



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
CAMPUS SOBRAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

SUÉLLI MARIA CARNEIRO PRADO

**EFEITOS DA NARINGENINA EM MODELOS ANIMAIS DE CONVULSÃO E
DEPRESSÃO: ASPECTOS COMPORTAMENTAIS, ENVOLVIMENTO DO
ADRENORRECEPTOR ALFA-1 E ESTRESSE OXIDATIVO**

SOBRAL – CE

2016

SUÉLLI MARIA CARNEIRO PRADO

**EFEITOS DA NARINGENINA EM MODELOS ANIMAIS DE CONVULSÃO E
DEPRESSÃO: ASPECTOS COMPORTAMENTAIS, ENVOLVIMENTO DO
ADRENORRECEPTOR ALFA-1 E ESTRESSE OXIDATIVO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará *Campus* Sobral, como requisito parcial para Obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia. Área de Concentração: Macromoléculas

Orientador (a): Profa. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos de Aguiar
Coorientadora: Profa. Dra. Carla Thiciane Vasconcelos de Melo

SOBRAL- CE

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P92e

Prado, Suélli Maria Carneiro.

Efeitos da naringenina em modelos animais de convulsão e depressão: aspectos comportamentais, envolvimento do adrenoceptor alfa-1 e estresse oxidativo / Suélli Maria Carneiro Prado. – 2016.
123 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2016.

Orientação: Profa. Dra. Lissiana Magna de Vasconcelos Aguiar .

Coorientação: Profa. Dra. Carla Thiciane Vasconcelos de Melo.

1. Epilepsia. 2. Depressão. 3. Estresse oxidativo. 4. Receptor adrenérgico. 5. Naringenina. I. Título.

CDD 660.6

SUÉLLI MARIA CARNEIRO PRADO

**EFEITOS DA NARINGENINA EM MODELOS ANIMAIS DE CONVULSÃO E
DEPRESSÃO: ASPECTOS COMPORTAMENTAIS, ENVOLVIMENTO DO
ADRENORRECEPTOR ALFA-1 E ESTRESSE OXIDATIVO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará *Campus* Sobral, como requisito parcial para Obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia. Área de Concentração: Macromoléculas.

Aprovada em ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Lissiana Magna de Vasconcelos Aguiar (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dra. Carla Thiciane Vasconcelos de Melo
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Gerardo Cristino Filho
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Tiago Sousa de Melo
Instituto Superior de Teologia Aplicada – INTA

Dedico aos meus pais, Antônio Sérgio Freire Prado e Maria Carneiro Prado, por terem me ensinado o real valor da educação, sempre incentivando, apoiando e confiando em meus objetivos e crescimento pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar ao meu lado em todos os momentos, pelas oportunidades concedidas e por não me deixar desistir diante dos obstáculos.

Aos meus pais, pelo incansável cuidado, carinho, amor incondicional, e constante apoio durante esta jornada, com atos e palavras de conforto, reconhecimento e motivação nos dias que mais precisei. Amo vocês imensuravelmente!

À minha amada irmã, *Suyanni*, pelo amor, carinho, incentivo e paciência, e pelas noites em claro para me ajudar e fazer companhia. Você é a melhor irmã do mundo!

Ao meu namorado, *Hudson*, por me apoiar durante esta trajetória, surpreendendo-me a cada dia com todo o seu amor, carinho, compreensão e paciência. Obrigada meu amor!

À minha professora e orientadora, *Lissiana Magna de Vasconcelos*, por ter me apresentado à neurociência, levando-me a descoberta de novos conhecimentos, e por me guiar durante esta pesquisa, apostando e confiando no meu trabalho. Muito obrigada!

À minha coorientadora, *Carla Thiciane Vasconcelos de Melo*, por mais uma vez contribuir com o meu crescimento profissional, me auxiliando na elaboração deste trabalho, com a sua vasta experiência e conhecimento. Muito obrigada!

Às minhas amigas e parceiras, *Bruninha e Bel*, pela amizade, auxílio, companheirismo e fidelidade durante esta jornada. Vocês tornaram os cansativos dias de experimentos mais fáceis e descontraídos. Obrigada por tudo, e que essa amizade que nasceu dentro de um laboratório perdure por toda a vida!

Ao meu colega, *Bruno*, pelo auxílio nas dosagens neuroquímicas.

Aos estudantes de iniciação científica, *Tarcizio e Thomas* pela ajuda nos experimentos

Aos colegas da turma de Pós-Graduação, *Bruninha, Nay, Humberlânia, Flávia, Glaucinete, Bruno, Salma Suellen e Israel* e *Aline* pelo partilhar de conhecimentos, pelos estudos em grupos e momentos de descontração.

A todos os professores da Pós-Graduação pelo partilhar de conhecimentos e experiências.

Aos professores, *Gerardo Cristinho Filho e Tiago Sousa de Melo*, por aceitarem participar da minha banca de defesa, contribuindo para a melhoria do meu trabalho.

À secretária da Pós-Graduação, *Edilda*, pela paciência com os alunos e dedicação ao trabalho.

Aos funcionários responsáveis pelo biotério, *Alana, Jordânia e Seu Araújo*, pela ética, compromisso com o trabalho, organização no repasse dos animais e cuidado com os mesmos.

Vocês também foram fundamentais para a concretização desta pesquisa.

Às verdadeiras amigas dos tempos de faculdade, pela vibração em relação a esta jornada.

À *CAPES* pelo apoio financeiro.

E a todos aqueles que me ajudaram, direta ou indiretamente, colaborando para concretização deste trabalho.

"... E jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual pertencerá seu trabalho futuro ..."

Albert Einstein

RESUMO

A epilepsia apresenta alta prevalência e severidade no mundo. Além da gravidade do transtorno epiléptico *per se*, esse distúrbio está normalmente acompanhado de comorbidades psiquiátricas, sendo a depressão a mais prevalente. Assim, o tratamento da epilepsia não deve se restringir apenas às crises convulsivas, mas deve incluir também o tratamento da depressão, uma vez que ambas as condições interferem diretamente na qualidade de vida dos pacientes. Nesse sentido, foram estudados os efeitos da naringenina em modelos clássicos para ansiedade, depressão e convulsão. Foi investigado o envolvimento do adrenoceptor α_1 nos efeitos da naringenina nos modelos supracitados e os efeitos do tratamento com a naringenina sobre o estresse oxidativo por meio do índice de peroxidação lipídica e concentração de nitrito/nitrato nas áreas cerebrais. A naringenina foi administrada em camundongos, de forma aguda e crônica (15 dias), nas doses de 10, 20 e 50 mg/Kg (v.o.) para realização dos testes do campo aberto, labirinto em cruz elevado (LCE), suspensão da cauda e convulsão induzida por pilocarpina. Os resultados mostraram que os tratamentos agudo e crônico com naringenina não interferiram na atividade locomotora espontânea, *rearing* e *grooming* dos animais, não apresentaram efeito ansiolítico no teste de LCE, mas mostraram efeito anti-imobilidade no teste da suspensão da cauda em todas as doses no tratamento agudo, e nas doses de 10 e 20 mg/kg no tratamento crônico. No teste da convulsão induzida por pilocarpina, o tratamento agudo com as três doses de naringenina não interferiu na latência de convulsão e morte dos animais, enquanto tratamento crônico com naringenina nas doses de 20 e 50 mg/kg reduziu a latência de convulsão, com redução da latência de morte no tratamento com a maior dose (50 mg/kg). A investigação do envolvimento do adrenoceptor α_1 mostrou que esse receptor parece mediar os efeitos antidepressivos do tratamento agudo e crônico com naringenina na dose de 20 mg/kg, assim como parece ser responsável pela redução da latência de convulsão observada nos tratamentos agudo e crônico com naringenina nas doses de 20 e 50 mg/kg e pela redução da latência de morte observada no tratamento crônico com a maior dose. A avaliação do estresse oxidativo mostrou que o tratamento agudo com as três doses de naringenina não interferiu nesse parâmetro. Entretanto, o tratamento crônico com naringenina na dose de 10 mg/kg reverteu o aumento dos níveis de peroxidação lipídica, sem interferir na concentração de nitrito/nitrato nas áreas cerebrais, o tratamento crônico com a dose de 20 mg/kg não interferiu na peroxidação lipídica e na concentração nitrito/nitrato, e o tratamento crônico com a maior dose (50 mg/kg) aumentou os níveis de peroxidação lipídica no hipocampo, sem interferir nas outras áreas cerebrais, bem como na concentração de nitrito/nitrato. Em conclusão, o estudo sugere que a dose de 10 mg/kg se mostrou a mais segura em relação ao tratamento da depressão comórbida da epilepsia, e que os efeitos da naringenina sobre a atividade antidepressiva e sobre a latência de convulsão e morte parecem ser mediados pelo adrenoceptor α_1 .

Palavras-chave: Epilepsia. Depressão. Estresse Oxidativo. Receptor Adrenérgico. Naringenina.

ABSTRACT

Epilepsy has a high prevalence and severity in the world. Beyond the severity of the epileptic disorder per se, this disorder is usually accompanied by psychiatric comorbidities, and depression is the most prevalent. Thus, the treatment of epilepsy should not be restricted only to seizures, but should also include the treatment of depression, since both conditions directly affect the quality of life of patients. Accordingly, the effects of naringenin in classical models of anxiety, depression and seizure were studied. In this work, we investigated the involvement of the $\alpha 1$ -adrenoceptor in the effects of naringenin in the models aforementioned, as well as the effects of naringenin treatment on oxidative stress by means of lipid peroxidation and concentration of nitrite/nitrate in brain areas. Naringenin was administered in mice, in acute and chronic (15 days) forms, at doses of 10, 20 and 50 mg / kg (p.o.) to perform the open field test, elevated plus maze (EPM), tail suspension and pilocarpine-induced seizure. Results showed that the acute and chronic treatments with naringenin did not affect the number of crossings, rearing and grooming of the animals. They also did not show anxiolytic effect on the EPM test but showed anti-immobility effect in the tail suspension test at all doses of the acute treatment, and in doses of 10 and 20 mg / kg in the chronic treatment. In the test of seizure induced by pilocarpine, acute treatment with three doses of naringenin did not affect the latency of seizure onset nor death of animals, however chronic treatment with naringenin at doses of 20 and 50 mg / kg reduced the seizure latency, reducing also, death latency in the treatment at the highest dose (50 mg / kg). Research on engagement of the $\alpha 1$ -adrenoceptor showed that this receptor seems to mediate the antidepressant effects of acute and chronic treatments with naringenin at a dose of 20 mg / kg. Likewise, it appears to be responsible for the reduction of the seizure onset latency observed in acute and chronic naringenin treatments in doses of 20 and 50 mg / kg, also reducing latency of death observed in chronic treatment at the highest dose. The evaluation of oxidative stress showed that acute treatment with three doses of naringenin had no effect on this parameter. However, chronic treatment with naringenin at a dose of 10 mg / kg reversed the increased levels of lipid peroxidation, without interfering with the concentration of nitrite/nitrate in brain areas. Chronic treatment at a dose of 20 mg / kg did not interfere with peroxidation lipid concentration nor nitrite/nitrate and chronic treatment in the highest dose (50 mg / kg) increased the levels of lipid peroxidation in the hippocampus, without interfering with other brain areas and in the concentration of nitrite/nitrate. In conclusion, this study suggests that the dose of 10 mg / kg proved to be the safest in relation to the treatment of comorbid depression in epilepsy, and that the effects of naringenin on the antidepressant activity and on the latency of seizure and death appears to be mediated by $\alpha 1$ -adrenoceptor.

Keywords: Epilepsy. Depression. Oxidative stress. Adrenergic receptor. Naringenin.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
α_1	Alfa-1
CE	Corpo estriado
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
CPF	Córtex pré-frontal
BUP	Bupropiona
DMSO	Dimetil sulfóxido
DZP	Diazepam
EMP	Erro padrão da média
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ELT	Epilepsia do lobo temporal
FLU	Fluoxetina
GABA	Ácido gama amino butírico
HC	Hipocampo
HPA	Hipotálamo-hipófise adrenal
IMP	Imipramina
i.p	Intraperitoneal
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
MAO	Monoaminoxidase
MDA	Malonildialdeído ou Malondialdeído
NA	Noradrenalina
NAR	Naringenina
P	Nível de significância
PILO	Pilocarpina
PRA	Prazosina
SNC	Sistema Nervoso Central
TSC	Teste da Suspensão da Cauda
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
v.o	Via oral
5-HT	Serotonina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Protocolo Experimental (Tratamento Agudo e Crônico)	38
Figura 2 -	Teste da Convulsão Induzida por Pilocarpina com o Tratamento Agudo	38
Figura 3 -	Esquema do Teste do Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevado.....	42
Figura 4 -	Esquema do Teste da Suspensão da Cauda	43
Figura 5 -	Esquema do Teste da Convulsão Induzida por Pilocarpina	44
Figura 6 -	Dissecação das áreas cerebrais	45
Figura 7 -	Efeito do tratamento agudo com naringenina sobre a atividade locomotora espontânea no teste do campo aberto em camundongos	50
Figura 8 -	Efeito do tratamento crônico com naringenina sobre a atividade locomotora espontânea no teste do campo aberto em camundongos	51
Figura 9 -	Efeito do tratamento agudo com naringenina sobre número de <i>rearing</i> no teste do campo aberto em camundongos	52
Figura 10 -	Efeito do tratamento crônico com naringenina <i>rearing</i> no teste do campo aberto em camundongos	53
Figura 11 -	Efeito do tratamento agudo com naringenina sobre número de <i>grooming</i> no teste do campo aberto em camundongos	54
Figura 12 -	Efeito do tratamento crônico com naringenina sobre número de <i>grooming</i> no teste do campo aberto em camundongos	55
Figura 13 -	Efeito do tratamento agudo com naringenina sobre o número de entrada nos braços abertos (NEBA) no teste Labirinto em Cruz Elevado	57
Figura 14 -	Efeito do tratamento agudo com naringenina sobre o percentual de entrada nos braços abertos (PEBA) no teste Labirinto em Cruz Elevado	58
Figura 15 -	Efeito do tratamento agudo com naringenina sobre o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) no teste Labirinto em Cruz Elevado	59
Figura 16 -	Efeito do tratamento agudo com naringenina sobre do percentual do tempo de permanência nos braços abertos (PTBA) no teste Labirinto em Cruz Elevado	60
Figura 17 -	Efeito do tratamento crônico com naringenina sobre o número de entrada nos braços abertos (NEBA) no teste Labirinto em Cruz Elevado	61
Figura 18 -	Efeito do tratamento crônico com naringenina sobre o percentual de entrada nos braços abertos (PEBA) no teste Labirinto em Cruz Elevado	62
Figura 19 -	Efeito do tratamento crônico com naringenina sobre o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) no teste Labirinto em Cruz	

	Elevado	63
Figura 20 -	Efeito do tratamento crônico com naringenina sobre o percentual de tempo de permanência nos braços abertos (PTBA) no teste Labirinto em Cruz Elevado	64
Figura 21 -	Efeito do tratamento agudo com naringenina sobre o tempo de imobilidade no teste de suspensão da cauda	66
Figura 22 -	Efeito do tratamento crônico com naringenina sobre o tempo de imobilidade no teste de suspensão da cauda	67
Figura 23 -	Efeito do tratamento agudo com naringenina sobre a latência de convulsão no teste da convulsão induzida por pilocarpina	70
Figura 24 -	Efeito do tratamento agudo com naringenina sobre a latência de morte no teste da convulsão induzida por pilocarpina	71
Figura 25 -	Efeito do tratamento crônico com naringenina sobre a latência de convulsão no teste da convulsão induzida por pilocarpina	72
Figura 26 -	Efeito do tratamento crônico com naringenina sobre a latência de morte no teste da convulsão induzida por pilocarpina	73
Figura 27 -	Efeito do tratamento agudo com naringenina (20 mg/kg) sozinho ou em associação com prazosina, antagonista dos adrenorreceptores α_1 , sobre o tempo de imobilidade no teste de suspensão da cauda	75
Figura 28 -	Efeito do tratamento crônico com naringenina (20 mg/kg) sozinho ou em associação com prazosina, antagonista dos adrenorreceptores α_1 , sobre o tempo de imobilidade no teste de suspensão da cauda	76
Figura 29 -	Efeito do tratamento crônico com naringenina (20 mg) sozinho ou em associação com prazosina, antagonista dos adrenorreceptores α_1 , sobre latência de convulsão	78
Figura 30 -	Efeito do tratamento crônico com naringenina (50 mg) sozinho ou em associação com prazosina, antagonista dos adrenorreceptores α_1 , sobre latência de convulsão	79
Figura 31 -	Efeito do tratamento crônico com naringenina (50 mg) sozinho ou em associação com prazosina, antagonista dos adrenorreceptores α_1 , sobre latência de morte	80
Figura 32 -	Efeito do tratamento agudo com naringenina sobre a produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no hipocampo de camundongos submetidos ao teste de convulsão induzida por pilocarpina no 1º dia de tratamento	82
Figura 33 -	Efeito do tratamento agudo com naringenina sobre a produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no corpo estriado de camundongos submetidos ao teste de convulsão induzida por pilocarpina no 1º dia de tratamento	83
Figura 34 -	Efeito do tratamento agudo com naringenina sobre a produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no córtex pré-frontal de camundongos submetidos ao teste de convulsão induzida por pilocarpina no 1º dia de tratamento	84

Figura 35 -	Efeito do tratamento crônico com naringenina sobre a produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no hipocampo de camundongos submetidos ao teste de convulsão induzida por pilocarpina no 15º dia de tratamento	85
Figura 36 -	Efeito do tratamento crônico com naringenina sobre a produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no corpo estriado de camundongos submetidos ao teste de convulsão induzida por pilocarpina no 15º dia de tratamento	86
Figura 37 -	Efeito do tratamento crônico com naringenina sobre a produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no córtex pré-frontal de camundongos submetidos ao teste de convulsão induzida por pilocarpina no 15º dia de tratamento	87
Figura 38 -	Efeito do tratamento agudo com naringenina sobre a concentração de nitrito/nitrato no hipocampo de camundongos submetidos ao teste de convulsão induzida por pilocarpina no 1º dia de tratamento	89
Figura 39 -	Efeito do tratamento agudo com naringenina sobre a concentração de nitrito/nitrato no corpo estriado de camundongos submetidos ao teste de convulsão induzida por pilocarpina no 1º dia de tratamento	90
Figura 40 -	Efeito do tratamento agudo com naringenina sobre a concentração de nitrito/nitrato no córtex pré-frontal de camundongos submetidos ao teste de convulsão induzida por pilocarpina no 1º dia de tratamento ...	91
Figura 41 -	Efeito do tratamento crônico com naringenina sobre a concentração de nitrito/nitrato no hipocampo de camundongos submetidos ao teste de convulsão induzida por pilocarpina no 15º dia de tratamento	92
Figura 42 -	Efeito do tratamento crônico com naringenina sobre a concentração de nitrito/nitrato no corpo estriado de camundongos submetidos ao teste de convulsão induzida por pilocarpina no 15º dia de tratamento .	93
Figura 43 -	Efeito do tratamento crônico com naringenina sobre a concentração de nitrito/nitrato no córtex pré-frontal de camundongos submetidos ao teste de convulsão induzida por pilocarpina no 15º dia de tratamento	94

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Drogas e Reagentes Utilizados	36
Quadro 2 -	Tratamento Agudo	39
Quadro 3 -	Tratamento Crônico	40

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Epilepsia	16
1.2	Epilepsia e Comorbidades Neuropsiquiátricas	18
1.3	Estresse Oxidativo, Epilepsia e Depressão	19
1.4	Sistemas de Neurotransmissores Envolvidos na Epilepsia e Depressão	22
<i>1.4.1</i>	<i>Sistema Noradrenérgico</i>	24
<i>1.4.1.1</i>	<i>Adrenorreceptores α_1</i>	26
1.5	Terapia Antidepressiva e Convulsões	27
1.6	Produtos Naturais na Terapêutica	30
1.7	Flavonoides	31
1.7.1	Naringenina	33
2	OBJETIVOS	35
2.1	Geral	35
2.2	Específicos	35
3	METODOLOGIA	36
3.1	Animais	36
3.2	Aspectos Éticos	36
3.3	Drogas e Reagentes	36
3.4	Preparo das Drogas	37
3.5	Protocolo Experimental	37
3.6	Tratamento dos Grupos Experimentais	39
3.7	Estudos Comportamentais	40
<i>3.7.1</i>	<i>Avaliação da Atividade Locomotora</i>	40
<i>3.7.1.1</i>	<i>Teste do Campo Aberto</i>	40
<i>3.7.2</i>	<i>Avaliação da Atividade Ansiolítica</i>	41
<i>3.7.2.1</i>	<i>Teste do Labirinto em Cruz Elevado</i>	41
<i>3.7.3</i>	<i>Avaliação da Atividade Antidepressiva</i>	42
<i>3.7.3.1</i>	<i>Teste de Suspensão da Cauda</i>	42
<i>3.7.4</i>	<i>Avaliação da Convulsão Induzida por Pilocarpina</i>	44
<i>3.7.4.1</i>	<i>Teste da Convulsão Induzida por Pilocarpina</i>	44
<i>3.7.5</i>	<i>Envolvimento do Adenorreceptor α_1 na Atividade Antidepressiva na</i>	

	<i>Convulsão Induzida por Pilocarpina no Tratamento com Naringenina</i>	44
3.8	Dissecação das Áreas Cerebrais	45
3.9	Avaliação do Estresse Oxidativo	45
3.9.1	<i>Determinação do Índice de Peroxidação Lipídica</i>	45
3.9.2	<i>Determinação da Concentração de Nitrito/Nitrato</i>	46
3.10	Análise Estatística	47
4	RESULTADOS	48
4.1	Estudos Comportamentais	48
4.1.1	<i>Avaliação da Atividade Locomotora</i>	48
4.1.1.1	<i>Teste do Campo Aberto</i>	48
4.1.2	<i>Avaliação da Atividade Ansiolítica</i>	56
4.1.2.1	<i>Teste do Labirinto em Cruz Elevado</i>	56
4.1.3	<i>Avaliação da Atividade Antidepressiva</i>	65
4.1.3.1	<i>Teste de Suspensão da Cauda</i>	65
4.1.4	<i>Avaliação da Convulsão Induzida por Pilocarpina</i>	68
4.1.4.1	<i>Teste da Convulsão Induzida por Pilocarpina</i>	68
4.1.5	<i>Envolvimento do Adrenorreceptor α_1</i>	74
4.1.5.1	<i>Atividade Antidepressiva</i>	74
4.1.5.1.1	<i>Teste de Suspensão da Cauda</i>	74
4.1.5.2	<i>Atividade na Convulsão Induzida por Pilocarpina</i>	77
4.1.5.2.1	<i>Teste da Convulsão Induzida por Pilocarpina</i>	77
4.1.6	<i>Avaliação do Estresse Oxidativo</i>	81
4.1.6.1	<i>Efeitos do tratamento com naringenina sobre a produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nas áreas cerebrais de animais submetidos ao modelo de convulsão induzida por pilocarpina ...</i>	81
4.1.6.2	<i>Efeitos do tratamento com naringenina sobre a produção de nitrito/nitrato nas áreas cerebrais de animais submetidos ao modelo de convulsão induzida por pilocarpina</i>	88
5	DISCUSSÃO	95
6	CONCLUSÃO	103
	REFERÊNCIAS	105
	ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL (CEPA)	123

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epilepsia

A epilepsia pode ser definida como uma doença neurológica complexa, caracterizada por qualquer uma das seguintes condições: pelo menos duas crises epiléticas espontâneas (não provocadas) ocorrendo com mais de 24 horas de intervalo; uma crise não provocada e uma probabilidade de novas crises semelhante ao risco geral de recorrência após duas crises espontâneas (cerca de 75% ou mais); e pelo menos duas crises num contexto de epilepsia reflexa (FISHER *et al.*, 2014).

Crise epilética é definida como a manifestação excessiva e/ou hipsíncrona resultante da atividade epilética, usualmente autolimitada, de neurônios cerebrais, mas que podem cursar de forma contínua configurando o quadro de *status epilepticus*. Este, por sua vez, é definido como uma crise duradoura, que não mostra sinais clínicos de interrupção após o tempo habitual da maioria das crises autolimitadas, ou ainda a ocorrência de crises recorrentes sem que a função do sistema nervoso central retorne ao período interictal (YACUBIAN, 2002).

As crises epiléticas podem ser classificadas em generalizadas e focais, ou ter classificação desconhecida. Aquelas que ocorrem em redes neuronais bilateralmente distribuídas são classificadas como generalizadas (tônico-clônica, ausência típica e atípica, ausência com características especiais, mioclônica, clônica, tônica e atônica), e aquelas que ocorrem dentro de redes delimitadas a um hemisfério ou discretamente localizadas são denominadas focais. Estas últimas podem ser caracterizadas pelo comprometimento ou não da consciência durante a crise. Em caso de não comprometimento da consciência, pode-se observar componentes motores, autonômicos e subjetivos sensoriais ou psíquicos; e em caso de comprometimento, evoluir para uma crise convulsiva bilateral, envolvendo componentes tônicos, clônicos, ou tônico-clônicos (BERG, CROSS, 2010; ILAE, 2011).

No mundo, há cerca de 50 milhões de pessoas que sofrem de epilepsia com crises ativas necessitando de tratamento, e 30% desses pacientes apresentam crises refratárias ao tratamento medicamentoso disponível no mercado. No Brasil, embora os estudos epidemiológicos sejam escassos, estima-se que a epilepsia atinja 2% a 4% da população, correspondendo a aproximadamente três milhões de pessoas em diferentes idades e classes sociais (BRODIE *et al.*, 2012; MARCHETTI, 2005).

A Liga Internacional Contra Epilepsia propõe, como etiologia da epilepsia, alterações genéticas, estruturais ou metabólicas, sendo as formas de epilepsia organizadas pela especificidade em: síndromes eletro clínicas, epilepsias não síndrômicas com causas estruturais, metabólicas ou desconhecidas e constelações distintas/síndromes cirúrgicas (ILAE, 2011).

A epilepsia do lobo temporal (ELT) é a forma mais comum de epilepsia em adultos, sendo responsável por 40% dos casos de epilepsia nesta população. Pacientes com ELT podem apresentar crises focais com comprometimento ou não da consciência, geralmente precedidas por auras. Estas correspondem a manifestações sensitivo-sensoriais ou psíquicas puramente subjetivas e que ocorrem em 20% a 90% dos pacientes com epilepsia do lobo temporal (ENGEL, 1996; FERNANDES, 2013; GUILHOTO, 2011; ILAE, 2011; KOTAGAL, 1991). A ELT pode estar associada a um estímulo inicial precipitante como *status epilepticus*, trauma ou crises febris prolongadas (ENGEL, PEDLEY, 1997), e para fins de estudos, pode ser reproduzida em modelos experimentais, mediante a administração sistêmica de pilocarpina, um agonista colinérgico muscarínico (CAVALHEIRO, 1995; TURSKI *et al.*, 1983).

A fisiopatologia da epilepsia ainda não foi completamente elucidada, no entanto, sabe-se que os principais mecanismos envolvidos na gênese das crises estão relacionados a um desequilíbrio ocasionado por um aumento da transmissão excitatória glutamatérgica e/ou diminuição da resposta inibitória GABAérgica (MARES; KUBOVÁ, 2008). A estimulação excessiva dos receptores de glutamato na epilepsia favorece o aumento de cálcio livre no citoplasma. Esse aumento pode ser superior à capacidade dos mecanismos celulares de regulação e, conseqüentemente, provocam a ativação de vários processos dependentes de cálcio, que são geralmente inativos ou que ocorrem em níveis basais nas células, resultando em um estado de excitação neuronal (LOPÉZ, 2007).

A excitação prolongada de neurônios durante as crises epiléticas pode levar a lesões e morte resultante de mecanismos bioquímicos subjacentes que ainda não são bem compreendidos. Um mecanismo plausível para a lesão celular envolve a formação excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) e, conseqüentemente, estresse oxidativo (GLUCK *et al.*, 2000), o qual também pode aumentar a suscetibilidade as convulsões.

Além do desequilíbrio entre a transmissão excitatória glutamatérgica e GABAérgica (MARES; KUBOVÁ, 2008) com aumento do estresse oxidativo, a gênese das convulsões também podem estar relacionadas com outros sistemas de neurotransmissão, tais como serotoninérgico, adrenérgico e dopaminérgico, com relações e mecanismos não bem

elucidados e muitas vezes controversos, e que podem estar relacionados com as comorbidades psiquiátricas da epilepsia.

1.2 Epilepsia e Comorbidades Neuropsiquiátricas

Comorbidades neuropsiquiátricas, tais como depressão, ansiedade, psicose, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) e problemas cognitivos são complicações comuns em pacientes com epilepsia, no entanto, a depressão e a ansiedade parecem ser as comorbidades psiquiátricas mais frequentes (KALININ *et al.*, 2010; KANNER, 2016), podendo afetar a qualidade de vida dos pacientes mais do que as próprias crises (VERROTTI *et al.*, 2014).

Um ensaio clínico de 193 adultos com epilepsia realizadas por Kanner *et al.* (2010) revelou que a ocorrência de transtorno misto depressão/ansiedade tem um impacto mais negativo na saúde, relacionado com qualidade de vida, do que a ocorrência de perturbações de ansiedade sozinha. Grabowska-Grzyb *et al.* (2006) mostraram que a depressão era mais comum em pessoas com ELT e Garcia (2012) confirmou essa associação em estudo mais recente.

Uma revisão sistemática e meta-análise publicada em 2013 na revista *Neurology*, incluindo dados de três grandes bancos de dados on-line com uma quantidade de estudos clínicos com mais de um milhão de participantes e mais de 30.000 pacientes com epilepsia, revelou que a prevalência de depressão na epilepsia foi de quase 20% (FIEST *et al.*, 2013). Estudos anteriores mostraram que os sintomas de depressão podem estar presentes em 40 a 60% dos pacientes com epilepsia, e o risco de suicídio é de quatro a nove vezes maiores do que na população em geral. Uma precisão maior nesses dados é difícil de se obter, provavelmente, devido heterogeneidade no desenho dos estudos e no método de diagnóstico da depressão ou da epilepsia (GRABOWSKA-GRZYB *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2007; VERROTTI *et al.*, 2014).

A relação entre epilepsia e depressão já está amplamente aceita, no entanto a base patogênica dessa associação ainda não está clara. Sabe-se que existem evidências de relação entre o início da convulsão e aparecimento da depressão e que esta relação pode ser bidirecional (KANNER, 2011), ou seja, o diagnóstico de epilepsia pode predizer um fator de risco para o aparecimento da depressão e a depressão pode ser um fator de risco para a epilepsia.

A epilepsia pode facilitar o desenvolvimento de depressão através da exposição ao estresse crônico. A incerteza e imprevisibilidade das crises podem causar sentimentos de tristeza, solidão, desespero, baixa autoestima e autocensura nos pacientes com epilepsia, levando ao isolamento social ou estigmatização. Outros fatores de risco associados ao desenvolvimento de depressão são uma história familiar de doença psiquiátrica, a falta de controle sobre as convulsões, causas iatrogênicas (farmacológicas e cirúrgicas) e mecanismos patogênicos comuns operando na epilepsia e na depressão (VERROTTI *et al.*, 2014).

Como já foi descrito, um grande número de trabalhos já mostram que pessoas com epilepsia estão em maior risco de doenças psiquiátricas do que a população em geral (JACOY *et al.*, 1996; MCCAGH *et al.*, 2009; MENSAH *et al.*, 2007; POMPILI *et al.*, 2005). No entanto, as doenças psiquiátricas e psicológicas são altamente subdiagnosticadas e negligenciadas nesses pacientes (BOER *et al.*, 2008).

O relatório de 2012 do Instituto de Medicina sobre a epilepsia destacou o crescente reconhecimento da frequência e impacto de comorbidades cognitivas e comportamentais da epilepsia, entretanto, houve poucos avanços no desenvolvimento de novas terapias dirigidas especificamente às comorbidades (ENGLAND *et al.*, 2012).

Levando em consideração a relação bidirecional entre a epilepsia e a depressão, e sugerindo a existência de mecanismos patogênicos comuns operando na epilepsia e na maioria dos distúrbios psiquiátricos, a identificação dos mecanismos subjacentes pode nortear sobre as bases neurobiológicas desses transtornos, facilitando o desenvolvimento de novas terapias, bem como a aplicação segura das mesmas (KANNER, 2016; LANDMARK *et al.*, 2016; VERROTTI *et al.*, 2014).

1.3 Estresse Oxidativo, Epilepsia e Depressão

A mitocôndria é a principal fonte de geração de radicais livres, uma vez que o metabolismo de respiração celular normal gera espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs). As EROs e ERNs são definidas como moléculas que possuem elétrons desemparelhados no seu orbital mais externo. Assim, a geração de radicais livres em baixas ou moderadas concentrações é uma característica fisiológica importante para a célula (HOVATTA *et al.*, 2010).

Quando ocorre um desequilíbrio entre a geração e a eliminação de EROs e ERNs, ou seja, uma perturbação no equilíbrio pró-oxidante (geração de radicais livres) e antioxidante (eliminação de radicais livres), em favor do primeiro, pode culminar em uma situação

denominada de estresse oxidativo, a qual é potencialmente capaz de causar danos importantes em macromoléculas celulares, como lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos (HOVATTA *et al.*, 2010; SIES, 1986).

O cérebro é extremamente susceptível ao estresse oxidativo, uma vez que ele processa grandes quantidades de oxigênio em uma massa relativamente pequena, possui uma baixa defesa antioxidante e tem um teor elevado de substratos disponíveis para a oxidação, tais como o grande conteúdo lipídico das bainhas de mielinas (WILHELM *et al.*, 2010).

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das EROs, mas a membrana é um dos mais atingidos, em decorrência da peroxidação lipídica. A oxidação de ácidos graxos poli-insaturados das bainhas de mielina dos neurônios torna-as mais hidrofílicas, resultando em alterações na fluidez e na permeabilidade da membrana com comprometimento da função celular, como perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos, e formação de produtos citotóxicos como o malonildialdeído – MDA), que pode culminar na morte celular (NAKAMURA; LIPTON, 2009; RUMIÀ *et al.*, 2013).

Os radicais livres têm sido implicados na patogênese de muitas doenças do SNC, tais como na doença de Parkinson, de Alzheimer, epilepsia, depressão, dentre outras. A lista dessas doenças está aumentando e isso se deve, pelo menos em parte, ao fato de que as moléculas reativas podem produzir uma grande variedade de processos danosos, podendo ser a causa e/ou a consequência dos danos (COBB; COLE, 2015).

Na epilepsia, a formação excessiva de radicais livres pode ser consequência da excitação prolongada de neurônios durante as crises convulsivas, bem como aumentar a suscetibilidade às convulsões (GLUCK *et al.*, 2000). O dano mitocondrial mediado pelo cálcio é um dos fatores-chave para a geração de EROs, e isso pode levar a um déficit energético, que contribui para a perpetuação do evento de excitotoxicidade. A relação entre a disfunção mitocondrial e a epilepsia é reforçada pelo fato de que alguns pacientes com epilepsia do lobo temporal apresentam deficiência mitocondrial no foco das convulsões (LOPÉZ *et al.*, 2007; SHIN *et al.*, 2011).

Além da geração de EROs nas crises convulsivas, durante os processos metabólicos das numerosas drogas antiepilépticas (DAE), especialmente as da geração mais velha, incluindo fenobarbital, fenitoína, carbamazepina e ácido valpróico, há uma produção de metabólitos reativos que podem ligar-se covalentemente a diferentes macromoléculas endógenas ou aumentar a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) induzindo o dano oxidativo. Para apoiar esta teoria, estudos que avaliam a influência da epilepsia e das DAEs

sobre a formação de radicais livres mostram que qualquer um deles pode estar ligado ao estresse oxidativo (LEE, 2014).

Uma condição de estresse crônico, observada em pacientes com epilepsia em virtude da incerteza e imprevisibilidade das crises convulsivas, é outra condição importante para indução do estresse oxidativo, uma vez que tal condição ativam circuitos relacionados ao estresse, com interface entre o sistema endócrino e sistema nervoso central, como o eixo hipotálamo-hipófise adrenal (HPA) e, em última instância, vias simpáticas através do *locus ceruleus* (MILLER *et al.*, 2009).

O estresse é capaz de estimular a liberação do hormônio cortisol pela glândula adrenal. O cortisol permite a preparação do organismo para desafios fisiológicos ou ambientais, sendo importante para a consolidação da resposta ao estresse. Em níveis fisiológicos normais, ele atua no controle/inibição da ativação do fator nuclear kappa beta (NF-kB) por condições de estresse oxidativo, por exemplo, atenuando assim a resposta inflamatória. No entanto, a persistência e/ou a intensidade exagerada do estresse, bem como a incapacidade do organismo em atenuar a sua exacerbação, podem tornar o eixo HPA hiperreativo, com dessensibilização dos receptores de glicocorticoides (RG), principalmente no hipocampo, área cerebral que tem como função exercer uma ação de retroalimentação negativa sobre o eixo, levando a liberação descontrolada de cortisol, que associada com as catecolaminas liberadas mediante a situação de estresse podem levar a atrofia do hipocampo, efeitos pró-inflamatórios e pró-oxidantes (KANDRATAVICIUS *et al.*, 2012; MILLER *et al.*, 2009; NUNES *et al.*, 2013; RÉUS *et al.*, 2015).

Os sinais inflamatórios centrais e periféricos ativam micróglia, que por sua vez, iniciam uma cascata inflamatória através da liberação de citocinas, quimiocinas, EROs e ERNs induzindo ativação da astróglia e, amplificando assim, os sinais inflamatórios no SNC. As citocinas, incluindo IL-1, IL-6 e TNF-alfa, ativam uma enzima, denominada indolamina 2,3-dioxigenase (IDO), que decompõe o triptofano, o primeiro precursor da serotonina, em quinurenina, um potente agonista do receptor glutamatérgico N-metil-d-aspartato (NMDA) e estimulador da liberação glutamato. Além disso, uma excessiva exposição à citocinas, quinurenina, EROs e ERNs, comprometem várias funções astrocíticas, conduzindo finalmente a regulação gênica negativa dos transportadores de glutamato, prejudicando a sua receptação, aumentando ainda mais os seus níveis na fenda sináptica. A acumulação de glutamato provoca um aumento de Ca^{2+} intracelular, o que por sua vez pode conduzir à produção de espécies de oxigênio reativas (ROS) devido a uma disfunção mitocondrial e redução da

capacidade antioxidante, com sérios danos as estruturas celulares (MILLER *et al.*, 2009; NUNES *et al.*, 2013; RÉUS *et al.*, 2015).

Assim, o estresse oxidativo pode ser consequência e/ou causa do processo inflamatório que contribui para a excitotoxicidade do glutamato, a qual é responsável por aumentar a expressão de genes pró-inflamatórias, inibir a expressão de fatores neurotróficos e levar a célula a apoptose, comprometendo a plasticidade neuronal, condição comum na depressão e epilepsia (KANDRATAVICIUS *et al.*, 2012; MILLER *et al.*, 2009; NUNES *et al.*, 2013; RÉUS *et al.*, 2015; SANTELLO; VOLTERRA, 2012).

Os compostos antioxidantes podem atuar na proteção do organismo contra os radicais livres. Tais compostos podem ter origem endógena, como as enzimas catalase, superóxido dismutase e glutatona, ou serem exógenos, provenientes da alimentação, com destaque para as vitaminas A, C e E, selênio, coenzima Q10, melatonina e os polifenóis (HOVATTA *et al.*, 2010). Neste sentido, agentes antioxidantes naturais ou sintéticos têm sido recomendados para alívio dos sinais e sintomas de doenças associadas com o estresse oxidativo e até mesmo para bloquear sua evolução (NAKAMURA, LIPTON, 2009).

1.4 Sistemas de Neurotransmissores Envolvidos na Epilepsia e Depressão

Algumas sugestões experimentais acerca das alterações neurobiológicas comuns entre epilepsia e depressão envolvem os sistemas de neurotransmissão monoaminérgicos, gabaérgico e glutamatérgico (KANDRATAVICIUS *et al.*, 2012; KANNER, 2011).

Muitos estudos sugerem uma ligação entre o sistema monoaminérgico, glutamatérgico e gabaérgico com eixo HPA na depressão (BARDEN, 2004; KANNER, 2011; LANFUMEY *et al.*, 2008; PORTER *et al.*, 2004). Embora não haja uma relação simples e bem elucidada entre eles, foi proposto que o aumento sustentado da secreção de glicocorticoides em resposta ao estresse repetido pode ter numerosos efeitos em longo prazo sobre a neurotransmissão monoaminérgica (LANFUMEY *et al.*, 2008). Vários estudos descobriram que a hipersecreção de glicocorticoides leva a uma supressão da expressão gênica dos RG, com uma consequente redução na expressão das enzimas responsáveis pela síntese de monoaminas no cérebro, triptofano hidroxilase e tirosina hidroxilase, contribuindo para a deficiência de monoaminas e, subsequentemente, predispondo a depressão (CLARK *et al.*, 2008; HEYDENDAEL, JACOBSON, 2009; MAKINO *et al.*, 2002). Um funcionamento anormal de HPA comparável àquele encontrado em pacientes depressivos também foi demonstrado em seres humanos com ELT (ZOBEL *et al.*, 2004).

A deficiência de monoaminas foi há muito tempo sugerida para explicar a patogenia da depressão, numa abordagem que passou a ser comumente conhecida como “teoria monoaminérgica da depressão” (COPPEN, 1967; KRISHNAN, NESTLER, 2008; SCHILDKRAUT, 1965; SCHILDKRAUT, 1974). Tal teoria foi fundamentada em parte na observação de que diversas drogas que aumentam os níveis sinápticos de monoaminas, seja noradrenalina e/ou serotonina, aliviam muitos dos sintomas da depressão, indicando que a neurotransmissão envolvendo uma ou ambas as monoaminas é reduzida na vigência dessa doença.

A falta de equilíbrio entre a excitação e a inibição na epilepsia já é conhecida há bastante tempo (KONDZIELLA *et al.*, 2007). No entanto, apenas recentemente o envolvimento do glutamato e do GABA foi reconhecido nos transtornos depressivos (KANNER, 2011). Em concordância com essas descobertas, o uso de agonistas e antagonistas do GABA é capaz de modular sintomas depressivos e a administração crônica de antidepressivos induz mudanças marcantes na função gabaérgica (KANDRATAVICIUS *et al.*, 2012; SANACORA *et al.*, 2002). Sugere-se, ainda, que existe uma relação evidente entre a neurotransmissão glutamatérgica e a monoaminérgica, uma vez que os neurônios glutamatérgicos projetam do córtex até os núcleos subcorticais monoaminérgicos, como o *locus ceruleus*, os núcleos da rafe e a substância negra, e que as drogas que aumentam as concentrações de noradrenalina e 5-HT geralmente diminuem a resposta ao glutamato, contribuindo para uma resposta inibitória, o que beneficiaria pacientes com depressão e epilepsia (BONANNO *et al.*, 2005; KANDRATAVICIUS *et al.*, 2012; ROBINSON *et al.*, 2003).

Jobe *et al.* (1999) sugeriram que alguns tipos de depressão e alguns tipos de epilepsia podem ser associados com a diminuição noradrenérgica e serotoninérgica no cérebro. Em estudo realizado por Clinckers *et al.* (2010), a noradrenalina demonstrou influenciar na neurotransmissão dopaminérgica, glutamatérgica e gabaérgica, contribuindo potencialmente para a supressão de crises límbicas. No entanto, a neurotransmissão noradrenérgica ainda exhibe efeitos discordantes no que diz respeito às ações anti e/ou pró-convulsivantes, as quais variam dependendo da distribuição do receptor adrenérgico nas regiões do cérebro, das espécies animais, modelos em estudo e da seletividade dos agonistas e antagonistas para os diferentes subtipos de receptores que varia de acordo com a dose do fármaco (CLINCKERS *et al.*, 2010; GIORGI *et al.*, 2004; PIZZANELLI *et al.*, 2009). Segundo Oliveira *et al.* (2007) as drogas com envolvimento noradrenérgico são as que estão significativamente mais implicadas com a frequência de crises convulsivas em pacientes que sofrem com epilepsia.

1.4.1 Sistema Noradrenérgico

O *locus ceruleus*, localizado na ponte, é um sistema de projeção generalizado que libera noradrenalina para todo o sistema nervoso central. A noradrenalina é uma catecolamina sintetizada a partir do seu aminoácido aromático precursor L-tirosina. Inicialmente a L-tirosina é hidroxilada produzindo a diidroxifenilalanina, etapa catalisada pela enzima tirosina hidroxilase. Este é o passo limitante da síntese, já que o produto final da via, a noradrenalina, inibe a enzima tirosina hidroxilase. Na etapa seguinte, a enzima dopa descarboxilase catalisa a descarboxilação da diidroxifenilalanina, convertendo-a em dopamina. A dopamina é hidroxilada pela enzima dopamina- β -hidroxilase dando origem a noradrenalina. A noradrenalina é, então, captada do citoplasma para o interior das vesículas sinápticas por um transportador vesicular de monoaminas (BRUNTON, 2012; BOGDANSK, 1988; FELDMAN *et al.*, 1997).

A neurotransmissão noradrenérgica é altamente complexa e envolve nove diferentes receptores adrenérgicos (adrenorreceptores). Os adrenorreceptores pertencem à superfamília de receptores de membrana com sete domínios transmembranares acoplados a diferentes proteínas G. São divididos em três subfamílias (α_1 , α_2 e β) cada uma delas contendo três subtipos, denominados α_{1A} , α_{1B} , e α_{1D} ; α_{2A} , α_{2B} , e α_{2C} ; β_1 , β_2 e β_3 . Os nove subtipos de adrenorreceptores são codificados por genes diferentes e apresentam características farmacológicas distintas (HIEBLE, 2007; PUPO; MINNEMAN, 2001; ZHONG; MINNEMAN, 1999).

A ação da noradrenalina, quando liberada na fenda sináptica mediante a impulso nervoso, se dá por meio da ativação dos adrenorreceptores localizados pós-sinápticamente (α_1 , α_2 e β) ou pré-sinápticamente (α_2). Os receptores α_2 de localização pré-sináptica agem como autorreceptores, ou seja, reconhecem a liberação de NA e desativam sua liberação adicional (JORM; STAMFORD, 1993; L'HEUREUX *et al.*, 1986; STAHL, 2010). Enquanto que a ativação de receptores α_2 pós-sinápticos inibe a ativação das células pós-sinápticas (células-alvo) e a ativação de α_1 pós-sináptico é responsável pela ativação da neurotransmissão noradrenérgica (GOBERT *et al.*, 1998).

Sabe-se ainda que a serotonina também regula a neurotransmissão noradrenérgica, e vice-versa. Um aumento da liberação de serotonina, mediante dessensibilização de receptores serotoninérgicos pré-sinápticos em neurônios noradrenérgicos, leva a uma maior liberação de NA e, conseqüentemente, ativação de receptores α_1 adrenérgicos (GORMAN;

SULLIVAN, 2000; SZABO, BLIER, 2001a; SZABO, BLIER, 2001b), contribuindo para atividade antidepressiva.

Para que haja inativação da neurotransmissão noradrenérgica, a NA deve ser retirada da fenda sináptica. O processo de receptação da NA da fenda sináptica foi descrito originalmente por Axelrod (1971) e é realizada pelo transportador de noradrenalina (NAT), o qual localiza-se na membrana plasmática de neurônios noradrenérgicos e serve como mecanismo primário de inativação da transmissão noradrenérgica. Este é um processo competitivo, onde uma variedade de aminas naturais e outras drogas podem ocupar o transportador e influenciar na captação do neurotransmissor. A nível intraneuronal a inativação da transmissão noradrenérgica ocorre pela enzima monoaminoxidase (MAO) (AXELROD, 1971; COSTA; SANDLER, 1972).

A alteração no sistema noradrenérgico tem sido implicada em vários distúrbios como depressão, ansiedade, transtorno do déficit de atenção e hiperatividade e epilepsia (TIMMONS *et al.*, 2004). Assim, a manipulação do sistema noradrenérgico foi um dos primeiros instrumentos relevantes adaptados para o entendimento dos eventos moleculares envolvidos na regulação do humor, desde a primeira observação empírica da reserpina apresentando efeitos depressivos (BAUMEISTER *et al.*, 2003). Acredita-se que a NA modula o humor particularmente através da atividade dos receptores inibitórios α_2 pré-sinápticos (autorreceptores). Além disso, o bloqueio de receptores α_1 -adrenérgicos mimetiza o estado depressivo (STONE *et al.*, 2003). A NA exerce efeitos inibitórios e excitatórios e tais ações podem estar relacionadas com a concentração da NA na fenda sináptica e ativação de diferentes subtipos de adrenoceptores específicos nos circuitos-alvo (SALGADO *et al.*, 2012).

Com relação a epilepsia, a NA exerce um papel dual sobre as crises convulsivas, podendo modular ou participar da elaboração de tais fenômenos (GIORGI *et al.*, 2004). Investigações farmacológicas com agonistas e antagonistas, visando revelar o papel das classes dos adrenoceptores na susceptibilidade de convulsões, muitas vezes produziu resultados contraditórios. Efeitos tanto pró como anticonvulsivantes têm sido relatados por muitos compostos, o que impedem a identificação consistente de um receptor adrenérgico anticonvulsivo e/ou pró-convulsivo (PIZZANELLI *et al.*, 2009; WEINSHENKER, SZOT, 2002).

1.4.1.1 Adrenorreceptores α_1

A neurotransmissão noradrenérgica envolvendo o adrenoceptor α_1 é regulada pelos seus três subtipos de receptores e tem papel importante na regulação do comportamento animal, no entanto existem poucos estudos mostrando o papel de cada subtipo desses receptores. Um desses estudos mostra uma forte correlação entre a potência de antagonistas não seletivos para os subtipos de adrenoceptores α_1 em inibir a atividade comportamental geral e suas afinidades por adrenoceptores α_{1B} , mas não por adrenoceptores α_{1A} ou adrenoceptores α_{1D} (STONE *et al.*, 2001).

Tem sido proposto que os adrenoceptores α_1 participam da regulação de dois tipos de comportamentos relacionados à depressão e ao estresse: os comportamentos motivados por estímulos positivos e os comportamentos inibidos por estresse (estímulos negativos) (STONE *et al.*, 2007). Nesse contexto, a administração do antagonista de adrenoceptores α_1 , prazosina, aumenta o comportamento de imobilidade de camundongos no teste de suspensão pela cauda (STONE *et al.*, 1999; STONE; QUARTERMAIN, 1999), um modelo animal preditivo de efeitos antidepressivos de drogas em humanos.

Um estudo realizado por Ribeiro (2015) verificou que o antagonismo dos adrenoceptores α_{1A} e α_{1D} apresentaram efeito anti-imobilidade, e que o antagonismo de α_{1B} promoveu efeito pró-imobilidade em animais tratados com imipramina, indicando que o estado normal do comportamento de imobilidade é regulado pelo balanço da ativação de cada um dos três subtipos de adrenoceptores α_1 . Esses resultados corroboraram com achados de Stone *et al.* (2001) que mostraram uma forte correlação entre a potência de antagonistas de adrenoceptores α_1 em inibir a atividade comportamental geral e suas afinidades por adrenoceptores α_{1B} , mas não por adrenoceptores α_{1A} ou adrenoceptores α_{1D} . Stone *et al.* (2002) mostraram, ainda, que a capacidade do modafinil em aumentar a atividade geral de camundongos expostos a um novo ambiente não é observada em camundongos nocaute para o adrenoceptor α_{1B} , o que sugere a importância desse adrenoceptor na atividade comportamental geral.

O envolvimento dos adrenoceptores α_{1B} também foi observado em crises convulsivas de camundongos transgênicos que possuem uma superexpressão do receptor α_{1B} , os quais exibiram crises convulsivas espontâneas e que foram parcialmente revertidas, neste modelo, pela administração de terazosina (antagonista seletivo para o adrenoceptor α_1 , mas não específico para os seus subtipos), indicando, assim, que o subtipo α_{1B} sustenta a atividade

convulsiva e que a terazosina parece ter uma maior afinidade para este subtipo do adrenoceptor α_1 (KUNIEDA *et al.*, 2002; ZUSCICK *et al.*, 2000).

1.5 Terapia Antidepressiva e Convulsões

Os antidepressivos podem ser incluídos em algumas classes farmacológicas, tais como os inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRSs), os inibidores não seletivos da recaptação de monoaminas ou antidepressivos tricíclicos (ADTs), os inibidores da monoamina oxidase e os antidepressivos denominados atípicos (LANDMARK *et al.*, 2016).

Pesquisas quanto ao uso de antidepressivos em pacientes com epilepsia ainda são limitadas, mas há um consenso geral de que os antidepressivos podem causar convulsões em altas doses ou doses consideradas tóxicas (KANNER, 2016). A incidência de crises na população que faz uso de antidepressivos em dose plena varia entre 0,1% e 4,0%. Portanto, de forma geral, o uso de antidepressivos, quando usados nas doses recomendadas, tem pouca chance de produzir ou exacerbar crises, embora isso também não seja consenso (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

As monoaminas são os principais neurotransmissores afetados pela terapia com antidepressivos. É sabido que são necessárias várias semanas para observar efeitos clínicos dessas drogas, que apontam para uma mudança em longo prazo no equilíbrio neuroquímico dentro dessas redes neuronais. Os antidepressivos podem perturbar o equilíbrio neuronal e controle da excitabilidade, levando a convulsões, no entanto os mecanismos subjacentes ainda não são claros (CURRAN; PAUW, 1998).

Numa revisão recente, o papel da serotonina no controle de excitabilidade neuronal, propagação da epileptogênese e convulsões é enfatizado, e vários efeitos são observados por meio da modulação de diferentes subtipos de receptores de 5-HT em todo o cérebro (HAMID; KANNER, 2013). Os efeitos serotoninérgicos e noradrenérgicos dos antidepressivos parecem apresentar propriedades anticonvulsivantes em doses terapêuticas, enquanto que doses mais altas podem ativar outras vias neuroquímicas, culminando em crises convulsivas (FEVALE *et al.*, 1995; JUDGE; RENTMEESTER, 2011).

Quatro antidepressivos, em particular, parecem ter efeitos pró-convulsivantes mais pronunciados, tais como a clomipramina, um antidepressivo tricíclico; a amoxapina e a maprotilina, inibidores não seletivos da MAO, e a bupropiona, um antidepressivo atípico, inibidor da recaptação de noradrenalina e dopamina. Para todos os outros antidepressivos, o risco para convulsões é considerado baixo (LANDMARK *et al.*, 2016).

A clomipramina não é mais tão clinicamente relevante como um antidepressivo já que a maioria de uso de antidepressivos é constituída por uma classe de medicamentos mais seletivos, no entanto ainda é indicada para tratamento do transtorno obsessivo-compulsivo (TOC). Um efeito pró-convulsivante foi demonstrado apenas em superdoses administradas em animais (20-40 mg/kg) (PETERSON *et al.*, 1985). As doses terapêuticas em humanos estão geralmente sob a ordem de 50 até 150 mg/dia. Alper *et al.* (2007) verificaram que a clomipramina quando utilizada para o TOC está relacionada com o maior risco (0,7%) de convulsões entre os medicamentos utilizados. A droga tem um risco intermediário (5% -10%) para as convulsões induzidas por overdose (JUDGE; RENTMEESTER, 2011). E se possível, deve ser evitada em pacientes com epilepsia. Alper *et al.* (2007) ainda observaram que a incidência de convulsões foi maior em pacientes que receberam clomipramina do que naqueles que receberam placebo.

A amoxapina tem um elevado risco (30%) para convulsões com superdosagens (LITOVITZ; TROUTMANWG, 1983; WHITE *et al.*, 2008), mas existem vários relatos de caso que descrevem convulsões associadas ao tratamento com este medicamento mesmo dentro das doses terapêuticas (BARRY *et al.*, 2008; GIANNI; PRICE, 1984). O banco de dados de reações adversas a medicamentos da OMS de 1968 a 2006 mostrou a amoxapina como o segundo antidepressivo mais citado por ter convulsões como efeito adverso (8,7%) e deve ser evitada em pacientes com epilepsia (KUMLIEN; LUNDBERG, 2010).

A maprotilina tem sido relatada por aumentar o risco de convulsões em pacientes sem epilepsia, com taxa de incidência de 15,6% de forma dependente da dose (PISANI *et al.*, 2002). Convulsões associadas com este medicamento têm sido descritas em vários relatos de casos desde a década de 1980 (ATRI; JULIUS, 1984; HOFFMAN; WACHSMUTH, 1982), mesmo dentro das dosagens normalmente prescritas. Um estudo retrospectivo entre os pacientes com depressão mostraram um risco de convulsão mesmo entre as doses terapêuticas (75 até 300 mg) (JABBARI, 1985) com o risco dose dependente. O banco de dados de reações adversas a medicamentos da OMS 1968-2006 mostrou a maprotilina como a droga mais referida com crises convulsivas como efeito adverso (14,4%). Maprotilina deve, por conseguinte, ser evitada em doentes com epilepsia (KUMLIEN; LUNDBERG, 2010).

A bupropiona é utilizada como um antidepressivo e cada vez mais tem sido utilizada como tratamento para cessação do tabagismo. Inicialmente, foi comercializado com apresentação de liberação imediata, mas depois foi aprovada a formulação de liberação prolongada. Após a sua introdução em 1985, uma significativa incidência de convulsões nas dosagens normalmente recomendadas originalmente (400-600 mg) conduziu a sua retirada do

medicamento do mercado um ano mais tarde. À medida que se verificou que o risco de convulsões era dependente da dose, a bupropiona foi reintroduzida em 1989, com uma dose máxima recomendada de 450 mg/dia (DAVIDSON, 1989). Como esperado, a droga tem um risco elevado (10%) de ataques induzidos por overdose (JUDGE; RENTMEESTER, 2011). Em estudos de fase II e III da FDA para os antidepressivos, a bupropiona de liberação imediata tinha um aumento no risco de convulsões (0,6%) semelhante à clomipramina (0,7%), ao passo que o risco (0,1%) de convulsões com a apresentação de liberação prolongada estava dentro do normal para os outros antidepressivos (ALPER *et al.*, 2007). O banco de dados de reações adversas a medicamentos da OMS 1968-2006 referiu crise convulsiva (9,48%) como reação adversa da bupropiona. Este medicamento aumenta o risco de convulsões de uma maneira dose dependente e deve, portanto, ser utilizado com precaução, preferencia pela formulação de liberação prolongada para evitar elevadas concentrações séricas máximas.

Os estudos randomizados controlados sobre a frequência de convulsões no tratamento de doentes com epilepsia com antidepressivos são escassos. As classes mais novas de antidepressivos, ISRS e IRSN, são mais seguros para as pessoas com epilepsia, e eles parecem obter resposta terapêutica, independentemente da frequência de crises. Estas drogas parecem ter até um potencial anticonvulsivante, em vez de efeitos pró-convulsivantes (ALPER *et al.*, 2007; RIBOT *et al.*, 2012). No entanto, a maioria dessas informações vem da população não-epiléptica, de ensaios pré-comercialização, onde a epilepsia muitas vezes é um critério de exclusão, ou de pós comercialização, onde as condições e os dados são muito variáveis. Na população não epiléptica, o aumento do risco de convulsão foi associado com concentrações elevadas no soro (CURRAN; PAUW, 1998; PRESKOM, 1992; TOMALIK-SCHARTE, 2008).

As pessoas com transtornos psiquiátricos, incluindo depressão, tem risco sete vezes maior de desenvolver epilepsia/convulsões em algum estágio da vida (ADELÖW *et al.*, 2012; HESDORFFER *et al.*, 2012). Desta forma, a ocorrência de convulsões num paciente com depressão pode ser uma expressão do curso natural da doença, e potencializada pela utilização de drogas antidepressivas sem prescrição e monitoramento adequado das doses (LANDMARK *et al.*, 2016). Assim, qualquer plano de tratamento abrangente de transtornos epilépticos deve levar em consideração a existência de comorbidades psiquiátricas e as medicações concomitantes previstas para o seu tratamento (KANNER, 2016).

1.6 Produtos Naturais na Terapêutica

Os produtos naturais têm sido a maior fonte de agentes terapêuticos na história medicinal. A utilização desses produtos com propriedades terapêuticas é tão antiga quanto à civilização humana e, ao longo do tempo, os produtos de origem mineral, animal e vegetal foram as principais fontes do arsenal terapêutico. Nos últimos anos, tem crescido o interesse nas terapias alternativas e no uso terapêutico de produtos naturais, principalmente aqueles derivados de vegetais (CRAGG; NEWMAN, 2013; LALL; KISHORE, 2014; TABASSUM *et al.*, 2014).

Os vegetais produzem uma larga e diversa ordem de componentes orgânicos divididos em metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários possuem função estrutural, plástica e de armazenamento de energia. Os metabólitos secundários, produtos secundários ou produtos naturais, aparentemente não possuem relação com crescimento e desenvolvimento do vegetal (TAIZ; ZEIGER, 2006; VIZZOTO *et al.*, 2010).

Embora os produtos secundários possuam uma variedade de funções nos vegetais, é provável que a sua importância ecológica tenha alguma relação com potencial efeito medicinal para os seres humanos. Por exemplo, produtos secundários envolvidos na defesa do vegetal através de citotoxicidade para patógenos microbianos podem ser úteis como medicamentos antimicrobianos em humanos, se não forem demasiado tóxicos. Da mesma forma, produtos secundários envolvidos na defesa contra herbívoros através de atividade neurotóxica poderia ter efeitos benéficos em seres humanos (ou seja, como antidepressivos, sedativos, relaxantes musculares ou anestésicos) através de sua ação no sistema nervoso central (KAUFMAN *et al.*, 1999; VIZZOTO *et al.*, 2010).

Os metabólitos secundários derivado de espécies vegetais tem atraído o interesse de muitos pesquisadores e constituem quase que 50% das novas drogas introduzidas no mercado farmacêutico de 1981 até 2010 (ARAÚJO; ONOFRE, 2011; NEWMAN; CRAGG, 2010).

A busca incessante por produtos naturais pelas indústrias farmacêuticas deve-se à grande diversidade molecular que eles apresentam (BORRIS, 1996; TURNER, 1996). No entanto, para o desenvolvimento de novos fármacos, existe um desafio, que é de tornar esses princípios ativos naturais num fármaco que seja terapêuticamente efetivo (BORRIS, 1996). Assim, a incorporação dos produtos naturais na terapêutica compreende-se como uma estratégia útil para a obtenção de novos compostos desde que seja realizado um adequado

planeamento, ou seja, o isolamento, a identificação em termos químicos, a síntese química e a avaliação das propriedades farmacêuticas do composto puro (YUNES *et al.*, 2001).

No cenário mundial, obstante a investigação intensiva das plantas medicinais, estima-se que somente 6% de aproximadamente 300.000 espécies de plantas têm sido investigadas farmacologicamente e cerca de 15% fotoquimicamente (CRAGG; NEWMAN, 2013).

Com o desenvolvimento de técnicas modernas que possibilitaram os estudos farmacológicos, bioquímicos, moleculares e toxicológicos, o interesse na procura de novos fármacos ou de protótipos de produtos naturais para obtenção de novos fármacos, aumentou significativamente. Atualmente, a maioria dos fármacos aprovados pela agência FDA derivam direta ou indiretamente dos princípios ativos isolados de produtos naturais (BUTLER, 2008; CALIXTO *et al.*, 2001; CRAGG, 2005; NEWMAN *et al.*, 2003).

O contributo que os produtos naturais têm dado à medicina já está bastante documentado na terapêutica. A crescente busca por agentes terapêuticos derivados de espécies vegetais justifica-se pela quantidade de doenças ainda sem tratamento efetivo e pelo crescimento do conhecimento científico a respeito dos fitofármacos como importantes alternativas terapêuticas (RAMOS *et al.*, 2015).

Entre os produtos naturais mais estudados e aplicados na terapêutica, destacam-se os flavonoides pelo vasto conjunto de atividades biológicas que lhes têm sido atribuídas (GEORGIEV *et al.*, 2014; JAIN *et al.*, 2010; TAPAS *et al.*, 2008).

1.7 Flavonoides

Os flavonoides constituem uma classe de metabólitos secundários pertencentes à classe dos compostos polifenólicos, de ampla distribuição no reino vegetal, com mais de 4000 tipos já foram descobertos (JAGER; SAABY, 2011; PATEL; SINGH; PATEL, 2014) e mais de 10.000 derivados identificados (DIXON; PASINETTI, 2010).

Quimicamente, os flavonoides são caracterizados por compostos de baixo peso molecular, com uma estrutura comum contendo quinze átomos de carbonos (C₆-C₃-C₆), apresentando um anel aromático (anel A) ligado a um anel pirano (anel C), que, por sua vez, está ligado a um terceiro anel aromático (anel B) (DI CARLO *et al.*, 1999; MUSCHIETTI; MARTINO, 2014).

Conforme a posição da ligação do anel B ao anel C, os flavonoides podem ser enquadrados em três classes distintas. Sendo classificados, segundo a nomenclatura da

IUPAC, em: flavonoides, isoflavonoides e neoflavonoides. E dentro de cada classe, de acordo com o grau de oxidação e insaturação do anel C, surgem diferentes grupos de flavonoides com os seus respectivos representantes, tais como os flavan-3-óis (catequina e epicatequina), flavononas (naringenina), flavonas (apigenina e luteolina), flavonóis (quercetina e kaempferol), antocianinas (cianidina), isoflavonas (genisteína e daidzeína) e neoflavononas (neoflavono) (DIXON; PASINETTI, 2010; IUPAC, 2015; MARAIS *et al.*, 2006).

As principais fontes alimentares de flavonoides estão presentes nos grupos dos flavonóis (cebola, brócolis, folhas verdes, maçã, feijão), flavan-3-óis (chá verde, vinho tinto e cacau), flavonas (salsa e aipo), isoflavonas (soja), flavononas (tomate, laranja, tangerina, limão e hortelã) e antocianinas (vinho tinto e frutas vermelhas) (LATIF, 2015).

Embora a ingestão diária de flavonoides na dieta não seja bem conhecida estima-se que ela varia de 60 a 350 mg/dia, entre diferentes nações e culturas (ALAM *et al.*, 2014; BAI *et al.*, 2014; BEKING; VIEIRA, 2011).

Os flavonoides são considerados nutracêuticos, devido as suas distintas propriedades biológicas e farmacológicas (GEORGIEV *et al.*, 2014; JAIN *et al.*, 2010; TAPAS *et al.*, 2008). As atividades biológicas dos flavonoides têm sido atribuídas a seus efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e propriedades de sinalização celular. A compreensão clara dos mecanismos de ação, como antioxidantes e/ou anti-inflamatórios ou moléculas de sinalização, é crucial para a aplicação de flavonoides como nutracêuticos neuroprotetores.

A atividade antioxidante dos flavonoides baseia-se fundamentalmente na sua capacidade em doar átomos de hidrogênio, reduzindo os radicais livres às suas formas estáveis, e quelar íons metálicos (Fe^{3+} e Cu^{2+}) por complexação (HALLIWELL, 1992; SHUKLA; GUPTA, 2010).

As propriedades terapêuticas dos flavonoides associadas à sua ação antioxidante têm sido extensivamente estudadas. Uma dieta rica em flavonoides, que inclua frutas e vegetais previne doenças associadas ao estresse oxidativo, tais com as doenças do SNC. No entanto, o grau em que os flavonoides provenientes da dieta podem atravessar a barreira hemato-encefálica ainda é uma questão de debate, apesar de Rendeiro *et al.* (2015) citarem em um trabalho de revisão, uma série de estudos que mostraram a presença de flavonoides e seus metabólitos no tecido cerebral após a administração oral de epicatequina, quercetina e naringenina, mostrando uma variedade de efeitos biológicos.

Percebe-se claramente que o número de trabalhos avaliando as ações medicinais dos flavonoides é superior ao número de pesquisas de avaliação da sua toxicidade e/ou reações adversas. Isto é preocupante, pois o uso de compostos de origem natural,

principalmente de maneira indiscriminada, também podem causar danos ao organismo. De modo geral, são exaltadas as propriedades benéficas dos flavonoides, não considerando as possíveis reações adversas atreladas a utilização dos mesmos, uma vez que muitos trabalhos não deixam claro em quais doses e tempo de exposição os flavonoides podem ser tóxicos, resultando, muitas vezes, na falta de interesse de outros pesquisadores em utilizá-los como referência ou modelo para a realização de outras pesquisas com esses compostos. Acredita-se que em função disso os flavonoides sejam considerados pela literatura científica e mídia em geral como isentos de reações adversas (RODRIGUES *et al.*, 2015).

1.7.1 Naringenina

A naringenina (4', 5,7-trihidroxiflavanona) é um dos principais flavonoides presentes na dieta ocidental, encontrado no tomate e frutas cítricas (principalmente na casca), que vem atraindo crescente interesse em nutrição clínica e na clínica médica, na prevenção e tratamento de doenças. Embora as propriedades de saúde dos flavonoides sejam atribuídas a sua biodisponibilidade após a ingestão, e a naringenina apresente baixa biodisponibilidade (inferior a 10%), devido a um elevado metabolismo de primeira passagem no intestino e fígado, os estudos mostram que ela continua a mostrar inúmeros efeitos biológicos (ORREGO-LAGARÓN *et al.*, 2015; ORREGO-LAGARÓN *et al.*, 2016).

Este flavonoide tem sido relatado como tendo múltiplos efeitos farmacológicos e muitos deles sobre o sistema SNC possivelmente por efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e propriedades de sinalização celular, através de mecanismos diretos ou indiretos (RENDEIRO *et al.*, 2015).

A naringenina protege contra demência e cognição com potencial terapêutico para a doença de Alzheimer (WILLIAMS *et al.*, 2012; ZAKI *et al.*, 2014), inibe a atividade da monoamina oxidase (OLSEN *et al.*, 2008), exibe efeito do tipo antidepressivo no teste de suspensão da cauda mediado, em parte, por sistemas monoaminérgicos, HPA e via fatores neurotróficos (YI *et al.*, 2010; 2012), exerce efeitos neuroprotetores contra a neurotoxicidade induzida por carbaril (MUTHAIAH *et al.*, 2013), alivia lesão cerebral isquêmica (RAZA *et al.*, 2013), entre outros efeitos neuroprotetores (LATIF, 2015; RENDEIRO *et al.*, 2015).

Neste sentido, considerando que a naringenina já foi estudada por suas propriedades antidepressivas e antioxidantes, e levando em consideração que os estudos mostram a existência de mecanismos patológicos subjacentes comuns operando entre a depressão e a epilepsia, o presente estudo poderá fornecer subsídios para nortear sobre a segurança e

risco/benefício da naringenina como terapêutica alternativa natural no tratamento da depressão comórbida na epilepsia, uma vez que não encontramos na literatura científica estudos pré-clínicos abordando os efeitos farmacológicos da naringenina em condições patológicas que podem ser coexistentes.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar os efeitos da naringenina sobre o sistema nervoso central em modelos comportamentais de convulsão e depressão em camundongos.

2.2 Específicos

- Analisar os efeitos comportamentais do tratamento agudo e crônico com naringenina no teste da suspensão da cauda;
- Analisar os efeitos comportamentais do tratamento agudo e crônico com naringenina no teste do labirinto em cruz elevado;
- Analisar os efeitos comportamentais do tratamento agudo e crônico com naringenina no teste da convulsão induzida por pilocarpina;
- Investigar o envolvimento do adrenoceptor α_1 , no tratamento agudo e crônico com naringenina, no teste da suspensão da cauda e no teste da convulsão induzida por pilocarpina;
- Determinar os efeitos do tratamento agudo e crônico da naringenina sobre a peroxidação lipídica e formação de nitrito-nitrato em tecido cerebral de camundongos após convulsões induzidas por pilocarpina;

3 METODOLOGIA

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss adultos machos (20-30g) oriundos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará – UFC. Os animais foram mantidos na Hospedaria da UFC – *Campus* Sobral em caixas de polipropileno com no máximo 8 animais, em condições ambientais semelhantes, em temperatura média de $24 \pm 2^\circ\text{C}$, com ciclo claro/escuro alternado de 12 horas, com luzes acesas às 06:00 horas, recebendo ração padrão e água *ad libitum*.

3.2 Aspectos Éticos

O protocolo experimental (número 17/15) (Anexo A) foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFC, e os experimentos foram realizados de acordo com as normas internacionais para utilização experimental de animais.

3.3 Drogas e Reagentes

As drogas e reagentes utilizados para execução do trabalho estão listados no Quadro 1.

Quadro 1 – Drogas e Reagentes Utilizados.

Drogas/Reagentes	Origem
Naringenina	Sigma Chemical Co.,USA
Diazepam	União Química Brasil
Cloridrato de imipramina	Cristália
Cloridrato de fluoxetina	Neo Química
Cloridrato de bupropiona	Nova Química
Minipress [®] (Cloridrato de prazosina)	Laboratório Pfizer
Cloridrato de pilocarpina	Sigma Chemical Co.,USA
Dimetil Sulfóxido (DMSO)	Sigma Chemical Co.,USA

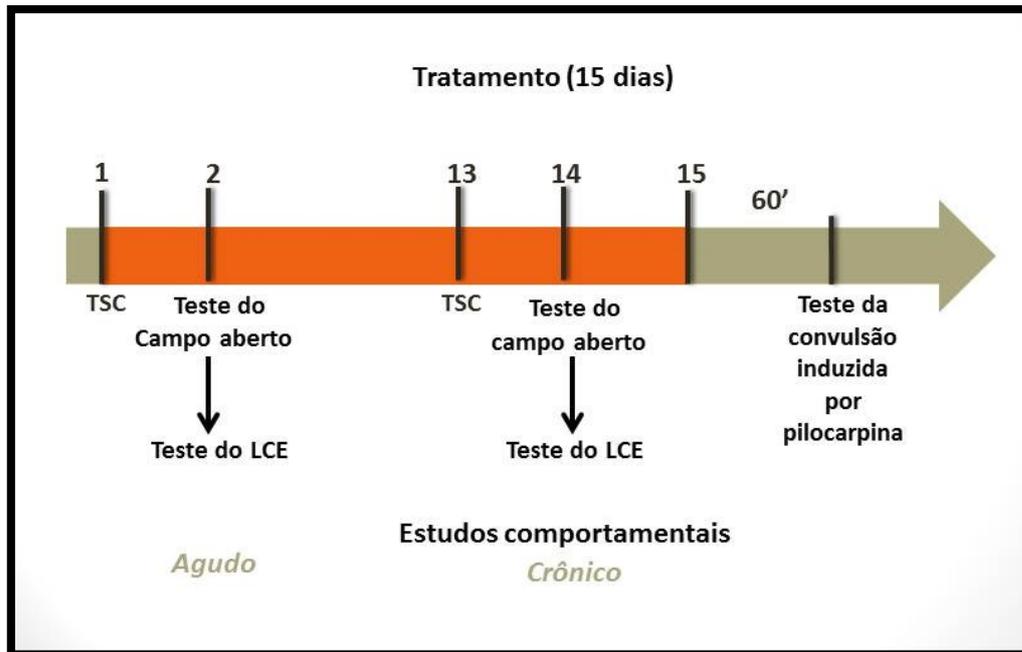
3.4 Preparo das Drogas

A naringenina foi dissolvida em DMSO a 0,01%, a pilocarpina foi dissolvida em solução salina e as demais drogas foram dissolvidas em água destilada.

3.5 Protocolo Experimental

Os experimentos comportamentais foram conduzidos entre 08:00 e 12:00 horas. Antes dos mesmos, os animais foram colocados em ambiente fechado, desprovido de barulho externo, com a temperatura constante ($24 \pm 1^\circ \text{C}$) e iluminação de baixa intensidade (lâmpada vermelha de 15 W), para que se adaptassem com o ambiente do experimento. Os testes da suspensão da cauda (TSC), campo aberto, labirinto em cruz elevado (LCE) foram realizados com os mesmos grupos de animais, tanto no tratamento agudo (primeiro e segundo dias de tratamento) como no crônico (décimo quarto e décimo quinto dias de tratamento) (**Figura 1**), uma hora após a administração via oral de naringenina ou imipramina ou fluoxetina ou bupropiona ou prazosina, com exceção do teste da convulsão, que para tratamento agudo, foram utilizados outros grupos de animais (**Figura 2**). Os testes comportamentais realizados com os animais que foram tratados durante 15 dias aconteceram em dias distintos, com exceção do campo aberto e labirinto em cruz elevado que foram realizados no mesmo dia, seguido um do outro (**Figuras 1 e 3**). Em todos os testes, com exceção do teste da suspensão da cauda, após cada observação do animal, foi utilizado álcool 10% para remoção de resíduos e odor do mesmo.

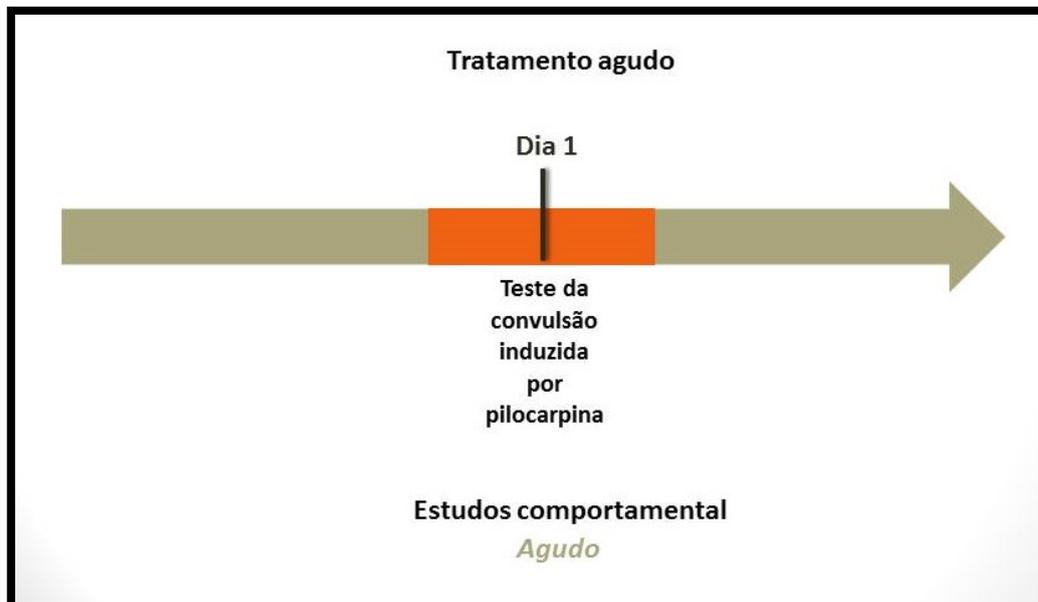
Figura 1 - Protocolo Experimental (Tratamento Agudo e Crônico)



TSC= Teste da Suspensão da Cauda; LCE= Labirinto em Cruz Elevado.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 2 - Teste da Convulsão Induzida por Pilocarpina com (Tratamento Agudo)



Fonte: Elaborada pelo autor.

3.6 Tratamento dos Grupos Experimentais

As doses da naringenina foram determinadas com base em trabalhos que avaliaram a atividade antidepressiva deste flavonoide (YI *et al.*, 2010; YI *et al.*, 2012). As doses das demais drogas foram selecionadas a partir de estudos prévios realizados em nosso laboratório. Os animais receberam um pré-tratamento com naringenina (NAR) (10, 20, 50, v.o.) ou veículo (DMSO 0,01%, v.o.) de forma aguda (**Quadro 2**) e crônica (durante 15 dias) (**Quadro 3**), ou prazosina (1 mg/kg, v.o.) (antagonista adrenérgico α_1) ou prazosina (1 mg/kg, v.o.) com NAR (20 mg/kg ou 50, v.o.) durante 15 dias (**Quadro 3**). Para a avaliação da atividade antidepressiva no teste de suspensão da cauda, foram utilizadas imipramina 30 mg/kg, fluoxetina 15 mg/kg e bupropiona 5 mg/kg, via oral (v.o.), como padrões positivos. Como referência ansiolítica nos testes do labirinto em cruz elevado e campo aberto foram utilizados o diazepam 1 mg/kg (i.p.) e diazepam 2 mg/kg (i.p.), respectivamente. Para o teste de convulsão foi utilizada a pilocarpina na dose de 400 mg/kg (i.p.).

Quadro 2 – Tratamento Agudo

GRUPOS	TRATAMENTOS
1	DMSO 0,01% agudo
2	DMSO 0,01% agudo + Pilocarpina (400 mg/kg i.p.)
3	Naringenina (10 mg/kg, v.o.) agudo + Pilocarpina (400 mg/kg i.p.)
4	Naringenina (20 mg/kg, v.o.) agudo + Pilocarpina (400 mg/kg i.p.)
5	Naringenina (50 mg/kg, v.o.) agudo + Pilocarpina (400 mg/kg i.p.)
6	Imipramina (30 mg/kg, v.o) agudo + Pilocarpina (400 mg/kg i.p.)
7	Fluoxetina (15 mg/kg, v.o) agudo + Pilocarpina (400 mg/kg i.p)
8	Bupropiona (5 mg/kg, v.o) agudo + Pilocarpina (400 mg/kg i.p)

Quadro 3 – Tratamento Crônico

GRUPOS	TRATAMENTOS
9	DMSO 0,01% durante 15 dias
10	DMSO 0,01% durante 15 dias + Pilocarpina (400 mg/kg i.p.) no 15° dia
11	Naringenina (10 mg/kg, v.o.) durante 15 dias + Pilocarpina (400 mg/kg i.p.) no 15° dia
12	Naringenina (20 mg/kg, v.o.) durante 15 dias + Pilocarpina (400 mg/kg i.p.) no 15° dia
13	Naringenina (50 mg/kg, v.o.) durante 15 dias + Pilocarpina (400 mg/kg i.p.) no 15° dia
14	Imipramina (30mg/kg, v.o) durante 15 dias + Pilocarpina (400 mg/kg i.p) no 15° dia
15	Fluoxetina (15 mg/kg, v.o) durante 15 dias + Pilocarpina (400 mg/kg i.p) no 15° dia
16	Bupropiona (5 mg/kg, v.o) durante 15 dias + Pilocarpina (400 mg/kg i.p) no 15° dia
17	Prazosina (1 mg/kg, v.o.) durante 15 dias + Pilocarpina (400 mg/kg i.p.) no 15° dia
18	Prazosina (1 mg/kg, v.o.) durante 15 dias + Naringenina (20 mg/kg, v.o.) + Pilocarpina (400 mg/kg i.p.) no 15° dia
19	Prazosina (1 mg/kg, v.o.) durante 15 + Naringenina (50 mg/kg, v.o.) + Pilocarpina (400 mg/kg i.p.) no 15° dia
20	Prazosina (1 mg/kg, v.o.) durante 15 + Imipramina (30 mg/kg, v.o.) + Pilocarpina (400 mg/kg i.p.) no 15° dia

3.7 Estudos Comportamentais

Os estudos comportamentais foram realizados 30 ou 60 minutos após os tratamentos via i.p ou v.o., respectivamente.

3.7.1 Avaliação da Atividade Locomotora

3.7.1.1 Teste do Campo Aberto

Este modelo foi proposto por Hall (1936) para a avaliação da atividade locomotora dos animais. O aparato para realização do teste consiste em uma caixa de madeira com piso preto (30 x 30 x 15) dividido em nove quadrantes iguais.

Para este teste foram utilizados os seguintes grupos de animais: veículo (DMSO 0,01%, v.o.) ou naringenina (10, 20, 50 mg/kg, v.o.) ou fluoxetina (15 mg/kg) ou imipramina (30 mg/kg) ou bupropiona (5 mg/kg) ou diazepam (2 mg/kg, i.p.).

Após 30 ou 60 minutos dos tratamentos i.p. ou v.o., respectivamente, no segundo e décimo quarto dias de tratamento com veículo ou naringenina ou imipramina ou fluoxetina ou bupropiona ou diazepam, os camundongos foram colocados no centro do campo aberto, um por vez, e o seu comportamento foi observado por 5 minutos. Os parâmetros observados foram: a atividade locomotora espontânea (número de cruzamentos com as quatro patas entre as divisões do campo aberto), o número de comportamentos de auto-limpeza (*grooming*) e o número de levantamentos (*rearing*) sem apoiar nas paredes do campo aberto (**Figura 3**).

3.7.2 Avaliação da Atividade Ansiolítica

3.7.2.1 Teste do Labirinto em Cruz Elevado

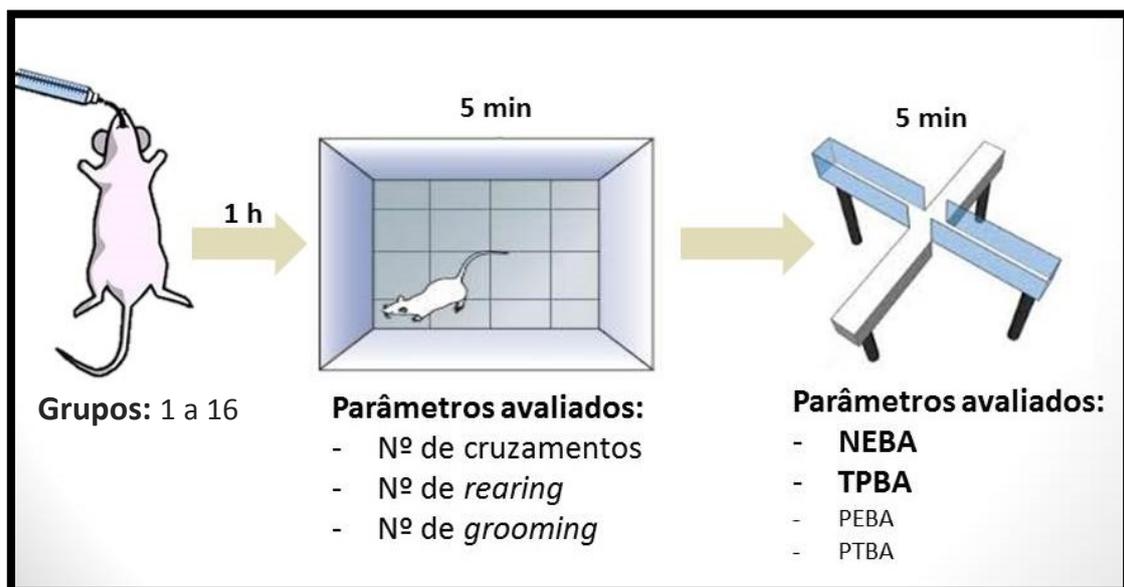
O labirinto em cruz elevado (LCE) é baseado no modelo proposto, em ratos, por (PELLOW *et al.*, 1985) e validado por (LISTER, 1987) para camundongos e consiste de dois braços abertos opostos (30 x 5 x 25 cm) e dois fechados (30 x 5 x 25 cm), também opostos, em forma de cruz grega. Os braços abertos e fechados estão conectados por uma plataforma central (5 x 5 cm). A plataforma, as paredes laterais dos braços fechados e o chão são confeccionados em acrílico. O aparelho fica elevado a uma altura de 45 cm do nível do chão. Neste modelo, os roedores evitam os braços abertos do labirinto, restringindo a maioria de suas atividades aos braços fechados. Um aumento seletivo nos parâmetros correspondentes aos braços abertos (entradas e tempo) revela um efeito ansiolítico (PELLOW *et al.*, 1985; PELLOW; FILE, 1986).

Para este teste foram utilizados os seguintes grupos de animais: veículo (DMSO 0,01%, v.o.) ou naringenina (10, 20, 50 mg/kg, v.o.) ou imipramina (30 mg/kg, v.o.) ou fluoxetina (15 mg/kg, v.o.) ou bupropiona (5 mg/kg, v.o.) ou diazepam (1 mg/kg, i.p.).

Após 30 ou 60 minutos dos tratamentos i.p. ou v.o., respectivamente, no segundo e décimo quarto dias de tratamento com veículo ou naringenina ou imipramina ou fluoxetina ou bupropiona ou diazepam, os camundongos foram colocados no centro do aparelho com a cabeça voltada para um dos braços fechados e o seu comportamento foi observado por 5 min (PELLOW *et al.*, 1985) (**Figura 3**).

As medidas comportamentais registradas no LCE foram: frequência de entradas e o tempo despendido nos braços abertos e nos fechados. A frequência total de entradas foi obtida pela soma simples das frequências de entradas nos braços abertos e nos fechados. Para análise estatística dos dados e confecção dos gráficos, a porcentagem de entradas nos braços abertos foi calculada dividindo-se a frequência de entradas nos braços abertos pela frequência total de entradas, e esse índice multiplicado por 100. De maneira semelhante foi calculada a porcentagem de tempo em que os animais permaneceram nos braços abertos. Os parâmetros utilizados para a análise estatística foram: número de entradas nos braços abertos (NEBA), tempo de permanência nos braços abertos (TPBA), porcentagem de entrada nos braços abertos (PEBA) e porcentagem de tempo nos braços abertos (PTBA). Para a análise estatística todos os grupos foram comparados ao grupo controle.

Figura 3 - Esquema do Teste do Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevado



NEBA= Número de entradas nos braços abertos; TPBA= Tempo de permanência nos braços abertos;
PEBA= Porcentagem de entrada nos braços abertos; PTBA= Porcentagem de tempo nos braços abertos.

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.7.3 Avaliação da Atividade Antidepressiva

3.7.3.1 Teste da Suspensão da Cauda

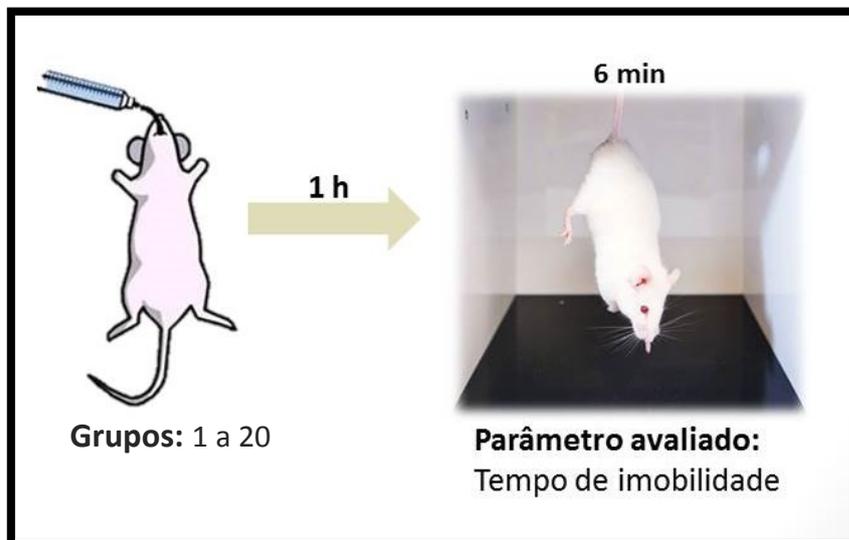
O teste de suspensão pela cauda é um dos modelos clássicos para avaliação da atividade antidepressiva de fármacos (STERU *et al.*, 1985). Nesse teste, os animais são

suspensos pela cauda impedidos de tocar o chão ou fugir e defrontam-se com o conflito entre o estresse físico gerado pela tentativa de fuga sem sucesso e a motivação para continuar tentando. Provavelmente, no momento em que esse estresse físico ultrapassa a motivação para a fuga, eles adquirem uma postura imóvel característica (corpo e cabeça alongados, patas dianteiras unidas e traseiras separadas) cuja duração e frequência aumentam ao longo do tempo. Esse modelo tem validade preditiva, uma vez que drogas com atividade antidepressiva utilizadas na terapia da depressão em humanos diminuem o tempo de imobilidade (efeito anti-imobilidade) de camundongos nesse teste (CRYAN *et al.*, 2005; STERU *et al.*, 1985).

Para esse teste foram utilizados os seguintes grupos de animais: veículo (DMSO 0,01%, v.o.) ou naringenina (10, 20, 50 mg/kg, v.o.) ou imipramina (30 mg/kg, v.o.) ou fluoxetina (15 mg/kg, v.o.) ou bupropiona (5 mg/kg, v.o.) ou prazosina (1 mg/kg, v.o.).

Após 30 ou 60 minutos dos tratamentos i.p. ou v.o., respectivamente, no primeiro e décimo terceiro dias de tratamento com veículo ou naringenina ou imipramina ou fluoxetina ou bupropiona, os camundongos, um por vez, foram suspensos, presos com uma fita adesiva cerca de 1 cm da cauda, numa plataforma de 58 cm, durante 6 minutos. O parâmetro observado foi o tempo de imobilidade do animal, em segundos (**Figura 4**).

Figura 4 - Esquema do Teste da Suspensão da Cauda



Fonte: Elaborada pelo autor.

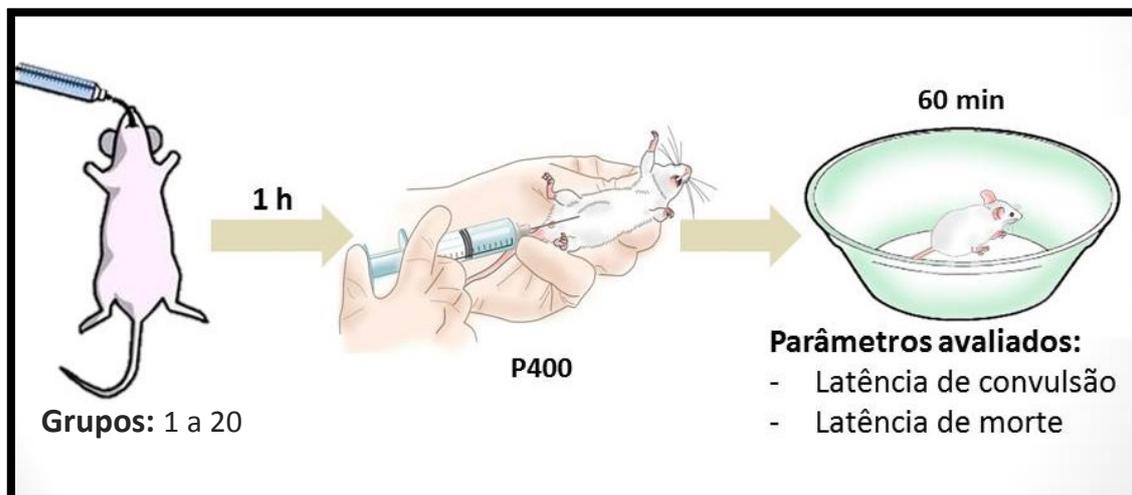
3.7.4 Avaliação da Convulsão Induzida por Pilocarpina

3.7.4.1 Teste da Convulsão Induzida por Pilocarpina

O teste de convulsão induzida por pilocarpina consiste na administração, via sistêmica, de altas doses do agonista muscarínico pilocarpina em roedores (TURSKI *et al.*, 1983; CAVALHEIRO, 1995). Para este teste foram utilizados os seguintes grupos de animais: veículo (DMSO 0,01%, v.o.) ou naringenina (10, 20, 50 mg/kg, v.o.) ou imipramina (30 mg/kg, v.o.) ou fluoxetina (15 mg/kg, v.o.) ou bupropiona (5 mg/kg, v.o.).

Após 60 minutos dos tratamentos, no primeiro dia (agudo) ou no décimo quinto (crônico) dias, foi administrado pilocarpina 400 mg/kg (P400), i.p. Logo após a administração de P400, os animais foram colocados em gaiolas individuais e observados por um período de 60 minutos. Os parâmetros analisados foram: latência da convulsão (tempo entre a administração de P400 até a primeira convulsão) e a latência de morte dos animais (tempo decorrido da administração de P400 e morte dos animais), em segundos (FIGURA 5).

Figura 5 - Esquema do Teste da Convulsão Induzida por Pilocarpina



P400= Pilocarpina 400 mg/kg.

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.7.5 Envolvimento do Adrenorreceptor α_1 na Atividade Antidepressiva e na Convulsão Induzida por Pilocarpina no Tratamento com Naringenina

Para investigar a participação do adrenorreceptor α_1 no efeito antidepressivo e na convulsão induzida por pilocarpina, os animais foram pré-tratados com prazosina (1

mg/kg,v.o.), antagonista seletivo de receptores α_1 -adrenérgicos) trinta minutos antes do tratamento com naringenina (20 mg/kg, v.o., para o efeito antidepressivo e convulsivante e 50 mg/kg, v.o, para o efeito convulsivante) ou imipramina (30 mg/Kg, v.o.). Após 60 minutos do último tratamento, os animais foram submetidos aos testes comportamentais: teste da suspensão da cauda, teste do campo aberto e teste da convulsão induzida por pilocarpina, seguindo o mesmo protocolo experimental para os grupos tratados com a naringenina ou imipramina sozinhas.

3.8 Dissecção das Áreas Cerebrais

Após o teste da convulsão induzida por pilocarpina, com o tratamento agudo ou crônico, os animais que não sobreviveram até o final do período de observação comportamental foram decapitados logo após a morte. Os animais tratados de forma aguda e crônica com DMSO 0,01% (v.o.) que não receberam pilocarpina foram sacrificados duas horas após o tratamento. O cérebro de todos os animais foram rapidamente removidos e dissecados sobre gelo (**Figura 6**). O hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal foram removidos e armazenados isoladamente à -80°C para a realização dos estudos neuroquímicos relacionados ao estresse oxidativo.

Figura 6 - Dissecção das áreas cerebrais



Fonte: Arquivos pessoais do autor.

3.9 Avaliação do Estresse Oxidativo

3.9.1 Determinação do Índice de Peroxidação Lipídica

O grau de lipoperoxidação nas áreas cerebrais (córtex pré-frontal, hipocampo e núcleos da base) 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.

Os tecidos cerebrais foram homogeneizados a 10% em tampão fosfato 50 mM (pH 7,4) gelado. Sessenta e três microlitros (63 µL) do homogenato foram adicionados em tubos de eppendorf, seguido da adição de 100 µL de ácido perclórico (35%). As amostras foram centrifugadas a 14000 rotações por minuto (rpm) por 15 minutos a 4°C. Em seguida, 150 µL do sobrenadante de cada amostra foram transferidos para outros tubos e adicionado 50 µL de ácido tiobarbitúrico 1,2%. A mistura foi levada ao banho de água por 30 minutos, a temperatura de 95°C. A solução foi então retirada e colocada para esfriar a temperatura ambiente e adicionada em placas de 96 poços para leitura em Elisa 535 nm. Os resultados foram expressos em micromol de malonildialdeído (MDA) por mg de proteína

- Curva-padrão de malonildialdeído (MDA)

A partir da solução padrão de MDA, foram preparadas as soluções a 0,627; 1,247; 2,463; 4,8; 9,16 e 16,77 µmol. O branco foi feito com água destilada. A leitura da absorbância foi feita a 535 nm para determinação da equação da curva-padrão de MDA.

3.9.2 Determinação da Concentração de Nitrito/Nitrato

Para a determinação da produção de nitrito/nitrato, primeiramente foi preparado uma curva padrão. Para isso, foram pesados 6,9 mg de NaNO₂ e dissolvidos em 10 mL de água bidestilada (estoque-10 mM) e feitas as diluições em série (10 e 20 x), ficando 1 mM, 100 µM, 10 µM, 5 µM, 2,5 µM, 1,25 µM, 0,625 µM, 0,312 µM. Foi realizada uma equação da reta para o cálculo das concentrações do teste (GREEN *et al.*, 1981). Para a determinação da concentração de nitrito de acordo com o método de Green *et al.* (1982), foram preparados homogenatos das áreas cerebrais a 10% (p/v) em tampão fosfato 50 mM (pH 7,4). Uma alíquota de 100 µL dos homogenatos foi centrifugada (11000 g, 15 min) e 50 µL do sobrenadante foi incubado com 50 µL do reagente de Griess [sulfanilamida 1 % em H₃PO₄ 1 %/N-(1-naphthyl)-ethylenediamine 0,1 % / H₃PO₄ 1 % / Água destilada (1:1:1:1)] a temperatura ambiente por 10 minutos. A absorbância foi medida em equipamento de Elisa a

540 nm. A concentração de nitrito (μM) foi determinada a partir de uma curva padrão de NaNO_2 .

3.10 Análise Estatística

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada através do software GraphPad Prism versão 5.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego, Califórnia EUA. Copyright (c) 1992- 2007 por GraphPad Software.

Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni's Multiple Comparison como teste *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 (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) caracterizam o grau de significância, assim como as letras “a” e “b”.

4 RESULTADOS

4.1. Estudos Comportamentais

4.1.1 Avaliação da Atividade Locomotora

4.1.1.1 Teste do Campo Aberto

No teste do campo aberto, a naringenina, em todas as doses utilizadas, não aumentou a atividade locomotora espontânea dos animais com tratamento agudo (**Figura 7**) [NAR-10: $95,82 \pm 4,560$ (10); NAR-20: $90,09 \pm 4,044$ (11); NAR-50: $95,00 \pm 4,079$ (9)] e crônico (**Figura 8**) [NAR-10: $78,89 \pm 3,553$ (9); NAR-20: $73,88 \pm 5,416$ (8); NAR-50: $68,67 \pm (3,454)$] quando comparado com os respectivos tratamentos com o grupo controle [Controle agudo: $76,67 \pm 7,176$ (9); Controle crônico: $72,94 \pm 3,598$ (16)], assim como os tratamentos agudo e crônico com imipramina [IMP-30 agudo: $103,6 \pm 7,068$ (6); IMP-30 crônico: $81,67 \pm 7,757$ (6)] e fluoxetina [FLU-15 agudo: $99,67 \pm 8,678$ (6); FLU-15 crônico: $80,20 \pm 6,264$]. Apenas os tratamentos agudo e crônico com a bupropiona [BUP-5 agudo: $122,8 \pm 9,724$ (6); BUP-5 crônico: $97,00 \pm 6,336$ (7)] aumentaram a atividade locomotora com relação aos tratamentos agudo e crônico do grupo controle [Controle agudo: $76,67 \pm 7,176$ (9)]. O diazepam 2mg/Kg, i.p., usado como droga padrão, reduziu a atividade locomotora [DZP2: $21,63 \pm 1,349$ (8)] em relação aos tratamentos agudo e crônico do grupo controle.

Não foi observada nenhuma alteração no número de *rearing* com os tratamentos agudo (**Figura 9**) [NAR-10: $18,83 \pm 2,372$ (7); NAR-20: $11,17 \pm 2,587$ (6); NAR-50: $10,14 \pm 1,262$ (7)] e crônico (**Figura 10**) [NAR-10: $12,10 \pm 1,206$ (12); NAR-20: $10,50 \pm 1,500$ (6); NAR-50: $12,54 \pm 1,289$ (13)] com naringenina quando comparado com os respectivos tratamentos do grupo controle [Controle agudo: $17,64 \pm 1,533$ (11); Controle crônico:], assim como os tratamentos agudos e crônicos com imipramina [IMP-30 agudo: $17,00 \pm 2,608$ (6)], fluoxetina [FLU-15 agudo: $14,00 \pm 3,011$ (6); FLU-15 crônico: $15,20 \pm 0,09695$ (6)] e bupropiona [BUP-5 agudo: $12,20 \pm 1,497$ (6); BUP-5 crônico: $20,80 \pm 2,764$ (6)].

O diazepam 2mg/Kg, i.p., usado como droga padrão, reduziu o *rearing* [$4,375 \pm 0,4605$ (8)] em relação aos tratamentos agudo e crônico do grupo controle.

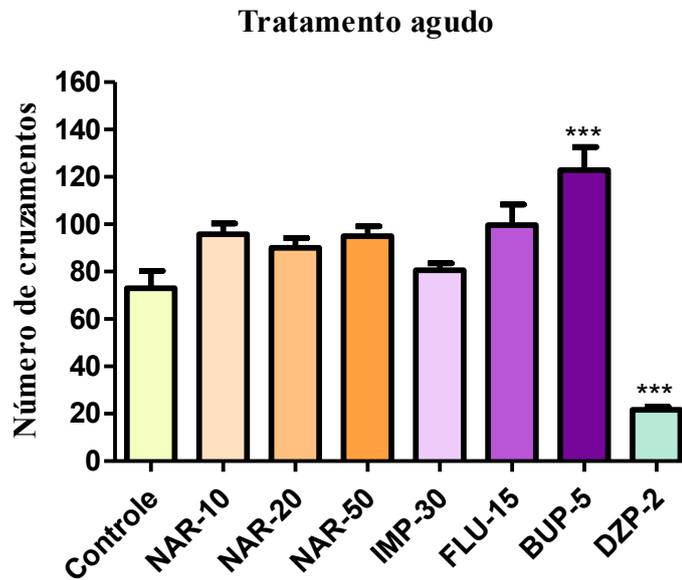
Com relação ao número de *grooming* não foi observada nenhuma alteração com os tratamentos agudo e crônico com naringenina nas doses de 10, 20 e 50 mg/kg [NAR-10 agudo: $8,833 \pm 0,6610$ (12); NAR-10 crônico: $8,111 \pm 0,6334$ (9); NAR-20 agudo: $7,400 \pm$

0,3399 (10); NAR-20 crônico: $8,667 \pm 0,8433$ (6); NAR-50 agudo: $10,64 \pm 1,038$ (11); NAR-50 crônico: $11,14 \pm 0,8442$ (14)] quando comparados com os respectivos tratamentos do grupo controle [Controle agudo: $6,857 \pm 0,2608$ (7); Controle crônico: $8,636 \pm 0,8342$ (11)] (**Figura 11 e 12**).

Os tratamentos agudo e crônico com imipramina e fluoxetina [IMP-30 agudo: $8,400 \pm 1,030$ (5); IMP-30: $11,40 \pm 2,600$ (5); FLU-15 agudo: $10,17 \pm 1,046$ (6); FLU-15 crônico: $14,00 \pm 2,160$ (5)] não mostraram alteração no número de *grooming* com relação aos respectivos tratamentos do grupo controle [Controle agudo: $6,857 \pm 0,2608$ (7); Controle crônico: $8,636 \pm 0,8342$ (11)], enquanto o tratamento agudo com bupropiona [BUP-5 agudo: $14,00 \pm 2,345$ (5)] aumentou o número de *grooming* nos animais, sem interferir neste parâmetro com tratamento crônico [BUP-5 crônico: $12,33 \pm 2,951$ (6)].

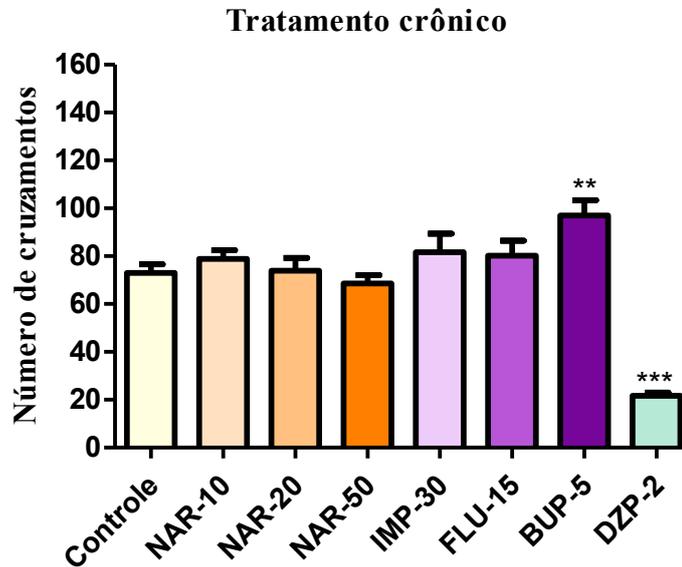
O diazepam 2mg/Kg, i.p., usado como droga padrão, reduziu o *rearing* [$4,375 \pm 0,4605$ (8)] em relação aos tratamentos agudo e crônico do grupo controle.

Figura 7 - Efeito do tratamento agudo com naringenina sobre a atividade locomotora espontânea no teste do campo aberto em camundongos.



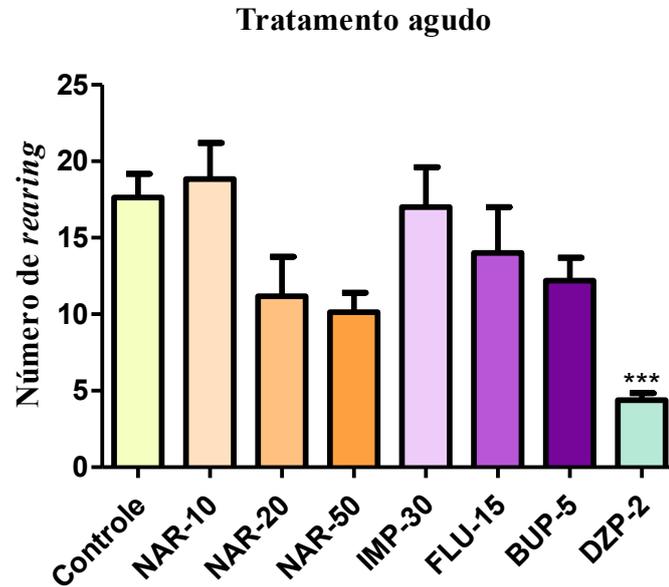
Controle (DMSO 0,01% - veículo, v.o.), naringenina (NAR, v.o.), imipramina (IMP, v.o.), fluoxetina (FLU, v.o.), bupropiona (BUP, v.o.) e diazepam (DZP, i.p.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores representam a média \pm EPM do número de cruzamentos durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Bonferroni's Multiple Comparison Test como teste *post hoc*. Valores significativos: *** $p < 0,001$ vs controle.

Figura 8 - Efeito do tratamento crônico com naringenina sobre a atividade locomotora espontânea no teste do campo aberto em camundongos.



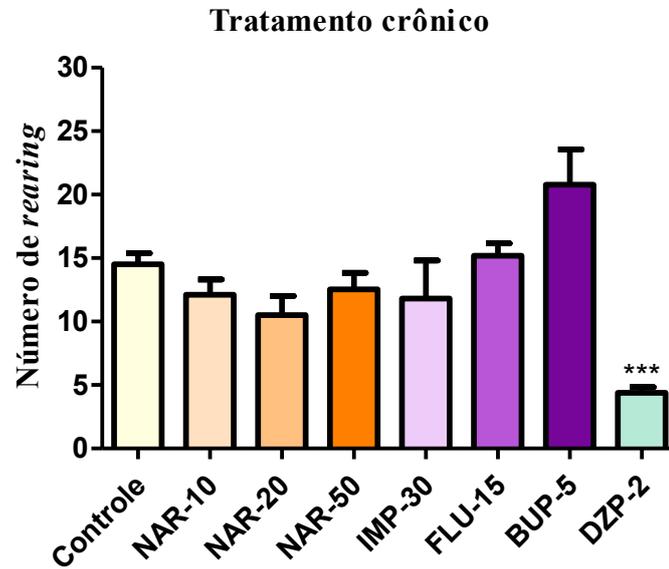
Controle (DMSO 0,01% - veículo, v.o.), naringenina (NAR, v.o.), imipramina (IMP, v.o.) fluoxetina (FLU, v.o.), bupropiona (BUP, v.o.) e diazepam (DZP, i.p.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores representam a média \pm EPM do número de cruzamentos durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Bonferroni's Multiple Comparison Test como teste *post hoc*. Valores significativos: ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ vs controle.

Figura 9 - Efeito do tratamento agudo com naringenina sobre número o de *rearing* no teste do campo aberto em camundongos.



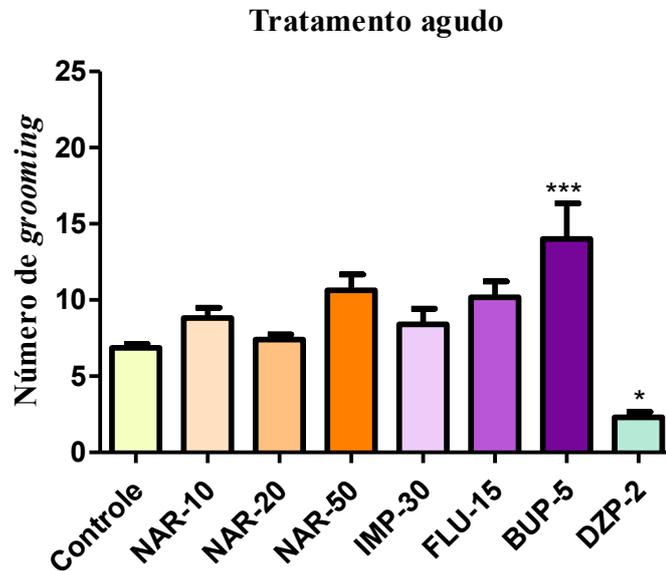
Controle (DMSO 0,01% - veículo, v.o.), naringenina (NAR, v.o.), imipramina (IMP, v.o.), fluoxetina (FLU, v.o.), bupropiona (BUP, v.o.) e diazepam (DZP, i.p.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores representam a média \pm EPM do número de *rearing* durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Bonferroni's Multiple Comparison Test como teste *post hoc*. Valores significativos: *** $p < 0,001$ vs controle.

Figura 10 - Efeito do tratamento crônico com naringenina sobre número de *rearing* no teste do campo aberto em camundongos.



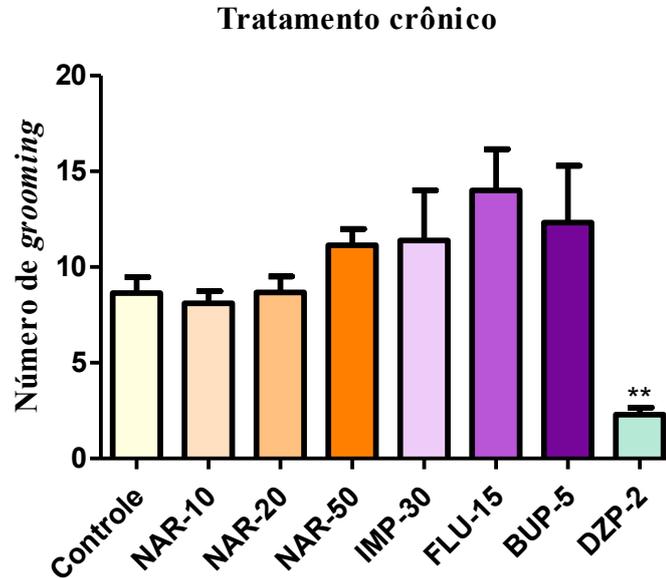
Controle (DMSO 0,01% - veículo, v.o.), naringenina (NAR, v.o.), imipramina (IMP, v.o.), fluoxetina (FLU, v.o.), bupropiona (BUP, v.o.) e diazepam (DZP, i.p.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores representam a média \pm EPM do número de *rearing* durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Bonferroni's Multiple Comparison Test como teste *post hoc*. Valores significativos: *** $p < 0,001$ vs controle.

Figura 11 - Efeito do tratamento agudo com naringenina sobre o número de *grooming* no teste do campo aberto em camundongos.



Controle (DMSO 0,01% - veículo, v.o.), naringenina (NAR, v.o.), imipramina (IMP, v.o.), fluoxetina (FLU, v.o.), bupropiona (BUP, v.o.) e diazepam (DZP, i.p.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores representam a média \pm EPM do número de *grooming* durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Bonferroni's Multiple Comparison Test como teste *post hoc*. Valores significativos: * $p < 0,05$ *** $p < 0,001$ vs controle.

Figura 12 - Efeito do tratamento agudo com naringenina sobre o número de *grooming* no teste do campo aberto em camundongos.



Controle (DMSO 0,01% - veículo, v.o.), naringenina (NAR, v.o.), fluoxetina (FLU, v.o.), bupropiona (BUP, v.o.) e diazepam (DZP, i.p.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores representam a média \pm EPM do número de *grooming* durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Bonferroni's Multiple Comparison Test como teste *post hoc*. Valores significativos: ** $p < 0,001$ vs controle.

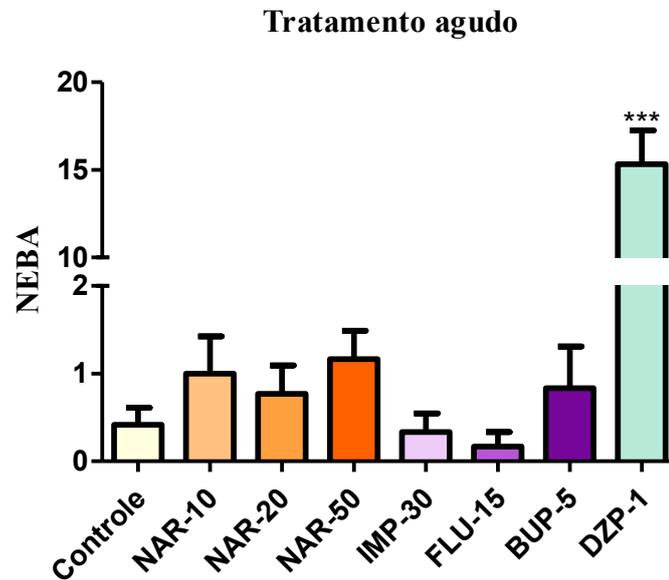
4.1.2 Avaliação da Atividade Ansiolítica

4.1.2.1 Teste do Labirinto em Cruz Elevado

O número de entrada nos braços abertos (NEBA), a percentagem de entrada nos braços abertos (PEBA), o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) e a percentagem do tempo de permanência nos braços abertos (PTBA) foram os parâmetros avaliados nos animais jovens e adultos.

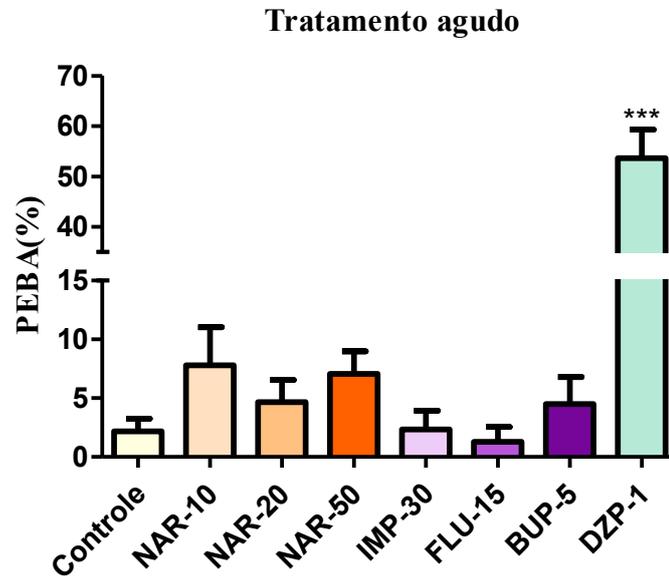
Os tratamentos agudo e crônico com a naringenina nas doses de 10, 20 e 50 mg/kg, bem como os tratamentos agudo e crônico com os controles antidepressivos imipramina (30 mg/kg), fluoxetina (15 mg/kg) e bupropiona (5 mg/kg) não interferiram nos parâmetros avaliados quando comparados com os respectivos tratamentos do grupo controle (**Figuras 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20**). O tratamento com diazepam 1 mg/kg aumentou todos os parâmetros analisados [NEBA: $15,33 \pm 1,93$ (6); PEBA: $53,65 \pm 5,64$ (7); TPBA: $168,4 \pm 14,87$ (7); PTBA: $61,41 \pm 5,98$ (7)] em relação aos tratamentos agudo [NEBA: $0,4167 \pm 0,1930$ (12); PEBA: $2,180 \pm 1,078$ (12); TPBA: $4,917 \pm 2,732$ (12); PTBA: $1,821 \pm 1,010$ (12)] e crônico do grupo controle [NEBA: $0,1667 \pm 0,1667$ (12); PEBA: $1,667 \pm 1,667$ (12); TPBA: $2,333 \pm 2,333$ (12); PTBA: $0,9042 \pm 0,9042$ (12)].

Figura 13 - Efeito do tratamento agudo com naringenina sobre o número de entrada nos braços abertos (NEBA) no teste Labirinto em Cruz Elevado.



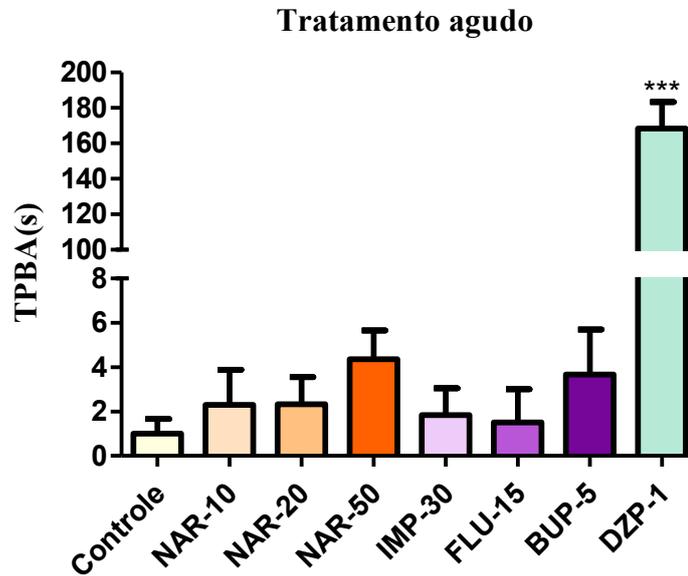
Controle (DMSO 0,01% - veículo, v.o.), naringenina (NAR, v.o.), imipramina (IMP, v.o.) fluoxetina (FLU, v.o.), bupropiona (BUP, v.o.) e diazepam (DZP, i.p.) foram administrados 60 min antes do experimento. Os valores representam a média \pm EPM do número de entrada nos braços abertos durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Bonferroni's Multiple Comparison Test como teste *post hoc*. Valores significativos: *** $p < 0,001$ vs controle.

Figura 14 - Efeito do tratamento agudo com naringenina sobre o percentual de entrada nos braços abertos (PEBA) no teste Labirinto em Cruz Elevado.



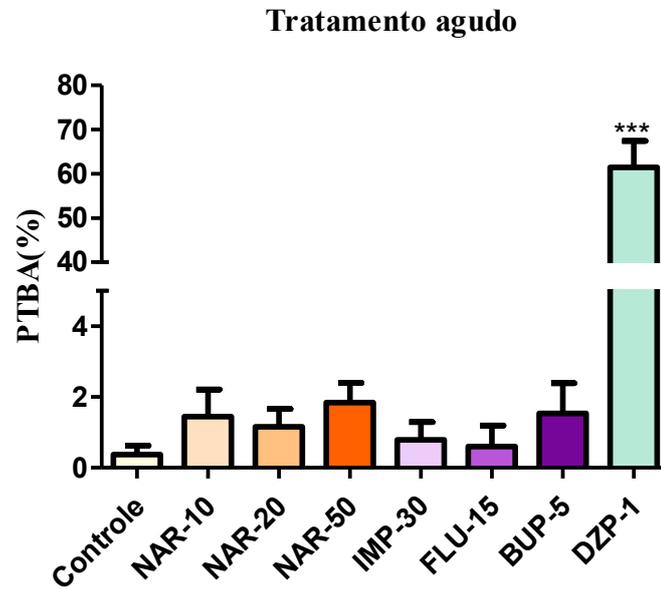
Controle (DMSO 0,01% - veículo, v.o.), naringenina (NAR, v.o.), imipramina (IMP, v.o.) fluoxetina (FLU, v.o.), bupropiona (BUP, v.o.) e diazepam (DZP, i.p.) foram administrados 60 min antes do experimento. Os valores representam a média \pm EPM do percentual de entrada nos braços abertos durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Bonferroni's Multiple Comparison Test como teste *post hoc*. Valores significativos: *** $p < 0,001$ vs controle.

Figura 15 - Efeito do tratamento agudo com naringenina sobre o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) no teste Labirinto em Cruz Elevado.



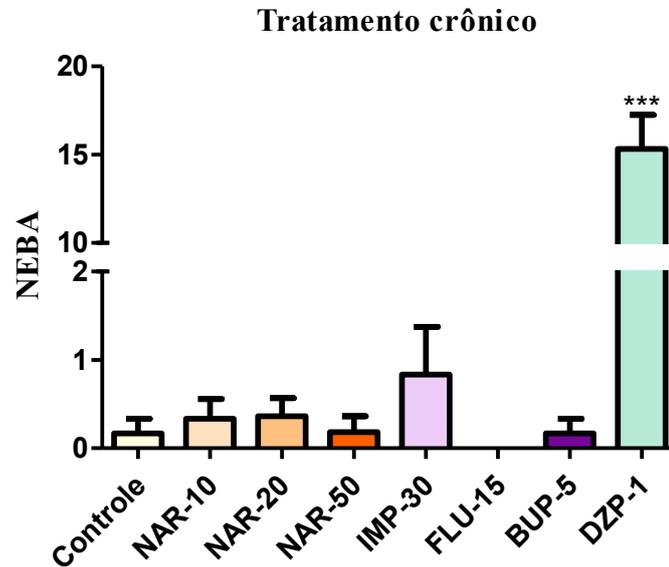
Controle (DMSO 0,01% - veículo, v.o.), naringenina (NAR, v.o.), imipramina (IMP, v.o.) fluoxetina (FLU, v.o.), bupropiona (BUP, v.o.) e diazepam (DZP, i.p.) foram administrados 60 min antes do experimento. Os valores representam a média \pm EPM do tempo de permanência nos braços abertos durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Bonferroni's Multiple Comparison Test como teste *post hoc*. Valores significativos: *** $p < 0,001$ vs controle.

Figura 16 - Efeito do tratamento agudo com naringenina sobre do percentual do tempo de permanência nos braços abertos (PTBA) no teste Labirinto em Cruz Elevado.



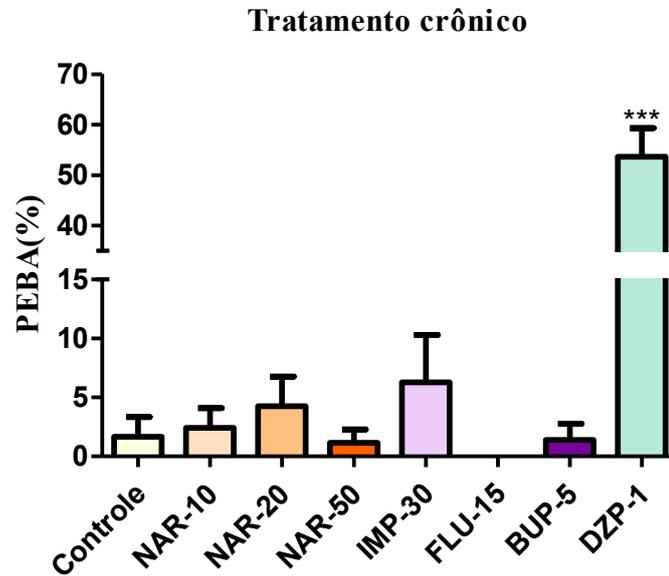
Controle (DMSO 0,01% - veículo, v.o.), naringenina (NAR, v.o.), imipramina (IMP, v.o.) fluoxetina (FLU, v.o.), bupropiona (BUP, v.o.) e diazepam (DZP, i.p.) foram administrados 60 min antes do experimento. Os valores representam a média \pm EPM do percentual de permanência nos braços abertos durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Bonferroni's Multiple Comparison Test como teste *post hoc*. Valores significativos: *** $p < 0,001$ vs controle.

Figura 17 - Efeito do tratamento crônico com naringenina sobre o número de entrada nos braços abertos (NEBA) no teste Labirinto em Cruz Elevado.



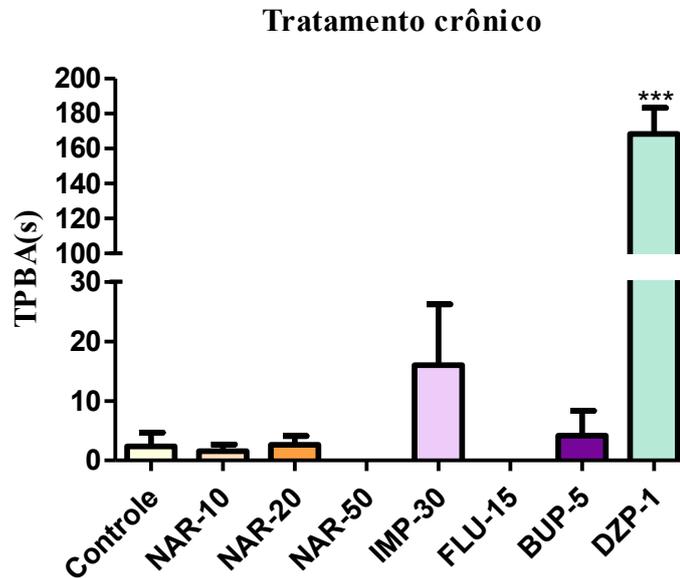
Controle (DMSO 0,01% - veículo, v.o.), naringenina (NAR, v.o.), imipramina (IMP, v.o.) fluoxetina (FLU, v.o.), bupropiona (BUP, v.o.) e diazepam (DZP, i.p.) foram administrados 60 min antes do experimento. Os valores representam a média \pm EPM do número de entrada nos braços abertos durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Bonferroni's Multiple Comparison Test como teste *post hoc*. Valores significativos: *** $p < 0,001$ vs controle.

Figura 18 - Efeito do tratamento crônico com naringenina sobre o percentual de entrada nos braços abertos (PEBA) no teste Labirinto em Cruz Elevado.



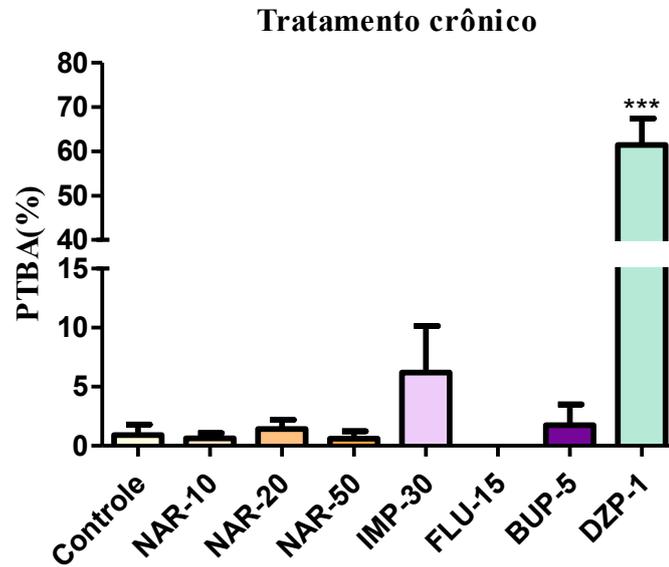
Controle (DMSO 0,01% - veículo, v.o.), naringenina (NAR, v.o.), imipramina (IMP, v.o.) fluoxetina (FLU, v.o.), bupropiona (BUP, v.o.) e diazepam (DZP, i.p.) foram administrados 60 min antes do experimento. Os valores representam a média \pm EPM do percentual de entrada nos braços abertos durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Bonferroni's Multiple Comparison Test como teste *post hoc*. Valores significativos: *** $p < 0,001$ vs controle.

Figura 19 - Efeito do tratamento crônico com naringenina sobre o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) no teste Labirinto em Cruz Elevado.



Controle (DMSO 0,01% - veículo, v.o.), naringenina (NAR, v.o.), imipramina (IMP, v.o.) fluoxetina (FLU, v.o.), bupropiona (BUP, v.o.) e diazepam (DZP, i.p.) foram administrados 60 min antes do experimento. Os valores representam a média \pm EPM do tempo de permanência nos braços abertos durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Bonferroni's Multiple Comparison Test como teste *post hoc*. Valores significativos: *** $p < 0,001$ vs controle.

Figura 20 - Efeito do tratamento crônico com naringenina sobre o percentual de tempo de permanência nos braços abertos (PTBA) no teste Labirinto em Cruz Elevado.



Controle (DMSO 0,01% - veículo, v.o.), naringenina (NAR, v.o.), imipramina (IMP, v.o.) fluoxetina (FLU, v.o.), bupropiona (BUP, v.o.) e diazepam (DZP, i.p.) foram administrados 60 min antes do experimento. Os valores representam a média \pm EPM do percentual tempo de permanência nos braços abertos durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Bonferroni's Multiple Comparison Test como teste *post hoc*. Valores significativos: *** $p < 0,001$ vs controle.

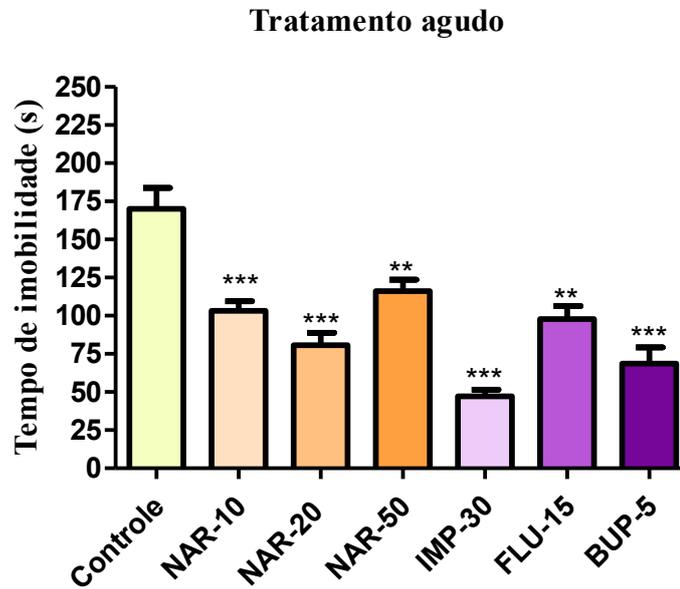
4.1.3 Avaliação da Atividade Antidepressiva

4.1.3.1 Teste da Suspensão da Cauda

O tratamento agudo (**Figura 21**) com naringenina nas doses de 10, 20 e 50 mg/kg [NAR-10 agudo: $103,2 \pm 6,409$ (13); NAR-20 agudo: $80,67 \pm 8,269$ (6); NAR-50 agudo: $116,2 \pm 7,545$ (10)] reduziu o tempo de imobilidade dos animais em relação ao grupo controle [Controle agudo: $170,1 \pm 13,75$ (14)], enquanto no tratamento crônico (**Figura 22**), apenas as doses de 10 e 20 mg/kg [NAR-10 crônico: $91,00 \pm 8,803$ (9); NAR-20 crônico: $59,56 \pm 4,805$ (9)] mostrou efeito anti-imobilidade quando comparadas com o grupo controle [Controle crônico: $183,3 \pm 15,78$ (9)].

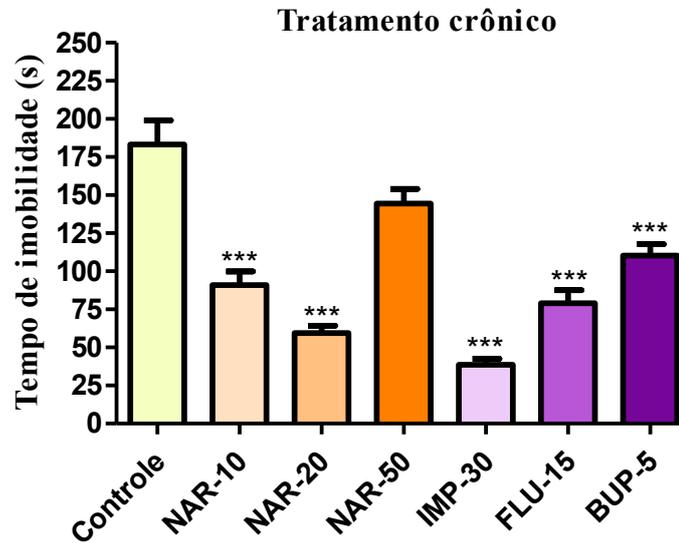
Os antidepressivos imipramina (30 mg/kg), fluoxetina (15 mg/kg) e bupropiona (5 mg/kg), utilizados como padrões positivos, reduziram o tempo de imobilidade dos animais tanto no tratamento agudo como no crônico [IMP-30 agudo: $47,17 \pm 4,453$ (6); IPM-30 crônico: $38,60 \pm 3,957$ (5); FLU-15 agudo: $97,80 \pm 8,599$ (5); FLU crônico: $79,00 \pm 8,562$ (5); BUP-5 agudo: $68,60 \pm 10,73$ (5); BUP crônico: $110,4 \pm 7,427$ (5)], quando comparados com o grupo controle de ambos os tratamentos [Controle agudo: $170,1 \pm 13,75$ (14); Controle crônico: $183,3 \pm 15,78$ (9)].

Figura 21 - Efeito do tratamento agudo com naringenina sobre o tempo de imobilidade no teste de suspensão da cauda.



Controle (DMSO 0,01% - veículo, v.o.), naringenina (NAR, v.o.), imipramina (IMP, v.o.), fluoxetina (FLU, v.o.), bupropiona (BUP, v.o.) foram administrados 60 min antes do experimento. Os valores representam a média \pm EPM do tempo de imobilidade durante 6 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Bonferroni's Multiple Comparison Test como teste *post hoc*. Valores significativos: ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ vs controle.

Figura 22 - Efeito do tratamento crônico com naringenina sobre o tempo de imobilidade no teste de suspensão da cauda.



Controle (DMSO 0,01% - veículo, v.o.), naringenina (NAR, v.o.), imipramina (IMP, v.o.), fluoxetina (FLU, v.o.), bupropiona (BUP, v.o.) foram administrados 60 min antes do experimento. Os valores representam a média \pm EPM do tempo de imobilidade durante 6 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Bonferroni's Multiple Comparison Test como teste *post hoc*. Valores significativos: *** $p < 0,001$ vs controle.

4.1.4 Avaliação da Convulsão Induzida por Pilocarpina

4.1.4.1 Teste da Convulsão Induzida por Pilocarpina

Após alguns minutos da administração da pilocarpina, 400 mg/Kg, i.p. (P400), os animais apresentaram sinais colinérgicos periféricos (miose, piloereção salivação, diarreia, diurese e tremores) movimentos estereotipados (aumento da atividade de roer, coçar, mastigar e *wet-dog shakes* – ato de sacudir semelhante a um cachorro molhado), seguidos por convulsões motoras límbicas. Esses sinais foram mais pronunciados nos grupos que receberam tratamento crônico com naringenina nas doses de 20 e 50 mg/kg.

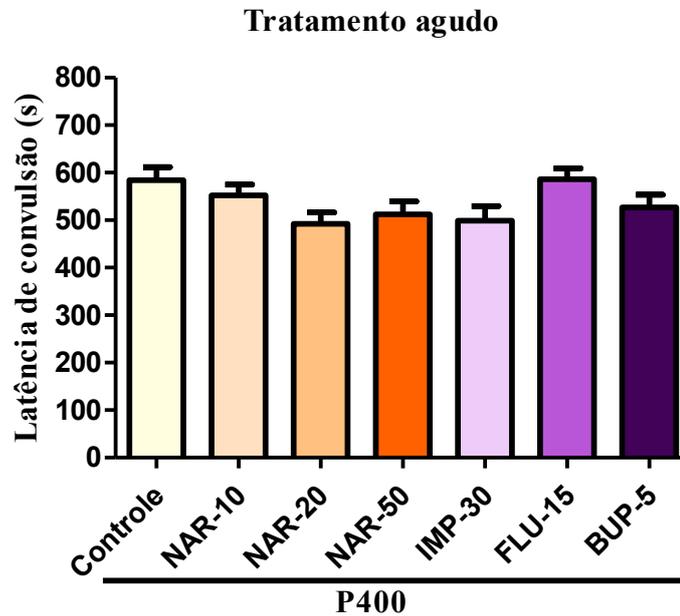
O tratamento agudo com naringenina nas doses de 10, 20 e 50 mg/kg [NAR-10 convulsão: $552,4 \pm 22,71$ (7); morte: $846,0 \pm 39,90$ (7). NAR-20 convulsão: $492,5 \pm 23,82$ (13); morte: $777,1 \pm 24,58$ (12). NAR-50 convulsão: $512,0 \pm 27,83$ (10); morte: $709,1 \pm 45,35$ (10)], bem como com as drogas antidepressivas imipramina (30 mg/kg), fluoxetina (15 mg/kg) e bupropiona (5 mg/kg) [IMP-30 convulsão: $498,7 \pm 31,02$ (7); morte: $622,4 \pm 42,93$ (7). FLU-15 convulsão: $586,3 \pm 22,93$ (6); morte: $686,5 \pm 22,79$ (6). BUP-5 convulsão: $527,0 \pm 26,39$ (6); morte: $622,0 \pm 19,98$ (6)] não interferiram na latência de convulsão e morte quando comparados com o grupo controle [Convulsão: $584,6 \pm 26,73$ (10); morte: $735,2 \pm 39,99$ (10)] (**Figuras 23 e 24**).

Os animais que receberam tratamento crônico com naringenina na dose de 10 mg/kg não tiveram alteração quanto a latência para o primeiro episódio de convulsão [Convulsão: $573,8 \pm 25,40$ (12), bem como para a morte [Morte: $735,5 \pm 18,66$] quando comparados com o grupo controle pilocarpina [Convulsão: $634,6 \pm 30,01$ (17); Morte: $777,7 \pm 43,77$ (14)]. No entanto, aqueles tratados com a dose de 20 mg/Kg tiveram uma redução apenas na latência para o primeiro episódio de convulsão [Convulsão: $503,0 \pm 15,98$ (10); Morte: $709,3 \pm 20,92$ (11)] quando comparado com o grupo controle pilocarpina [Convulsão: $634,6 \pm 30,01$ (17); Morte: $777,7 \pm 43,77$ (14)], enquanto aqueles tratados com a dose de 50 mg/kg reduziram a latência de convulsão e morte [Convulsão: $529,9 \pm 16,13$ (17); Morte: $609,9 \pm 23,839$ (20)] (**Figuras 25 e 26**).

O tratamento crônico com os controles das drogas antidepressivas: imipramina [Convulsão: $609,7 \pm 27,43$ (6); Morte: $723,3 \pm 31,41$], fluoxetina [Convulsão: $516,7 \pm 23,56$ (6); Morte: $639,2 \pm 66,09$ (6)] e bupropiona [Convulsão: $536,3 \pm 30,38$ (6); Morte: $667,7 \pm 40,92$ (6)] não interferiram na latência para o primeiro episódio de convulsão e na latência de morte

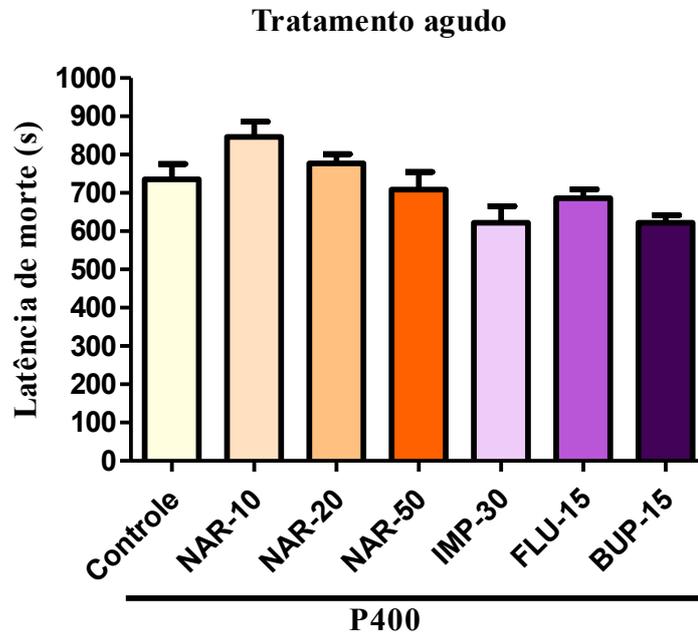
quando comparados com o grupo controle pilocarpina [Convulsão: $634,6 \pm 30,01$ (17); Morte: $777,7 \pm 43,77$ (14)].

Figura 23 - Efeito do tratamento agudo com naringenina sobre a latência de convulsão no teste de convulsão induzida por pilocarpina.



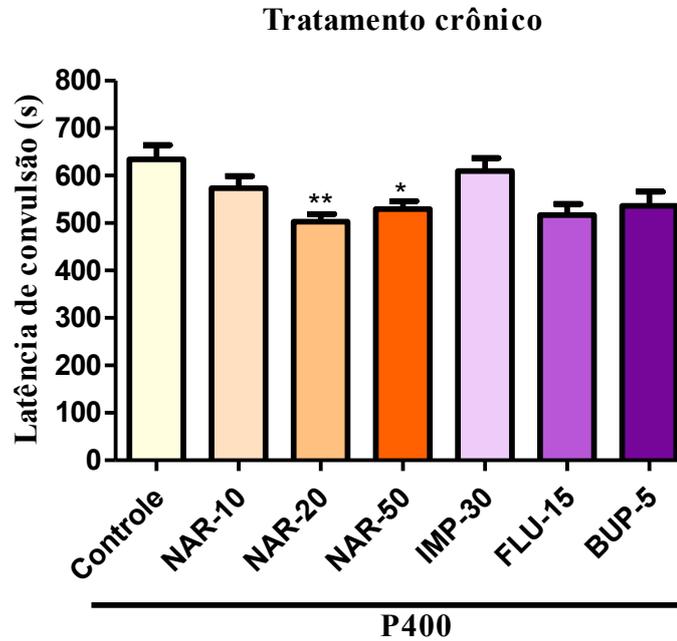
Controle (DMSO 0,01% - veículo, v.o.), naringenina (NAR 10, 20 e 50 mg/kg v.o.), imipramina (IMP 30 mg/kg, v.o.), fluoxetina (FLU 15mg/kg, v.o.) e bupropiona (BUP 5 mg/kg, v.o.) administrados 60 min (v.o.) antes da administração de pilocarpina (400 mg/kg, i.p.). Os valores representam a média \pm EPM da latência para o primeiro episódio de convulsão durante uma hora. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Bonferroni's Multiple Comparison Test como teste *post hoc*.

Figura 24 - Efeito do tratamento agudo com naringenina sobre a latência de morte no teste de convulsão induzida por pilocarpina.



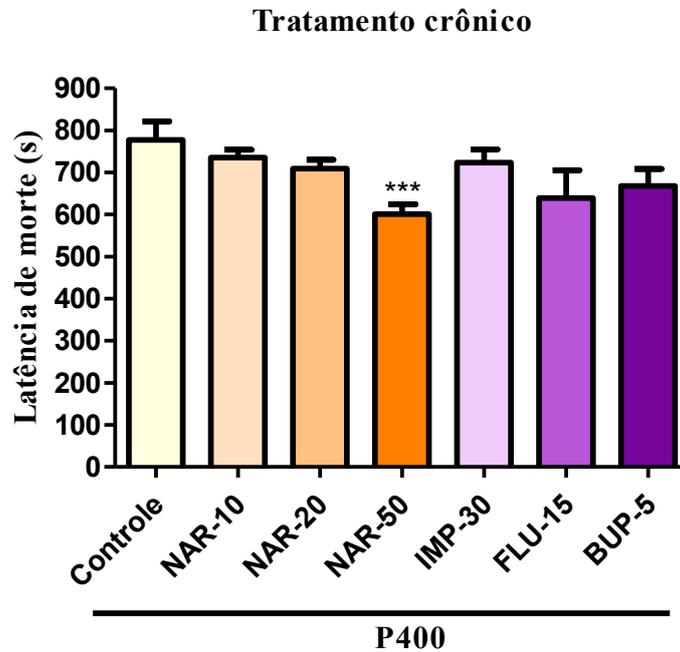
Controle (DMSO 0,01% - veículo, v.o.), naringenina (NAR 10, 20 e 50 mg/kg v.o.), imipramina (IMP 30 mg/kg, v.o.), fluoxetina (FLU 15mg/kg, v.o.) e bupropiona (BUP 5 mg/kg, v.o.) administrados 60 min (v.o.) antes da administração de pilocarpina (400 mg/kg, i.p.). Os valores representam a média \pm EPM da latência de morte. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Bonferroni's Multiple Comparison Test como teste *post hoc*.

Figura 25 - Efeito do tratamento crônico com naringenina sobre a latência de convulsão no teste de convulsão induzida por pilocarpina.



Controle (DMSO 0,01% - veículo, v.o.), naringenina (NAR 10, 20 e 50 mg/kg v.o.), imipramina (IMP 30 mg/kg, v.o.), fluoxetina (FLU 15mg/kg, v.o.) e bupropiona (BUP 5 mg/kg, v.o.) administrados 60 min (v.o.) antes da administração de pilocarpina (400 mg/kg, i.p.). Os valores representam a média \pm EPM da latência para o primeiro episódio de convulsão durante uma hora. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Bonferroni's Multiple Comparison Test como teste *post hoc*. Valores significativos: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs controle.

Figura 26 - Efeito do tratamento crônico com naringenina sobre a latência de morte no teste de convulsão induzida por pilocarpina.



Controle (DMSO 0,01% - veículo, v.o.), naringenina (NAR 10, 20 e 50 mg/kg v.o.), imipramina (IMP 30 mg/kg, v.o.), fluoxetina (FLU 15mg/kg, v.o.) e bupropiona (BUP 5 mg/kg, v.o.) administrados 60 min (v.o.) antes da administração de pilocarpina (400 mg/kg, i.p.). Os valores representam a média \pm EPM da latência de morte. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Bonferroni's Multiple Comparison Test como teste *post hoc*. Valores significativos: *** $p < 0,001$ vs controle.

4.1.5 Envolvimento do Adrenorreceptor α_1

4.1.5.1 Atividade Antidepressiva

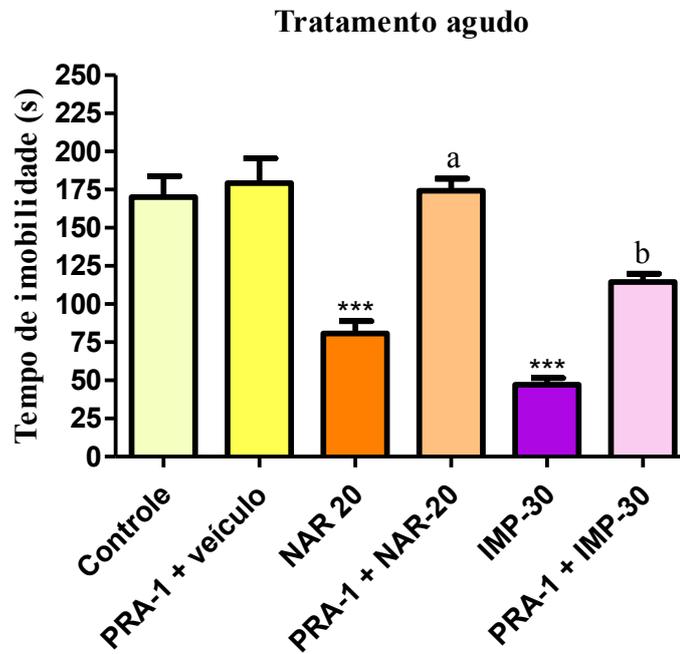
4.1.5.1.1 Teste de Suspensão da Cauda

Os grupos pré-tratados com prazosina e tratados com veículo, tanto no tratamento agudo como no crônico [PRA-1 + veículo agudo: $179,2 \pm 16,34$ (5); PRA-1 + veículo crônico: $165,3 \pm 9,117$ (10)], não reduziram o tempo de imobilidade em relação ao grupo controle de ambos os tratamentos [Controle agudo: $170,1 \pm 13,75$ (14); Controle crônico: $183,3 \pm 15,85$ (9)] (**Figuras 27 e 28**).

O pré-tratamento com prazosina associado ao tratamento com NAR-20 reverteu o efeito anti-imobilidade da naringenina tanto no tratamento agudo como no crônico [PRA-1 + NAR 20 agudo: $174,3 \pm 7,864$ (6); PRA-1 + NAR 20 crônico: $205,0 \pm 14,44$ (7)], apresentando diferença significativa em relação ao grupo NAR-20 de ambos os tratamentos [NAR 20 agudo: $80,67 \pm 8,269$ (6); NAR-20 crônico: $59,56 \pm 4,805$ (9)].

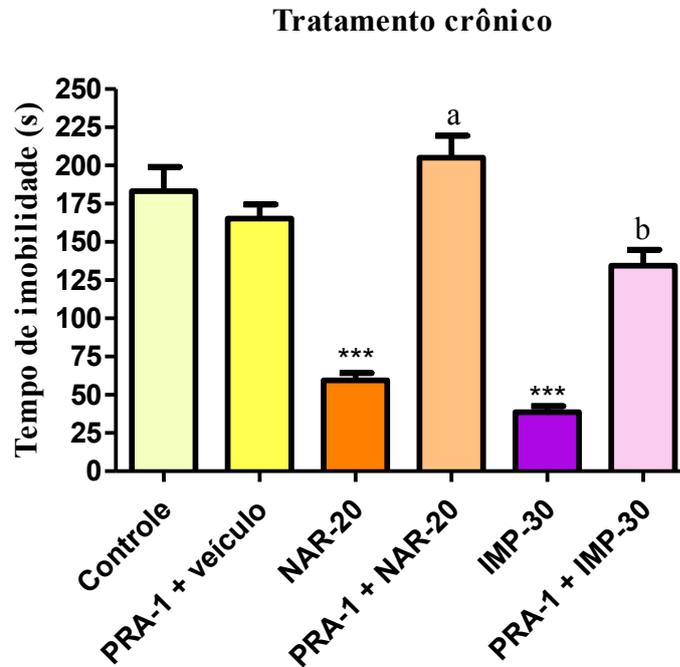
A prazosina também reverteu o efeito antidepressivo quando foi administrada antes dos tratamentos agudo e crônico com imipramina [PRA-1 + IMP-30 agudo: $114,4 \pm 5,573$ (5); PRA-1 + IMP-30 crônico: $134,4 \pm 10,50$ (5)] quando comparado com o grupo IMP-30 [IMP-30 agudo: $47,17 \pm 4,453$ (6); IMP-30 crônico: $38,60 \pm 3,957$ (5)].

Figura 27 - Efeito do tratamento agudo com naringenina (20 mg/kg) sozinho ou em associação com prazosina, antagonista dos adrenorreceptores α_1 , sobre o tempo de imobilidade no teste de suspensão da cauda.



Controle (DMSO 0,01% - veículo, v.o.), naringenina (NAR 20 mg/kg, v.o.) ou imipramina (IMP 30 mg/kg, v.o.), quando sozinhos foi administrada 60 min (v.o.) antes do experimento; quando associados foram administrados 30 min após a administração da prazosina (1 mg/kg, v.o). Os valores representam a média \pm EPM do tempo de imobilidade durante 6 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Bonferroni's Multiple Comparison Test como teste *post hoc*. Valores significativos: *** $p < 0,001$ vs controle; ^a $p < 0,001$ vs NAR-20; ^b $p < 0,05$ vs IMP-30.

Figura 28 - Efeito do tratamento crônico com naringenina (20 mg/kg) sozinho ou em associação com prazosina, antagonista dos adrenoceptores α_1 , sobre o tempo de imobilidade no teste de suspensão da cauda.



Controle (DMSO 0,01% - veículo, v.o.), naringenina (NAR 20 mg/kg, v.o.) ou imipramina (IMP 30 mg/kg, v.o.) quando sozinhos foram administrados 60 min (v.o.) antes do experimento; quando associados foram administrados 30 min após a administração da prazosina (1 mg/kg, v.o.). Os valores representam a média \pm EPM do tempo de imobilidade durante 6 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Bonferroni's Multiple Comparison Test como teste *post hoc*. Valores significativos: *** $p < 0,001$ vs controle; ^a $p < 0,001$ vs NAR-20; ^b $p < 0,05$ vs IMP-30.

4.1.5.2 Atividade na Convulsão Induzida por Pilocarpina

4.1.5.2.1 Teste da Convulsão Induzida por Pilocarpina

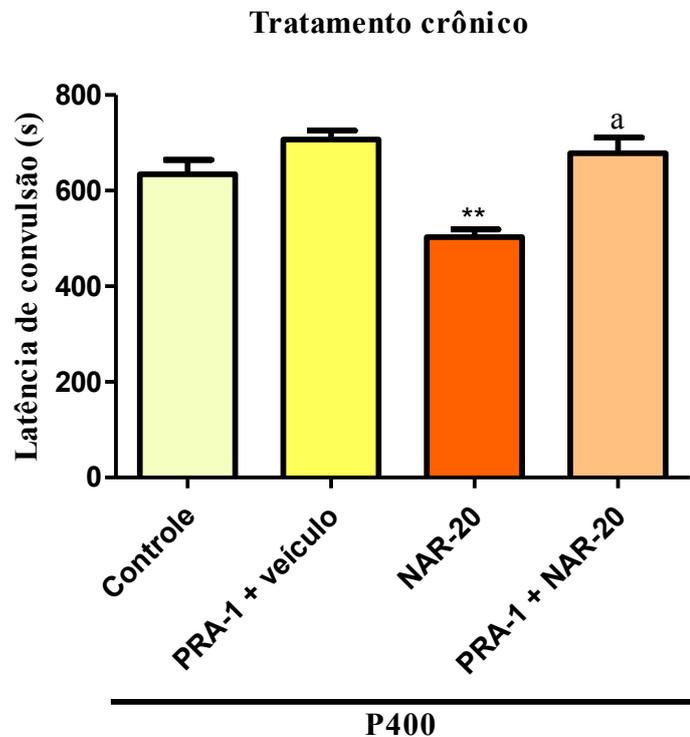
O grupo pré-tratado com prazosina e tratado com veículo [PRA-1 + veículo: $706,9 \pm 18,80$ (9)], no tratamento crônico, não reduziu a latência para o primeiro episódio de convulsão quando comparado com o grupo controle [Controle: $634,6 \pm 30,01$ (17)].

O pré-tratamento com prazosina associado ao tratamento com NAR-20 ou NAR-50 no tratamento crônico [PRA-1 + NAR-20: $678,5 \pm 32,27$ (6); PRA-1 + NAR-50: $738,5 \pm 23,48$ (8)] impediu a redução na latência para a primeira convulsão, apresentando diferença significativa em relação ao grupo NAR-20 ou NAR-50 [NAR-20: $503,0 \pm 15,98$ (10); NAR-50: $529,9 \pm 16,13$ (17)] (**Figuras 29 e 30**).

O grupo pré-tratado com prazosina e tratado com veículo [PRA-1 + veículo: $874,2 \pm 30,22$ (10)], no tratamento crônico, não reduziu a latência de morte quando comparado com o grupo controle [Controle: $777,7 \pm 43,77$ (14)].

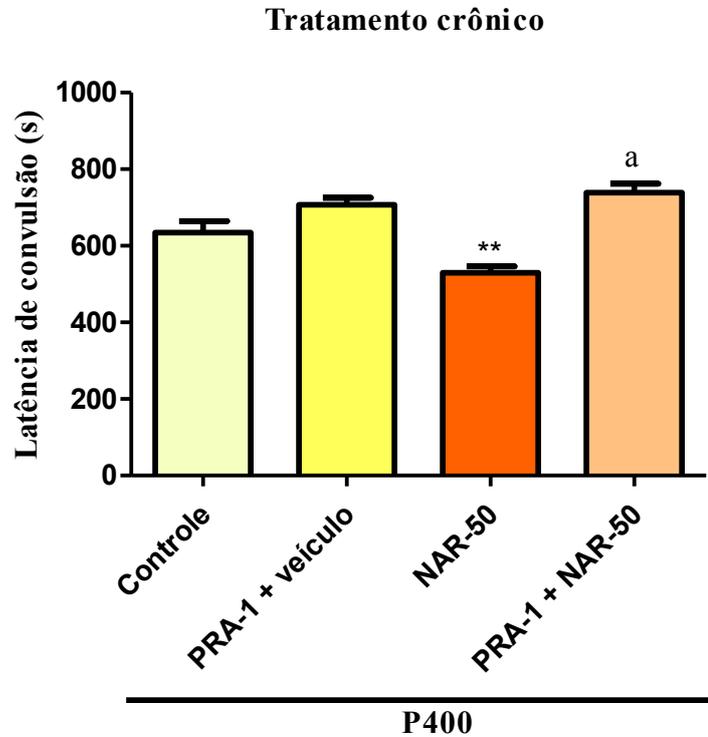
O pré-tratamento com prazosina associado ao tratamento com NAR-50, no tratamento crônico, impediu a redução na latência para a primeira convulsão [PRA-1 + NAR-50: $847,3 \pm 51,47$ (6)], apresentando diferença significativa em relação ao grupo NAR-50 [NAR 50: $600,9 \pm 23,83$] (**Figura 31**).

Figura 29 - Efeito do tratamento crônico com naringenina (20 mg) sozinho ou em associação com prazosina, antagonista dos adrenoceptores α_1 , sobre a latência de convulsão.



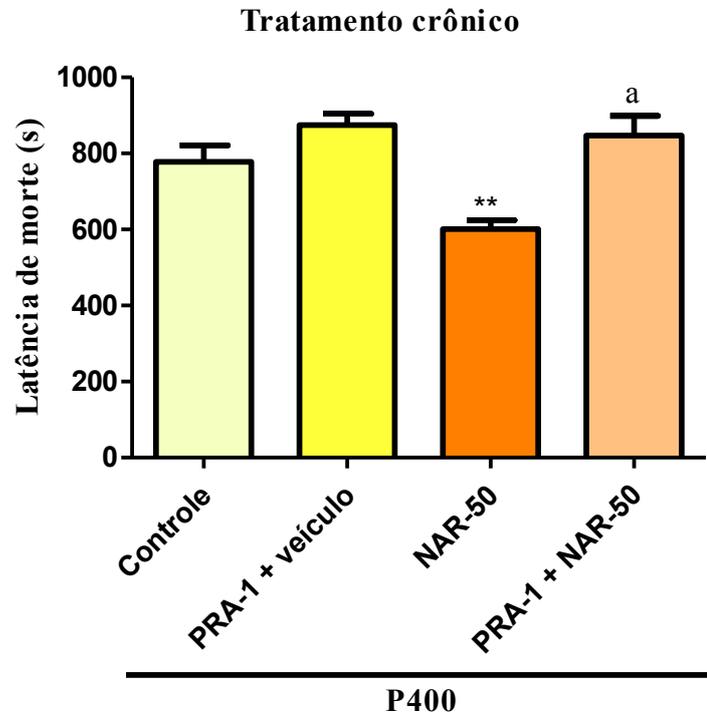
Controle (DMSO 0,01% - veículo, v.o.) ou naringenina (NAR 20 mg/kg, v.o.) quando sozinhos foram administrados 60 min (v.o.) antes do experimento; quando associados foram administrados 30 min após a administração da prazosina (1 mg/kg, v.o.). Os valores representam a média \pm EPM da latência para o primeiro episódio de convulsão durante uma hora. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Bonferroni's Multiple Comparison Test como teste *post hoc*. Valores significativos: ** $p < 0,01$ vs controle; ^a $p < 0,001$ vs NAR-20.

Figura 30 - Efeito do tratamento crônico com naringenina (50 mg) sozinho ou em associação com prazosina, antagonista dos adrenorreceptores α_1 , sobre latência de convulsão.



Controle (DMSO 0,01% - veículo, v.o.) ou naringenina (NAR 50 mg/kg, v.o.) quando sozinhos foram administrados 60 min (v.o.) antes do experimento; quando associados foram administrados 30 min após a administração da prazosina (1 mg/kg, v.o.). Os valores representam a média \pm EPM da latência para o primeiro episódio de convulsão durante uma hora. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Bonferroni's Multiple Comparison Test como teste *post hoc*. Valores significativos: ** $p < 0,01$ vs controle; ^a $p < 0,001$ vs NAR-20.

Figura 31 - Efeito do tratamento crônico com naringenina (50 mg) sozinho ou em associação com prazosina, antagonista dos adrenorreceptores α_1 , sobre latência de morte.



Controle (DMSO 0,01% - veículo, v.o.) ou naringenina (NAR 50 mg/kg, v.o.) quando sozinhos foram administrados 60 min (v.o.) antes do experimento; quando associados foram administrados 30 min após a administração da prazosina (1 mg/kg, v.o.). Os valores representam a média \pm EPM da latência para de morte. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Bonferroni's Multiple Comparison Test como teste *post hoc*. Valores significativos: ** $p < 0,01$ vs controle; ^a $p < 0,001$ vs NAR-50.

4.1.6 Avaliação do Estresse Oxidativo

4.1.6.1 Efeitos do tratamento com naringenina sobre a produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nas áreas cerebrais de animais submetidos ao modelo de convulsão induzida por pilocarpina

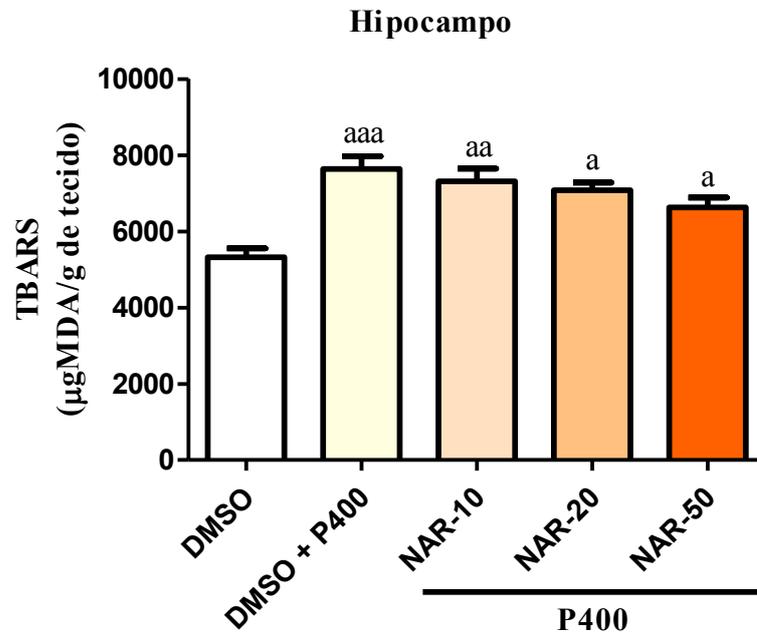
Os resultados da análise da produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no hipocampo (HC), corpo estriado (CE) e córtex pré-frontal (CPF) foram expressas em μg de (malonildialdeído)/ mg de tecido.

Foi observado um aumento significativo na concentração de MDA no HC, CE e CPF dos animais do grupo controle submetidos aos tratamentos agudo e crônico com o veículo, e que receberam pilocarpina (pilo) [Tratamento agudo - Controle pilo HC: $7635 \pm 337,1$ (7); Controle pilo CE: $6852 \pm 181,9$ (6); Controle pilo CPF: $7066 \pm 182,4$ (7). Tratamento crônico - Controle pilo HC: $6186 \pm 318,0$ (8); Controle pilo CE: $5511 \pm 341,1$ (9); Controle pilo CPF: $6942 \pm 228,6$ (9)] em relação aos grupos controles que receberam apenas o veículo [Tratamento agudo - Controle HC: $5318 \pm 234,9$ (10); Controle CE: $4243 \pm 274,4$ (13); Controle CPF: $5247 \pm 264,0$ (12). Tratamento crônico - Controle HC: $4284 \pm 313,2$ (5); Controle CE: $3825 \pm 208,2$ (5); Controle CPF: $4850 \pm 393,5$ (5)].

O tratamento agudo com NAR-10, NAR-20 e NAR-50 não reverteu a elevação dos níveis de MDA em relação ao grupo controle pilo em nenhuma das áreas analisadas [NAR-10 HC: $7315 \pm 329,8$ (7); NAR-10 CE: $6907 \pm 188,3$ (6); NAR-10 CPF: $7431 \pm 326,1$. NAR-20 HC: $7076 \pm 206,4$ (6); NAR-20 CE: $6860 \pm 278,5$ (7); NAR-20 CPF: $7137 \pm 283,8$ (7). NAR-50 HC: $6627 \pm 257,2$ (7); NAR-50 CE: $6632 \pm 259,8$ (6); NAR-50 CPF: $6282 \pm 362,9$ (7)] (**Figuras 32, 33 e 34**).

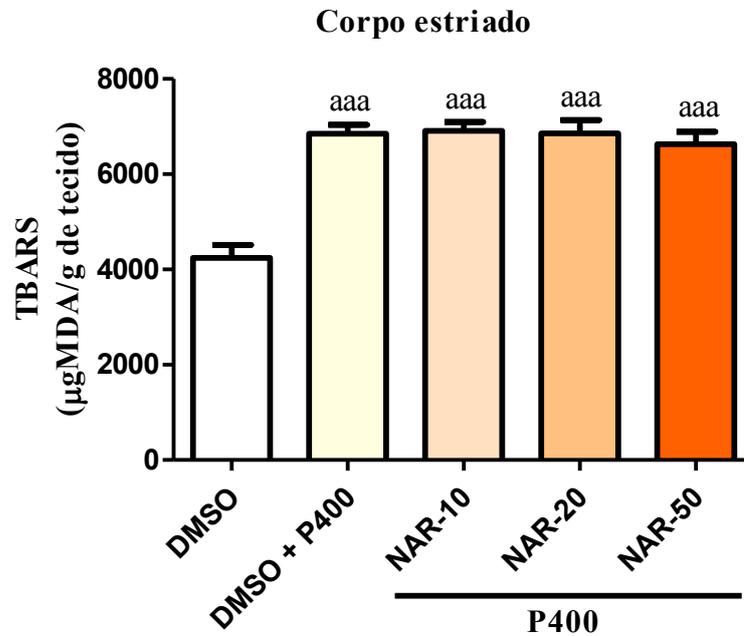
O tratamento crônico com NAR-10 reverteu a elevação dos níveis de MDA no HC e CPF dos animais [NAR-10 HC: $4526 \pm 256,5$ (6); NAR-10 CPF: $4200 \pm 367,9$ (5)] em relação ao grupo controle pilo [Controle pilo HC: $6186 \pm 318,0$ (8)], enquanto o tratamento crônico com NAR-20 não alterou os níveis aumentados de MDA em nenhuma das áreas estudadas [NAR-20 HC: $6524 \pm 267,4$ (6); NAR-20 CE: $5519 \pm 255,2$ (6); NAR-20 CPF: $6656 \pm 275,1$ (6)] em relação ao grupo controle pilo, e o tratamento crônico com NAR-50 elevou ainda mais a concentração de MDA no HC [NAR-50 HC: $8103 \pm 595,9$ (5)] em relação ao grupo controle pilo, sem influenciar nas demais áreas [NAR-50 CE: $6325 \pm 344,8$ (5); NAR-50 CPF: $6580 \pm 180,0$ (5)] (**Figuras 35, 36 e 37**).

Figura 32 - Efeito do tratamento agudo com naringenina sobre a produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no hipocampo de camundongos submetidos ao teste de convulsão induzida por pilocarpina no 1º dia de tratamento.



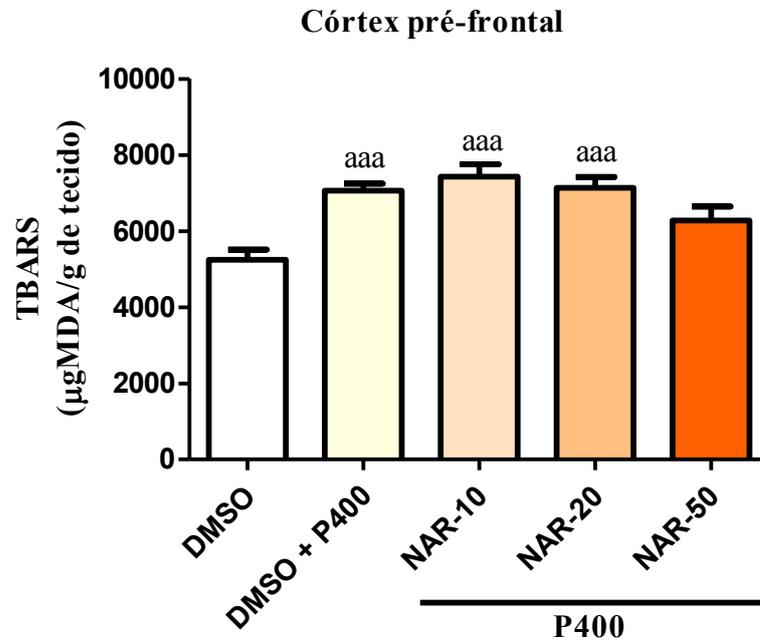
Determinação da ocorrência de peroxidação lipídica com base na concentração de MDA. Os valores representam a média \pm EPM da concentração de TBARS no hipocampo. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Bonferroni's Multiple Comparison Test como teste *post hoc*. Valores significativos: ^avs DMSO com ^ap < 0,05; ^{aa}p < 0,01; ^{aaa}p < 0,001.

Figura 33 - Efeito do tratamento agudo com naringenina sobre a produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no corpo estriado de camundongos submetidos ao teste de convulsão induzida por pilocarpina no 1º dia de tratamento.



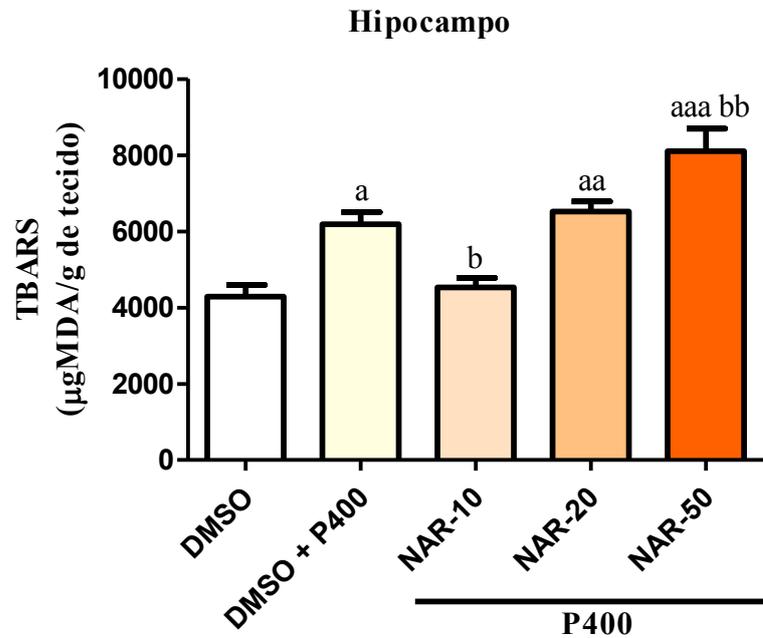
Determinação da ocorrência de peroxidação lipídica com base na concentração de MDA. Os valores representam a média \pm EPM da concentração de TBARS no corpo estriado. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Bonferroni's Multiple Comparison Test como teste *post hoc*. Valores significativos: ^avs DMSO com ^{aaa} $p < 0,001$.

Figura 34 - Efeito do tratamento agudo com naringenina sobre a produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no córtex pré-frontal de camundongos submetidos ao teste de convulsão induzida por pilocarpina no 1º dia de tratamento.



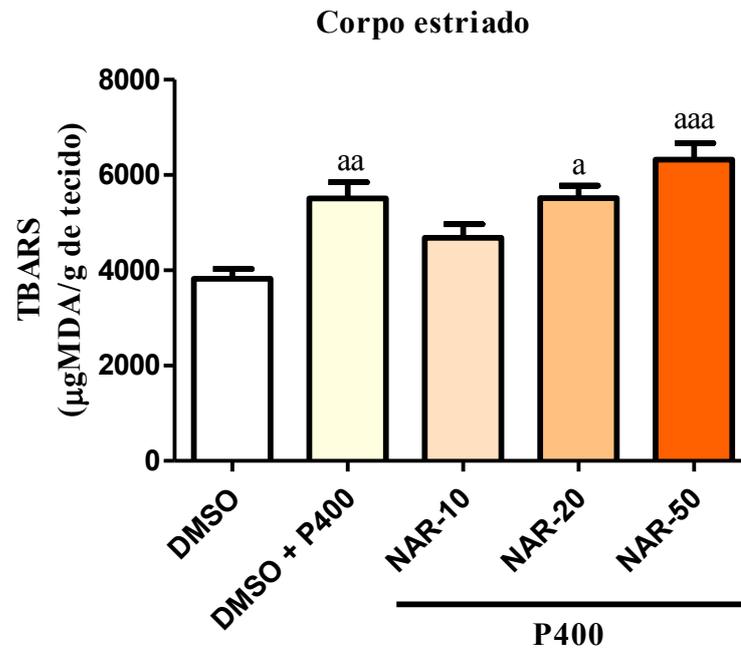
Determinação da ocorrência de peroxidação lipídica com base na concentração de MDA. Os valores representam a média \pm EPM da concentração de TBARS no córtex pré-frontal. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Bonferroni's Multiple Comparison Test como teste *post hoc*. Valores significativos: ^avs DMSO com ^{aaa} $p < 0,001$.

Figura 35 - Efeito do tratamento crônico com naringenina sobre a produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no hipocampo de camundongos submetidos ao teste de convulsão induzida por pilocarpina no 15º dia de tratamento.



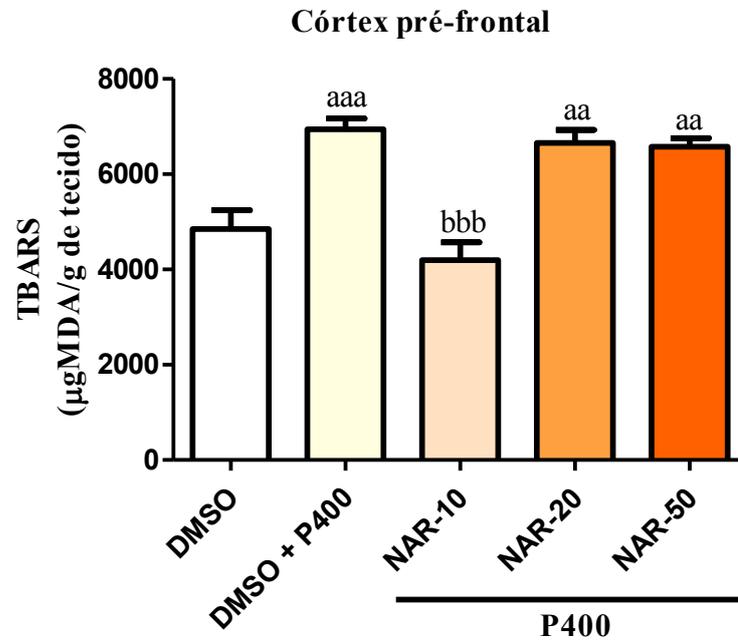
Determinação da ocorrência de peroxidação lipídica com base na concentração de MDA. Os valores representam a média \pm EPM da concentração de TBARS no hipocampo. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Bonferroni's Multiple Comparison Test como teste *post hoc*. Valores significativos: ^avs DMSO; ^b vs DMSO + P400 com ^a $p < 0,05$; ^{aa} $p < 0,01$; ^{aaa} $p < 0,001$; ^b $p < 0,05$; ^{bb} $p < 0,01$.

Figura 36 - Efeito do tratamento crônico com naringenina sobre a produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no corpo estriado de camundongos submetidos ao teste de convulsão induzida por pilocarpina no 15º dia de tratamento.



Determinação da ocorrência de peroxidação lipídica com base na concentração de MDA. Os valores representam a média \pm EPM da concentração de TBARS no corpo estriado. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Bonferroni's Multiple Comparison Test como teste *post hoc*. Valores significativos: ^avs DMSO com ^a $p < 0,05$; ^{aa} $p < 0,01$; ^{aaa} $p < 0,001$.

Figura 37 - Efeito do tratamento crônico com naringenina sobre a produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no córtex pré-frontal de camundongos submetidos ao teste de convulsão induzida por pilocarpina no 15º dia de tratamento.



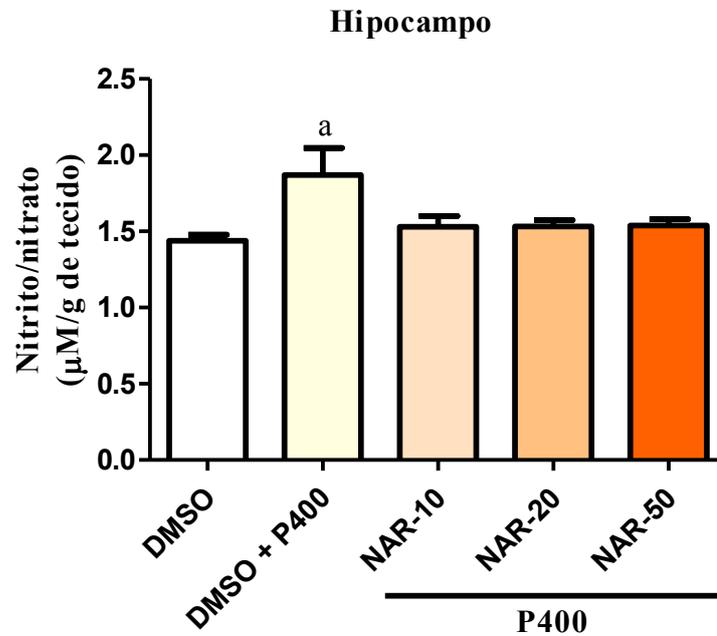
Determinação da ocorrência de peroxidação lipídica com base na concentração de MDA. Os valores representam a média \pm EPM da concentração de TBARS no córtex pré-frontal. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Bonferroni's Multiple Comparison Test como teste *post hoc*. Valores significativos: ^avs DMSO; ^b vs DMSO + P400 com ^{aa} $p < 0,01$; ^{aaa} $p < 0,001$; ^{bbb} $p < 0,001$.

4.1.6.2 Efeitos do tratamento com naringenina sobre a produção de nitrito/nitrato nas áreas cerebrais de animais submetidos ao modelo de convulsão induzida por pilocarpina

Foi observado um aumento significativo na concentração de nitrito/nitrato no hipocampo (HC), corpo estriado (CE) e córtex pré-frontal (CPF) dos animais dos grupos controles submetidos aos tratamentos agudo e crônico com veículo e que receberam pilocarpina (pilo) [Tratamento agudo – Controle pilo HC: $1,87 \pm 0,18$ (5); CE $1,83 \pm 0,10$ (6); CPF: $1,55 \pm 0,04$ (6). Tratamento crônico - Controle pilo HC: $2,26 \pm 0,12$ (7), CE: $2,25 \pm 0,06$ (7), CPF: $2,21 \pm 0,09$] em relação aos grupos controles que receberam apenas o veículo [Tratamento agudo – Controle HC: $1,44 \pm 0,04$ (6); CE: $1,43 \pm 0,027$ (6); CPF: $1,29 \pm 0,04$ (8). Tratamento crônico - Controle HC: $1,45 \pm 0,05$ (6), CE: $1,49 \pm 0,08$ (5), CPF: $1,52 \pm 0,10$ (5)] (**Figuras 38, 39, 40, 41, 42, 43**).

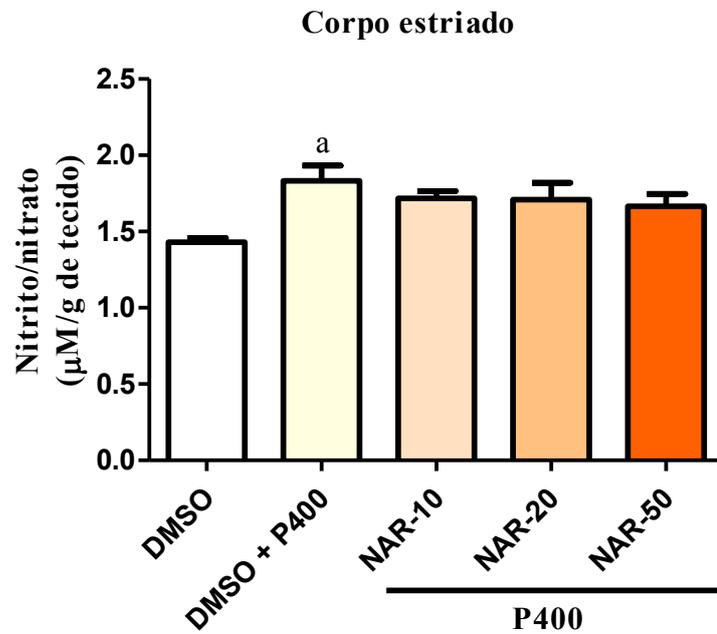
Os tratamentos agudo e crônico com NAR-10, NAR-20 e NAR-50 não reverteram a elevação dos níveis de nitrito/nitrato no HC, CE e CPF dos animais [Tratamento agudo - NAR-10 HC: $1,53 \pm 0,07$ (7), CE: $1,72 \pm 0,05$ (7), CPF: $1,44 \pm 0,03$ (7); NAR-20 HC: $1,53 \pm 0,04$ (5), CE: $1,71 \pm 0,11$ (7), CPF: $1,41 \pm 0,03$ (7); NAR-50 HC: $1,54 \pm 0,04$ (5), CE: $1,67 \pm 0,08$ (7), CPF: $1,43 \pm 0,05$ (6). Tratamento crônico - NAR-10 HC: $2,17 \pm 0,90$ (7), CE: $2,34 \pm 0,09$ (9) CPF: $2,03 \pm 0,07$ (7); NAR-20 HC: $2,09 \pm 0,12$ (6), CE: $2,04 \pm 0,07$ (6), CPF: $2,01 \pm 0,09$; NAR-50 HC: $2,17 \pm 0,22$ (5), CE: $2,14 \pm 0,09$ (5), CPF: $2,08 \pm 0,18$] em relação ao grupo controle pilo [Controle pilo HC: $2,26 \pm 0,12$ (7), CE: $2,25 \pm 0,06$ (7), CPF: $2,21 \pm 0,09$] (**Figuras 38, 39, 40, 41, 42, 43**).

Figura 38 - Efeito do tratamento agudo com naringenina sobre a concentração de nitrito/nitrato no hipocampo de camundongos submetidos ao teste de convulsão induzida por pilocarpina no 1º dia de tratamento.



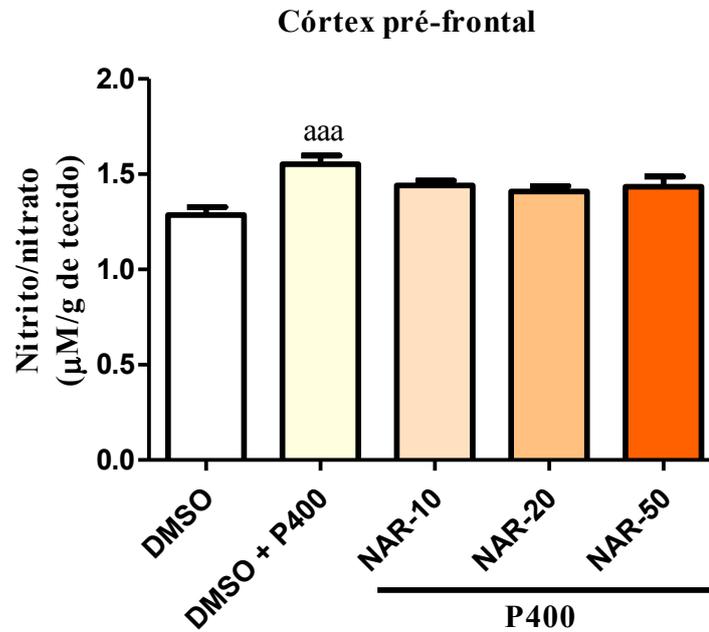
Determinação da formação de nitrito/nitrato. Os valores representam a média \pm EPM da concentração de nitrito/nitrato no hipocampo. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Bonferroni's Multiple Comparison Test como teste *post hoc*. Valores significativos: ^avs DMSO com ^a $p < 0,05$.

Figura 39 - Efeito do tratamento agudo com naringenina sobre a concentração de nitrito/nitrato no corpo estriado de camundongos submetidos ao teste de convulsão induzida por pilocarpina no 1º dia de tratamento.



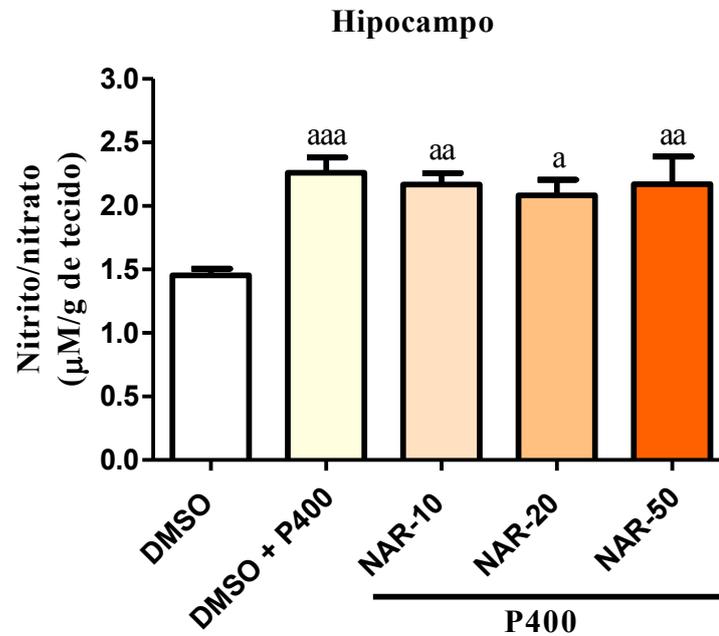
Determinação da formação de nitrito/nitrato. Os valores representam a média \pm EPM da concentração de nitrito/nitrato no corpo estriado. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Bonferroni's Multiple Comparison Test como teste *post hoc*. Valores significativos: ^avs DMSO com ^a $p < 0,05$.

Figura 40 - Efeito do tratamento agudo com naringenina sobre a concentração de nitrito/nitrato no córtex pré-frontal de camundongos submetidos ao teste de convulsão induzida por pilocarpina no 1º dia de tratamento.



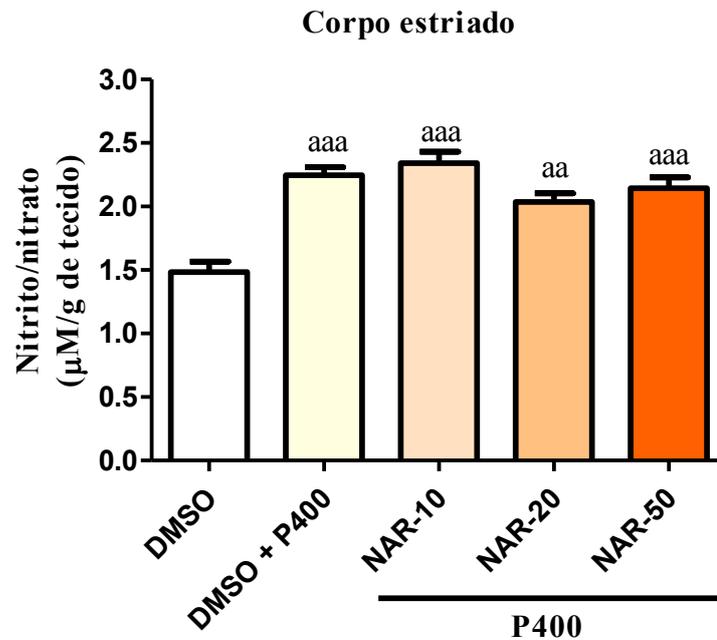
Determinação da formação de nitrito/nitrato. Os valores representam a média \pm EPM da concentração de nitrito/nitrato no córtex pré-frontal. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Bonferroni's Multiple Comparison Test como teste *post hoc*. Valores significativos: ^avs DMSO com ^{aaa} $p < 0,01$.

Figura 41 - Efeito do tratamento crônico com naringenina sobre a concentração de nitrito/nitrato no hipocampo de camundongos submetidos ao teste de convulsão induzida por pilocarpina no 15º dia de tratamento.



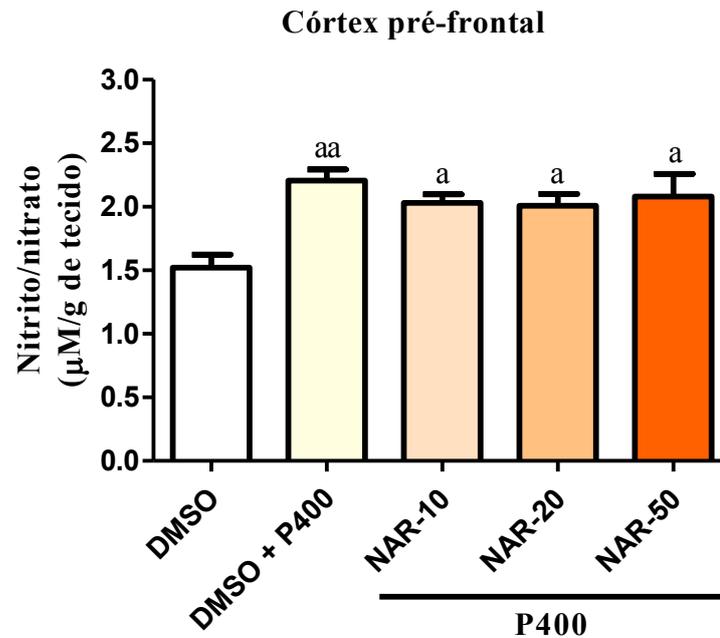
Determinação da formação de nitrito/nitrato. Os valores representam a média \pm EPM da concentração de nitrito/nitrato no hipocampo. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Bonferroni's Multiple Comparison Test como teste *post hoc*. Valores significativos: ^avs DMSO com ^a $p < 0,05$; ^{aa} $p < 0,01$; ^{aaa} $p < 0,001$.

Figura 42 - Efeito do tratamento crônico com naringenina sobre a concentração de nitrito/nitrato no corpo estriado de camundongos submetidos ao teste de convulsão induzida por pilocarpina no 15º dia de tratamento.



Determinação da formação de nitrito/nitrato. Os valores representam a média \pm EPM da concentração de nitrito/nitrato no corpo estriado. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Bonferroni's Multiple Comparison Test como teste *post hoc*. Valores significativos: ^avs DMSO com ^{aa} $p < 0,01$; ^{aaa} $p < 0,001$.

Figura 43 - Efeito do tratamento crônico com naringenina sobre a concentração de nitrito/nitrato no córtex pré-frontal de camundongos submetidos ao teste de convulsão induzida por pilocarpina no 15º dia de tratamento.



Determinação da formação de nitrito/nitrato. Os valores representam a média \pm EPM da concentração de nitrito/nitrato no córtex pré-frontal. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Bonferroni's Multiple Comparison Test como teste *post hoc*. Valores significativos: ^avs DMSO com ^a $p < 0,05$; ^{aa} $p < 0,01$.

5 DISCUSSÃO

Os efeitos da naringenina, no presente trabalho, foram estudados em modelos de comportamento animal, tais como campo aberto, labirinto em cruz elevado (LCE), suspensão da cauda e convulsão induzida por pilocarpina. Foi investigado o envolvimento do adrenoceptor α_1 nos efeitos da naringenina nos modelos supracitados e os efeitos do tratamento com a naringenina sobre o estresse oxidativo por meio do índice de peroxidação lipídica e concentração de nitrito/nitrato nas áreas cerebrais.

Os testes comportamentais realizados com animais são modelos clássicos para *screening* de atividades no sistema nervoso central, fornecendo informações sobre atividade ansiolítica, antidepressiva, atividade locomotora, anticonvulsivante ou convulsivante.

Devido à correlação entre transtornos de humor em humanos e estresse social, os modelos animais de ansiedade e depressão são baseados na exposição dos animais a condições estressantes (PALANZA, 2001).

Neste trabalho foi avaliado o comportamento animal no teste do campo aberto, uma vez que a literatura demonstra que através dessa análise é possível inferir a respeito da influência da droga sobre o nível de excitabilidade do SNC, visando reduzir a probabilidade de resultados falso-positivos ou falso-negativos nos testes de ansiedade e depressão, pois para que novas drogas sejam caracterizadas como ansiolíticas ou antidepressivas é importante investigar a sua ação sobre a atividade locomotora dos animais a fim de determinar a especificidade do efeito ansiolítico ou antidepressivo, uma vez que compostos que apresentam efeitos sedativos ou psicoestimulantes podem produzir resultados falso negativos ou falso positivos nos testes de LCE e suspensão da cauda (BORSINI; MELI, 1988; LISTER, 1987).

O teste do campo aberto é empregado para avaliar a atividade exploratória dos animais. A tendência natural do animal em um ambiente novo é a de explorá-lo, apesar do estresse e do conflito provocado por este ambiente (MONTGOMERY, 1958). Dessa forma, a locomoção, o *rearing* e o *grooming* em roedores, observados no campo aberto, são os parâmetros comportamentais mais usados para descrever influências dos eventos da vida ou da administração de drogas (ARAKAWA; IKEDA, 1991; MONTGOMERY, 1958; REX *et al.*, 1996).

Para o teste do campo aberto, foi utilizado o diazepam na dose de 2 mg/Kg como droga padrão e passível de causar sedação, a fim de verificar um possível efeito sedativo da droga em estudo neste teste, bem como os antidepressivos utilizados como controles positivos para o teste de suspensão da cauda. Foi observado que os tratamentos

agudo e crônico com naringenina (10, 20 e 50 mg/kg) não interferiram na atividade locomotora espontânea, quando comparados com os respectivos tratamentos de grupo controle (agudo e crônico) e com os grupos tratados com as drogas antidepressivas fluoxetina (15 mg/kg) e imipramina (30 mg/kg). No entanto, os tratamentos agudo e crônico com a bupropiona (5 mg/kg) aumentou a atividade dos animais, possivelmente, por um efeito psicoestimulante desta droga conferido pela dopamina, uma vez que o fármaco atua inibindo a recaptação desse neurotransmissor (MEYER *et al.*, 2002). O diazepam (2 mg/Kg) diminuiu a atividade locomotora quando comparado aos demais grupos, indicando o efeito sedativo comum aos benzodiazepínicos.

Outros dois parâmetros analisados no campo aberto foram o número de *rearing* e *grooming*. Enquanto alguns estudos apontam o *rearing* como um comportamento exploratório (JOHANSSON; AHLENIUS, 1989), outros sugerem que o aumento deste parâmetro está relacionado com um aumento da atividade dopaminérgica (SWANSON *et al.*, 1997). Com relação ao *grooming*, de acordo com MacFarland e Reeder (1974), quase todos os animais gastam significativa parte do tempo nesse comportamento. Embora vários neurotransmissores pareçam modular a expressão desse comportamento (MOODY *et al.*, 1988; TRABER, *et al.*, 2011), a dopamina está particularmente envolvida (COOLS *et al.*, 2011; DRAGO *et al.*, 2009). No presente estudo, foi observado que não houve alteração no número de *rearing* e *grooming* no campo aberto com os tratamentos agudo e crônico com todas as doses de naringenina, imipramina e fluoxetina, com aumento do *grooming* apenas no tratamento agudo com bupropiona, o que pode ter relação com o envolvimento dopaminérgico da droga. O diazepam, na dose de 2 mg/kg, diminuiu o *rearing* e *grooming*.

Diante dos resultados observados no teste do campo aberto, pode-se enfatizar que os efeitos da naringenina encontrados nos testes comportamentais de ansiedade e depressão não foram resultados de interferência da naringenina sobre a atividade locomotora.

O labirinto em cruz elevado (LCE) é um teste originalmente desenvolvido por Pellow *et al.* (1985) e se tornou um modelo para o estudo do comportamento de ansiedade em ratos e, subsequentemente, em camundongos (BUCKMAN *et al.*, 2009; CORNÉLIO; NUNES-DE-SOUSA, 2009; GRUNDMANN *et al.*, 2009; LISTER, 1987;). É baseado na aversão natural que os roedores apresentam a áreas abertas e elevadas (CAROLA *et al.*, 2002; RABBANI *et al.*, 2008; RAUPP *et al.*, 2008), sendo o teste mais utilizado na busca de agentes semelhantes aos benzodiazepínicos (CHEN *et al.*, 2004; LAPIN, 1995; PELLOW *et al.*, 1985).

Durante o teste do LCE, os roedores são normalmente cautelosos ao explorar os espaços abertos. Após uma exploração inicial geral, os animais evitam os espaços abertos e tendem a permanecer nos dois braços fechados do labirinto (BERTOGLIO; CAROBREZ, 2000). Sabendo de tal fato, observa-se que a diminuição na ocupação dos braços abertos e a redução do número de entradas nesses braços, em relação ao número total de entradas, é indicativo de um estado de ansiedade. Esse comportamento é atenuado pelo uso de drogas ansiolíticas e exacerbado pelo uso de drogas ansiogênicas (BUCKMAN *et al.*, 2009; SONAVANE *et al.*, 2002).

No presente estudo, o diazepam na dose de 1 mg/Kg foi utilizado como padrão positivo no LCE e, como esperado, produziu significativo aumento em todos os parâmetros analisados: número de entradas nos braços abertos (NEBA), percentual do número de entradas nos braços abertos (PEBA), tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) e percentual do tempo de permanência nos braços abertos (PTBA). Isso indica a atividade ansiolítica do diazepam, uma vez que o tratamento diminuiu a aversão natural dos animais aos espaços desprotegidos e elevados.

Foi observado que a naringenina nos tratamentos agudo e crônico, nas três doses estudadas (10, 20 e 50 mg/kg), bem como a imipramina (30 mg/kg), fluoxetina (15 mg/kg) e bupropiona (5 mg/kg) não diferiram do controle nos tratamentos agudo e crônico em todos os parâmetros analisados no LCE, sugerindo ausência de efeito ansiolítico deste flavonoide e das drogas antidepressivas no modelo estudado. Tais resultados corroboram com os de Baretta (2012), que, estudando os possíveis efeitos ansiolíticos de doses mais baixas de naringenina (0,3; 1,0 e 3,0 mg/kg) no LCE e no teste de esconder esferas, também não identificou efeito ansiolítico do flavonoide. A ausência do efeito ansiolítico da naringenina, bem como dos controles antidepressivos em relação aos animais tratados com o diazepam, observada no presente estudo, pode estar relacionada ao fato do modelo estudado ser mais sensível aos benzodiazepínicos. Apesar do teste do LCE estar entre os modelos animais de ansiedade mais utilizados para o estudo experimental de drogas com potencial ansiolítico, os estudos dos efeitos ansiolíticos de drogas antidepressivas têm se mostrado contraditórios nesse modelo, podendo estas apresentar efeitos ansiolíticos ou nenhum efeito (ANDREATINI *et al.*, 2001), corroborando com os nossos resultados.

Levando em consideração que a depressão é a comorbidade psiquiátrica mais frequente e relevante em pacientes com epilepsia e que estudos anteriores já avaliaram o efeito da naringenina no teste de suspensão da cauda, demonstrando suas propriedades antidepressivas, tais como efeito anti-imobilidade, aumento da concentração de serotonina e

noradrenalina, bem como de fatores neurotróficos em modelos animais e inibição da MAO *in vitro* (OLSEN *et al.*, 2008; YI *et al.*, 2010; 2012; 2014), reproduzimos o teste da suspensão da cauda com as doses que apresentaram efeito antidepressivo no trabalho realizado por Yi *et al.* (2010) e investigamos o envolvimento do adrenoceptor α_1 no efeito antidepressivo da naringenina.

Modelos animais de depressão podem ser reproduzidos pelo teste de suspensão da cauda, o qual é um dos modelos clássicos para avaliação da atividade antidepressiva de fármacos. É baseado no “desespero comportamental”, uma vez que os animais são impedidos de fugir e tocar o chão, experimentando, assim, curtos períodos de estresse inescapável, tendendo a assumir uma postura imóvel, a qual parece ser prevenida com o tratamento com drogas antidepressivas (CRYAN *et al.*, 2005; STERU *et al.*, 1985).

O estresse é considerado como um fator importante no desenvolvimento de transtornos do sistema nervoso central, tais como depressão. Estudos têm mostrado que experiências estressantes aumentam a vulnerabilidade a esse distúrbio (HENNINGSEN *et al.*, 2009; KAROLEWICZ; PAUL, 2001).

Embora a relação entre a imobilidade observada em modelos animais de depressão e a depressão em humanos permaneça controversa, uma grande variedade de compostos que apresentam potenciais antidepressivos reduzem o tempo de imobilidade nos testes da suspensão da cauda e do nado forçado (BILKEI-GORZO *et al.*, 2002; CRYAN *et al.*, 2005; DHIR; KULKARNI, 2007; YAO *et al.*, 2009). No presente estudo, foi observado que o tratamento agudo com naringenina nas doses de 10, 20 e 50 mg/kg reduziu o tempo de imobilidade dos animais no teste de suspensão da cauda, assim como as drogas antidepressivas (imipramina, fluoxetina e bupropiona) utilizadas como controles positivos. No entanto, no tratamento crônico, a dose de 50 mg/kg perdeu o seu efeito anti-imobilidade.

Sabendo que Olsen *et al.* (2008) observaram que a naringenina apresenta atividade inibidora da MAO, e que Yi *et al.* (2010) encontraram uma maior concentração de serotonina e noradrenalina com o tratamento com naringenina, sugerimos que o tratamento crônico com naringenina na dose de 50 mg/kg pode elevar ainda mais a concentração desses neurotransmissores, causando um desequilíbrio na resposta noradrenérgica normal.

Ribeiro (2015), estudando o envolvimento de subtipos de adrenoceptores α_1 no efeito anti-imobilidade da imipramina no teste da suspensão da cauda com antagonistas seletivos, observou que os subtipos de adrenoceptores α_1 têm papéis opostos no comportamento de camundongos nesse teste, e que a ativação dos adrenoceptores α_{1B} associados com antagonismo dos adrenoceptores α_{1A} e α_{1D} pode ser um dos

mecanismos envolvidos na atividade antidepressiva da imipramina e de outros antidepressivos tricíclicos, indicando, assim, que o estado normal do comportamento de imobilidade é regulado pelo balanço da ativação de cada um dos três subtipos de adrenoceptores α_1 (RIBEIRO, 2015; RIBEIRO; PUPO, 2015). Nesse sentido, sugerimos que o tempo de tratamento e a elevação da dose de naringenina pode potencializar a neurotransmissão noradrenérgica, com possível desequilíbrio na ativação desses receptores, resultando na ausência de efeito anti-imobilidade no tratamento crônico com a maior dose (50 mg/kg).

Investigando o envolvimento dos adrenoceptores α_1 com o antagonista prazosina no efeito anti-imobilidade da naringenina e imipramina no teste de suspensão da cauda, foi observado que os animais tratados com prazosina, meia hora antes, do tratamento com a naringenina na dose de 20 mg/kg, reverteu o efeito anti-imobilidade do flavonoide, assim como o efeito anti-imobilidade da imipramina (30 mg/kg), sugerindo uma importante participação da noradrenalina e dos adrenoceptores α_1 no comportamento anti-imobilidade da naringenina. Corroborando os nossos resultados, estudos mostram que o antagonismo de adrenoceptores α_1 com prazosina previne o efeito anti-imobilidade da creatina, do extrato de *Hoodia gordonii*, da deidrozingerona, do cloreto de cromo, do ácido elágico e da riparina I derivada da *Aniba riparia* (CITÓ *et al.*, 2015; CUNHA *et al.*, 2013; de SOUSA *et al.*, 2014 GIRISH *et al.*, 2012; MARTINEZ *et al.*, 2014; PIOTROWSKA *et al.*, 2013), sugerindo que a ativação desses receptores é essencial para o efeito antidepressivo de tais compostos.

Estudos pré-clínicos demonstraram que os receptores α_1 adrenérgicos parecem ser responsáveis por mediar a resposta aos antidepressivos (DANYSZ *et al.*, 1986; MASUDA *et al.*, 2001). Complementando tais evidências, outros estudos apontaram que o bloqueio de receptores α_1 -adrenérgicos mimetiza o estado depressivo, que, assim como o estresse crônico, está associado à dessensibilização desses receptores, e que o tratamento crônico com antidepressivos aumenta a densidade e a atividade dos receptores α_1 -adrenérgicos no córtex frontal e hipocampo (STONE *et al.*, 2003). Adicionalmente, o tratamento crônico com antidepressivos diminui gradualmente a densidade (*downregulation*) dos autorreceptores α_2 -adrenérgicos, receptores acoplados à proteína G inibitória, cujo principal efeito parece ser a diminuição da taxa de disparo do neurônio noradrenérgico e que se encontram em maior número em pacientes com depressão (FLÜGGE *et al.*, 2003; ORDWAY *et al.*, 2003).

Levando em consideração que as drogas antidepressivas com envolvimento noradrenérgico parecem ter um duplo papel nas crises convulsivas, podendo apresentar atividade moduladora com efeitos anti ou pró-convulsivantes em pacientes com epilepsia (CLINCKERS *et al.*, 2010; GIORGI *et al.*, 2004), e observando neste trabalho que o efeito

anti-imobilidade da naringenina parece ser mediado pela ativação de adrenorreceptores α_1 , estudamos o efeito da naringenina em modelo de convulsão induzida por pilocarpina.

O teste da convulsão induzida por pilocarpina consiste na administração do agonista muscarínico pilocarpina em roedores e assemelha-se, em muitos aspectos, as crises convulsivas da epilepsia do lobo temporal, nos padrões eletroencefalográficos, comportamentais e sequelas morfológicas (CAVALHEIRO *et al.*, 1991; LEITE *et al.*, 1990; TURSKI *et al.*, 1989; VEZZANI *et al.*, 2013). De uma maneira geral, as convulsões induzidas por pilocarpina podem produzir lesões neuronais em diversas áreas e, especialmente, nas estruturas límbicas, causando perda neuronal no hipocampo, amígdala, córtex entorrinal e piriforme, indicando o envolvimento de diferentes áreas no estabelecimento do processo epiléptico (CAVALHEIRO, 1995; FERNANDES, 2013; LEITE *et al.*, 1990; TURSKI *et al.*, 1983).

No teste da convulsão induzida por pilocarpina, foi observado que o tratamento agudo com a naringenina nas doses de 10, 20 e 50 mg/kg, bem como com as drogas antidepressivas imipramina (30 mg/kg), fluoxetina (15 mg/kg) e bupropiona (5 mg/kg) não interferiu na latência de convulsão e morte dos animais, semelhante aos resultados observados no tratamento crônico com naringenina (10 mg/kg), imipramina (30 mg/kg), fluoxetina (15 mg/kg) e bupropiona (5 mg/kg). No entanto, o tratamento crônico com as doses mais altas de naringenina (20 e 50 mg/kg) reduziu a latência para o primeiro episódio de convulsão, com redução da latência de morte observada apenas nos animais que receberam o tratamento crônico com a maior dose (50 mg/kg). Dessa forma, o tempo de tratamento com naringenina e a elevação da dose parecem estar relacionados com a intensificação das crises convulsivas, possivelmente em virtude de alterações no conteúdo de neurotransmissores, uma vez que os estudos mostram que a naringenina pode inibir a enzima MAO (OLSEN *et al.*, 2008) e elevar os níveis de serotonina e noradrenalina (YI *et al.*, 2010, 2012). Além disso, uma possível alteração no número de receptores noradrenérgicos também pode explicar os resultados encontrados nesse trabalho, pois segundo Stone *et al.* (2003) o tratamento crônico com antidepressivos pode aumentar a densidade e a atividade dos receptores α_1 -adrenérgicos no córtex frontal e hipocampo.

Considerando, ainda, que a neurotransmissão noradrenérgica pode influenciar outros neurotransmissores no SNC, tais como serotonina, dopamina, GABA e glutamato, e que o fator determinante para as drogas psicotrópicas, em termos de excitação/inibição, é a dosagem (CLINCKERS *et al.*, 2010), sugerimos que a redução do limiar convulsivo observada nos animais submetidos ao tratamento crônico com naringenina nas maiores doses

(20 e 50 mg/kg), pode estar relacionada com um desequilíbrio entre a neurotransmissão excitatória/inibitória, e esse desequilíbrio pode ser explicado pela potencialização da transmissão excitatória por meio da estimulação dos adrenorreceptores (CLINCKERS *et al.*, 2010). Estudos mostram que altas concentrações de noradrenalina, dopamina e serotonina podem ser pró-convulsivantes em modelo de epilepsia focal (CLINCKERS *et al.*, 2004; CLINCKERS *et al.*, 2010).

Investigando o envolvimento do adrenorreceptor α_1 na redução da latência de convulsão no tratamento crônico com NAR-20 e na redução da latência de convulsão e morte no tratamento crônico com NAR-50 no modelo de convulsão induzida por pilocarpina, foi observado uma reversão desses efeitos nos animais que receberam o tratamento com prazosina antes do tratamento com naringenina. Dessa forma, os nossos resultados sugerem o envolvimento do adrenorreceptor α_1 na redução do limiar para convulsões, corroborando com estudos realizados com camundongos transgênicos para uma superexpressão do receptor α_{1B} -noradrenérgico, os quais demonstraram que os animais exibiram crises convulsivas espontâneas parcialmente revertidas pela administração de terazosina, um antagonista de receptores α_1 , indicando, assim, que esse subtipo do receptor α_1 sustenta a atividade convulsiva (KUNIEDA *et al.*, 2002; ZUSCICK *et al.*, 2000). Complementando tais evidências, um estudo com camundongos nocaute para o receptor α_{1B} -noradrenérgico, demonstrou que a ausência desse receptor protege os animais contra crises epiléticas (PIZZANELLI *et al.*, 2009), e um trabalho realizado por Felippotti (2010) referiu que o efeito da noradrenalina sobre adrenorreceptores α_1 pode ser responsável pelo aparecimento de crises convulsivas.

Sabendo que a formação de radicais livres é comum em modelos de convulsão induzida por pilocarpina (NEJM *et al.*, 2015), e investigando o estresse oxidativo nas áreas cerebrais (hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado) dos animais, foi observado que o tratamento agudo com naringenina nas doses de 10, 20 e 50 mg/kg não interferiu na peroxidação lipídica e nas concentrações de nitrito/nitrato nas três áreas cerebrais. No entanto, o tratamento crônico com a naringenina na menor dose (10 mg/kg) foi capaz de proteger os animais da peroxidação lipídica, uma vez que observamos uma redução na produção de MDA no hipocampo e córtex pré-frontal desses animais, sem encontrar alterações nas concentrações de nitrito/nitrato quando comparado com o grupo controle que recebeu pilocarpina, enquanto o tratamento crônico com a maior dose (50 mg/kg), coincidentemente com a redução na latência de convulsão, aumentou a peroxidação lipídica no hipocampo dos animais, apesar de não ter interferido na concentração de nitrito/nitrato, e o tratamento crônico com a dose de 20,

embora também tenha reduzido a latência de convulsão, não interferiu nas concentrações de MDA e nitrito/nitrato, o que pode ser sugestivo de um equilíbrio entre a atividade pró-oxidante decorrente da intensificação da crise convulsiva e a atividade antioxidante conferida pela naringenina. Dessa forma, a redução da peroxidação lipídica observada no tratamento crônico com naringenina na dose de 10 mg/kg pode ser explicada pela possível atividade antioxidante conferida pelo flavonoide em doses menores no modelo estudado, já que essa atividade antioxidante não foi observada com o tratamento crônico com a dose de 20, e que um efeito pró-oxidante foi encontrado no tratamento crônico com a maior dose (50 mg/kg) de naringenina. Esse resultado pode ser sugestivo de uma excitotoxicidade pelo glutamato decorrente da potencialização da neurotransmissão noradrenérgica em virtude da elevação da dose de naringenina, com conseqüente desequilíbrio entre o efeito pró-oxidante do glutamato e antioxidante do próprio flavonoide, em favor do primeiro, principalmente porque a maior concentração de MDA foi observada no hipocampo dos animais tratados com NAR-50, sendo esta área descrita como o sítio da atividade convulsiva (TURSKI *et al.*, 1983).

Com base nos resultados obtidos, sugerimos que o tratamento crônico com a dose de 10 mg/kg de naringenina se mostrou o mais seguro em relação ao tratamento da depressão em pacientes com epilepsia, uma vez que apresentou atividade anti-imobilidade no teste de suspensão da cauda, um indicativo de atividade antidepressiva; não reduziu a latência de convulsão e ainda minimizou a peroxidação lipídica. No entanto, são necessários estudos mais aprofundados com modelos experimentais de epilepsia e depressão, que induzam, de fato, tais patologias e reproduzam os sintomas crônicos das mesmas, a fim de verificar se o tratamento com a naringenina continua a produzir os mesmos efeitos observados neste estudo. Além disso, enfatiza-se a importância de estudos visando esclarecer o envolvimento dos três subtipos do adrenoceptor α_1 nos efeitos antidepressivos e na redução da latência de convulsão conferidos pela naringenina, bem como o envolvimento dos outros sistemas de neurotransmissão.

6 CONCLUSÃO

A análise dos resultados apresentados neste trabalho nos permitiu concluir que:

- A naringenina não apresentou efeito ansiolítico no teste do labirinto em cruz elevado;
- A naringenina reduziu o tempo de imobilidade no teste de suspensão da cauda, confirmando o efeito antidepressivo já descrito na literatura científica;
- No teste do campo aberto, a naringenina não alterou a atividade locomotora dos animais, permitindo concluir que o efeito antidepressivo conferido pela droga no teste da suspensão da cauda é específico e não relacionado a um possível efeito psicoestimulante;
- O efeito antidepressivo da naringenina parece ter envolvimento do adrenoceptor α_1 , visto que o pré-tratamento com o antagonista deste receptor impediu o efeito anti-imobilidade do flavonoide;
- O tratamento agudo com naringenina não interferiu na latência de convulsão e morte dos animais no teste da convulsão induzida por pilocarpina;
- O tratamento crônico com NAR-20 e NAR-50 reduziu a latência de convulsão dos animais, e o tratamento com NAR-50 reduziu a latência de morte;
- A redução da latência de convulsão e morte com o tratamento crônico com naringenina parece ter envolvimento noradrenérgico, via adrenoceptor α_1 , uma vez que o pré-tratamento com o antagonista deste receptor impediu a redução da latência de convulsão e morte dos animais;
- O tratamento agudo com naringenina não impediu o aumento da peroxidação lipídica observada nos animais tratados com pilocarpina;
- O tratamento crônico com a menor dose naringenina (NAR-10) reverteu a peroxidação lipídica conferida pela pilocarpina;

- Os tratamentos agudo e crônico com naringenina não interferiram nos níveis de nitrito/nitrato nas áreas cerebrais dos animais.
- O tratamento crônico com a menor dose de naringenina (NAR-10) pode ser considerado seguro para o tratamento da depressão comórbida da epilepsia.

REFERÊNCIAS

- ADELÖW, C.; ANDERSSON, T.; AHLBOM, A.; TOMSON, T. Hospitalization for psychiatric disorders before and after onset of unprovoked seizures/epilepsy. **Neurology**. v. 78, n. 6, p. 396-401, 2012.
- ALAM, M. A.; SUBHAN, N.; RAHMAN, M. M.; UDDIN, S. J.; REZA, H. M.; SARKER, S. D. