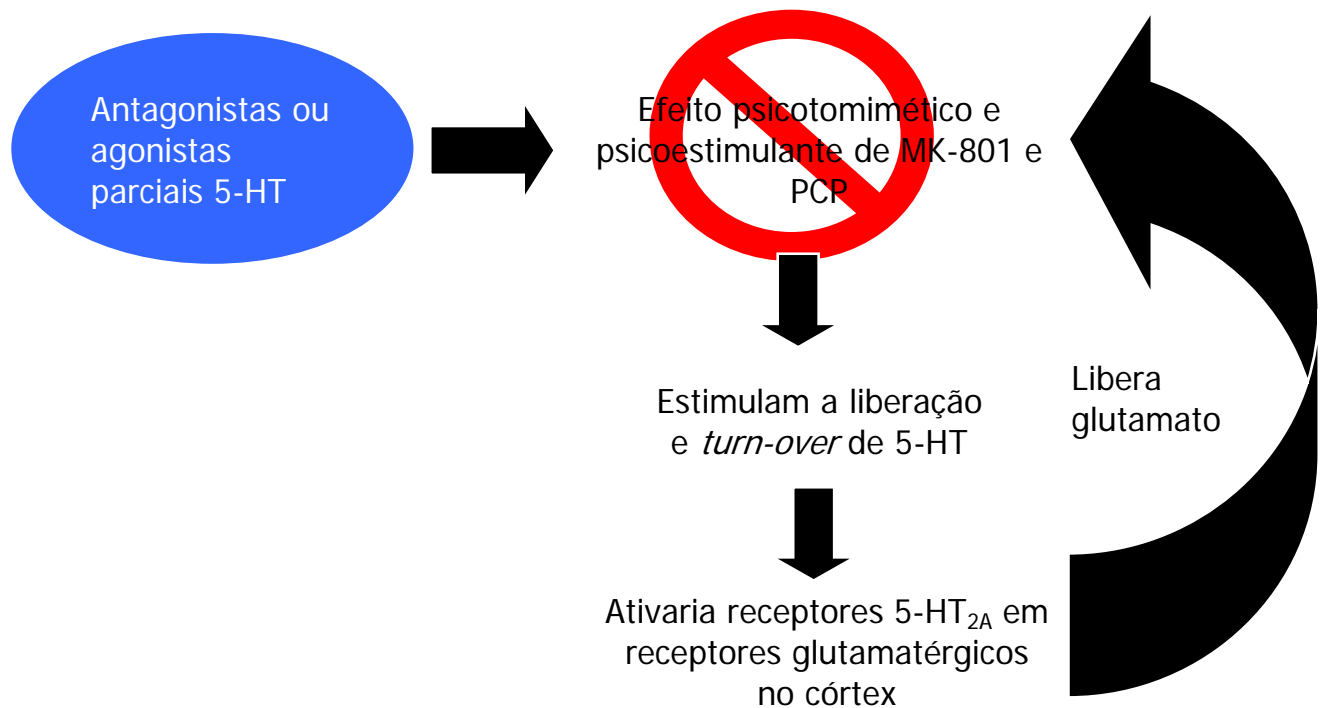


Figura 3: Interação entre o sistema serotoninérgico e glutamatérgico.

Não existe consenso sobre os efeitos da atividade serotoninérgica quanto aos processos de aprendizado e memória; diferenças nos modelos e subtipos de receptores parecem ser relevantes na compreensão de muitos resultados encontrados na literatura (MENESES; HONG, 1997; MISANE ; ÖGREN, 2000; SOLANA-FIGUEROA *et al.*, 2002; KHALIFA, 2003). No

entanto, a amnésia induzida pela psiclatina (artigo científico, 4.1) é compatível com antagonismo NMDA (ROULLET *et al.*, 2001; HLINÁK; KREJČÍ, 2002; BARDGETT *et al.*, 2003), assim como com uma atividade anticolinérgica sugerida pela reversão de tremores induzidos por oxotremorina pela psiclatina (artigo científico, 4.1). Uma moderada atividade analgésica, atividade ansiolítica, amnésica e antimuscarínica são aspectos procurados em drogas pré-anestésicas.

Como pode ser observado no artigo científico 4.3 (anexo 1), a psiclatina alterou vários parâmetros do estresse oxidativo em diferentes regiões cerebrais. A reatividade antioxidante total (TAR) é um índice útil da capacidade de uma dada amostra em modular os danos associados ao aumento da produção de radicais livres (LISSI *et al.*, 1992), já que determina a qualidade de antioxidantes presentes em uma amostra (LISSI, 1995; DESMARCHELIER *et al.*, 1997). É importante notar que a psiclatina aumentou a capacidade antioxidante total no córtex e hipocampo; no entanto a formação de radicais livres (DCF) foi reduzida apenas no córtex. Ao contrário, no hipocampo foi observado um aumento significativo nos níveis de DCF com a maior dose de psiclatina. Esse efeito pró-oxidante pode ser conseqüente à liberação de glutamato resultante do antagonismo de receptores 5HT<sub>2</sub> pela psiclatina. Acredita-se que o aumento de radicais livres prejudica o potencial de longa duração (LTP) no hipocampo (McGAHON *et al.*, 1999) e contribui com o déficit cognitivo relacionado à idade (HALLIWELL, 1992; RÁDAK *et al.*, 2001). O aumento nos níveis de DCF no hipocampo induzido por psiclatina pode ser relevante para a propriedade amnésica verificada em esQUIVA inibitória (BOTH *et al.*, 2005).

O paradigma que dominou o século XIX entendia doenças como o resultado de etiologias específicas, com o corolário de terapias específicas preferencialmente com drogas com único mecanismo de ação. Ao contrário, o conceito atual entende doenças não como eventos e sim como processos. A probabilidade de uma doença se expressar depende não só de uma causa, mas sim de vários fatores determinantes, que por sua vez são influenciados pelas múltiplas e

concomitantes exposições a diversas variáveis relevantes (VINEIS; PORTA, 1996). Na maior parte das vezes, há no mínimo a interação de fatores geneticamente determinados com as variáveis ambientais (hábitos, dieta, atividade física, exposição a toxinas e poluentes, etc).

Quanto ao sistema nervoso central (SNC), na última década o entendimento do mecanismo de ação de drogas psicotrópicas evoluiu da modulação de um sistema neurotransmissor (ou receptor específico) para o de múltiplas e repetidas interferências no SNC. Assim, o efeito terapêutico dessas drogas resultaria destas múltiplas interferências que em conjunto modificam o estado funcional do trato neuronal ou área em questão (HYMAN; NESTLER, 1996). Com a constatação de que os antipsicóticos atípicos mostram um efeito terapêutico superior aos clássicos, e interferem com receptores pertencentes a diversos sistemas de neurotransmissão, o *cross talk* (modulação mútua) entre os vários sistemas cerebrais, a modulação indireta de receptores e as vantagens de interferir com múltiplos alvos relevantes a um dado distúrbio tem mudado o paradigma de drogas e terapias no SNC (TRUDEAU, 2004). É bem estabelecido o *cross talk* entre aminoácidos excitatórios e os sistemas serotoninérgico e dopaminérgico; a literatura é particularmente rica de dados que subsidiam a interação entre serotonina (5-HT) e dopamina (DA), entre glutamato e dopamina e entre serotonina e glutamato (JONES; BLACKBURN, 2002; COOK *et al.*, 2004; BREESE *et al.*, 2002).

Os dados obtidos através de modelos comportamentais demonstram que psiclatina administrada sistemicamente possui clara ação farmacológica. A psiclatina apresentou propriedades ansiolítica, antidepressiva, amnésica, além de interferir com comportamentos modulados por dopamina (Figura 5). Cabe lembrar que alguns dos modelos comportamentais usados neste estudo são comumente empregados em programas de desenvolvimento de novas drogas por terem valor preditivo quanto a propriedades terapêuticas em humanos.



Como falado no início dessa discussão, o entendimento do mecanismo de ação de drogas que atuam sobre o SNC evoluiu da modulação de um único sistema neurotransmissor ou único receptor para o de múltiplas e repetidas interferências no SNC – *cross-talk*. De acordo com os resultados deste trabalho, os efeitos de psiclatina são compatíveis com a literatura no que se refere às interações entre serotonina e dopamina e glutamato e dopamina, bem como aquelas que se referem entre a interação de serotonina e glutamato (Figura 5).

Resumidamente pode-se dizer que os efeitos farmacológicos apresentados por psiclatina em diversos modelos comportamentais são compatíveis com antagonistas serotoninérgicos ou agonistas inversos 5-HT<sub>2A/C</sub> e com antagonistas NMDA (Figura 4 e 5). A modulação de psiclatina sobre receptores dopaminérgicos parece ser indireta via receptores 5-HT e NMDA. A participação de receptores GABAérgicos não parece ser significativa, já que a administração prévia de picrotoxina não influencia a atividade ansiolítica de psiclatina, que também não bloqueia convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ).

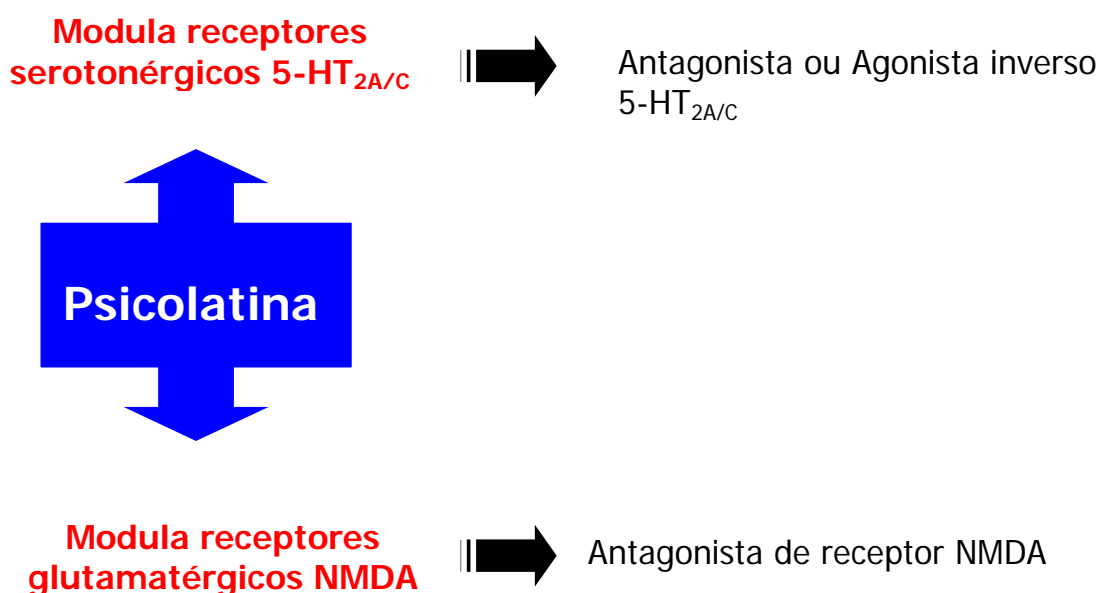


Figura 4: Possíveis mecanismos de ação de psiclatina.

Atividade ansiolítica

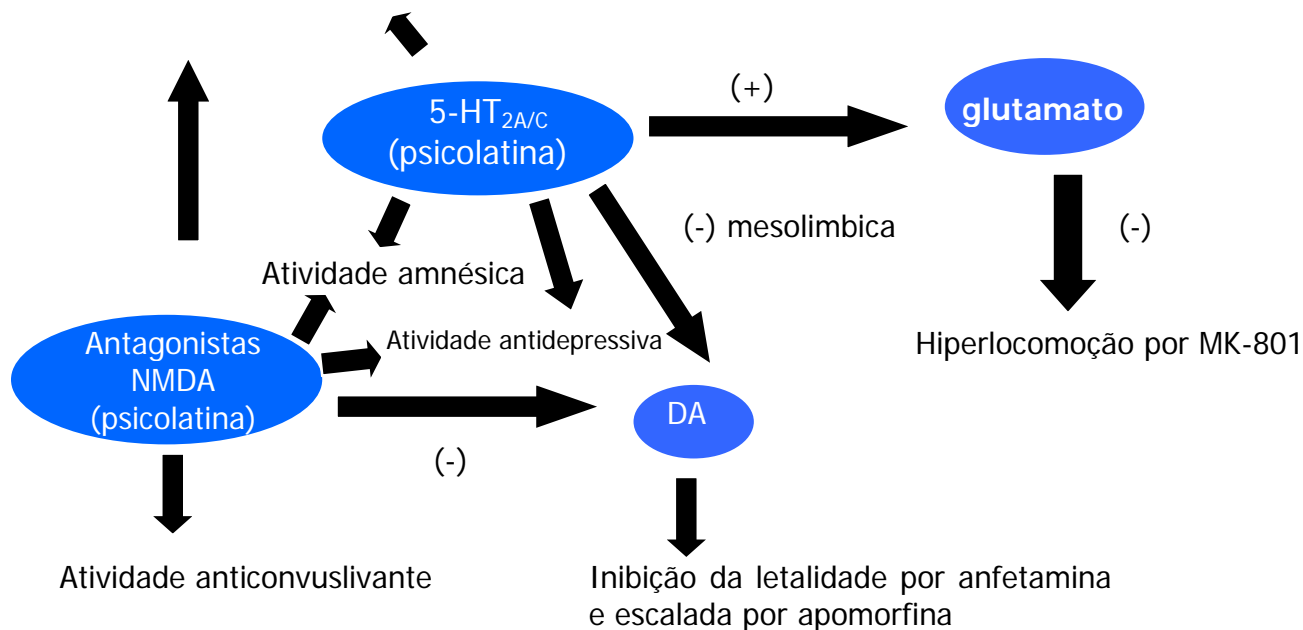


Figura 5: Possíveis atividades farmacológicas e mecanismos de ação de psicotatina.

