



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**ESTUDO DOS EFEITOS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS DO  
MONOTERPENO ACETATO DE CITRONELILA EM CAMUNDONGOS**

**LUCIANA KELLY XIMENES DOS SANTOS**

**FORTALEZA**

**2014**

**LUCIANA KELLY XIMENES DOS SANTOS**

**ESTUDO DOS EFEITOS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS DO  
MONOTERPENO ACETATO DE CITRONELILA EM CAMUNDONGOS**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

Orientador (a): Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa.

**FORTALEZA**

**2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências da Saúde

- 
- S236e Santos, Luciana Kelly Ximenes dos.  
Estudo dos efeitos comportamentais e neuroquímicos do monoterpeno acetato de citronelila em camundongos. / Luciana Kelly Ximenes dos Santos. – 2014.  
181 f.: il. color., enc.; 30 cm.
- Tese (doutorado). – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Doutorado em Farmacologia, Fortaleza, 2014.  
Área de Concentração: Neurofarmacologia.  
Orientação: Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa.
1. Antidepressivos. 2. Monoaminas Biogênicas. 3. Cymbopogon. I. Título.

---

CDD 616.8918

LUCIANA KELLY XIMENES DOS SANTOS

ESTUDO DOS EFEITOS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS DO  
MONOTERPENO ACETATO DE CITRONELILA EM CAMUNDONGOS

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

APROVADO EM: 21 / 11 / 2014.

BANCA EXAMINADORA



---

Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa  
Universidade Federal do Ceará – UFC  
(Orientadora)



---

Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles  
Universidade Federal do Ceará – UFC



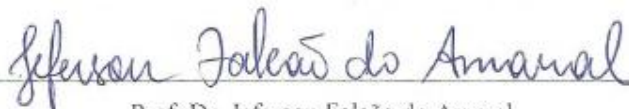
---

Profa. Dra. Edna Maria Camelo Chaves  
Universidade Estadual do Ceará – UECE



---

Prof. Dr. Cicero Francisco Bezerra Felipe  
Universidade Federal da Paraíba – UFPB.



---

Prof. Dr. Jeferson Falcão do Amaral

*A Deus, Pai maravilhoso e presente em todos os momentos de minha vida e em cada etapa desta pesquisa, sem o qual esta não seria possível ser realizada. Por me acompanhar e por me dar conhecimento e sabedoria para realizar este estudo.*

*Aos meus Pais, que me incentivaram e me ensinaram a primeira lição, com exemplos de amor e carinho.*

## AGRADECIMENTOS

*À Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa, por sua amizade e pela orientação prestada neste estudo. Pelas palavras de incentivo, pelos conselhos para a vida acadêmica e para a vida. Por seu carinho, paciência, compreensão nos momentos difíceis e por sua atenção, meu profundo agradecimento.*

*Às Profa. Dra. Silvânia Maria Mendes de Vasconcelos e a Profa. Dra. Danielle Macêdo, pela disposição em ajudar nos momentos em que precisei esclarecer dúvidas acerca do estudo.*

*À Profa. Dra. Glauce de Barros Viana, por sua imensa ajuda na realização da análise das monoaminas em seu Laboratório na Faculdade de Medicina em Juazeiro do Norte, bem como aos técnicos que realizaram a análise em seu Laboratório.*

*À Profa. Dra. Gerliane e suas técnicas do Laboratório de Morfologia, sem as quais não teria sido possível a confecção das lâminas para análise histológica.*

*Ao Prof. Dr. Pedro Soares, por sua atenção e disposição em realizar a análise histológica desta pesquisa.*

*À Profa. Dra. Isabel Gomes, pela coorientação, pelas palavras de apoio e de incentivo e por sua colaboração para a realização deste estudo.*

*A todos os professores do curso de Pós-graduação em Farmacologia, pelos conhecimentos transmitidos durante as aulas e por sua dedicação ao ensino da Farmacologia.*

*Aos colegas do Laboratório do comportamento por sua ajuda no manuseio do aparelho de ELISA.*

*Aos colegas do Laboratório de Neurofarmacologia: **Nayrton Flávio, Emiliano Rios, Leonardo Vasconcelos, Alyne Mara, Mariana Feitosa, Edith, Camila Nayane, João Henrique, Íris e Auriana** por sua amizade, companheirismo e pelos momentos de conhecimento e alegrias mútuos durante os Congressos e Jornadas de Farmacologia.*

*À Amiga, **Maria do Carmo de Oliveira Citó**, que me ajudou na realização deste estudo desde o início. Por sua amizade, companheirismo, e disposição em me ajudar sempre que precisei de alguma orientação e na realização dos experimentos.*

*Às Amigas, **Mariana Lima Fernandes, Helvira Melo e Charliane Carlos** por sua amizade, apoio e ajuda constante.*

*Aos Estudantes de Iniciação Científica, **Joaquim Abílio, Iardja Stefane e Priscila Barbosa**, por sua imensa ajuda na realização dos experimentos, pelos bons momentos juntos e por me proporcionarem não só ensinar mas também aprender.*

*A todos os colegas do **Projeto de Extensão Drogas de Abuso**, pelos momentos de alegria e descontração durante as reuniões do projeto, pela realização das atividades e pelo aprendizado mútuo.*

*Às técnicas de Laboratório **Vilani e Lena (Leninha)**, pelo apoio, ajuda nos experimentos, pelos momentos de companhia e de alegria no laboratório.*

*Aos técnicos **Arnaldo e Nágila** pela ajuda no manuseio e realização dos experimentos neuroquímicos no aparelho de HPLC.*

*Aos **Funcionários** do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, por sua ajuda e dedicação ao trabalho.*

*Aos **meus familiares**, tios, primos, avós e principalmente aos irmãos pelos momentos de compreensão e incentivo.*

*A **Banca examinadora** por aceitar participar da defesa desta tese e por suas importantes contribuições para este estudo.*

*Aos Programas **CAPES, CNPQ e FUNCAP** pelo financiamento desta pesquisa, bem como ao Programa **CAPES REUNI** por desenvolver e proporcionar aos estudantes de pós-graduação, além da pesquisa, o amor pela docência.*

*A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meu sincero agradecimento.*



*“Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e os seus planos serão bem-sucedidos” (Provérbios 16:3).*

## RESUMO

O acetato de citronelila é um monoterpeno presente no óleo essencial de diversas plantas como a citronela. Estudos mostraram sua atividade como substância anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana e analgésica, sendo seu maior uso, na veterinária como repelente para insetos. Entretanto, pesquisas que mostrem sua atividade como antidepressivo e ansiolítico em modelos experimentais, não foram realizadas. O presente estudo investigou a atividade antidepressiva em camundongos nos testes experimentais do nado forçado e teste de suspensão da cauda, bem como o envolvimento do sistema monoaminérgico nestes efeitos. A análise neuroquímica a fim de verificar a atividade antioxidante nos camundongos submetidos ao teste do nado forçado também foi realizado. Além disso, foi verificada também a atividade ansiolítica, no teste do *plus maze*, a avaliação da atividade motora no teste do campo aberto, a atividade anticonvulsivante no teste das convulsões induzidas por pentilenotetrazol, e a atividade hipnótica no tempo de sono induzido por pentobarbital. A toxicologia e o dano aos órgãos (cérebro, fígado e rim) dos animais também foi avaliada. O acetato de citronelila reduziu o tempo de imobilidade no teste do nado forçado e no teste de suspensão da cauda, nas doses de 50 e 100 mg/kg, v.o. O efeito de anti-imobilidade do acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg) foi revertido pelo pré-tratamento com PCPA 100 mg/kg i.p. (inibidor da síntese de serotonina), Prazosin 1mg/kg, i.p. (antagonista  $\alpha$ -1 adrenérgico), ioimbina 1mg/kg, i.p. (antagonista  $\alpha$ -2 adrenérgico), SCH23390, 15  $\mu$ g/kg, s.c. (antagonista dopaminérgico D1) ou sulpirida 50 mg/kg, i.p. (antagonista dopaminérgico D2). O acetato de citronelila não alterou a atividade locomotora espontânea dos animais no teste do campo aberto, bem como não apresentou atividade ansiolítica nos animais, no teste do *plus maze*. A análise dos níveis de monoaminas mostrou que houve um aumento dos níveis das monoaminas (NA, DA e 5-HT) na dose de 100 mg/kg do acetato de citronelila e que a dose de 50 mg/kg aumentou os níveis de NA no corpo estriado dos camundongos. Houve uma diminuição nos níveis de metabólitos (DOPAC, HVA e 5-HIAA) no corpo estriado dos camundongos. Os testes de toxicidade mostraram que o acetato de citronelila apresentou um nível de segurança 5 (CINCO), de acordo com o protocolo OECD 423 e mostrou que não houve alterações histológicas significativas nos órgãos dos animais estudados. Com isso, o estudo sugere que o efeito de anti-imobilidade do acetato de citronelila no teste do nado forçado está relacionado com sua ação nos receptores adrenérgicos, dopaminérgicos e serotoninérgicos, o qual foi evidenciado por um aumento nos níveis de monoaminas no cérebro, sugerindo um possível efeito antidepressivo desta substância. Não houve alteração da atividade locomotora dos animais, bem como evidência de efeitos ansiolíticos no teste do *plus maze*, além de, não apresentar efeitos toxicológicos significativos.

**Palavras-chave:** Antidepressivos. Monoaminas Biogênicas. Cymbopogon.

## ABSTRACT

The citronellyl acetate is a monoterpene present in the essential oil of various plants with citronella. Studies have shown its activity as anti-inflammatory, antimicrobial substance analgesic, antioxidant, and being their biggest use in veterinary as insect repellent. However, surveys show that its activity as an antidepressant and anxiolytic in experimental models, were not performed. The present study investigated the antidepressant activity in mice in the experimental tests the forced swimming and tail suspension test as well as the involvement of the monoaminergic system in these effects. The neurochemical analysis in order to verify the antioxidant activity in mice submitted to the forced swimming test was also performed. Furthermore, it was also verified anxiolytic activity in the plus maze test, the assessment of motor activity in the open field test, the testing of anticonvulsant activity in pentylenetetrazole-induced seizures and hypnotic activity on the sleeping time induced by pentobarbital. Toxicology and damage to organs (brain, liver and kidney) of the animals was also evaluated. Citronellyl acetate reduced the immobility time in the forced swimming test and tail suspension test, at doses of 50 and 100 mg/kg, p.o. The anti-immobility effect of citronellyl acetate (50 and 100 mg / kg) was reversed by pretreatment with PCPA 100 mg/kg i.p. (inhibitor of serotonin synthesis), Prazosin 1 mg / kg, i.p. ( $\alpha$ -1 adrenoceptor antagonist), Yohimbine 1 mg / kg, i.p. ( $\alpha$ -2 adrenergic receptor antagonist), SCH23390, 15 mg / kg, s.c. (D1 dopamine antagonist) sulpiride 50 mg / kg, i.p. (dopamine D2 antagonist). Citronellyl acetate did not alter spontaneous locomotor activity of animals in the open field test, and showed no anxiolytic activity in animals in the plus maze test. The analysis of the levels of monoamines showed an increase in the levels of monoamines (NA, DA and 5-HT) at a dose of 100 mg/kg of citronellyl acetate and the dose of 50 mg/kg increased levels of NA in striatum of mice. There was a decrease in the levels of metabolites (DOPAC, 5-HIAA and HVA) in the striatum of mice. Toxicity tests have shown that citronellyl acetate showed a security level five (5) according to the OECD 423 protocol and showed no significant histology alterations in the organs of the animals studied. Thus, the study suggests that the anti-immobility effect of citronellyl acetate in the forced swim test is related to its action on adrenergic, dopaminergic and serotonergic receptors, which was evidenced by an increase in the levels of monoamines in the brain, suggesting a possible antidepressant effect of this substance. Don't have altering the locomotor activity of animals and evidence of anxiolytic effects in *plus maze* test, and not presented significant toxicological effects.

**Keywords:** Antidepressants. Monoamines Biogenics. Cymbopogon.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b>	Vias noradrenérgicas no Sistema Nervoso Central (SNC).	<b>28</b>
<b>FIGURA 2</b>	Vias dopaminérgicas no Sistema Nervoso Central (SNC).	<b>32</b>
<b>FIGURA 3</b>	Vias Serotonérgicas no Sistema Nervoso Central (SNC).	<b>34</b>
<b>FIGURA 4</b>	Estresse oxidativo e dano celular.	<b>40</b>
<b>FIGURA 5</b>	Estrutura química do Acetato de Citronelila.	<b>51</b>
<b>FIGURA 6</b>	Teste de Suspensão da Cauda.	<b>60</b>
<b>FIGURA 7</b>	Teste do Nado Forçado.	<b>61</b>
<b>FIGURA 8</b>	Avaliação do Mecanismo de ação no Teste do Nado Forçado.	<b>62</b>
<b>FIGURA 9</b>	Teste do Campo Aberto.	<b>64</b>
<b>FIGURA 10</b>	Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) ou Plus Maze.	<b>65</b>
<b>FIGURA 11</b>	Teste do tempo de sono induzido por Pentobarbital.	<b>66</b>
<b>FIGURA 12</b>	Teste das convulsões induzidas por Pentilenotetrazol	<b>67</b>
<b>FIGURA 13</b>	Dissecção de áreas cerebrais para determinação de monoaminas e metabólitos no HPLC.	<b>68</b>
<b>FIGURA 14</b>	Dissecção de áreas cerebrais para avaliação do estresse oxidativo.	<b>71</b>
<b>FIGURA 15</b>	Efeito do acetato de citronelila e imipramina sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos.	<b>78</b>
<b>FIGURA 16</b>	Efeito do acetato de citronelila e imipramina sobre o tempo de imobilidade no teste de suspensão da cauda em camundongos.	<b>80</b>
<b>FIGURA 17</b>	Efeito do acetato de citronelila (50 mg/kg) sozinho ou associado com prazosina (1 mg/kg) ou ioimbina (1 mg/kg) sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos.	<b>81</b>
<b>FIGURA 18</b>	Efeito do acetato de citronelila (100 mg/kg) sozinho ou associado com prazosina (1 mg/kg) ou ioimbina (1 mg/kg) sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos.	<b>82</b>

<b>FIGURA 19</b>	Efeito do acetato de citronelila (50 mg/kg) e bupropiona (30 mg/kg) sozinho ou associado com SCH23390 (15 µg/kg) ou Sulpirida (50 mg/kg) sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos.	<b>83</b>
<b>FIGURA 20</b>	Efeito do acetato de citronelila (100 mg/kg) e bupropiona (30 mg/kg) sozinho ou associado com SCH23390 (15 µg/kg) ou Sulpirida (50 mg/kg) sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos	<b>84</b>
<b>FIGURA 21</b>	Efeito do acetato de citronelila (50 mg/kg) e fluoxetina (35 mg/kg) sozinho ou associado com PCPA (100 mg/kg) sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos.	<b>86</b>
<b>FIGURA 22</b>	Efeito do acetato de citronelila (100 mg/kg) e fluoxetina (35 mg/kg) sozinho ou associado com PCPA (100 mg/kg) sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos.	<b>87</b>
<b>FIGURA 23</b>	Efeito do acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg) e fluoxetina (35 mg/kg) sozinho ou associado com NAN-190 (0,5 mg/kg) sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos.	<b>88</b>
<b>FIGURA 24</b>	Efeito do acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg) e fluoxetina (35 mg/kg) sozinho ou associado com ritanserina (4 mg/kg) sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos.	<b>89</b>
<b>FIGURA 25</b>	Efeito do acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg) e fluoxetina (35 mg/kg) sozinho ou associado com ondansetron (1 mg/kg) sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos.	<b>90</b>
<b>FIGURA 26</b>	Efeito do acetato de citronelila e diazepam sobre a atividade locomotora espontânea no teste do campo aberto em camundongos.	<b>91</b>

<b>FIGURA 27</b>	Efeito do acetato de citronelila e diazepam sobre o número de <i>grooming</i> no teste do campo aberto em camundongos.	<b>92</b>
<b>FIGURA 28</b>	Efeito do acetato de citronelila e diazepam sobre o número de <i>rearing</i> no teste do campo aberto em camundongos.	<b>93</b>
<b>FIGURA 29</b>	Efeito do acetato de citronelila e diazepam sobre o número de entradas nos braços abertos (NEBA) no teste do labirinto em cruz elevado em camundongos.	<b>94</b>
<b>FIGURA 30</b>	Efeito do acetato de citronelila e diazepam sobre o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) no teste do labirinto em cruz elevado em camundongos.	<b>94</b>
<b>FIGURA 31</b>	Efeito do acetato de citronelila e diazepam sobre a percentagem de entradas nos braços abertos (PEBA) no teste do labirinto em cruz elevado em camundongos.	<b>95</b>
<b>FIGURA 32</b>	Efeito do acetato de citronelila e diazepam sobre a percentagem de tempo nos braços abertos (PTBA) no teste do labirinto em cruz elevado em camundongos.	<b>95</b>
<b>FIGURA 33</b>	Efeito do acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg) e diazepam (1 mg/kg) sobre a latência (31 a) e duração do sono (31 b) no teste do tempo de sono induzido por pentobarbital em camundongos.	<b>97</b>
<b>FIGURA 34</b>	Determinação dos níveis de noradrenalina (NA) em corpo estriado de camundongos tratados com acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg) ou veículo (controle).	<b>100</b>
<b>FIGURA 35</b>	Determinação dos níveis de dopamina (DA) em corpo estriado de camundongos tratados com acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg) ou veículo (controle).	<b>101</b>
<b>FIGURA 36</b>	Determinação dos níveis de serotonina (5-HT) em corpo estriado de camundongos tratados com acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg) ou veículo (controle).	<b>102</b>
<b>FIGURA 37</b>	Efeitos do acetato de citronelila 50 ou 100 mg/kg sobre os níveis de GSH em corpo estriado de animais submetidos ou não ao estresse do nado forçado.	<b>104</b>

<b>FIGURA 38</b>	Efeitos do acetato de citronelila 50 ou 100 mg/kg sobre os níveis de GSH em córtex pré-frontal de animais submetidos ou não ao estresse do nado forçado.	<b>105</b>
<b>FIGURA 39</b>	Efeitos do acetato de citronelila 50 ou 100 mg/kg sobre os níveis de GSH em hipocampo de animais submetidos ou não ao estresse do nado forçado.	<b>106</b>
<b>FIGURA 40</b>	Efeitos do acetato de citronelila 50 ou 100 mg/kg sobre os níveis de MDA (malonildialdeído) no corpo estriado de animais submetidos ou não ao estresse do nado forçado.	<b>107</b>
<b>FIGURA 41</b>	Efeitos do acetato de citronelila 50 ou 100 mg/kg sobre os níveis de MDA (malonildialdeído) no córtex pré-frontal de animais submetidos ou não ao estresse do nado forçado.	<b>108</b>
<b>FIGURA 42</b>	Efeitos do acetato de citronelila 50 ou 100 mg/kg sobre os níveis de MDA (malonildialdeído) no hipocampo de animais submetidos ou não ao estresse do nado forçado.	<b>109</b>
<b>FIGURA 43</b>	Efeitos do acetato de citronelila 50 ou 100 mg/kg sobre os níveis de Nitrito/nitrato no corpo estriado de animais submetidos ou não ao estresse do nado forçado.	<b>110</b>
<b>FIGURA 44</b>	Efeitos do acetato de citronelila 50 ou 100 mg/kg sobre os níveis de Nitrito/nitrato no córtex pré-frontal de animais submetidos ou não ao estresse do nado forçado.	<b>111</b>
<b>FIGURA 45</b>	Efeitos do acetato de citronelila 50 ou 100 mg/kg sobre os níveis de Nitrito/nitrato no hipocampo de animais submetidos ou não ao estresse do nado forçado.	<b>112</b>
<b>FIGURA 46</b>	Análise histológica dos seguintes órgãos respectivamente: rim, cérebro e fígado em ratos na dose de 2000 mg/kg no 14 ° dia após término da avaliação para toxicidade. 1A, 2A e 3A (controle), 1B, 2B e 3B (teste 1), 1C, 2C e 3C (teste 2).	<b>115</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b>	Relação dos equipamentos utilizados nos ensaios neuroquímicos.	<b>56</b>
<b>TABELA 2</b>	Relação das drogas utilizadas nos experimentos comportamentais.	<b>57</b>
<b>TABELA 3</b>	Efeito da administração do acetato de citronelila 50 e 100 mg/kg e diazepam (1 mg/kg) nas convulsões induzidas por pentilenotetrazol em camundongos.	<b>99</b>
<b>TABELA 4</b>	Níveis de 5-HIAA, HVA e DOPAC em corpo estriado de camundongos tratados com acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg) ou veículo (controle).	<b>103</b>
<b>TABELA 5</b>	Média do peso corporal (gramas $\pm$ desvio padrão) de camundongos swiss expostos ao acetato de citronelila na dose de 2000 mg/kg, por via oral.	<b>114</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS/SIGLAS

<b>ALE</b>	Atividade locomotora espontânea
<b>AMPT</b>	$\alpha$ -metil- <i>p</i> -tirosina
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>BDNF</b>	Fator neurotrófico derivado do cérebro
<b>BUP</b>	Buspirona
<b>CAT</b>	Catalase
<b>CEPA</b>	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
<b>CIT</b>	Acetato de citronelila
<b>COMT</b>	Catecol-O-Metil-Transferase
<b>CRF</b>	Fator liberador de corticotropina
<b>DOPAC</b>	Ácido diidroxifenilacético
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfoxido
<b>DTNB</b>	Solução de ácido 5:5 ditiobis-2-nitrobenzoato
<b>DZP</b>	Diazepam
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético
<b>EEG</b>	Eletro Encefalograma
<b>EPM</b>	Erro Padrão da Média
<b>ERNS</b>	Espécies reativas de nitrogênio
<b>EROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>FLU</b>	Fluoxetina
<b>GABA</b>	Ácido gamaaminobutírico
<b>GSH</b>	Glutationa reduzida
<b>GSH-Px</b>	Glutationa-peroxidase
<b>GSSG</b>	Glutationa oxidada
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogênio
<b>HClO<sub>4</sub></b>	Ácido perclórico
<b>HHA</b>	Hipotálamo-hipófise-adrenal

<b>HOCL</b>	Ácido hipocloroso
<b>HPLC</b>	Cromatografia Líquida de Alta Performance
<b>HVA</b>	Ácido homovalínico
<b>IOIM</b>	Ioimbina
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>IP3</b>	Trifosfato de Inositol
<b>LC</b>	Latência da convulsão
<b>LCE</b>	Labirinto em cruz elevado
<b>LM</b>	Latência de morte
<b>MAO</b>	Monoaminoxidase
<b>MDA</b>	Malonildialdeído
<b>NEBA</b>	Número de entradas no braço aberto
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NTs</b>	Neurotrofinas
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	Radical superóxido
<b>OH<sup>•</sup></b>	Radical hidroxila
<b>OND</b>	Ondasentrona
<b>ONOO<sup>•</sup></b>	Radical peroxinitrito
<b>PEBA</b>	Porcentagem de entradas no braço aberto
<b>PKC</b>	Proteína quinase C
<b>PRZ</b>	Prazosina
<b>PTBA</b>	Tempo de permanência no braço fechado
<b>PTZ</b>	Pentilenotetrazol
<b>RCS</b>	Espécies reativas do cloro
<b>RIT</b>	Ritanserina
<b>ROO</b>	Radical peróxido
<b>SCH</b>	SCH23390
<b>SOD</b>	Superóxido-dismutase
<b>SULP</b>	Sulpirida
<b>TBA</b>	Ácido tiobarbitúrico
<b>TBARS</b>	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético
<b>TNF</b>	Teste do nado forçado
<b>TPBA</b>	Tempo de permanência no braço aberto
<b>TSC</b>	Teste de suspensão da cauda
<b>v.o.</b>	Via oral
<b>WGE</b>	Extrato aquoso de <i>Gastrodia elata</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\pm$	Mais ou menos
%	Porcentagem
$^{\circ}\text{C}$	Graus centígrados
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\text{A}$	Alfa
$\text{B}$	Beta
5-HT	Serotonina
AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
$\text{Ca}^{2+}$	Íon cálcio
$\text{Cl}^{-}$	Íon cloro
Cm	Centímetro
D1	Receptor dopaminérgico do tipo d1
D2	Receptor dopaminérgico do tipo d2
DL50	Dose letal que mata 50% dos animais
G	Gramas
g/Kg	Gramas/quilograma
H	Hora
Kg	Quilograma
Mg	Miligrama
mg/ml	Miligrama/mililitro
mg/kg	Miligrama/quilograma
Min	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milímetro
$\text{Na}^{+}$	Íon sódio
P	Nível de significância
S	Segundo

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>24</b>
<b>1.1 Considerações gerais</b>	<b>24</b>
<b>1.2 Transmissores do sistema nervos central (SNC) e depressão</b>	<b>26</b>
<i>1.2.1 Via noradrenérgica e depressão</i>	<i>27</i>
<i>1.2.2 Via dopaminérgica e depressão</i>	<i>30</i>
<i>1.2.3 Via serotoninérgica e depressão</i>	<i>33</i>
<b>1.3 Fatores relacionados com a depressão</b>	<b>37</b>
1.3.1 Estresse oxidativo e depressão	39
<b>1.4 Modelos experimentais de depressão</b>	<b>44</b>
<b>1.5 Uso de plantas medicinais na depressão</b>	<b>46</b>
<b>1.6 Óleos essenciais e suas ações no SNC</b>	<b>47</b>
<b>1.7 Acetato de citronelila</b>	<b>49</b>
<b>2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA</b>	<b>52</b>
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>54</b>
<b>3.1 Objetivo geral</b>	<b>54</b>
<b>3.2 Objetivos específicos</b>	<b>54</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>56</b>
<b>4.1 Principais equipamentos utilizados</b>	<b>56</b>
<b>4.2 Drogas e reagentes</b>	<b>57</b>
<b>4.3 Substância do estudo: acetato de citronelila</b>	<b>57</b>
<b>4.4 Animais</b>	<b>58</b>
<b>4.5 Preparo das drogas</b>	<b>58</b>
<b>4.6 Tratamento dos grupos experimentais</b>	<b>58</b>
<b>4.7 Curva dose-resposta no teste do nado forçado</b>	<b>59</b>
<b>4.8 Testes comportamentais</b>	<b>59</b>
4.8.1 Avaliação da atividade antidepressiva	59
<i>4.8.1.1 Teste de suspensão da cauda</i>	<i>59</i>
<i>4.8.1.2 Teste do nado forçado</i>	<i>60</i>
4.8.2 Avaliação do mecanismo de ação antidepressivo	61

4.8.2.1 <i>Avaliação do sistema noradrenérgico</i>	61
4.8.2.2 <i>Avaliação do sistema dopaminérgico</i>	62
4.8.2.3 <i>Avaliação do sistema serotoninérgico</i>	62
4.8.3 Avaliação da atividade ansiolítica	63
4.8.3.1 <i>Teste do campo aberto</i>	63
4.8.3.2 <i>Labirinto em cruz elevado (Plus Maze)</i>	64
4.8.4 Avaliação da atividade sedativo-hipnótica e anticonvulsivante	65
4.8.4.1 <i>Teste da indução do sono por pentobarbital</i>	65
4.8.4.2 <i>Teste das convulsões com pentilenotetrazol</i>	66
<b>4.9 Testes Neuroquímicos</b>	<b>67</b>
4.9.1 Dissecção das áreas cerebrais	67
4.9.2 Determinação de monoaminas e metabólitos com HPLC	68
4.9.2.1 <i>Procedimento experimental</i>	69
4.9.2.2 <i>Soluções reagentes</i>	70
4.9.3 Estresse oxidativo	70
4.9.3.1 <i>Determinação da produção de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS)</i>	71
4.9.3.2 <i>Determinação da produção de nitrito</i>	72
4.9.3.3 <i>Determinação da concentração de glutatona reduzida (GSH)</i>	73
<b>4.10 Avaliação da toxicologia</b>	<b>74</b>
4.10.1 Procedimento experimental	74
4.10.2 Observação dos sinais de toxicidade	75
4.10.3 Análise histológica	76
<b>4.11 Análise estatística</b>	<b>76</b>
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>78</b>
<b>5.1 Avaliação da atividade antidepressiva</b>	<b>78</b>
5.1.1 Teste do nado forçado	78
5.1.2 Teste da suspensão da cauda	79
5.1.3 Envolvimento do sistema noradrenérgico	80
5.1.4 Envolvimento do sistema dopaminérgico	82
5.1.5 Envolvimento do sistema serotoninérgico	84

<b>5.2 Avaliação da atividade ansiolítica</b>	<b>90</b>
5.2.1 Teste do campo aberto	90
5.2.2 Teste do labirinto em cruz elevado	93
<b>5.3 Avaliação da atividade sedativa/hipnótica e anticonvulsivante</b>	<b>96</b>
5.3.1 Teste do tempo de sono induzido por pentobarbital	96
5.3.2 Teste da convulsão induzida por pentilenotetrazol	98
<b>5.4 Testes Neuroquímicos</b>	<b>99</b>
5.4.1 Determinação dos níveis de monoaminas e seus metabólitos em HPLC	99
5.4.1.1 Determinação dos níveis de noradrenalina	99
5.4.1.2 Determinação dos níveis de dopamina	100
5.4.1.3 Determinação dos níveis de serotonina	101
5.4.1.4 Determinação dos níveis de metabólitos das monoaminas	102
5.4.2 Avaliação do efeito do acetato de citronelila sobre o estresse oxidativo	103
5.4.2.1 Efeitos do acetato de citronelila sobre os níveis de GSH em cérebro de camundongos	103
5.4.2.2 Efeitos do acetato de citronelila sobre os níveis de MDA (malonildialdeído) em cérebro de camundongos	106
5.4.2.3 Efeitos do acetato de citronelila sobre os níveis de nitrito/nitrato em cérebro de camundongos	109
<b>5.5 Avaliação da toxicologia aguda do acetato de citronelila</b>	<b>113</b>
5.5.1 Avaliação comportamental	113
5.5.2 Avaliação histológica	114
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>116</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>149</b>
<b>8 CONCLUSÕES</b>	<b>151</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>152</b>
<b>ANEXO A - PROTOCOLO OECD GUIA 423</b>	<b>182</b>
<b>ANEXO B – FOLHA DE AROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA</b>	<b>183</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Considerações gerais

A Depressão é um dos transtornos afetivos que mais vem crescendo nos últimos anos, dados da organização mundial de saúde (OMS) afirmam que esta doença se tornou um problema de saúde pública e tem atingido mais de 350 milhões de pessoas no mundo (WHO, 2012). Em algum momento da vida os seres humanos podem entristecer-se e desenvolver sintomas depressivos, com uma incidência que varia de 13% a 20%, entretanto, estes sintomas podem agravar-se e em 2% a 3% dos casos podem progredir para um distúrbio afetivo, como a depressão. Segundo a organização mundial de saúde, estima-se que a depressão apresente uma prevalência mundial de 15%, podendo chegar a 21% até 2020 (GAY, et al., 2010).

Os distúrbios depressivos podem incluir a depressão maior, a distímia e outros tipos de depressão não especificados, sendo que a depressão maior se caracteriza por uma condição clínica recorrente de sintomas que prejudicam a saúde física e incapacitam os pacientes de desenvolverem suas atividades cotidianas normais (GUIMARÃES & GRAEFF, 2001). Os pacientes depressivos geralmente apresentam sintomas como desesperança, tristeza, choro, diminuição do interesse e da concentração, decréscimo do apetite e da libido, insônia, fadiga, retardo ou agitação psicomotora, inabilidade para o desenvolvimento das atividades diárias e pensamentos recorrentes sobre morte e suicídio (GUIMARÃES & GRAEFF, 2001; CRUZ et al., 2008). Em muitos casos a depressão pode vir acompanhada da ansiedade, o que gera nos pacientes sintomas autonômicos como tremor, palpitações, dor no estômago, náuseas e cefaléia. Estes sintomas colaboram ainda mais para o agravamento da depressão (HIRSCHFELD, 2001). Estudos mostram que a depressão pode contribuir para o surgimento de outras doenças como o câncer, doenças endócrinas e até mesmo coronariopatias (GAY et al., 2010).

Há vários anos o estresse tem sido envolvido com diversas doenças, incluindo a depressão. Estudos realizados em laboratório mostram que animais submetidos a situações de estresse excessivo desenvolvem sintomas de depressão como aumento do sono e ganho de



peso. O mecanismo que estaria envolvido com o surgimento da depressão ainda não é bem esclarecido, entretanto acredita-se que o estresse crônico estaria envolvido em transtornos de ansiedade e depressão (GUIMARÃES, 2001; SAKAKIBARA et al., 2006).

A principal hipótese que explicaria a causa da depressão é a hipótese das monoaminas, esta hipótese afirma que na depressão ocorre uma depleção de monoaminas como dopamina, norepinefrina e serotonina no sistema nervoso central (BERTON E NESTLER, 2006; LUDKA et al., 2013). Esta teoria pode ser confirmada através de estudos neuroquímicos e até mesmo através da própria terapêutica para a depressão, pois a maioria dos medicamentos utilizados para seu tratamento são inibidores da recaptação de monoaminas ou agem inibindo o metabolismo das mesmas (ELHWUEGI, 2004; ANDREASEN et al., 2009).

Diversas classes de medicamentos têm sido utilizadas para o tratamento da depressão, por volta de 65% a 70% dos pacientes obtém alguma melhora com os tratamentos convencionais, entretanto estes medicamentos apresentam diversos efeitos adversos, como arritmias, hipotensão, insônia e disfunção sexual (DONOGHUE & TYLEE, 1996; DEMYTTENAERE, 1997; MACDONALD, 1997; SUBHAN et al., 2010). Os efeitos adversos durante a terapia medicamentosa para a depressão estariam envolvidos com a baixa adesão dos pacientes ao tratamento (MACGILLIVRAY et al., 2003).

A fim de diminuir os efeitos adversos medicamentosos do tratamento com os antidepressivos convencionais, vêm crescendo a busca por medicamentos menos tóxicos e com menor risco de overdose em altas doses, com base nisso as indústrias farmacêuticas vem investindo também em medicamentos fitoterápicos. Plantas como a *Valeriana wallichii*, *Ginseng* e *Ginkgo biloba* são exemplos de fitoterápicos que demonstram atividades antidepressivas em estudos experimentais e até mesmo clínicos. Estas plantas demonstraram em seu mecanismo de ação, assim como outros medicamentos antidepressivos, envolvimento dos sistemas noradrenérgico, serotoninérgico e dopaminérgico (SAKAKIBARA et al., 2006; SUBHAN et al., 2010; WANG et al., 2010).

Sendo assim o estudo desses neurotransmissores e seu envolvimento com a depressão é de bastante relevância para o desenvolvimento de novos fármacos antidepressivos.

## **1.2 Transmissores do sistema nervoso central (SNC) e depressão**

Os principais neurotransmissores encontrados no SNC são as monoaminas, estas foram descritas primeiramente por volta de 1960 e desde então pesquisas têm demonstrado sua estreita relação com doenças neurodegenerativas e alterações do humor, além de outras patologias relacionadas ao SNC. As descobertas em relação a sua distribuição no organismo, metabolismo, síntese e à sua fisiologia tem proporcionado a descoberta de medicamentos que agem em distúrbios neuroafetivos como antidepressivos, antipsicóticos e ansiolíticos (MANN et al., 1996; WONG & LICÍNIO, 2001; NEMEROFF & OWENS, 2002).

A hipótese das monoaminas, um das mais bem aceitas relacionada com a fisiopatologia da depressão, afirma que no paciente com depressão ocorre uma deficiência de monoaminas como a 5-hidroxitriptamina (5-HT) ou serotonina, noradrenalina (NA) e dopamina (DA). De fato, vários estudos afirmam que a causa da depressão está relacionada com um déficit de todas as monoaminas transmissoras especialmente a serotonina (PRANGE et al., 1974 ; MILLAN, 2004 ; NUTT, 2008; ALTAMURA et al., 2008).

Pesquisas clínicas e pré-clínicas para investigar a ação dos medicamentos antidepressivos têm sido realizadas através da depleção das monoaminas no SNC. Estudos realizados com paraclofenilalanina (PCPA) e  $\alpha$ -metil-p-tirosina (AMPT), inibidores da síntese de serotonina e noradrenalina, respectivamente, em camundongos aumentou o tempo de imobilidade dos animais no teste do nado forçado, o que foi revertido pelo uso de antidepressivos (RODRIGUES et al., 2002; KASTER et al., 2005; MACHADO et al., 2008). Uma pesquisa clínica realizada em pacientes com depressão e sem depressão examinou a depleção das catecolaminas com o AMPT nestes pacientes concomitantemente ao uso de inibidores da recaptação de noradrenalina. Os resultados mostraram que o AMPT teve um pequeno efeito nos pacientes normais, mas quando administrado aos pacientes em tratamento para depressão apresentou uma remissão dos sintomas depressivos (CHARNEY, 1998).

Baseado nesta hipótese, diversos medicamentos antidepressivos têm sido estudados para o tratamento da depressão e muitos já estão sendo usados. Medicamentos como os antidepressivos tricíclicos (TCAs), inibidores seletivos da recaptação de serotonina (SSRIs) e inibidores da enzima que metaboliza as monoaminas (MAOIs) exercem seus efeitos através do aumento dos níveis das monoaminas transmissoras (ELHWUEGI, 2004; BOUVIER et al., 2003; SHEN & LIANG, 2007). No SNC podemos encontrar três principais vias monoaminérgicas: a vias noradrenérgica, serotoninérgica e dopaminérgica.

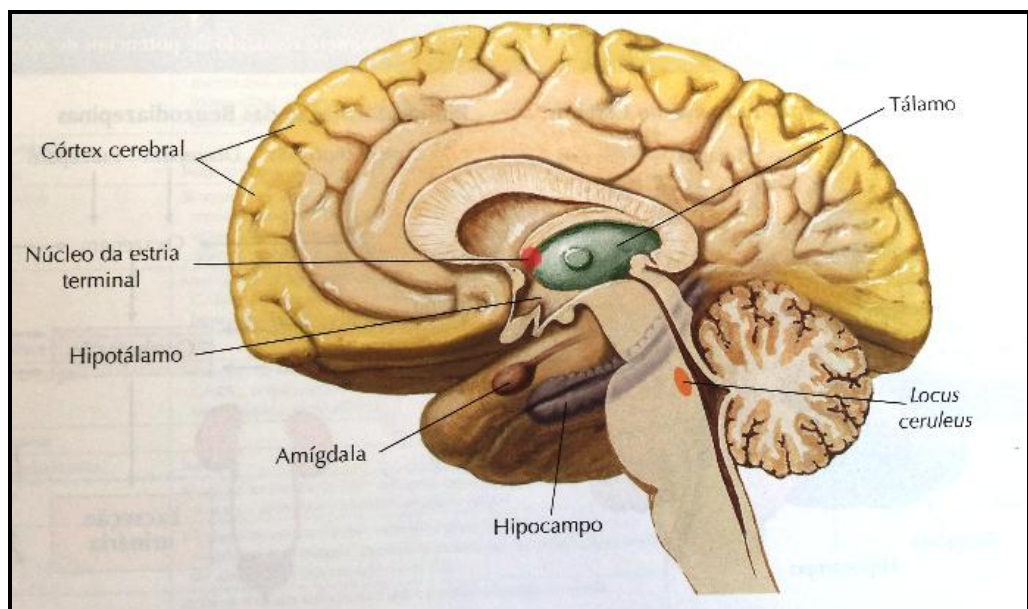
### 1.2.1 Via noradrenérgica e depressão

Os neurônios da via noradrenérgica (Figura 1) podem ser encontrados em pequenos agrupamentos na ponte e na medula oblonga, de onde saem ramificações para outras partes do cérebro e da medula espinhal, um dos locais com maior concentração de neurônio noradrenérgicos é o *locus ceruleus* (LC), encontrado na substância cinzenta da ponte e sua estimulação está bastante relacionada com a reatividade e o humor. Estudos mostram que drogas que agem nesta área do cérebro, estimulando a liberação de noradrenalina aumentam a atividade exploradora e o estado de alerta (CIRELLI et al., 1996; STONE et al., 2004). Outras pesquisas mostram que drogas antidepressivas que agem nesta área do cérebro melhoram o humor em pacientes depressivos, além de aumentar a disposição para a realização das atividades diárias (KITAYAMA et al., 1994; WEISS et al., 2005).

Os neurônios noradrenérgicos podem ser encontrados tanto na periferia como no sistema nervoso central (SNC), sendo as terminações nervosas simpáticas as maiores responsáveis pelo conteúdo de noradrenalina na periferia (SADOCK, 2007). Os receptores para noradrenalina são divididos em receptores  $\alpha$  e  $\beta$ , sendo os receptores  $\alpha$  divididos em  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ , e os receptores  $\beta$  divididos em  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$ . Todos os receptores da transmissão noradrenérgica agem em receptores do tipo metabotrópicos que estão acoplados à proteína G, sendo que os receptores  $\alpha_1$  agem através da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular via fosfolipase C, os receptores  $\alpha_2$  agem inibindo a produção de AMPc e os canais de cálcio, já os receptores  $\beta$  agem através da estimulação ou inibição da adenilato ciclase e aumento ou redução dos níveis

de AMPc intracelular (COOPER et al., 1991; RANG & DALE, 2005). COLOCAR EDIÇÃO MAIS RECENTE.

Os receptores para adrenalina e noradrenalina podem ser encontrados em todo o SNC, sendo sua concentração maior na área do *locus ceruleus* de onde inervações partem para outras áreas do SNC como o córtex cerebral, tálamo, hipotálamo, bulbo, sistema olfatório, cerebelo, mesencéfalo e medula espinhal (ARRANZ et al., 2001; SADOCK, 2007). Estudos mostram que o hipotálamo seria a área de maior concentração dos receptores adrenérgicos (SINGEWOLD et al., 1994; BERRIDGE et al., 2003).



**Fonte:** Raffa, 2006.

### **Figura 1. Vias noradrenérgicas no Sistema Nervoso Central (SNC).**

A noradrenalina assim como outras catecolaminas é sintetizada dentro das terminações nervosas. As catecolaminas são substâncias que possuem um núcleo catecol e uma cadeia lateral de etilamina ou de um de seus derivados, como a noradrenalina e a dopamina. Para a síntese das catecolaminas é necessário um precursor, denominado L-tirosina, um aminoácido aromático presente nos líquidos orgânicos, e captados pelas terminações nervosas

adrenérgicas. A primeira reação para síntese das catecolaminas, chamada de etapa limitadora de velocidade, é catalisada pela enzima tirosina hidroxilase (TH), nesta etapa a tirosina é convertida em diidroxifenilalanina (DOPA). A segunda etapa consiste na conversão da DOPA em dopamina pela enzima DOPA descarboxilase, a seguir a dopamina é convertida em noradrenalina pela dopamina  $\beta$ -hidroxilase (RANG & DALE, 2005; KATZUNG, 2005; GOODMAN & GILMAN, 2011).

A noradrenalina já sintetizada é armazenada em vesículas dentro dos neurônios noradrenérgicos, uma pequena quantidade de noradrenalina também pode ser encontrada livre dentro da célula neuronal. Dentro destas vesículas podemos encontrar além de noradrenalina, ATP e cromogranina A. O ATP estaria envolvido com a contração rápida da musculatura lisa. A liberação da noradrenalina de dentro das vesículas ocorre através do processo de exocitose, ou seja, a despolarização da membrana da célula neuronal promove a abertura dos canais de  $Ca^{2+}$ , o que gera a fusão e descarga das vesículas sinápticas (RANG & DALE., 2005; GOODMAN & GILMAN, 2011).

A noradrenalina que é liberada pela exocitose após despolarização da membrana neuronal também pode retornar às terminações nervosas por um processo chamado captação 1. Esta captação funciona como um sistema transportador para as catecolaminas, já a captação 2 promove a captação extraneuronal de catecolaminas. Esse transporte é saturável, ocorre gasto de energia e depende do gradiente de  $Na^+$  e  $Cl^-$ . Algumas substâncias podem fazer uso desses sistemas de transportadores, como a imipramina (inibidor da recaptação da monoaminas) e a fluoxetina (inibidor seletivo da recaptação de serotonina). Este sistema de transporte (captação 1) pode ser usado tanto para a recaptação de monoaminas, como para a liberação de noradrenalina da célula neuronal através de sua troca por algum substrato (AXEROLD, 1971; RANG & DALE, 2005).

As catecolaminas podem ser metabolizadas nas fendas sinápticas pela enzima monoamina oxidase (MAO), envolvida com o catabolismo nos tecidos neuronais, e pela catecol o-metil transferase (COMT) responsável pelo metabolismo extraneuronal e encontrada amplamente no corpo e SNC (COSTA; 1972). A enzima MAO pode ser encontrada no

interior das células acoplada as mitocôndrias e age nas catecolaminas que estão livres na fenda sináptica. A COMT pode ser encontrada em tecidos tanto neuronais como não neuronais. Ao metabolizar a noradrenalina no cérebro ocorre a produção do metabólito que é um derivado etilenoglicol (MOPEG), na periferia o metabolismo da noradrenalina produz o ácido 3-metoxi-4-hidroximandélico (VMA). (MOREAU, 1993).

Como já mencionado anteriormente o *locus ceruleus* é a área de maior concentração neuronal noradrenérgica no SNC, seus feixes se projetam para áreas como o córtex cerebral, sistema límbico, tálamo e hipotálamo. Uma estimulação do *locus ceruleus* estaria envolvida com situações de estresse, ocasionando o aumento de noradrenalina na fenda sináptica, desta forma a ansiedade e a depressão podem estar relacionadas a uma desregulação do sistema noradrenérgico (KATZ et al., 1996; KANDEL et al., 2000; HALES, 2006).

Estudos mostram que fármacos que aumentam a disposição de catecolaminas na fenda sináptica como a imipramina que inibe a recaptação de monoaminas (noradrenalina e serotonina), e a fluoxetina que inibe seletivamente a recaptação de serotonina são utilizadas no tratamento da depressão, com melhora dos sintomas depressivos em algumas semanas (TATSUMI et al., 1997; NESTLER et al., 2002; ELHWUEGI, 2004). Pesquisas clínicas e pré-clínicas indicam que o sistema noradrenérgico está relacionado com a fisiopatologia da depressão e que uma depleção de noradrenalina também altera os efeitos de algumas drogas antidepressivas (CRYAN et al., 2002a; O' LEARY et al., 2007; NUTT, 2006). Isto pode ser comprovado através de estudos com agentes antidepressivos inibidores da monoaminoxidase (inibidores da MAO), como a toloxatone, que ao inibir a MAO aumenta consideravelmente os níveis de monoaminas no cérebro (WONG, et al., 1995).

### 1.2.2 Via dopaminérgica e depressão

Os neurônios das vias dopaminérgicas (Figura 2) produzem o neurotransmissor dopamina, envolvido em distúrbios de déficit de atenção, dependência de drogas, bem como doenças neurodegenerativas como o Parkinson e transtornos como a esquizofrenia. Os neurônios dopaminérgicos localizam-se principalmente no corpo estriado, sistema motor

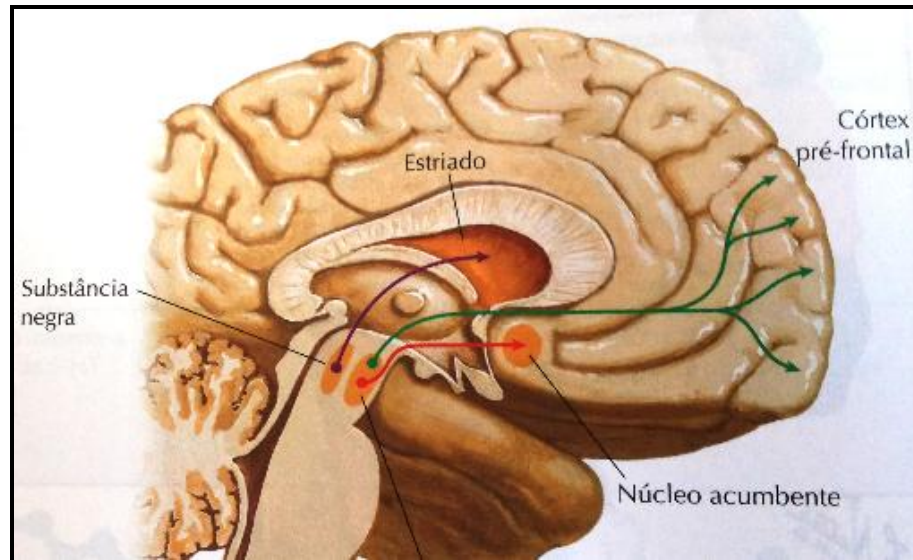
extrapiramidal, sistema límbico e hipotálamo. As vias dopaminérgicas podem ser divididas de acordo com a sua localização neuronal em vias nigroestriatal, mesolímbica-mesocortical e sistema túbero-hipofisário ou via tuberoinfundibular.

A via nigroestriatal projeta seus corpos celulares na substância negra e terminam suas projeções no corpo estriado (caudado-putamen). Estes neurônios são responsáveis principalmente pelo controle motor o que pode ser observado na doença de Parkinson, onde uma degeneração da via nigroestriatal faz com que o paciente apresente sintomas motores como, por exemplo, os tremores visíveis na doença de Parkinson. Medicamentos antipsicóticos que bloqueiam os receptores  $D_2$  localizados nesta via geram efeitos adversos de parkinsonismo. Outras pesquisas mostram que há uma relação entre doença de Parkinson e depressão, sugerindo que além do controle motor, o trato nigroestriatal também está envolvido com o controle do humor (LANG, 1998; SADOCK, 2007).

A via mesolímbica-mesocortical projeta seus corpos celulares na área tegumentar ventral adjacente a substância negra, com fibras que se estendem para o córtex cerebral e sistema límbico (núcleo acumbens e amígdala). Os feixes que se projetam para o córtex estão envolvidos com ações como aprendizado e memória, já os feixes que se projetam para o sistema límbico estão envolvidos com o comportamento motivacional e as emoções. De fato, pesquisas mostram que pacientes com esquizofrenia apresentam comportamento agressivo e falta de motivação para as atividades, devido a alterações no sistema límbico. Estudos de neuroimagem mostraram uma redução no volume do hipocampo e da amígdala em doentes com esquizofrenia. Outros estudos mostraram que uma deficiência de dopamina na área mesolímbica está relacionada com sintomas de depressão como anedonia e perda da motivação (SADOCK, 2007; DUNLOP & NEMEROFF, 2007).

A via tuberoinfundibular concentra seus corpos celulares na área periventricular do hipotálamo e projeta seus feixes para a eminência média do hipotálamo e hipófise. A dopamina atua nesta via como um inibidor da produção de prolactina pela hipófise. Medicamentos antipsicóticos, antagonistas dos receptores de dopamina nesta via, aumentam

os níveis de prolactina, gerando eventos adversos como ginecomastia (FELDMAN et al., 1997; RANG & DALE, 2007; SADOCK, 2007).



**Fonte:** Raffa, 2006.

### **Figura 2. Vias dopaminérgicas no Sistema Nervoso Central (SNC).**

A síntese da dopamina segue as mesmas etapas da síntese de noradrenalina. Entretanto, os neurônios dopaminérgicos não contêm dopamina  $\beta$ -hidroxilase e, portanto não produzem noradrenalina. A dopamina também é metabolizada pela MAO<sub>B</sub> e pela COMT, gerando seus produtos de degradação, o ácido diidroxifenilacético (DOPAC) e o ácido homovanílico (HVA).

Os receptores para dopamina estão divididos em dois grupos, D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>. Os receptores do grupo D<sub>1</sub> estão subdivididos em D<sub>1</sub> e D<sub>5</sub>, e os receptores do grupo D<sub>2</sub> estão subdivididos em D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> e D<sub>4</sub>. Todos estes receptores agem através da proteína G, entretanto os receptores do grupo D<sub>1</sub> agem através da proteína G estimulante, com conseqüente aumento do AMPc intracelular; já os receptores do grupo D<sub>2</sub> apresentam suas ações na proteína G inibidora, diminuindo a formação de AMPc. O receptor D<sub>2</sub> predomina em áreas como o caudado e o putamen no corpo estriado, os receptores D<sub>3</sub> estão mais concentrados em áreas da via



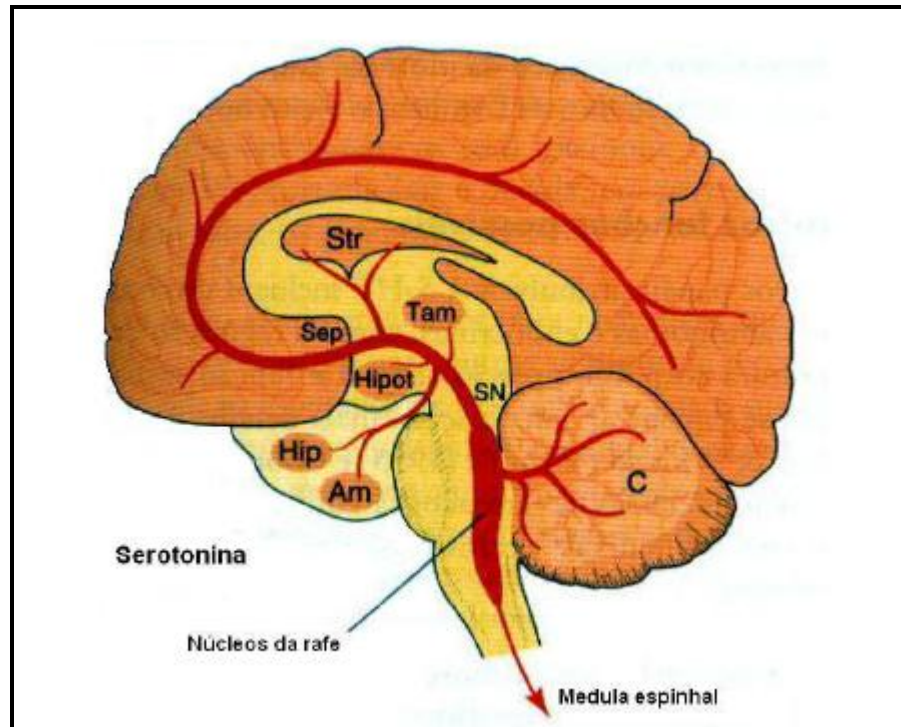
mesolímbica especialmente o núcleo acumbens, o receptor D<sub>4</sub> é expresso em maior quantidade no córtex frontal e estudos tem mostrado uma relação deste receptor com a dependência de drogas demonstrando assim uma possível localização deste receptor também em áreas do sistema límbico (COOPER et al., 1991; SADOCK, 2007).

Diversos estudos experimentais já demonstraram que a dopamina está envolvida com a depressão. Estudos clínicos mostraram que há uma diminuição nos níveis de dopamina e de seus metabólitos no cérebro de pacientes depressivos e que cometeram suicídio (WILLNER et al., 2005; MITANI et al., 2006; PAPAKOSTAS, 2006). Sintomas comuns da depressão como anedonia, disforia e perda da motivação estão relacionados com um déficit na transmissão de dopamina (HEINZ et al., 1994). Um estudo mostrou que o efeito antidepressivo da melatonina em animais no teste da suspensão da cauda foi devido a sua interação com o sistema dopaminérgico, ativando os receptores D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> (BINFARÉ et al., 2010). Outros estudos mostraram que o antagonista dos receptores D<sub>1</sub> de dopamina (SCH 23390) e o antagonista seletivo para os receptores D<sub>2</sub> (sulpirida) preveniram os efeitos antidepressivos de inibidores da recaptção de dopamina, como a bupropiona e nomifensina no teste do nado forçado em camundongos (YAMANDA et al., 2004; MACHADO et al., 2009; MELO et al., 2010; AMARAL et al., 2013)

### 1.2.3 Via serotoninérgica e depressão

As vias serotoninérgicas (Figura 3) localizadas principalmente na porção superior da medula oblonga, mais especificamente nos *núcleos da rafe* produzem o neurotransmissor serotonina (5-HT). Estes núcleos projetam-se para outras áreas do sistema nervoso como o córtex cerebral, hipocampo, gânglios da base, sistema límbico e hipotálamo. Pesquisas apontam o 5-HT como principal neurotransmissor envolvido com a depressão, sendo seu papel muito importante para o desenvolvimento de drogas antidepressivas (SAKAI et al., 2001; LESCH, 2001). Barnes & Sharp, 1999, descreveram algumas funções das vias serotoninérgicas no cérebro, relacionando o neurotransmissor serotonina com ações como alucinações, alterações, comportamentais, sono, vigília, humor e até mesmo comportamento alimentar. No paciente com depressão podemos notar alterações nestas funções fisiológicas

controladas pelas vias serotoninérgicas, o que explica o uso de medicamentos que agem nestas vias, para tratamento e controle da depressão maior (ARRANS et al., 2001; DREVETS et al., 2002).



**Fonte:** Rang et al., 2005

### **Figura 3. Vias Serotoninérgicas no Sistema Nervoso Central (SNC).**

A 5-hidroxitriptamina (5-HT) ou serotonina é sintetizada no SNC através do aminoácido triptofano que é adquirido na alimentação. Sua concentração depende do momento do dia e da quantidade adquirida na dieta. O triptofano é convertido em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) pela enzima triptofano hidroxilase que está presente nos neurônios serotoninérgicos, a seguir o 5HTP é descarboxilado através da enzima ácidoamino-aromático descarboxilase (AADC) em 5-HT. Depois de sintetizada, a serotonina é armazenada em vesículas sinápticas e é liberada pelo neurônio serotoninérgico após um potencial de ação que causa despolarização da membrana neuronal com a entrada do íon  $\text{Ca}^{2+}$  envolvido na exocitose deste neurotransmissor. Os receptores pré-sinápticos estão envolvidos no controle

da sua liberação. A ação sináptica da serotonina é encerrada quando esta é recaptada no terminal pré-sináptico por um transportador de membrana específico para serotonina (SERT) (ZIGMOND et al., 1999; SADOCK, 2007; GOODMAN & GILMAN, 2011).

Vários estudos têm demonstrado que a inibição da síntese de serotonina no SNC, promoveu em camundongos nos testes no nado forçado e teste de suspensão da cauda (testes utilizados para avaliar a ação depressiva de fármacos em camundongos e ratos) resultados positivos para depressão. Sendo estes efeitos revertidos por drogas que inibem a recaptção de serotonina, como a fluoxetina e a venlafaxina (SAKAI et al., 2001; WOOD et al., 2012). Uma substância utilizada em vários estudos para inibir a síntese de serotonina, chama-se paraclorfenilalanina (PCPA) que inibe irreversivelmente a enzima triptofano hidroxilase. Isto causa uma depleção das reservas de serotonina no cérebro, tecidos periféricos e sangue de camundongos e ratos em 2 a 3 dias do seu uso podendo diminuir em 90% os níveis de serotonina (PAGE et al., 1999; ZOMKOWOSKI et al., 2004; ZETTERSTRÖM et al., 2013).

A serotonina assim como a noradrenalina e a dopamina é metabolizada pela enzima MAO, de preferência a MAO<sub>A</sub>, que converte a 5-HT em 5-hidroxiindol acetaldeído (5-HIAA), logo após este produto é desidrogenado para formar ácido 5-hidroxiindol acético (5-HIAAA), o qual pode ser encontrado na urina (RANG & DALE, 2007).

Os receptores para serotonina são classificados em diversas famílias e estão distribuídos em grande quantidade em todo o organismo. Atualmente são reconhecidos 7 tipos de receptores 5-HT, do 5-HT<sub>1</sub> ao 5-HT<sub>7</sub>, divididos em subtipos, com um total de 14 receptores. Todos estão acoplados a proteína G, com exceção do receptor 5-HT<sub>3</sub> que age em receptores acoplados a canais iônicos permeáveis ao Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup>. Vários estudos têm demonstrado o envolvimento dos receptores serotoninérgicos com a depressão. Os receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A/2C</sub> e 5-HT<sub>3</sub> têm sido extensamente estudados como alvo para drogas antidepressivas. O mecanismo de ação de classes de antidepressivos como os antidepressivos tricíclicos, os inibidores da recaptção de serotonina (SSRIS) e os inibidores da monoaminoxidase (MAOIs) têm sido relacionadas ao envolvimento de receptores 5-HT<sub>1A</sub> (CRYAN & LUCKI, 2002; HENSLER, 2002; LEITCH et al., 2003; EISENSAMER et al., 2003).

O receptor 5-HT<sub>1A</sub> está subdividido em 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1C</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>1E</sub> e 5-HT<sub>1F</sub>. Estes receptores agem de forma inibitória sob a adenilil ciclase interferindo na síntese de AMPc intracelular nos neurônios pré-sinápticos no núcleo da rafe. O receptor 5-HT<sub>1A</sub> tem grande distribuição no sistema límbico e tem sido amplamente estudado como alvo para fármacos no tratamento da ansiedade e da depressão (RANG & DALE, 2007; NAYEBI et al., 2010; SHARIFI et al., 2013). Este receptor é autoinibitório, entretanto em locais como o córtex cerebral, hipocampo, gânglios da base, sistema límbico e hipotálamo estes receptores podem ser encontrados tanto pré como pós-sinápticos (LANFUMEY, 2000). Estudos mostram que uma deficiência na função e expressão de receptores 5-HT<sub>1A</sub> é um importante fator de desenvolvimento para a depressão (LEITCH et al., 2003). Já os receptores 5-HT<sub>1B</sub> e 5-HT<sub>1D</sub> são encontrados principalmente como receptores pré-sinápticos inibitórios nos gânglios da base. Entretanto os receptores 5-HT<sub>1B</sub> são encontrados em neurônios tanto serotoninérgicos quanto não serotoninérgicos (SARI, 2004). Um estudo realizado em camundongos *knockouts* para 5-HT<sub>1B</sub> mostrou um aumento do mecanismo antidepressivo do fármaco desipramine (inibidor da recaptação de monoaminas). Outro estudo mostrou que mutações e antagonistas específicos para este receptor (GR 127935 ou SB 216641) aumentou a sensibilidade de inibidores seletivos da captação de serotonina (SSRIs) (MAYORGA et al., 2001; GUILLOUX et al., 2011).

Os receptores da família 5-HT<sub>2</sub> possuem três subtipos de receptores, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> e 5-HT<sub>2C</sub>. Estão localizados principalmente no córtex e no sistema límbico. Estudos pré-clínicos e clínicos têm demonstrado o papel dos 5-HT<sub>2</sub> na fisiopatologia da depressão bem como no mecanismo de ação de alguns antidepressivos. Agonistas parciais do receptor 5-HT<sub>2A</sub> mostraram envolvimento com seu efeito antidepressivo (KHISTI & CHOPDE, 2000; ZOMKOWSKI et al., 2004; BOOTHMAN et al., 2006). Estudos revelaram que derivados de plantas ou substâncias que agem como agonistas destes receptores apresentam um efeito antidepressivo no teste do nado forçado em camundongos. A ritanserina (antagonista dos receptores 5-HT<sub>2A</sub>), utilizada como teste nestes estudos, foi capaz de reverter ações antidepressivas das substâncias estudadas e de fármacos inibidores da recaptação de serotonina como a fluoxetina (MACHADO et al., 2009; BIBIANA et al., 2010; BRUNING et al., 2011).

O receptor 5-HT<sub>3</sub> é o único da família dos receptores serotoninérgicos que age através de canais iônicos atuando como excitatórios. Este receptor também age indiretamente no aumento de dopamina no corpo estriado devido sua grande concentração neste local. Além disso, eles podem ser encontrados também na *área postrema*, envolvida com o controle do vômito e em outras partes do tronco encefálico. Estudos apontam que drogas antidepressivas podem agir neste receptor tanto como agonistas quanto como antagonistas (DALE; BRAVO & MASWOOD, 2006; BRUNING et al., 2011; MELO et al., 2011).

Estudos têm relatado que a serotonina é o principal neurotransmissor envolvido com a depressão. Vários estudos têm mostrado que alterações na área do hipocampo estão relacionadas com o desenvolvimento deste transtorno. O hipocampo controla várias funções cerebrais que estão alteradas no paciente depressivo como a cognição e resposta ao estresse. Um aumento nos níveis de 5-HT está relacionado com a neurogênese do hipocampo com consequente reversão da depressão para o estado normal (STOCKMEIER, 1997; AMAT et al., 1998; KAN & MING, 2005).

A partir das ações observadas nos receptores serotoninérgicos para estudo dos fármacos antidepressivos, podemos notar que estes receptores são alvos para pesquisas com possíveis drogas que possam agir no sistema serotoninérgico para o tratamento da depressão. Atualmente sabe-se que os antidepressivos tricíclicos (imipramina) bem como os inibidores da recaptação de serotonina (fluoxetina e paroxetina) são utilizados para tratar a depressão, devido suas ações em receptores serotoninérgicos. Especialmente os SSRIs, que atuam aumentando a concentração de serotonina na fenda sináptica e com isso permitem maior disposição deste neurotransmissor para agirem nos receptores serotoninérgicos pós-sinápticos (DETKE et al., 1995; HOCHMAN et al., 2003; BOCKAERT et al., 2008).

### **1.3 Fatores relacionados com a depressão**

Como já mencionado anteriormente, a hipótese das monoaminas tem sido a hipótese mais aceita em relação a fisiopatologia da depressão. Entretanto, além do déficit de monoaminas vários fatores têm sido relacionados a causa da depressão. A depressão pode

ocorrer espontaneamente após experiências traumáticas ou ser um sintoma de doenças neurológicas como esclerose múltipla ou doença de Parkinson, ou endócrinas como a síndrome de Cushing e o hipotireoidismo. Outro fator, bastante comum nos dias de hoje, e que também está relacionado com o desenvolvimento da depressão, é o estresse (PAULINO et al., 2009; KENNESON et al., 2013; VILLANUEVA, 2013).

O estresse seria um estado gerado pela percepção de estímulos que provocam excitação emocional e que perturbam a homeostase. O estresse dispara no organismo um processo de adaptação caracterizado, entre outras alterações, por diversas manifestações sistêmicas com distúrbios fisiológicos e psicológicos. Experiências realizadas em animais mostraram que a amígdala e o sistema septo-hipocampal estão relacionados com situações de estresse (MARGIS et al., 2003; RIBEIRO et al., 2000).

Estudos mostram que pacientes com a síndrome de Cushing, podem desenvolver depressão maior. O elevado nível de estresse e hormônios glicocorticóides interfere com a neurogênese hipocampal contribuindo para o desenvolvimento da depressão (ANACKER et al., 2013). Outros achados revelaram que o receptor para glicocorticóides (SGK1), que inibe a neurogênese hipocampal, tem sua estimulação aumentada em pacientes com depressão e em modelos animais de depressão (ISING et al., 2007; ANACKER et al., 2013). Vários autores indicam que a depressão maior está associada a uma má adaptação a respostas de estresse, devido a disfunção do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) (STROHLE & HOLSBOER, 2003; HOLSEN et al., 2013). Foi constatado que em cerca de metade dos pacientes deprimidos ocorre um aumento dos níveis de cortisol e alterações no ritmo e no controle do cortisol pelo eixo HHA, as quais podem ser revertidas com o uso de antidepressivos (SACHAR; BARON, 1979; HOLSBOER, 2001).

Há evidências que os corticosteroides estariam envolvidos também na atividade funcional do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (KUMAMARO et al., 2008). O BDNF faz parte da família das neurotrofinas (NTs) e está envolvido com a regeneração de células nervosas lesionadas. O papel das NTs tem sido de extremo interesse em pesquisas envolvendo doenças neuropsiquiátricas, sendo o BDNF, a principal NT de interesse em

pesquisas envolvendo transtornos de ansiedade, depressão unipolar, doença de Alzheimer e esquizofrenia (AYDEMIR et al, 2005; JIANG et al, 2005; SCHINDOWISKI, 2008; REIS et al, 2008). Foi observado que a regulação gênica do BDNF poderia estar alterada por fatores tais como estresse crônico (TSANKOVA et al. 2007) e que os antidepressivos aumentam os níveis de BDNF, que por si só já exerce efeito antidepressivo o que pode ser comprovado em estudos que mostram que o BDNF está aumentado nos doentes tratados com antidepressivos em relação aos doentes não medicados (NIBUYA, 1996; CHEN et al., 2001; ARANTES & COELHO, 2006).

Outro fator que também vem sendo estudado na fisiopatologia da depressão, são as Citocinas pro-inflamatórias. Estas além de desenvolver um importante papel na resposta imune e na inflamação, estão envolvidas com efeitos metabólicos e endócrinos como o metabolismo de neurotransmissores, função neuroendócrina e plasticidade neuronal. A administração de interleucina-6 induziu depressão e reverteu os efeitos antidepressivos da fluoxetine em modelos animais de depressão (SUKOFF-RIZZO et al, 2012).

Como visto anteriormente, o estresse está intimamente envolvido com distúrbios psiquiátricos, dentre estes, a depressão. O estresse altera as funções cerebrais no SNC e em vários sistemas do organismo além de induzir nas células danos oxidativos que estariam relacionados a doenças psiquiátricas. O aumento do estresse oxidativo nas células do SNC está relacionado com a depressão, o que pode ser evidenciado pela deficiência de defesas antioxidantes no plasma de pacientes com esta doença. Além disso, um aumento na peroxidação lipídica (quebra dos lipídios das membranas celulares) também ocorre nestes pacientes (de KLOET et al., 2005; BERK, 2007; YAGER et al., 2010).

### 1.3.1 Estresse oxidativo e a depressão

Estudos recentes têm sugerido que a ação dos medicamentos antidepressivos está relacionada com o crescimento de efeitos antioxidantes (BEHR et al., 2012). O estresse oxidativo ocorre a nível celular devido a excessiva produção de espécies químicas reativas, mais comumente conhecidas por radicais livres. Estes seriam um átomo ou molécula

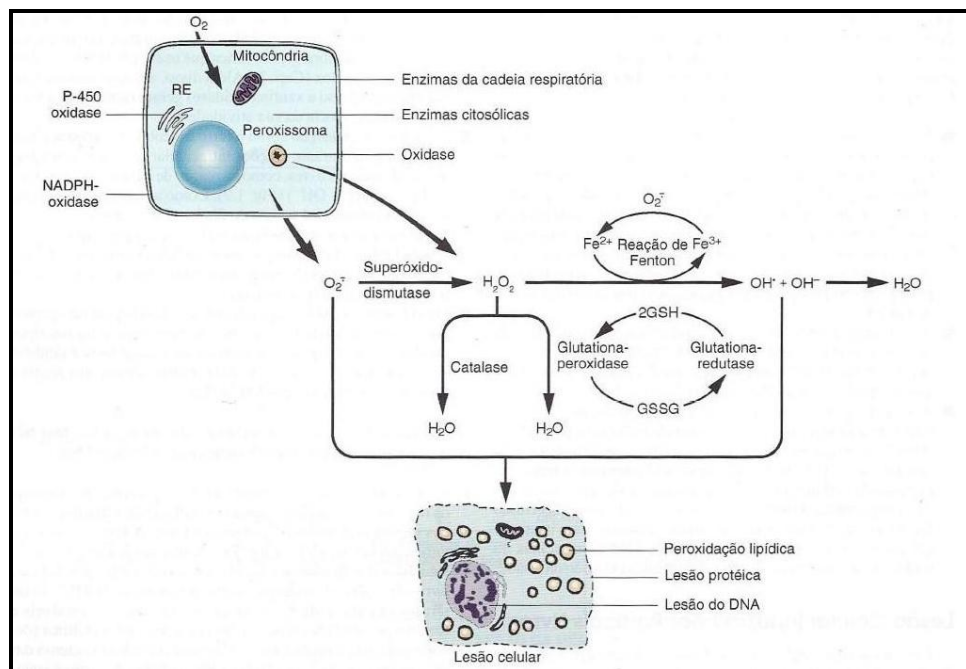
altamente reativos que contêm número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. Os radicais livres causam danos teciduais quando interagem com os carboidratos, ácidos nucleicos, lipídios e proteínas teciduais (HALLIWELL & GUTTERIGE, 1990; HALLIWELL, 1992).

Os radicais livres podem dar origem a uma série de espécies reativas, principalmente as espécies reativas de oxigênio (EROS). As EROS são produtos do metabolismo celular e apresentam ações que podem prejudicar as células do organismo, se não neutralizadas as EROS podem se acumular e causar estresse oxidativo, agravar o processo inflamatório e causar danos teciduais (HARWELL, 2007).

O cérebro é mais susceptível ao estresse oxidativo, pois suas células fazem grande uso de oxigênio e contêm um alto teor de lipídios que facilmente reagem com os radicais livres, além disso, as células do SNC contêm grande quantidade de íons  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  que promovem a formação de radicais livres. As células do hipocampo, estriado e do córtex cerebral são as áreas mais susceptíveis a danos (MAES et al., 2011).

A excessiva produção de EROS e uma atividade antioxidante insuficiente juntamente com as reações inflamatórias tem um papel considerável no desenvolvimento de várias doenças que ocasionam desordens do SNC, como as doenças neurodegenerativas, por exemplo, a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson e a esclerose múltipla (RADWANSKA-WALA, 2008; HASSIM-BAER, 2011).





**Fonte:** ROBBINS & COTRAN, 2005

#### **Figura 4. Estresse oxidativo e dano celular.**

Dentre as principais espécies reativas de oxigênio (EROS) estão incluídos o  $O_2^{\bullet-}$  (superóxido), o  $H_2O_2$  (peróxido de hidrogênio), a o  $OH^{\bullet}$  (radical hidroxila), ROO (radical peróxido), as espécies reativas de nitrogênio (ERNS), como NO (óxido nítrico) e o ONOO $^{\bullet}$  (peroxinitrito) e espécies reativas do cloro (RCS) como o HOCL (ácido hipocloroso) (HARWELL, 2007).

Para se proteger dos agentes oxidantes a célula possui um sistema de defesa que pode atuar antes que o agente cause lesão (Figura 4), constituída por glutaciona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutaciona-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E. Agentes que têm a função de reparar a lesão ocorrida, constituída pelo ácido ascórbico (vitamina C), glutaciona redutase (GSH-Rd) e GSH-Px, e vários outros. As principais enzimas antioxidantes incluem a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), e glutaciona peroxidase (GSH-Px). A SOD é a enzima mais eficiente em catalisar o superóxido  $O_2^{\bullet-}$  o qual gera o

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que pode ser removido por dois tipos de enzimas, a catalase (CAT) e a glutationala peroxidase (GSH- Px). (ROSS & MODEL, 1991; HALLIWELL, 2011).

A catalase é uma hemoproteína citoplasmática que catalisa a redução de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Pode ser encontrada no cérebro, no sangue, medula óssea, mucosas, rim e fígado (HECK et al., 2003).

As Glutationalas são bastante abundantes nas células dos órgãos e desenvolvem um importante papel na proteção do estresse oxidativo no cérebro. Glutationala redutase (GR) é a enzima responsável por converter a glutationala reduzida (GSH) a glutationala oxidada (GSSG) e água (DRINGEN, 2000; GAWRYLUK et al., 2011; SCHULIGA et al., 2002). A glutationala (GSH) age ainda, protegendo o rim contra lesões isquêmicas, transportando e servindo como reservatório para a cisteína, além de participar da depuração de agentes químicos e eliminação de produtos de lipoperoxidação, síntese de DNA e de algumas prostaglandinas (SHAN et al., 1990).

O radical hidroxil (OH<sup>•</sup>) é formado durante as reações de Fenton ( $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^{\bullet} + \text{OH}^-$ ), onde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é reduzido na presença de metais pesados como o Fe<sup>2+</sup> e o Cu<sup>1+</sup>, e nas reações de Haber-Weiss ( $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{OH}^{\bullet} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2^{\bullet-} + \text{H}^+$  e  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{O}_2 + \text{OH}^- + \text{OH}^{\bullet}$ ) onde o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é reduzido a radical hidroxil também na presença destes metais. Este radical age nos sistemas biológicos inativando ou causando mutações no DNA, inibindo proteínas presentes nas membranas celulares e iniciando a peroxidação lipídica. As reações ionizantes levam a produção do radical hidroxila. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> geralmente não é tóxico, exceto quando produzido em grandes quantidades, como nas reações de estresse (HARWELL, 2007; NICHOLLS, 2008).

Algumas espécies de nitrogênio podem ser potencialmente perigosas para as células, como o peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), formado nas reações entre O<sub>2</sub><sup>•-</sup> e óxido nítrico (NO). O peroxinitrito é tóxico para o organismo e pode lesionar proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos (WANG et al., 2002). O óxido nítrico (NO) tem um papel extremamente importante nos processos celulares, está envolvida que a regulação das funções cognitiva e

funcional; o óxido nítrico está envolvido na etiologia de distúrbios como a ansiedade e a depressão, através de sua participação na neuromodulação, neurotransmissão e neuroplasticidade. Em condições fisiológicas, o NO apresenta funções de neuroproteção, porém, quando produzido em excesso ou quando as células apresentam um nível baixo de antioxidantes, o NO se torna lesivo para as células. O NO juntamente com as espécies reativas de nitrogênio (RNS) estão relacionados com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (CALABRESE, 2007; ANKARALI et al., 2009; TALAROWSKA et al., 2014).

A membrana celular, ao passar pela peroxidação lipídica sofre alterações na sua estrutura ocasionando a perda de produtos celulares vitais como as enzimas lisossomais e com consequente formação de produtos tóxicos, como o malonildialdeído (MDA), uma molécula de baixo peso molecular formada a partir da peroxidação lipídica (JANERO, 1990). O MDA e outras substâncias reativas tiobarbitúricas (TBARS) se condensam com dois equivalentes do ácido tiobarbitúrico e podem ser vistos no espectrofotômetro (DEL RIO et al., 2005).

Várias pesquisas já confirmaram que o aumento do estresse oxidativo está relacionado com a depressão (CHOPRA et al., 1993; COYLE & PUTTFARCKER et al., 2011). Um estudo em grupo de 50 pacientes com depressão maior que tiveram uma remissão da depressão, depois de 3 meses de tratamento com 20 mg de fluoxetina foram testados antes e depois da remissão. Antes do tratamento os pacientes tiveram um aumento dos níveis de SOD e atividade da catalase e aumento dos níveis de MDA. Depois de três meses de tratamento com a fluoxetina os níveis de MDA foram normalizados (GALECKI et al., 2009).

Alterações no DNA mitocondrial gerando estresse oxidativo estariam envolvidas com o surgimento de doenças psiquiátricas, como a esquizofrenia e a depressão (TOBE, 2013). Outro estudo mostrou que os níveis de GSH encontravam-se baixos em cérebros post-mortem de pacientes com depressão, comparado ao controle (GAURYLUK et al., 2011).

Estudos têm demonstrado que um aumento nos marcadores para estresse oxidativo e um decréscimo de antioxidantes no plasma de pacientes tem correlação com a severidade da

depressão (YANIK et al., 2004; CUMURCU et al., 2009; SARANDOL et al., 2007). Este fato é importante, pois, fármacos antioxidantes poderiam auxiliar na melhora dos sintomas de depressão, diminuindo sua severidade. A fluoxetina e o citalopram, por exemplo, têm demonstrado diminuição do estresse oxidativo em pacientes com depressão maior (KHANZODE et al., 2003).

Diante disso se torna relevante a descoberta de fármacos que possam agir como antioxidantes a fim de diminuir o estresse oxidativo nas células, principalmente do SNC, de pacientes com depressão. Os antioxidantes devem ser capazes de inativar os radicais livres impedindo dano e lesões aos constituintes celulares, o que pode gerar apoptose (morte celular) (NAKAMURA, 2009).

#### **1.4 Modelos experimentais de depressão**

A busca por medicamentos antidepressivos e a procura por explicações acerca da neurobiologia da depressão têm incentivado o estudo de várias substâncias e plantas tanto em estudos clínicos quanto pré-clínicos. Entretanto, antes do medicamento ser comercializado este precisa passar por testes precisos de eficácia e segurança do medicamento. Sendo assim, os medicamentos antidepressivos precisam passar por testes pré-clínicos, estudos experimentais, a fim de comprovar seu efeito no tratamento da depressão. Para isto modelos animais de depressão têm sido usados a fim de simular o comportamento depressivo que ocorre no ser humano, em animais (LINDE et al., 2011).

Os modelos animais de depressão são excelentes para a identificação de novos fármacos antidepressivos e permitem estudar os possíveis mecanismos de ação destes fármacos. Os modelos animais de depressão devem ter analogia com a depressão humana na sua manifestação e provocar uma mudança comportamental no animal que deve ser revertida pelo mesmo tratamento antidepressivo utilizado nos seres humanos (MCKINNEY & BUNNEY, 1969).

O modelo mais utilizado para estudar a depressão em animais foi proposto por Porsolt e cols. em 1977, este modelo provoca no animal uma ação de desespero comportamental, conhecido por teste do nado forçado (TNF). Este teste tem alta reprodutibilidade laboratorial e uma alta eficácia em detectar medicamentos antidepressivos. O teste consiste em colocar o animal (rato ou camundongo) em um cilindro com água do qual o mesmo não consegue fugir. No início o animal apresenta movimentos para tentar escapar do cilindro como escalar o cilindro ou nadar de um lado para o outro, depois de um tempo, o animal desenvolve uma postura quase imóvel. Este comportamento reflete o fracasso do animal na tentativa de escapar do estímulo estressante (nado forçado), o qual equivale ao retardo psicomotor observado em muitos pacientes deprimidos (WILLNER, 1991). Os antidepressivos reduzem o tempo de imobilidade do animal neste teste.

Outro teste utilizado como modelo para estudo da depressão é o teste de suspensão da cauda (TSC). Neste modelo também é aplicado o princípio do desespero comportamental. Neste teste o animal é colocado preso pela cauda sob uma altura de 30 cm da superfície. No início, assim como no teste do nado forçado, o animal tenta escapar, mas depois de certo tempo ele fica imóvel. Neste modelo também é avaliado o tempo de imobilidade do animal (STERU et al., 1985).

O TNF e o TSC são bastante utilizados como modelos de depressão para *screening* de drogas com ação antidepressiva (PORSOLT et al., 1978; STERU et al., 1985). Estes testes são bastante sensíveis e relativamente específicos para a avaliação de fármacos como os inibidores da recaptação de serotonina (SSRI), inibidores da monoamino oxidase (MAOI) e antidepressivos tricíclicos (TCA). Estes medicamentos diminuem o tempo de imobilidade dos animais em ambos os testes (TNF e TSC), o que pode ser comprovado na prática clínica, onde a eficácia dos antidepressivos nestes testes está relacionada com sua potencialidade no uso clínico (PORSOLT, 2000).

### 1.5 Uso de plantas medicinais na depressão

O uso de plantas para o tratamento de diversas enfermidades tem sido bastante explorado nos últimos anos. Sabe-se que as plantas medicinais são utilizadas pela população há bastante tempo, entretanto seu uso é feito de forma empírica e muitas vezes as plantas acabam sendo utilizadas indevidamente (VASCONCELOS, 2004).

Para a avaliação da eficácia e toxicidade das plantas medicinais são necessários estudos científicos como, por exemplo, estudos experimentais em animais. O objetivo destes estudos é conhecer a farmacologia e farmacodinâmica destas substâncias a fim de verificar sua segurança antes de estudá-las em seres humanos (RATES, 2001; CARLINI, 2003). Atualmente o uso de plantas como medicamento passou a ter um maior rigor acerca da verificação de sua eficácia e toxicidade, desta a forma as indústrias farmacêuticas têm aumentado seu interesse em relação ao uso das plantas medicinais.

Várias plantas têm sido pesquisadas por sua ação no SNC nas desordens psiquiátricas, dentre elas a depressão. Plantas como a *Valeriana*, *Gastrodia elata*, *Lafoensia pacari*, *Marapuama*, *Ginkgo biloba* e *Paulínia cupana* (*Guaraná*) têm sido estudadas por seus efeitos no SNC como ansiolíticos e antidepressivos, apresentando bons resultados. Nos testes do nado forçado (TNF) e suspensão da cauda (TSC) estas plantas apresentaram bons efeitos como antidepressivos, diminuindo o tempo de imobilidade dos animais nestes testes. Estes resultados foram comparados com animais controle e com inibidores da recaptação de monoaminas e inibidores seletivos da captação de serotonina, como a imipramina e fluoxetina respectivamente, drogas bastante utilizadas no tratamento da depressão (SAKAKIBARA et al., 2006; OTOBONE et al., 2007; HATTESOH et al., 2008; PIATO et al., 2008; CHEN et al., 2009; GALDINO et al., 2009).

A maior desvantagem do uso das drogas tradicionais para o tratamento da depressão seriam seus inúmeros efeitos adversos. Além disso, estas drogas demoram semanas para agir e cerca de 30% dos pacientes abandonam o tratamento devido estes efeitos (EINAT, 2007). Devido estas limitações dos antidepressivos e um menor número de efeitos adversos, vários

medicamentos originados de plantas possuem melhor adesão pelos pacientes. Diversas plantas têm sido testadas para verificar sua ação como antidepressivos no modelo do nado forçado, de forma aguda ou crônica, apresentando resultados positivos no tempo de imobilidade no teste do nado forçado (NATHAN, 2001; RODRÍGUEZ-LANDA & CONTRERAS, 2003; ZHANG, 2004; SAKAKIBARA et al., 2006).

## **1.6 Óleos essenciais e suas ações no SNC**

Os óleos essenciais são produtos aromáticos do metabolismo secundário de várias plantas, normalmente produzidos por células secretoras, sendo encontrados em diversas partes do vegetal (CONNER, 2003). Trata-se de um conjunto de substâncias que apresentam componentes químicos diferentes como os hidrocarbonetos, alcoóis, aldeídos, cetonas, fenóis, etc. São bastante utilizados na perfumaria, podendo ser comercializados de forma bruta ou beneficiados e fornecer substâncias como o limoneno, citral, citronelal, eugenol e mentol (JUCÁ, 2007).

Há cerca de 300 óleos essenciais comercializados no mundo, sendo os 18 principais: o da laranja, da menta japonesa, do eucalipto, da citronela, hortelã-pimenta, limão, eucalipto (tipo citronela), cravo-da-índia, cedro (EUA), lima destilada (Brasil), spearmint, cedro (China), Lavadin, Sassafrás (China), cânfora, coentro, grape-fruit, patchouli (BIZZO & REZENDE, 2009).

Os óleos essenciais possuem atividades como inseticida, antimicrobiano, analgésico, anticaricida, anti-inflamatórias, antirreumática e como anticonvulsivante (HAMMER et al., 1999; JUNIOR-QUINTAN et al., 2011) . Estima-se que 60% dos óleos essenciais possuem atividade antifúngica e 35% atividades antimicrobianas (MARUYAMA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006).

Na sua constituição apresentam duas classes distintas, os terpenóides e os fenilpropanóides. Os terpenos são substâncias encontradas como compostos de muitos extratos vegetais e possuem mais de 55.000 metabólitos secundários isolados atualmente

(MAIAMONE; BARAN, 2007). Por possuírem sua estrutura dividida em duas unidades de isopreno ( $C_5H_8$ ) podem também ser chamados de isoprenóides e podem ser classificados de acordo com as quantidades de isopreno em sua estrutura, por exemplo, os monoterpenos são constituídos por duas unidades de isopreno ( $C_{10}H_{16}$ ), os sequiterpenos por três ( $C_{15}H_{24}$ ) e os diterpenóides por quatro ( $C_{20}H_{32}$ ). Eles podem ser classificados ainda em acíclicos (possuem cadeia aberta), monocíclicos (um anel), bicíclicos (dois anéis) e tricíclicos (três anéis) (ROBBERS, 1997; SIMÕES & SPTIZER, 2004).

Os monoterpenos, responsáveis por 90% da constituição dos óleos essenciais, juntamente com os sequiterpenos são moléculas mais presentes nos óleos essenciais. Devido suas atividades biológicas importantes, o consumo de óleos essenciais pelas indústrias farmacêuticas tem crescido bastante, sendo o Brasil um dos produtores de destaque juntamente com a Índia, China e Indonésia (BIZZO & REZENDE, 2009).

Diversas plantas que contêm óleos essenciais em sua constituição têm sido estudadas também por suas atividades no SNC. O extrato de *Valeriana wallichii* contém óleos essenciais que contribuem para sua atividade ansiolítica e antidepressiva envolvendo mecanismos que atuam via óxido nítrico (SAH et al, 2011) . O óleo essencial de *Aloysia gratissima* demonstrou além de atividades anti-helmíntico e antifúngico, efeito antidepressivo comprovado pelo TNF e TSC em camundongos (ZENI et al., 2011). Outro estudo mostrou demonstrou a atividade de dois constituintes do óleo essencial de *Magnolia bark*, o qual apresentou atividade antidepressiva em camundongos, com sua ação envolvendo os sistemas noradrenérgico e serotoninérgico (YI et al., 2009).

Constituintes como o 1,4 e 1-8-cineol, carvacrol, isopulegol, linalool e citronellol presentes em óleos essenciais de plantas como *Lavandula angustifolia*, *Citrus*, *Cymbopogon citratus*, *Ducrosia anethifolia* e *Cissus sicyoides* têm demonstrado atividade ansiolítica e sedativa em estudos experimentais em testes como o *Plus maze* (labirinto em cruz elevado), tempo de sono induzido por pentobarbital e *Hole board* (placa perfurada) em ratos e camundongos (SOUSA, 2012).



Baseado nesses e em outros estudos é que a procura por óleos essenciais têm crescido cada vez mais, em busca de substâncias que possam agir com finalidade terapêutica e com menos efeitos adversos, como no caso da depressão, onde o tratamento com os antidepressivos tradicionais apresenta vários efeitos adversos que muitas vezes fazem com que os pacientes abandonem o tratamento.

### 1.7 Acetato de citronelila

O acetato de citronelila (3,7-dimethyl-6-octen-1-yl acetate) (Figura 5) é um monoterpeno presente na constituição de vários óleos essenciais, produto do metabolismo de plantas. Citronelol, Citronelal e Acetato de citronelila fazem parte dos principais constituintes de óleos essenciais de plantas como limoeiro (citrus), Citronela (*Cymbopogon nardus*), rosas, capim-santo ou capim-limão (*Cymbopogon citratus*), manjerição (*Ocimum basilicum*), e eucaliptos que possuem propriedades aromáticas e biológicas, incluindo atividade antibactericida (HAMMER et al. 1999; DORMAN E DEANS. 2000; BAKKALI et al. 2008).

Um estudo realizado por Scherer et al., em 2009, investigou as atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo da Índia, citronela e palmarosa, plantas ricas em óleos essenciais estudadas em relação a atividade repelente em insetos bem como por sua ação antifúngica (MAKHAIK ET AL.; DUARTE et al., 2005; KUMAR et al., 2007). O óleo de citronela apresenta diversos constituintes, dentre eles o acetato de citronelila (1,46%). Neste estudo o óleo essencial de citronela apresentou fraca ação antioxidante, porém com forte ação antimicrobiana (SCHERER, 2009).

O acetato de citronelila está presente no óleo extraído da *Zanthoxylum tingoassuiba* (SILVA, DETONI & VELOSO, 2008), planta popularmente conhecida como casca preciosa, tinguaciba, limão-bravo e laranjeira do mato. A casca do seu caule é utilizada na medicina tradicional, na forma de chás ou infusões, como antiespasmódico, relaxante muscular, analgésico, sudorífero, antifúngico, diurético, anti-hipertensivo, antiagregação plaquetária, antiparasitário para *Ascaris lumbricoides*, *Taenia* sp, *Trichiuris trichiura* e *Shistosoma* sp., além de anti-inflamatório para infecções de garganta (DUARTE, 2000).

Um estudo realizado por Shen et al. (2012) mostrou que o acetato de citronelila é um potente agente contra hepatomas, com atividade pro-apoptótica em células HepG2. O acetato de citronelila também está presente em amostras significativas do extrato de *Zanthoxylum schinifolium*, o qual demonstrou ser um indutor de apoptose em células HepG2 e inibir o crescimento tumoral em células huh-7 (hepatoma de células humanas).

Outro estudo, realizado em nosso laboratório, mostrou que o acetato de citronelila possui atividade antinociceptiva em modelos de antinocicepção em camundongos. Este estudo mostrou que seu mecanismo de ação foi devido seu envolvimento com os receptores de glutamato através da proteína quinase C (PKC) e dos canais TRPV1, ASIC (RIOS et al., 2013).

Apesar de algumas pesquisas com o acetato de citronelila, são poucos os estudos que relatam a atividade desta molécula. Podemos destacar ainda pesquisas envolvendo uma possível atividade anti-inflamatória, antifúngica e antiparasitária deste, com ênfase na sua atividade larvívica e como repelente para insetos (SCHERER et al., 2009; TOZONI et al., 2010).

Já a investigação dos efeitos do acetato de citronelila sobre o Sistema Nervoso Central (SNC), até onde se sabe, ainda não foram realizadas. Dessa forma, estudos sobre as ações centrais em diferentes modelos comportamentais do acetato de citronelila bem como os mecanismos envolvidos são necessários e importantes no sentido de confirmar a utilização desta substância em doenças que afetam o sistema nervoso central.



**Fonte:** Sigma-Aldrich, 2014

**Figura 5:** Estrutura química do Acetato de Citronelila

## 2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

As doenças psicossomáticas têm crescido bastante nos últimos anos, antigamente estas doenças eram tratadas de forma agressiva e muitas vezes seu diagnóstico e tratamento eram negligenciados. O “doente psiquiátrico” era tratado como “louco” e ter um transtorno psiquiátrico era motivo de vergonha e isolamento social.

Atualmente, o grande avanço e busca da ciência em pesquisar novos fármacos para o tratamento dos transtornos psiquiátricos, tem proporcionado uma orientação maior por parte da população em buscar tratamentos efetivos para estas enfermidades. A depressão está entre os transtornos psiquiátricos mais incidentes na atualidade, e ao contrário do que muitas pessoas pensam, é uma doença que pode causar diversos danos para o indivíduo, família e sociedade.

O estresse da vida moderna, trabalhos estressantes, preocupações excessivas e problemas decorrentes da infância como o abuso e a baixa autoestima, tem cooperado para o aumento dos índices de depressão na vida adulta. De fato, vários estudos já demonstraram que os altos níveis de estresse, aumentam a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, aumentando a liberação de cortisol, hormônio este que está intimamente relacionado com a depressão.

Apesar dos inúmeros avanços da ciência, o tratamento da depressão é acompanhado de vários efeitos adversos decorrentes do uso dos antidepressivos, além disso, muitos desses medicamentos demoram várias semanas para apresentar eficácia no tratamento do paciente. Isto desestimula o paciente e muitas vezes promove o abandono do tratamento antes do tempo determinado.

Diante disso, os pesquisadores têm procurado estudar substâncias que sejam menos tóxicas para o organismo humano. As substâncias originadas de plantas apresentam efeitos adversos mais leves e maior aceitação pela população, este fato tem estimulado diversos laboratórios a realizar pesquisas com os chamados “produtos naturais”. Diversos países já

fazem pesquisas com plantas para o tratamento de transtornos psiquiátricos como a esquizofrenia, a depressão e a ansiedade. Em nosso laboratório, estudos de substâncias originadas de plantas como as Riparinas II e III , o Bis-eugenol, o Carvacrol e o Timol, têm mostrado bons resultados em relação a depressão, podendo contribuir para o surgimento de novos fármacos antidepressivos.

O acetato de citronelila é uma substância oriunda do óleo essencial de diversas plantas como a citronela, o capim limão e manjeriço. Já foram relatados efeitos anti-inflamatórios, bactericidas e inseticidas em relação a esta substância, e em nosso Laboratório, um estudo mostrou sua ação como analgésico (RIOS et al., 2013). Entretanto, suas ações no sistema nervoso central, até o presente momento, não foram elucidadas. Baseado em outros estudos que mostram ações antidepressivas de substâncias originadas de óleos essenciais como o carvacrol, o timol, a valeriana, dentre outros, nosso estudo objetivou estudar os efeitos neurocomportamentais e neuroquímicos do acetato de citronelila em relação à depressão, a fim de colaborar na descoberta de uma nova opção para o tratamento desta patologia.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar as ações do acetato de citronelila no sistema nervoso central, através da análise das alterações neurocomportamentais e neuroquímicas em camundongos. Desta forma, acreditamos contribuir para o conhecimento farmacológico das propriedades terapêuticas desta substância, visando melhor caracterizar suas atividades.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Realizar a análise da atividade antidepressiva do acetato de citronelila nos modelos experimentais do nado forçado e suspensão da cauda, assim como a participação do sistema noradrenérgico, serotoninérgico e dopaminérgico no mecanismo de ação antidepressivo dessa substância;
- Investigar a atividade ansiolítica do acetato de citronelila nos modelos experimentais do labirinto em cruz (*Plus maze*);
- Verificar a atividade sedativo-hipnótica do acetato de citronelila no modelo experimental de tempo de sono induzido por pentobarbital;
- Avaliar o efeito do acetato de citronelila sobre a atividade locomotora de camundongos submetidos ao Teste do campo aberto;
- Avaliar a atividade anticonvulsivante acetato de citronelila no modelo experimental de convulsão induzido por pentilenotetrazol (PTZ);
- Determinar as alterações neuroquímicas provocadas pelo acetato de citronelila em córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado de camundongos, avaliando-se os seguintes parâmetros:

- Níveis de monoaminas: DA, 5-HT e NE; e seus metabólitos – DOPAC e HVA (DA) e 5-HIAA (5-HT), em ensaio de cromatografia de alta performance (HPLC);
- Investigar o envolvimento antioxidante do acetato de citronelila através da determinação da atividade da catalase, dosagem de nitrito/nitrato e avaliação da peroxidação lipídica (dosagem de malonildialdeído);
- Avaliar a toxicidade aguda do acetato de citronelila através do protocolo OECD 423 e análise histológica.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Principais equipamentos utilizados

**Tabela 1. Relação dos equipamentos utilizados nos ensaios neuroquímicos.**

<b>Equipamentos</b>	<b>Marca/Modelo</b>
Agitador de tubos	Modelo 251, FANEN, SP, Brasil
Balança analítica	Modelo H5, Mettler, Suíça
Banho Maria	Modelo 102/1, Fanen, SP, Brasil
Bomba para HPLC	LC-10AD Shimadzu Corp., Japan
Centrífuga refrigerada (eppendorf)	Modelo Marathon 26 KMR, Fisher Scientific
Cubetas de plástico para leitura em espectrofotômetro	Sarstedt, Alemanha Oriental
Degaseificador	DGU-2 <sup>a</sup> Shimadzu Corp., Japan
Detector eletroquímico	L-ECD-6 <sup>a</sup> , Shimadzu Corp., Japan
Equipamento de Millipore para filtração a vácuo	Millipore Apparatus, Bedford, MA, USA
Espectrofotômetro	Modelo Beckman DU 640 B, Fullerton, CA, USA
Estufa para secagem	Modelo 315 SE FANEM, SP, Brasil
Filtros de fibra de vidro	GF/B Whatman, Maidstone, England
Freezer a -70° C	Modelo ULT 2586-3D14, Revco Scientific, Inc.
Homogeneizadores automáticos	Asheville, N.C., USA
Integrador C-R6A Chromatopac	Shimadzu Corp., Japan
Medidor de pH, modelo B374	Micrnonal, SP, Brasil
Micropipetas	H.E., Pedersen, Dinamarca
Sonicador	Modelo PT 10-35. Brinkmann Instrument Inc. NY, USA



## 4.2 Drogas e reagentes

**Tabela 2. Relação das drogas utilizadas nos testes comportamentais.**

<b>Droga</b>	<b>Laboratório</b>
Água destilada	deionizador
Álcool etílico	Quimex, Brasil
Bupropiona	Zybia ®, Glaxo-Wellcome
Imipramina	Imipra ®, Cristália
Fluoxetina	Fluxene ®, Eurofarma
p-clorofenilamina (PCPA)	Sigma-Aldrich, U.S.A.
Ritanserina	Sigma-Aldrich, U.S.A
Ondansetron	Sigma-Aldrich, U.S.A
Prazosina	Sigma-Aldrich, U.S.A
Ioimbina	Sigma-Aldrich, U.S.A
SCH 23390	Sigma-Aldrich, U.S.A
Sulpirida	Sigma-Aldrich, U.S.A
Tween 80 - Polyoxyethylene	Sigma-Aldrich, U.S.A
Sorbitan Mono-oleate	
Pentobarbital	Sigma-Aldrich, U.S.A
Petilenotetrazol (PTZ)	Sigma-Aldrich, U.S.A
Diazepam	Sigma-Aldrich, U.S.A

## 4.3 Substância em estudo: Acetato de citronelila

O acetato de citronelila foi obtido do laboratório Sigma-Aldrich Brasil Ltda. Apresenta um peso molecular de 198.3 g/mol e uma pureza de 80%. Sua fórmula molecular é  $C_{12}H_{22}O_2$ . Para a administração do acetato de citronelila, esta foi emulsificada em água destilada, juntamente com tween 80, a fim de obter uma concentração de 10 ml/kg para ser administrada nas doses de 50 e 100 mg/kg.

#### 4.4 Animais

Foram utilizados camundongos da espécie *Mus musculus* da variedade *Swiss*, machos, com peso variando entre 20-35 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará.

Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com 24 animais, com as mesmas condições ambientais, sala com temperatura de  $25\pm 1$  °C, com ciclo claro/escuro alternado de 12 horas, recebendo ração padrão e água *ad libitum*. Os animais foram mantidos sob jejum de 8 horas antes da realização dos experimentos.

O projeto para a execução desta tese foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA), do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará cujo número do protocolo de aprovação é 07/2012 (**ANEXO B**).

#### 4.5 Preparo das drogas

O acetato de citronelila foi dissolvido com Tween 80 a 2% e diluído em água deionizada, obtendo-se a concentração final de 5 e 10 mg/ml para ser administrada nas doses 50 e 100 mg/kg, respectivamente. Os grupos controles receberam veículo (água deionizada emulsificada a 2% com Tween 80). Os fármacos utilizados ao longo dos experimentos como padrão positivo, o diazepam (1 e 2 mg/kg) e imipramina (10 e 30 mg/kg) e todas as demais drogas foram dissolvidas e diluídas diretamente em água deionizada, com exceção da ritanserina que foi dissolvida em DMSO . O volume total de solução administrada nos animais foi de 10 ml/kg.

#### 4.6 Tratamento dos grupos experimentais

Os animais foram tratados com acetato de citronelila de forma aguda, nas doses de 50 e 100 mg/kg através da via oral (v.o.). As doses do acetato de citronelila foram determinadas após a verificação da curva de dose-resposta no teste do nado forçado. Imipramina 10 e 30

mg/kg, fluoxetina 35 mg/ kg e bupropiona 30 mg/kg, via intraperitoneal (i.p.) foram utilizados como drogas-padrão para os experimentos de depressão. Diazepam 1 e 2 mg/ kg, via i.p. foram utilizados nos testes de convulsão e campo aberto. Os animais foram submetidos aos testes 30 ou 60 minutos (min) após o tratamento intraperitoneal ou oral, respectivamente.

#### **4.7 Curva dose-resposta no teste do nado forçado**

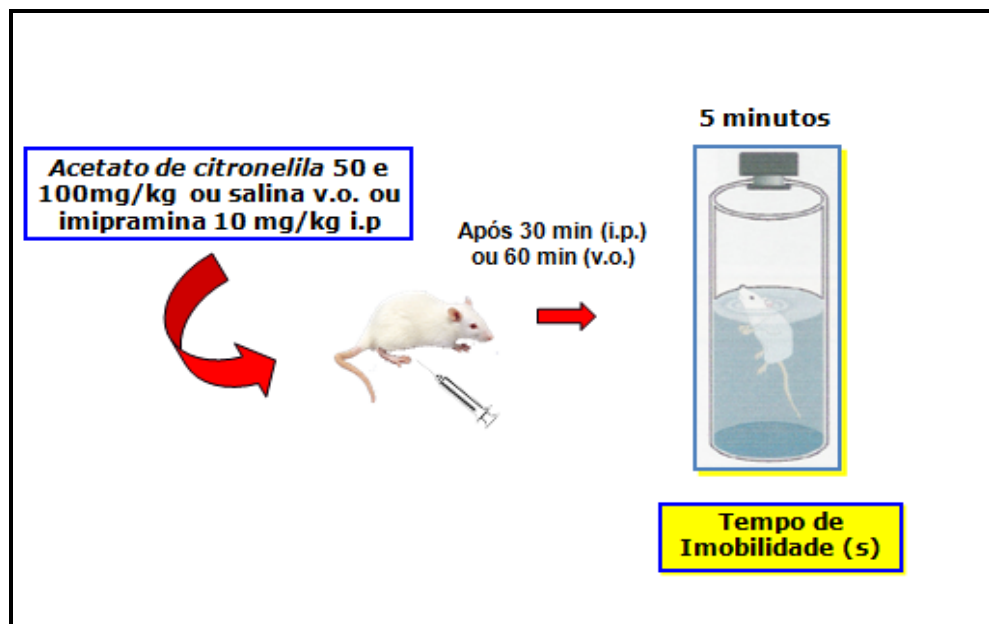
Baseado em outros estudos com óleos essenciais, utilizamos a dose inicial de 25 mg/kg, as demais doses foram 50 e 100 mg/kg. Os animais receberam acetato de citronelila ou veículo (água destilada emulsificada com 2% Tween 80) e após 60 minutos do tratamento os animais foram submetidos ao nado por 5 minutos, a fim de analisar o tempo de imobilidade dos animais neste teste para escolher a dose mais adequada para os testes subsequentes.

#### **4.8 Protocolo Experimental**

##### **4.8.1 Avaliação da atividade antidepressiva**

###### **4.8.1.1 Teste do nado forçado**

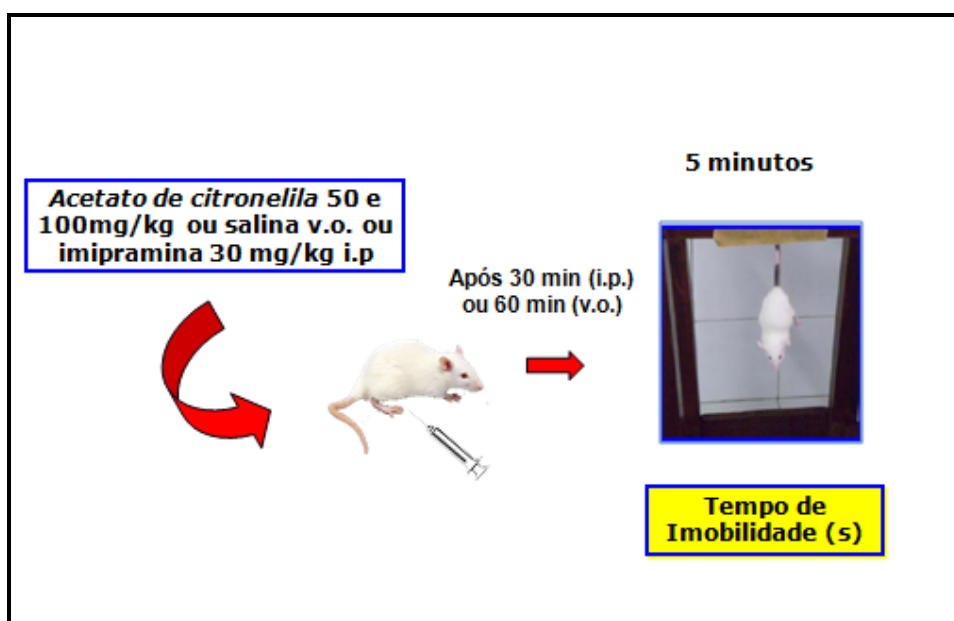
Neste experimento foram utilizados tanques de 22 cm de diâmetro e 40 cm de altura, contendo água fresca a  $23 \pm 1^\circ \text{C}$  até a altura de 20 cm do tanque. Após 60 minutos da administração oral do veículo e acetato de citronelila 50 e 100 mg/kg ou 30 minutos da administração de Imipramina (10 mg/kg, i.p.), os animais foram colocados, um de cada vez, dentro dos tanques (Figura 6). Neste experimento foi avaliado o tempo de imobilidade dos animais, por 5 minutos. O animal foi considerado imóvel quando permaneceu flutuado na água, fazendo apenas movimentos suaves necessários para manter a cabeça acima da água (PORSOLT et al., 1977).



**Figura 6. Teste do Nado Forçado.**

#### 4.8.1.2 Teste da suspensão da cauda

Neste teste os animais foram suspensos pela cauda através de uma fita adesiva acerca de 1 cm da ponta da cauda, numa plataforma 58 cm acima da bancada, durante 6 minutos. Durante esse tempo é observado o tempo de imobilidade do animal, em segundos (STERU et al., 1985). Os animais receberam veículo, acetato de citronelila 50 e 100 mg/kg por via oral e após 60 minutos foram submetidos ao teste. Os animais que receberam a droga padrão, imipramina (30 mg/kg, i.p.) foram submetidos ao teste após 30 minutos da administração (Figura 7).

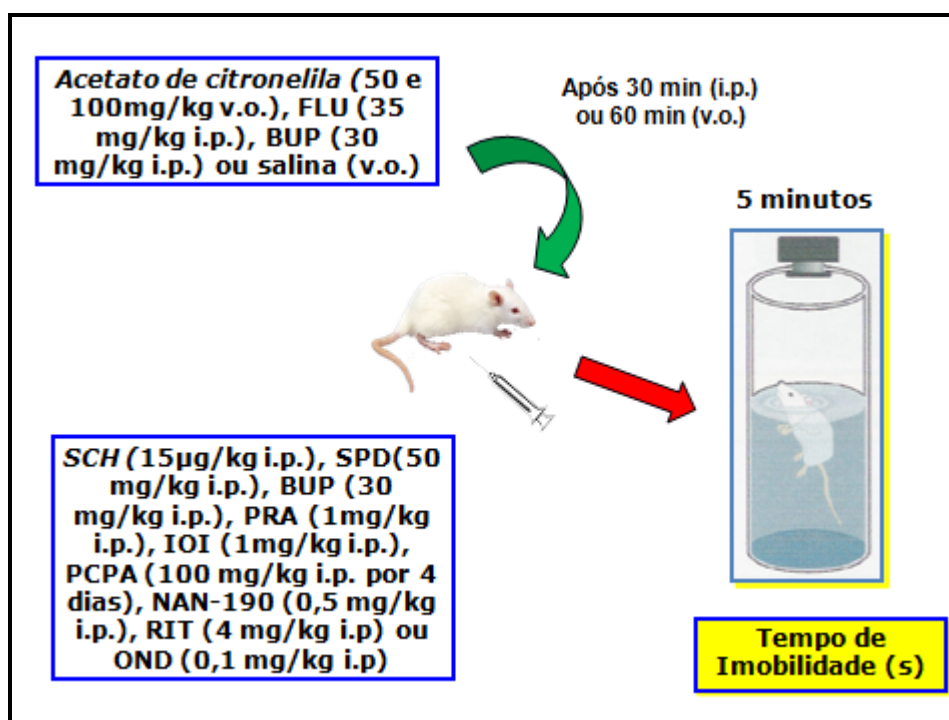


**Figura 7. Teste de Suspensão da Cauda.**

#### 4.8.2 Avaliação do mecanismo de ação antidepressivo

##### 4.8.2.1 Avaliação da participação do sistema noradrenérgico

Para avaliar o sistema noradrenérgico, os animais receberam prazosina (1 mg/kg, i.p.), um antagonista dos receptores  $\alpha$ -1 adrenérgicos ou ioimbina (1 mg/kg, i.p.) um antagonista  $\alpha$ -2 adrenérgico e após 30 minutos receberam acetato de citronelila (50 ou 100 mg/kg, v.o.), veículo (água destilada + 2% tween 80, v.o.) ou imipramina (10 mg/kg, i.p.). Depois de 60 minutos da administração de acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg, i.p.) ou veículo e após 30 minutos da administração de imipramina, os animais foram submetidos ao teste do nado forçado onde foi avaliado o tempo de imobilidade por 5 minutos (Figura 8).



**Figura 8. Avaliação do Mecanismo de ação no Teste do Nado Forçado.**

#### 4.8.2.2 Avaliação da participação do sistema dopaminérgico

Para a avaliação do sistema dopaminérgico, os animais receberam SCH (15 µg/kg, i.p.), antagonista dopaminérgico D1 ou Sulpirida (50 mg/kg, i.p.), antagonista dopaminérgico D2, 30 minutos antes da administração do acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg, v.o.), veículo (água destilada + 2% tween 80, v.o.) ou bupropiona (30 mg/kg, i.p.). Após 60 minutos da administração de acetato de citronelila (50 ou 100 mg/kg) ou veículo e após 30 minutos da administração de bupropiona, os animais foram submetidos ao teste do nado forçado, onde foi avaliado o tempo de imobilidade por 5 minutos (Figura 8).

#### 4.8.2.3 Avaliação da participação do sistema serotoninérgico

Para este experimento, os animais foram pré-tratados durante quatro dias consecutivos, com p-clorofenilalanina (PCPA, 100 mg/kg, i.p.), inibidor da síntese de serotonina. No quarto dia de tratamento os animais receberam acetato de citronelila (50 ou 100 mg/kg, v.o.), veículo

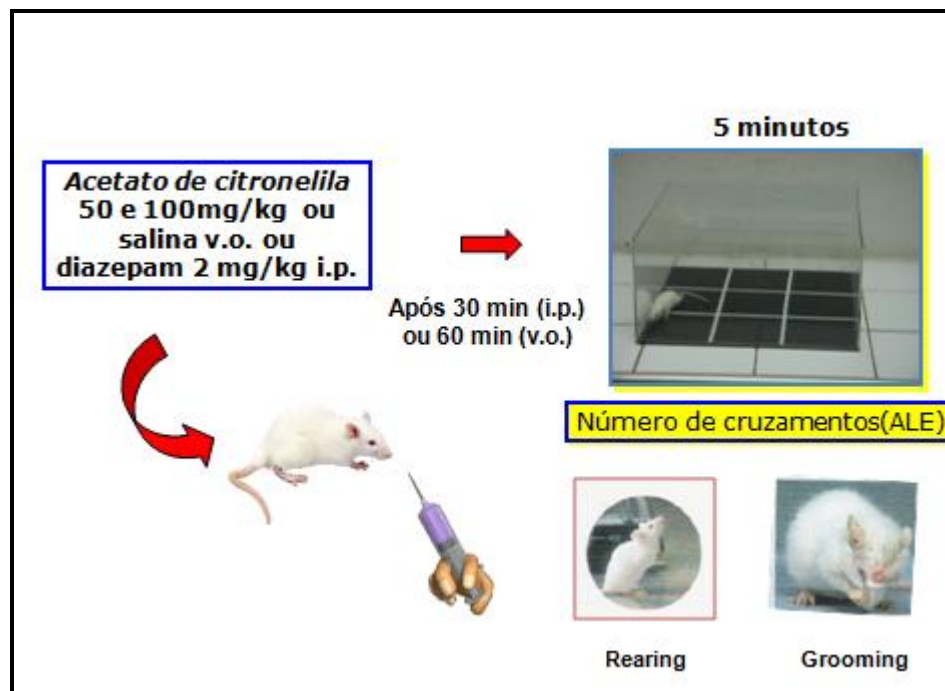
(água destilada + 2% tween 80, v.o.) ou fluoxetina (35 mg/kg, i.p.) 30 minutos após a administração de PCPA. Após 60 minutos da administração de acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg) ou veículo e 30 minutos da administração de fluoxetina, os animais foram submetidos ao teste do nado forçado. Foi avaliado o tempo de imobilidade por 5 minutos (Figura 8).

Para avaliar a especificidade do acetato de citronelila sob os receptores serotoninérgicos, foram formados grupos de diferentes substâncias que agem nestes receptores. Os grupos receberam anteriormente, NAN-190 (0,5 mg/kg, i.p.), antagonista do receptor 5-HT<sub>1A</sub>, Ritanserina (4 mg/kg, i.p.), antagonista do receptor 5-HT<sub>2A/2C</sub> ou ondasetron (0,1 mg/kg, i.p.), antagonista do receptor 5-HT<sub>3</sub> e após 30 minutos receberam acetato de citronelila (50 ou 100 mg/kg, v.o.) ou veículo (água destilada + 2% tween 80, v.o.) ou fluoxetina (35 mg/kg, i.p.). Depois de 60 minutos da administração de acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg) e 30 minutos da administração de fluoxetina os animais foram submetidos ao teste do nado forçado, onde o tempo de imobilidade foi avaliado por 5 minutos.

#### 4.8.3 Avaliação da atividade ansiolítica

##### 4.8.3.1 Teste do campo aberto

O teste do campo aberto é utilizado para testar a atividade exploratória do animal (ARCHER, 1973). O aparato é feito de acrílico e dividido em 9 quadrantes iguais. Para os camundongos, o tamanho utilizado é 30 x 30 x 15 cm. Após 30 ou 60 minutos dos tratamentos i.p. ou v.o., respectivamente, os animais, um de cada vez, foram colocados no centro do campo aberto (Figura 9). Os animais receberam acetato de citronelila 50 e 100 mg/kg v.o. e diazepam 2 mg/kg, via intraperitoneal. Foi avaliado o número de cruzamentos com as quatro patas (atividade locomotora espontânea, ALE), bem como o número de *rearings* (levantamentos verticais) e *groomings* (comportamento de auto-limpeza), durante um tempo de 5 minutos.



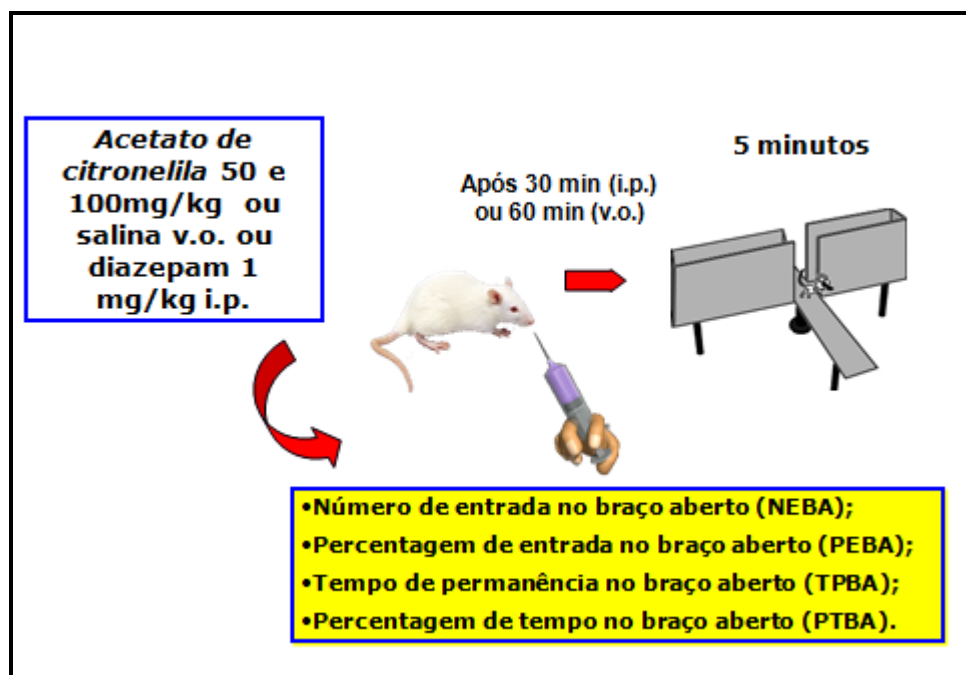
**Figura 9. Teste do Campo Aberto.**

#### 4.8.3.2 Labirinto em cruz elevado (*Plus Maze*)

Neste teste drogas com atividade ansiolítica aumentam a frequência de entradas e/ou o tempo gasto nos braços abertos, enquanto que drogas ansiogênicas fazem o inverso. O aparelho é construído em acrílico e coberto por fórmica preta, com 4 braços elevados 45 cm do chão, sendo dois braços abertos (30 cm x 5 cm) perpendiculares a dois braços fechados (30 cm x 5 cm x 25 cm). No centro do labirinto (5 x 5 cm) existe um quadrado central onde o animal é colocado com a cabeça voltada para um dos braços fechados no início do experimento (Figura 10). Após 60 minutos do tratamento com veículo, acetato de citronelila 50 e 100 mg/kg, v.o. ou 30 minutos da administração intraperitoneal de Diazepam 1 mg/kg (utilizado como droga padrão para a ação ansiolítica), os animais foram colocados neste aparato (LISTER, 1987).



Foi registrado o tempo de permanência do animal em cada braço e o número de entradas nos braços abertos e fechados, durante 5 minutos. O experimento foi realizado numa sala de comportamento isolada de ruídos e com baixa iluminação.



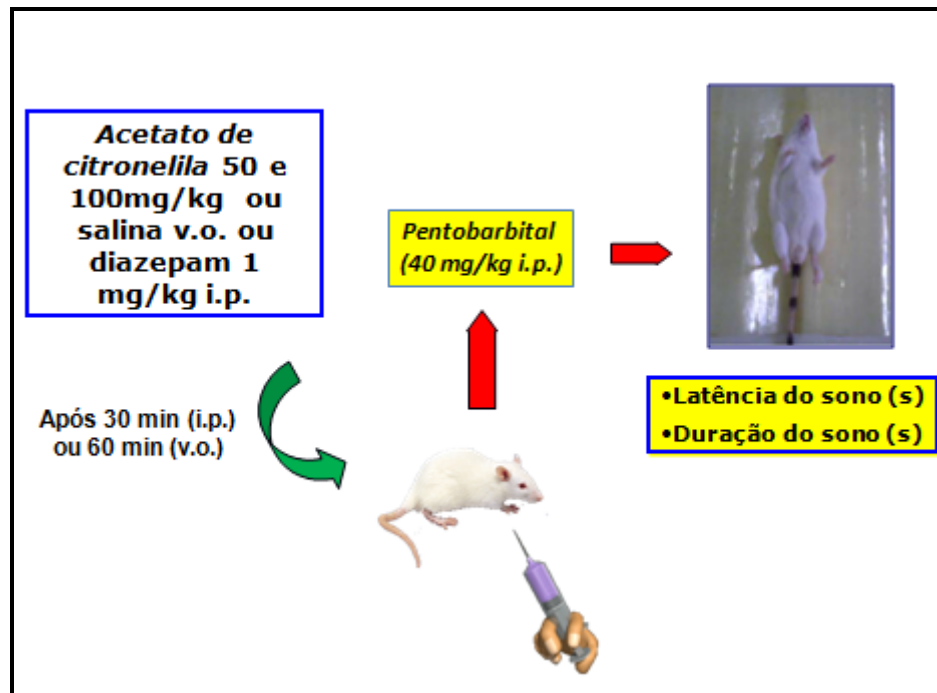
**Figura 10. Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) ou Plus Maze.**

#### 4.8.4 Avaliação da atividade sedativo-hipnótica e anticonvulsivante

##### 4.8.4.1 Teste da indução do sono por pentobarbital

Uma hora após o tratamento com acetato de citronelila nas doses de 50 e 100 mg/kg, os animais receberam pentobarbital sódico (40 mg/Kg, i.p.) como agente indutor do sono de acordo com o método de Dandiya & Collumbine (1959). O tempo desde a injeção do pentobarbital até o animal perder o reflexo postural foi registrado como latência de sono e o tempo de latência entre a perda e a recuperação voluntária do reflexo postural foi registrado como tempo de sono. Iniciado o período de sono, em seus respectivos grupos, os animais foram posicionados em decúbito dorsal em local de adequada observação; Foi registrado o início do sono de cada animal. Os animais foram observados durante todo o tempo de sono; sendo o final deste marcado no momento em que o animal retornou à situação de alerta,

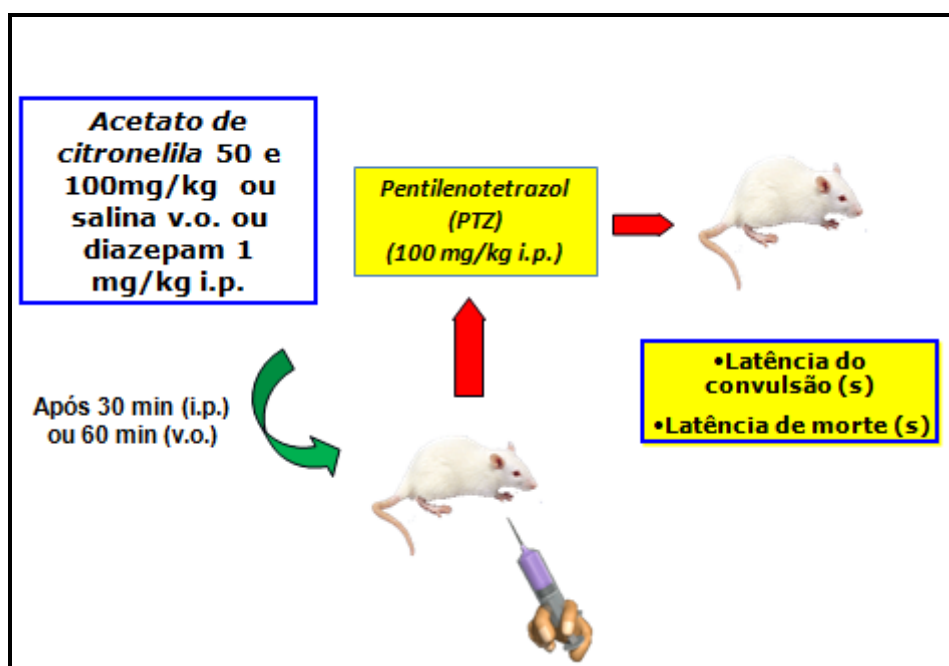
caracterizada pela alteração da posição de decúbito dorsal. O período total de observação foi de, no máximo, 120 minutos. Diazepam 1 mg/kg foi utilizado como droga-padrão (Figura 11).



**Figura 11. Teste do tempo de sono induzido por Pentobarbital.**

#### 4.8.4.2 Teste das convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ)

Este experimento foi realizado seguindo a metodologia descrita por Swinyard *et al.* (1952) e permitiu avaliar a possível ação anticonvulsivante da droga em teste. Após 60 minutos do tratamento com acetato de citronelila (via oral) ou veículo ou trinta minutos após o Diazepam 1 mg/kg, i.p., todos os animais foram tratados com pentilenotetrazol 100 mg/kg, i.p. Em seguida, os camundongos foram colocados em gaiolas individuais e observados por até 20 minutos. O tempo de manifestação da primeira convulsão do tipo clônica ou tônico-clônica (latência de convulsão) e a latência para morte foram os parâmetros registrados (Figura 12).



**Figura 12. Teste das convulsões induzidas por Pentilenotetrazol.**

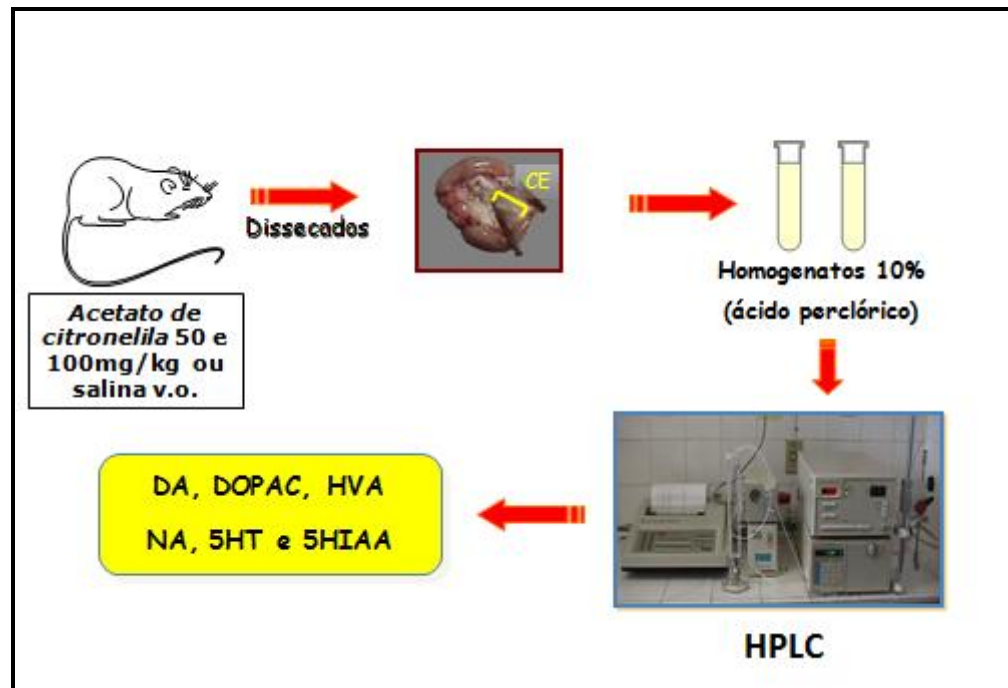
## 4.9 Testes neuroquímicos

### 4.9.1 Dissecção das áreas cerebrais

Para a realização dos estudos neuroquímicos (estresse oxidativo, dosagem de monoaminas e seus metabólitos) foram dissecadas as áreas cerebrais: córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e, em seguida, os encéfalos foram retirados e colocados sobre papel alumínio numa placa de petri com gelo. Acompanhando a fissura sagital mediana, a camada cortical cerebral foi liberada das leptomeninges com a ajuda de uma pinça reta de microdissecação que divulsionou o córtex delicadamente, em toda a sua extensão fronto-occipital. O córtex já divulsionado foi rebatido para os lados, expondo parte do hipocampo que, divulsionado, foi deslocado e retirado (Figura 13).

O corpo estriado (caudado, putâmen e globo pálido) foi isolado das estruturas circunjacentes por divulsionamento com uma tesoura de microdissecação, sendo a sua retirada orientada pelo diâmetro da porção tuberosa visível desses núcleos, após o rebatimento lateral

do córtex. Foi feita também a dissecação da área pré-frontal a qual consiste em uma secção bilateral da parte anterior dos lobos frontais e do hipocampo. Terminada a dissecação, cada área foi colocada em *ependorffs* sob o gelo, pesada e armazenada a  $-70^{\circ}\text{C}$  para uso posterior. Quando necessária a estocagem por certo período de tempo (no máximo dois meses) os tecidos foram considerados como tendo a mesma viabilidade para experimentação que os ensaiados 24h após a dissecação (BURKE, GREENBAUN, 1987).



**Figura 13.** Dissecção de áreas cerebrais para determinação de monoaminas e metabólitos no HPLC.

#### 4.9.2. Determinação de monoaminas e metabólitos com HPLC

Para a determinação dos níveis de catecolaminas foi utilizado o equipamento de HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Performance). Na cromatografia líquida clássica, um adsorvente (alumina ou sílica) é empacotado em uma coluna e é eluído por um líquido ideal (fase móvel). Uma mistura para ser separada é introduzida na coluna e é carregada através da mesma por um líquido eluente (fase móvel). Se um composto da mistura (soluto) é adsorvido fracamente pela superfície da fase sólida estacionária, ele atravessará a coluna mais rapidamente que outro soluto que seja mais fortemente adsorvido. Então, a separação dos

solutos é possível se existem diferenças na adsorção pelo sólido. Os detectores eletroquímicos medem a condutância do eluente ou a corrente associada com a oxidação ou redução dos solutos. Para ser capaz de detectar no primeiro caso, os solutos devem ser iônicos e no segundo caso, os solutos devem ter a característica de serem relativamente fáceis de oxidarem ou reduzirem. Neste estudo foi utilizado o detector amperométrico que reage com uma quantidade muito menor de soluto, em torno de 1 %. Todas as técnicas eletroquímicas envolvem a aplicação de um potencial para um eletrodo (geralmente de carbono vítreo), oxidação da substância que está sendo estudada próximo à superfície do eletrodo seguindo a amplificação e medida da corrente produzida. As catecolaminas são oxidadas nos grupos de anel hidroxil para produzir um derivado ortoquinona com a liberação de dois elétrons.

#### 4.9.2.1 Procedimento experimental

Os animais foram decapitados 60 minutos após a administração do acetato de citronelila, logo após tiveram seus cérebros dissecados sobre gelo. O corpo estriado, hipocampo e o córtex pré-frontal foram utilizados para preparar homogenatos a 10% (20mg área/100µl tampão). Os tecidos cerebrais foram homogeneizados em ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>) e centrifugados por 15 minutos em centrífuga refrigerada (4°C) a 15.000 rpm. Uma alíquota de 20 µL do sobrenadante foi, então, injetada no equipamento de HPLC, para a análise química. Para a análise das catecolaminas, uma coluna BDS HYPERSIL C18 com comprimento de 250 mm, calibre 4,6 mm e de partícula de 5 µm, da Thermo Scientific, foi utilizada. A fase móvel foi composta por tampão ácido cítrico 0,163 M, pH 3,0, contendo ácido octanosulfônico sódico(SOS) 0,69 M, como reagente formador do par iônico, acetonitrila 4 % v/v e tetrahidrofurano 1,7 % v/v. NA, DA, DOPAC, HVA, 5-HT e 5-HIAA foram eletronicamente detectados usando um detector amperométrico (Modelo L-ECD-6A da Shimadzu, Japão) pela oxidação em um eletrodo de carbono vítreo fixado em 0,85V relativo a um eletrodo de referência de Ag-AgCl (HALLMAN, JOSSON, 1984).

#### 4.9.2.2 Soluções reagentes

##### *Fase móvel*

Foram pesados 15,75 g de ácido cítrico (grupo química, RJ, Brasil) e completado para um volume de 400 mL com água puríssima (Mili-Q). Esta solução foi ajustada para pH 3,0 com hidróxido de sódio 12,5 M (Reagen, RJ, Brasil). A esta solução foi adicionado o SOS 75 mg (Sigma, MO, USA) e completado o volume para 471,5 mL com água Milli-Q. Em seguida, foi procedida a filtração e degaseificação, e posteriormente adição de 20 mL de acetonitrila (Carlo Erba Reagenti, MI, Itália) e 8,5 mL de tetrahidrofurano (Sigma, MO, USA) para um volume final de 500 mL.

##### *Ácido perclórico 0,1 M*

Adicionou-se 1,8 mL de ácido perclórico (Sigma, MO, USA) em um balão volumétrico e completou o volume para 300 mL.

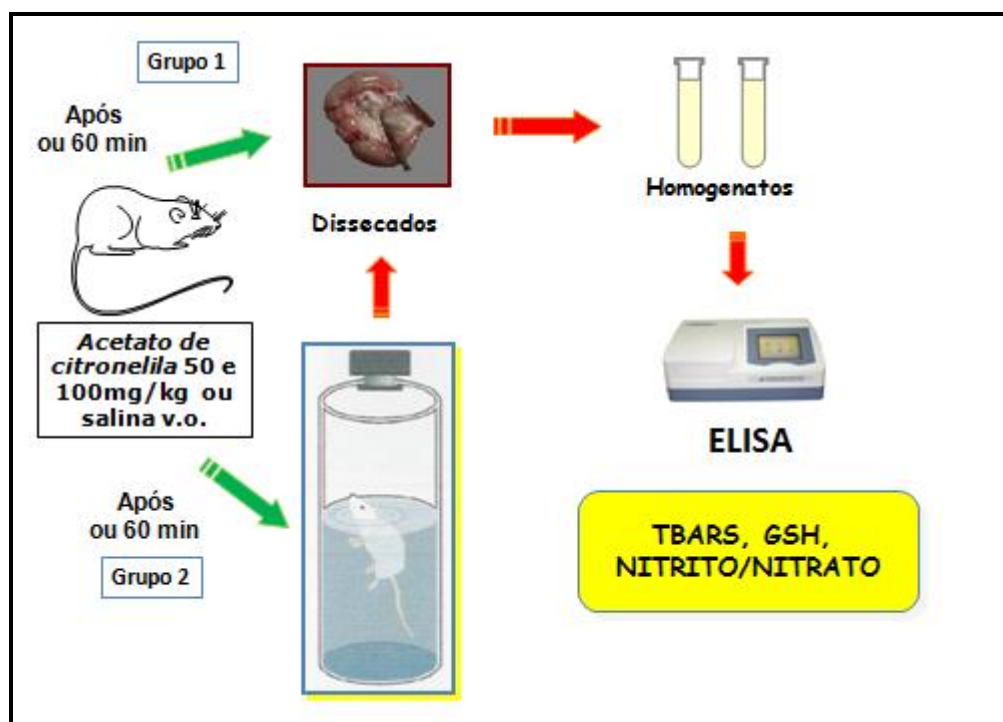
##### *Padrões*

Os padrões foram preparados em uma concentração final de 4ng/20 µl de solução de NA, DA, 5HT, DOPAC, HVA e 5HIAA (Sigma, MO, EUA). A partir da área dos picos padrões, as concentrações das amostras foram calculadas utilizando o programa *Microsoft Excel*® e os resultados expressos em ng/mg de tecido.

#### 4.9.3 Estresse oxidativo

Para os experimentos de estresse oxidativo, os animais foram divididos em dois grupos. O grupo que sofreu a indução do estresse através do teste do nado forçado e o grupo que não recebeu a indução do estresse. No primeiro grupo, os animais receberam acetato de citronelila 50 e 100 mg/kg ou veículo e após 60 minutos foram submetidos ao nado forçado e 60 minutos depois foram sacrificados por deslocamento cervical para dissecação das áreas cerebrais (corpo estriado, hipocampo e córtex pré-frontal) (Figura 14).

No segundo grupo (não realizou o nado forçado), os animais receberam de acetato de citronelila 50 e 100 mg/kg ou veículo e após 120 minutos foram sacrificados e tiveram seus cérebros dissecados para a remoção das áreas cerebrais. O objetivo desses dois grupos foi comparar o estresse oxidativo com e sem indução do estresse nos animais estudados para análise da ação do acetato de citronelila sob o estresse oxidativo.



**Figura 14.** Dissecção de áreas cerebrais para avaliação do estresse oxidativo.

4.9.3.1 Determinação da produção de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS)

#### *Método*

O grau de lipoperoxidação foi medido através da determinação das concentrações de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme o método de Draper e Hadley (1990), seguindo o protocolo a seguir:

Foram preparados homogenatos da área cerebral a 10 % em solução de fosfato de potássio 150 mM com pH de 7,4.. Um volume de 63  $\mu$ L do homogeneizado foi misturado a 100  $\mu$ L de solução de ácido perclórico a 35%. Em seguida essa mistura foi colocada na centrífuga com 5.000 rpm por 10 min a 4°C. Após a centrifugação, foi adicionado 50  $\mu$ L de ácido tiobarbitúrico 1,2% a 150 $\mu$ L do sobrenadante. Logo após, essa mistura foi mantida em banho de água fervente (95-100° C) por 30 minutos. Após o término do banho ocorre o resfriamento em banho de gelo por alguns minutos e retira-se 150  $\mu$ L da solução para serem adicionadas as placas de ELISA. A leitura é feita no aparelho de ELISA com comprimento de onda de 535 nM.

#### *Soluções reagentes*

- Tampão Fosfato de potássio  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Reagen, RJ, Brasil) em água destilada, pH 7,4
- Solução de ácido perclórico  
Ácido perclórico absoluto (Cinética, Brasil) diluído em água destilada.
- Solução de ácido tiobarbitúrico (TBA)  
TBA (Sigma, St.Louis, MO, EUA) 1,2 g em 100 mL de água destilada

#### 4.9.3.2 Determinação da produção de nitrito

##### *Método da preparação da curva-padrão*

Foi pesado 6,9 mg de NaNO<sub>2</sub> e dissolvido em 10 mL de água bidestilada (estoque-10mM). Em seguida foram feitas as diluições em série (10 e 20x). Foi feita uma equação da reta para o cálculo das concentrações do teste (GREEN *et al.*, 1981).

##### *Procedimento experimental*

Foram preparados homogenatos da área cerebral a 10 % em tampão fosfato de potássio 150 mM, pH 7,4, em seguida foi realizado a centrifugação a 11.000 rpm por 15 minutos a 4° C. logo após adiciona-se 100 $\mu$ L dos pontos da curva, amostra ou tampão (branco) nos poços da placa de ELISA. Em seguida, é adicionado 100 $\mu$ L do Reagente de



Griess [sulfanilamida 1% em H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1%, N-(1-naphthyl)- ethylenediamine- NEED 0,1%, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1% diluído em água (1:1: 1)]. Esperar 10 minutos e ler em 540nm no leitor de ELISA.

#### *Solução reagente*

#### *Reagente de Griess*

- 1 volume de ácido fosfórico 5% (Dinâmica, Brasil) diluído em água destilada
- 1 volume de sulfonilamida 1% (Sigma Aldrich, USA) diluída em ac. fosfórico 5%
- 1 volume de NEED 0,1% (Sigma Aldrich, USA) diluído em água destilada
- 1 volume de água destilada.

#### 4.9.3.3 Determinação da concentração da glutatona reduzida (GSH)

#### *Método*

A determinação da concentração da GSH baseia-se na reação do reagente de Ellman, o 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) com o tiol livre originando um dissulfeto misto mais ácido 2-nitro-5-tiobenzóico. A medida do produto de reação formado é feita por leitura da absorbância a 412 nm.

#### *Procedimento experimental*

As amostras foram homogeneizadas a 10% com EDTA 0,02 M, em seguida foi retirado 40 µL do homogenato e adicionado 50 µL de água destilada e 10 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 50 % juntamente com as amostras no ependorff. Em seguida essa mistura foi centrifugada a 5.000 rpm por 15 minutos. Logo após foi recolhido 60 µL da amostra e do branco em cada poço da placa de ELISA. Imediatamente antes da leitura foi misturado 25 mL do tampão Tris EDTA + 650 µL do DTNB 0,01M. Após, foi adicionado 102µL da solução em cada poço. A leitura da placa foi realizada no leitor de ELISA a 412 nm. Todo o experimento foi feito sobre refrigeração em gelo.

### *Curva-padrão de GSH*

A partir da solução de GSH (1mg/mL), foi preparado 4 mL (em triplicata) de soluções a 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL. O branco foi feito com água destilada (4 mL) e a cada tubo das soluções de GSH foi acrescentado 4 mL de tampão Tris-HCL 0,4 M (pH 8,9). Adicionou-se ainda a cada tubo 0,1 mL de DTNB (0,01M) e feita a leitura da absorbância a 412 nm após 1 minuto da adição de DTNB, e determinada a equação da curva padrão de GSH.

### *Soluções reagentes*

- Solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)

EDTA (Sigma, St.Louis, MO, EUA), Pesa-se 521,1mg de EDTA em 70mL de água bidestilada (para preparar EDTA 0,2M); Em seguida retira-se 30 mL desta solução inicial e acrescenta mais 270mL de água bidestilada (q.s.p. 300mL).

### *Tampão Tris-HCL/EDTA*

1,212g de Tris (Sigma, St.Louis, MO, EUA) foram adicionados a 10mL de EDTA 0,02M e cerca de 10mL de água destilada, foi feito o ajuste do pH para 8,9; em seguida o volume da solução foi completado até 25mL.

### *Solução de ácido 5:5 ditiobis-2-nitrobenzoato (DTNB)*

7,92 de DTNB (Sigma, St.Louis, MO, EUA) foi pesado e em seguida dissolvido em 2 mL de metanol absoluto.

## **4.10 Avaliação toxicológica aguda**

### **4.10.1 Procedimento experimental**

A toxicidade oral aguda foi realizada conforme o Guia OECD-423/2001 “Toxicidade Aguda de Classe” (OECD, 2001), que determina as doses a serem utilizadas no estudo (5 mg/kg, 50 mg/kg, 300 mg/kg ou 2000 mg/kg) e o número de animais por dose (três) (ANEXO A).

O experimento foi realizado com 09 (nove) ratos machos, com peso entre 200 e 260 g, sendo 03 do grupo controle e 06 dos grupos teste (que receberam acetato de citronelila). Os animais foram alocados individualmente em caixas de poliuretano, em condições controladas de luminosidade (12h claro/ 12h escuro), temperatura ( $23 \pm 2^\circ \text{C}$ ) e receberam água potável e ração comercial *ad libitum*.

Os animais ficaram em jejum por 8 h anteriormente à administração do acetato de citronelila, com acesso livre apenas água. O peso corporal dos animais foi verificado no dia (dia 1) da administração do acetato de citronelila, no sétimo (dia 7) e no décimo quarto dia (dia 14) pós-administração. A administração do acetato de citronelila (2000 mg/kg) foi realizada em dose única por via oral.

A dose inicial selecionada para o estudo foi de 2000 mg/kg, segundo o guia da OECD 423, na ausência de morbidade ou mortalidade a dose deve ser aumentada para 5000 mg/kg. Após esse período a categoria toxicológica é estimada, segundo as especificações do Guia.

#### 4.10.2 Observação dos sinais de toxicidade

Durante o período experimental os animais foram examinados diariamente quanto a alterações comportamentais de acordo com “screening” hipocrático. Foram observados: a postura, frêmito vocal, irritabilidade, contorção, posição trem posterior, ataxia, convulsões/tremores, hipnose, anestesia, respiração, cianose, consistência e aspecto das fezes, micção, fechamento da pálpebra, lacrimejamento, piloereção, aspecto da pele e pêlos, salivação, hipotermia. As observações foram realizadas a intervalos variados no dia de administração do acetato de citronelila (1h, 2h, 4h, 6h, 12h e 24h) e a partir de então periodicamente até o 14º dia (MALONE, 1977; PUCCI, 2009). A intensidade dos eventos foi pontuada e classificada segundo Malone (1977) em: 0= ausente, 1= raro, 2= pouco, 3= moderado e 4= intenso.

No décimo quarto dia (dia 14), os animais foram sacrificados. Em seguida foi realizada a necropsia para a avaliação geral dos órgãos e foram retirados: cérebro, fígado e rins, para análise histopatológica.

#### 4.10.3 Análise Histológica

Para a análise histológica os órgãos (fígado, cérebro e rim) foram retirados e colocados em solução de formol 10% tamponado por 24 horas. Após esse período, os órgãos foram retirados da solução de formol tamponado, em seguida foram seccionados e colocados em cassetes. Os cassetes foram colocados em recipientes contendo álcool a 70%, para posterior confecção das lâminas.

Para a confecção das lâminas, os cassetes com os órgãos já seccionados foram mergulhados em solução de parafina para posterior corte e fixação dos tecidos nas lâminas para microscopia. Em seguida as lâminas foram coradas pelo método de hematoxilina/eosina e posteriormente analisadas por microscopia.

#### *Solução de Formol tamponado 10%*

*Regentes (Para a preparação de 1 litro de formol tamponado)*

Misturar:

- Solução de 35-40% de formaldeído (formalina) 100 ml
- Água destilada 900 ml
- Fosfato monobásico de sódio 4g
- Fosfato dibásico de sódio 6,5g

#### **4.11 Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada através do software GraphPad Prism versão 5.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego Califórnia EUA. Copyright (c) 1994 - 1999 por GraphPad Software.

Os resultados que obedeciam a uma distribuição paramétrica foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student Newman Keuls (*post hoc*). Para os resultados que apresentaram mais de uma variável analisada ao mesmo tempo foram utilizados Two-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni *post hoc*.

Em todas as análises estatísticas, os valores foram representados pela Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM) com o número de animais entre parênteses e foi considerado o nível crítico para rejeição da hipótese de nulidade menor que 0,05 ( $p < 0,05$ ). Os asteriscos (\*) caracterizam o grau de significância, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ , assim como os demais símbolos #, a, A, b.

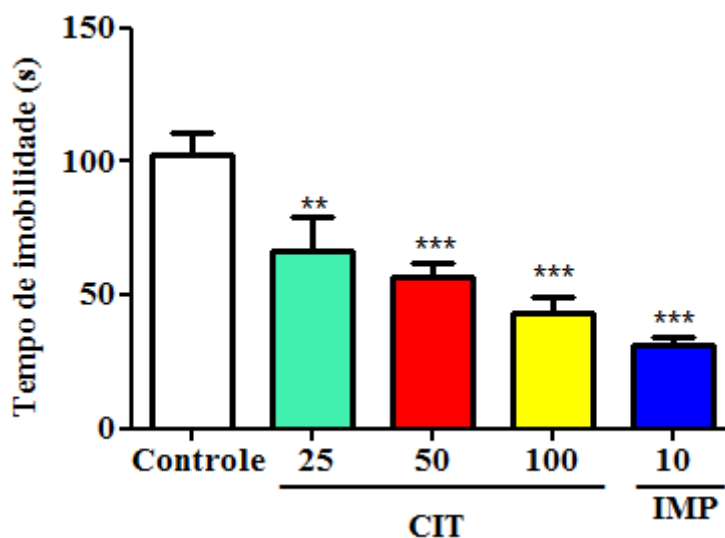
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Avaliação da Atividade Antidepressiva

#### 5.1.1 Teste do Nado Forçado

A fim de verificar a melhor dose, os animais foram tratados com acetato de citronelila nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg (v.o.). Foi observado que houve uma diminuição no tempo de imobilidade nas doses utilizadas [CIT-25:  $66.38 \pm 13.23$  (10)  $p < 0.01$ ; CIT-50:  $57.00 \pm 5.13$  (10)  $p < 0.001$ ; CIT-100:  $43.17 \pm 5.91$  (10)  $p < 0.001$ ], assim como também houve uma diminuição no tempo de imobilidade da imipramina (10 mg/kg) [IMP:  $31.38 \pm 2.6$  (8)  $p < 0.001$ ] quando comparado ao controle [ $102.3 \pm 8.65$  (10)] (figura 15).

Entre as doses analisadas, não houve diferença significativamente estatística no tempo de imobilidade quando comparado 25 e 50 mg/kg, 25 e 100 mg/kg e 50 e 100 mg/kg, entretanto, como base em outros estudos com óleos essenciais optamos por escolher as doses de 50 e 100 mg/kg para os demais experimentos deste estudo.

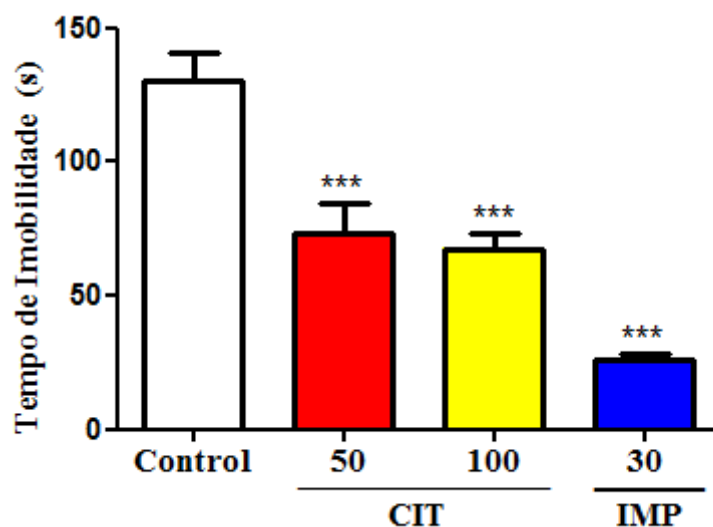


**Figura 15. Efeito do acetato de citronelila e imipramina sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos.**

Controle (veículo), acetato de citronelila (25, 50 e 100 mg/kg) e imipramina (10 mg/kg), v.o., foram administrados 60 min antes do experimento. Os valores das figuras apresentam a média  $\pm$  EPM do tempo de imobilidade (s) durante 5 minutos. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  vs controle.

#### 5.1.2 Teste da Suspensão da Cauda

Os animais tratados com acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg, v.o.) apresentaram diminuição do tempo de imobilidade [CIT-50:  $73.40 \pm 11.17$  (10)  $p < 0.001$ ; CIT-100:  $67.50 \pm 6.07$  (10)  $p < 0.001$ ] do mesmo modo que os animais tratados com imipramina [IMP:  $26.08 \pm 2.33$  (10)  $p < 0.001$ ] quando comparados com o controle [controle:  $130.30 \pm 10.49$  (10)] (figura 16).



**Figura 16. Efeito do acetato de citronelila e imipramina sobre o tempo de imobilidade no teste de suspensão da cauda em camundongos.**

Controle (veículo), acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg) e imipramina (30 mg/kg), v.o., foram administrados 60 min antes do experimento. Os valores das figuras apresentam a média  $\pm$  EPM do tempo de imobilidade (s) durante 5 minutos. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: \*\*\* $p < 0.001$  vs controle.

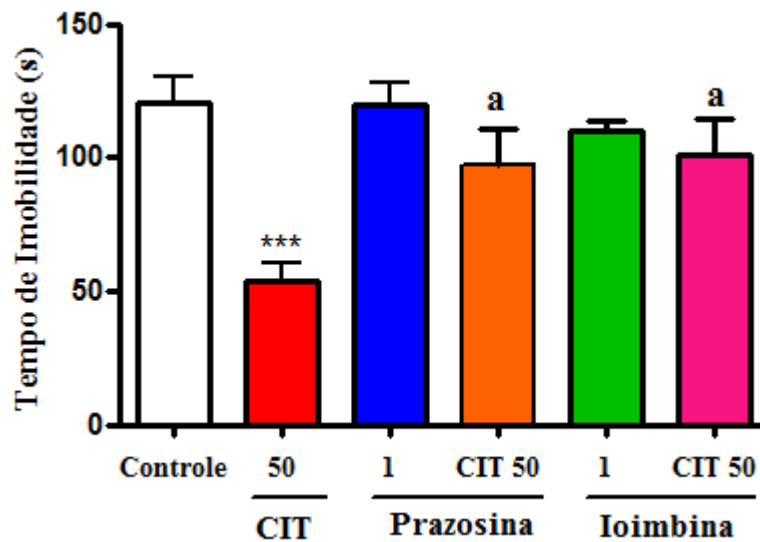
### 5.1.3 Envolvimento do Sistema Noradrenérgico

Os grupos que foram pré-tratados com prazosina (1 mg/kg, i.p.) (figura 17 e 18) ou ioimbina (1 mg/kg, i.p.) (figura 17 e 18) e tratados com veículo não diminuíram o tempo de imobilidade [PRZ + veículo:  $119.7 \pm 8.03$  (8); IOIM + veículo:  $109.8 \pm 4.32$  (8)] em relação ao controle [controle:  $120.7 \pm 9.61$  (10)].

As figuras 17 e 18 mostram que o pré-tratamento com prazosina, antagonista  $\alpha$ -1 adrenérgico, reverteu o efeito antidepressivo do acetato de citronelila nas doses de 50 mg/kg [CIT-50 + PRZ-1:  $97.29 \pm 13.30$  (8)  $P < 0.01$ ] (figura 9) e 100 mg/kg [CIT-100 + PRZ-1:  $71.50 \pm 8.57$  (8)  $P < 0.01$ ] (figura 10), pois apresentou diferença significativa em relação ao grupo que recebeu apenas acetato de citronelila 50 mg/kg [CIT-50:  $53.50 \pm 7.02$  (8)] e 100 mg/kg [CIT-100:  $36.50 \pm 4.44$  (8)]. Da mesma forma, quando os animais foram pré-tratados

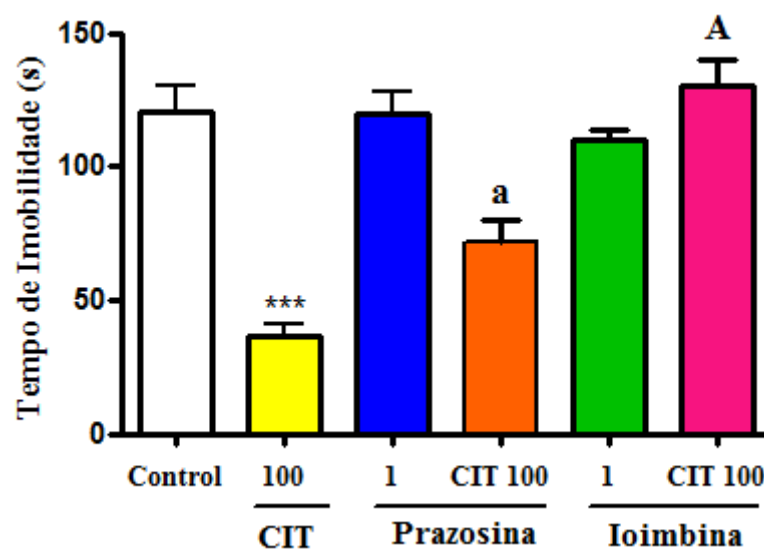


com ioimbina, antagonista  $\alpha$ -2 adrenérgico, e depois com acetato de citronelila nas doses de 50 mg/kg [CIT-50 + IOIM-1:  $101.3 \pm 13.52$  (8)  $P < 0.01$ ] e 100 mg/kg [CIT-100 + IOIM-1:  $130.30 \pm 9.30$  (8)  $P < 0.001$ ] não houve diminuição do tempo de imobilidade, mostrando a reversão do efeito do acetato de citronelila 50 mg/kg [CIT-50:  $53.50 \pm 7.02$  (8)] e 100 mg/kg [CIT-100:  $36.50 \pm 4.44$  (8)].



**Figura 17. Efeito do acetato de citronelila (50 mg/kg) sozinho ou associado com prazosina (1 mg/kg) ou ioimbina (1 mg/kg) sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos.**

Controle (veículo), acetato de citronelila (50 mg/kg, v.o.), quando sozinhos foram administrados 60 min antes do experimento; quando associados foram administrados 30 minutos após a administração de prazosina (1 mg/kg) ou ioimbina (1 mg/kg) e após 60 minutos foram submetidos ao experimento. Os valores das figuras apresentam a média  $\pm$  EPM do tempo de imobilidade (s) durante 5 minutos. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: \*\*\* $p < 0.001$  vs controle; <sup>a</sup> $p < 0.01$  vs CIT-50.



**Figura 18.** Efeito do acetato de citronelila (100 mg/kg) sozinho ou associado com prazosina (1 mg/kg) ou ioimbina (1 mg/kg) sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos.

Controle (veículo), acetato de citronelila (100 mg/kg, v.o.), quando sozinho foram administrados 60 min antes do experimento; quando associados foram administrados 30 minutos após a administração de prazosina (1 mg/kg, i.p.) ou ioimbina (1 mg/kg, i.p.) e após 60 minutos foram submetidos ao experimento. Os valores das figuras apresentam a média ± EPM do tempo de imobilidade (s) durante 5 minutos. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: \*\*\* $p < 0.001$  vs controle; <sup>a</sup> $p < 0.01$  vs CIT-100; <sup>A</sup> $p < 0.001$  vs CIT-100.

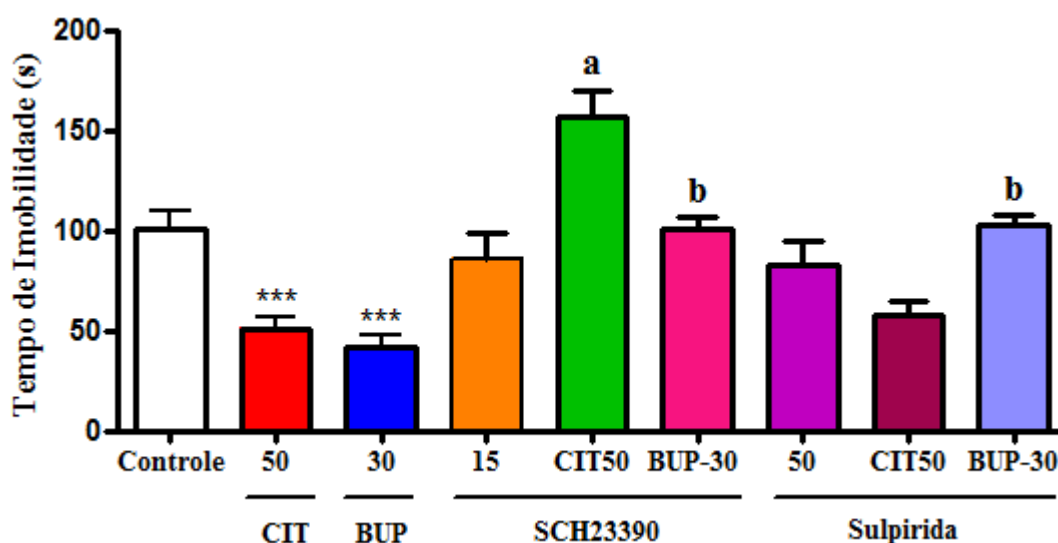
#### 5.1.4 Envolvimento do Sistema Dopaminérgico

Os grupos que foram pré-tratados com SCH23390 (15 $\mu$ /kg, i.p.) (figura 19 e 20) ou sulpirida (50 mg/kg, i.p.) (figura 19 e 20) e tratados com veículo não diminuíram o tempo de imobilidade [SCH-15 + veículo: 86.06 ± 12.21 (8) ; sulpirida-50 + veículo: 82.95 ± 11.86 (8)] em relação ao controle [controle: 85.24 ± 10.47 (8)].

As figuras 19 e 20 mostram que o pré-tratamento com SCH23390, antagonista dos receptores dopaminérgicos D1, reverteu o efeito antidepressivo do acetato de citronelila nas doses de 50 mg/kg [CIT-50 + SCH-15: 156.70 ± 12.57 (8)  $p < 0.001$ ] (figura 11) e 100 mg/kg [CIT-100 + SCH-15: 68.75 ± 8.28 (8)  $p < 0.05$ ] (figura 12), pois apresentou diferença significativa em relação ao grupo que recebeu apenas acetato de citronelila 50 mg/kg [CIT-50:

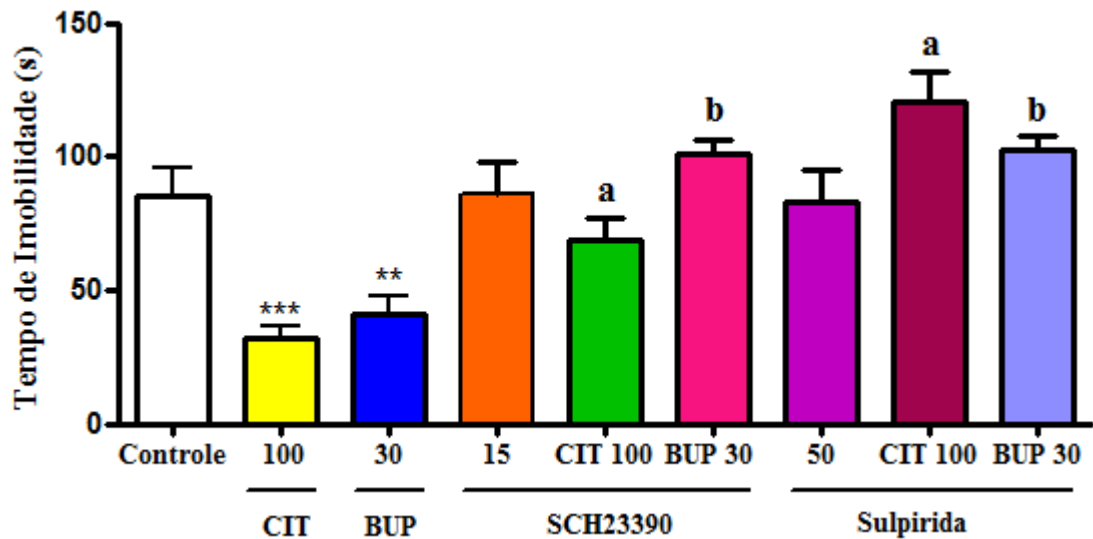
51.13 ± 5.37 (8)] e 100 mg/kg [CIT-100: 31.63 ± 4.86 (8)]. Quando os animais foram pré-tratados com sulpirida, antagonista dos receptores dopaminérgicos D2, e depois com acetato de citronelila nas doses de 50 mg/kg [CIT-50 + sulpirida-50: 57.50 ± 7.19 (8)] e 100 mg/kg [CIT-100 + sulpirida-50: 120.4 ± 11.55 (8) p< 0.001] houve diminuição do tempo de imobilidade na dose de 100 mg/kg [CIT-100: 31.63 ± 4.86 (8)] do acetato de citronelila mas não da dose de 50 mg/kg [CIT-50: 51.13 ± 5.37 (8)], mostrando que a reversão do efeito do acetato de citronelila neste receptor (D2) foi dependente da dose administrada.

O SCH23390 e sulpirida revertem o efeito antidepressivo da bupropiona [SCH-15 + BUP-30: 101.00 ± 5.22 (8) p<0.001; Sulpirida-50 + BUP-30: 102.40 ± 5.13 (8) p<0.001] quando comparados com o grupo da bupropiona [BUP-30: 41.17 ± 6.92 (8)].



**Figura 19. Efeito do acetato de citronelila (50 mg/kg) e bupropiona (30 mg/kg) sozinho ou associado com SCH23390 (15 µg/kg) ou Sulpirida (50 mg/kg) sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos.**

Controle (veículo), acetato de citronelila (50 mg/kg, v.o.) e bupropiona (30 mg/kg), quando sozinhos foram administrados 60 min antes do experimento; quando associados foram administrados 30 minutos após a administração de SCH (15 µ/kg, i.p.) ou sulpirida (50 mg/kg, i.p.) e após 60 minutos foram submetidos ao experimento. Os valores das figuras apresentam a média ± EPM do tempo de imobilidade (s) durante 5 minutos. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: \*\*\*p< 0.001 vs controle; <sup>a</sup>p< 0.001 vs CIT-50; <sup>b</sup>p< 0.001 vs BUP-30.



**Figura 20. Efeito do acetato de citronelila (100 mg/kg) e bupropiona (30 mg/kg) sozinho ou associado com SCH23390 (15 µg/kg) ou Sulpirida (50 mg/kg) sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos.**

Controle (veículo), acetato de citronelila (100 mg/kg, v.o.) e bupropiona (30 mg/kg), quando sozinhos foram administrados 60 min antes do experimento; quando associados foram administrados 30 minutos após a administração de SCH (15 µg/kg, i.p.) ou sulpirida (50 mg/kg, i.p.) e após 60 minutos foram submetidos ao experimento. Os valores das figuras apresentam a média ± EPM do tempo de imobilidade (s) durante 5 minutos. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: \*\*\* $p < 0.001$  vs controle; <sup>a</sup> $p < 0.001$  vs CIT-100; <sup>b</sup> $p < 0.001$  vs BUP-30.

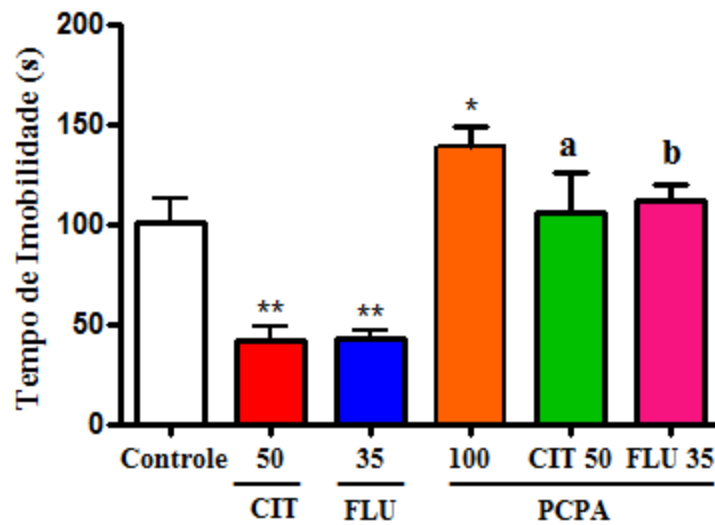
### 5.1.5 Envolvimento do Sistema Serotonérgico

Os animais pré-tratados por quatro dias com PCPA (inibidor da síntese de serotonina) e tratados com veículo não diminuíram o tempo de imobilidade [PCPA +veículo: 138.40 ± 9.72 (10)] em relação ao controle [controle: 100.80 ± 11.88 (10)]. Os animais que foram pré-tratados com PCPA e depois receberam acetato de citronelila nas doses de 50 e 100 mg/kg [PCPA + CIT-50: 105.70 ± 19.61 (8)  $p < 0.01$ ; PCPA + CIT-100: 100.90 ± 10.55 (8)  $p < 0.001$ ] apresentaram uma reversão do efeito antidepressivo do acetato de citronelila [CIT-50: 41.88 ± 6.88 (10); CIT-100: 33.00 ± 4.75 (8)] (figuras 21 e 22).

A figura 23 mostra que o pré-tratamento com NAN-190, antagonista 5-HT<sub>1A</sub>, seguido do tratamento com acetato de citronelila nas doses de 50 e 100 mg/kg [NAN-190 + CIT-50:

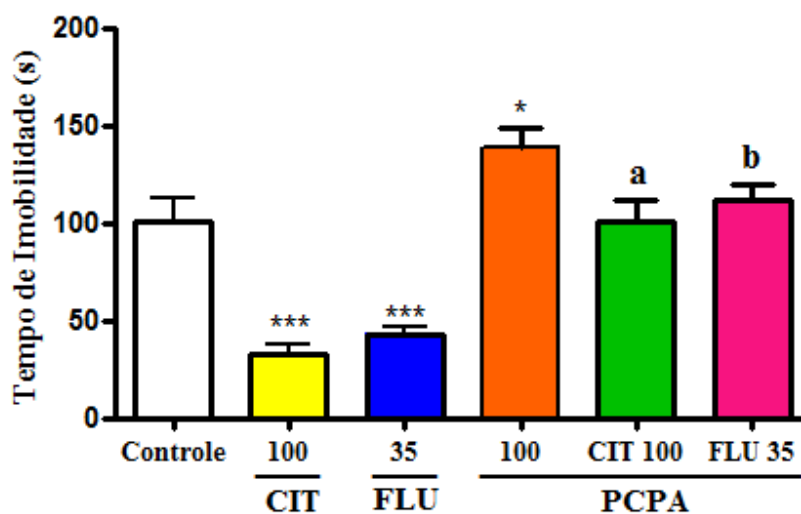
64,8 ± 9,1; NAN-190 + CIT-100: 42,8 ± 9,43] não reverteu o efeito antidepressivo do acetato de citronelila nestas doses, pois não apresentou diferença significativa em relação ao acetato de citronelila 50 mg/kg [CIT-50: 53,5 ± 7,0] e 100 mg/kg [CIT-100: 33,2 ± 5,4]. O grupo pré-tratado com ritanserina, antagonista 5-HT<sub>2A/2C</sub> e em seguida tratados com acetato de citronelila 50 e 100 mg/kg [RIT-4 + CIT-50: 142,7 ± 17,5; RIT-4 + CIT-100: 121,3 ± 12,2] tiveram seu efeito antidepressivo revertido em ambas as doses (figura 24). De modo semelhante, quando os animais foram pré-tratados com ondansetron, antagonista 5-HT<sub>3</sub>, e tratados com acetato de citronelila 50 e 100 mg/kg [OND-1 + CIT-50: 106,1 ± 11,4; OND-1 + CIT-100: 82,7 ± 13,1] houve reversão do efeito antidepressivo do acetato de citronelila nas doses administradas (figura 25).

O PCPA (figura 21 e 22), NAN-190 (figura 23), ritanserina (figura 24) e ondansetron (figura 25) reverteram o efeito antidepressivo da fluoxetina [PCPA + FLU-35: 111,7 ± 7,97; NAN-190 + FLU-35: 133,0 ± 14,9; RIT-4 + FLU-35: 73,4 ± 7,0; OND-1 + FLU-35: 78,0 ± 14,1] quando comparados com o grupo da fluoxetina [FLU-35: 43,0 ± 3,7].



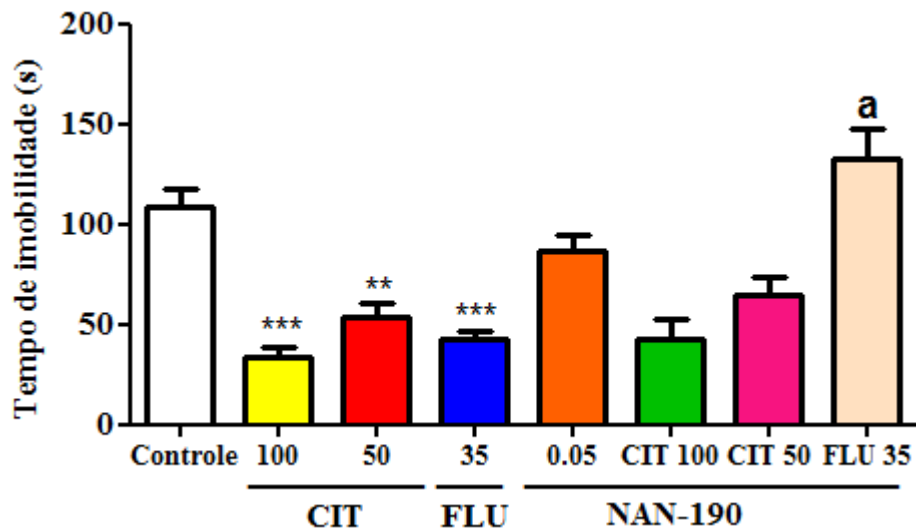
**Figura 21. Efeito do acetato de citronelila (50 mg/kg) e fluoxetina (35 mg/kg) sozinho ou associado com PCPA (100 mg/kg) sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos.**

Controle (veículo), acetato de citronelila (50 mg/kg, v.o.) e fluoxetina (35 mg/kg), quando sozinhos foram administrados 60 min antes do experimento; quando associados foram administrados 30 minutos após a última administração de PCPA (administrado por 4 dias, 100 mg/kg, i.p.) e após 60 minutos foram submetidos ao experimento. Os valores das figuras apresentam a média  $\pm$  EPM do tempo de imobilidade (s) durante 5 minutos. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: \*\* $p < 0.01$  vs controle; \* $p < 0.05$  vs controle; <sup>a</sup> $p < 0.01$  vs CIT-50; <sup>b</sup> $p < 0.001$  vs FLU-35.



**Figura 22. Efeito do acetato de citronelila (100 mg/kg) e fluoxetina (35 mg/kg) sozinho ou associado com PCPA (100 mg/kg) sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos.**

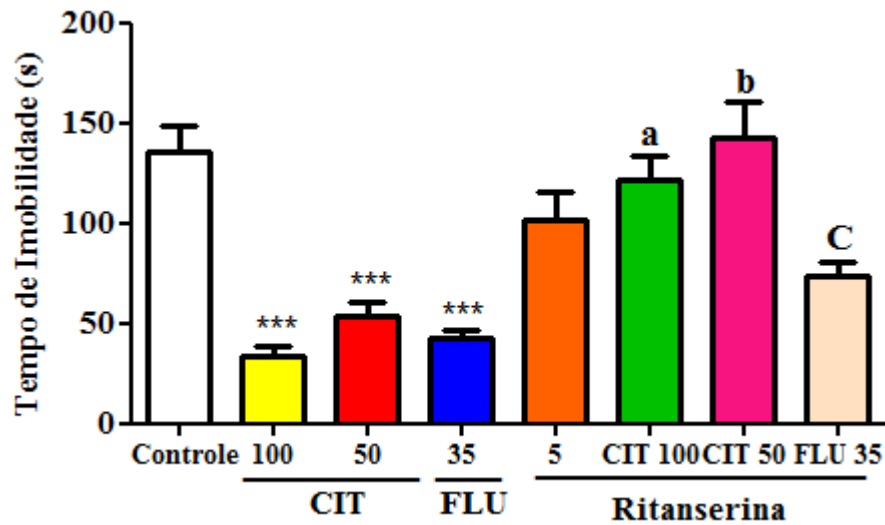
Controle (veículo), acetato de citronelila (100 mg/kg, v.o.) e fluoxetina (35 mg/kg), quando sozinhos foram administrados 60 min antes do experimento; quando associados foram administrados 30 minutos após a última administração de PCPA (administrado por 4 dias, 100 mg/kg, i.p.) e após 60 minutos foram submetidos ao experimento. Os valores das figuras apresentam a média  $\pm$  EPM do tempo de imobilidade (s) durante 5 minutos. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: \*\*\* $p < 0.001$  vs controle; \* $p < 0.05$  vs controle; <sup>a</sup> $p < 0.001$  vs CIT-100; <sup>b</sup> $p < 0.001$  vs FLU-35.



**Figura 23. Efeito do acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg) e fluoxetina (35 mg/kg) sozinho ou associado com NAN-190 (0,5 mg/kg) sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos.**

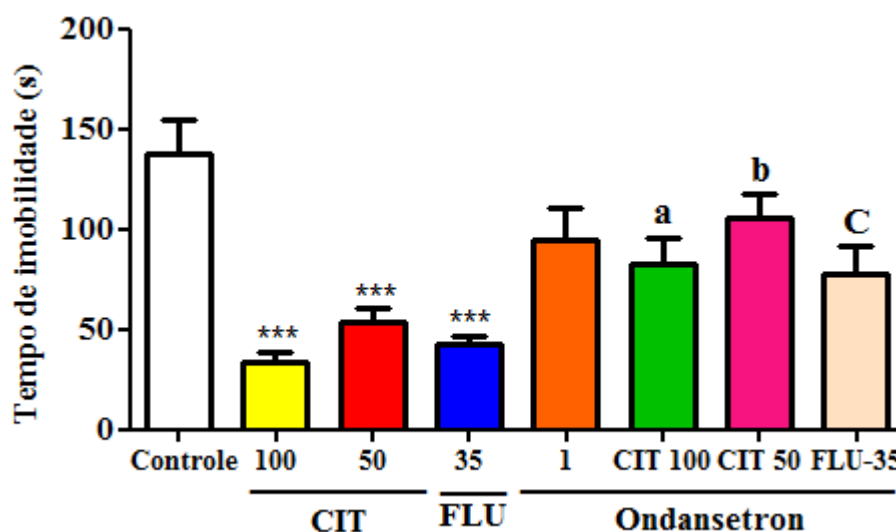
Controle (veículo), acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg, v.o.) e fluoxetina (35 mg/kg), quando sozinhos foram administrados 60 min antes do experimento; quando associados foram administrados 30 minutos após a administração de NAN-190 (0,5 mg/kg, i.p.) e após 60 minutos foram submetidos ao experimento. Os valores das figuras apresentam a média ± EPM do tempo de imobilidade (s) durante 5 minutos. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: \*\*\* $p < 0.001$  vs controle; \*\* $p < 0.01$  vs controle; <sup>a</sup> $p < 0.001$  vs FLU-35.





**Figura 24.** Efeito do acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg) e fluoxetina (35 mg/kg) sozinho ou associado com ritanserina (4 mg/kg) sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos.

Controle (veículo), acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg, v.o.) e fluoxetina (35 mg/kg), quando sozinhos foram administrados 60 min antes do experimento; quando associados foram administrados 30 minutos após a administração de ritanserina (4 mg/kg, i.p.) e após 60 minutos foram submetidos ao experimento. Os valores das figuras apresentam a média  $\pm$  EPM do tempo de imobilidade (s) durante 5 minutos. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: \*\*\* $p < 0.001$  vs controle; <sup>a</sup> $p < 0.001$  vs CIT-100; <sup>b</sup> $p < 0.001$  vs CIT-50; <sup>c</sup> $p < 0.05$  vs FLU-35.



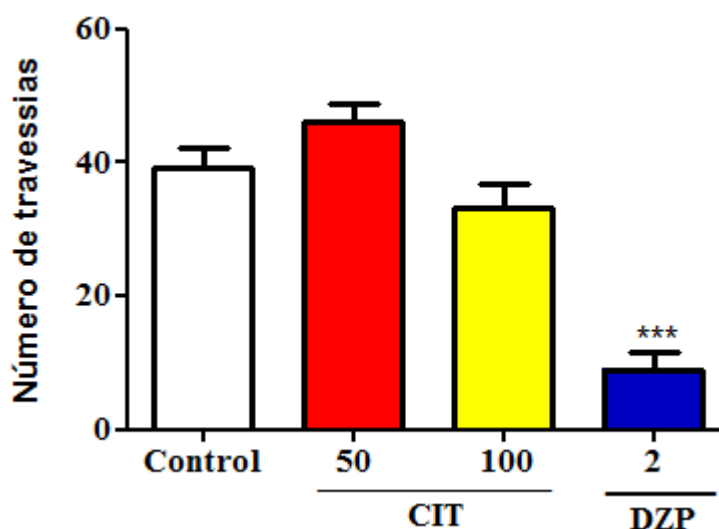
**Figura 25. Efeito do acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg) e fluoxetina (35 mg/kg) sozinho ou associado com ondansetron (1 mg/kg) sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos.**

Controle (veículo), acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg, v.o.) e fluoxetina (35 mg/kg), quando sozinhos foram administrados 60 min antes do experimento; quando associados foram administrados 30 minutos após a administração de ondansetron (1 mg/kg, i.p.) e após 60 minutos foram submetidos ao experimento. Os valores das figuras apresentam a média ± EPM do tempo de imobilidade (s) durante 5 minutos. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: \*\*\* $p < 0.001$  vs controle; <sup>a</sup> $p < 0.05$  vs CIT-100; <sup>b</sup> $p < 0.05$  vs CIT-50; <sup>c</sup> $p < 0.05$  vs FLU-35.

## 5.2 Avaliação da Atividade Ansiolítica

### 5.2.1 Teste do Campo Aberto

A atividade locomotora espontânea (ALE), *grooming* e *rearing* foram os parâmetros analisados e os resultados foram expressos como número de cruzamentos de *rearing* e de *grooming*. O acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg, v.o.) não alterou a atividade locomotora (Figura 26) em nenhum das doses utilizadas [CIT-50:  $46.13 \pm 2.70$  (8); CIT-100:  $33.13 \pm 3.71$  (8)], comparado com o controle [controle:  $39.16 \pm 3.07$  (8)]. O diazepam (2 mg/kg, i.p.) utilizado como droga padrão, reduziu a atividade locomotora em relação ao controle [DZP:  $9.00 \pm 2.61$  (8)].

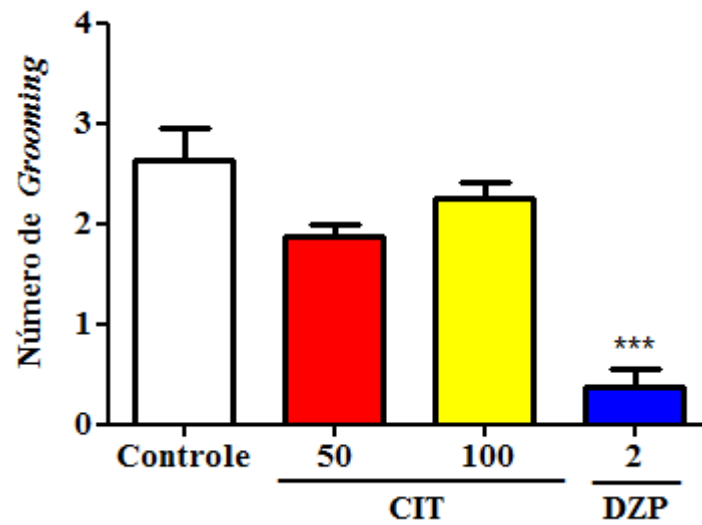


**Figura 26. Efeito do acetato de citronelila e diazepam sobre a atividade locomotora espontânea no teste do campo aberto em camundongos.**

Controle (veículo), acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg) e diazepam (2 mg/kg) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores das figuras apresentam a média  $\pm$  EPM do número de travessias durante 5 minutos. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: \*\*\* $p < 0.001$  vs controle.

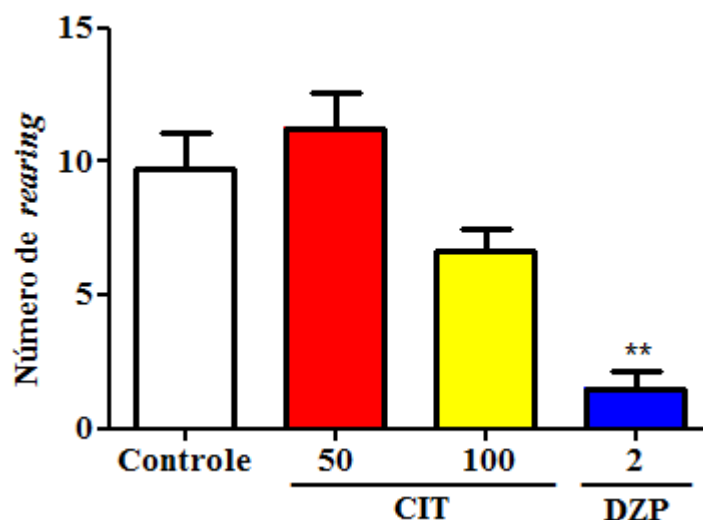
A figura 27 mostra que o acetato de citronelila não alterou o número de *grooming* em ambas as doses (50 e 100 mg/ Kg, v.o.) [CIT-50:  $1.87 \pm 0.12$  (8); CIT-100:  $2.25 \pm 0.16$  (8)] quando comparado com o controle [controle:  $2.62 \pm 0.32$  (8)]. Do contrário, o diazepam (2mg//Kg, i.p.) diminuiu o número de *grooming* quando comparado ao controle [DZP:  $0.37 \pm 0.18$  (8)].

O número de *rearing* (Figura 28) também não foi alterado com as doses de 50mg/kg e 100 mg/kg do acetato de citronelila, que manteve-se semelhante ao controle, sem alteração significativa [CIT-50:  $11.25 \pm 1.29$  (8); CIT-100:  $6.62 \pm 1.50$  (8)] quando comparado ao controle [ $9.75 \pm 1.30$  (8)]. Já o diazepam (2 mg/kg, i.p.) também diminuiu o número de *rearing* quando comparado ao controle [DZP:  $1.50 \pm 0.65$  (8)].



**Figura 27.** Efeito do acetato de citronelila e diazepam sobre o número de *grooming* no teste do campo aberto em camundongos.

Controle (veículo), acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg) e diazepam (2 mg/kg) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores das figuras apresentam a média  $\pm$  EPM do número de travessias durante 5 minutos. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: \*\*\* $p < 0.001$  vs controle.



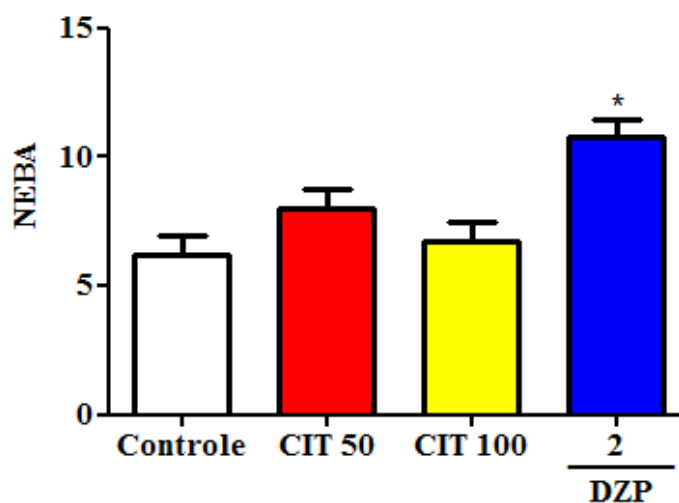
**Figura 28. Efeito do acetato de citronelila e diazepam sobre o número de *rearing* no teste do campo aberto em camundongos.**

Controle (veículo), acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg) e diazepam (2 mg/kg) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores das figuras apresentam a média  $\pm$  EPM do número de travessias durante 5 minutos. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: \*\* $p < 0.01$  vs controle.

### 5.2.2 Teste do Labirinto em Cruz Elevado

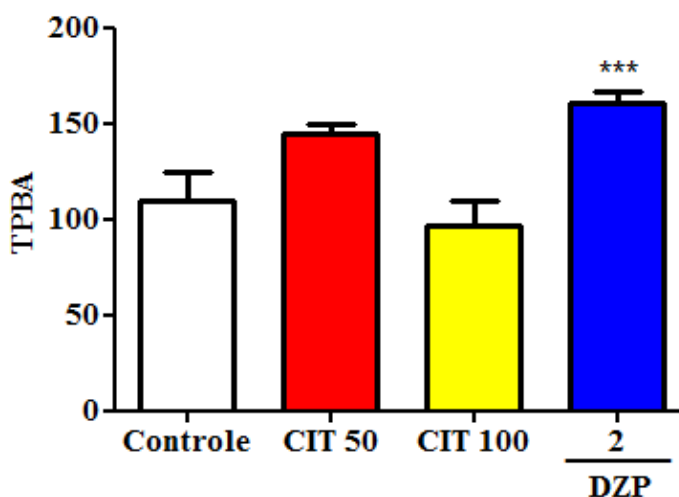
O tratamento agudo com o acetato de citronelila nas doses de 50 e 100 mg/kg (v.o.) aumentou no teste do labirinto em cruz elevado, apenas o TPBA (figura 30) [controle:  $89.83 \pm 8.44$  (8); CIT-50:  $154.60 \pm 9.37$  (8); CIT-100:  $96.86 \pm 13.07$  (8)] e o PTBA (figura 32) [controle:  $0.40 \pm 0.03$  (8); CIT-50:  $0.53 \pm 0.02$  (8); CIT-100:  $0.36 \pm 0.04$  (8)] na dose de 50 mg/kg comparando com o controle. O acetato de citronelila não alterou o NEBA (figura 29) [controle:  $6.20 \pm 0.73$  (8); CIT-50:  $8.00 \pm 0.77$  (8); CIT-100:  $6.71 \pm 0.74$  (8)] e nem o PEBA (figura 31) [controle:  $0.46 \pm 0.04$  (8); CIT-50:  $0.55 \pm 0.02$  (8); CIT-100:  $0.45 \pm 0.03$  (8)] quando comparado com o controle.

O diazepam (1 mg/kg, i.p.) aumentou todos os parâmetros: NEBA [DZP:  $10.75 \pm 0.67$  (8)]; TPBA [DZP:  $160.80 \pm 6.14$  (8)]; PEBA [DZP:  $0.61 \pm 0.03$  (8)]; PTBA [DZP:  $0.59 \pm 0.03$  (8)].



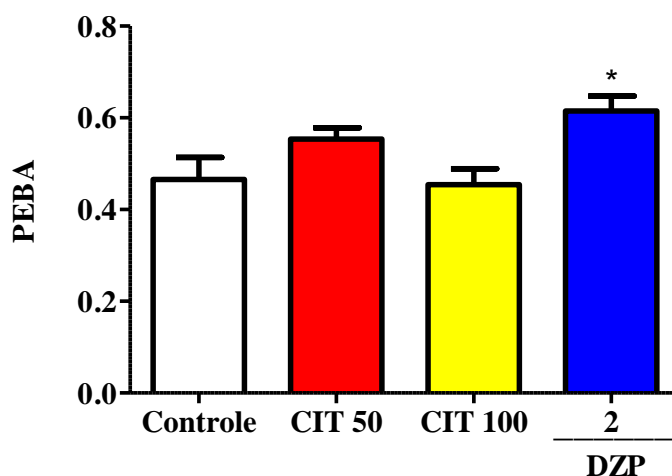
**Figura 29. Efeito do acetato de citronelila e diazepam sobre o número de entradas nos braços abertos (NEBA) no teste do labirinto em cruz elevado em camundongos.**

Controle (veículo), acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg) e diazepam (2 mg/kg) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores das figuras apresentam a média ± EPM do número de travessias durante 5 minutos. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: \* $p < 0.05$  vs controle.



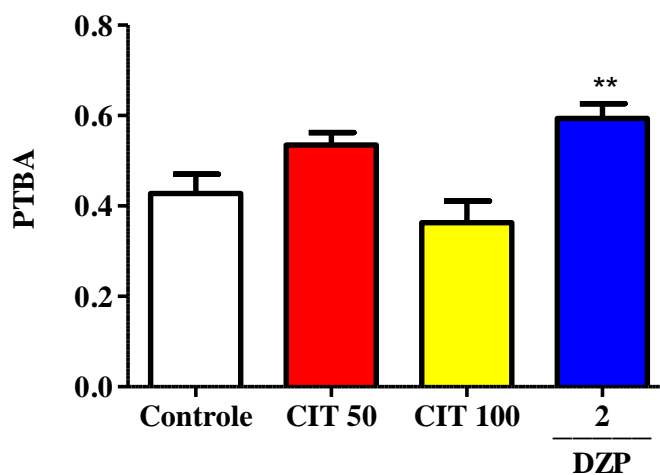
**Figura 30. Efeito do acetato de citronelila e diazepam sobre o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) no teste do labirinto em cruz elevado em camundongos.**

Controle (veículo), acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg) e diazepam (2 mg/kg) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores das figuras apresentam a média ± EPM do número de travessias durante 5 minutos. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: \*\*\* $p < 0.001$  vs controle.



**Figura 31. Efeito do acetato de citronelila e diazepam sobre a percentagem de entradas nos braços abertos (PEBA) no teste do labirinto em cruz elevado em camundongos.**

Controle (veículo), acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg) e diazepam (2 mg/kg) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores das figuras apresentam a média ± EPM do número de travessias durante 5 minutos. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: \* $p < 0.05$  vs controle.



**Figura 32. Efeito do acetato de citronelila e diazepam sobre a percentagem de tempo nos braços abertos (PTBA) no teste do labirinto em cruz elevado em camundongos.**

Controle (veículo), acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg) e diazepam (2 mg/kg) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores das figuras apresentam a média ± EPM do número de travessias durante 5 minutos. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: \*\* $p < 0.01$ ; \* $p < 0.05$  vs controle.

### 5.3 Avaliação da Atividade Sedativa/hipnótica e Anticonvulsivante

#### 5.3.1 Teste do Tempo de Sono induzido por Pentobarbital

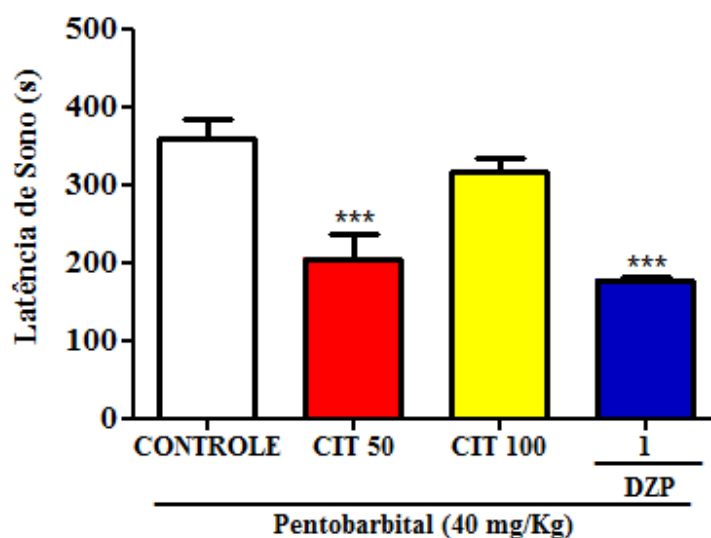
Neste teste foram analisados dois parâmetros: a latência do sono (figura 33a) e a duração do sono (figura 33b), em segundos. O acetato de citronelila diminuiu a latência do sono na dose de 50 mg/kg [CIT-50:  $205.10 \pm 31.40$  (8)  $p < 0.001$ ] mas não na dose de 100 mg/kg [CIT-100:  $317.00 \pm 18.10$  (8)], quando comparado com o controle [controle:  $360.02 \pm 24.31$  (10)] (figura 33a).

Nenhuma alteração na duração do sono foi vista após a administração nas doses de 50 mg/kg [CIT-50:  $1558 \pm 285.70$  (8)] e 100 mg/kg [CIT-100:  $2016 \pm 252.6$  (8)] comparando com o controle [controle:  $1602 \pm 146.5$  (10)] (figura 33b).

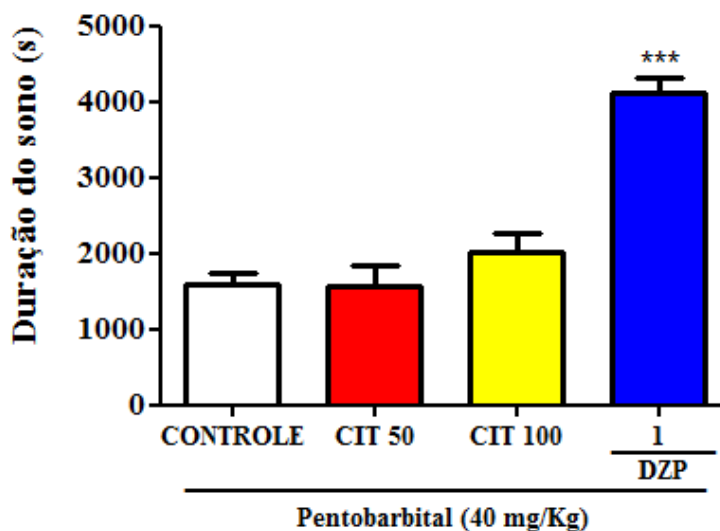
O Diazepam (1 mg/kg, i.p.) diminuiu o tempo de latência do sono [DZP-1:  $177.1 \pm 4.04$  (10)  $p < 0.001$ ] e aumentou a duração do sono [DZP-1:  $4118 \pm 192.8$  (10)  $p < 0.001$ ] em relação ao grupo controle (Figuras 33a e 33b).



33 a



33 b



**Figura 33. Efeito do acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg) e diazepam (1 mg/kg) sobre a latência (33 a) e duração do sono (33 b) no teste do tempo de sono induzido por pentobarbital em camundongos.**

Controle (veículo), acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg, v.o.) e diazepam (1 mg/kg), foram administrados 30 min (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores das figuras 33a e 33b apresentam a média  $\pm$  EPM do tempo de imobilidade (s) durante 5 minutos. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: \*\*\* $p < 0.001$  vs controle.

### 5.3.2 Teste da Convulsão induzida por Pentilenotetrazol

No teste da convulsão induzido por pentilenotetrazol foram avaliados a latência da convulsão e a latência da morte em segundos e a percentagem de sobrevivência. Os animais tratados com acetato de citronelila nas doses de 50 e 100 mg/kg (v.o.) não alteraram a latência da convulsão (LC) [CIT-50:  $62.29 \pm 5.97$  (8); CIT-100:  $86.00 \pm 12.54$  (8)] em nenhuma das doses utilizadas, como também não aumentaram a latência de morte (LM) [CIT-50:  $259.70 \pm 47.87$  (8); CIT-100:  $275.30 \pm 37.17$  (8)], quando comparado com os respectivos controles [LC:  $104.20 \pm 5.98$  (8); LM:  $287.00 \pm 26.63$  (8)].

O diazepam (1 mg/kg, i.p.) como esperado aumentou a latência de convulsão [DZP-1:  $154.80 \pm 19.02$  (8)  $p < 0.01$ ], comparado com o controle (tabela 2).

A percentagem de sobrevivência dos animais tratados com acetato de citronelila foi de 0% em ambas as doses. A taxa de sobrevivência dos animais tratados com diazepam (1 mg/kg) foi de 100%.

**Tabela 3. Efeito da administração do acetato de citronelila 50 e 100 mg/kg e diazepam (1 mg/kg) nas convulsões induzidas por pentilenotetrazol em camundongos.**

<b>Grupo (mg/kg)</b>	<b>Latência da Convulsão (s)</b>	<b>Latência da Morte (s)</b>	<b>Sobrevivência (%)</b>
Controle	104.20 ± 5.98 (8)	287.00 ± 26.63 (8)	0
CIT-50	62.29 ± 5.97 (8)	259.70 ± 47.87 (8)	0
CIT-100	86.00 ± 12.54 (8)	275.30 ± 37.17 (8)	0
DZP-1	154.8 ± 19.02 (8)**	-	100

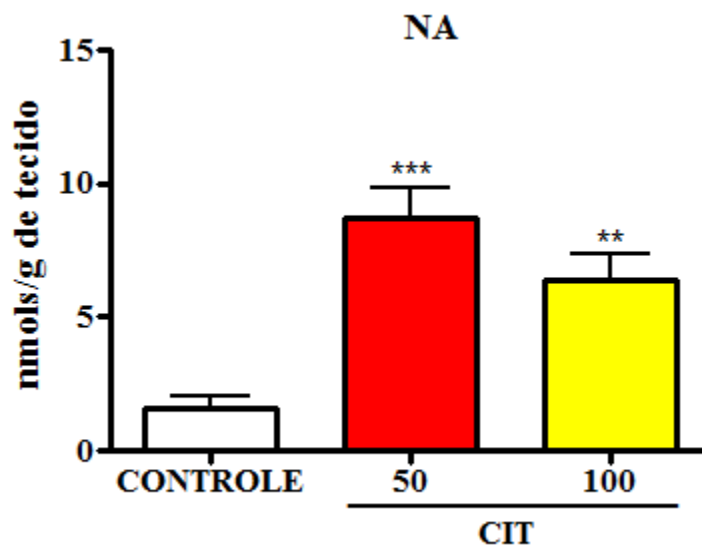
Os valores representam a média ± EPM da latência da convulsão e latência da morte. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: \*\*p< 0.01 vs controle.

## 5.4 Testes Neuroquímicos

### 5.4.1 Determinação dos níveis de Monoaminas e seus metabólitos em HPLC

#### 5.4.1.1 Determinação dos níveis de Noradrenalina

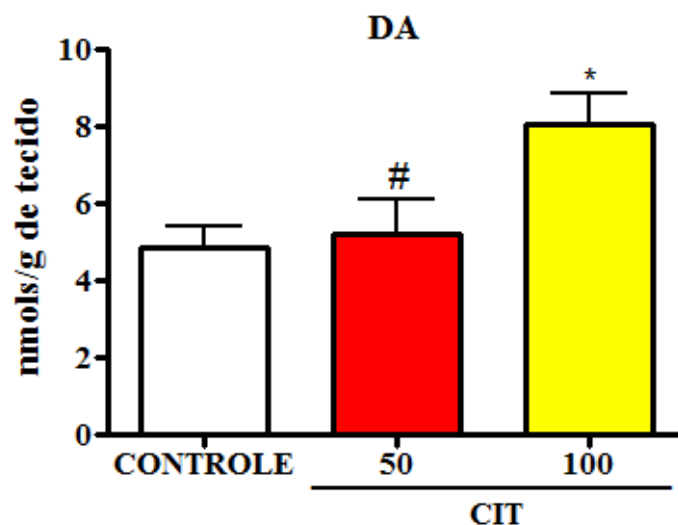
A figura 34 mostra os efeitos do acetato de citronelila 50 e 100 mg/kg sobre os níveis de noradrenalina em corpo estriado de camundongos. Ocorreu um aumento significativo nos níveis de noradrenalina comparados ao controle [controle: 1,573 ± 0,5013 (9)], sendo o aumento na dose de 50 [CIT-50: 8,74 ± 1,12 (9) p<0.001] mg/kg maior que na dose de 100 mg/kg [CIT-100: 6,36 ± 0,98 (10) p<0.01].



**Figura 34. Determinação dos níveis de noradrenalina (NA) em corpo estriado de camundongos tratados com acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg) ou veículo (controle).** Os animais receberam veículo (controle) e acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg, v.o.) e após 60 min foram sacrificados e dissecados para a retirada das áreas. A determinação das monoaminas foi feita pela técnica de HPLC com detecção eletroquímica. Os valores apresentam a média  $\pm$  EPM. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: \*\*\* $p < 0.001$  vs controle. \*\* $p < 0.01$  vs controle.

#### 5.4.1.2 Determinação dos níveis de Dopamina

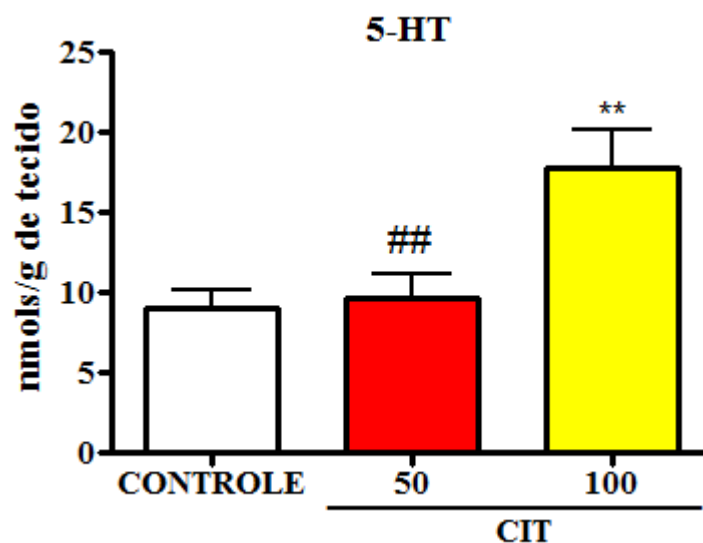
A figura 35 mostra os efeitos do acetato de citronelila 50 e 100 mg/kg sobre os níveis de dopamina em corpo estriado de camundongos. Ocorreu um aumento significativo nos níveis de dopamina na dose de 100 mg/kg do acetato de citronelila [CIT-100:  $8,06 \pm 0,80$  (14)  $p < 0.05$ ] mas não na dose de 50 mg/kg do acetato de citronelila [CIT-50:  $5,192 \pm 0,9023$  (11)] quando comparados ao controle [controle:  $4,88 \pm 0,54$  (14)].



**Figura 35. Determinação dos níveis de dopamina (DA) em corpo estriado de camundongos tratados com acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg) ou veículo (controle).** Os animais receberam veículo (controle) e acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg, v.o.) e após 60 min foram sacrificados e dissecados para a retirada das áreas. A determinação das monoaminas foi feita pela técnica de HPLC com detecção eletroquímica. Os valores apresentam a média  $\pm$  EPM. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: \* $p < 0.05$  vs controle; # $p < 0.05$  vs CIT 100.

#### 5.4.1.3 Determinação dos níveis de Serotonina

A figura 36 mostra os efeitos do acetato de citronelila 50 e 100 mg/kg sobre os níveis de dopamina em corpo estriado de camundongos. Ocorreu um aumento significativo nos níveis de serotonina na dose de 100 mg/kg do acetato de citronelila [CIT-100:  $17,76 \pm 2,344$  (7)  $p < 0.01$ ] mas não na dose de 50 mg/kg do acetato de citronelila [CIT-50:  $9,66 \pm 1,532$  (8)] quando comparados ao controle [controle:  $8,98 \pm 1,16$  (7)].



**Figura 36. Determinação dos níveis de serotonina (5-HT) em corpo estriado de camundongos tratados com acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg) ou veículo (controle).** Os animais receberam veículo (controle) e acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg, v.o.) e após 60 min foram sacrificados e dissecados para a retirada das áreas. A determinação das monoaminas foi feita pela técnica de HPLC com detecção eletroquímica. Os valores apresentam a média  $\pm$  EPM. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: \*\* $p < 0.01$  vs controle; ##  $p < 0.01$  vs CIT 100.

#### 5.4.1.4 Determinação dos níveis de metabólitos das monoaminas

Houve uma redução nos metabólitos das monoaminas nas duas doses (50 e 100 mg/kg) do acetato de citronelila. A redução nos níveis de DOPAC ocorreu tanto nos animais tratados com o acetato de citronelila de 50 mg/kg [ $p < 0.001$ ] quanto com o acetato de citronelila de 100 mg/kg [ $p < 0.001$ ] quando comparado ao controle. De modo semelhante, os níveis de HVA também diminuíram com o acetato de citronelila nas doses de 50 e 100 mg/kg [ $p < 0.001$  e  $p < 0.01$ , respectivamente] comparado ao controle como mostra a tabela 2.

Semelhante aos metabólitos para dopamina (DOPAC e HVA), o 5-HIAA também teve seus níveis reduzidos nos animais tratados com acetato de citronelila nas doses de 50 mg/kg [ $p < 0.05$ ] e 100 mg/kg [ $p < 0.001$ ], sendo esta redução dose-dependente (tabela 3).

**Tabela 4. Níveis de 5-HIAA, HVA e DOPAC em corpo estriado de camundongos tratados com acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg) ou veículo (controle).**

<b>Grupo (mg/kg)</b>	<b>5-HIAA</b>	<b>HVA</b>	<b>DOPAC</b>
Controle	15,08 ± 1,91 (11)	3,43 ± 0,54 (9)	5,22 ± 0,61 (9)
CIT-50	10,56 ± 1,14 (11)*	0,88 ± 0,11 (12)***	1,05 ± 0,10 (12)***
CIT-100	2,01 ± 0,24 (12)***	2,10 ± 0,19 (11)**	0,91 ± 0,10 (11)***

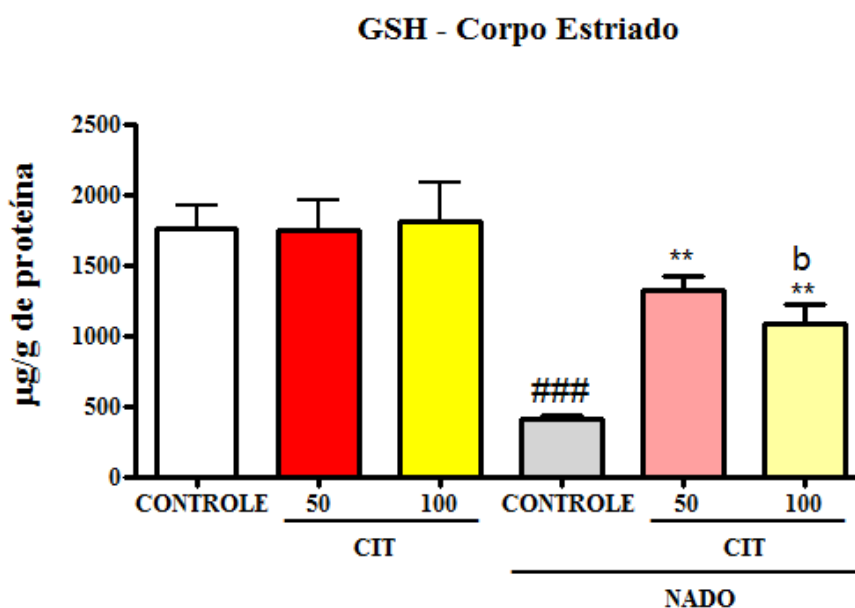
Médias (nmol/g de tecido) ± EP; ANOVA seguido por Student Newman Keuls; \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001 vs controle.

#### 5.4.2 Avaliação do efeito do acetato de citronelila sobre o estresse oxidativo

Para a análise da atividade antioxidante do acetato de citronelila foram realizados homogenatos das áreas cerebrais: corpo estriado, córtex pré-frontal e hipocampo em grupos pré-tratados com controle (veículo) ou acetato de citronelila nas doses de 50 e 100 mg/kg (v.o.), submetidos ou não ao teste do nado forçado.

##### 5.4.2.1 Efeitos do acetato de citronelila sobre os níveis de GSH em cérebro de camundongos

A figura 37 mostra que o pré-tratamento dos animais com acetato de citronelila nas doses de 50 e 100 mg/kg [controle: 1.759 ± 161,3 (8); CIT-50: 1.751 ± 206,9 (8); CIT-100: 1.813 ± 270,4 (8) p>0,05] não alterou significativamente os níveis de GSH no corpo estriado quando os animais não são submetidos ao nado, entretanto houve um aumento significativo nos níveis de GSH nas doses de 50 e 100 mg/kg do acetato de citronelila [CIT-50: 1.321 ± 99,37 (8) p<0,01; CIT-100: 1.089 ± 131,9 (8) p<0,01] em relação ao controle-nado [controle: 407,00 ± 31,24 (8)] no corpo estriado dos animais submetidos ao nado forçado.

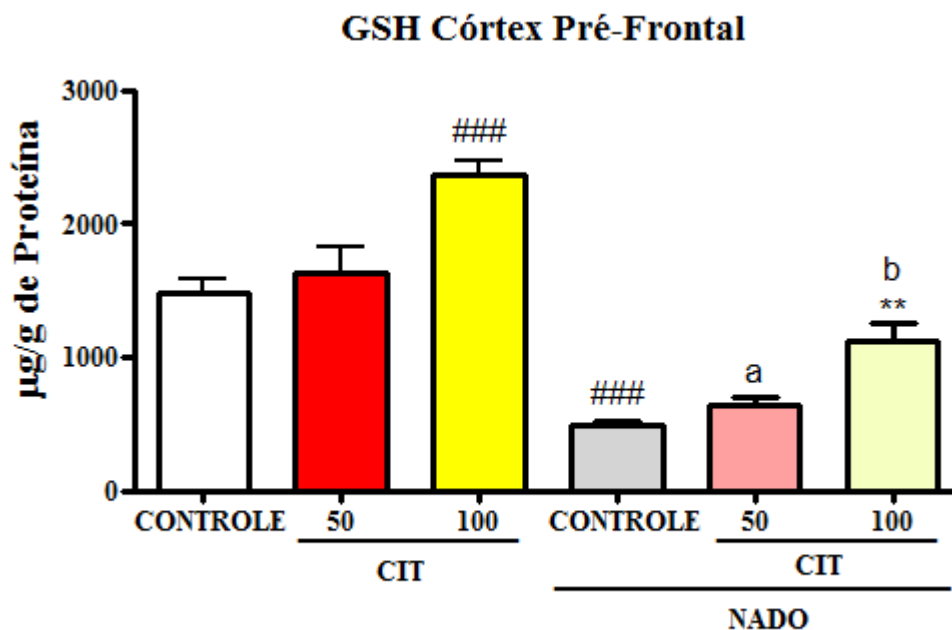


**Figura 37. Efeitos do acetato de citronelila 50 ou 100 mg/kg sobre os níveis de GSH em corpo estriado de animais submetidos ou não ao estresse do nado forçado.**

Os animais que não foram submetidos ao nado forçado foram tratados com acetato de citronelila 50 ou 100 mg/kg ou veículo (v.o.) e depois de 1 hora foram sacrificados e tiveram seus cérebros dissecados para a remoção das áreas. Os animais que foram submetidos ao estresse foram tratados com acetato de citronelila 50 ou 100 mg/kg ou veículo (v.o.) e depois de 60 minutos foram submetidos ao nado forçado por 5 min e depois foram sacrificados e dissecados. Os valores representam média  $\pm$  EPM. ANOVA seguido Student Newman Keuls como teste *post hoc*. \*\*\* $p < 0.001$  vs controle-nado; ### $p < 0.001$  vs controle. <sup>b</sup> $p < 0.05$  vs CIT-100.

A figura 38 mostra que o pré-tratamento dos animais com acetato de citronelila na dose de 50 mg/kg [CIT-50:  $1.637 \pm 184,6$  (8)  $p > 0,05$ ] não alterou significativamente os níveis de GSH e que o acetato de citronelila 100 mg/kg [CIT-100:  $2.363 \pm 109,3$  (8)  $p < 0.001$ ] aumentou os níveis de GSH no córtex pré-frontal em relação ao controle [controle:  $1.484 \pm 103,3$  (8)], quando os animais não são submetidos ao nado forçado. Da mesma forma não houve aumento significativo nos níveis de GSH na dose de 50 mg/kg [CIT-50:  $644,6 \pm 49,63$  (8)  $p > 0,05$ ], mas houve aumento nos níveis de GSH com o acetato de citronelila 100 mg/kg [CIT-100:  $1.114 \pm 133,9$  (8)  $p < 0.01$ ] em relação ao controle-nado [controle:  $490,4 \pm 30,33$  (8)] no córtex pré-frontal dos animais submetidos ao nado forçado.

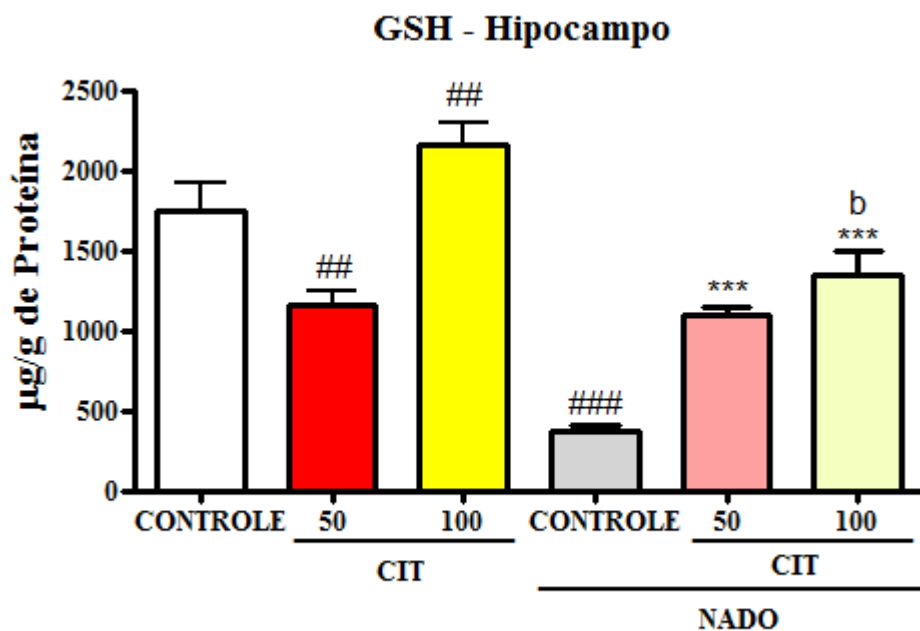




**Figura 38. Efeitos do acetato de citronelila 50 ou 100 mg/kg sobre os níveis de GSH em córtex pré-frontal de animais submetidos ou não ao estresse do nado forçado.**

Os animais que não foram submetidos ao nado forçado foram tratados com acetato de citronelila 50 ou 100 mg/kg ou veículo (v.o.) e depois de 1 hora foram sacrificados e tiveram seus cérebros dissecados para a remoção das áreas. Os animais que foram submetidos ao estresse foram tratados com acetato de citronelila 50 ou 100 mg/kg ou veículo (v.o.) e depois de 60 minutos foram submetidos ao nado forçado por 5 min e depois foram sacrificados e dissecados. Os valores representam média  $\pm$  EPM. ANOVA seguido Student Newman Keuls como teste *post hoc*. ### $p < 0.001$  vs controle; \*\* $p < 0.01$  vs controle-nado. <sup>a</sup> $p < 0.001$  vs CIT-50; <sup>b</sup> $p < 0.001$  vs CIT-100.

A figura 39 mostra que o pré-tratamento dos animais com acetato de citronelila na dose de 50 mg/kg [CIT-50:  $1.157 \pm 87,02$  (8)  $p < 0,01$ ] diminuiu significativamente os níveis de GSH e que o acetato de citronelila 100 mg/kg [CIT-100:  $2.159 \pm 141,7$  (8)  $p < 0,01$ ] aumentou os níveis de GSH no hipocampo em relação ao controle [controle:  $1.748 \pm 171,2$  (8)], quando os animais não foram submetidos ao nado forçado. Entretanto, houve um aumento significativo nos níveis de GSH nas doses de 50 e 100 mg/kg do acetato de citronelila [CIT-50:  $1.098 \pm 41,98$  (8)  $p < 0,001$ ; CIT-100:  $1.344 \pm 156,3$  (8)  $p < 0,001$ ] em relação ao controle-nado [controle:  $365,80 \pm 48,26$  (8)] no corpo estriado dos animais submetidos ao nado forçado.



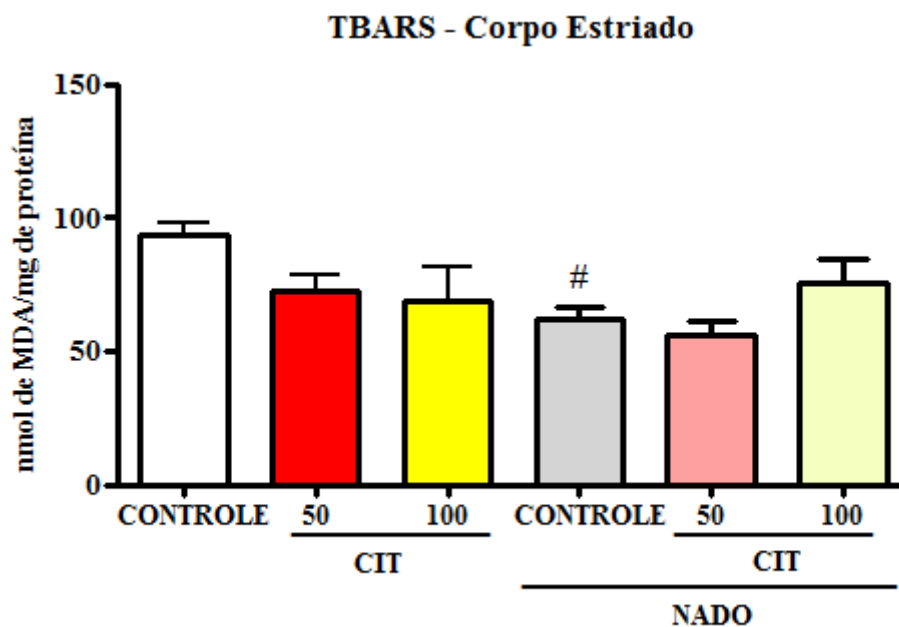
**Figura 39. Efeitos do acetato de citronelila 50 ou 100 mg/kg sobre os níveis de GSH em hipocampo de animais submetidos ou não ao estresse do nado forçado.**

Os animais que não foram submetidos ao nado forçado foram tratados com acetato de citronelila 50 ou 100 mg/kg ou veículo (v.o.) e depois de 1 hora foram sacrificados e tiveram seus cérebros dissecados para a remoção das áreas. Os animais que foram submetidos ao estresse foram tratados com acetato de citronelila 50 ou 100 mg/kg ou veículo (v.o.) e depois de 60 minutos foram submetidos ao nado forçado por 5 min e depois foram sacrificados e dissecados. Os valores representam média  $\pm$  EPM. ANOVA seguido Student Newman Keuls como teste *post hoc*. ## $p < 0,01$ ; ### $p < 0.001$  vs controle; \*\*\* $p < 0.001$  vs controle-nado; <sup>b</sup> $p < 0.001$  vs CIT-100.

#### 5.4.2.2 Efeitos do acetato de citronelila sobre os níveis de MDA (malonildialdeído) em cérebro de camundongos

A figura 40 mostra que o pré-tratamento dos animais com acetato de citronelila nas doses de 50 e 100 mg/kg [controle:  $93,20 \pm 4,91$  (8); CIT-50:  $72,37 \pm 5,76$  (8); CIT-100:  $68,97 \pm 12,22$  (8)  $p > 0,05$ ] não alterou significativamente os níveis de MDA no corpo estriado quando os animais não são submetidos ao nado. Da mesma forma não houve alteração significativa nos níveis de MDA nas doses de 50 e 100 mg/kg do acetato de citronelila [CIT-

50:  $55,69 \pm 5,25$  (8); CIT-100:  $75,36 \pm 9,17$  (8)  $p > 0,05$ ] em relação ao controle-nado [controle:  $61,88 \pm 4,68$  (8)] no corpo estriado do animais submetidos ao nado forçado.

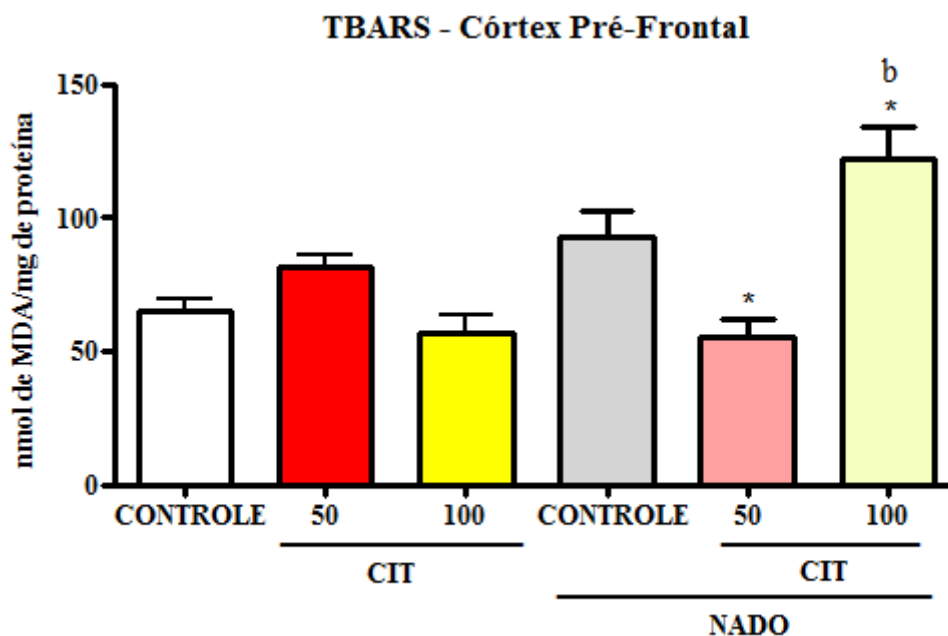


**Figura 40. Efeitos do acetato de citronelila 50 ou 100 mg/kg sobre os níveis de MDA (malonildialdeído) no corpo estriado de animais submetidos ou não ao estresse do nado forçado.**

Os animais que não foram submetidos ao nado forçado foram tratados com acetato de citronelila 50 ou 100 mg/kg ou veículo (v.o.) e depois de 1 hora foram sacrificados e tiveram seus cérebros dissecados para a remoção das áreas. Os animais que foram submetidos ao estresse foram tratados com acetato de citronelila 50 ou 100 mg/kg ou veículo (v.o.) e depois de 60 minutos foram submetidos ao nado forçado por 5 min e depois foram sacrificados e dissecados. Os valores representam média  $\pm$  EPM. ANOVA seguido Student Newman Keuls como teste *post hoc*. # $p < 0,05$  vs controle.

A figura 41 mostra que o pré-tratamento dos animais com acetato de citronelila nas doses de 50 e 100 mg/kg [CIT-50:  $81,82 \pm 4,10$  (8); CIT-100:  $56,56 \pm (8)$   $p > 0,05$ ] não alterou significativamente os níveis de MDA no córtex pré-frontal em relação ao controle [controle:  $65,29 \pm 4,57$  (8)] quando os animais não são submetidos ao nado, entretanto houve uma diminuição significativa nos níveis de MDA com o acetato de citronelila 50mg/kg [CIT-50:  $54,98 \pm 6,90$  (8)  $p < 0,05$ ] e um aumento com o acetato de citronelila 100 mg/kg [CIT-100:

122,00 ± 12,17 (8) p<0,05] em relação ao controle-nado [controle: 92,98 ± 9,87 (8)] no córtex pré-frontal dos animais submetidos ao nado forçado.

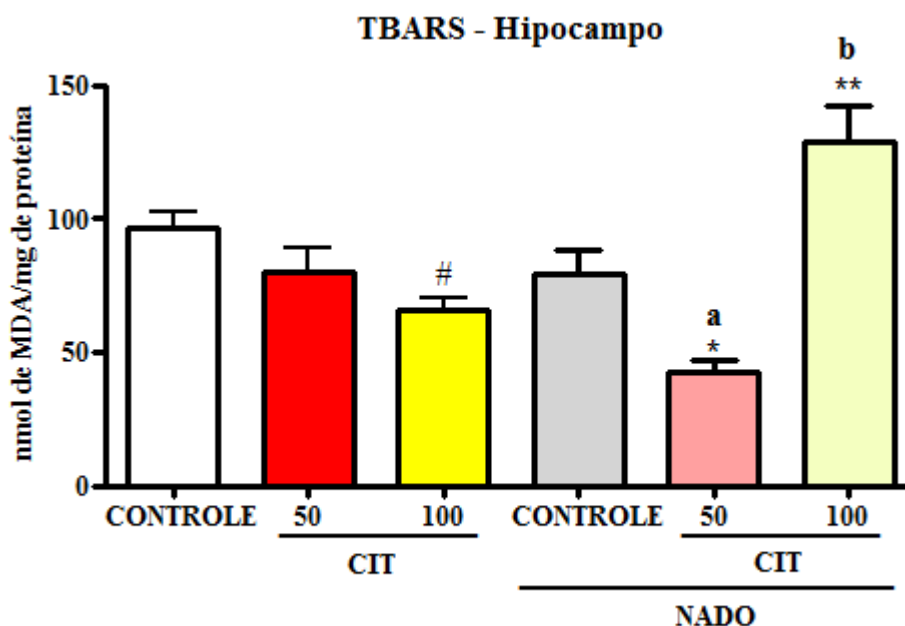


**Figura 41. Efeitos do acetato de citronelila 50 ou 100 mg/kg sobre os níveis de MDA (malonildialdeído) no córtex pré-frontal de animais submetidos ou não ao estresse do nado forçado.**

Os animais que não foram submetidos ao nado forçado foram tratados com acetato de citronelila 50 ou 100 mg/kg ou veículo (v.o) e depois de 1 hora foram sacrificados e tiveram seus cérebros dissecados para a remoção das áreas. Os animais que foram submetidos ao estresse foram tratados com acetato de citronelila 50 ou 100 mg/kg ou veículo (v.o.) e depois de 60 minutos foram submetidos ao nado forçado por 5 min e depois foram sacrificados e dissecados. Os valores representam média ± EPM. ANOVA seguido Student Newman Keuls como teste *post hoc*. \*p<0,05 vs controle-nado; <sup>b</sup>p<0,001 vs CIT-100.

A figura 42 mostra que o pré-tratamento dos animais, que não foram submetidos ao nado forçado, com acetato de citronelila 50 mg/kg [CIT-50: 80,26 ± 8,99 (8) p>0,05] não alterou de forma significativa os níveis de MDA no hipocampo, entretanto o acetato de citronelila 100 mg/kg [CIT-100: 65,85 ± 4,55 (8) p<0,05] diminuiu de forma significativa os níveis de MDA no hipocampo em relação ao controle [controle: 96,44 ± 5,90 (8)]. Nos animais submetidos ao estresse do nado forçado, houve uma diminuição significativa nos

níveis de MDA com o acetato de citronelila 50mg/kg [CIT-50:  $42,79 \pm 4,17$  (8)  $p < 0,05$ ] e um aumento com o acetato de citronelila 100 mg/kg [CIT-100:  $128,99 \pm 13,34$  (8)  $p < 0,01$ ] em relação ao controle-nado [controle:  $79,49 \pm 9,00$  (8)] no hipocampo dos animais.



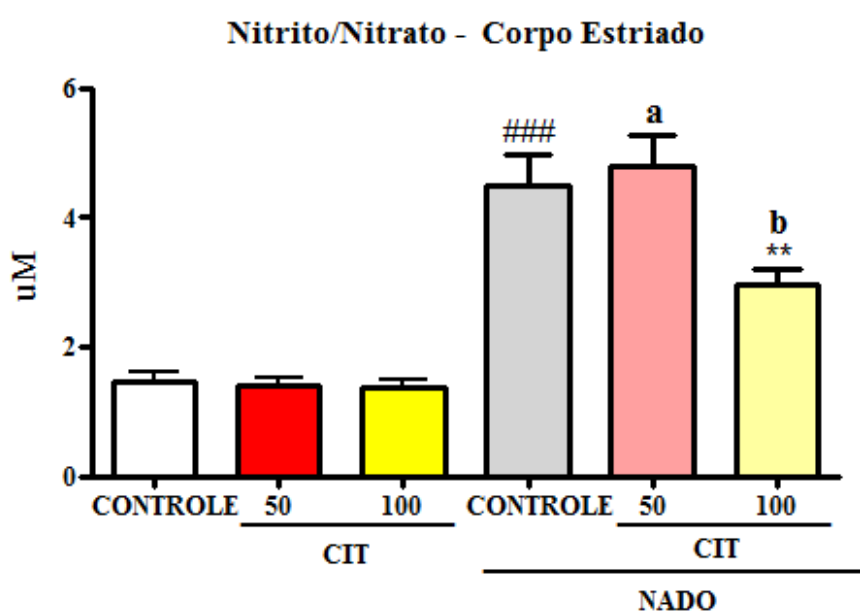
**Figura 42.** Efeitos do acetato de citronelila 50 ou 100 mg/kg sobre os níveis de MDA (malondialdeído) no hipocampo de animais submetidos ou não ao estresse do nado forçado.

Os animais que não foram submetidos ao nado forçado foram tratados com acetato de citronelila 50 ou 100 mg/kg ou veículo (v.o) e depois de 1 hora foram sacrificados e tiveram seus cérebros dissecados para a remoção das áreas. Os animais que foram submetidos ao estresse foram tratados com acetato de citronelila 50 ou 100 mg/kg ou veículo (v.o.) e depois de 60 minutos foram submetidos ao nado forçado por 5 min e depois foram sacrificados e dissecados. Os valores representam média  $\pm$  EPM. ANOVA seguido Student Newman Keuls como teste *post hoc*. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  vs controle-nado; # $p < 0,05$  vs controle; <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs CIT-50; <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs CIT-100.

#### 5.4.2.3 Efeitos do acetato de citronelila sobre os níveis de nitrito/nitrato em cérebro de camundongos

A figura 43 mostra que o pré-tratamento dos animais com acetato de citronelila nas doses de 50 e 100 mg/kg [CIT-50:  $1,41 \pm 0,10$  (8); CIT-100:  $1,37 \pm 0,12$  (8)  $p > 0,05$ ] não

alterou significativamente os níveis de nitrito/nitrato no corpo estriado, em relação ao controle [controle:  $1,45 \pm 0,14$  (8)], quando os animais não são submetidos ao nado. Quando os animais foram submetidos ao nado forçado não houve alteração significativa nos níveis de nitrito/nitrato na dose do acetato de citronelila 50 mg/kg [CIT-50:  $4,78 \pm 0,47$  (8)  $p > 0,05$ ], entretanto com o acetato de citronelila 100 mg/kg [CIT-100:  $2,96 \pm 0,22$  (8)  $p < 0,01$ ] houve uma diminuição significativa nos níveis de nitrito/nitrato no corpo estriado dos animais, em relação ao controle-nado [controle:  $4,49 \pm 0,47$  (8)].

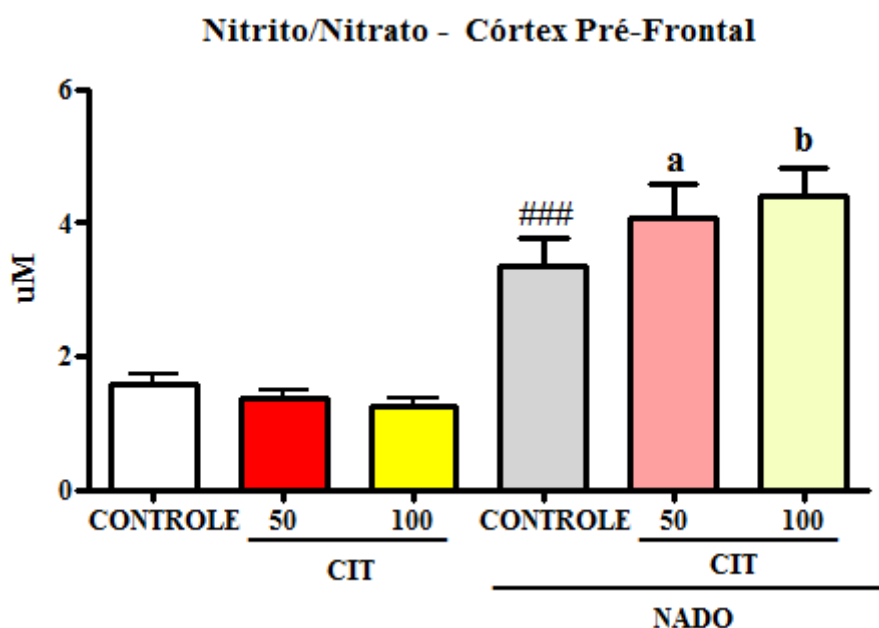


**Figura 43. Efeitos do acetato de citronelila 50 ou 100 mg/kg sobre os níveis de Nitrito/nitrato no corpo estriado de animais submetidos ou não ao estresse do nado forçado.**

Os animais que não foram submetidos ao nado forçado foram tratados com acetato de citronelila 50 ou 100 mg/kg ou veículo (v.o) e depois de 1 hora foram sacrificados e tiveram seus cérebros dissecados para a remoção das áreas. Os animais que foram submetidos ao estresse foram tratados com acetato de citronelila 50 ou 100 mg/kg ou veículo (v.o.) e depois de 60 minutos foram submetidos ao nado forçado por 5 min e depois foram sacrificados e dissecados. Os valores representam a média  $\pm$  EPM. ANOVA seguido Student Newman Keuls como teste *post hoc*. ### $p < 0,001$  vs controle; <sup>a</sup> $p < 0,001$  vs CIT-50; <sup>b</sup> $p < 0,01$  vs CIT-100.

A figura 44 mostra que o pré-tratamento dos animais com acetato de citronelila nas doses de 50 e 100 mg/kg [CIT-50:  $1,38 \pm 0,09$  (8); CIT-100:  $1,23 \pm 0,14$  (8)  $p > 0,05$ ] não

alterou significativamente os níveis de nitrito/nitrato no córtex pré-frontal, em relação ao controle [controle:  $1,59 \pm 0,15$  (8)], quando os animais não são submetidos ao nado. Da mesma forma não houve aumento significativo nos níveis de nitrito/nitrato nas doses de 50 e 100 mg/kg do acetato de citronelila [CIT-50:  $4,06 \pm 0,50$  (8); CIT-100:  $4,40 \pm 0,41$  (8)  $p > 0,05$ ] em relação ao controle-nado [controle:  $3,34 \pm 0,42$  (8)] no córtex pré-frontal dos animais submetidos ao nado forçado.

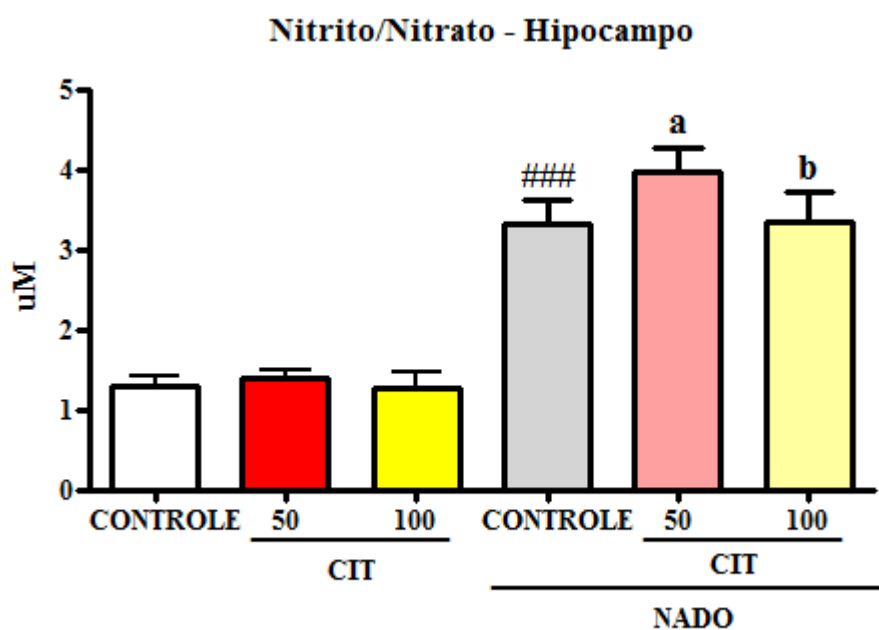


**Figura 44. Efeitos do acetato de citronelila 50 ou 100 mg/kg sobre os níveis de Nitrito/nitrato no córtex pré-frontal de animais submetidos ou não ao estresse do nado forçado.**

Os animais que não foram submetidos ao nado forçado foram tratados com acetato de citronelila 50 ou 100 mg/kg ou veículo (v.o) e depois de 1 hora foram sacrificados e tiveram seus cérebros dissecados para a remoção das áreas. Os animais que foram submetidos ao estresse foram tratados com acetato de citronelila 50 ou 100 mg/kg ou veículo (v.o.) e depois de 60 minutos foram submetidos ao nado forçado por 5 min e depois foram sacrificados e dissecados. Os valores representam a média  $\pm$  EPM. ANOVA seguido Student Newman Keuls como teste *post hoc*. # $p < 0,05$  vs controle; <sup>a</sup> $p < 0,001$  vs CIT-50; <sup>b</sup> $p < 0,001$  vs CIT-100.

A figura 45 mostra que o pré-tratamento dos animais com acetato de citronelila nas doses de 50 e 100 mg/kg [CIT-50:  $1,39 \pm 0,10$  (8); CIT-100:  $1,26 \pm 0,21$  (8)  $p > 0,05$ ] não alterou significativamente os níveis de nitrito/nitrato no hipocampo, em relação ao controle

[controle:  $1,29 \pm 0,11$  (8)], quando os animais não foram submetidos ao nado. Da mesma forma não houve aumento significativo nos níveis de nitrito/nitrato nas doses de 50 e 100 mg/kg do acetato de citronelila [CIT-50:  $3,95 \pm 0,31$  (8); CIT-100:  $3,34 \pm 0,37$  (8)  $p > 0,05$ ] em relação ao controle-nado [controle:  $3,31 \pm 0,30$  (8)] no hipocampo dos animais submetidos ao nado forçado.



**Figura 45. Efeitos do acetato de citronelila 50 ou 100 mg/kg sobre os níveis de Nitrito/nitrato no hipocampo de animais submetidos ou não ao estresse do nado forçado.** Os animais que não foram submetidos ao nado forçado foram tratados com acetato de citronelila 50 ou 100 mg/kg ou veículo (v.o.) e depois de 1 hora foram sacrificados e tiveram seus cérebros dissecados para a remoção das áreas. Os animais que foram submetidos ao estresse foram tratados com acetato de citronelila 50 ou 100 mg/kg ou veículo (v.o.) e depois de 60 minutos foram submetidos ao nado forçado por 5 min e depois foram sacrificados e dissecados. Os valores representam a média  $\pm$  EPM. ANOVA seguido Student Newman Keuls como teste *post hoc*. ### $p < 0,001$  vs controle; <sup>a</sup> $p < 0,001$  vs CIT-50; <sup>b</sup> $p < 0,001$  vs CIT-100.



## 5.5 Avaliação da Toxicologia Aguda do acetato de citronelila

### 5.5.1 Avaliação comportamental

Baseado em outros estudos com acetato de citronelila, onde o mesmo foi testado para analgesia na dose de 200 mg/kg, sem apresentar toxicidade (RIOS et al., 2013), resolvemos iniciar o teste de toxicidade com a dose máxima que corresponde a 2000 mg/kg.

No primeiro teste (Teste 1), nenhum animal apresentou morbidade ou mortalidade nas primeiras 24 horas após exposição, apenas alguns poucos efeitos ocasionados pela administração da substância como piloereção, fechamento de pálpebra, tremor e sonolência.

Entretanto ocorreu a morte de 01 (um) animal no 7º dia do estudo, no grupo com acetato de citronelila (2000 mg/kg). Os outros animais seguiram o estudo, até o 14º dia sem mortalidade e morbidade. Diante disso, de acordo com o protocolo da OECD 423 (Anexo A) realizamos o segundo teste (Teste 2) com a dose de 2000 mg/kg. Nas primeiras 24 horas os animais não apresentaram nenhuma alteração, entretanto no 13º dia (penúltimo dia) do estudo, ocorreu a morte de 01 (um) animal. Com os resultados obtidos observamos que a toxicidade oral do acetato de citronelila é maior que 2000 mg/kg e classificada como categoria 5 (cinco), segundo os critérios do protocolo experimental adotado.

No presente estudo não foi observado sinais clínicos de toxicidade nos animais testados durante os 14 (quatorze) dias após a administração do acetato de citronelila (2000 mg/kg).

Em relação ao peso corporal houve um aumento significativo de 28,65% no peso do grupo acetato de citronelila (2000 mg/kg) no segundo teste, comparando o dia 1 com o 14º dia, entretanto um aumento de peso significativo (27,12%) também foi notado no grupo controle, comparando o 1º com 14º dia (Tabela 5). Não foram evidenciadas diferenças significativas entre os grupos teste e controle em relação aos pesos dos animais.

Não foram observadas diferenças significativas no consumo de ração e água entre os animais das doses testadas.

**Tabela 5. Média do peso corporal (gramas  $\pm$  desvio padrão) de camundongos swiss expostos ao acetato de citronelila na dose de 2000 mg/kg, por via oral.**

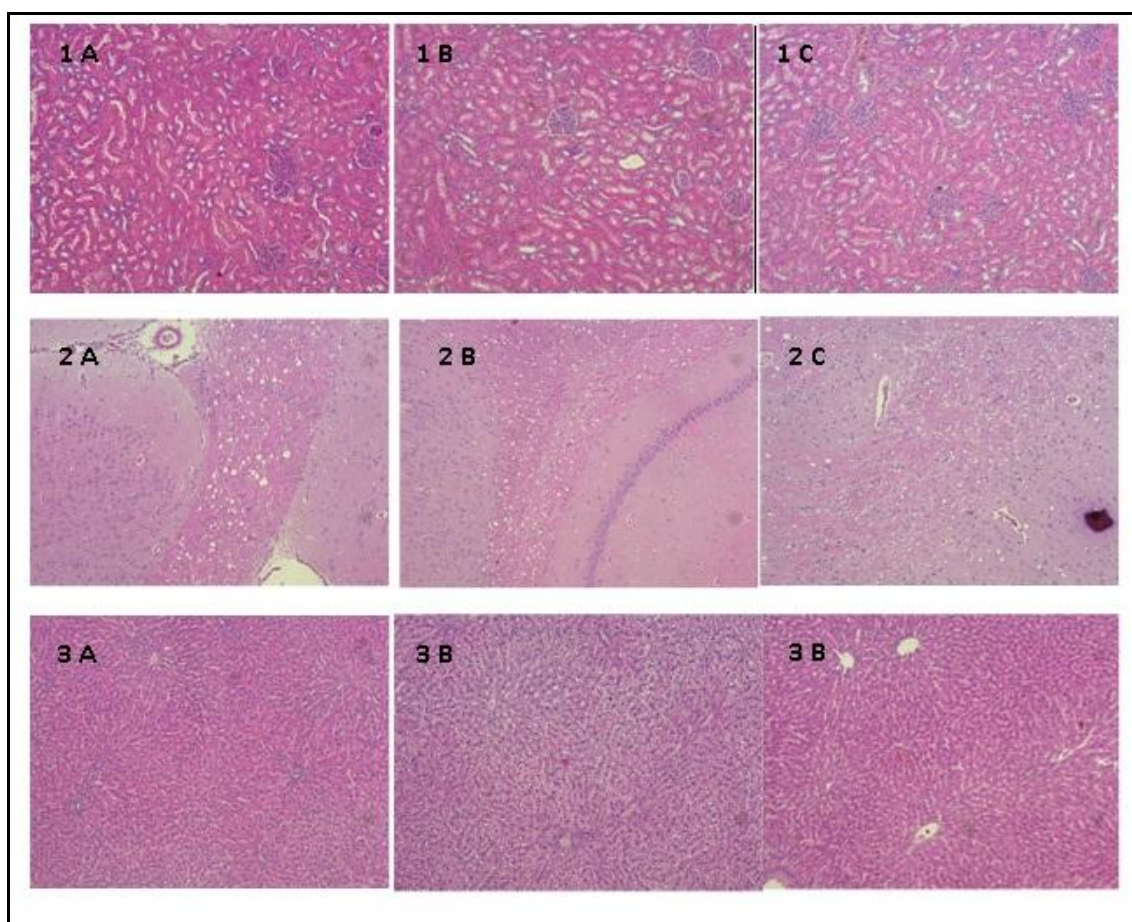
	Controle	Teste 1 2000 mg/kg	Teste 2 2000 mg/kg
Dia 1	223.3 $\pm$ 25.66 (n=3)	210.7 $\pm$ 4.04 (n=3)	244.0 $\pm$ 25.52 (n=3)
Dia 7	266.3 $\pm$ 34.27 (n=3)	254 $\pm$ 16.97 (n=2)	248.7 $\pm$ 44.77 (n=3)
Dia 14	306.3 $\pm$ 34.27# (n=3)	298.0 $\pm$ 25.46 (n=2)	342.0 $\pm$ 1.4* (n=2)

Os valores representam a média  $\pm$  EPM. ANOVA seguido Student Newman Keuls como teste *post hoc*. # $p < 0,05$  vs Dia 1 do controle; \*  $P < 0,05$  vs Dia 1 do Teste 2. Para análise entre os grupos foi realizado Two-way ANOVA seguido Bonferroni como teste *post hoc*.

### 5.5.2 Avaliação histológica

Com o intuito de averiguar possíveis danos aos órgãos internos, foi realizada análise histológica nos órgãos dos animais. No último dia de estudo (14º dia) os animais foram sacrificados e seus órgãos (fígado, cérebro e rins) foram retirados para análise histológica.

Nas preparações das lâminas com os tecidos dos respectivos órgãos estudados (fígado, cérebro e rins) não houve alterações, nem sinais de processo inflamatório ou alterações na ultraestrutura dos órgãos analisados microscopicamente (Figura 46).



**Figura 46. Análise histológica dos seguintes órgãos respectivamente: rim, cérebro e fígado em ratos na dose de 2000 mg/kg no 14 ° dia após término da avaliação para toxicidade. 1A, 2A e 3A (controle), 1B, 2B e 3B (teste 1), 1C, 2C e 3C (teste 2).**

## 6 DISCUSSÃO

As desordens depressivas têm se tornado comuns e estima-se que há um aumento na incidência destas patologias. A depressão causa incapacidades no indivíduo, sendo uma das principais causas de suicídio (REYNOLDS, 2003). Diversos agentes terapêuticos utilizados para o tratamento da depressão apresentam uma taxa de resolutividade em torno de 65 a 75% nos pacientes depressivos, entretanto efeitos adversos desagradáveis têm limitado o tratamento com os agentes antidepressivos utilizados atualmente (KEITH & MATTHEW, 1993). A partir disso, surgiu a necessidade de desenvolver novos fármacos, que apresentem boa eficácia, mas que diminuam os efeitos adversos indesejáveis oriundos do tratamento com os antidepressivos. Com isso surgiram novos medicamentos como os antidepressivos de segunda geração, inibidores seletivos da recaptação de serotonina (SSRIs), como a fluoxetina, que reduzem os riscos destes efeitos em comparação aos antidepressivos tricíclicos (TCA) sem alterar a efetividade do tratamento para a depressão (MOLLER & VOLZ, 1996). Entretanto, estes também apresentam uma vasta lista de efeitos adversos.

Estudos anteriores mostraram que os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (SSRIs), apresentam efeitos adversos como diminuição ou aumento de peso, interações entre as drogas, disfunção sexual e sintomas extrapiramidais, dentre outros sintomas (CROFT et al., 1999; MASAND & GUPTA, 2002). Os efeitos adversos da fluoxetina são menores quando comparados com outros antidepressivos, mas a fluoxetina está mais relacionada a efeitos como insônia, agitação, tremor e ansiedade (ANDERSON, 2001; BRAMBILLA et al., 2005).

Atualmente tem surgido interesse dos laboratórios em realizar pesquisas com fitoterápicos, acreditando na sua grande aceitação pela população e por sua menor incidência de efeitos indesejáveis. Um estudo realizado com o óleo essencial WGE (extrato de *Gastrodia elata*), um agente fitoterápico, mostrou que no grupo dos animais tratados com fluoxetina, estes apresentaram diminuição do peso e aumento da irritabilidade. Entretanto, no grupo de animais tratados com o fitoterápico WGE, estes efeitos não foram observados (CHEN et al., 2009).

A hipótese mais bem aceita para a depressão se baseia no fato de que neste transtorno ocorre um déficit funcional das monoaminas, desta forma, o tratamento das desordens depressivas está classicamente relacionado com o aumento da disposição de monoaminas através do uso dos antidepressivos (HASHIMOTO, 2009).

Embora a hipótese das monoaminas seja extensamente estudada para auxiliar no tratamento da depressão, uma das grandes desvantagens dos antidepressivos atuais, se deve ao longo tempo que os mesmos levam para agir, muitos deles só apresentam seus efeitos terapêuticos, com 2 a 3 semanas de tratamento. Uma combinação com mais de um agente terapêutico nos casos de depressão resistente ao tratamento, oferece várias vantagens, como uma diminuição de recidiva dos sintomas iniciais, além de apresentar uma maior efetividade na resposta clínica comparada às formas de tratamento anteriores (LAM et al., 2002; RUBIO et al., 2004). Entretanto, a combinação de agentes terapêuticos pode gerar uma potencialização dos efeitos adversos, especialmente na combinação de agentes antidepressivos tricíclicos com inibidores da monoamino oxidase (IMAO) (DEBATTISTA et al., 1998; DODD et al., 2005).

Baseado nestas hipóteses, estudos têm sido realizados com intuito de desenvolver novos fármacos para o tratamento da depressão e há alguns anos, as indústrias farmacêuticas têm mostrado interesse por agentes que combinem mais de uma ação terapêutica em apenas um único agente e que, além disso, apresentem menos efeitos adversos, a fim de proporcionar melhor adesão dos pacientes ao tratamento (QIU, 2007).

As indústrias farmacêuticas tem procurado utilizar diversas espécies de plantas para o tratamento das desordens mentais, e com isso o estudo de plantas medicinais e seus derivados tem tido constante crescimento. Já foram demonstrados diferentes fármacos de diferentes espécies de plantas numa variedade de modelos animais, e estes tem apresentado alta eficácia terapêutica no tratamento de distúrbios psiquiátricos (ZHANG, 2004; LINDE & KNUPPEL, 2005; SAKAKIBARA et al., 2006). Plantas como *ginseng*, *ginko biloba*, *Valeriana walichii* e *gastrodia elata*, dentre outras, apresentaram em estudos anteriores em modelos animais, alta eficácia no tratamento da depressão. Estudos clínicos realizados em seres humanos mostraram

que a *Valeriana* apresenta uma boa eficácia no tratamento da depressão e dos transtornos de ansiedade. Estudos realizados em nosso laboratório com as riparinas I, II e III, isoladas da planta *Aniba riparia*, bem como com o carvacrol, isolado do óleo essencial de plantas, também demonstraram efeito antidepressivo em modelos experimentais (HATTSOHL, et al., 2008; MELO F. et al., 2011, MELO F. et al., 2011; AMARAL et al., 2013).

O acetato de citronelila (3,7-dimetil-6-octen-1-yl acetato) trata-se de um monoterpreno, presente no óleo essencial extraído de diversas plantas como a *Citronela*, *Cymbopogon citratus* e *Lipia Alba*. Vários estudos já comprovaram sua atividade como repelente para insetos, além de sua ação antibacteriana e antifúngica. Um estudo recente realizado em nosso laboratório mostrou que o acetato de citronelila apresenta efeito analgésico por meio de uma ação nos receptores de glutamato através da proteína quinase C (PKC) e dos canais TRPV1, ASIC (RIOS et al., 2013). Porém, estudos com esta substância relacionados à sua atividade no Sistema Nervoso Central, ainda são escassos. Outras substâncias também presentes no óleo essencial da *citronela* como o *citronelol* e o *citronelal*, além de efeitos antibacterianos e antifúngicos também apresentaram atividade anticonvulsivante e ansiolítica.

Baseado no crescente interesse em estudar tratamentos eficazes e com maior aceitação pela população tanto em relação aos custos, como em relação a uma melhor adesão terapêutica e com base nos altos índices de depressão que vem aumentando nos últimos anos, este estudo teve como objetivo avaliar a ação antidepressiva do acetato de citronelila em camundongos, através da identificação de seus possíveis mecanismos de ação. Uma das desvantagens dos antidepressivos atuais é o longo período para o surgimento do efeito terapêutico, sendo assim neste estudo também objetivamos comparar os mecanismos de ação dos antidepressivos já existentes com os possíveis mecanismos de ação do acetato de citronelila, através da realização do teste do nado forçado em camundongos.

Dessa forma, o presente estudo foi realizado através de análises das alterações comportamentais e neuroquímicas em camundongos. As alterações comportamentais foram investigadas através da elaboração de curva dose-resposta, confirmação do efeito antidepressivo do acetato de citronelila em modelos preditivos como o teste da suspensão da

cauda e nado forçado, campo aberto e plus maze. Além disso, no teste do nado forçado foram investigados os possíveis mecanismos de ação sobre o sistema de monoaminas com a utilização de antagonistas específicos para cada subtipo de receptor da noradrenalina, serotonina e dopamina. A fim de avaliar o efeito anticonvulsivante foi realizado um estudo comportamental para convulsão em camundongos. Para os estudos neuroquímicos foram realizadas análises nos níveis de monoaminas e seus metabólitos no HPLC eletroquímico em corpo estriado. Realizou-se ainda a avaliação da atividade de sistemas enzimáticos e a produção de substâncias derivadas do estresse oxidativo com dosagem da atividade da enzima glutatona reduzida (GSH), do conteúdo de nitrito e do índice de peroxidação lipídica (TBARS) em córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado de animais previamente tratados. Para a avaliação da toxicidade, foi realizado o teste de toxicidade aguda preconizado pela OECD e avaliado a vitalidade e lesão dos órgãos através da análise histológica.

Para a avaliação dos mecanismos de ação antidepressivos do acetato de citronelila, foi escolhido o Teste do Nado Forçado (TNF), por se tratar de um teste bastante utilizado cientificamente para a avaliação de medicamentos antidepressivos. O TNF e o Teste de Suspensão da Cauda (TSC) são bastante utilizados como modelos para screening de novas drogas antidepressivas (PORSOLT et al., 1978; STERU et al., 1985). Estes testes são um tanto sensíveis e relativamente específicos para a maioria dos antidepressivos, incluindo os tricíclicos, inibidores da recaptação de serotonina, inibidores da monoamino oxidase e antidepressivos atípicos (PORSOLT et al., 1977; STERU et al., 1985; DETKE et al., 1995).

No TNF e no TSC o animal sofre uma espécie de “desespero comportamental” e acredita-se que estes modelos criam uma condição semelhante a depressão humana nos animais. Em ambos os modelos, é observado o tempo de imobilidade do animal na tentativa de fugir do ambiente ameaçador (WILLNER, 1984; STERU et al., 1985).

O TNF tem sido utilizado como uma ferramenta para avaliar drogas com possível efeito antidepressivo (PORSOLT et al., 1978; MATTHEWS et al., 2005). Neste modelo, camundongos são forçados a nadar num ambiente restrito, onde eles não podem escapar e apresentam um comportamento de imobilidade na tentativa de sair do ambiente ameaçador,

logo após, os animais podem se apresentar imóveis como se estivessem flutuando no tanque de água, gerando no animal uma resposta adaptativa ao estresse (PORSOLT et al., 1978; GALEA et al., 2001). Esta imobilidade, referente ao desespero comportamental em animais pretende reproduzir uma condição semelhante à depressão humana nos animais (STERU et al., 1985). O estado de desespero comportamental é inibido por diversos agentes que são utilizados para o tratamento clínico da depressão. De fato, uma significativa correlação foi observada entre a eficácia dos antidepressivos no TNF e no TSC e sua relação com a potência clínica (PORSOLT, 2000).

O TSC também é bastante usado como modelo de depressão para o screening de novos agentes antidepressivos, bem como para investigar o mecanismo de ação dos antidepressivos (CRYAN et al., 2005). No TSC, os camundongos são forçados a ficarem pendurados num espaço confinado, aonde eles não podem escapar. A imobilidade é referida como um desespero comportamental do animal, o que também reproduz uma resposta depressiva semelhante a que ocorre em humanos. Uma redução no tempo de imobilidade indica efeito antidepressivo do fármaco (STERU et al., 1985; WILLNER, 1984; CRYAN et al., 2005). Sendo assim, muitos estudos têm mostrado que ambos os testes, TNF e TSC são bastante sensíveis para a maioria das classes de antidepressivos, incluindo os inibidores seletivos da recaptação de serotonina, antidepressivos tricíclicos e inibidores da monoamino oxidase (DETKE et al., 1995; CRYAN et al., 2005).

Além da hipótese das monoaminas, outros estudos mostram que o estresse está envolvido na patogênese de várias doenças, dentre estas, desordens do comportamento (GILLESPIE & NEMEROFF, 2005; SAPOLSKY et al., 2006). Sendo considerado um disparador importante no desenvolvimento da depressão (BARDEN, 2004). Foi demonstrado que a função do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) se encontra alterado no paciente depressivo, com a atividade deste eixo retornando ao normal depois do tratamento antidepressivo ou eletroconvulsoterapia (SWIERGIEL et al., 2008).

Num estudo realizado com roedores, a exposição destes ao estresse crônico induziu mudanças no comportamento típicas da depressão em seres humanos como a falta de



interesse, anorexia e desânimo (WILLNER, 1997; DUCOTTET et al., 2003). Um estudo realizado com amitriptilina e fluoxetina demonstrou um decréscimo no tempo de imobilidade e aumento da atividade comportamental no Teste do Nado Forçado (TNF) em camundongos (RENERIC & LUCKI, 1998). Foi comprovado também que alterações nos níveis de monoaminas foram encontradas no cérebro dos animais após o TNF, bem como uma ativação do eixo Hipófise-Pituitária-Adrenal (HPA), o que comprova a sensibilidade deste teste em desenvolver uma situação de estresse, semelhante à depressão em humanos.

Desta forma, apesar de ambos os testes, TNF e TSC, terem objetivos comuns, o teste de suspensão da cauda apresenta uma sensibilidade maior para drogas que agem inibindo a recaptação de serotonina (ISRS), como a fluoxetina (CRYAN et al., 2005).

Baseado em estudos que comprovam que o nado forçado é um modelo seguro e comprovado cientificamente para o *screening* de drogas antidepressivas, este teste foi escolhido para a avaliação das doses ideais para o acetato de citronelila, bem como para os testes dos mecanismos de ações e testes neuroquímicos. Inicialmente o acetato de citronelila foi testado nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg, a fim de detectar a melhor dose com efeito antidepressivo. As três doses apresentaram diminuição no tempo de imobilidade em relação ao controle, sendo esta redução dependente da dose, entretanto, foram utilizadas as doses de 50 e 100 mg/kg para a avaliação dos testes de comportamento e neuroquímicos nos animais. Neste teste, o efeito antidepressivo do acetato de citronelila foi comparado com a droga padrão positivo, imipramina (antidepressivo tricíclico), inibidor da recaptação de monoaminas.

Para comprovar o efeito antidepressivo do acetato de citronelila, foi utilizado o teste de suspensão da cauda, desta vez nas doses já selecionadas para o estudo, 50 e 100 mg/kg. Assim como no nado forçado, no teste de suspensão da cauda também ocorreu uma diminuição no tempo de imobilidade do acetato de citronelila e da droga padrão positivo, imipramina, quando comparado ao grupo controle, sendo este efeito dose-dependente. Desta forma podemos ver que o acetato de citronelila diminuiu o tempo de imobilidade semelhante

à droga de referência (padrão positivo), em ambos os testes, nas duas doses avaliadas (50 e 100 mg/kg).

Considerado que um aumento da atividade das monoaminas neurotransmissoras como serotonina e/ou noradrenalina, causa melhora considerável nos sintomas depressivos, diversas pesquisas tem voltado sua atenção para fármacos que promovem o aumento destas monoaminas na fenda sináptica (O'LEARY et al., 2007).

A hipótese das monoaminas se baseia na deficiência de monoaminas para o desenvolvimento da depressão. Esta hipótese inicialmente se baseou na deficiência de noradrenalina (SCHILDKRAUT et al., 1965) e serotonina (COPPEN, 1967), sendo logo depois acrescida do envolvimento da dopamina (RANDRUP et al., 1975). Drogas que inibem a recaptação de serotonina, noradrenalina e dopamina têm sido recentemente desenvolvidas e a maioria dos antidepressivos usados hoje exerce seu efeito bioquímico baseado na regulação sináptica das concentrações de serotonina, noradrenalina e/ou dopamina (ELHWUEGI, 2004; PÁEZ-PEREDA, 2005).

Foi comprovado que a depressão pode estar associada com uma hipofunção do sistema noradrenérgico e que alguns antidepressivos aumentam a disponibilidade de noradrenalina na fenda sináptica (ELHWUEGI, 2004; TAYLOR et al., 2005). Vários estudos mostraram que a depleção de monoaminas, dentre elas, a noradrenalina, está envolvida com a sintomatologia da depressão. Os antidepressivos tricíclicos como a imipramina, utilizados há bastante tempo no tratamento da depressão tem seu mecanismo de ação baseado na inibição da recaptação de noradrenalina e serotonina, principalmente noradrenalina (CRYAN et al., 2002; O' LEARY et al., 2007). Reboxetina e mirtazapina também agem aumentando a disposição de noradrenalina na fenda sináptica (BRUNELLO et al., 2002).

Um estudo realizado com AMPT, um inibidor da tirosina hidroxilase, proporcionou uma rápida depleção de catecolaminas na fenda sináptica, causando sintomas de recaída da depressão em pacientes depressivos tratados com um inibidor da recaptação de noradrenalina. Entretanto, estudos mostraram que o AMPT tem pouco efeito no comportamento de sujeitos

normais, mas quando aplicado a pacientes depressivos, apresenta remissão dos sintomas iniciais da depressão (MILLER et al. 1996; CHARNEY, 1998).

Os estudos experimentais para comprovar a ação de fármacos no sistema noradrenérgico procuram avaliar seu mecanismo de ação, principalmente através da ação de dois receptores. Os receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos localizados na fenda pós-sináptica e os receptores  $\alpha$ -2 adrenérgicos, localizados na fenda pré-sináptica, que são responsáveis pelo controle autoinibitório da liberação de noradrenalina.

A estimulação dos receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos no SNC causa excitação neuronal e suas ações estão fundamentadas no controle de duas ações principais: a motivação do comportamento exploratório e as reações de estresse e inibição comportamental. É necessário um equilíbrio entre esses dois sistemas, a fim de controlar o estresse e o desenvolvimento de comportamentos estressores e depressivos (STONE et al., 2007).

Recentemente foi encontrado que os receptores  $\alpha$ -1 possuem diversos subgrupos e estão localizados em várias regiões cerebrais. Foi demonstrado que a estimulação de receptores  $\alpha$ 1 localizados nas regiões frontais do cérebro de ratos produz alterações do Eletro Encefalograma (EEG) e excitação comportamental nesses animais, sem provocar estimulação da atividade motora, enquanto que a estimulação dos receptores  $\alpha$ 1 em regiões do tronco cerebral produz aumento do comportamento exploratório do animal (BERRIDGE et al., 2003).

Vários estudos tem confirmado a ação da estimulação dos receptores  $\alpha$ 1 na melhora da motivação e ativação comportamental e têm demonstrado que a administração de antagonistas  $\alpha$ -1 reduziram a atividade do hipotálamo e diminuíram o comportamento de motivação em estudos experimentais (LIEBMAN et al., 1982; SAHRAEI et al., 2004). Além disso, estudos tem mostrado que a estimulação do receptor  $\alpha$ 1 tem induzido a neurogênese no hipocampo (SAWAKI et al., 2003; YANPELLAWAR et al., 2004) e a atividade sináptica neuronal (NAKADATE, 2006). Estas alterações em relação aos receptores adrenérgicos  $\alpha$ -1 podem ser comprovadas através de estudos que mostraram que lesões nos receptores noradrenérgicos no

cérebro de ratos produziu um estado de inatividade e catalepsia nos animais, no teste do nado forçado (KOSTOWSKI, 1978). Outro estudo demonstrou que lesões cerebrais com 6-hidroxitriptamina aboliram os efeitos de anti-imobilidade do antidepressivo reboxetina (inibidor seletivo da recaptção de noradrenalina), no teste do nado forçado em camundongos (CRYAN et al., 2002). Isso nos faz perceber a importância e o envolvimento dos receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos na neurobiologia da depressão.

Os receptores  $\alpha$ -2-adrenérgicos também tem sido alvo de estudos nos pacientes com depressão. Sabe-se que a depressão é um transtorno psiquiátrico que gera nos pacientes diversos sintomas desagradáveis como a falta de motivação e a tristeza crônica. Dentre os transtornos psiquiátricos como esquizofrenia, distúrbio bipolar e depressão, a depressão é a que está mais intimamente relacionada com as tentativas de suicídio (PRIGERSON et al., 2003; JOINER et al., 2005). Estudos realizados no cérebro de pacientes depressivos que realizaram suicídio mostraram que os receptores  $\alpha$ -2-adrenérgicos estão aumentados nesses pacientes. Os receptores  $\alpha$ -2 realizam a regulação autoinibitória da liberação de noradrenalina e inibem através da proteína G inibitória a liberação de noradrenalina e 5-HT na fenda sináptica. Um maior número destes receptores no SNC estaria envolvido com a inibição da liberação destes neurotransmissores e com o desenvolvimento da depressão (De PARMENTIER et al., 1997). O tratamento com fármacos antidepressivos leva a uma downregulation dos receptores  $\alpha$ -2-adrenérgicos, causando uma diminuição no número desses receptores (OLMOS et al., 1999; ORDWAY et al., 2003).

Embora a Ioimbina seja um antagonista  $\alpha$ -2-adrenérgico, esta não causa diminuição da imobilidade do animal, o que poderia ocorrer já que este receptor é inibitório e ao ser bloqueado causaria aumento da liberação de noradrenalina pela fenda sináptica. Estudos mostram que a Ioimbina apresenta alta afinidade para receptores  $\alpha$ -2 e, além disso, apresenta afinidade também pelos receptores  $\alpha$ -1 adrenérgicos, receptores serotoninérgicos 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT1D, 5-HT1F e receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub>, o que poderia explicar o aumento do tempo de imobilidade com o uso da Ioimbina (ARTHUR et al., 1993; MILLAN et al., 2000).

Com base na literatura descrita, resolvemos avaliar a ação antidepressiva do acetato de citronelila no sistema noradrenérgico através da investigação do seu envolvimento com os receptores  $\alpha$ -1 e  $\alpha$ -2 adrenérgicos. Em nosso estudo o acetato de citronelila teve seu efeito antidepressivo bloqueado pelo pré-tratamento com prazosina (antagonista  $\alpha$ -1-adrenérgico) e também pela ioimbina (antagonista  $\alpha$ -2-adrenérgico), em ambas as doses (50 e 100 mg/kg), sugerindo que o acetato de citronelila interage com os receptores do sistema noradrenérgico,  $\alpha$ -1 e  $\alpha$ -2, para exercer seus efeitos.

O envolvimento do sistema dopaminérgico na depressão tem sido essencialmente estudado através de substâncias agonistas que aumentam a atividade dopaminérgica, resultando em efeito antidepressivo nos modelos animais de depressão (BASSO et al., 2005; RENARD et al., 2001). Um estudo realizado *post-mortem*, em sujeitos com depressão severa, mostrou uma redução nas concentrações dos metabólitos de dopamina no fluido cérebro-espinhal e nas regiões cerebrais responsáveis pela motivação (PAPAKOSTAS, 2006). Estudos de neuroimagem confirmaram hipóteses que a depressão maior está associada com a transmissão reduzida de dopamina, possivelmente refletida por um aumento compensatório de receptores D2 dopaminérgicos (BASSO et al., 2005; PAPAKOSTAS et al., 2006; MACHADO et al., 2007).

Pesquisas tem mostrado que a deficiência de dopamina no sistema mesolímbico é um forte indício para explicar a etiologia da depressão e está relacionado com o surgimento de sintomas como, por exemplo, anedonia, baixa motivação e disforia (HEINZ et al., 1994; DUNLOP & NEMEROFF, 2007). Dados clínicos sugerem que a depressão está relacionada com uma redução nos níveis de dopamina e seus metabólitos como o ácido homovalínico no cérebro de pacientes depressivos e suicidas comparados aos indivíduos normais (MITANI et al., 2006; PAPAKOSTAS, 2006; SHER et al., 2006).

Estudos pré-clínicos mostraram que os agonistas dos receptores para dopamina aumentaram o efeito de anti-imobilidade dos animais no teste do nado forçado (JOCA et al., 2000). Muitas drogas antidepressivas como os inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRS), imipramina (um antidepressivo tricíclico) e bupropiona (um antidepressivo

atípico que inibe a recaptação de dopamina) ativam receptores de dopamina D1 e D2 (RENARD et al., 2001; YAMADA et al., 2004). Em um estudo realizado com o extrato de *Rosmarinus officinalis* (o qual apresentou um possível efeito antidepressivo no TNF), mostrou que o antagonista do receptor D1, SCH23390, e o antagonista do receptor D2, sulpirida, foram capazes de reverter o efeito antidepressivo do extrato de *Rosmarinus officinalis* no teste do nado forçado, mostrando que ambos os receptores dopaminérgicos D1 e D2, desenvolvem um papel importante na fisiopatologia da depressão (YAMADA et al., 2004; BASSO et al., 2005; PAPAKOSTAS, 2006; MACHADO et al., 2007;).

Outro estudo realizado por Binfaré et al., (2010) mostraram que o efeito antidepressivo da melatonina no teste de suspensão da cauda é mediado pela interação com o sistema dopaminérgico, através da ativação dos receptores D1 e D2. Além disso, artigos sugerem que a severidade da depressão está inversamente proporcional aos níveis de dopamina do sistema nervoso central (PAPAKOSTAS, 2006).

Em nosso estudo, a investigação do sistema dopaminérgico foi realizada através do pré-tratamento dos animais com antagonista D1, SCH23390, ou D2, sulpirida antes da administração do acetato de citronelila no nado forçado, revelando com o efeito antidepressivo do acetato de citronelila foi impedido pelo SCH23390 em ambas as doses, 50 e 100 mg//kg, sugerindo um envolvimento do acetato de citronelila com o receptor D1. Entretanto, a sulpirida impediu o efeito antidepressivo do acetato de citronelila apenas na dose de 100 mg/kg, mas não na dose de 50 mg/kg. Isso sugere que o efeito antidepressivo do acetato de citronelila no receptor D2 é dose-dependente. Como o receptor D2 apresenta localização pré e pós-sináptica, este resultado sugere que o acetato de citronelila na dose de 100 mg/kg age nos receptores D2 pós-sinápticos, já que o receptor D2 pré-sináptico tem ação inibitória e causaria uma diminuição do efeito antidepressivo.

O sistema serotoninérgico também está implicado na etiologia da depressão. A maior evidência disto consiste no alívio dos sintomas de depressão causados pelo uso dos inibidores da recaptação de serotonina. Estudos mostram que a depleção do triptofano confirma a relação entre a serotonina e as desordens psiquiátricas (GOODWIN & JAMISON, 1990;

TAYLOR et al., 2005; YI et al., 2008). A serotonina (5-HT) está implicada numa variedade de alterações psicológicas e comportamentais, incluindo a modulação dos estados de humor. Pesquisas recentes mostram que o aumento cerebral de serotonina (5-HT) é efetivo em atenuar sintomas da depressão (DELGADO & MORENO, 1999; NUTT, 2008) e exercem um importante papel na regulação neural (DUMAN et al., 1997).

As causas da depressão tem sido atribuídas em parte a desregulação de uma ou mais monoaminas na sinapse (PRANGE et al., 1974), principalmente a serotonina (5-HT) (NUTT, 2008), sendo bastante investigado o importante papel da serotonina na mediação dos efeitos antidepressivos de drogas (MILLAN, 2004; PAPAKOSTAS, 2006). A maior parte dos antidepressivos prescritos atualmente para o tratamento da depressão afeta diretamente a concentração de serotonina (5-HT) no cérebro inibe a recaptção de serotonina (5-HT) e interage com vários receptores serotoninérgicos, dentre eles, 5-HT1A e 5-HT2 (KREISS & LUCKI, 1995; CRYAN et al., 2005).

Para avaliar o efeito da depleção de serotonina no SNC, vários autores têm utilizado um inibidor da enzima triptofano hidroxilase (PCPA), enzima que está envolvida na síntese do neurotransmissor serotonina. A administração diária do PCPA por quatro dias consecutivos reduz os estoques de serotonina por volta de 60% em camundongos, entretanto, não afeta os níveis de outras monoaminas como noradrenalina e dopamina (REDROBE et al., 1998). O efeito do pré-tratamento com PCPA em camundongos bloqueou completamente o efeito antidepressivo induzido por inibidores da recaptção de serotonina, como fluoxetina e o citalopram no Teste de Suspensão da Cauda (TSC), mas não alterou o efeito antidepressivo dos inibidores da recaptção de noradrenalina como a desipramina e a reboxetina (O'LEARY et al., 2007). Também foi confirmado que o tratamento prévio com o PCPA inibiu completamente o efeito antidepressivo da fluoxetina usada como controle positivo em vários estudos acerca do efeito antidepressivo de drogas.

Em nosso estudo, o pré-tratamento com PCPA, por quatro dias consecutivos foi efetivo em causar o bloqueio do efeito de anti-imobilidade do acetato de citronelila no nado forçado, nas doses estudadas (50 e 100 mg/kg). Isto sugere que o efeito de anti-imobilidade do

acetato de citronelila pode ser dependente da disposição de 5-HT na fenda sináptica. Assim como observado em outros estudos com o PCPA, este sozinho não alterou o tempo de imobilidade dos animais no nado forçado e bloqueou o efeito da fluoxetina (ISRS), revertendo seu efeito de anti-imobilidade.

Os receptores serotoninérgicos estão bem distribuídos em todo o SNC e estão divididos em 7 famílias de receptores 5-HT (5-HT1A, 5-HT2A/2C, 5-HT2B, 5-HT3, 5-HT4, 5-HT6, 5-HT7) caracterizados e abundantemente distribuídos nas regiões cerebrais (HOCHMAN et al., 2003; BOCKAERT et al., 2008), sendo os receptores 5-HT1A, 5-HT2A/2C e 5-HT3 amplamente estudados para alvo de drogas antidepressivas (CRYAN et al., 2005; BRÜNING et al., 2008; SAVEGNAGO et al., 2007; MACHADO et al., 2007; POSSER et al., 2009). A modulação dos receptores serotoninérgicos tem sido implicada no mecanismo de ação de diversas classes de drogas antidepressivas.

Estudos pré-clínicos sugerem que o receptor pós-sináptico 5-HT1A desenvolve um papel importante na ação antidepressiva de fármacos (BLIER & DE MONTIGNY, 1994), e estes receptores tem sido implicados nas desordens afetivas (AGHAJANIAN et al., 1990). Os receptores 5-HT1A estão localizados a nível pré-sináptico no núcleo da rafe, e pós-sináptico na região límbica e cortical. Os receptores 5-HT1A pré-sinápticos agem inibindo a saída de 5-HT dos neurônios, e fazem a regulação autoinibitória da liberação de serotonina (BLIER & WARD, 2003); Um estudo mostrou que a depressão maior está associada com uma redução de receptores 5-HT1A a nível pós-sináptico (SARGENT et al., 2000).

Pesquisas realizadas em seres humanos mostraram, através da tomografia com emissão de pósitrons, que ocorre um decréscimo na ligação do receptor 5-HT1A nos pacientes depressivos, em múltiplas áreas do cérebro, incluindo o córtex frontal e o hipocampo (DREVETS et al., 1999; SARGENT et al., 2000). Isto comprova que a deficiência na função e expressão de receptores 5-HT1A é um importante fator no desenvolvimento da depressão (LEITCH et al., 2003). O papel do receptor 5-HT1A também está relacionado ao mecanismo de ação de várias classes de drogas antidepressivas, como os tricíclicos, inibidores da recaptação de serotonina e inibidores da MAO (HENSLER, 2002), inclusive a ação



antidepressiva de algumas plantas tem mostrado relação com a ativação deste receptor (KIM et al., 2007; MACHADO et al., 2007). Os receptores 5-HT1A parecem ser necessários para os efeitos dos agentes antidepressivos como os ISRS em ambos os tratamentos, agudo e crônico, em modelos de estudo experimentais (MAYORGA et al., 2001). Estudo com ISRS, como a fluoxetina e a paroxetina falharam em diminuir o tempo de imobilidade no Teste de Suspensão da Cauda (TSC) em camundongos, com mutação dos receptores 5-HT1A e 5-HT1B. Estes dados sugerem que a presença dos receptores 5-HT1A é importante para a expressão de respostas comportamentais antidepressivas dos ISRS (MAYORGA et al., 2001; SHARIFI et al., 2013).

O NAN-190 é um composto que tem afinidade pelos receptores 5-HT1A e tem sido utilizado para a avaliação do envolvimento deste receptor no mecanismo antidepressivo de novos fármacos (GLENNON et al. 1988; HJORTH & SHARP, 1990; CHOJNACKA-WOJCIK et al., 1991). De fato, substâncias que têm sido estudadas como antidepressivos como é o caso do agamantine e do tetralin (8-OH-DPAT) tiveram seu efeito de anti-imobilidade bloqueado pelo NAN-190 no teste do nado forçado em camundongos. Resultado similar foi observado com a fluoxetina (ISRS), que teve seu efeito de anti-imobilidade revertido pela ação do NAN-190 no nado forçado (REDROBE et al., 1990). Estudos realizados em nosso laboratório com as Riparinas II e III (TEIXEIRA et al. e MELO et al., 2011) e com o bis-eugenol (AMARAL et al., 2012) mostraram que estas substâncias possuem uma ação antidepressiva em camundongos que foi demonstrada através do teste do nado forçado. Estas substâncias tiveram seu efeito antidepressivo bloqueado pelo pré-tratamento com o NAN-190, assim como a fluoxetina (ISRS), utilizada como droga padrão.

Em nossos resultados, observamos que o efeito de anti-imobilidade do acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg) não teve seu efeito de anti-imobilidade revertido pelo pré-tratamento com o NAN-190 (antagonista 5-HT1A), ao contrário da fluoxetina (ISRS) que teve seu efeito de anti-imobilidade totalmente revertido pelo pré-tratamento com o NAN-190. Estes resultados sugerem que a ação do acetato de citronelila no sistema serotoninérgico independe da participação do receptor 5-HT1A.

Estudos clínicos e pré-clínicos têm mostrado um importante papel dos receptores 5-HT<sub>2</sub> na fisiopatologia da depressão bem como a ação de muitos antidepressivos (CRYAN & LUCKI, 2000; BOOTHMAN et al., 2006; WANG et al., 2008), mostrando que a ativação dos receptores 5-HT<sub>2</sub> está amplamente implicada com a regulação das desordens de humor (CELADA et al., 2004).

Um estudo realizado com um agonista parcial do receptor 5-HT<sub>2A</sub>, *R(-)-1-(2,5-dimetoxi-4-iodofenil)-2-aminopropano HCl* (DOI), mostrou que há uma relação deste receptor com o aumento do efeito antidepressivo de alguns compostos antidepressivos (KHISTI & HOPDE, 2000; ZOMKOWSKI et al., 2004). Estudos experimentais revelaram que o pré-tratamento com ketanserina (antagonista 5-HT<sub>2A</sub>) preveniu o efeito de anti-imobilidade do extrato de plantas como *Rosmarinus officinalis*, agmatine (ZOMKOWSKI et al., 2004) e *Schinus molle* (MACHADO et al., 2007). A ketanserina apresenta uma afinidade maior pelos receptores 5-HT<sub>2A</sub> do que por outros subtipos de receptores 5-HT<sub>2</sub> podendo ser útil para a avaliação deste receptor (BAXTER et al., 1995; CARDOSO et al., 2009).

Neste estudo, encontramos que o efeito antidepressivo do acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg) no nado forçado foi bloqueado pelo pré-tratamento com ritanserina (antagonista 5-HT<sub>2A</sub>), assim como a fluoxetina (ISRS), sugerindo que o efeito de anti-imobilidade do acetato de citronelila depende se sua ação nos receptores 5-HT<sub>2A</sub> no sistema serotoninérgico.

Assim como os receptores 5-HT<sub>2A</sub> e 5-HT<sub>2C</sub>, os receptores 5-HT<sub>3</sub> também vêm sendo alvo de estudos para fármacos antidepressivos. Um estudo realizado com o composto *m*-trifluorometil-difenil diselenide [(*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub>], demonstrou que o pré-tratamento com ondasetron, um antagonista seletivo do receptor 5-HT<sub>3</sub>, bloqueou a atividade antidepressiva do desse composto. Estudos prévios também mostraram um bloqueio do efeito antidepressivo do difenildiselenide, um análogo do (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> pelo ondasetron (SAVEGNAGO et al., 2007).

Foi demonstrado que existem diferentes subtipos de receptores 5-HT<sub>3</sub>, com localização pré e pós-sináptica, o que foi comprovado através de estudos que mostraram que a

supressão da atividade do receptor 5-HT<sub>3</sub> contribui para a ação de alguns antidepressivos (EISENSAMER et al., 2003). Foi comprovado que a administração de antagonistas dos receptores 5-HT<sub>3</sub> administrados de forma aguda diminuiu a duração da imobilidade dos camundongos nos testes do nado forçado (TNF) (BRAVO & MASWOOD, 2006). Agonistas dos receptores 5-HT<sub>3</sub> pré-sinápticos atenuaram o decréscimo na imobilidade produzida por imipramina, desipramina e mianserina, já os antagonistas dos receptores 5-HT<sub>3</sub> pré-sinápticos, potencializaram o efeito antidepressivo de diversos ISRS no nado forçado em camundongos (NAKAGAWA et al., 1998).

Nossos resultados mostraram que o acetato de citronelila (500 e 100 mg/kg) assim como a fluoxetina, tiveram seu efeito antidepressivo prevenido pela administração de ondansetron (antagonista 5-HT<sub>3</sub>). Este efeito sugere que provavelmente o acetato de citronelila exerce sua ação através da ativação dos receptores 5-HT<sub>3</sub> pós-sinápticos, localizados mais especificamente no hipocampo, uma vez que a estimulação dos receptores 5-HT<sub>3</sub> pré-sinápticos ocasionaria um efeito de imobilidade, o que não foi observado na administração do acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg) sozinho.

Apesar do teste do nado forçado apresentar uma alta efetividade para screening de drogas antidepressivas, os resultados neste teste podem apresentar um resultado falso positivo, com uma diminuição do tempo de imobilidade por se tratar de um fármaco psicoestimulante, e não por ter uma ação antidepressiva. Baseado nisso, várias pesquisas com substâncias antidepressivas realizam testes a fim de avaliar a atividade locomotora dos animais. Com o intuito de detectar se o acetato de citronelila causa um efeito psicoestimulante nos camundongos, foi realizada a investigação da atividade locomotora através do teste do campo aberto. Este teste permite ao animal explorar um ambiente novo, sendo um teste bastante utilizado para descrever o comportamento dos animais numa situação nova, que possa gerar alguma reação de estresse (BORSINI & MELI, 1988; BOURIN et al., 2001). Um aumento da atividade locomotora do animal, representado por um maior número de cruzamentos do animal, no campo aberto, indica um efeito estimulante. Já uma diminuição do número de cruzamentos do animal, bem como do número de vezes que este se levanta verticalmente, pode indicar efeito sedativo (PRUT & BELZUNG, 2003).

No teste do campo aberto, os animais tratados com acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg) não apresentaram alteração na atividade locomotora comparado aos animais controle, enquanto o diazepam (benzodiazepínico), droga que causa relaxamento muscular, provocou diminuição da atividade locomotora dos camundongos neste teste. Isto nos sugere que o efeito antidepressivo do acetato de citronelila não está relacionado ao aumento da atividade motora dos animais.

Durante o teste do campo aberto, os animais também são avaliados quanto aos movimentos estereotipados, *grooming* e *rearing*. Estudos mostram que a atividade locomotora tem uma relação maior com os receptores dopaminérgicos do tipo D<sub>1</sub> (STARR et al., 1989), já os movimentos estereotipados tem maior envolvimento dos receptores dopaminérgicos do tipo D<sub>2</sub> (USHIJIMA et al., 1995). Fármacos que agem como agonistas dos receptores D<sub>2</sub> apresentam um efeito de diminuição do *grooming* e do *rearing*, sendo este efeito relacionado com o aumento da ansiedade no animal, ou seja, drogas com ação ansiolítica teriam a tendência a diminuir *grooming* e *rearing*, já as drogas com atividade ansiogênica, teriam a tendência de aumentar estes comportamentos (DUNN et al., 1987; REX et al., 1996).

Em nosso estudo, o acetato de citronelila, nas doses de 50 e 100 mg/kg, apresentou uma tendência a diminuir o número de *grooming* e *rearing*, mas não diminuiu de forma significativa estes comportamentos, ao contrário do diazepam (fármaco ansiolítico), que diminuiu significativamente *grooming* e *rearing* quando comparado ao controle.

O *grooming*, que é o movimento de auto-limpeza do animal, têm apresentado resultados divergentes por alguns autores em se tratando de ansiedade, sendo seu aumento relacionado principalmente com o aumento da ansiedade (KALUEFF & TUOHIMAA, 2005; FILE et al., 2006), sendo a dopamina o principal neurotransmissor envolvido na modulação deste comportamento (DRAGO et al., 1999; COOLS et al., 2001). Já o *rearing* demonstra a atividade exploratória do animal e também está relacionado com o aumento da transmissão da dopamina no SNC e sua diminuição pode ocorrer com o uso de fármacos ansiolíticos (STOUT, 1994; SWANSON et al., 1997).

De uma forma geral, no teste do campo aberto o acetato de citronelila não alterou a atividade locomotora dos animais e não alterou os comportamentos de *grooming* e *rearing*, o que poderia sugerir um não envolvimento dos receptores dopaminérgicos, entretanto, ao avaliarmos o envolvimento do sistema dopaminérgico no mecanismo de ação do acetato de citronelila durante o teste do nado forçado, observamos que houve um envolvimento dos receptores dopaminérgicos do tipo D<sub>1</sub>, já que o acetato de citronelila teve seu efeito de anti-imobilidade bloqueado pelo uso do SCH23390 (antagonista dopaminérgico D<sub>1</sub>), já o receptor dopaminérgico D<sub>2</sub> também apresentou envolvimento no mecanismo de ação do acetato de citronelila, sendo este efeito dose-dependente, uma vez que, o acetato de citronelila na dose de 100 mg/kg teve seu efeito de anti-imobilidade revertido pela sulpirida (antagonista dopaminérgico D<sub>2</sub>), já a dose de 50mg/kg não teve reversão do seu efeito com o uso do antagonista D<sub>2</sub>.

Como a administração de algumas drogas antidepressivas pode reduzir também os estados de ansiedade e causar um efeito neuroprotetor no paciente (GRIEBEL et al., 1994; XU et al., 2003), optamos por avaliar se o acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg) apresenta alguma ação ansiolítica nos camundongos. Para a avaliação da atividade ansiolítica optamos por utilizar o teste do *Plus maze*, este modelo é amplamente usado em modelos experimentais para observar a atividade ansiolítica de várias drogas. Neste teste o animal é colocado em um aparato composto de dois braços abertos e dois braços fechados, a fim de observar o comportamento do animal. Caso o animal apresente um tempo de permanência maior nos braços abertos e um maior número de entradas nos braços abertos, isto sugere que se trata de uma droga com atividade ansiolítica (MONTGOMERY, 1958; PELOW et al., 1995; RODGERS et al., 1997).

O teste do *plus maze* ou labirinto em cruz elevado (LCE) é um modelo para estudo de fármacos com atividade ansiolítica, bastante utilizada como ferramenta para detectar compostos com ação no receptor GABA<sub>A</sub>. Os receptores GABA<sub>A</sub> agem através do neurotransmissor GABA que tem uma ação inibitória sobre o sistema nervoso central, sendo alvo para drogas com ação ansiolítica e sedativa (OLSON, 2002).

Em nosso estudo o acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg) não alterou o número de entradas (NEBA), percentagem de entradas (PEBA) e percentagem de tempo (PTBA) nos braços abertos em relação ao controle, já o tempo de permanência (TPBA) nos braços abertos, embora tenha apresentado um pequeno aumento na dose do acetato de citronelila 50 mg/kg, quando comparado ao controle, não foi considerado significativo. Entretanto o diazepam, droga com atividade ansiolítica e utilizada como padrão positivo neste teste, apresentou aumento de todos os parâmetros avaliados no teste do *plus maze*, quando comparado ao controle, comprovando sua atividade ansiolítica. Diante disso foi observado que o acetato de citronelila (50 e 100mg/kg), apesar de apresentar resultados que sugerem sua atividade antidepressiva no teste do nado forçado, não apresentou atividade ansiolítica no teste do *plus maze* e nem atividade ansiogênica, efeito este que se refere à diminuição no número de entradas e tempo nos braços abertos (PELLOW et al., 1985).

Estudos mostram que drogas que agem no sistema noradrenérgico e que ativam os receptores  $\alpha$ -1 adrenérgicos podem desencadear comportamentos aversivos, seguidos de ansiedade e estresse devido ao estímulo da secreção do hormônio corticotrófico (CRF) (YANG et al., 1990; KISS & AGUILERA, 2000; GRAHN et al., 2002; BERRIDGE & WATERHOUSE, 2003). Em nosso estudo o acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg) demonstrou uma atividade antidepressiva que sugere um envolvimento com o sistema noradrenérgico, podendo está relacionada com uma ativação do receptor  $\alpha$ -1, já que seu efeito de anti-imobilidade foi inibido pela prazosina (antagonista do receptor  $\alpha$ -1). Os resultados mostrados no teste do *plus maze* com o acetato de citronelila (50 e 100 mg/k) nos trazem um ponto positivo, já que nossa substância apesar do envolvimento com os receptores  $\alpha$ -1 adrenérgicos, não desenvolveu comportamento ansiogênico nos camundongos no teste do *plus maze*.

A fim de avaliar se o acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg) possui atividade sedativa ou hipnótica, foi realizado o teste do tempo de sono induzido por pentobarbital. Este teste avalia se determinada substância apresenta efeito sinérgico em aumentar a atividade sedativo-hipnótica do pentobarbital. Algumas drogas que não apresentam efeitos centrais como

adrenalina e histamina, podem apresentar também efeito sinérgico sobre o tempo de sono induzido pelo pentobarbital (RILEY & SPINKS, 1958; RILEY et al., 1958).

Em nossos resultados encontramos que o acetato de citronelila nas doses estudadas (50 e 100 mg/kg) não apresentou alterações em relação a duração do sono dos animais, entretanto, na dose de 50 mg/kg, o acetato de citronelila diminuiu a latência para o sono na dose de 50 mg/kg. Já o diazepam, droga utilizada como padrão, diminuiu a latência e aumentou a duração do sono nos animais. Isto sugere que o acetato de citronelila não possui ação sedativa e nem hipnótica nos animais, nas doses utilizadas neste estudo. Estes resultados corroboram com o teste do campo aberto, o qual não mostrou atividade sedativa do acetato de citronelila, já que não diminuiu a atividade locomotora dos animais.

Para avaliar um possível efeito anticonvulsivante do acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg), foi realizado o teste da convulsão induzida por pentilenotetrazol (PTZ). O PTZ é bastante utilizado para estudos de screening, a fim de detectar novas drogas anticonvulsivantes (LÖSCHER & SCHMIDT, 2002). As convulsões ocorrem quando existe um desequilíbrio entre a excitação e a inibição neuronal. Geralmente as drogas anticonvulsivantes exercem seu mecanismo de ação através da modulação de receptores para canais iônicos voltagem-dependentes, como os canais de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{++}$ , ou através do aumento da ação inibitória do neurotransmissor GABA, podendo atuar também inibindo a ação excitatória mediada pelo glutamato (MELDRUM, 1996; WHITE, 1997). O PTZ apresenta uma ação convulsivante através da inibição dos canais iônicos para o neurotransmissor GABA, mais especificamente, os receptores  $\text{GABA}_A$ . Desta forma, o PTZ permite a avaliação de drogas com atividade anticonvulsivante que agem neste receptor, como é o caso dos benzodiazepínicos, por exemplo, o diazepam (GOODCHILD, 1993; KUPFERBERG & SCHMUTZ, 1997).

Além do neurotransmissor GABA, outros neurotransmissores podem está envolvidos na fisiopatologia da convulsão. Estudos mostram que o sistema dopaminérgico pode agir na manutenção ou propagação da epilepsia (MARINHO et al., 1997, BARONE et al., 1992). Outros estudos mostraram que a serotonina (5-HT) também pode está envolvida na

manutenção e/ou propagação da epilepsia através da estimulação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> no sistema nervoso central (PEROUTKA, 1988; JANUSZ & KLEINROK, 1989). Já o sistema noradrenérgico também tem demonstrado um envolvimento nas epilepsias do lobo temporal em seres humanos (SHIPLEY et al., 1999).

Como vimos anteriormente, o mecanismo de ação do acetato de citronelila, sugere um envolvimento com os sistemas noradrenérgico, dopaminérgico e serotoninérgico no sistema nervoso central de camundongos. Embora a ação desses neurotransmissores no SNC tenha um envolvimento com a propagação e/ou manutenção das convulsões, em nosso estudo encontramos que o acetato de citronelila nas doses de 50 e 100 mg/kg não alterou o tempo de latência para a primeira convulsão e não alterou o tempo de morte dos animais, quando comparado ao grupo controle.

Já o diazepam (benzodiazepínico), que exerce ação sobre os receptores GABA<sub>A</sub>, aumentou o tempo de latência para a primeira convulsão, além disso, a taxa de sobrevivência nos animais tratados com o diazepam foi de 100%, ao contrário do acetato de citronelila, em que não houve sobrevivência dos animais em nenhuma das doses estudadas.

Com isso podemos concluir que o acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg) não exerce efeito anticonvulsivante mediado pelo receptor GABA<sub>A</sub>, o que corrobora com os dados apresentados nos teste do campo aberto e plus maze, os quais não evidenciaram atividade ansiolítica do acetato de citronelila, que poderia ter ocorrido caso esta substância tivesse uma ação sobre estes receptores. Além disso, apesar de sua possível ação sobre a neurotransmissão das monoaminas, estes efeitos não foram capazes de propagar e/ou atenuar as convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol (PTZ) nos camundongos.

Com o intuito de colaborar com os achados acerca do mecanismo de ação do acetato de citronelila no teste do nado forçado, resolvemos quantificar os níveis de monoaminas e seus metabólitos no corpo estriado dos camundongos tratados com acetato de citronelila de forma aguda, nas doses de 50 e 100 mg/kg (v.o.). Diversos estudos mostram que ocorre uma diminuição dos níveis de monoaminas no cérebro de pacientes com depressão



(SCHILDKRAUT et al., 1965; RANDRUP et al., 1975; ELHWUEGI, 2004). O aumento nos níveis de monoaminas, ocasionado pelo tratamento com antidepressivos melhora os sintomas dos transtornos de humor, mais especificamente da depressão. Fármacos do grupo dos antidepressivos tricíclicos, inibidores seletivos da recaptção de serotonina e inibidores da monoaminoxidase (MAO), exercem seus efeitos antidepressivos aumentando os níveis de monoaminas (PÁEZ-PEREDA, 2005; CHEN & SKOLNICK, 2007).

Semelhante ao que foi encontrado na atividade de outros fármacos antidepressivos, neste estudo o acetato de citronelila aumentou os níveis de noradrenalina no corpo estriado dos camundongos nas doses de 50 e 100mg/kg, e aumentou os níveis de dopamina e serotonina na dose de 100 mg/kg, quando comparados ao grupo controle.

Pesquisas mostraram que o teste do nado forçado diminui os níveis de serotonina (5-HT) no córtex frontal, hipocampo e corpo estriado, além de diminuir os níveis de 5-HIAA, um metabólito da serotonina, nessas áreas cerebrais comparado a grupos controle não expostos ao nado forçado (HEINE et al., 2004). Como o teste do nado forçado (TNF), é um modelo comportamental amplamente utilizado para estudo de fármacos antidepressivos, estas pesquisas nos mostram que ao diminuir os níveis de monoaminas, como a serotonina, o TNF contribui para desenvolver sintomas depressivos em camundongos.

Estudos com substâncias antidepressivas (SHEN et al., 2009) mostraram que o 5-HIAA, um metabólito da serotonina (5-HT), e o DOPAC, um metabólito de dopamina (DA) estavam diminuídos no cérebro de animais tratados, quando comparado ao grupo controle. E que os níveis de serotonina e noradrenalina se encontram aumentados no cérebro de camundongos submetidos ao nado forçado e que receberam tratamento com fármacos antidepressivos, como a fluoxetina (SCHWARTING & HUSTON, 1992; WANG et al., 2008).

Assim como na literatura, nossos achados mostraram uma diminuição nos níveis dos metabólitos para dopamina, HVA e DOPAC, e do metabólito da serotonina, 5-HIAA nos animais tratados com acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg) de forma aguda, no teste do nado

forçado. O que demonstra que há um aumento dos níveis de monoaminas livres na fenda sináptica, já que seus metabólitos encontram-se diminuídos. Semelhante ao que ocorreu com o acetato de citronelila, estudos realizados com Venlafaxina e com outros antidepressivos, através da análise do fluido cerebrospinal de pacientes com depressão unipolar, demonstrou que ocorre um aumento nos níveis de monoaminas, como 5-HT, DA e NE e uma diminuição nos níveis dos metabólitos 5-HIAA, HVA, DOPAC e MHPG no fluido cerebrospinal destes pacientes (De BELLIS et al., 1993; LITTLE et al., 1999; GEX-FABRY et al., 2002) . Outro estudo realizado através da análise do tecido cerebral de ratos que receberam Venlafaxina e fluoxetina, mostrou que houve um aumento nos níveis de monoaminas (5-HT, NE e DA) e uma diminuição de seus metabólitos (5-HIAA, HVA, DOPAC e MHPG) após 2 semanas de tratamento com estes fármacos (FENLI et al., 2013). Isto indica que os antidepressivos agem nos níveis de monoaminas e na metabolização destas para exercerem seus efeitos antidepressivos.

A fisiopatologia da depressão, dentre outras causas, tem evidenciado um envolvimento do estresse oxidativo com o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos como a depressão, e drogas capazes de regular a atividade antioxidante tem apresentado efeito antidepressivo (ABDALLA et al., 1986; BILICI et al., 2001; LI et al., 2003). As espécies reativas de oxigênio (EROs), conhecidas como radicais livres, estão envolvidas com o surgimento de várias doenças, principalmente no sistema nervoso central (SNC), devido à vulnerabilidade deste tecido à ação do estresse oxidativo (PEET et al., 1998; BILICI et al., 2001; EREN et al., 2007). Pesquisas tem mostrado um envolvimento entre a depressão e o estresse oxidativo e sua relação com o efeito antidepressivo de várias drogas (HERKEN et al., 2007).

Os Radicais livres são espécies químicas reativas produzidas durante o estresse oxidativo como a peroxidação lipídica da membrana celular (OZCAN et al., 2004). Quando os radicais livres são produzidos em excesso no cérebro e não são controlados pelos sistemas de defesa enzimáticos ocorre dano da membrana celular, bem como dano ao DNA celular, podendo levar à morte neuronal (PAMPHLETT et al., 1998; NIEBROJ-DOBOSZ et al., 2004). Os radicais livres podem ser controlados pela ação de enzimas antioxidantes como a

superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathiona peroxidase (GPx) e através do controle dos níveis de peroxidação lipídica (KULOGLU et al., 2002).

Estudos clínicos tem mostrado que alterações na atividade da SOD e nos níveis de malonildialdeído (MDA) estão relacionadas com a depressão maior (LUKASH et al., 2002; KHANZODE et al., 2003; OZCAN, 2004; HERKEN et al., 2007). Estudos experimentais mostram que o estresse oxidativo que ocorre na depressão leva a diminuição nos níveis de glutathiona peroxidase e aumento nos níveis de MDA (OZCAN et al., 2004; SARANDOL et al., 2007). Outro estudo que avaliou um modelo de depressão em ratos, através da indução do estresse no crônico nos animais, mostrou que ocorreu um crescimento significativo na atividade de SOD no cérebro destes animais (WANG et al., 2005). Bilici et al., (2001) evidenciaram que pacientes com depressão maior tiveram os níveis de marcadores para estresse oxidativo significativamente revertidos com o uso de drogas antidepressivas.

Baseado nesses achados da literatura que demonstram um envolvimento entre o estresse oxidativo e a depressão e na relação de benefícios das drogas antidepressivas em reverter o dano oxidativo como ferramenta para o auxílio no tratamento da depressão, optamos em nosso estudo por avaliar a capacidade do acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg) em atuar como substância antioxidante em áreas cerebrais de extrema importância na fisiopatologia da depressão como, o corpo estriado, córtex pré-frontal e hipocampo. O teste do nado forçado causa uma situação de estresse no animal que pode ser comprovado através dos níveis de dano oxidativo no cérebro de camundongos, com aumento da produção de malonildialdeído (MDA) e aumento nos níveis de espécies reativas de nitrogênio (ERNs), levando também a uma diminuição na atividade de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD) e a glutathiona peroxidase (GSx) (AKHTAR et al., 2005; ABDEL-WAHAB et al., 2011).

A glutathiona redutase é uma enzima antioxidante que tem sido estudada em pacientes deprimidos. A glutathiona (GSH) é formada no fígado a partir de três aminoácidos, glicina, glutamina e cisteína, sendo três as suas funções principais: poderoso antioxidante que protege as células contra os danos provocados pelos radicais livres e que recicla a vitamina C e E, de

modo que elas se tornam novamente ativas como antioxidantes, está envolvida com a linfoproliferação e age na proteção hepatocelular. Estudos pré-clínicos mostraram que há uma diminuição nos níveis de GSH em modelos animais para depressão, além disso estudos clínicos em mulheres deprimidas mostraram uma diminuição nos níveis sanguíneos de glutathione (KODYDKOVÁ et al. 2009; MAES et al., 2011).

Assim como a catalase, a glutathione peroxidase atua na remoção do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), produto que é tóxico para as células. Para que ocorra a retirada dos peróxidos da célula, é necessário que a glutathione peroxidase ( $GP_x$ ) tenha um cofator para fazer a detoxificação deste radical livre. Este cofator é a chamada glutathione reduzida (GSH), presente na mitocôndria e citoplasma das células neuronais (HECK et al., 2003; GYSIN et al., 2007).

Um estudo mostrou que o tratamento agudo com fluoxetina reduziu a atividade de glutathione peroxidase ( $GP_x$ ) no hipocampo de camundongos submetidos ao estresse, porém o tratamento crônico aumentou os níveis de GSH no hipocampo e córtex pré-frontal dos camundongos, também submetidos ao estresse (LOBATO et al., 2010). Estudos experimentais também demonstraram que a venlafaxina diminuiu os níveis de malondialdeído (MDA) e de nitrito, e aumentou o potencial antioxidante através do aumento da atividade da glutathione reduzida (GSH) no hipocampo de animais que foram submetidos ao estresse. Outra pesquisa que acompanhou a administração de quatro drogas diferentes (fluoxetina, sertralina, fluvoxamina e citalopram) durante 12 semanas de tratamento, mostrou que a atividade antioxidante da glutathione peroxidase ( $GP_x$ ) e que os níveis de malondialdeído (MDA) retornaram a valores normais no plasma dos pacientes com depressão (XU et al., 2003; ZAFIR et al., 2009; NOVIO et al., 2011; BEHR et al., 2012).

Sendo assim, em nosso estudo, optamos por avaliar os níveis de glutathione reduzida (GSH) nas áreas cerebrais (hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal) de animais submetidos ou não ao estresse pelo nado forçado. Em nossos resultados encontramos que a indução do estresse pelo nado forçado levou a uma diminuição significativa dos níveis de GSH nas três áreas cerebrais estudadas, corroborando com a literatura, a qual mostra que há

uma redução da atividade antioxidante da enzima GSH em animais que são submetidos ao teste do nado forçado. Em nosso estudo foi observado que o acetato de citronelila na dose de 100 mg/kg, aumentou a concentração da GSH no corpo estriado, córtex pré-frontal e hipocampo dos animais submetidos ao nado forçado, assim como também aumentou a concentração de GSH no corpo estriado e hipocampo dos animais que receberam acetato de citronelila na dose 50 mg/kg, nos animais que sofreram indução do estresse.

Ainda em relação à concentração da GSH no SNC dos camundongos estudados, encontramos em nosso estudo que, o pré-tratamento dos animais com acetato de citronelila na dose de 100 mg/kg aumentou os níveis de GSH no córtex pré-frontal e hipocampo dos animais que não foram submetidos ao nado.

Esses resultados nos mostram que o pré-tratamento com acetato de citronelila (100mg/Kg) exerce um efeito de neuroproteção sugerido pelo aumento nos níveis de GSH nos animais que não foram submetidos ao estresse do nado forçado e ainda que, o acetato de citronelila apresenta um efeito antioxidante evidenciado pelo aumento da concentração da GSH no córtex pré-frontal, corpo estriado e hipocampo dos camundongos estudados, na dose de 100 mg/kg do acetato de citronelila, e no hipocampo e corpo estriado, na dose de 50 mg/kg do acetato de citronelila. Isto sugere que o acetato de citronelila possivelmente apresenta seu efeito antidepressivo através de uma ação antioxidante, mediada pelo aumento da atividade da glutathiona reduzida (GSH) no SNC.

Ozcan et al. (2008) mostrou que pacientes com depressão apresentam baixas defesas contra a peroxidação lipídica, a qual altera a estrutura da membrana celular, e demonstrou que uma suplementação do tratamento com substâncias antioxidantes apresenta benefícios na recuperação de pacientes com depressão do tipo bipolar. A produção de radicais livres pode levar a peroxidação lipídica e gerar o rompimento da membrana celular através de alterações na sua estrutura, o que ocasiona a formação de produtos que são tóxicos para a célula, como o malonildialdeído (MDA) (HERSHKO, 1989). Em muitos estudos, para a avaliação da peroxidação lipídica, é utilizada a mensuração das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico

(TBARS), através da análise dos níveis de malonildialdeído (MDA) (ESTERBAUER & CHEESEMAN, 1990; DEL RIO et al., 2005; SILVA et al., 2007).

Khanzode et al. (2003) verificaram que a depressão maior está associada com um aumento significativo dos níveis séricos de malonialdeído (MDA). Estudos clínicos mostraram concentrações aumentadas de MDA em pacientes com transtornos afetivos, e aumento dos níveis de MDA no sangue periférico de pacientes deprimidos em comparação com indivíduos saudáveis. Além disso, o tratamento com antidepressivos, como por exemplo, a fluoxetina, reduziu os níveis de MDA nesses pacientes (OZCAN et al. 2004; GALECKI et al., 2009).

Dessa forma, nosso estudo procurou avaliar os níveis de malonildialdeído (MDA) através através da quantificação das espécies reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) em animais normais, que não foram submetidos ao estresse ocasionado pelo nado forçado, como também em animais que passaram pelo teste do nado forçado, a fim de induzir o estresse nesses animais.

Nossos resultados mostraram que não houve alteração nos níveis de MDA nas áreas cerebrais (corpo estriado e córtex pré-frontal) nos animais pré-tratados com acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg) em comparação ao controle nos animais que não foram submetidos ao nado forçado, exceto no hipocampo, onde o pré-tratamento com acetato de citronelila na dose de 100 mg/kg, diminuiu os níveis de MDA quando comparado ao controle. Já nos animais que sofreram indução do estresse através do nado forçado, ocorreu aumento nos níveis de MDA, no córtex pré-frontal e no hipocampo dos animais, que foi revertido pelo acetato de citronelila apenas na dose de 50 mg/kg, sugerindo uma ação neuroprotetora relacionada a inibição da peroxidação lipídica com a dose do acetato de citronelila 50 mg/kg.

Estudos realizados para mostrar os efeitos do tratamento crônico com fluoxetina (fármaco utilizado no tratamento da depressão) e sua relação com a diminuição do dano oxidativo e proteico na depressão, tem sido investigados. Foi encontrado que o estresse oxidativo ocasionado pela depressão aumenta significativamente a geração de espécies

reativas de oxigênio (EROS) no sangue periférico de pacientes depressivos e que o tratamento agudo com fluoxetina reverteu parcialmente o aumento dessas espécies reativas, possivelmente através da atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase e do conteúdo de GSH (glutationa reduzida) no plasma desses pacientes (GALECKI, et al., 2009; NOVIO et al., 2011).

O óxido nítrico é um dos radicais envolvidos com o estresse oxidativo e a depressão; seu papel está envolvido com a regulação de neurotransmissores, alterando a comunicação e a plasticidade neuronal e atuando na melhora do fluxo sanguíneo cerebral, devido sua ação vasodilatadora (MCLEOD et al., 2001). Alterações neuronais na atividade da NOS (óxido nítrico sintase), enzima envolvida com a síntese do óxido nítrico e alterações no sistema antioxidante estão relacionadas com as desordens afetivas, como a depressão (SRIVASTAVA et al., 2002; OZCAN et al., 2004).

Dentre as espécies reativas de oxigênio (EROs) comumente envolvidas com a produção de radicais livres temos, o ânio superóxido ( $O_2^-$ ), o radical hidroxila (OH), o radical peróxido (ROO), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), além das espécies reativas de nitrogênio (ERNs) como o óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito (ONOO). Estes podem ser neutralizados por diferentes enzimas antioxidantes como, por exemplo, a superóxido dismutase (SOD), a glutaciona peroxidase (GPx) e a catalase. Substâncias antioxidantes como a coenzima Q10, vitamina C e E e a glutaciona estão envolvidas com a diminuição na produção de espécies reativas de oxigênio (MOSLEY et al., 2006; MAES et al., 2011).

Em condições normais, as espécies reativas de oxigênio (EROs) e as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) são fortemente reguladas por sistemas antioxidantes, que promovem o equilíbrio entre a produção de enzimas antioxidantes e estas espécies reativas. As reações antioxidantes podem remover EROs e ERNs eliminando-os ou mesmo diminuindo sua produção no organismo, impedindo assim os danos causados pelo estresse oxidativo (KATALINIC et al., 2005).

Nossos resultados mostraram que houve um aumento na produção de nitrito-nitrato no hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal dos animais que foram submetidos ao estresse pelo nado forçado, o que demonstra que este modelo realmente colabora para induzir uma situação de estresse no animal. Entretanto, o pré-tratamento com acetato de citronelila foi capaz de reverter a elevação dos níveis de nitrito-nitrato apenas no corpo estriado, na dose de 100 mg/kg quando comparado ao controle. A administração de acetato de citronelila (50 e 100 mg/kg) não alterou o níveis de nitrito-nitrato nos animais que não foram submetidos ao nado forçado, em relação ao controle, demonstrando não ocorrer uma ação pro-oxidante, e mostrando que o acetato de citronelila exerce uma função de ação antioxidante no corpo estriado, apenas após a indução do estresse, o que pode colaborar para seu efeito antidepressivo.

Fármacos obtidos a base de plantas tem mostrado grande aceitação e distribuição no mercado farmacêutico. Por se tratarem de produtos considerados “naturais”, a grande maioria da população acredita que produtos originados de plantas, são livres de efeitos adversos e não geram toxicidade para o organismo. Entretanto, sabe-se que diversos constituintes presentes nas plantas medicinais podem causar alguma toxicidade para o organismo, principalmente se não forem administrados na dose adequada e de forma correta (CASTRO et al., 1993; SIMÕES et al., 2004). Infelizmente a maioria dos produtos fitoterápicos utilizados pela população não apresentam bulas que orientem o seu uso adequado, muito menos indicação dos seus efeitos adversos e toxicidade (AGRA et al., 2007; OLIVEIRA, 2008).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recentemente passou a requerer um maior rigor na venda plantas medicinais, exigindo estudos clínicos e pré-clínicos que demonstrem a segurança e a eficácia destes fitoterápicos, além de estudos de toxicidade que possam orientar doses seguras para a administração destas substâncias (BRASIL, 2004). Com isso, optamos em nosso estudo, por avaliar a toxicidade aguda pré-clínica do acetato de citronelila, a fim de verificar se esta substância apresenta sinais de toxicidade, bem como observar a dose de segurança para a administração do acetato de citronelila.



Os testes de toxicidade aguda tem o objetivo principal de classificar as substâncias de acordo com a sua toxicidade ou letalidade (VALADARES, 2006). Para que os testes de toxicidade sejam aceitos, é necessário que os resultados destes testes sejam conduzidos através de protocolos que tenham aceitação internacional (SACHETTI et al., 2009). O teste do DL 50 (dose capaz de matar 50% da população em estudo), criado em 1927, foi o primeiro teste utilizado para avaliar a toxicidade de substâncias que seriam posteriormente utilizadas em seres humanos. Entretanto este teste passou a ser criticado pelas sociedades de proteção aos animais devido à utilização de um grande número de animais, de ambos os sexos, para a realização deste teste (KRYSIK et al., 1997; SIAMM et al., 2005; SACHETTI et al., 2009).

A partir daí, a Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (Organization for Economic Co-operation and Development-OECD) passou a elaborar novos protocolos para estudos de toxicidade, como os guias 420, 423 e 425 (OECD, 2001). Estes protocolos utilizam um menor número de animais para avaliação da toxicidade de substâncias e permite o uso de apenas um sexo para a realização destes protocolos. O guia OECD 423 foi criado em 2001, apresenta boa reprodutibilidade, é aceito internacionalmente e utiliza poucos animais para a realização do teste de toxicidade. Neste protocolo, os animais são testados para sinais de toxicidade a partir da dose inicial de 5 mg/kg, seguida das doses de 50 mg/kg, 300 mg/kg, 2000 mg/kg e 5000 mg/kg. Estas doses são aumentadas de acordo com a letalidade apresentada pelos animais em cada grupo, ou seja, se o teste for iniciado com a dose de 5 mg/kg e esta não apresentar letalidade (morte), segue-se o protocolo com a dose de 50 mg/kg e assim por diante. Caso alguma das doses utilizadas apresente letalidade, a mesma dose é repetida, a fim de verificar a segurança desta dose. A segurança da substância administrada é classificada em cinco (5) categorias, de acordo com a dose que foi administrada e com o número de animais mortos, por grupo testado (OECD, 2001).

Em nosso estudo, utilizamos o protocolo da OECD 423 para a avaliação da toxicidade aguda do acetato de citronelila. Optamos por iniciar nosso teste com a dose de 2000 mg/kg, pois os estudos realizados com os animais nas doses de 50 e 100 mg/kg, já utilizados em nosso estudo, não apresentaram sinais de toxicidade e letalidade nos animais, além disso, um estudo realizado em nosso laboratório para a avaliação do efeito analgésico do acetato de

citronelila em camundongos (RIOS et al., 2013), utilizou doses de 200 mg/kg, não apresentando efeitos tóxicos para os animais na dose utilizada. Como a próxima dose, segundo o guia OECD 423 seria a dose de 300 mg/kg e esta se encontra bem próxima da dose de 200 mg/kg utilizada neste estudo anterior, optamos por iniciar a avaliação da toxicidade do acetato de citronelila com a dose de 2000 mg/kg.

Em nosso estudo, utilizamos um grupo de 3 ratos machos, que receberam a dose aguda de 2000 mg/kg do acetato de citronelila, por via oral, e 3 ratos machos que receberam apenas solução salina 0,9% e que foram utilizados como grupo controle. Após a administração oral, estes animais foram avaliados na primeira hora, segunda hora, sexta hora, décima segunda hora e vigésima quarta hora e posteriormente todos os dias, para a avaliação de sinais de toxicidade, durante 14 dias. Nossos resultados mostraram que na primeira hora após a administração do acetato de citronelila, os animais apresentaram alguns efeitos como sonolência, queda palpebral, tremores e piloereção, entretanto, estes efeitos não foram observados nas horas seguintes em nenhum dos 14 dias de observação.

Na primeira hora após a administração do acetato de citronelila, os animais foram colocados num campo aberto para avaliação do seu estado de locomoção e contagem do número de bolos fecais. Autores relatam que o aumento do tempo que o animal fica na parte central do campo aberto é indicação de ansiólise, e a locomoção aumentada pode ser um indicativo de um efeito estimulante, do contrário, uma diminuição da locomoção e da frequência com que o animal permanece sobre as patas traseiras é relatada como sedação (PRUT & BELZUNG, 2003). Em nosso estudo observamos que na primeira hora, os animais permaneceram parados, no campo aberto, sonolentos, e com diminuição da locomoção e no número de grooming e rearing, indicando um possível efeito sedativo do acetato de citronelila (2000 mg/kg) quando comparados ao grupo controle.

O número de bolos fecais também foi avaliado nos dois grupos, acetato de citronelila (2000 mg/kg) e controle, com isso vimos que o grupo controle apresentou um grande número de bolos fecais em comparação ao grupo que recebeu acetato de citronelila na dose de 2000 mg/kg, o que corrobora com outros estudos que mostraram que o índice de defecção nos

animais indica seu estado de ativação do sistema nervoso simpático e ansiedade (MARIZ et al., 2006; SACHETTI, 2009). Estes efeitos foram observados apenas na primeira hora após a administração do acetato de citronelila, não sendo detectados nas demais horas avaliadas.

No sétimo dia de observação, ocorreu a morte de um animal do grupo que recebeu acetato de citronelila 2000 mg/kg, com isso, seguindo o guia OECD 423, após o término dos 14 dias de observação deste grupo, um novo grupo iniciou os testes para avaliação da toxicidade, na mesma dose utilizada (2000 mg/kg). Neste grupo os animais apresentaram os mesmos efeitos observados no grupo anterior (sonolência, queda palpebral e piloereção) apenas na primeira hora de observação. Neste segundo grupo de tratamento, ocorreu a morte de um animal no 13º dia de observação dos animais. De acordo com o protocolo seguido (OECD 423), isto encerra o estudo de toxicidade nesta dose avaliada, 2000 mg/kg, e classifica a segurança da substância avaliada, como categoria 5 (cinco). Este resultado nos mostra que o acetato de citronelila apresenta uma alta categoria de segurança para a administração desta substância nos animais.

Um dos sinais de toxicidade sistêmica pode se manifestar por meio da redução no consumo de água e ração, além de alterações comportamentais, apatia e má distribuição dos pêlos dos animais (MELO, 2001; GONZALEZ & SILVA, 2003). Em nosso estudo não foram detectadas alterações no peso e no consumo de água dos animais estudados, inclusive, tanto os animais tratados como os animais controle tiveram um aumento considerável de peso, não havendo diferenças significativas no aumento de peso dos animais tratados com acetato de citronelila, quando comparados ao grupo controle.

Para colaborar com os achados do estudo comportamental, optamos por retirar os órgãos dos animais no 14º dia de observação. Para posterior comparação dos resultados os órgãos dos dois grupos, tratados com acetato de citronelila 2000 mg/ kg e controle, foram retirados para avaliação histológica. A análise microscópica dos órgãos é um dos parâmetros mais empregados para a avaliação de efeitos tóxicos de uma determinada substância, juntamente com alterações na massa relativa dos órgãos (HAYES, 2001; PIRES JUNIOR et al., 2012). Em nosso estudo encontramos que não houve alterações na ultraestrutura dos

órgãos avaliados (rim, fígado e cérebro) em nenhum dos grupos observados, além disso, os órgãos também não apresentavam sinais histológicos de toxicidade, como alterações da coloração ou mesmo sinais de inflamação. Isto indica que o acetato de citronelila, mesmo em altas doses, apresenta segurança para a administração em animais, não apresenta sinais clínicos e nem histológicos de toxicidade e está classificado como categoria 5 de segurança segundo o protocolo OECD 423.

Na literatura não encontramos dados de estudos que relatem a segurança toxicológica do acetato de citronelila, o que demonstra a importância desta avaliação para auxílio de estudos posteriores com esta substância.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Foi demonstrado que o tratamento agudo com acetato de citronelila reduziu o tempo de imobilidade dos animais, no teste do nado forçado (TNF) e teste de suspensão da cauda (TSC), sugerindo um possível efeito antidepressivo para o acetato de citronelila nas doses de 50 e 100 mg/kg.
- Nossos dados mostraram que este efeito parece ser mediado com a possível interação do acetato de citronelila com o sistema noradrenérgico nos receptores  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  adrenérgicos, no sistema dopaminérgico nos receptores  $D_1$  e  $D_2$  para dopamina e no sistema serotoninérgico nos receptores 5-HT<sub>2A</sub> e 5-HT<sub>3</sub> para serotonina, sendo estes resultados obtidos no teste do nado forçado.
- O acetato de citronelila não apresentou atividade ansiolítica e nem ansiogênica no teste do labirinto em cruz elevado (*Plus maze*).
- O acetato de citronelila não apresentou efeito sedativo e/ou estimulante sobre o SNC e ou/periférico, pois não alterou qualquer parâmetro observado nos testes do tempo de sono induzido por pentobarbital e nas convulsões induzidas por pentilenotetrazol.
- Este efeito não está relacionado com aumento da atividade motora, já que os resultados obtidos no teste do campo aberto, não mostraram aumento na atividade locomotora dos animais neste teste.
- O acetato de citronelila aumentou os níveis de monoaminas (NA, DA e 5HT) mais especificamente na dose de 100 mg/kg e diminuiu seus metabólitos (DOAC, HVA e 5-HIAA) nas doses estudadas, o que corrobora com os resultados obtidos para a avaliação do mecanismo de ação encontrados no Teste do Nado Forçado (TNF) e Teste de Suspensão da Cauda (TSC).

- O acetato de citronelila apresentou um possível efeito antioxidante através do aumento da atividade do GSH, e não alterou os níveis de TBARS e Nitrito/nitrato no corpo estriado, córtex pré-frontal e hipocampo dos animais, nas doses estudadas e apresentou um efeito pró-oxidante em alguns testes.
- O acetato de citronelila não apresentou efeitos tóxicos na observação hipocrática e não apresentou alterações histopatológicas nos órgãos dos animais estudados na avaliação da toxicidade, sendo classificado como categoria 5 de segurança, segundo o guia OECD 423.

## 8 CONCLUSÃO

Com isso podemos concluir que o acetato de citronelila apresenta efeitos de anti- mobilidade no TNF, que sugerem um possível efeito antidepressivo, sendo este efeito evidenciado por aumento nos níveis de monoaminas no corpo estriado dos animais. Embora muitos fármacos apresentem sua ação antidepressiva relacionada a apenas um único sistema, o acetato de citronelila mostrou envolvimento com os sistemas serotoninérgico, noradrenérgico e dopaminérgico. Além disso, seus efeitos não estão relacionados com o aumento da atividade locomotora e não estimulam ansiogênese nos animais, não apresentam efeitos sedativos e nem efeitos de estimulação do SNC.

Outro ponto positivo é que esta substância parece ter um efeito antioxidante, através do aumento da concentração de GSH e um efeito pró-oxidante, o que pode contribuir também para o seu efeito antidepressivo. Outra vantagem é que o acetato de citronelila não apresenta efeitos tóxicos, sendo classificado como categoria máxima de segurança para estudos experimentais.

Entretanto, estudos mais detalhados seriam necessários para avaliar sua ação nos receptores específicos, como o *Binding*, por exemplo, a fim de detalhar o mecanismo de ação desta substância. Como o acetato de citronelila mostrou aumento nas concentrações de monoaminas no corpo estriado dos animais e diminuiu os níveis de metabólitos, podemos sugerir que o acetato de citronelila poderia ser um possível inibidor da MAO, entretanto estudos mais detalhados como mensuração das concentrações de MAO no SNC ou mesmo estudos da atividade enzimática da MAO devem ser realizados para comprovar estas hipóteses.

## REFERENCIAS

- ABDALLA, D.S.; MONTEIRO, H.P.; OLIVEIRA, J.A.; BECHARA, E.J. Activities of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in schizophrenic and manic-depressive patients. **Clinical Chemical**, v.32, p.805-807, 1986.
- ABDEL-WAHAB, B.A.; SALAMA, R.H. "Venlafaxina protects against stress-induced oxidative DNA damage in hippocampus during antidepressant testing in mice," **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.100, n.1, p. 59-65, 2011.
- AGHAJANIAN, G.K.; SPROUSE, J.S.; SHELDON, P.; RASMUSSEN, K. Electrophysiology of the central serotonin system: receptor subtypes and transducer mechanisms. **Annals of New York Academy of Sciences**, v.600, p.93-103, 1990.
- AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.1, p.114-140, 2007.
- ALTAMURA, A.C.; DELL'OSSO, B.; SERATI, M.; CIABATTI, M.; BUOLI, M. Recent assessments on the neurobiology of major depression: a critical review. **Rivista di Psichiatria**, v. 43, 185-207, 2008.
- AMARAL, J. F.; SILVA, M. I. G.; NETO, M. R. A.; MOURA, B. A.; CARVALHO, A. M. R.; VASCONCELOS, P. F.; FILHO, J. M. B.; GUTIERREZ, S. J. C.; VASCONCELOS, S. M. M.; MACEDO, D. S.; SOUSA, F. C. F. Antidepressant-like effect of bis-eugenol in the mice forced swimming test: evidence for the involvement in the monoaminergic system. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v.27, n.5, p.471-82, 2013.
- AMAT, J.; MATUS-AMAT, P.; WATKINS, L.R.; MAIER, S.F. Escapable and inescapable stress differentially and selectively change extracellular levels of 5-HT in the ventral hippocampus and dorsal periaqueductal gray of the rat. **Brain Research**, v.797, p.12-22, 1998.
- ANACKER, C.; CATTANEO, A.; MUSAELYAN, K. et al., "Role for the kinase SGK1 in stress, depression, and glucocorticoid effects on hippocampal neurogenesis," **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, p. 8708-8713, 2013.
- ANDERSON, R.J.; FREEDLAND, K.E.; CLOUSE, R.E.; LUSTMAN, P.J. The Prevalence of Co-morbid Depression in Adults with Diabetes. **Diabetes Care**, v. 24, p.1069-78, 2001.
- ANDREASEN, J. T.; OLSEN, G.M.; WIBORG, O. REDROBE, J.P. Antidepressant -like effects of nicotinic acetylcholine receptor antagonist but not agonists, in the mouse forced swim and mouse tail suspension tests. **Journal Psychopharmacology**, v.23, p.797-804, 2009.



ANKARALI, S.; ANKARALI, H.C.; MARANGOZ, C. Further evidence for the role of nitric oxide in maternal aggression: effects of L-NAME on maternal aggression towards female intruders in Wistar rats. **Physiology Research**, v.58, n.4, p.591-598, 2009.

ARANTES GONÇALVES, F.; COELHO, R. DEPRESSÃO E TRATAMENTO: Apoptose, Neuroplasticidade e Antidepressivos. **Acta Medical Portuguesa**, v.19, p.9-20, 2006.

ARRANZ, M.J.; MANCAMA, D.; KERWIN, R.W. Neurotransmitter receptor variants and their influence on antipsychotic treatment. **International Journal Molecular Medicine**, v. 7, n.1, p.27-30, 2001.

AXELROD, J. Noradrenaline: Fate and control of its biosynthesis. **Science**, v.173, p.598-606, 1971.

AYDEMIR, O.; DEVECI, A.; TANELI, F. The effect of chronic antidepressant treatment on serum brain-derived neurotrophic factor levels in depressed patients: a preliminar study. **Progress Neuropsychopharmacol Biology Psychiatry**, v.29, p.261-265, 2005.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D. and IDOAMAR, M. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.2, p.446-475, 2008.

BARDEN, N. Implication of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in the physiopathology of depression. **Journal of Psychiatry & Neuroscience**, v.29, p.185-193, 2004.

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

BARONE, P.; PALMA, V.; DE BARTOLOMEIS, A.; TEDESCHI, E.; CICARELLI, G.; CAMPANELLA, G. Dopaminergic regulation of epileptic activity. **Neurochemistry International**, v.20, p.245-249, 1992.

BASSO, A.M.; GALLAGHER, K.B.; BRATCHER, N.A.; BRIONI, J.D.; MORELAND, R.B.; HSIEH, G.C., et al. Antidepressant-like effect of D(2/3) receptor, but not D(4) receptor-activation in the rat forced swim test. **Neuropsychopharmacology**, v.30, p.1257-68, 2005.

BAXTER, G.; KENNETT, G.A.; BLANEY, F.; BLACKBURN, T. 5-HT<sub>2</sub> receptor subtypes: a family reunited? **Trends Pharmacology Science**, v.16, p.105-10, 1995.

BEHR, G.A.; MOREIRA, J.C.F.; FREY, B.N. Preclinical and Clinical Evidence of Antioxidant Effects of Antidepressant Agents: Implications for the Pathophysiology of Major Depressive Disorder. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2012.

BEHR, G.A.; MOREIRA, J.C.F.; FREY, B.N. Preclinical and Clinical Evidence of Antioxidant Effects of Antidepressant Agents: Implications for the Pathophysiology of Major Depressive Disorder. **Hindawi Publishing Corporation Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2012.

BERK, B.C. Novel approaches to treat oxidative stress and cardiovascular diseases. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**, v.118, p.209-14, 2007.

BERRIDGE, C.W.; WATERHOUSE, B.D. The locus ceruleus noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. **Brain Research Review**, v.42, p.33-84, 2003.

BERRIDGE, C.W.; ISAAC, S.O.; ESPANA, R.A. Additive wakepromoting actions of medial basal forebrain noradrenergic  $\alpha$ 1- and  $\beta$ -receptor stimulation. **Behavioral Neuroscience**, v.117, 350-359, 2003.

BERTON, O.; NESTLER, E.J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nature Neuroscience**, v.7, p.137-151, 2006.

BILICI, M.; EFE, H.; KOROGLU, M.A.; UYDU, H.A.; BEKAROGLU, M.; DEGER, O. Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. **Journal Affective Disorders**, v.64, p.43-51, 2001.

BINFARE, R. W.; MANTOVANI, M.; BUDNI, J.; SANTOS, A. R.; RODRIGUES, A.L. Involvement of dopamine receptors in the antidepressant like effect of melatonin in the tail suspension test. **European Journal of Pharmacology**, v.638, p.78-83, 2010.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v.32, n.3, 588-594, 2009.

BLIER, P. The pharmacology of putative early-onset antidepressant strategies. **Eur Neuropsychopharmacology**, v.13, p.57-66, 2003.

BLIER, P.; DE MONTIGNY, C. Current advances and trends in the treatment of depression. **Trends Pharmacology Science**, v. 15, p.220-226, 1994.

BOCKAERT, J.; CLAEYSEN, S.; COMPAN, V.; DUMUIS, A. 5-HT<sub>4</sub> receptors: history, molecular pharmacology and brain functions. **Neuropharmacology**, v.55, p. 922-931, 2008.

BOOTHMAN, L. J.; MITCHELL, S. N.; SHARP, T. Investigation of the SSRI augmentation properties of 5-HT<sub>2</sub> receptor antagonists using in vivo, microdialysis. **Neuropharmacology**, v.50, p.726-732, 2006.

BORSINI, F.; MELI, A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? **Psychopharmacology**, v.94, p.147- 160, 1988.

BOURIN, M.; FIOCCO, A.J.; CLENET, F. How valuable are animal models in defining antidepressant activity? **Human Psychopharmacology**, v.16, p.9-21, 2001.

BOUVIER, N.; TRENQUE, T.; MILLART, H. Development of antidepressant drugs. Experience and prospects. **Presse Medicale**, v.32, 519-522, 2003.

BRAMBILLA, P.; CIPRIANI, A.; M. HOTOPF AND C. BARBUI. Side-effect profile of fluoxetine in comparison with other SSRIs, tricyclic and newer antidepressants: a meta-analysis of clinical trial data. **Pharmacopsychiatry**, v.38, p.69-77, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 90, de 16 de março de 2004. Determina a publicação da “guia para a realização de estudo de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos.”** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, poder executivo, Brasília, DF, 18 mar. 2004.

BRAVO, G.; MASWOOD, S. Acute treatment with 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist, tropisetron, reduces immobility in intact female rats exposed to the forced swim test. **Pharmacology Biochemical Behavioral**, v.85, p.362-368, 2006.

BRUNELLO, N.; MENDLEWICZ, J.; KASPER, S.; LEONARD, B.; MONTGOMERY, S.; NELSON, J.; PAYKEL, E.; VERSIANI, M.; RACAGNI, G. The role of noradrenalin and selective noradrenalin reuptake inhibition in depression. **European Neuropsychopharmacology**, v.12, p.461-475, 2002.

BRÜNING, C. A.; SOUZA, A. C. G.; GAI, B. M.; ZENI, G.; NOGUEIRA, C.W. Antidepressant-like effect of m-trifluoromethyl-diphenyl diselenide in the mouse forced swimming test involves opioid and serotonergic systems. **European Journal of Pharmacology**, v. 658, p.145–149, 2011.

CALABRESE V.; MANCUSO, C.; CALVANI, M. et al: Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. **Natural Review Neuroscience**, v. 8, p.766-775, 2007.

CARDOSO, C.C.; LOBATO, K.R.; BINFARÉ, R.W.; FERREIRA, P.K.; ROSA, A.O.; SANTOS, A.R.S., et al. Evidence for the involvement of the monoaminergic system in the antidepressant-like effect of magnesium. **Progress Neuropsychopharmacology Biological Psychiatry**, v.33, p.235-42, 2009.

CARLINI, E.A.; RODRIGUES, E.; MENDES, F.R.; TABACH, R.; GIANFRATTI, B. Treatment of drug dependence with Brazilian herbal medicines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p. 690-695, 2006.

CASTRO, J.A. Toxicologia básica: mecanismos de toxicidade y sus aplicaciones. **Acta bioquímica clinica latinoamericana**, v.2, p.197-206, 1993.

CELADA, P.; PUIG, V.M.; AMARGOS-BOSCH, M.; ADELL, A.; ARTIGAS, F. The therapeutic role of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors in depression. **Journal Psychiatry Neuroscience**, v.29, p.252-265, 2004.

CHARNEY, D.S. Monoamine dysfunction and the pathophysiology and treatment of depression. **Journal Clinical Psychiatry**, v.59, (Suppl 14), p.11-14, 1998.

CHARNEY, D.S. Monoamine dysfunction and the pathophysiology and treatment of CHEN, B.; DOWLATSHAHI, D.; MACQUEEN, G.M.; WANG, J.F.; YOUNG, L.T. Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. **Biological Psychiatry**, v.50, p.260-265, 2001.

CHEN, P.J.; HSIEH, C.L.; SU, K.P.; HOU, Y.C.; CHIANG, H.M.; SHEEN, L.Y. Rhizomes of *Gastrodia elata* B(L) possess antidepressant-like effect via monoamine modulation in sub chronic animal model. **American Journal of Chinese Medicine**, v.37, n.6, p.1113-1124, 2009.

CHEN, Z.; SKOLNICK, P. Triple uptake inhibitors: therapeutic potential in depression and beyond. **Expert Opin Investig Drugs**, v.16, p.1365-1377, 2007.

CHOJNACKA-WOJCIK, E.; TATARCZYNSKA, E.; GOLEMBIOWSKA, K.; PRZEGALISKI, E. Involvement of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the antidepressant-like activity of gepirone in the forced swimming test. **Neuropharmacology**, v.30, p.711-717, 1999.

CHOPRA, K.; KUMAR, B.; KUHAD, A. "Path o biological targets of depression," **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 15, n. 4, p. 379-400, 2011.

CIRELLI, C.; POMPEIANO, M.; TONONI, G. Neuronal gene expression in the waking state: a role for the locus ceruleus. **Science**, v.274, p.1211-1215, 1996.

CONNER, D.E. Naturally occurring compounds. In: DAVIDSON P.; BRANEN A.L. **Antimicrobials in foods**. New York: Marcel Dekker, p.441-468, 1993.

COOL, A.R.; SPRUIJT, B.M.; ELLENBROEK, B.A. apud SERAFIM, A.P.; FELICIO, L.F. Dopaminergic modulation of grooming behavior I virgin and pregnant rats. **Brazilian Journal Medical Biological Research**, v.34, p.1465-1470, 2001.

COOPER, J.R.; BLOOM, F.E.; ROTH, R.H. **The biochemical basis of Neuropharmacology**. 6 th ed. New York: Oxford University, 1991.

COPPEN, A.J. **Biochemical aspects of depression**. International Psychiatry Clinics, v.6, p. 53-81, 1969.

COSTA, E.; SANDLER, M. **Monoamine Oxidase**: New York: Raven, 1972.

COYLE, J.T.; PUTTFARCKEN, P. "Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders," **Science**, v. 262, n. 5134, p. 689-695, 1993.

CROFT, H.; SETTLE, E.J.; HOUSER, T.; BATEY, S.R.; DONAHUE, R.; ASCHER, A. A placebo-controlled comparison of the antidepressant efficacy and effects on sexual

functioning of sustained-release bupropion and sertraline. **Clinical Therapy**, v.21, p.643-658, 1999.

CRUZ, G.G.; AGUILAR, F.J.A.; VELASCO, R.L.; PALACIOS, G.V.; JAIME, H.B. Antidepressant like effects of *Tagetes lucida* Cav. in the forced swimming test. **Journal of Ethnopharmacology**, v.120, p.277-281, 2008.

CRYAN JF, MARKOU A, LUCKI I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends Pharmacology Science**, v.23, 238-245, 2002.

CRYAN, J.F., MOMBÉREAU, C., VASSOUT, A. The tail suspension test as a model to assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, p.571-625, 2005.

CUMURCU, B.E; OZYURT, H.; ETIKAN, I.; DEMIR, S.; KARLIDAG, R. Total antioxidant capacity and total oxidant status in patients with major depression: impact of antidepressant treatment. **Psychiatry Clinical Neuroscience**, v.63, p.639-645, 2009.

DE BELLIS, M.D.; GERACIOTI, T.D.J.; ALTEMUS, M.; KLING, M.A. Cerebrospinal fluid monoamine metabolites in fluoxetine-treated patients with major depression and in healthy volunteers. **Biological Psychiatry**, v.33, p.636-641, 1993.

De PARMENTIER, F.; MAUGE, J.M.; LOWTHER, S.; CROMPTON, M.R.; KATONA, C.L.; HORTON, R.W. Brain alpha-adrenoceptors in depressed suicides. **Brain Research**, v.757, p.60-68, 1997.

DEBATTISTA, C.; SOFUOGLU, M.; SCHATZBERG, A.F. Serotonergic synergism: the risks and benefits of combining the selective serotonin reuptake inhibitors with other serotonergic drugs. **Biological Psychiatry**, v.44, p.341-7, 1998.

DEL RIO, D.; STEWART, A.J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on Malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v.15, n.4, p.316-328, 2005.

DELGADO, P.; MORENO, F. Antidepressants and the brain. **International Clinical Psychopharmacology**, v.14, n.(S1), p.9-16, 1999.

DEMYTTENAERE, K. Compliance during treatment with antidepressants. **Journal of Affective Disorders**, v.43, p.27-39, 1997.

DETKE, M.J.; JOHNSON, J.; LUCKI, I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. **Psychopharmacology (Berl.)**, v.121, p.66-72, 1995.

DODD, S.; HORGAN, D.; MALHI, G.S.; BERK, M. To combine or not to combine? A literature review of antidepressant combination therapy. **Journal Affective Disorders**, v.89, p.1-11, 2005.

DONOGHUE, J.M., TYLEE, A. The treatment of depression: prescribing patterns of antidepressants in primary care in the UK. *British Journal of Psychiatry*, v.168, p.164-168, 1996.

DORMAN, H.J.D. and DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, n.2, p. 308-316, 2000.

DRAGO, F.; CONTARINO, A.; BUSA, L. The expression of neuropeptide-induced excessive grooming behaviour in dopamine D1 and D2 receptor-deficient mice. **European Journal Pharmacology**, v.365, p.125-131, 1999.

DREVETS, W. C.; BOGERS, W.; RAICHLE, M. E. Functional anatomical correlates of antidepressant drug treatment assessed using PET measures of regional glucose metabolism. **European Neuropsychopharmacology**, v.12, p.527-544, 2002.

DRINGEN, R. Metabolism and functions of glutathione in brain. **Progress Neurobiology**, v.62, p.649-671, 2000.

DRINGEN, R. Metabolism and functions of glutathione in brain. **Progress Neurobiology**, v.62, p.649-671, 2000.

DUARTE, J. R. M.; **Estudo do potencial de mercado de fármacos (medicamentos e cosméticos) fitomedicamentos, bancos de extratos e compostos e serviços de patenteamento e certificação**, Superintendência do Desenvolvimento da Amazônia: Belém, 2000.

DUARTE, M.C.T. et al. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, p.305-311, 2005.

DUCOTTET, C., GRIEBEL, G., BELZUNG, C. Effects of the selective non peptide corticotrophin releasing factor receptor 1 antagonist antalarmin in the chronic mild stress model of depression in mice. **Progress in Neuro Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.7, p.625-631, 2003.

DUMAN, R.S.; HENINGER, G.R.; NESTLER, E.J. A molecular and cellular theory of depression. **Archives of General Psychiatry**, v.54, p.597-606, 1997.

DUNLOP BW, NEMEROFF CB. The role of dopamine in the pathophysiology of depression. **Archives of General Psychiatry**, v.64, p.327-337, 2007.

DUNN, A.; BERRIDGE, C.; LAI, Y.; YACHABACH, T. CRF-induced excessive grooming behavior in rats and mice. **Peptides**, v.8, p.841-844, 1987.

EINAT, H. Chronic Oral Administration of Ginseng Extract results in Behavioral Change but has no Effects in Mice Models of Affective and Anxiety Disorders. **Phytotherapy Research**, v.21, p.62-66, 2007.

EISENSAMER, B.; RAMMES, G.; GIMPL, G.; SHAPA, M.; FERRARI, U.; HAPFELMEIER, G. et al. Antidepressants are functional antagonists at the serotonin type 3 (5-HT<sub>3</sub>) receptor. **Molecular Psychiatry**, v.12, p.994-1007, 2003.

ELHWUEGI, A.S. Central monoamines and their role in major depression. **Progress Neuropsychopharmacology Biological Psychiatry**, v.28, p.435-451, 2004.

EREN, I.; NAZIROGGLU, M.; DEMIRDAŞS. A. Protective effects of lamotrigine, aripiprazole and escitalopram on depression-induced oxidative stress in rat brain. **Neurochemical Research**, v.32, n.7, p.1188-1195, 2007.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods Enzymol**, v.186, p.407-421, 1990.

FELDMAN, R. S.; MEYER, J. S.; QUENZER, L. F. Catecholamines, principles of **Neuropsychopharmacology**. Sunderland, M. A.: Sinauer Associates, Inc, p.277-344, 1997.

FENLI, S.; FENG, W.; RONGHUA, Z.; HUANDE, L. Biochemical mechanism studies of venlafaxine by metabonomic method in rat model of depression. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v.17, p. 41-48, 2013.

FILE, S.; MABBUTT, P.; WALKER, J. Comparison of adaptive responses in familiar and novel environments: modulatory factors. **Annals of the New York Academy of Science**, v.525, p.69-79, 2006.

FUNDERBURK, K. J. S.; MAISTO, S. A. "Substance use disorders increase the odds of subsequent mood disorders," **Drug and Alcohol Dependence**, 2013.

GALDINO, P.M.; NASCIMENTO, M.V.M.; SAMPAIO, B.L.; FERREIRA, R.N.; PAULA, J.R.; COSTA, E.A. Antidepressant-like effect of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. ethanolic extract and fractions in mice. **Journal Ethnopharmacology**, v.124, p.581-585, 2009.

GALEA, L.A.; WIDE, J.K.; BARR, A.M. Estradiol alleviates depressive like symptoms in a novel animal model of postpartum depression. **Behavioural Brain Research**, v. 122, n.1-9, 2001.

GALECKI, P.; SZEMRAJ, J.; KIEWICZ, M. B.; FLORKOWSKI, A.; GAŁECKA, E. "Lipid peroxidation and antioxidant protection in patients during acute depressive episodes and in remission after fluoxetine treatment," **Pharmacological Reports**, v.61, n.3, p. 436-447, 2009.

GARCÍA-SEVILLA, J.A.; ESCRIBÁ, P.V.; OZAITA, A.; LA HARPE, R.; WALZER, C.; EYTAN, A. et al. Up-regulation of immunolabeled  $\alpha_2$  A-adrenoceptors, Gi coupling proteins

and regulatory receptor kinases in the prefrontal cortex of depressed suicides. **Journal Neurochemical**, v.72, p.282-291,1999.

GAWRYLUK, J.W.; WANG, J.F.; ANDREAZZA, A.C.; SHAO, L.; YOUNG, L.T. "Decreased levels of glutathione, the major brain antioxidant, in post-mortem prefrontal cortex from patients with psychiatric disorders," **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 14, n.1, p. 123–130, 2011.

GAWRYLUK, J.W.; WANG, J.F.; ANDREAZZA, A.C.; SHAO, L.; YOUNG, L.T. Decreased levels of glutathione, the major brain antioxidant, in post-mortem prefrontal cortex from patients with psychiatric disorders. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v.14, p.123-130. 2011.

GAY, B. M.; PRIGOL, M.; STEIN, A. L.; CRISTINA W. NOGUEIRA.; NOGUEIRA, C. W. Antidepressant-like pharmacological profile of 3-(4-fluorophenylselenyl)-2,5-diphenylselenophene: Involvement of serotonergic system. **Neuropharmacology**, v.59, p. 172-179, 2010.

GEX-FABRY, M.; RUDAZ, S.; BALANT-GORGIA, A.E.; BRACHET, A.; VEUTHEY, J.L.; BALANT, L.P.; BERTSCHY, G. Steady-state concentration of venlafaxine enantiomers: modelbased analysis of between-patient variability. **European Journal Clinical Pharmacology**, v.58, p.323-331, 2002.

GILLESPIE, C.F.; NEMEROFF, C.B. Hypercortisolemia and depression. **Psychosomatic Medicine**, v.67, p.26-28, 2005.

GLENNON, R.A.; NAIMAN, N.A.; PEIRSON, M.E.; TITETER, M.; LYON, R.A.; HERNDON, J.L.; MISENHEIMER, B. NAN-190, a potential 5-HTA serotonin antagonist. **Drug Development Research**, v.16, p.335-343, 1989.

GONZALEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. **Introdução a bioquímica clínica animal**. Gráfica de Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2003. 198p.

GOODCHILD, C.S. GABA receptors and benzodiazepines. **Brasilian Journal Anesthesiology**, v.71, n.1, p.127-133, 1993.

GOODMAN & GILMAN. **Manual de Farmacologia e Terapêutica**. 1 ed. São Paulo: Mc Graw Hill, 2010. 1220p.

GOODWIN, F. R.; JAMISON, K. R. **Manic-depressive illness**. New York and Oxford: Oxford University Press; p. 416-41, 1990.

GRAHN, R.E.; HAMMACK, S.E.; WILL, M.J.; O'CONNOR, K.A.; DEAK, T.; SPARKS, P.D. et al. Blockade of alpha1 adrenoreceptors in the dorsal raphe nucleus prevents enhanced conditioned fear and impaired escape performance following uncontrollable stressor exposure in rats. **Behavioral Brain Research**, v.134, p.387-392, 2002.



GRIEBEL, G.; MOREAU, J.L.; JENCK, F.; MISLIN, R.; MARTIN, J.R. Acute and chronic treatment with 5HT reuptake inhibitors differentially modulate emotional responses in anxiety models in rodents. **Psychopharmacology (Berl.)**, v.113, p.463-470, 1994.

GUILLOUX, J. P.; DAVID, D. J.; XIA, L.N.; GUYEN, H. T.; RAINER, Q.; GUIARD, B. P. et al. Characterization of 5-HT (1A/1B)-/- mice: an animal model sensitive to anxiolytic treatments. **Neuropharmacology**, v.61, p.478-488, 2011.

GUIMARÃES, F. S.; GRAEFF, F. G. **Fundamentos de Psicofarmacologia**. São Paulo: Atheneu, 2001.

GYSIN, R.; KRAFTSIK, R.; SANDELL, J.; BOVET, P.; CHAPPUIS, C.; CONUS, P.; DEPPEN, P.; PREISIG, M.; RUIZ, V.; STEULLET, P.; TOSIC, M.; WERGE, T.; NOD, M.C. Impaired glutathione synthesis in schizophrenia: Convergent genetic and functional evidence. **PNAS**, v.104, n.42, p.16621-16626, 2007.

HAIM E. Chronic Oral Administration of Ginseng Extract results in Behavioral Change but has no Effects in Mice Models of Affective and Anxiety Disorders. **Phytotherapy Research**, v.21, p.62-66, 2007.

HALLIWELL, B. "Free radicals and antioxidants-quo vadis?" Trends in **Pharmacological Sciences**, v.32, n.3, p.125-130, 2011.

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

HALLIWELL, B.; GUTTERIGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol**, v.186, p.1-85, 1990.

HAMMER K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v.89, p. 985-990, 1999.

HARWELL, B. "Biochemistry of oxidative stress," **Biochemical Society Transactions**, v. 35, n.5, p.1147-1150, 2007.

HASHIMOTO, K. Emerging role of glutamate in the patho-physiology of major depressive disorder. **Brain Research Review**, v.65, p.105-123, 2009.

HASSIN-BAER, S.; COHEN, O.S.; VAKIL, E. et al. Is C-reactive protein level a marker of advanced motor and neuropsychiatric complications in Parkinson's disease? **Journal of Neural Transmission**, v.118, n.4, p.539-543, 2011.

HATTESOHLA, M.; FEISTELB, B.R.N.; SIEVERSC, H., LEHNFELDC, R.; HEGGERA, M.; WINTERHOFF, H. Extracts of Valeriana officinalis L. s.l. show anxiolytic and

antidepressant effects but neither sedative nor myorelaxant properties. **Phytomedicine**, v.15, p.2-15, 2008.

HAYES, W.A.; DiPASQUALE, L.C. **Acute toxicity and eye irritancy**. In: HAYES, A.W. Principles and methods of toxicology. 4 ed. Philadelphia: Taylor e Francis, 2001.

HECK, D.E.; VETRANO, A. M.; MARIANO, T. M.; LASKIN, J.D. UVB Light Stimulates Production of Reactive Oxygen Species. **The Journal of Biological Chemistry**, v.278, n.25, p. 22432-22436, 2003.

HEINZ, A.; SCHMID, L. G.; REISCHIES, F. M. Anhedonia in schizophrenic, depressed, or alcohol-dependent patients-neurobiological correlates. **Pharmacopsychiatry**, v.27, p.7-10, 1994.

HENSLER JG. Differential regulation of 5-HT<sub>1A</sub> receptors-G protein interactions in brain following chronic antidepressant administration. **Neuropsychopharmacology**, v.26, p.565-73, 2002.

HERKEN, H.; GUREL, A.; SELEK, S.; ARMUTCU, F.; OZEN, M.E.; BULUT, M., et al. Adenosine deaminase, nitric oxide, superoxide dismutase, and xanthine oxidase in patients with major depression: impact of antidepressant treatment. **Archives Medical Research**, v.38, n.2, p.247-252, 2007.

HIROYUKI, S.; KAORI, I.; OLIVER, G.; JUN-ICHIRO, N.; SHUJIRO, S.; VERONIKA, B.; YUKO, M.; SATOMI, S.; YOSHICHIKA, K.; YUTAKA, N.; JUNJI, T. Antidepressant Effect of Extracts from Ginkgo biloba Leaves in Behavioral Models. **Biological Pharmacology Bulletin**, v.29, n.8, p.1767-1770, 2006.

HIRSCHFELD, R.M. The comorbidity of major depression and anxiety disorders: recognition and management in primary care. **Prim Care Companion Journal Clinical Psychiatry**, v.3, 244-254, 2001.

HJORTH, S.; SHARP, T. Mixed agonist/antagonist properties of NAN-190 at 5-HT<sub>1A</sub> receptors: behavioural and in vivo brain microdialysis studies. **Life Science**, v.46, p.955-963, 1990.

HOCHMAN, S.; GARRAWAY, S.M.; MACHACEK, D.W.; SHAY, B.L. 5-HT receptors and the neuromodulatory control of spinal cord function. In: Cope, T.C. (Ed.), Motor Neurobiology of the Spinal Cord. **CRC Press**, Washington, p.47-87, 2003.

HOLSBOER F. Stress, hypercortisolism and corticosteroid receptors in depression: implications for therapy. **Journal Affect Disorders**, v. 62, p.77-91, 2001.

HOLSBOER F. Stress, hypercortisolism and corticosteroid receptors in depression: implications for therapy. **Journal Affective Disorders**, v.62, p.77-91, 2001.

HOLSEN, L.M.; LANCASTER, K.; KLIBANSKI, A. et al., "HPA-Axis hormone modulation of stress response circuitry activity in women with remitted major depression," **Neuroscience**, v.250, p. 733-742, 2013.

ISING, M.; HORSTMANN, S.; KLOIBER, S. et al., "Combined dexamethasone/corticotropin releasing hormone test predicts treatment response in major depression-a potential biomarker?" **Biological Psychiatry**, v.62, n.1, p.47-54, 2007.

JANERO, D.R. "Malondialdehyde and thiobarbituric acid reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury," **Free Radical Biology and Medicine**, v.9, n.6, p.515-540, 1990.

JANUSZ, W.; KLEINROK, Z. The role of the central serotonergic system in pilocarpine-induced seizures: receptor mechanisms. **Neuroscience Research**, v.7 p.144-153, 1989.

JIANG, X.; XU, K.; HOBERMAN, J.; TIAN, F.; MARKO, A.J.; WAHEED, J.F.; HARRIS, C.R.; MARINI, A.M.; ENOCH, M.A.; LIPSKY, R.H. BDNF variation and mood disorders: a novel functional promoter polymorphism and Val66Met are associated with anxiety but have opposing effects. **Neuropsychopharmacology**, v.30, n.7, p.1353-1361, 2005.

JOCA, S.R.L.; SKALISZ, L.L.; BEJAMINI, V.; VITAL, M.A.B.F.; ANDREATINI, R. The antidepressive-like effect of oxcarbazepine: possible role of dopaminergic neurotransmission. **European Neuropsychopharmacology**, v.10, p.223-228, 2000.

JOINER Jr, T.E.; BROWN, J.E.; WINGATE, L.R. The psychology and neurobiology of suicidal behavior. **Annual Review of Psychology**, v.56, p.287-314, 2005.

JUCÁ, D. M. **Propriedades farmacológicas dos monoterpenos  $\alpha$  e  $\beta$  pineno no músculo liso gastrointestinal de ratos: efeito miorrelaxante e pró-cinético**. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, Ceará, 2001.

KALUEFF, A.V.; TUOHIMAA, P. Mouse grooming microstructure is a reliable anxiety marker bidirectionally sensitive to GABAergic drugs. **European Journal Pharmacology**, v.508, p.147-153, 2005.

KAN, H.W.; MING, L. Effects of 5-HT<sub>1A</sub> in the incidence and treatment of depression. **Shandong Med.**, v.45, p.66-68, 2005.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T.M., 2000. In: **Principles of Neural Science**. McGraw Hill, New York, NY. HALES, 2006.

KASTER, M. P.; SANTOS, A. R. S.; RODRIGUES, A. L. S. Involvement of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the antidepressant-like effect of adenosine in the mouse forced swimming test. **Brain Research Bulletin**, v.67, 53-61, 2005.

KATALINIC, V.; MODUN, D.; MUSIC, I.; BOBAN, M. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2, 2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. **Comparative Biochemistry and Physiology C Toxicology Pharmacology**, v.140, n.1, p.47-52, 2005.

KATZ, L.; FLEISHER, W.; KJERNISTED, K.; MILANESE, P. A review of the psychobiology and pharmacotherapy of posttraumatic stress disorder. **Canadian Journal of Psychiatry**, v.50, p. 295-305, 1996.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica e clínica**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 204p.

KEITH, S. J.; MATTHEWS, S. M. The value of psychiatric treatment: its efficacy in severe mental disorders. **Psychopharmacology Bulletin**, v.29, p. 427-430. 1993.

KHANZODE, S.D.; DAKHALE, G.N.; KHANZODE, S.S.; SAOJI, A.; PALASODKAR, R. Oxidative damage and major depression: the potential antioxidant action of selective serotonin re-uptake inhibitors. **Redox Rep.**, v.8, p.365-370, 2003.

KHISTI R. T.; CHOPDE, C. T. Serotonergic agents modulate antidepressant-like effect of the neurosteroid 3 alpha-hydroxy-5alpha-pregnan-20-one in mice. **Brain Research**, v.865, p.291-300, 2000.

KIM, J.H.; KIM, S.Y.; LEE, S.Y.; JANG, C.G. Antidepressant-like effects of Albizzia julibrissin in mice: involvement of the 5-HT1A receptor system. **Pharmacological Biochemical Behavioral**, v.87, p.41-47, 2007.

KISS, A.; AGUILERA, G. Role of  $\alpha 1$ -adrenergic receptors in the regulation of corticotropin-releasing hormone mRNA in the paraventricular nucleus of the hypothalamus during stress. **Cellular Molecular Neurobiology**, v.20, p.683-94, 2000.

KITAYAMA, I.; NAKAMURA, S.; YAGA, T.; MURASE S.; NOMURA, J.; KAYAHARA, T. et al. Degeneration of locus coeruleus axons in stress-induced depression model. **Brain Research Bulletin**, v.35, p.573-580, 1994.

KLOET, E.R.; JOELS, M.; HOLSBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. **Nature Review Neuroscience**, v.6, p. 463-475, 2005.

KODYDKOVÁ, J.; VÁVROVÁ, L.; ZEMAN, M.; JIRÁK, R.; MACÁSEK, J.; STANKOVÁ, B. et al. Antioxidative enzymes and increased oxidative stress in depressive women. **Clinical Biochemical**, v.42, p.1368-1374, 2009.

KOSTOWSKI, W.; JERLICZ, M.; BIDZINSKI, A.; HAUPTMANN, M. Evidence for the existence of two opposite noradrenergic brain systems controlling behavior. **Psychopharmacology**, v.59, p.311-312, 1978.

KREISS, J.D.S.; LUCKI, I. Effects of acute and repeated administration of antidepressant drugs on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine measured in vivo, **Journal Pharmacological Experimental Therapy**, v.254, p.866-876, 1995.

KRYSIAK, B.; RYDZYNSKI, K. Comparative studies on the usefulness of using a fixed dose of a stepwise method of dosing for evaluating acute chemical toxicity. **Med Pr.**, v.48, n.5, p.561-578, 1997.

KULOGLU, M.; USTUNDAG, B.; ATMACA, M.; CANATAN, H.; TEZCAN, A.E.; CINKILINC, N. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in patients with schizophrenia and bipolar disorder. **Cellular Biochemical Function**, v.20, p.171-175, 2002.

KUMAMARU, E.; NUMAKAWA, T.; ADACHI, N. et al., "Glucocorticoid prevents brain-derived neurotrophic factor-mediated maturation of synaptic function in developing hippocampal neurons through reduction in the activity of mitogen-activated protein kinase," **Molecular Endocrinology**, v. 22, n.3, p.546-558, 2008.

KUMAR, R. et al. Evaluation of *Cymbopogon martinii* oil extract for control of postharvest insect deterioration in cereals and legumes. **Journal of Food Protection**, v.70, n.1, p.172-178, 2007.

KUPPERBERG, H.J.; SCHMUTZ, M. Screening of new compounds and role of the pharmaceutical industry. In: ENGEL, J.; PREDLEY, T. (ed). **Epilepsy: a comprehensive textbook**. Philadelphia: Lippincott-Raven publishers, p.1417-1434, 1997.

LAM, R.W.; WAN, D.D.; COHEN, N.L.; KENNEDY, S.H. Combining antidepressants for treatment-resistant depression: a review. **Journal Clinical Psychiatry**, v.63, p.685-693, 2002.

LANFUMEY, L.; HAMON, M. Central 5-HT (1A) receptors: regional distribution and functional characteristics. **Nuclear Medicine and Biology**, v.27, n.5, p. 429-435, 2000.

LANG, A.E.; LOZANO, A.M. Parkinson's disease. First of two parts. **New England Journal Medicine**, v.339, p.1044-1053, 1998.

LEITCH, M. M.; INGRAM, C. D.; YOUNG, A.H.; MCQUADE, R.; GARTSIDE, S. E. Flattening the corticosterone rhythm attenuates 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptor function in the rat: relevance for depression. **Neuropsychopharmacology**, v.28, p.119-125, 2003.

LESCH, K. P. Variation of serotonergic gene expression: neurodevelopment and the complexity of response to psychopharmacologic drugs. **European Neuropsychopharmacology**, v.11, n.6, p.457-474, 2001.

LI, J. M.; KONG, L. D.; WANG, Y. M.; CHENG, C. H.; ZHANG, W. Y.; TAN, W.Z. Behavioral and biochemical studies on chronic mild stress models in rats treated with a Chinese traditional prescription Banxia-houpu decoction. **Life Science**, v.74, p.55-73, 2003.

LIEBMAN, J.; HALL, N.; PROWSE, J. Effect of various catecholamine receptor antagonists, muscle relaxation and physical hindrance on shuttlebox self-stimulation. **Pharmacological Biochemical Behavioral**, v.16, p.785-790, 1982.

LINDE, K.; KNUPPEL, L. Large-scale observational studies of hypericum extracts in patients with depressive disorders – a systematic review. **Phytomedicine**, v.12, p.148-157, 2005.

LINDE, K.; SCHUMANN, I.; MEISSNER, K.; JAMIL, S.; KRISTON, L.; RUCKER, G.; ANTES, G.; SCHNEIDER, A. Treatment of depressive disorders in primary care protocol of a multiple treatment systematic review of randomized controlled trials. **BMC Fam Pract**, v.15, p.12-127, 2011.

LI-TAO, Y.A.; YU-CHENG, L.A.; YING, P.A.; JIAN-MEI, L.A.; QUN, X.A.; SHI-FU, M.A.; CHUN-FENG, Q.; FU-XIN, J.A.; HONG-XI, X.C.; XIAO-BO, L.B.; LING-DONG, K.; HSIANG-FU, K. Antidepressant-like effects of psoralidin isolated from the seeds of *Psoralea Corylifolia* in the forced swimming test in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.32, p.510-519, 2008.

LITTLE, J.T.; KETTER, T.A.; MATHÉ, A.A.; FRYE, M.A.; LUCKENBAUGH, D.; POST, R. M. Venlafaxine but not bupropion decreases cerebrospinal fluid 5-hydroxyindoleacetic acid in unipolar depression. **Biological Psychiatry**, v.45, p.285-289, 1999.

LOBATO, K.R.; CARDOSO, C.C.; BINFARE, R.W. “ $\alpha$ -Tocopherol administration produces an antidepressant-like effect in predictive animal models of depression,” **Behavioural Brain Research**, v.209, n.2, p.249-259, 2010.

LOSCHER, W.; SHIMIDT, D. New horizons in the development of antiepileptic drugs. **Epilepsy research**, v.50, p.316, 2002.

LUDKA, F.; ZOMKOWSKI, A.D.E.; CUNHA, M.P.; DAL-CIM, T.; ZENI, A.L.B.; RODRIGUES, A.L.S.; TASCA, C.I. Acute atorvastatin treatment exerts antidepressant-like effect in mice via the L-arginine–nitric oxide–cyclic guanosine monophosphate pathway and increases BDNF levels. **European Neuropsychopharmacology**, v.23, p.400-412, 2013.

LUKASH, A.I.; ZAIKA, V.G.; KUCHERENKO, A.O.; MILIUTINA, N.P. Free radical processes and antioxidant system in depression and treatment efficiency. **Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova**, v.102, p.41-44, 2002.

MACDONALD, T.M. Treatment of depression: prescription for success? **Primary Care Psychiatry**, v.3, p.7-10, 1997.

MACGILLIVRAY, S.; ARROLL, B.; HATCHER, S.; OGSTON, S.; REID, I.; SULLIVAN, F.; WILLIAMS, B.; CROMBIE, I. Efficacy and tolerability of selective serotonin reuptake inhibitors compared with tricyclic antidepressants in depression treated in primary care: systematic review and meta analysis. **British Medical Journal**, v.326, p.1-6, 2003.

MACHADO, D. G.; BETTIO, L. E. B.; CUNHA, M. P.; CAPRA, J. C.; DALMARCO, J. B.; PIZZOLATTI, M. G.; RODRIGUES, A. L. S. Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: Involvement of the monoaminergic system. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.33, p.642-650, 2009.

MACHADO, D. G.; BETTIO, L. E. B.; CUNHA, M. P.; SANTOS, A. R. S.; PIZZOLATTI, M. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; RODRIGUES, A. L. S. Antidepressant-like effect of rutin isolated from the ethanolic extract from *Schinus molle* L. in mice: Evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. **European Journal of Pharmacology**, v.587, p.163-168, 2008.

MACHADO, D. G.; KASTER, M. P.; BINFARE, R. W.; DIAS, M.; SANTOS, A. R. S.; PIZZOLATTI, M. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; RODRIGUES, A. L. S. Antidepressant-like effect of the extract from leaves of *Schinus molle* L. in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.31, p.421-428, 2007.

MAES, M.; GALECKI, P.; CHANG, Y. S.; BERK, M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro) degenerative processes in that illness. **Progress Neuropsychopharmacology Biological Psychiatry**, v.35, n.3, p.676-692, 2011.

MAIMONE, T. J.; BARAN, P. S. Modern synthetic efforts toward biologically active terpenes. **Nature Chemical Biology**, v.3, n.7, 2007.

MAKHAIK, M. et al. Evaluation of anti-mosquito properties of essential oils. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v.64, n.2, p.129-133, 2005.

MALONE, M. H. Pharmacological approaches to natural product, screening and evaluation. In.: *New natural products and plant drugs with pharmacological, biological or therapeutically activity*. Berlin: H. Wagner, Wolf Springer-Verlag, 1977.

MANN, J.J.; MALONE, K.M.; DIEHL, D.J.; PEREL, J.; COOPER, T.B.; MINTUM, M.A. Demonstration in vivo of reduced serotonin responsivity in the brain of untreated depressed patients. **Am Journal Psychiatry**. v.153, p.174-182, 1996.

MARGIS, R.; PICON, P.; COSNER, F.; SILVEIRA, R. O. et al. Relação entre estressores, estresse e ansiedade. **Revista de Psiquiatria**, v.25(S 1), p. 65-73, 2003.

MARINHO, M. M. F.; SOUSA, F. C. F.; BRUIN, V. M. S.; AGUIAR, L. M. V.; PINHO, R. S. N.; VIANA, G. S. B. Inhibitory action of a calcium channel blocker (nimodipine) on seizures and brain damage induced by pilocarpine and lithium-pilocarpine in rats. **Neuroscience letters**, v.235, p.13-16, 1997.

MARIZ, S. R., CERQUEIRA, G. S.; ARAÚJO, W. C.; DUARTE, J. C.; MELO, A. F. M.; SANTOS, H. B.; OLIVEIRA, K.; DINIZ, M. F. F. M.; MEDEIR, I. A. Estudo toxicológico

agudo do extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. em ratos. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, n.3, 372-378, 2006.

MARUYAMA, N.; SEKIMOTO, Y.; IS HIBASHI, H.; INOUE, S.; OSHIMA, H.; YAMAGUCHI, H.; ABE, S. Suppression of neutrophil accumulation in mice by cutaneous application of geranium essential oil. **Journal Inflammation**, v.2, n.1, p.34-39, 2005.

MASAND, P. S.; GUPTA, S. Long-term side effects of newer-generation antidepressants: SSRIS, venlafaxine, nefazodone, bupropion, and mirtazapine. **Annual Clinical Psychiatry**, v.14, p.175-182, 2002.

MATTHEWS, K., CHRISTMAS, D., SWAN, J., SORRELL, E. Animal models of depression: navigating through the clinical fog. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.29, p.503-513, 2005.

MAYORGA, A. J.; DALVI, A.; PAGE, M. E.; ZIMOV-LEVINSON, S.; HEN, R.; LUCKI, I. Antidepressant-like behavioral effects in 5-hydroxytryptamine (1A) and 5-hydroxytryptamine (1B) receptor mutant mice. **Journal Pharmacology Experimental Therapy**, v.298, p.1101-1107, 2001.

MCKINNEY, W.T.; BUNNEY, W.E. Animal model of depression. I. Review of evidence: implications for research. **Archives of General Psychiatry**, v.21, p. 240-248, 1969.

MCLEOD, T. M.; LOPEZ-FIGUEROA, A.L.; LOPEZ-FIGUEROA, M.O. Nitric oxide, stress, and depression. **Psychopharmacol Bulletin**, v.35, p.24-41, 2001.

MELDRUM, B. Action of established and novel anticonvulsant drugs on the basic mechanisms of epilepsy. **Epilepsy research**, v.11, p.67-77, 1996.

MELO, C. T.; DE CARVALHO, A. M.; MOURA, B. A.; TEIXEIRA, C. P.; VASCONCELOS, L. F.; FEITOSA, M. L.; DE OLIVEIRA, G. V.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CHAVEZ GUTIERREZ, S. J.; DE FRANÇA FONTELES, M. M.; VASCONCELOS, S. M.; DE SOUSA F. C. Evidence for the involvement of the serotonergic, noradrenergic, and dopaminergic systems in the antidepressant-like action of riparin III obtained from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Fundamental Clinical and Pharmacology**, v.27, n.1, p.104-112, 2011.

MELO, F. H. C.; MOURA, B. A.; SOUSA, D. P.; VASCONCELOS, S. M. M.; MACEDO, D. S.; FONTELES, M. M. F.; VIANA, G. S. B.; SOUSA, F. C. F. Antidepressant-like effect of carvacrol. (5-Isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement of dopaminergic system. **Fundamental Clinical Pharmacology**, v.25, n.3, p.362-367, 2011.

MELO, F. B. **Estudo dos efeitos de *Lantana Camara* (Verbeneae) sobre a fertilidade e reprodução de ratos.** Dissertação de mestrado em Ciências veterinárias, Escola de veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.



MIGUEL, H.; BJORN, F.; HARTWIG, S.; ROMANUS, L.; MIRJAM, H.; HILKE, W. Extracts of *Valeriana officinalis* L. s.l. show anxiolytic and antidepressant effects but neither sedative nor myorelaxant properties. **Phytomedicine**, v.15, p.2-15, 2008.

MILLAN, M. J. The role of monoamines in the actions of established and "novel" antidepressant agents: a critical review. **European Journal Pharmacological**, v.500, 371-384, 2004.

MILLER, H. L., DELGADO, P. L., SALOMON, R. M., HENINGER, G. R., CHARNEY, D. S. Effects of  $\alpha$ -methyl-para-tyrosine (AMPT) in drug-free depressed patients. **Neuropsychopharmacology**, v.14, p.151-157, 1996.

MITANI, H.; SHIRAYAMA, Y.; YAMADA, T.; KAWAHARA, R. Plasma levels of homovanillic acid, 5-hydroxyindoleacetic acid and cortisol, and serotonin turnover in depressed patients. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 30, p.531-534, 2006.

MOLLER, H.; VOLZ, H. Drug treatment of depression in the 1990s. **Drugs**, v.52, p. 625-638. 1996.

MOREAU, J. L.; JENCK, F.; MARTIN, J. R.; MORTAS, P.; HAEFELY, W. E. Effects of moclobemide, a new generation reversible MAO-A inhibitor, in a novel animal model of depression. **Pharmacopsychiatry**, v.26, p.30-33, 1993.

NAKADATE, K.; MATSUKAWA, M.; OKADO, N. Identification of adrenoceptor subtype-mediated changes in the density of synapses in the rat visual cortex. **Neuroscience**, v.138, p.37-46, 2006.

NAKAGAWA, Y.; ISHIMA, T.; TAKASHIMA, T. The 5-HT<sub>3</sub> receptor agonist attenuates the action of antidepressants in the forced swim test in rats. *Brain Research*, v.786, p.189-193, 1998.

NAKAMURA, T.; LIPTON, S. A. Cell death: protein misfolding and neurodegenerative diseases. **Apoptosis**, v.14, p.455-468, 2009.

NATHAN, P. J. *Hypericum perforatum* (St John's Wort): a non-selective reuptake inhibitor? A review of the recent advances in its pharmacology. **Journal Psychopharmacology**, v.15, p.47-54, 2001.

NAYEBI, A. M.; RAD, S. R.; SABERIAN, M.; AZIMZADEH, S.; SAMINI, M. Buspirone improves 6-hydroxydopamine-induced catalepsy through stimulation of nigral 5-HT<sub>1A</sub> receptors in rats. **Pharmacological Reports**, v.62, n.2, p.258-64, 2010.

NEMEROFF, C. B.; OWENS, M. J. Treatment of mood disorders. **Natural Neuroscience**. v.5 (Suppl), p.1068-1070, 2002.

NESTLER, E. J.; BARROT, M.; DILEONE, R.J.; EISCH, A. J.; GOLD, S. J.; MONTEGGIA L.M. Neurobiology of depression. **Neuron**. v. 34, 13-25, 2002.

NIBUYA, M.; NESTLER, E. J.; DUMAN, R. S. Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. **Journal Neuroscience**, v.16, n.7, p.2365-2372, 1996.

NICHOLLS, D. G. Oxidative Stress and Energy Crises in Neuronal Dysfunction. *Ann. N.Y. Academic Science*, v.1147, p.53-60, 2008.

NOVIO, S.; NUNEZ, M. J.; AMIGO, G.; GARABAL, M. F. "Effects of fluoxetine on the oxidative status of peripheral blood leucocytes of restraint-stressed mice," **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.109, n.5, p.365-371, 2011.

NUTT, D. J. Relationship of neurotransmitters to the symptoms of major depressive disorder. **Journal Clinical Psychiatry**, v.69 (Suppl. E1), p.4-7, 2008.

NUTT, D. J. The role of dopamine and norepinephrine in depression and antidepressant treatment. **Journal Clinical Psychiatry**, v.67, p.3-8, 2006.

O'LEARY, O. F., BECHTHOLT, A. J., CROWLEY, J. J., HILL, T. E., PAGE, M. E., AND LUCKI, I. Depletion of serotonin and catecholamines block the acute behavioral response to different classes of antidepressant drugs in the mouse tail suspension test. **Psychopharmacology (Berl.)**. v.192, p.357-371, 2007.

OECD (Organization for economic co-operation and development) 2001. **Guideline for Testing of Chemicals: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Guideline: 423**. [http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECD\\_GL423.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECD_GL423.pdf). Acesso em julho de 2013.

OLIVEIRA, C. C. **Estudo toxicológico pré-clínico do extrato aquoso e do óleo essencial das folhas de *Alpínia Zerumbet* (PERS.) Burt & Smith**. Dissertação (Mestrado). Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; VIEIRA, W. L.; FREIRE, K. R. L.; TRAJANO, V. N.; LIMA, I. O.; SOUZA, E. L.; TOLEDO, M. S.; SILVA-FILHO, R. N. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Revista brasileira de farmacognosia**, v.16, n.1, p.77-82, 2006.

OLMOS, G.; DEGREGORIO-ROCASOLANO, N.; PAZ-REGALADO, M.; GASULL, T.; ASSUMPCIO-BORONAT, M.; TRULLAS, R.; VILLARROEL, A.; LERMA, J.; GARCIA-SEVILLA, J.A. Protection by imidazoline drugs and agmatine of glutamate-induced neurotoxicity in cultured cerebellar granule cells through blockade of NMDA receptor, **Br. J. Pharmacol.**, v.127, p.1317- 1326, 1999.

OLSON, R. GABA. In.: DAVIS, K.; CHARNEY, D.; COYLE, J.; NEMEROFF, C.; editors. **Neuropsychopharmacology: the fifth generation of progress**. Philadelphia: Lippincott, Williams's e Wilkins, 2002.

ORDWAY, G.A.; WIDDOWSON, P.S.; SMITH, K.S; HALARIS, A. Agonist binding to alpha 2- adrenoceptors is elevated in the locus ceruleus from victims of suicide. **Journal neurochemical**, v.63, p.617-624, 1994.

OTOBONE, F. J.; SANCHES, A. C. C.; NAGAE, R.; MARTINS, J. V. C.; SELA, V. R.; MELLO, J. C. P.; AUDI, E. A. Effect of Lyophilized Extracts from Guaraná Seeds [Paullinia cupana var. sorbilis (Mart.) Ducke] on Behavioral Profiles in Rats. **Phytotherapy Research**, v. 21, p.531-535, 2007.

OZCAN, M. E.; GULEC, M.; OZEROL, E.; POLAT, R.; AKYOL, O. Antioxidant enzyme activities and oxidative stress in affective disorders. **International Clinical Psychopharmacology**, v.19, n.2, p.89-95, 2004.

PÁEZ-PEREDA, M. New drug targets in the signalling pathways activated by antidepressants. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v.29, p.1010-1016, 2005.

PAGE, M. E.; DETKE, M. J.; DALVI, A.; KIRBY, L. G.; LUCKI, I. Serotonergic mediation of the effects of fluoxetine, but not desipramine, in the rat forced swimming test, **Psychopharmacology**, v. 147, p.162-167, 1999.

PAMPHLETT, R.; SLATER, M.; THOMAS, S. Oxidative damage to nucleic acids in motor neurons containing mercury. **Journal Neurology Science**, v.159, p.121-126, 1998.

PAPAKOSTAS, G. I. Dopaminergic based pharmacotherapies for depression. **European Neuropsychopharmacology**, v.16, p.391-402, 2006.

PAULINO, C. A.; PREZOTTO, A. O.; CALIXTO, R. T. Associação entre estresse, depressão e tontura: uma breve revisão. *Revista Equilíbrio Corporal e Saúde*, v.1, p.33-45, 2009.

PEET, M.; MURPHY, B.; SHAY, J.; HORROBIN, D. Depletion of omega-3 fatty acid levels in red blood cell membranes of depressive patients. **Biological Psychiatry**, v.43, n.5, p.315-319, 1998.

PELLOW, S., CHOPIN, P., FILE, S.E., BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal Neuroscience Methods**, v.14, n.3, p.149-167, 1985.

PEROUTKA, S. J. 5-hydroxytryptamine receptor subtypes. **Annuals Review Neuroscience**, v.7, p.45, 1988.

PIATO, A. L.; DETANICO, B. C.; JESUS, J. F.; LHULLIER, F. R. L.; NUNES, D. S.; ELISABETSKY, E. Effects of Marapuama in the chronic mild stress model: Further indication of antidepressant properties. **Journal of Ethnopharmacology**, v.118, p.300-304, 2008.

PIRES JUNIOR, H. B.; BORGES, L. M. F.; DE SOUSA, L. A. D.; CUNHA, L. C.; LINO JUNIOR, R. S.; MELO, D. F. A.; PEREIRA, M. E. Avaliação da toxicidade aguda o extrato hexânico de frutos da *Melia azedarach* (MELIACEAE) em camundongos. **Ciência Animal Brasileira**, v.13, n.4, 2012.

PORSOLT, R. D. Animal models of depression: utility for transgenic research. **Neuroscience Review**, v.11, p.53-58, 2000.

PORSOLT, R. D., ANTON, G., BLAVET, N., JALFRE, M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal Pharmacological**, v.47, n.4, p.379-391, 1978.

PORSOLT, R. D., PICHON, M. L. E., JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressant. **Archives internationales de Pharmacodynamie et de therapy**, v. 229, p.327-336, 1977.

POSSER, T.; KASTER, M. P.; BARAÚNA, S. C.; ROCHA, J. B.; RODRIGUES, A. L.; LEAL, R. B. Antidepressant-like effect of the organoselenium compound ebselen in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. **European Journal Pharmacology**, v.602, n.1, p.85-91, 2009.

PRANGE JR., A. J.; WILSON, I. C.; LYNN, C. W.; ALLTOP, L. B.; STIKELEATHER, R. A. L-tryptophan in mania. Contribution to a permissive hypothesis of affective disorders. **Archives of General Psychiatry**, v.30, p.56-62, 1974.

PRIGERSON, H. G; DESAI, R. A.; LUI-MARES, W.; ROSEHECK, R. A. Suicidal ideation and suicidal attempts in homeless mentally ill persons. **Social Psychiatry and Epidemiology**, v.38, p.213-9, 2003.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal Pharmacology**, v.463, p.3-33, 2003.

PUCCI, L. L. **Avaliação da toxicidade oral aguda e das atividades diurética e antioxidante da *Rudgea virbunoides* (CHAM.) BENTH. (Congonha de Bugre)**. 87f. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

QIU, J. Back to the future” for Chinese herbal medicines. **Natural Review Drug Discovery**, v.6, p.506-7, 2007.

QUINTANS-JUNIOR, L.; ROCHA, R.F.; CAREGNATO, F.F.; MOREIRA, J.C.F.; SILVA, F.A.; ARAUJO,A.A.S.; SANTOS, J.P.A.; MELO,M.S.; SOUSA, D.P.; BONJARDIM, L.R.;

GELAIN, D.P. Antinociceptive Action and Redox Properties of Citronellal, an Essential Oil Present in Lemongrass. **Journal of Medicinal Food**, v.14, n.6, p.630-639, 2011.

RADWAŃSKA-WALA, B.; BUSZMAN, E.; DRUŻBA, D. Udział reaktywnych form tlenu w patogenezie chorób ośrodkowego układu nerwowego. *Wiad Lek*, LXI: 1–3 [in Polish], 2008.

RANDRUP, A.; MUNKVAD, I.; FOG, R.; GERLACH, J.; MOLANDER, L.; KJELLBERG, B. et al. Mania, depression and brain dopamine. **Current Developments in Psychopharmacology**, v.2, p.205-248, 1975.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**. 6ª edição, Elsevier, Rio de Janeiro, Elsevier, 2007.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon Amsterdam**. v.39, p.603-613. 2001.

REIS, H.J.; NICOLATO, R.; BARBOSA, I.G.; TEIXEIRA, D.O.; PRADO, P.H.; ROMANO SILVA, M.A.; TEIXEIRA, A.L. Increased serum levels of brain-derived neurotrophic factor in chronic institutionalized patients with schizophrenia., **Neuroscience Letters**, v.439, n.2, p.157-159, 2008.

RENARD, C.E.; FIOCCO, A.J.; CLENET, F.; HASCOET, M.; BOURIN, M. Is dopamine implicated in the antidepressant-like effects of selective serotonin reuptake inhibitors in the mouse forced swimming test? **Psychopharmacology**, v.159, p.42-50, 2001.

RÉNÉRIC, J.P.; LUCKI, I. Antidepressant behavioral effects by dual inhibition of monoamine reuptake in the rat forced swimming test. **Psychopharmacology (Berl)**, v.136, p.190-7, 1998.

RENERIC, J.P.; LUCKI, I. Antidepressant behavioral effects by dual monoamine reuptake in the rat forced swimming test. **Psychopharmacology (Berl)**, v.136, p.190-197, 1998.

REX, A.; STEPHENS, D.N.; FINK, H. "Anxiolytic" action of diazepam and abecarnil in a modified open field test. **Pharmol. Biochem. Behav.**, v.53, p.1005-1012, 1996.

REYNOLDS, E.H. Brain and mind: a challenge for WHO. **Lancet**, v.361, p.1924-1925. 2003.

RIBEIRO, L.; KAPCZINSK, F. Ansiedade In: KAPCZINSK, F.; QUEVEDO, J.; IZQUIERDO, I. editores. **Bases biológicas dos transtornos psiquiátricos**. Porto Alegre. Artmed editora, p.133-141, 2000.

RILEY, H.; SPINKS, A. Biological assessment of tranquilizers. **Journal Pharmacology**, v.10, p. 675-71, 1958.

RIO, D.D.; STEWART, A.J.; PELLEGRINI, N. "A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress," **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v.15, n.4, p.316-328, 2005.

RIOS, E.R.V.; ROCHA, N.F.M.; CARVALHO A.M.R.; VASCONCELOS, L.F.; DIAS, M.L.; SOUSA, D.P.; SOUSA, F.C.F.; FONTELES, M.M.F. TRP and ASIC channels mediate the antinociceptive effect of citronellyl Acetate. **Chemico-Biological Interactions**, v.203, p. 573-579, 2013.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. “**Terpenóides**” e “**Farmacognosia farmacobioteecnologia - terpenóides**” (Premier, ed.), São Paulo, p.91-103, 1997.

RODRIGUES, A.L.S.; SILVA, G.L.; MATTEUSSI, A.S.; FERNANDES, E.S.; MIGUEL, O.G.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B.; SANTOS, A.R. Involvement of monoaminergic system in the anti-depressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. **Life Science**, v.70, p.1347-1358, 2002.

RODRÍGUEZ-LANDA, J.F.; CONTRERAS, C.M. A review of clinical and experimental observations about antidepressant actions and side effects produced by *Hypericum perforatum* extracts. **Phytomedicine**, v.10, p.688-699, 2003.

RODRÍGUEZ-LANDA, J.F.; CONTRERAS, C.M. A review of clinical and experimental observations about antidepressant actions and side effects produced by *Hypericum perforatum* extracts. **Phytomedicine**, v.10, p.688-699, 2003.

ROSS, D.; MOLDEUS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In: Vigo-Pelfrey C. (ed). **Membrane lipid oxidation**. 1 st ed. Boca raton. CRC press, p.151-170, 1991.

RUBIO, G.; SAN, L.; LÓPEZ-MUÑOZ, F.; ALAMO, C. Reboxetine adjunct for partial or nonresponders to antidepressant treatment. **J Affect Disorders**, v.81, p.67-72, 2004.

SACHAR, E.J.; BARON, M. The biology of affective disorders. **Annu Review Neuroscience**, v.2, p.505-517, 1979.

SACHETTI, C. G.; FASCINELI, M.L.; SAMPAIO, J.A.; LAMEIRA, O.A.; CALDAS, E.D. Avaliação da toxicidade aguda e potencial neurotóxico do óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.19, n.4, p.937-941.

SADOCK, B. J. Compêndio de psiquiatria: ciências do comportamento e psiquiatria clínica. 9ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

SADOCK, B. J; SADOCK, V. A, editors. **Kaplan & Sadock's Synopsis of Psychiatry: behavioral sciences / clinical psychiatry**. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Klumer Business Press; 2007.

SAHRAEI, H.; GHAZZAGHI, H.; ZARRINDAST, M.R.; GHOSHONI, H.; SEPEHRI, H.; HAERI-ROHAN, A. The role of alpha-adrenoceptor mechanism(s) in morphine-induced conditioned place preference in female mice. **Pharmacology Biochemical Behavioral**, v.78, p.135-141, 2004.

SAKAI, K.; GAO, X.M.; HASHIMOTO, T.; TAMMINGA, C.A. Traditional and new antipsychotic drugs differentially alter neurotransmission markers in basal gangliathalamocortical neural pathways. **Synapse.**, v.39, n.2, p.152-160, 2001.

SAKAKIBARA, H.; ISHIDA, K.; GRUNDMANN, O.; NAKAJIMA, J.; SEO, S.; BUTTERWECK, V. et al. Antidepressant effect of extracts from Ginkgo biloba leaves in behavioral models. **Biological Pharmacol Bulletin**, v.29, p.1767-1770, 2006.

SAKAKIBARA, H.; ISHIDA, K.; GRUNDMANN, O.; NAKAJIMA, J.I.; SEO, S.; BUTTERWECK, V.; MINAMI, Y.; SAITO, S.; KAWAI, Y.; NAKAYA, Y.; TERAOKA, J. Antidepressant effect of extracts from Ginkgo biloba leaves in behavioral models. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.29, p.1767-1770, 2006.

SAPOLSKY, R.M.; ROMERO, L.M.; MUNCK, A.U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocrine Reviews**, v.21, p.55-89, 2006.

SARANDOL, A.; SARANDOL, E.; EKER, S.S.; ERDINC, S.; VATANSEVER, E.; KIRLI, S. Major depressive disorder is accompanied with oxidative stress: short-term antidepressant treatment does not alter oxidative antioxidative systems. **Human Psychopharmacology**, v. 22, p.67-73, 2007.

SARANDOL, A.; SARANDOL, E.; EKER, S.S.; ERDINC, S.; VATANSEVER, E.; KIRLI, S. Major depressive disorder is accompanied with oxidative stress: short-term antidepressant treatment does not alter oxidative-antioxidative systems. **Hum Psychopharmacology**, v.22, n.2, p.67-73, 2007.

SARGENT, P.A.; KJAE, K.H.; BENCH, C.J.; RABINER, E.A.; MESSA, C.; MEYER, J. Brain serotonin 1A receptor binding measured by positron emission tomography with [<sup>11</sup>C] WAY-100635: effects of depression and antidepressant treatment. **Archives of General Psychiatry**, v.57, p.174-180, 2000.

SARI, Y. Serotonin 1 B receptors: from protein to physiological function and behavior. **Neuroscience Biobehavioral Review**, v.28, n.6, p.565-582, 2004.

SAVEGNAGO, L., JESSE, C.R., PINTO, L.G., ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA, C.E., ZENI, G. Monoaminergic agents modulate antidepressant-like effect caused by diphenyl diselenide in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v.3, p.1261-1269, 2007.

SAWAKI, L.; WERHAHN, K.J.; BARCO, R.; KOPYLEV, L.; COHEN, L.G. Effect of an  $\alpha_1$ -adrenergic blocker on plasticity elicited by motor training. **Experimental Brain Research** v.148, p.504-8, 2003.

SCHILDKRAUT, J.J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. **American Journal of Psychiatry**, v. 122, p. 509-522, 1965.

SCHINDOWSKI, K.; BELARBI, K.; BUE'E, L. Neurotrophic factors in Alzheimer's disease: role of axonal transport. **Genes, Brain and Behavioral**, v.7 (S1), p. 43-56, 2008.

SCHULIGA, M.; CHOUCANE, S.; SNOW, E.T. Up regulation of glutathione-related genes and enzyme activities in cultured human cells by sublethal concentrations of inorganic arsenic. **Toxicology Science**, v.70, p.183-192, 2002.

SCHWARTING, R.; HUSTON, J. Behavioral concomitants of regional changes in the brain's biogenic amines after apomorphine and amphetamine. **Pharmacology Biochemical Behavioral**, v.41, p.675-682, 1992.

SHAN, X; AW, T.Y.; JONES, D.P. Glutathione-dependent protector against oxidative injury. **Pharmacology Therapy**, v.47, p. 61-71, 1990.

SHARIFI, H.; NAYEBI, A.M.; FARAJNIA, S. Dose-Dependent Effect of Fluoxetine on 6-OHDA-Induced Catalepsy in Male Rats: A Possible Involvement of 5-HT<sub>1A</sub> Receptors. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v.3, n.1, p.203-206, 2013.

SHEN, J.W.; LIANG, Z.J. Advances in research on biological etiology of depression and the antidepressants. **Pharmaceutical Care and Research**, v.7, 94-99, 2007.

SHEN, K.H.; CHEN, Z.T.; DUH, P.D. Cytotoxic effect of eucalyptus citriodora resin on human hepatoma HepG2 cells. **American Journal Chinese of Medicine**, v. 40, p. 399-413, 2012.

SHER, L.; MANN, J.J.; TRASKMAN-BENDZ, L.; WINCHEL, R.; HUANG, Y.Y.; FERTUCK, E.; STANLEY, B.H. Lower cerebrospinal fluid homovanilic acid levels in depressed suicide attempters. **Journal of Affective Disorders**, v.90, p.83-89, 2006.

SHIPLEY, M.T. GRIFF, E.R.; ENNIS, M.; EL-ETRI. Evidence for cholinergic regulation of basa, norepinephrine release in the rat olfactory bulb. **Neuroscience**, v.9, p.611-617, 1999.

SILVA, C.V.; DETONI, C.B.; VELOZO, E.S.; GUEDES, M.L.S. Alcalóides e outros metabólitos do caule e frutos de *Zanthoxylum tingoassuiba* A. St. Hil. **Química Nova**, v.31, n. 8, p.2052-2055, 2008.

SIMÕES, C.M.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In.: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª Ed. Florianópolis. Ed. da UFSC, 2004.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.G.C.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed, Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004. 1096p.



SINGEWALD, N.; SCHNEIDER, C.; PFITSCHER, A.; PHILLIPU, A. In vivo release of catecholamines in the locus coeruleus. **Naunyn-Schmied Archives Pharmacology**, v.350, p.339-345, 1994.

SOUSA, D.P. Medicinal essential oils: Chemical, pharmacological and therapeutic aspects. New York: Nova Science Publishers, 2012.

SRIVASTAVA, N.; BARTHWAL, M. K.; DALAL, P. K. et al. A study on nitric oxide, beta-adrenergic receptors and antioxidant status in the polymorphonuclear leukocytes from the patients of depression. **Journal Affective Disorders**, v.72, p.45-52, 2002.

STARR, M.S.; STAAR, B.S. Behavioral synergism between the dopamine agonist SKF38393 and LY171555 in dopamine depleted mice: Antagonism by sulpiride reveals only stimulant postsynaptic D2 receptors. **Pharmacology Biochemical Behavioral**, v.33, n.1, p.41-44, 1989.

STERU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v.85, p.367-370, 1985.

STOCKMEIER, C. A. Neurobiology of serotonin in depression and suicide. *Ann. N. Y. Academic Science*, v. 836, p.220-232, 1997.

STONE, E.; QUARTERMAIN, D. Rate dependent behavioral effects of stimulation of central motoric  $\alpha$ 1-adrenoceptors: hypothesized relation to depolarization blockade. **Psychopharmacology**, v.178, p.109-14, 2004.

STOUT, J.C.; WEISS, J.M. An animal model for measuring behavioral responses to anxiogenic and anxiolytic manipulation. **Pharmacology Biochemical Behavioral**, v.47, p.459-465, 1994.

STROHLE, A.; HOLSBOER, F. "Stress responsive neurohormones in depression and anxiety," *Pharmacopsychiatry*, v.36, n.3, p. 207-214, 2003.

SUBHAN, F.; KARIM, N.; GILANI, A.H.; SEWELL, R.D.E. Terpenoid Content of Valeriana wallichii Extracts and Antidepressant-like Response Profiles. **Phytotherapy Research**, v. 24, p.686-691, 2010.

SUKOFF-RIZZO, S.J.; NEAL, S.J.; HUGHES, Z.A. et al., "Evidence for sustained elevation of IL-6 in the CNS as a key contributor of depressive-like phenotypes," **Translational Psychiatry**, v.2, 2012.

SWANSON, C.J.; HEATH, S.; STRATFORD, T.R.; KELLEY, A.E. Differential behavioral responses to dopaminergic stimulation of nucleus accumbens subregions in the rat. **Pharmacology Biochemical Behavioral**, v.58, p.933-945, 1997.

SWIERGIEL, A.H.; LESKOV, I.L.; DUNN, A.J. Effects of chronic and acute stressors and CRF on depressionlike behavior in mice. **Behavioural Brain Research**, v.186, p.32-40, 2008.

TALAROWSKA, M.; BOBIŃSKA, K.; ZAJĄCZKOWSKA, M.; SU, K.P.; MAES, M.; GAŁECKI, P. Impact of oxidative/nitrosative stress and inflammation on cognitive functions in patients with recurrent depressive disorders. **Medical Science Monitor**, v.20, P. 110-115, 2014.

TATSUMI, M.; GROSHAN, K.; BLAKELY, R.D.; RICHELSON, E. Pharmacological profile of antidepressants and related compounds at human monoamine transporters. **European Journal Pharmacology**, v.340, p.249-258, 1997.

TAYLOR, C.; FRICKER, A.D; DEVI, L.A.; GOMES, I. Mechanisms of action of antidepressants: from neurotransmitter systems to signaling pathways. **Cell Signal**, v.17, p.549-57, 2005.

TOBE, H.E. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and major depressive disorder. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**. v.9, p. 567-573, 2013.

TSANKOVA, N.; RENTHAL, W.; KUMAR, A.; NESTLER, E.J. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. **Natural Review Neuroscience**, v.8, n.5, p.355-367, 2007.

USHIJIMA, I.; CARINO, M.A.; HORTA, A. Involvement of D1 and D2 dopamine system in the behavioral effects of cocaine in rats. **Pharmacology Biochemical Behavioral**, v.52, p.737-741, 1995.

VALADARES, M.C. Avaliação de toxicidade aguda: Estratégias após a “Era do Teste DL50”. **Revista Eletronica de Farmácia**, v.3, p.93-98, 2006.

VASCONCELOS, M.C. Estudo de toxicologia clínica e genotoxicidade do fitoterápico Tamaril cápsula, em voluntários sadios. Dissertação (Mestrado). Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

VILLANUEVA, R. Neurobiology of Major Depressive Disorder. **Neural Plasticity**, p.1-7, 2013.

WANG, G.H.; DONG, H.Y.; DONG, W.G.; WANG, X.P.; LUO, H.S.; YU, J.P. Protective effect of Radix Acanthopanax Senticosi capsule on colon of rat depression model. **World Journal Gastroenterology**, v.11, p.1373-1377, 2005.

WANG, J.; GRINBERG, S.F.; LI, S.; LIUA, H.; SUNA, L.; ZHOUA, Y.; EINAT, H. Antidepressant like effects of the active acidic polysaccharide portion of ginseng in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.132, p.65-69, 2010.

WANG, P.G.; XIAN, M.; TANG, X.; WU, X.; WEN, Z.; CAI, T.; JANCZUK, A.J. Nitric oxide donors: chemical activities and biological applications. **Chemical Review**, v.102, p.1091-1134, 2002.

WANG, W.X.; HU, X.Y.; ZHAO, Z.Y.; LIU, P.; HU, Y.C.; ZHOU, J.P. et al. Antidepressant-like effects of liquiritin and isoliquiritin from *Glycyrrhiza uralensis* in the forced swimming test and tail suspension test in mice. **Progress Neuro-Psychopharmacol Biological Psychiatry**, v.32, p.1179-1184, 2008.

WEISS, J.M.; BOSS-WILLIAMS, K.A.; MOORE, J.P.; DEMETRIKOPOULOS, M.K.; RITCHIE, J.C.; WEST, C.H.K. Testing the hypothesis that locus coeruleus hyperactivity produces depression-related changes via galanin. **Neuropeptides**, v.39, p.281-287, 2005.

WEIXING, W.A.; XINYING, H.A.; ZHIYU, ZHAO, B.; PENG, L.A.; YUCHI, H.U.C.; JIANPING, Z. C.; DONGFENG, Z.B.; ZHIBIN, W.C.; DEAN, G.A.; HONGZHU, G. Antidepressant-like effects of liquiritin and isoliquiritin from *Glycyrrhiza uralensis* in the forced swimming test and tail suspension test in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.32, p.1179-1184, 2008.

WHITE, H.S. Clinical significance of animal seizure models and mechanism of action studies of potential antiepileptic drugs. **Epilepsia**, v.38, p.9-17, 1997.

WHO. **World Health Organization**. Depression is a common illness and people suffering from depression need support and treatment. 2012.

WILLNER, P. Animal models as simulations of depression. **Trends Pharmacology Science**, v.12, p.131-136, 1991.

WILLNER, P. The validity of animal models of depression. **Psychopharmacology**, v.83, p.1-16, 1984.

WILLNER, P., HALE, A.S., ARGYROPOULOS, S. Dopaminergic mechanism of antidepressant action in depressed patients. **Journal of Infectious Diseases**, v.86, p.37-45, 2005.

WONG, D.T.; BYMASTER, F.P.; ENGLEMAN, E.A. Minireview Prozac (Fluoxetine, Lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug: twenty years since its first publication. **Life Science**, v.57, p.411-441, 1995.

WONG, M.L.; LICINIO, J. Research and treatment approaches to depression. **Nat Rev Neurosci**, v.2, p.343-351, 2001.

WOODS, S.; CLARKE, N.N.; LAYFIELD, R.; FONE, K.C. 5-HT<sub>6</sub> receptor agonists and antagonist enhance learning and memory in a conditioned emotion response paradigm by modulation of cholinergic and glutamatergic mechanisms. **Brazilian Journal Pharmacology**, 2012.

XU, J.; LI, X.Q. The establishment and evaluation of chronic unpredictable mild stress depression model. **Chinese Journal Behavioral Medical Science**, v.12, p.14-17, 2003.

YAGER, S.; FORLENZA, M.J.; MILLER, G.E. Depression and oxidative damage to lipids. **Psychoneuroendocrinology**, v. 35, n.9, p. 1356-1362, 2010.

YAMADA, J., SUGIMOTO, Y., YAMADA, S. Involvement of dopamine receptors in the anti-immobility effects of dopamine re-uptake inhibitors in the forced swimming test. **European Journal of Pharmacology**, v.504, p.207-211, 2004.

YANG, X.M.; GORMAN, A.L.; DUNN, A.J. The involvement of central noradrenergic systems and corticotropin-releasing factor in defensive-withdrawal in rats. **Journal Pharmacology Experimental Therapy**, v.255, p.1064-1670, 1990.

YANIK, M.; EREL, O.; KATI, M. The relationship between potency of oxidative stress and severity of depression. **Acta neuropsychiatrica**. p.200-203, 2004.

YANPELLAWAR, S.; SHANKER, J.; LADIWAL, U.; VAIDYA, V. Regulation of hippocampal neurogenesis by norepinephrine in the adult rat brain. **Abstr View/ It in Plan Washington, DC: Soc Neurosci.**, Online. Program, n.31, 2004.

YI, L.T.; QUN XU, YU-CHENG LI, LEI YANG, LING-DONG KONG. Antidepressant-like synergism of extracts from magnolia bark and ginger rhizome alone and in combination in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.33, p.616-624, 2009.

ZAFIR, A.; ARA, A.; BANU, N. "In vivo antioxidant status: a putative target of antidepressant action," **Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry**, v.33, n.2, p.220-228, 2009.

ZENIA, A.L.B.; ZOMKOWSKIA, A.D.E.; MARASCHIN, T.D.C.M.; RODRIGUES, A.L.S.; TASCA, C.I. Antidepressant-like and neuroprotective effects of *Aloysia gratissima*: Investigation of involvement of l-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway. **Journal of Ethnopharmacology**, v.137, p.864-874, 2011.

ZETTERSTRÖMA, T. S. C.; COPPELLA, A. A.; KHUNDAKAR, A. A. The role of 5-hydroxytryptamine receptor subtypes in the regulation of brain-derived neurotrophic factor gene expression. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.66, p.53-61. 2013.

ZHANG, Z. Therapeutic effects of herbal extracts and constituents in animal models of psychiatric disorders. **Life Science**, v.75, p.1659-1699, 2004.

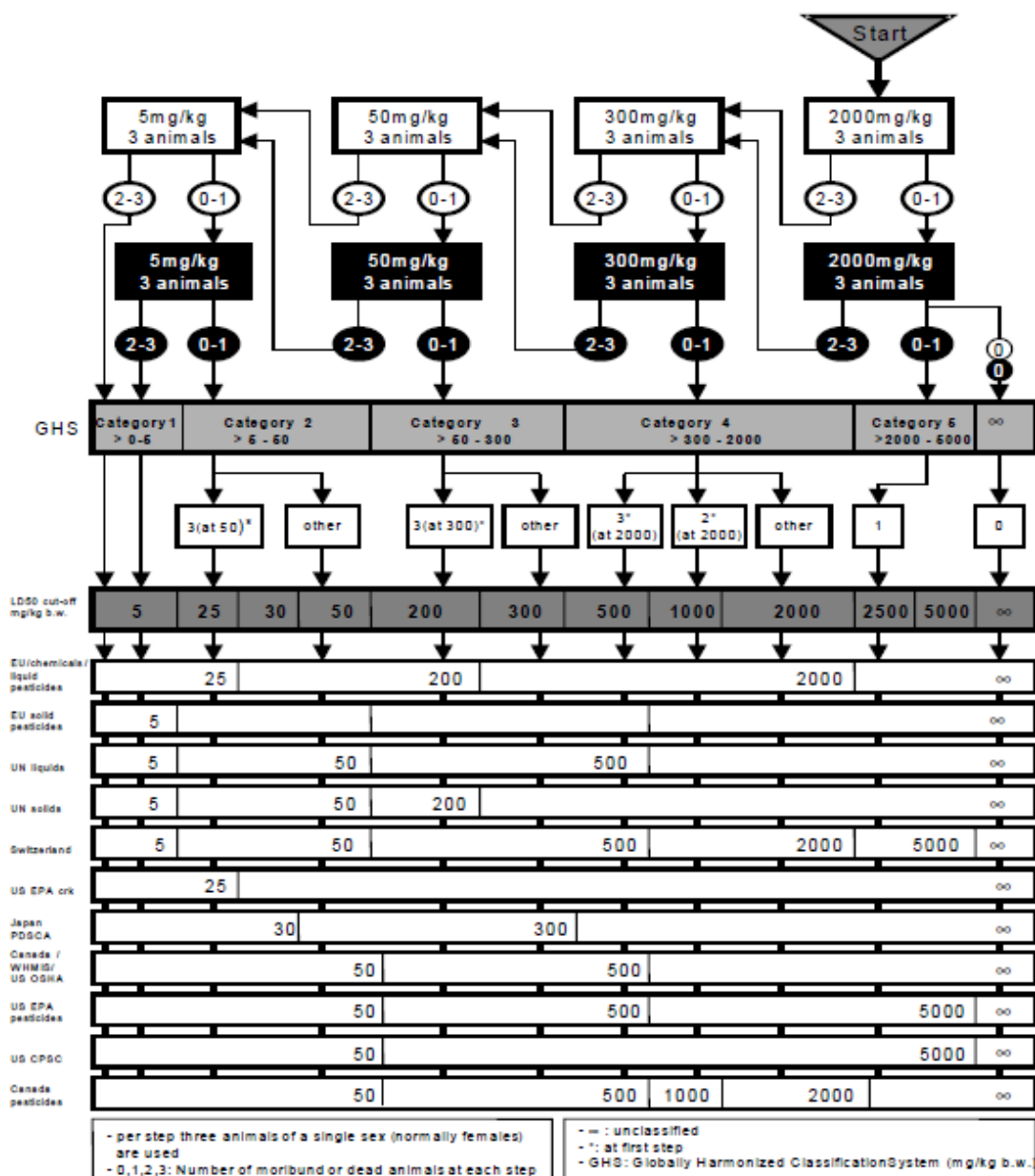
ZIGMOND, M. J.; BLOOM, F.E.; LANDIS, S.C.; ROBERTS, J.L.; SQUIRE, L.R. *Fundamental Neuroscience*. **Academic Press**, p.14-44, 1999.

ZOMKOWOSKI, A. D. E.; ROSA, A. O.; LIN, J.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B.; RODRIGUES, A. L. S. Evidence for serotonin receptor subtypes involvement in agmatine antidepressant-like effect in the mouse forced swimming test. **Brain Research**, v.1023, p.253-263, 2004.

ZOMKOWSKI, A. D. E.; ROSA, A. O.; LIN, J.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B.; RODRIGUES, A. L. S. Evidence for serotonin receptor subtypes involvement in agmatine antidepressant-like effect in the mouse forced swimming test. **Brain Research**, v.1023, p.253-263, 2004.

### ANEXO A- PROTOCOLO OECD GUIA 423

TEST GUIDELINE 423: CLASSIFICATION ACCORDING TO CURRENTLY STILL APPLICABLE CLASSIFICATION SCHEMES TO COVER THE TRANSITION PERIOD UNTIL FULL IMPLEMENTATION OF THE GLOBALLY HARMONISED CLASSIFICATION SYSTEM (GHS)



## ANEXO B- FOLHA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE  
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

### DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação n° 07/2012, sobre o projeto intitulado: **“ESTUDO DOS EFEITOS NEUROCOMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS DO MONOTERPENO 1,2 ACETATO DE CITRONELILA EM CAMUNDONGOS”**, de responsabilidade de Luciana Kelly Ximenes dos Santos e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 28 de novembro de 2012.

Fortaleza, 07 de fevereiro de 2013

  
Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar  
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

Profa. Dra. Nylane M. Nunes de Alencar  
Coordenadora de CEPA/OFF/PPMEDI/UFCE  
MAT. SIAPE 2166300