Em conjunto, estes estudos reforçam a idéia de que o alcalóide indol-monoterpênico psicotatina pode ser explorado como modelo estrutural para o desenvolvimento de medicamentos ou fármacos que atuem em subtipos de receptores NMDA e 5-HT. Fármacos com este mecanismo de ação tem sido sugeridos como pré-anestésicos, antipsicóticos, e ainda para o tratamento do mal de Parkinson. Para tanto, o estudo do perfil psicofarmacológico de psicotatina poderia ser complementado através de outros modelos comportamentais tais como catalepsia induzida por haloperidol, estereotipia induzida por anfetamina, estereotipia induzida por MK-801; cabe ainda verificar a influência deste alcalóide na tolerância e dependência à morfina. Estudos neuroquímicos são também necessários para esclarecer o mecanismo de ação de psicotatina, especialmente analisando a interação deste composto com os sistemas serotoninérgico, dopaminérgico e glutamatérgico. O conjunto de correlatos neuroquímicos e perfil comportamental permitiriam uma melhor definição do mecanismo de ação, da aplicabilidade e da relevância da

modulação concomitante destes receptores no desenvolvimento de drogas psicoativas.

## 6 CONCLUSÕES

A psicotatina promove, em camundongos, vários efeitos farmacológicos relacionados ao sistema nervoso central, incluindo:

- Atividade ansiolítica, nos modelos de claro/escuro e placa perfurada, dependente de receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2A/C</sub>;
- Atividade anticonvulsivante, em convulsões induzidas por NMDA, mas não por pentilenotetrazol;
- Atividade antidepressiva no modelo de modelo de nado forçado;
- Atividade amnésica no teste de esquia inibitória;
- Atividade antipsicótica, prevenindo a letalidade induzida por anfetamina em animais agrupados, a hiperlocomção induzida por MK-801 e o comportamento de escalada induzido por apomorfina;
- as doses tóxicas de psicotatina são bem superiores às que apresentam as atividades acima.

Estes efeitos psicofarmacológicos parecem estar relacionados com:

- Modulação de receptores serotoninérgicos 5HT<sub>2A/C</sub>;
- Bloqueio de receptores NMDA.

Os receptores gabaérgicos não parecem relevantes para atividade da psicotatina, mas os receptores dopaminérgicos podem ser indiretamente modulados pelas ações em NMDA e 5HT<sub>2A/C</sub>. Além disso, a psicotatina bloqueia tremores induzidos por oxotremorina, sugerindo atividade anticolinérgica.

Quanto à avaliação dos efeitos de psicolatina nos parâmetros de estresse oxidativo, verificou-se:

- Aumento da reatividade antioxidante total no hipocampo e córtex;
- Aumento do conteúdo de radicais livres (DCF) no hipocampo e redução no córtex;
- Ausência de efeito quanto à peroxidação lipídica (TBARS), oxidação dos resíduos de triptofano (TRI) e tirosina (TIR) no hipocampo e no córtex.

Os resultados sugerem que, assim como outros compostos indólicos, a psicolatina pode reduzir o dano induzido por situações de estresse oxidativo. As diferenças na modulação do estado oxidativo observadas em diferentes estruturas cerebrais pode ser explicada por diferenças no estado oxidativo basal dessas áreas, ou por uma distribuição diferencial de psicolatina.

É improvável que o perfil psicofarmacológico de psicolatina possa ser resultado de sua modulação num único sistema neurotransmissor, mas pode-se concluir que este composto apresenta um padrão semelhante a drogas que modulam receptores NMDA e 5-HT. O tipo de modulação que a psicolatina exerce nestes receptores só pode ser definitivamente esclarecida por estudos neuroquímicos, mas é compatível com antagonistas e agonistas inversos de 5-HT (ZANGROSSI *et al.*, 2001), ou antagonistas glutamatérgicos NMDA (HLINÁK; KREJČÍ, 2002).

Este trabalho demonstra a importância de estudos farmacológicos de produtos naturais na descoberta de compostos com mecanismo de ação farmacológica diferenciado. O termo *Psychotria*, que empresta o nome a toda a tribo Psychotriace, é aparentemente o resultado de uma transformação arbitrária feita por Lineaus, do nome *Psychotrophum* (PETIT, 1964). *Psychotrophum*, o nome dado por Browne, em 1756 é composto das duas palavras gregas: *psyche*=alma e

*trophos*=alimento (DILLENBURG; PORTO, 1985). Somando-se ao considerável corpo de dados farmacológicos conhecidos com extratos e compostos isolados de espécies do gênero *Psychotria*, os efeitos psicofarmacológicos aqui relatados para psicolatina não apenas reforçam o interesse nos alcalóides encontrados neste gênero; como também confirmam a adequação de sua denominação.

## 7 REFERÊNCIAS

ABI-DARGHAM, A.; MOORE, H. Prefrontal DA transmission at D1 receptors and the pathology of schizophrenia. **Neuroscientist**, v.9, n.5, p.404-416, 2003.

ADAMEC, R. E. *et al.* NMDA receptors mediate lasting increases in anxiety-like behavior produced by the stress of predator exposure-implications for anxiety associated with posttraumatic stress disorder. **Physiol. Behav.**, v.65, n.4/5, p.723-737, 1999.

ADJIBADÉ, Y. *et al.* Dimeric alkaloids from *Psychotria forsteriana*. **Phytochem.**, v.31, p.317-319, 1992.

ADJIBADÉ, Y. **Pharmacognosie du *Psychotria forsteriana* A. Gray (RUBIACEAE)-Aspects Botanique, Cinique et Essais Pharmacologiques Preliminares.** Paris: Universite Louis Pasteur de Strasbourg I. (Tese de Doutorado), 1989.

AGUILAR, J. L. *et al.* Anti-inflammatory activity of two different extracts of *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae). **J. Ethnopharmacol.**, v.81, p.271-276, 2002.

ALARCON, R. D.; AGUILAR-GAXIOLA, S. A. Mental health policy developments in Latin America. **Bull. World Health Organ.**, v.78, n.4, p.483-490, 2000.

ALEX, K. D. *et al.* Modulation of dopamine release by striatal 5-HT<sub>2C</sub> receptors. **Synapse**, v.55, p.242-251, 2005.

ALMEIDA-FILHO, N. *et al.* Brazilian Multicentric study of psychiatric morbidity. Methodological features and prevalence estimates. **Br. J. Psychiatry**, v.171, p.524-529, 1997.

AMADIO, M. *et al.* Emerging targets for the pharmacology of learning and memory. **Pharmacological Res.**, v.50, p.111-122, 2004.

AMADOR, T. A. *et al.* Antinociceptive profile of hodgkinsine. **Planta Med.**, v.66, p.1-3, 2000.

AMADOR, T. A. *et al.* Involvement of NMDA receptors in the analgesic properties of psychotridine. **Phytomedicine**, v.8, p.202-206, 2001.

ANDRADE, L. *et al.* The epidemiology of major depressive episodes: results from international consortium of psychiatric epidemiology (ICPE) surveys. **Int. J. Methods Psychiatr. Res.**, v.12, n.3, p.165, 2003.

ANDREASSEN, N. The evolving concept of schizophrenia: from Kraepelin to the present and future. **Schizophrenia Res.**, v.28, p.105-109, 1997.

ARVANOV, V.L.; WANG, R.Y. A selective 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist and a potential antipsychotic drug, facilitates N-methyl-D-aspartate-receptor mediated neurotransmission in the medial prefrontal cortical neurons in vitro. **Neuropsychopharmacol.**, v.18, p.197-209, 1998.

AZAM, S. *et al.* Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. **Med. Science Monit.**, v.9, n.9, p.BR335-330, 2003.

BALDESSARINI, R. Fármacos e o Tratamento dos Distúrbios Psiquiátricos: Depressão e Mania. IN: GOODMAN & GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 9 ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, cap.19, p.314-331, 1996.

BALICK, M. J. Ethnobotany and the identification of therapeutic agents from the rainforest. IN: **Bioactive Compounds from Plants**. Edit. Chadwick, D.L.; Marsh, J., p. 22-31 Chischerster (Ciba Foundation Symposium), 1990.

BALL, K. T.; BUDREAU, D.; REBEC, G. V. Acute effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on striatal single-unit activity and behavior in freely moving rats: differential involvement of dopamine D(1) and D(2) receptors. **Brain Res.**, v.994, n.2, p.203-15, 2003.

BARDGETT M.E. *et al.* NMDA receptor blockade and hippocampal neuronal loss impair fear conditioning and position habit reversal in C57B1/6 mice. **Brain Res. Bull.**, v.60, p. 131-142, 2003.

BATTISTI, J. J.; URETSKY, N. J.; WALLACE, L. J. NMDA glutamate receptors role in the development of context-dependent and independent sensitization of the induction of stereotypy by amphetamine or apomorphine. **Behav. Brain Res.**, v.114, p.167-174, 2000.

BEGON, M.; HARPER, J. L.; TOWNSED, C. R. Recursos. IN: **Ecologia, Indivíduos, Poblaciones y Comunidades**, p.76-123, Ediciones Omega, Barcelona, 1987.

BELMAKER, R. H.; BERSUDSK, Y. Y. Mechanism of atypicality of antipsychotic drugs. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v.27, p.1067-1069, 2003.



BEN-ELIYAHU, S.; MAREK, P.; VACCARINO, A. L. The NMDA receptor antagonist MK801 prevents long-lasting non-associative morphine tolerance in the rat. **Brain Res.**, v.575, n.2, p.304-308, 1992.

BENEYTEZ, M. E. *et al.* Preclinical pharmacology of B-20991, a 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist with anxiolytic activity. **Eur. J. Pharmacol.**, v.344, p.127-135, 1998.

BHANJI, N. H. *et al.* Late-onset agranulocytosis in a patient with schizophrenia after 17 months of clozapine treatment. **J. Clin. Psychopharmacol.**, v.23, n.5, p.522-523, 2003.

BONACCORSO, S. *et al.* SR46349-B, a 5-HT<sub>2A/2C</sub> Receptor Antagonist, Potentiates Haloperidol-induced Dopamine Release in Rat Medial Prefrontal Cortex and Nucleus Accumbens. **Neuropsychopharmacol.**, v.27, n.3, p.430-441, 2002.

BOTH, F. L. **Avaliação da atividade analgésica do alcalóide umbelatina isolado de *Psychotria umbellata* (Rubiaceae).** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade do Rio Grande do Sul, 2001.

BOTH, F. L. *et al.* Analgesic Properties of Umbellatine from *Psychotria umbellata*. **Pharmaceutical Biol.**, v.40, n.5, p.336-341, 2002.

BOTH, F. L. *et al.* Psychopharmacological profile of the alkaloid psychollatine as a 5HT<sub>2A/C</sub> serotonin modulator. **J. Nat. Prod.**, v.68, n.3, 374-380, 2005.

BOURIN, M.; POISSON, L.; LAROUSSE, C. Piracetam interaction with neuroleptics in psychopharmacological tests. **Neuropsychobiol.**, v.19, p.93-96, 1986.

BOURIN, M. *et al.* Cymemazine as an anxiolytic drug on the elevated plus maze and light/dark paradigm in mice. **Behav. Brain Res.**, v.124, p.87-95, 2001.

BREESE, R. G.; KNAPP, D. J.; MOY, S. S. Integrative role for serotonergic and glutamatergic receptor mechanisms in the action of NMDA antagonists: potential relationship to antipsychotic drug actions on NMDA antagonist responsiveness. **Neurosci. Behav. Rev.**, v.26, p.441-455, 2002.

BRESSAN, R. A.; PILOWSKY, L. S. Glutamatergic hypothesis of schizophrenia. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v.25, n.3, p.177-83, 2003.

BRUNDEGE, J. M.; DUNWIDDIE, T. V. Role of adenosine as a modulator of postsynaptic activity in the central nervous system. **Adv. Pharmacol.**, v.39, p.353-391, 1997.

BRUNETON, J. **Elementos de Fitoquímica y de Farnacognosia**. 1 ed. Espanha: Editorial Acribia, S.A., p.467-517, 1991.

BRUNETON, J. **Elementos de Fitoquímica y de Farnacognosia**. 1 ed. Paris, Editorial Acribia, S.A., 1993.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz. J. Med. and Biol. Res.**, v.33, p. 179-189, 2000.

CANO, A.; ALCARAZ, O.; ARNAO, M.B. Free radical-scavenging activity of indolic compounds in aqueous and ethanolic media. **Anal. Bioanal. Chem.**, v.376, p.33-37, 2003.

CARLSSON, A.; LINDQVIST, M. Effect of chlorpromazine or haloperidol on formation of 3-methoxytyramine and normetanephrine in mouse brain. **Acta Pharmacol. Toxicol.**, v.20, p.140-144, 1963.

CARLSSON, M.; CARLSSON, A. Interactions between glutamatergic and monoaminergic systems within basal ganglia-implications for schizophrenia and Parkinson's disease. **Trends Neurosci.**, v.13, p.272-276, 1990.

CARLSSON, A.; WATERS, N.; CARLSSON, M. L. Neurotransmitter interactions in schizophrenia-therapeutic implications. **Biol. Psychiatry**, v.46, p.1388-1395, 1999.

CARLSSON, A. *et al.* Network interactions in schizophrenia – therapeutic implications. **Brain Res. Rev.**, v.31, p.342-349, 2000.

CHETLEY, A. **Health Action International (HAI-Europa) AIS**. Peru: Bellido, 1994.

CHUNG, Y. C. *et al.* Clozapine increases both acetylcholine and dopamine release in rat ventral hippocampus: role of 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonism. **Brain Res.**, v.1023, p.54-63, 2004.

COOK, C. D. *et al.* Modulation of the locomotor activating effects of the noncompetitive NMDA receptor antagonist MK801 by dopamine D2/3 receptor agonist in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.77, p.309-318, 2004.

COQUOZ, D.; PORCHET, H. C.; DAYER, P. Central analgesic effects of antidepressant drugs with various mechanisms of action: desipramina, fluvoxamine and moclobemide. **Schweiz-Med-Wochenschr.**, v.121, n.49, p. 1843-1845, 1991.

COSTA-CAMPOS, L. *et al.* Antipsychotic-like Profile of Alstonine. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.60. , n.1, p.133 -141, 1998.

COSTA-CAMPOS, L. *et al.* Antipsychotic profile of alstonine: Ethnopharmacology of a traditional Nigerian botanical remedy. **Ann. Acad. Bras. Cienc.**, v.71, n.2, p.189-201, 1999.

COSTA-CAMPOS, L. *et al.* Anxiolytic properties of the antipsychotic alkaloid alstonine. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.77, n.3, p. 481-489, 2004.

COSTENTIN, J.; PROTAIS, P.; SCHWARTZ, J. C. Rapid and dissociated changes in sensitivities of different dopamine receptors in mouse brain. **Nature**, v. 257, p. 405-407, 1975.

CURTIS-PRIOR, P.; VERE, D.; FRAY, P. Therapeutic value of Ginkgo biloba in reducing symptoms of decline in mental function. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.51, p.535-541, 1999.

DAW, N. W.; STEIN, P. S. G.; FOX, K. The role of NMDA receptors in information processing. **Ann. Rev. Neurosci.**, v.16, p.207–222, 1993.

DE ALMEIDA-FLECK, M. P. *et al.* Major depression and its correlates in primary care settings in countries. 9-month follow-up study. **Br. J. Psychiatry**, v.186, p.41-47, 2005.

DEMYTTENAERE, K. *et al.* Prevalence, severity, and unmet need for treatment of mental disorders in World Health Organization World Mental Health Surveys. **JAMA** v.291, n.21, p.2581-2590, 2004.

DESMARCHELIER, C. *et al.* Total Reactive Antioxidant Potential (TRAP) and Total Antioxidant Reactivity (TAR) of Medicinal Plants used in Southwest Amazonia (Bolivia and Peru). **Int. J. Pharmacog.**, v.35, p.288-96, 1997.

DEURWAERDÈRE, *et al.* Constitutive Activity of the Serotonin<sub>2C</sub> Receptor Inhibits *In Vivo* Dopamine Release in the Rat Striatum and Nucleus Accumbens. **J. Neurosci.**, v.24, n.13, p.3235-3241, 2004.

DHAWAN, K. *et al.* Passiflora: a review update. **J. Ethnopharmacol.**, v. 94, n. 1, p. 1-23, 2004.

DILLENBURG, C. R.; PORTO, M. L. Rubiaceae - Tribo Psychotriace. **Boletim do Instituto de Biociências**, Porto Alegre, n.39, p.1-76, 1985.

DI MATTEO, V.; CACCHIO, M.; DI GIULIO, C. Esposito E. Role of serotonin<sub>2C</sub> receptors in the control of brain dopaminergic function. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.71, p.727-734, 2002.

DINGLELINE, R.; MCBAIN, C. J.; MCNAMARA, J. O. Excitatory amino acid receptors in epilepsy. IN: LODGE, D. & COLLINGRIDGE, G. **The Pharmacology of Excitatory Amino Acids**, A TIPS Special Report., Cambridge, p. 49-53, 1991.

DOMINGUEZ, R. A. Serotonergic antidepressants and their efficacy in obsessive compulsive disorder. **J. Clinical Psychiatry**, v.53, p.56-59, 1992.

EL-SHERBINY, D. A. *et al.* *Hypericum perforatum* extract demonstrates antioxidant properties against elevated rat brain oxidative status induced by amnestic dose of scopolamine. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.76, p.525-533, 2003.

ELISABETSKY, E.; SETZER, R. Caboclo concepts of disease, diagnosis and therapy: implications for ethnopharmacology and health systems in Amazonia. IN: PARKER, E. P. **The Amazonian Caboclo: Historical and Contemporary Perspectives**, v.32, pp. 243-278, Studies on Third World Societies Publication Series, Williamsburg, 1985.

ELISABETSKY, E.; CASTILHOS, Z. C. Plants used as analgesics by Amazonian caboclos as a basis for selecting plants for investigations. **J. Crude Drug Res.**, v.28, n.4, p.309-320, 1990.

ELISABETSKY, E.; SHANLEY, P. Ethnopharmacology in the Brazilian Amazon. **Pharmacol. Therapeutics**, v.64, n.2, p. 201-214, 1994.

ELISABETSKY, E. *et al.* Analgesic activity of *Psychotria colorata* (Willd ex R. & S.) Muell. Arg. **J. Ethnopharmacol.**, v.48, n.2, p.77-83, 1995.

ELISABETSKY, E. *et al.* Merging ethnopharmacology with chemotaxonomy: an approach to unveil bioactive natural products. The case of *Psychotria* alkaloids as potential analgesics. **Ciência e Cultura**, v.49, n.5/6, p.378-385, 1997.

ELLIOTT, K.; MINAMI, N.; KOLESNIKOV, Y. A. The NMDA receptor antagonist, LY274614 and MK-801, and the nitric oxide synthase inhibitor, NG-nitro-L-arginine, attenuate analgesic tolerance to the mu-opioid morphine but not to kappa opioids. **Pain**, v.56, p.69-75, 1999.

ENGELKE, F. Fitoterápicos e Legislação. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, v.1, n.1, p.10-15, 2003.

FARNSWORTH, N. R. The role of Ethnopharmacology in Drug Development. In: Chadwick, D. J. and Marsch, J. (Eds), **Bioactive Compounds from Plants**, New York, Ciba Foundation, p.2-10, 1990.

FEINBERG, I. Cortical pruning and the development of schizophrenia. **Schizophrenia Bull.**, v.16, p.567-568, 1990.

FERNANDES, E. *et al.* In vitro scavenging activity for reactive oxygen and nitrogen species by nonsteroidal anti-inflammatory indole, pyrrole, and oxazole derivative drugs. **Free Radic. Biol. Med.**, v.37, n.11, p.1895-1905, 2004.

FERRÉ, S. Adenosine-dopamine interactions in the ventral striatum: implications for the treatment of schizophrenia. **Psychopharmacol.**, v.133, p.107-120, 1997.

FERREIRA, S. H. **Medicamentos a Partir de Plantas Mediciniais no Brasil**, Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências; 1998.

FILE, S. E.; PELOW S. The effects of triazolobenzodiazepines in two animal tests of anxiety and in the holeboard. **Br. J. Pharmacol.**, v.86, p.729-735, 1985.

FILE, S. E. Recent Developments in Anxiety, Stress and Depression. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.54, n.1, p.3-12, 1996.

FLETCHER, A. *et al.* Electrophysiological, biochemical, neurohormonal and behavioural studies with WAY-100635, a potent, selective and silent 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist. **Behav. Brain Res.**, v.73, p.337-353, 1996.

FRY, J. **Common Diseases their Nature Incidence and Care**. 4 ed. Lancaster: MTP Press Limited, cap. 38 e 39, 1987.

GARD, P. R. *et al.* Strain differences in the anxiolytic effects of losartan in the mouse. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.69, p.35-40, 2001.

GARFIELD, D. The mask of psychotic diagnosis. **J. Am. Acad. Psychoanal. Dyn. Psychiatry** v.31, n.1, p.45-58, 2003.

GIFFORD, A. N.; PARK, M. H.; KASH, T. L. Effect of amphetamine-induced dopamine release on radiotracer binding to D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors in rat brain striatal slices. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v.362, p.413-418, 2000.

GOBERT, A. *et al.* Serotonin<sub>2C</sub> receptors tonically suppress the activity of mesocortical dopaminergic and adrenergic, but not serotonergic, pathways: a combined dialysis and electrophysiological analysis in the rat. **Synapse**, v.36, p.205-221, 2000.

GOLDBERG, D. P.; LECRUBIER Y. Form and frequency of mental disorders across centers. IN: ÜSTÜN, T. B.; SANTORIUS, N. (Org.). **Mental illness in general care: an international study**. Chichester: John Wiley; Sons, p. 332-334, 1995.

GOUTAREL, R.; GOLLNHOFER, O.; SILLANS, R. Pharmacodynamics and Therapeutic Applications of Iboga and Ibogaine. **Psychedelic Monographs and Essays**, p. 71-111, 1993.

GRAEFF, F. **Drogas Psicotrópicas e Seu Modo de Ação**. 2 ed. São Paulo: EPU, 1989.

GRENNAMYRE, J. T. *et al.* Alterations in L-glutamate binding in Alzheimer's and Huntington's diseases. **Science**, v.227, n.4693, p.1496-1499, 1985.

GRENNAMYRE, J. T.; PORTER, R. H. P. Anatomy and physiology of glutamate in the CNS. **Neurology**, v.44, n.8, p.7-13, 1994.

GRIEBEL, G.; PERRAULT, G.; SANGER, D. J. A Comparative Study of the Effects of Selective and Non-Selective 5-HT<sub>2</sub> Receptor Subtype Antagonists in Rat and Mouse Models of Anxiety. **Neuropharmacol.**, v.36, n.6, p.793-802, 1997.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **J. Neurochem.**, v. 59, p.1609-1623, 1992.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v.30, n.12, p.3864-3878, 1991.

HARBONE, J. B. Role of secondary metabolites in chemical defense mechanisms in plants. IN: CHADWICK, D. L.; MARSH, J. **Bioactive compounds from plants**, p. 126-139. Chischerster (Ciba Foundation Symposium), 1990.

HASCÖET, M.; BOURIN, M. A New Approach to the Light/Dark Test Procedure in Mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.60, n.3, p.645-653, 1998.

HEMINGWAY, S. R.; PHILIPSON, J. D. Alkaloids of the RUBIACEAE. IN: PHILIPSON, J.D.; ZENK, M.H. **Indole and Biogenetically related alkaloids**. ch.4, p.63-90, Academic London, 1980.

HIETALA, J.; SYVALAHTI, E. Dopamine in schizophrenia. **Ann. Med.**, v.28, n.6, p.557-61, 1996.

HLINÁK, Z.; KREJČÍ, I. MK-801 induced amnesia for the elevated plus-maze in mice. **Behav. Brain Res.**, v.131, p.221-225, 2002.

HOLLISTER, L.E. Agentes Antidepressivos. IN: KATZUNG, B.G. **Farmacologia Básica e Clínica**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.29, p.307-314, 1994.

HOYER, D.; HANNON, J. P.; MARTIN, G.R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.71, p.533-554, 2002.

HYMAN, S.E.; NESTLER, E.J. Initiation and Adaptation: a Paradigm for Understanding Psychotropic Drug Action. **Am. J. Psychiatry**, v.152, p.151-162, 1996.

IQBAL, N.; VAN PRAAG, H. M. The role of serotonin in schizophrenia. **Eur. Neuropsychopharmacol.**, v.5 (suppl.), p.11-13, 1995.

JANNIC, V. *et al.* Pyrrolidinoindoline alkaloids from *Psychotria oleoides* and *Psychotria lyciiflora*. **J. Nat. Prod.**, v.62, p.838-843, 1999.

JONES, B.; BLACKBURN, T. The medical benefit of 5-HT research. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.71, p.555-568, 2002.

KANE, J. M.; MAYERHOFF, D. Do negative symptoms respond to pharmacological treatment? **Br. J. Psychiatry**, v.155, n.7, p.115-118, 1989.

KANEKO, S. *et al.* Effects of several cerebroprotective drugs on NMDA channel function: evaluation using *Xenopus* oocytes and [3H]MK-801 binding. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 207, p.119-128, 1991.

KAPUR, S.; MAMO, D. Half a century of antipsychotics and still a central role for dopamine D(2) receptors. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psy.**, v.27, n.7, p.1081-1090, 2003.

KEEPERS, G. A.; CLAPPISON, V. J.; CASEY, D. E. Initial anticholinergic prophylaxis for neuroleptic-induced extrapyramidal syndromes. **Arch. Gen. Psychiatry**. v.40, p.1113-1117, 1983.

KELLEY, S. P; BRATT, A. M.; HODGE, C. W. Targeted gene deletion of the 5-HT<sub>3A</sub> receptor subunit produces an anxiolytic phenotype in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v.461, p.19-25, 2003.

KEMALI, D.; VECCHIO, M. D.; MAJ, M. Increased noradrenalin levels in CSF and plasma of schizophrenic patients. **Biol. Psychiatry**, v.17, p.711-717, 1982.

KERBER, V.A. **Análise dos alcalóides de *Psychotria brachiceras* Mull.Arg. e *P. umbellata* Vell., e o estabelecimento e caracterização de cultura de células de *P. umbellata* Vell.** Tese de doutorado, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999.

KETY, S. S. Norepinephrine in the central nervous system and its correlation with behavior. IN: CHIMITT, F.O. **The Neurosciences**. New York, p.229-336, 1970.

KHALIFA, E. A. Zuclopenthixol facilitates memory retrieval in rats: possible involvement of noradrenergic and serotonergic mechanisms. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v.75, p.755-762, 2003.

KIM, H. S. *et al.* Inhibition by noncompetitive NMDA receptor antagonists of apomorphine-induced climbing behavior in mice. **J. Life Sci.**, v.58, n.17, p.1397-1402, 1996.

KIM, H. S. *et al.* NMDA receptor antagonist inhibit apomorphine-induced climbing behavior not only in intact mice but also in reserpine-treated mice. **Behav. Brain Research**, v.100, p.135-142, 1999.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

LAGIS, N. H.; MAHMUD, Z.; TOIA, R. F. The alkaloids of *Psychotria rostrata*. **Planta Med.**, v.59, p.383-384, 1993.

LARA, D. R.; SOUZA, D. O. Schizophrenia: a purinergic hypothesis. **Méd. Hypotheses**, v.54, n.2, p.157-166, 2000.

LATYSHEVA, N. V.; RAYEVSKY, K. S. Chronic neonatal N-methyl-D-aspartate receptor blockade induces learning deficits and transient hypoactivity in young rats. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psy.**, v.27, p.787-794, 2003.

LEAL, M. B. **Estudo psicofarmacológico de espécies de *Psychotria* (Rubiaceae) do Estado do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: UFRGS. Curso de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, 1994. 98p. (dissertação de mestrado)

LEAL, M. B.; ELISABETSKY, E. Absence of alkaloids in *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae). **J. Ethnopharmacol.**, v.54, n.1, p.37-40, 1996a.

LEAL, M. B.; ELISABETSKY, E.. Opioid-like activity of *P. brachypoda*. **Int. J. Pharmacognosy**, v.34, n.4, p.267-272, 1996b.



LEMÉNAGER, D. *et al.* Hormone mediated alkaloids accumulation: implication of redox state in cytokinin signalling? **Université François-Rabelais, Tours - France**, 2004.

LEONARD, B. E. Pharmacological Differences of Serotonin Reuptake Inhibitors and Possible Clinical Relevance. **Drugs** v.43, suppl. 2, 1992.

LEPICARD, E. M. *et al.* Differences in anxiety-related behavior and response to diazepam in BALB/cByJ and C57BL/6J strains of mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.67, p.739-748, 2000.

LI, L. *et al.* Effects of spiramine T an antioxidant enzymatic activities and nitric oxide production in cerebral ischemia-reperfusion gerbils. **Brain Res.**, v.944, p.205-209, 2002.

LIANG, K. C. Pre- or post-training injection of buspirone impaired retention in the inhibitory avoidance task: involvement of amygdala 5-HT<sub>1A</sub> receptors. **Eur. J. Neurosci.**, v.11, p.1491-1500, 1999.

LIBOT, F. *et al.* Rubiacées D'Océanie: Alcaloides de *Psychotria oleoides* de Nouvelle-Calédonie et de *Calycodendron milnei* du Vanuatu (Nouvelles-Hébrides). **J. Nat. Prod.**, v.50, n.3, p.468-473, 1987.

LIPTON, S. A.; ROSENBERG, P. A. Excitatory Amino Acids as a Final Common Pathway for Neurologic Disorders. **Eng. J. Med.**, v.380, p.613-622, 1994.

LISSI, E.; PASCUAL C.; DEL CASTILHO, M. Luminol luminescence induced by 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) thermolysis. **Free Radic. Res. Comm.**, v.17, p.299-23, 1992.

LISSI, E. *et al.* Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. **Free Radic Biol Med**, v. 18, p.153-158, 1995.

LIWSZYC, G.E. *et al.* Daime-a ritual herbal potion. **J. Ethnopharmacol.**, v.36, p.91-92, 1992.

LOPES, S. O. **Análise química e cultivo in vitro de *Psychotria leiocarpa* Cham. et Schlecht. e *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae).** Porto Alegre: UFRGS. Curso de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. (dissertação de mestrado), 1998.

LÖSCHER, W.; ANNIES, R.; HÖNACK, D. The N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 induces increases in dopamine and serotonin metabolism in several brain regions of rats. **Neurosci. Lett.**, v.128, p.191-194, 1991.

LOTSOF, H. S. Ibogaine in the Treatment of Chemical Dependence Disorders: Clinical Perspectives. **Maps**, v.5, n.5, 1995.

MALMBERG-AIELLO, P. *et al.* Mouse light/dark test reveals anxiogenic-like effects by activation of histamine H1 receptors. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.71, p.321-326, 2002.

MANTOVANI, M. *et al.* Melatonin exerts an antidepressant-like effect in the tail suspension test in mice: evidence for involvement of N-methyl-D-aspartate receptors and the L-arginine-nitric oxide pathway. **Neurosci. Lett.**, v.343, p.1-4, 2003.

MAREK, G. J. *et al.* Physiological antagonism between 5-hydroxytryptamine<sub>2A</sub> and group II metabotropic glutamate receptors in prefrontal cortex. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.292, p.76-87, 2000.

MATTHYSE, S. Antipsychotic drug actions: a clue to the neuropathology of schizophrenia? **Fed. Proc.**, v.32, p.200-205, 1973.

McGAHON, B.M. *et al.* Age-related changes in oxidative mechanisms and LTP are reversed by dietary manipulation. **Neurobiol. Aging.**, v.20, p.643-653, 1999.

McKENNA, D. J.; TOWERS, G. N. T.; ABBOT, F. Monoamine oxidase inhibitors in South American hallucinogenic plants: triptamine and  $\beta$ -carboline constituents of Ayahuasca. **J. Ethnopharmacol.**, v.10, p.195-223, 1984.

McKENNA, D. J. Clinical investigations of the therapeutic potential of ayahuasca: rationale and regulatory challenges. **Pharmacol. Ther.**, v.102, p.111-129, 2004.

MEADOR-WOODRUFF, J. H; HEALY, D. J. Glutamate receptor expression in schizophrenic brain. **Brain Res. Rev.**, v.31, n.2/3, p.288-394, 2000.

MELDRUM, B. S. Mechanism based approaches to anticonvulsant therapies: modulation of inhibitory and excitatory transmission. IN: MELDRUM, B. S.; WILLIAMS, M. **Current and Future Trends in Anticonvulsant, Anxiety and Stroke Therapy**: proceedings of a symposium held at Princeton, New Jersey. USA: Willey-Liss, p.31-43, 1990.

MELDRUM, B. S. The role of Glutamate in Epilepsy and Other CNS Disorders. **Neurology**, v.44, n.8, p.14-23, 1994.

MELTZER, H. Y. Atypical Antipsychotics Drugs. IN: Bloom FE, Kupfer DJ eds. **Psychopharmacology: the fourth generation of progress**. New York: Raven Press Ltd., pp. 1277-1286, 1995.

MELTZER, H. Y. *et al.* Serotonin receptors: their key role in drugs to treat schizophrenia. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psy.**, v.27, p.1159-1172, 2003.

MENESES, A.; HONG, E. Effects of 5-HT<sub>4</sub> receptor agonists and antagonists in learning. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.56, n.3, p. 347-351, 1997.

MISANE, I.; ÖGREN, S. O. Multiple 5-HT receptors in passive avoidance: comparative studies of p-chloroamphetamine and 8-OH-DPAT. **Neuropsychopharmacol.**, v.22, n.2, p.168-190, 2000.

MOGHADDAM, B. *et al.* Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. **J. Neurosci.**, v.17, p.2921-2927, 1997.

MOHN, A. R. *et al.* Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. **Cell**, v. 98, p.427-436, 1999.

MOORE, N. A.; AXTON, M. S. Production of climbing behaviour in mice requires D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptor activation. **Psychopharmacol.**, v.94, p.263-266, 1988.

MORAES, M. O. *et al.* Avaliação clínica da eficácia e segurança de fitoterápicos no Brasil. **Arquivos Brasileiros de Fitomedicina Científica**, v.1, p.30-38, 2003.

MORENO, R. A.; MORENO, D. H. Transtornos do Humor. IN: NETO, M.R.L. *et al.* **Psiquiatria Básica**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1995.

OLNEY, J. W.; FARBER, N. B. Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. **Arch. Gen. Psychiatry.**, v.52, p.998-1007, 1995.

O'NEILL, M. Screening plants for leads to novel medicines. **J. Pharm. Med.**, v.12, p.211-217, 1998.

ORGANIZAÇÃO Panamericana da Saúde. **CID-10: Classificação Estatística Internacional de Doenças**. 8 ed. São Paulo: EDUSP, 2000.

ORLAND, M. J.; SALTMAN, R. J. **Manual of Medical Therapeutics**. 25 ed. Boston: Little, Brown and Company, 1989.

PATEL, V.; KLEINMAN, A. Poverty and common mental disorders in developing countries. **Bull. World Health Organ**, v.81, n.8, p.609-615, 2003.

PEHEK, E. A. *et al.* M100,907, a selective 5-HT<sub>2A</sub> antagonist, attenuates dopamine release in the rat medial prefrontal cortex. **Brain Res.**, v.888, p.51-59, 2001.

PELLETIER, S. W. (Ed.) **Chemistry of the alkaloids**. Nova Iorque: Van Nostrand Reinhold, 1970. 795 p.

PEREIRA, C. *et al.* Estratégias de neuroproteção: Efeito da vimpocetina em modelos *in vitro* de estresse oxidativo. **Acta Médica Portuguesa**, v.16, p.401-406, 2003

PERES, O. *et al.* Toxicologia aguda e atividade antiinflamatória e analgésica de extrato hidroalcoólico de *Leonorus sibiricus* L. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, v.1, n.3, p.110-118, 2003.

PERKINS, M.; DRAY, A. Novel pharmacological strategies for analgesia. **Ann. Rheumatic Disease**, v.55, n.10, p. 715-722, 1996.

PERRY, L. M. **Rubiaceae - dans Medicinal Plants of East and Southeast Asia**. MIT Press, p.347-360, 1980.

PETIT, E. Les espèces africaines du genre *Psychotria* L. (Rubiaceae). I. **Bull. Jard. Bot. Brux.** Bruxelles, v.34, p.1-229, 1964.

PETROVICK, P. R.; MARQUES, L. C.; DE PAULA, I. C. New rules for phytochemical drug registration in Brazil. **J. Ethnopharmacol.**, v.66, p.51-55, 1999.

PISCOYA, J. *et al.* Efficacy and safety of freeze-dried cat's claw in osteoarthritis of the knee: mechanisms of action of the species *Uncaria guianensis*. **Inflamm. Res.**, v.50, p.442-448, 2001

PRICE, D. D. *et al.* NMDA-receptor antagonists and opioid receptor interactions as related to analgesia and tolerance. **J. Pain Symptom. Manage**, v.19, n.1, S7-S9, 2000.

PROCTER, A. W. *et al.* Evidence of glutamatergic denervation and possible abnormal metabolism in Alzheimer's disease. **J. Neurochem.**, v.50, p.790-802, 1988.

PROTAIS, P.; COSTENTIN, J; SCHWARTZ, J. Climbing behavior induced by apomorphine in mice: a simple test for the study of dopamine receptors in striatum. **Psychopharmacol.** v. 50, p.1-6, 1976.

RADA, P. *et al.* Glutamate release in the nucleus accumbens is involved in behavioral depression during the porsolt swim test. **Neurosci.**, v.119, p. 557-565, 2003.

RADÁK, Z. *et al.* Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. **Neurochem. Int.**, v.38, n.1, p.17-23, 2001.

RAKIC, P.; BOURGEOIS, J. P.; GOLDMAN-RAKIC, P. S. Synaptic development of the cerebral cortex: implications for learning, memory, and mental illness. **Prog. Brain Res.**, v.102, p.227-243, 1994.

RANG, H.; DALE, M.; RITTER, J. M. **Farmacologia.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 4 ed., 2001.

RASKIN, I. *et al.*,. Plants and human health in the twenty-first century. **TRENDS in Biotechnology** v.20, n.12, p.522-531, 2002.

REGIER, D. A. *et al.* The APA classification of mental disorders: future perspectives. **Psychopathol.**, v.35, n.2/3, p.166-170, 2002.

RELATÓRIO Sobre a Saúde no Mundo, 2001 – Organização Panamericana da Saúde – Organização Mundial da Saúde – ONU, World Health Report – WHO – Genève – Swiss. **PsiWeb.** Disponível em: <http://www.psiqweb.med.br/acad/oms1.html>. Acesso em: 20 nov. 2003.

RIMONDINI, R. *et al.* Adenosine A<sub>2A</sub> agonists: a potential new type of atypical antipsychotic. **Neuropsychopharmacol.**, v.17, p.82-91, 1997.

RIVIER, L.; LINDGREN, J. E. "Ayahuasca", The South American Halucinogenic Drink: An Ethnobotanical and Chemical Investigation. **Economic Botany**, v.26, p.101-129, 1972.

ROBBRECHT, E. **Tropical woody RUBIACEAE.** Opera Botanica. v.1, 271p., 1988.

ROGÓZ, Z. *et al.* Synergistic effect of uncompetitive NMDA receptor antagonists and antidepressant drugs in the forced swimming test in rats. **Neuropharmacol.**, v.42, p.1024-1030, 2002.

ROSA, A. O. *et al.* Involvement of NMDA receptors and L-arginine-nitric oxide pathway in the antidepressant-like effects of zinc in mice. **Behav. Brain Res.**, v.144, p.87-93, 2003.

ROTH, J. Drugs Used in the Treatment of Mood Disorders. IN: SMITH, A.; REYNARD, E. **Essentials of Pharmacology**. Philadelphia: Saunder Company, 1995.

ROULLET, P. *et al.* NMDA and AMPA antagonist infusions into the ventral striatum impair different steps of spatial information processing in a nonassociative task in mice. **The J. Neurosci.**, v.21, n.6, p. 2143-2149, 2001.

SCHWARCZ, R.; MELDRUM, B. Excitatory Amino Acid Antagonists Provide a Therapeutic Approach to Neurological Disorders. **The Lancet**, p. 140-143, 1985.

SHIM, S. S. *et al.* Actions of butyrophenones and other antipsychotic agents at NMDA receptors: relationship with clinical effects and structural considerations. **Neurochem. Int.**, v.34, p.167-175, 1999.

SHIRAKAWA, I.; BRESSAN, A.; CHAVES, A. C. Tratamento Farmacológico da Esquizofrenia. IN: SHIRAKAWA, I.; CHAVES, A. C.; MARI, J. J. (Ed.). **O desafio da esquizofrenia**. São Paulo: Lemos Editorial, 2001. p.25-32.

SKOLNICK, P. Antidepressant of the new millennium. **Eur. J. Pharmacol.**, v.375, p.31-40, 1999.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Plantas da medicina popular do Rio Grande do Sul**. 4 ed., p. 11. Porto Alegre: Editora da Universidade/UFRGS, 1995.

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Resumo preliminar das rubiáceas de Santa Catarina. **Sellowia**, v.7, p. 13-86, 1956.

SMITH, J. A.; BOYER-MILLAR, C.; GOUDIE, A. J. Does MK-801 discrimination constitute an animal model of schizophrenia useful for detecting atypical antipsychotics? **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.64, n.2, p.429-433, 1999.

SOLANA-FIGUEROA, R. *et al.* Enhanced inhibitory avoidance training protects against the amnesic effect of p-chloroamphetamine. **Life Sci.**, v.71, p.391-399, 2002.

SOULIMANI, R. *et al.* Behavioural effects of *Passiflora incarnata* L. and its indole alkaloid and flavonoid and maltol in the mouse. **J. Ethnopharmacol.**, v.57, p.11-20, 1997.

SRIRAM, D. *et al.*, Camptothecin and its analogues: a review and their chemotherapeutic potential. **Nat. Prod. Res.**, v.19, n.4, p.393-412, 2005.

STOLC, S. Indole derivatives as neuroprotectants. **Life Sciences**, v.65, n.18/19, p.1943-1950, 1999.

SUN, J. *et al.* Effects of natural products on ischemic diseases and cardiovascular system. **Acta Pharmacol. Sin.**, v.23, n.12, p.1142-1151, 2002.

SVENSSON, T. Dysfunctional brain dopamine systems induced by psychotomimetic NMDA-receptor antagonists and the effects of antipsychotic drugs. **Brain Res. Rev.**, v.31, p.320-329, 2000.

TAKAYAMA, H. *et al.* Studies on the synthesis and opioid agonistic activities of mitragynine-related indole alkaloids: discovery of opioid agonists structurally different from other opioid ligands. **J. Med. Chem.**, v.45, n.9, p.1949-1956, 2002.

TAKEDA, H.; TSUJI, M.; MATSUMIYA, T. Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v.350, p.21-29, 1998.

TAYLOR, C. M. *Cephaelis* (Rubiaceae: Psychotriaceae). Missouri Gardens, 1997. Disponível na Internet no endereço <http://www.mobot.org/MOBOT/STAFF/RESEARCH/taylor/cephaeli.html>

TRETTNER, L.; ADAM-VIZI, V. The neuroprotective drug vinpocetine prevents veratridine-induced  $[Na^+]_i$  and  $[Ca^{2+}]_i$  rise in synaptosomes. **Neuroreport**, v.9, p.1849-1853, 1998.

TRUDEAU, L. E. Glutamate co-transmission as an emerging concept in monoamine neuron function. **J. Psychiatr. Neurosci.**, v. 29, n.4, p.296-310, 2004.

TRUJILLO, K. A.; AKIL, H. Inhibition of Morphine Tolerance and Dependence by the NMDA Receptor Antagonist MK-801. **Science**, v.251, p.85-87, 1991.

VAN DE SANTOS, L. *Psychotria suterella* Muell. Arg.: caracterização de alcalóides, análise farmacológica e cultivo in vitro de calos e raízes. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999.

VEROTTA, L. *et al.* Pyrrolidinoindoline Alkaloids from *Psychotria colorata*. **J. Nat. Prod.**, v.61, n.3, p.392-396, 1998.

VINEIS, P.; PORTA, M. Causal Thinking, Biomarkers, and Mechanisms of Carcinogenesis. **J.Clinical Epidemiol.**, v.49, n.9, p.951-956, 1996.

ZANGROSSI JR., H. *et al.* Serotonergic regulation of inhibitory avoidance and one-way sscape in the rat elevated T-maze. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.25, p.637-645, 2001.

ZANINI, A. C.; OGA, S. **Farmacologia Aplicada**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 1985.

ZHAO, B.; MOOCHHALA, S. M.; THAM, S. Y. Biologically active components of *Physostigma nenenosum*. **J. Chromatgr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.**, v.812, n.1/2, p.183-192, 2004.

ZIPURSKY, R. B. *et al.* Widespread cerebral grey matter volume deficits in schizophrenia. **Arch. Gen. Psychiatry**, v.49, p.195-205, 1992.

WANG, P. S.; SIMON, G. E.; KESSLER, R. C. The economic burden of depression and the cost-effectiveness of treatment. **Int. J. Methods Psychiatr. Res.**, v.12, n.1, p.22-23, 2003.

WANG, P. S. *et al.* Effects of major depression on moment-in-time work performance. **Am. J. Psychiatry**, v.161, n.10, p.1885-1891, 2004.

WELLS, J. E. *et al.* Christchurch Psychiatric Epidemiology Study, Part I: Methodology and lifetime prevalence for specific psychiatric disorders. **Aust. N. Z. J. Psychiatry**, v.23, n.3, p.315-326, 1989.

WHEELWRIGHT, E. G. **Medicinal Plants and Their History**. Dover Publications, INC., New York, 1994.

WIESENFELD-HALLIN, Z. Combined Opioid-NMDA Antagonist Therapies: What advantages do they offer for the control of pain syndromes? **Drugs**, v.55, n.1, p.1-4, 1998.

WILDE, M. Fluvoxamine: An Updated Review of its Pharmacology and Therapeutic Use in Depressive Illness. **Drugs**, v.46, n.5, p.895-921, 1993.

WILLAMAN, J. J.; SCHUBERT, B. G. **Alkaloid bearing plants and their contained alkaloids**. ARS, USDA, Twch. Bull. 1234, Supt Documents, Govt. Print Off., Washington DC, 1961.

WILLIAMS, J. E. Review of Antiviral and Immunomodulating Properties of Plants of the Peruvian Rainforest with a Particular Emphasis on Uña de Gato and Sangre de Grado. **Altern. Med. Rev.**, v.6, n.6, p. 567-79, 2001



WITHERUP, K. M.; BOGUSKY, P. S. A.; RAMJIT, H. Cyclopsychotride A, a biologically active, 31-residue cyclic peptide isolated from *Psychotria longipes*. **J. Nat. Prod.**, v.57, n.12, p. 1619-1625, 1994.

WÖLFLE, A. *et al.* N-acetylserotonin is a better extra- and intracellular antioxidant than melatonin. **FEBS Letters** v. 449, p.206-210, 1999.

WOOLLEY, D. W.; SHAW, E. N. Evidence for the participation of serotonin in mental processes. **Ann. N Y Acad. Sci.**, v.66, n.3, p.649-665, 1957.

YAMADA, C. S. B. Fitoterapia: sua história e importância. **Revista Racine**, ano VIII v.43, p.50-51, 1998.

YAMAMOTO, K. *et al.* Possible noradrenergic dysfunction in schizophrenia. **Brain Res. Bull.**, v.35, n.5/6, p.529-543, 1994.

YAN, Q-S. *et al.* Dizocilpine (MK-801) increases not only dopamine but also serotonin and norepinephrine transmissions in the nucleus accumbens as measured by microdialysis in freely moving rats. **Brain Res.**, v.765, p. 149-158, 1997.



## ANEXO 1

### **Antioxidative and prooxidative properties of the indole monoterpene alkaloid psychollatine.**

Fernanda L. Both<sup>a,b</sup>, Ionara R. Siqueira<sup>c</sup>, Vitor A. Kerber<sup>d</sup>, Amélia T. Henriques<sup>a</sup> and Elaine Elisabetsky\*<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, Brazil;

<sup>b</sup>Laboratório de Etnofarmacologia, Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, Brazil;

<sup>c</sup>Centro Universitário UNIVATES, Lajeado, RS, Brazil.

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

**\*Corresponding author:** Tel/Fax: (+)55 51 33163121.

*E-mail address:* elaine.elisabetsky@gmail.com. Caixa Postal 5072, 90041-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

## **Abstract**

The aim of this study was to evaluate the *in vivo* antioxidant effect of psychollatine. Adult male mice were treated (i.p.) with saline or psychollatine (7.5 and 30 mg/kg), and the hippocampi and cerebral cortex dissected out 30 min latter to measure free radicals content, damage to macromolecules and total antioxidant capacity. Psychollatine administration reduced free radicals level in the cortex, however, paradoxically, increased in hippocampus the high dose group, as well as increased the total antioxidant capacity in hippocampus and cortex. However, psychollatine was devoid of effects on lipid peroxidation and on oxidation of proteins in both brain structures cerebral cortex and hippocampus. The study suggests that psychollatine is able to modify the cellular antioxidant network efficacy in the brain, ultimately reducing the damage in oxidative stress conditions.

*Keywords:* *Psychotria umbellata*, psychollatine, antioxidant activity, indolic alkaloid, brain

## Introduction

Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) are produced during normal metabolism, specially by cellular respiration (Fernandes et al., 2004, El-Sherbiny et al., 2003). The continuous overproduction of ROS and RNS, and/or the decrease in antioxidant defenses (oxidative stress) may induce cerebral damage, either directly by interacting and destroying cellular proteins, lipids and DNA, or indirectly by affecting normal cellular signaling pathway and gene regulation (Li et al., 2002, Sun et al., 2002). This continuous damage contributes to the development of several chronic diseases of the nervous system, such as stroke, neurotrauma and chronic brain ischemia (El-Sherbiny et al., 2003).

Various products can play an important role within this context in two aspects: enhancing the activity of original cellular antioxidants resources or by neutralizing free radicals (Sun et al., 2002). Among the compounds interfering with the effects of ROS, indole derivatives constitute a distinct chemical and pharmacological group (Stolc, 1999).

Indoles are related to the metabolism of tryptophan and present substitutions in different positions of the indolic ring (Fig. 1) (Cano et al., 2003, Williams, 2001). In animals, a most significant group of indolic compounds is that related with melatonin. Besides playing a hormonal role, melatonin has been extensively studied as a potent scavenger of hydroxyl radical, peroxynitrite and hypochlorous acid, as well as singlet oxygen quencher (Cano et al., 2003, Stolc, 1999) exhibiting distinct antioxidant features in vitro as well as in vivo (Reiter, 1998).

5-hydroxytryptamine (serotonin), another indole derivative, exhibits a wide range of physiological actions. Serotonin is also reported to protect biological tissues against radiation injury, to interact with or to scavenge ROS generated by ionizing radiation, and act as antioxidant in lipid system, although behaving as pro-oxidants in a non-lipid systems (Stolc, 1999).

Other important indolic compounds are the plant indole alkaloids vinblastine, vincristine, vincamin and camptothecin isolated from *Catharanthus*

*roseus* L. Don. Vinpocetine, a derived synthetic of the alkaloid vincamin, possesses antioxidant activity capable to reduce the formation of ROS and lipid peroxidation (Pereira et al., 2003). Other synthetic indolic compound (beta carboline compound), stobadine, is an agent with remarkable antioxidant or radical scavenging actions (Stolc, 1999).

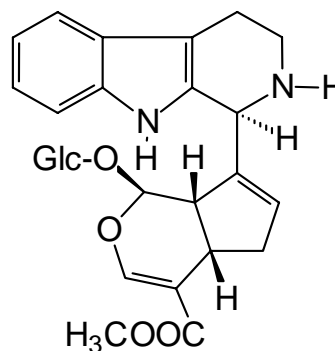
It has been suggested that the anti-inflammatory activity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, like indomethacin, also indole derivatives, may be partly attributed to its ability to scavenge ROS and RNS (Fernandes et al., 2004).

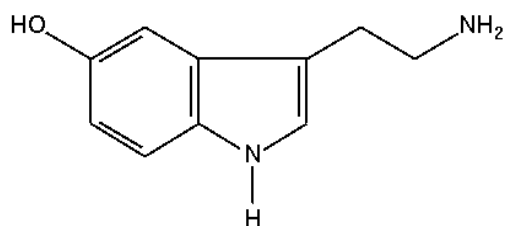
Psychollatine is an indol-monoterpene alkaloid (isolated from *Psychotria umbellata* Vell., Rubiaceae) structurally related to serotonin (Fig. 1). Three alkaloids have been identified in this species, psychollatine being the major one (nearly 1.3% w/w of the dry plant). We have previously reported that psychollatine (formerly known as umbellatine) possess mild analgesic and anti-inflammatory activity against a number of algogenic stimuli suggesting the participation of opioid and NMDA glutamate receptors (Both et al., 2002) and anxiolytic, sedative, antidepressives and amnesic possibly involving the participation of 5-HT<sub>2A/C</sub> receptors (Both et al., 2005).

Considering that indoles demonstrate antioxidant activity and that psychollatine possess multiple mechanism of action, including a involvement with NMDA receptors, which may be implicated with neuroprotectant activity, the present study was undertaken to further investigate the *in vivo* antioxidative properties of psychollatine.

Serotonin

Psychollatine





**Figure1. Molecular structure of psychollatine and serotonin**

## **Material and Methods**

### *Plant material*

*Psychotria umbellata* Vell.(Rubiaceae) leaves were collected at Torres (Rio Grande do Sul, Brazil) in 2003; voucher material (MBM 48571) has been deposited at the herbarium of the Museu Botânico Municipal de Curitiba (PR, Brazil).

### *Alkaloid isolation*

Dried leaves (100g) were extracted 3-times with EtOH at room temperature, each for a week. The extract was concentrated under vacuum at 40°C resulting in dark green syrup. The syrup was dissolved in HCl 2% (0.5l) and partitioned with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The acid solution was alkalized with NH<sub>4</sub>OH 25% until pH = 10 and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. From the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extract 954 mg of a colorless amorphous compound was precipitated. Purity of the compound was checked by TLC with silica gel 60F254 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH/NH<sub>3</sub> vapor - 85:15 - R<sub>f</sub> = 0.2) and HPLC (column: NOVAPACK C18 150 mm x 3.9 mm - Waters; MeOH:H<sub>2</sub>O - 50:50 as eluent and a Photo Diode Array as detector; R<sub>t</sub> = 2.13 min).

### *Chemicals*

Thiobarbituric acid and Trolox were obtained from Merck, ABAP was obtained from Wako Chemicals USA, Inc., 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), 2'-7'-dichlorofluorescein (DCF), trichloroacetic acid (TCA), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 5-amino-2,3-dihydro-1,4-phtalazinedione (luminol), and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stock solution were purchased from Sigma Chemical Co.

### *Animals and psychollatine administration*

Experiments were performed with male adult mice (CF1), acquired from Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) with 2 months of age. Animals were maintained in our owns facilities (22°±1°C, 12 h light/dark cycle, free access to food [Nuvilab CR1] and water) for at least two weeks before experiments. All procedures were carried out according to institutional policies on experimental animal handling. Saline 0.9% or psychollatine 7.5 or 30 mg/kg were administered intraperitoneally (0.1 ml/10g); this dose was chosen because it proved to present anxiolytic and analgesic (when co-administrated with MK-801) activity in previous studies (Both et al., 2002; Both et al., 2005).

### *Preparation of brain samples*

Mice were decapitated 30 min after drug administration; the brain was quickly excised and placed on ice-cold glass plate. Hippocampi and cerebral cortex were dissected out, weighted, instantaneously placed in liquid nitrogen and stored at -70°C until experimental day. Brain tissues were homogenized in 10 vol. of ice-cold phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) containing KCl (140 mM), EDTA (1 mM) and phenylmethylsulfonyl fluoride (1 mM). The homogenate was centrifuged at 960xg



for 10 min to remove nuclei and cell debris; the supernatant was used for the assays. All steps were carried out at 4°C.

### **Free radical content**

To assess free radicals levels we used 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) as a probe. An aliquot of the sample was incubated with DCFH-DA (100 µM) at 37°C for 30 min; the reaction mixture was concluded at 4°C. The formation of the oxidized fluorescent derivative (DCF) was monitored at excitation and emission wavelengths of 488 nm 525 nm, respectively, using a fluorescence spectrophotometer (Hitachi F-2000). Free radicals content was quantified using a DCF standard curve and results were expressed as pmol of DCF formed/mg protein. All procedures were performed in the dark, and blanks containing DCFH-DA (no homogenate) and homogenate (no DCFH-DA) were processed for measurement of autofluorescence (Driver et al., 2000; Sriram et al., 1997).

### **Lipid peroxidation assay**

The evaluation of formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) was based on Buege and Aust (1978). Sample aliquots were incubated with 10% trichloroacetic acid (TCA) and 0.67% thiobarbituric acid (TBA). The mixture was heated on a boiling water bath for 30 min, an equal volume of n-butanol added and the final mixture centrifuged; the organic phase was collected for fluorescence measurements, at excitation and emission wavelengths of 515 and 553 nm, respectively (Bromont et al., 1989). 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMP) was used as standard. Results are reported as pmol MDA /mg protein.

#### *Oxidation of protein tryptophan residues (TRI)*

Samples were solubilized in sodium dodecyl sulfate (SDS) at final concentration of 0.1%. The intrinsic tryptophan fluorescence was determined at excitation and emission wavelengths of 280 and 345 nm, respectively, using a fluorescence spectrophotometer Hitachi F-2000 (Gusow et al., 2002).

#### *Oxidation of protein tyrosine residues (TIR)*

Samples were solubilized in SDS at final concentration of 0.1%. The intrinsic tyrosine fluorescence was determined at excitation and emission wavelengths of 277 and 320 nm, respectively (Bondy, 1996).

#### *Total Antioxidant Reactivity (TAR) Assay*

The TAR assay is based on luminol-enhanced chemiluminescence (CL) induced by an azo initiator (Lissi et al., 1992; Lissi et al., 1995; Desmarchelier, 1997). The reaction mixture contained 2 mM ABAP and 6 mM luminol in glycine buffer. TAR values were determined by assessing the initial decrease of luminescence calculated as the ratio “ $I_0/I$ ”, where “ $I_0$ ” is the CL in the absence of additives, and “ $I$ ” is the CL after the addition of 20 nM Trolox or samples (1  $\mu$ l). TAR values were expressed as equivalents of Trolox concentration per mg of protein.

#### *Protein Assay*

The total protein concentration was determined using the method described by Bradford (1976) with bovine serum albumin as the standard.

### *Statistical analysis*

Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) with *post hoc* analysis by the Duncan's multiple range test. Differences were considered significant when  $P \leq 0.05$ . Results are expressed as mean  $\pm$  standard error mean (SEM).

### **Results**

A single i.p. administration of psychollatine 7.5 or 30 mg/kg induced changes in several indexes of oxidative stress; different patterns were found at different brain regions.

A significant decrease in free radicals levels (DCF formation) was observed in the frontal cortex with psychollatine 7.5 mg/kg and 30 mg/kg ( $F_{(2,14)} = 0.028$ ;  $P < 0.05$ ) (Fig 2). The TAR levels increased in the frontal cortex with psychollatine 7.5 mg/kg and 30 mg/kg ( $F_{(2,16)} = 0.048$ ;  $P < 0.05$ ) (Fig. 3).

A significant increase in free radicals levels (DCF formation) was observed in the hippocampus with psychollatine 30 mg/kg ( $F_{(2,18)} = 0.003$ ;  $P < 0.05$ ) (Fig 2). The TAR was increased in hippocampus ( $F_{(2,16)} = 0.052$ ;  $P < 0.05$ ) with psychollatine 7.5 mg/kg (Fig. 3).

No changes in lipoperoxidation (TBARS levels), TIR and TRI levels were observed in the hippocampus and in the cortex with all doses tested (Fig. 4, 5 and 6) respectively.

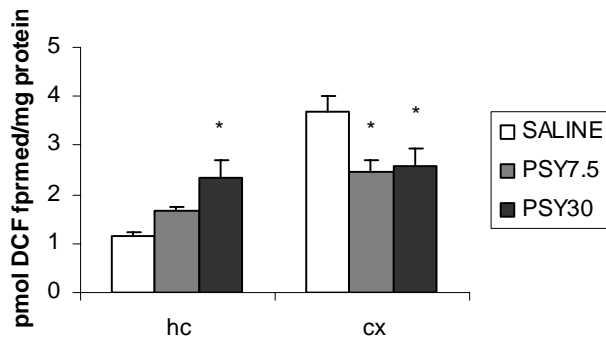


Figure 2. Effects of psychollatine on free radical content, using DCFH-DA as a probe in brain areas, frontal cortex (cx) and hippocampi (hc). Data expressed as mean + SEM. N= 5-6. ANOVA/Duncan, \* $P < 0.05$  compared with saline.

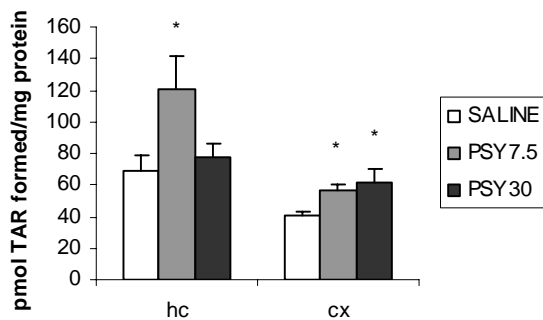


Figure 3. Effects of psychollatine on total antioxidant reactivity (TAR) levels from frontal cortex (cx) and hippocampi (hc) from saline and psychollatine 7.5 and 30 mg/kg. Data expressed as mean  $\pm$  SEM. N=7-8. ANOVA/Duncan, \* $P < 0.05$  compared with saline.

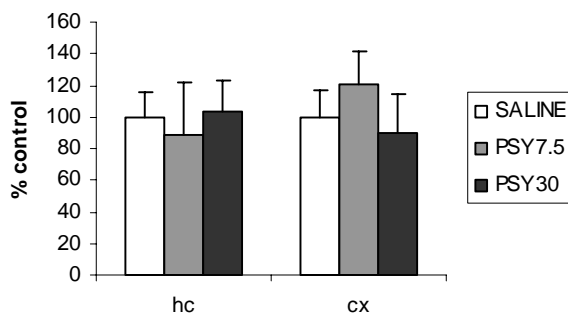


Figure 4. Effects of psychollatine on lipid peroxidation assay (TBARS). Results are expressed as percentage of control. N= 7-8. ANOVA/Duncan.

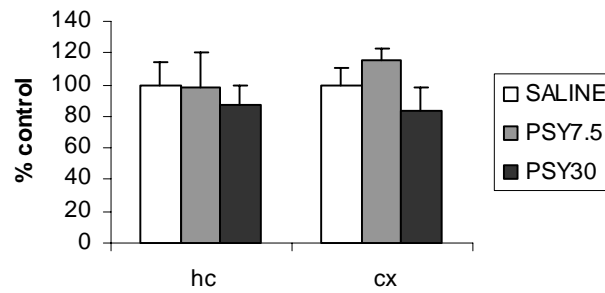


Figure 5. Tyrosine contents in cortex (cx) and hippocampus (hc) from mice treated with saline and psychollatine. Results are expressed as percentage of control. N= 7-8. ANOVA/Duncan.

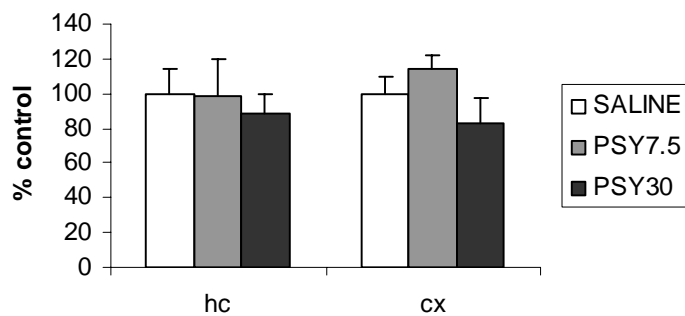


Figure 6. Contents of tryptophan in brain structures, cortex (cx) and hippocampi (hc) from saline and psychollatine (PSY) 7.5 and 30 mg/kg. Results are expressed as percentage of control. N= 7-8. ANOVA/Duncan.

## Discussion

Indole derivatives, e.g. melatonin,  $\beta$ -carbolines are thought to have great potential to be used in the prevention and/or treatment of numerous neurological diseases. Moreover, they may serve as model compounds in further search for a new generation of powerful and safe neuroprotectants (Stolc, 1999).

We found that psychollatine, an indole monoterpene alkaloid, alters various oxidative stress parameters. Psychollatine increased the total antioxidant capacity in hippocampus and cortex as evaluated by the TAR assay. It is important to note that TAR measurements determine the quality (conferred by reactivity) of antioxidants present in the sample (Lissi, 1995, Desmarchelier, 1997). The TAR levels were significantly augmented in frontal cortex with both doses (approximately 40 and 55% with 7.5 and 30 mg/kg, respectively) and in hippocampus (by 70%) only with the lower dose (7.5 mg/kg). TAR can be considered an useful index of the capacity of a given sample to modulate the damage associated with an enhanced production of free radicals (Lissi et al. 1992). Therefore, the effect of psychollatine on TAR levels in important brain areas might be relevant to protect from oxidative events and the consequent damage to lipids and proteins. It is important to note that the higher dose of psychollatine induced a large increase in DCF formed, consequently

in favor of a strong oxidative stress; conversely protein and lipid damage did not accompany the enhanced free radicals content.

Although antioxidant reactivity of both brain areas was increased by acute treatment with psychollatine, the DCF formation was found to be reduced only in the cortex. Interestingly, we observed a significantly increase on DCF levels in hippocampus from animals treated with the higher dose of psychollatine (30 mg/kg) with a concomitant reduction of TAR levels compared to those observed with the dose 7.5 mg/kg. The increase DCF levels in hippocampus, a structure that plays an important role in cognitive function, was consistent with our recent finding that this dose impaired both acquisition and consolidation in the step-down inhibitory avoidance test (Both et al., 2005). It has been previously suggested that increases in free radical content contribute with age-related deficit in cognition (Halliwell, 1992; Rádak et al., 2000) and impairment in hippocampal long-term potentiation (LTP) (McGahon et al., 1999).

The formation of free radicals in rat hippocampus after acute NMDA infusion was prevented by specific NMDA-receptor antagonists (Pepicelli et al., 2002). Nonetheless, there are evidences that sub-anesthetic doses of NMDA antagonists induce hypermetabolic and hyperglutamatergic states (Kurumaji and McCulloch, 1990). Various mechanisms may contribute to this apparent paradox of sub-anesthetic doses of NMDA antagonist, usually regarded as neuroprotective agents, inducing a neurotoxic hyperglutamatergic state: sub-anesthetic doses of NMDA antagonists stimulate glutamate release in the prefrontal cortex (Moghaddam et al., 1997; Moghaddam and Adams, 1998), and hippocampus (Grunze et al, 1996); NMDA antagonists preferentially attenuate the activity of the inhibitory interneurons in the hippocampus, resulting in freeing pyramidal neurons and increased firing of these neurons, therefore enhancing glutamate release (Grunze et al, 1996).

Hyperactivity of glutamatergic pyramidal neurons induced by NMDA antagonists seem to result in activation of non-NMDA glutamate receptor including

AMPA and kainate receptors (Liu et al., 2002; Patel and McCulloch, 1995); in fact, AMPA/kainate antagonist completely block prefrontal cortical pyramidal neurons activation induced by 5-HT<sub>2A</sub> receptor (Aghajanian and Marek, 1997).

In this study, a similar picture was observed with psychollatine: an apparently NMDA antagonist (Both et al., 2002), increasing hippocampal radical free content. The observed amnesic effects of psychollatine (Both et al, 2005), observed with the same doses that result in oxidative stress (evaluated *ex vivo*) may be at least in part associated with a hyperglutamatergic effect, given that psychollatine may lead to impairments in the information-processing capacity of cortical circuits by acting as NMDA antagonist. The neurotoxic effects (amnesic and prooxidative action) at higher doses of psychollatine may reflect its capacity to induce glutamate release as discussed above.

Antioxidants can demonstrate both antioxidant and prooxidant properties; however, a prooxidant activity requires a relatively high concentration of the compounds (Azam et al., 2003). Consistent with this pattern, psychollatine, as other indole antioxidants (Stolc, 1999), exhibited prooxidant action with higher doses.

The markers of basal oxidative damage to macromolecules (TBARS as index of lipid peroxidation, and tyrosine and tryptophan residue levels, as protein damage indexes) were not affected by acute treatment with psychollatine. However, the decline in free radical levels, and the increase on total antioxidant reactivity may indicate that psychollatine treatment can improve the protective defenses and reduce the oxidative damage in situations of oxidative stress.

Additionally, the analgesic and anti-inflammatory activity of psychollatine in the capsaicin and formalin models (Both et al., 2002) may be related to its antioxidant properties.

The anti-inflammatory activity of compounds can be due to synergistic effect of various mechanisms of action, as pro-inflammatory enzyme inhibitors, corticoid-like effects and/or antioxidant effect (Schinella et al., 2002). Free radicals seem to have an important role in the inflammatory process, since free radicals



produced by phagocyte cells are implicated in the activation of nuclear factor  $\kappa$ B, which induces the transcription of inflammatory cytokines and cyclo-oxygenase (Winrow et al., 1993, Sahnoun et al., 1998).

At this point, the exact mechanism(s) by which psychollatine modulates oxidative stress exerts its antioxidant activities are unknown. The distinct modulation of oxidative status observed in different brain structures can be associated with particularities in the basal oxidative status of different brain areas (Candelario-Jalil et al., 2001) and/or differential distribution of psychollatine.

Improving antioxidant defenses seems to be another interesting approach for treating neurodegenerative disorders (Nikolov and Richardson, 1998). It is clear that additional works must be performed, including ischemia models, to evaluate the potential of psychollatine as a neuroprotective agent.

## **Conclusions**

The present study indicates that psychollatine, an indole alkaloid isolated from *Psychotria umbellata*, modify basal oxidative status in distinct mice brain areas. Our results are consistent with previous studies reporting neuroprotection and prooxidative action by indole derivatives (Stolc, 1999).

## **Acknowledgements**

This study was supported by grants from CNPq (EE, ATH and FLB), and financial support from CNPq and PROPESQ.

## **References**

Aghajanian, G.K.; Marek, G.J., 1997. Serotonin induces excitatory post synaptic potentials in apical dendrites of neocortical pyramidal cells. *Neuropharmacology.*, v. 36(4-5): 589-599.

Azam S., Hadi N., Khan N.U., Hadi S.M, 2003. Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. *Med Science Monit* 9 (9), BR335-330.

Bondy S. C., 1996. Evaluation of free radical-initiated oxidant events within the nervous system. *Methods in Neuroscience*, Academic Press, Inc. 30, 243-259.

Both, F.L., Kerber, V.A., Henriques, A.T., Elisabetsky, E., 2002. Analgesic Properties of Umbellatine from *Psychotria umbellata*. *Pharmaceutical Biology*. 40(5), 336-341.

Both F.L., Meneguini L., Kerber V.A., Henriques A.T., Elisabetsky E., 2005. Psychopharmacological profile of the alkaloid psychollatine as a 5HT<sub>2a/C</sub> serotonin modulator. *J Nat. Prod.* 68 (3), 374-380.

Bradford MM., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-54.

Buege J.A., Aust S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52, 302-310.

Candelario-Jalil E., Mhadu N. H., Al-Dalain S. M., Martínez G., León O. S., 2001. Time course of oxidative damage in different brain regions following transient cerebral ischemia in gerbils. *Neuroscience Research*. 41(3), 233-241.

Cano A., Alcaraz O., Arnao M.B., 2003. Free radical-scavenging activity of indolic compounds in aqueous and ethanolic media. *Anal Bioanal Chem* 376, 33-37.

Desmarchelier C., Repetto M., Coussio J., Llesuy S., Ciccia G., 1997. Total Reactive Antioxidant Potential (TRAP) and Total Antioxidant Reactivity (TAR) of Medicinal Plants used in Southwest Amazonia (Bolivia and Peru). *Int J Pharmacog* 35, 288-96.

Driver A.S., Kodavanti P.R.S., Mundy W.R., 2000. Age-related in reactive oxygen species production in rat brain homogenates. *Neurotoxicol Teratol* 22, 175-81.

El-Sherbiny D.A., Khalifa A.E., Attia A.S., Eldenshary E.El-Din S., 2003. *Hypericum perforatum* extract demonstrates antioxidant properties against elevated rat brain oxidative status induced by amnestic dose of scopolamine. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 76, 525-533.

Fernandes E., Costa D., Toste S.A., Lima J.L.F.C. and Reis S., 2004. In vitro scavenging activity for reactive oxygen and nitrogen species by nonsteroidal anti-inflammatory indole, pyrrole, and oxazole derivative drugs. *Free Radical Biology & Medicine* 37(11), 1895-1905.

Grunze, H.C., Rainnie, D.G., Hasselmo, M.E., Barkai, E., Hearn, E.F., Mccarley, R.W., Greene, R.W. NMDA-dependent modulation of CA1 local circuit inhibition. *J. Neurosci.*, v. 16, p. 2034-2043, 1996.

Halliwell, B., 1992. Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal of Neurochemistry* 59, 1609-1623.

Kurumaji, A., Mcculloch, J., 1990. Effects on MK-801 upon local cerebral glucose utilization in conscious rats following unilateral lesion of caudal entorhinal cortex. *Brain Res.*, 531(1-2), 72-82.

Li L., Shen Y-M., Yang X-S., Wu W-L., Wang B-G., Chen Z-H., Hao X-J., 2002. Effects of spiramine T an antioxidant enzymatic activities and nitric oxide production in cerebral ischemia-reperfusion gerbils. *Brain Research* 944, 205-209.

Lissi E., Pascual C., del Castillo M., 1992. Luminol luminescence induced by 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) thermolysis. *Free Radic Res Comm* 17, 299-23.

Lissi E., Salim-Hanna M., Pascual C., del Castillo M.D., 1995. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Radic Biol Med* 18, 153-8.

Liu, H-N., Giasson, B.I., Mushynski, W.E., Almazan, G., 2002. AMPA receptor-mediated toxicity in oligodendrocyte progenitors involves free radical generation and activation of JNK, calpain and caspase 3. *Journal of Neurochemistry*, 82, 398–409.

McGahon, B.M., Murray, C.A., Horrobin, D.F. and Lynch, M.A., 1999. Age-related changes in oxidative mechanisms and LTP are reversed by dietary manipulation. *Neurobiol. Aging* 20 643-653.

Moghaddam, B. *et al.* Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. **J. Neurosci.**, v.17, p.2921-2927, 1997.

Moghaddam, B.; Adams, B. Reversal of phencyclidine effects by a group II metabotropic glutamate receptor agonist in rats. **Science**, v. 281, p. 1349-1352, 1998.

Nikolov, R., Richardson, J.S. Antiamyloid strategies for the treatment of Alzheimer's disease. *Drugs Today (Barc)*, 34(8), 673-689, 1998.

Patel, T.R.; Mcgulloch, J. 1995. AMPA receptor antagonism attenuates MK-801-induced hypermetabolism in the posterior cingulate cortex. *Brain Research*, 686, 254-258.

Pepicelli, O. 2002. In vivo activation of N-methyl-D-aspartate receptors in the rat hippocampus increases prostaglandin E(2) extracellular levels and triggers lipid peroxidation through cyclooxygenase-mediated mechanisms. *Journal of Neurochemistry*, 81, 1028 – 1034.

Pereira C., Agostinho P., Moreira P.I., Duarte A.I., Santos M.S., Oliveira C.R., 2003. Estratégias de neuroproteção: Efeito da vimpocetina em modelos *in vitro* de stresse oxidativo. *Acta Médica Portuguesa* 16, 401-406.

Radák Z., Kaneko T., Tahara S., Nakamoto H., Pucsok J., Sasvári M., Nyakas C., Goto S., 2001. Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. *Neurochemistry International*, 38(1), 17-23.

Reiter J.R., 1998. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog. Neurobiol.*, 56(3), 359-384.

Sahnoun Z., Jamoussi K., Zeghal K.M., 1998. Free radicals and antioxidants: Physiology, human pathology and therapeutic aspects. *Therapie* 53, 315-39.

Schinella G.R., Tournier H.A., Prieto J.M., Mordujovich de Buschiazzo P., Ríos J.L., 2002. Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts. *Life science* 70, 1023-1033.

Sriram K., Pai K.S., Boyd M.R., Ravindranath V., 1997. Evidence for generation of oxidative stress in brain by MPTP: in vitro and in vivo studies in mice. *Brain Res* 749, 44-52.

Stolc S., 1999. Indole derivatives as neuroprotectants. *Life Sciences* 65 (18/19), 1943-1950.

Sun J., Kh Tan B., Huang S-H., Whiteman M., Zhu Y-Z., 2002. Effects of natural products on ischemic heart diseases and cardiovascular system. *Acta Pharmacol Sin* 23 (12), 1142-1151.

Williams J.E., 2001. Review of Antiviral and Immunomodulating Properties of Plants of the Peruvian Rainforest with a Particular Emphasis on Uña de Gato and Sangre de Grado. *Altern. Med. Rev.* 6(6), 567-79.

## ANEXO 2

### **Acute toxicity induced by the indole monoterpene alkaloid psychollatine isolated from *Psychotria umbellata* Vell.**

Fernanda L. Both<sup>a,b</sup>, Lisiane Meneghini<sup>b</sup>, Vitor A. Kerber<sup>c</sup>, Amélia T. Henriques<sup>a</sup> and Elaine Elisabetsky<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, Brazil;

<sup>b</sup>Laboratório de Etnofarmacologia, Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, Brazil;

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

\*Corresponding author: Tel/Fax: (+)55 51 3316 3121. Caixa Postal 5072, 90041-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

*E-mail address:* elaine.elisabetsky@gmail.com

## **Abstract**

Psychollatine is an indole monoterpene alkaloid, isolated from *Psychotria umbellata* Vell. (Rubiaceae). The acute toxicity and LD50 of psychollatine were determined from 0 to 360 min, and 24 hours after its intraperitoneal administration (325 - 500 mg/kg) to adult male mice. Each animal was observed for immediate signs of toxicity up to 6h, and for death up to 24h. Parameter considered for toxicity included salivation, diarrhea, tremor, seizures, reaction to stimulus, abdominal constriction, ptose, and motor activity. The acute LD50 with intraperitoneal administration was found to be 375.57 mg/kg (95% confidence limits = 345.06 – 408.76; correlation coefficient = 0.955), with no deaths or signs of toxicity with 1g/kg per os. It is concluded that toxic doses of psychollatine are much higher than those of pharmacologic interest.

*Keywords:* *Psychotria umbellata*; psychollatine; LD<sub>50</sub>; mice, acute toxicity.



## Introduction

Due to its extensive use in traditional systems of medicine and the presence of bioactive alkaloids (Adjibade et al, 1992; Leal and Elisabetsky, 1996), the genus *Psychotria* L. (Rubiaceae) has been subjected to a considerable amount of chemical and pharmacological investigation (Both et al, 2002a; Kerber et al., 2001, Schultes and Raffauf, 1990; Amador et al., 2000, 2001; Leal and Elisabetsky, 1995; Verotta et al., 2002). A number of pyrrolidinoindoline alkaloids have been isolated from *P. oleoides*, *P. lyciiflora* (Jannic et al., 1999), *P. forsteriana* (Adjibadé et al., 1992), and *P. colorata* (Verotta et al., 1998). Isolated from *P. colorata*, hodgkinsine and psychotridine present analgesic activity implicating the opioid and glutamatergic systems (Amador et al., 2000, 2001).

Psychollatine (formerly known as umbellatine) is an indole monoterpene alkaloid, isolated from *Psychotria umbellata* Vell. In previous studies psychollatine was found to possess mild analgesic activity against a number of algogenic stimuli, indicating the participation of opioid and NMDA glutamate receptors (Both et al., 2002b). Recent findings demonstrate that psychollatine also possess anxiolytic, antidepressive and amnesic effects indicating the participation of 5-HT<sub>2A/C</sub> receptors (Both et al., 2005).

The present study was carried out in order to determinate the acute toxicity and LD50 of psychollatine administered intraperitonealy to adult male mice.

*Psychotria umbellata* Vell.(Rubiaceae) leaves were collected at Torres (Rio Grande do Sul, Brazil) in 2003; voucher material (MBM 48571) has been deposited at the herbarium of the Museu Botânico Municipal de Curitiba (PR, Brazil).

Dried leaves (100g) were extracted with EtOH at room temperature 3-times, each for a week. The extract was concentrated under vacuum at 40°C to a dark green

syrup. The syrup was dissolved in 2% HCl (0.5L) and partitioned with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The acid solution was alkalized with 25% ammonia solution until pH = 10 and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. From the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extract 954 mg of a colorless amorphous compound was precipitated. Purity of the compound was checked by TLC with silica gel 60F254 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH/NH<sub>3</sub> vapor - 85:15 - R<sub>f</sub> = 0.2) and HPLC (column: NOVAPACK C18 150 mm x 3.9 mm - Waters; MeOH:H<sub>2</sub>O - 50:50 as eluent and a Photo Diode Array as detector; R<sub>t</sub> = 2.13 min).

The experiments were performed with male adult mice (CF1), acquired from Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) with 2 months of age. Animals were maintained in our own facilities (22°±1°C, 12 h light/dark cycle, free access to food [Nuvilab CR1] and water) for at least two weeks before experiments. All procedures were carried out according to institutional policies on experimental animal handling. Six groups of five or ten animals were treated i.p. with saline 0.9% or different doses of psychollatine (325, 350, 400, 450 or 500 mg/kg). The various solutions of psychollatine were prepared by adding one or a few drops (20-60 µL) of HCl (1N), the final volume was adjusted with saline and the pH adjusted (7.0) with a few drops of NaOH (1N).

Each animal was observed for one minute at 0, 15, 30, 60, 120, 240, 360 min and 24h after dosing, for characterization of behavioural profile (locomotor activity), neurological symptoms (reaction to stimulus), autonomic peculiarities (optical signs, secretory signs, general signs), in general accepted to reflect the toxic potential of a substance given to the animals. Moreover, number of deaths at 24h was noted.

Data are shown as cumulative frequency of death and/or toxicity signs. The LD<sub>50</sub>, 95% confidence limits and correlation index were calculated by the Litchfield and Wilcoxon method (computer software: LETAL.EXE, US. 1.3. FKS, 1991). Statistical analysis for toxic effects (salivation, diarrhea, tremor, seizures, reaction to stimulus and abdominal constriction) was done by chi-square test. Ptose and locomotion scores were analysed by Mann-Whitney U test, following Kruskal-

Wallis. Statistical significance was set at  $P < 0.05$  (Zar, 1999). Ptoses was scored for 1 min during the observation periods, and the highest rating observed during the observation period was used in the calculations. Scores were as follows: normal (0 point), slight (1 point), medium (2 points), and intense (3 points) with a maximum of 24 points. The locomotor activity scores were as follows: low activity (1 point), medium (2 points) and intense (3 points). To determine LD50, mice were injected with psychollatine 325, 350, 400 or 450 mg/kg. The LD50 determined by probit test for each intraperitoneal dose was 375.57 mg/kg (95% confidence limits = 345.06 – 408.76; correlation coefficient = 0.955). Among all parameters of toxicity analyzed (salivation, diarrhea, tremor, seizures, reaction to stimulus and abdominal constriction) only the dose of 500 mg/kg reduced the reaction to stimulus immediately after administration ( $P < 0.01$ ) (Table 1). Death occurred in all psychollatine dose-groups until 120 min post dosing (Table 2). The percentage of death that occurred in the groups treated with psychollatine 450 and 500 mg/kg were 90 and 100%, respectively and were significantly different from control (0.002 and 0.008, respectively). Correlation analysis using Spearman test showed that this effect is dose-dependent ( $r = 0.987$ ,  $p < 0.01$ ). In the evaluation of ptose scores psychollatine 450 mg/kg (1[0-1]) and 500 mg/kg (1[1-1]) were significantly different from control ( $P = 0.003$  for all doses) (Table 3). In the assessment of locomotor activity psychollatine 400 mg/kg (5[1.75-6.5]), 450 mg/kg 1[0-1]) and 500 mg/kg (1[1-1]) were also significantly different from control ( $P = 0.01$ , 0.01 and 0.003, respectively) (Table 4).

As observed in table 1, all doses of psychollatine presented some degree of toxic signs (tremor and seizures). Only psychollatine 500 mg/kg exhibited the reaction to stimulus reduced immediately after i.p. administration. The LD50 (379.85 mg/kg), as well as, all doses of psychollatine that induced death are well distant from that doses that present biological activities (Both et al., 2002, Both et al., 2005) which range from 7.5 – 200 mg/kg. Signs of toxicity, as expressed by altered scores (decreased in comparison to control group) of ptosis and locomotion

were observed in the mice with 400, 450 and 500 mg/kg. No deaths or signs of toxicity were observed with animals that received psychollatine per os (0.4 - 1g/kg) (data not shown).

Although *Psychotria umbellata* has no reported traditional uses, the evaluation of acute toxicity and LD50 are important considering the relevant psychollatine psychopharmacology profile (analgesic, anxiolytic, antidepressive, antioxidant and amnesic), and its apparent modulating of different neurotransmitter systems including NMDA, opioid and 5-HT. Psychollatine modulation of serotonin 5-HT<sub>2A/C</sub> receptors is of special interest given the important role of these receptors in a diversity of relevant psychoactivities, and this study shows that the wide gap between active and toxic doses should be considered when launching structure/activity studies.

### **Acknowledgements**

This study was supported by grants from CNPq (EE, ATH and FLB), and financial support from CNPq and PROPESQ.

### **References**

- Adjibadé, Y., Weniger, B., Quirion, J.C., Kuballa, B., Cabalion, P., Anton, R., 1992. Dimeric alkaloids from *Psychotria forsteriana*. *Phytochem.* 31, 317-319.
- Amador, T.A., Verotta, L., Nunes, D.S., Elisabetsky, E., 2000. Antinociceptive profile of hodgkinsine. *Planta Med.* 66, 1-3.
- Amador, T.A., Verotta, L., Nunes, D.S., Elisabetsky, E., 2001. Involvement of NMDA receptors in the analgesic properties of psychotridine. *Phytomedicine* 8, 202-206.

Both, F.L., Farias F.M., Nicoláo, L.L., Misturini, J., Henriques, A.T., Elisabetsky E. 2002. Avaliação da atividade analgésica de extratos alcaloídicos de espécies de *Psychotria*. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s. 5(1), 41-45.

Both, F.L., Kerber, V.A., Henriques, A.T., Elisabetsky, E. 2002. Analgesic Properties of Umbellatine from *Psychotria umbellata*. *Pharmaceutical Biol.* 40(5), 336-341.

Both, F.L., Meneguini, L., Kerber, V.A., Henriques, A.T., Elisabetsky, E. 2005. Psychopharmacological profile of the alkaloid psychollatine as a 5HT<sub>2a/C</sub> serotonin modulator. *J Nat. Prod.*, 68 (3), 374-380.

Jannic, V., Guéritte, F., Laprévotte, O., Serani, L., Martin, M.T., Sévenet, T., Potier, P., 1999. Pyrrolidinoindoline alkaloids from *Psychotria oleoides* and *Psychotria lyciiflora*. *J Nat. Prod.* 62, 838-843.

Leal, M. B e Elisabetsky, E., 1996. Opioid-like activity of *P. brachypoda*. *Int. J. Pharmacognosy.* 34 (4), 267-272.

Litchfield, J.T., Wilcoxon, F., 1987. Confidence limits of ED<sub>50</sub>. In: Tallarida, R.J., Murray, R.B., Manual of pharmacologic calculations with computer programs, Springer-Verlag, New York, pp. 153-166.

Kerber, V.A., Gregianini, T.S., Paranhos, J.T., Schwambach, J., Farias, F., Fett, J.P., Fett-Neto, A.G., Zuanazzi, J.A., Quirion, J.C., Elisabetsky, E., Henriques, A.T., 2001. Brachycerine, a novel monoterpene alkaloid from *Psychotria brachyceras*. *J. Nat. Prod.* 64(5), 677-679.

Schultes, RE., Raffauf, R.F., 1990. The Healing Forest: Medicinal and Toxic Plants of the Northwest Amazonia. Portland: Dioscorides Press. pp. 392-396.

Verotta, L., Pilati, T., Tato, M., Elisabetsky, E., Amador, T. A., Nunes, D.S., 1998. Pyrrolidinoindoline alkaloids from *Psychotria colorata*. *J Nat. Prod.* 61(3), 392-396.

Verotta, L., Orsini, F., Sbacchi, M., Scheidler, M.A., Amador, T.A., Elisabetsky, E., 2002. Synthesis and antinociceptive activity of chimonanthines and pyrrolidinoindoline-Type alkaloids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 10(7), 2133-2142.

Zar, J.H., 1999. *Biostatistical analysis*, Prentice Hall, New Jersey, pp. 486-515.

Table 1. Toxicity signs following i.p. administration of psychollatine or saline to mice

Dose (mg/kg)	N	Time (min)						
		0	15	30	60	120	240	360
Salivation								
0	5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
325	10	0/10	0/10	0/9	0/8	0/8	0/8	0/8
350	5	0/5	0/5	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
400	10	0/10	0/10	0/8	0/7	0/6	0/5	0/5
450	10	0/10	0/6	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
500	5	0/5	0/5	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Diarrhea								
0	5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
325	10	0/10	0/10	0/9	0/8	0/8	0/8	0/8
350	5	0/5	0/5	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
400	10	0/10	0/10	0/8	0/7	0/6	0/5	0/5
450	10	0/10	0/6	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
500	5	0/5	0/5	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Tremor								
0	5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
325	10	1/10	3/10	3/9	1/8	1/8	0/8	0/8
350	5	1/5	3/5	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
400	10	0/10	1/10	0/8	1/7	1/6	1/5	1/5
450	10	4/10	3/6**	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
500	5	3/5**	4/5**	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Seizures								
0	5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
325	10	0/10	0/10	0/9	0/8	0/8	0/8	0/8
350	5	0/5	0/5	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
400	10	0/10	0/10	0/8	0/7	0/6	0/5	0/5
450	10	0/10	0/6	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
500	5	0/5	2/5	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Reaction to stimulus								
0	5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
325	10	10/10	10/10	9/9	8/8	8/8	8/8	8/8
350	5	5/5	5/5	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
400	10	10/10	10/10	7/8	6/7	5/6	5/5	5/5
450	10	10/10	6/6	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
500	5	0/5**	0/5**	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Abdominal constriction								
0	5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
325	10	0/10	0/10	0/9	0/8	0/8	0/8	0/8
350	5	0/5	0/5	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
400	10	0/10	0/10	0/8	0/7	0/6	0/5	0/5
450	10	0/6	0/6	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
500	5	0/5	0/5	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0

Values indicate the number of animals with the toxic effect/total number of animals remaining alive. N= 5-10.

\*\* Significantly different from control group ( $P<0.01$ ) by chi-square test.

Table 2. Cumulative death during the period of 24h following the i.p. administration of psychollatine or saline to mice.

Dose (mg/kg)	Time (min)								Cumulative Death in 24h (%)
	0	15	30	60	120	240	360	24	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
325	0	1	2	2	2	2	2	2	20
350	0	5	5	5	5	5	5	5	100**
400	0	2	3	4	5	5	5	5	50
450	4	9	9	9	9	9	9	9	90**
500	0	5	5	5	5	5	5	5	100**

Values indicate the number of dead animals. N = 5 (psychollatine 350 and 500 mg/kg) =10 (psychollatine 325, 400 and 450 mg/kg)

\* Significantly different from control group ( $P < 0.01$ )

Correlation analysis using Spearman test showed that this effect is dose-dependent ( $r = 0.987$ ,  $p < 0.01$ ).

Table 3. Ptose scores following i.p. administration of psychollatine or saline to mice

Dose (mg/kg)	Ptose scores			
	N	Median	Percentile 25	Percentile 75
0	5	6	6	6
325	10	11	5	13
350	5	1**	1	1
400	10	6.5	2	13
450	10	1**	0	1
500	5	1**	1	1

\*\*  $P < 0.01$  significant difference compared with saline in Mann-Whitney U test, following Kruskal-Wallis.



Table 4. Locomotor activity scores following i.p. administration of psychollatine or saline to mice

Dose (mg/kg)	Locomotor activity scores			
	N	Median	Percentile 25	Percentile 75
0	5	12	12	12
325	10	7.5	5.25	13.25
350	5	1**	1	1
400	10	5**	1.75	6.5
450	10	1**	0	1
500	5	1**	1	1

\*\*  $P < 0.01$  significant difference compared with saline in Mann-Whitney U test, following Kruskal-Wallis.

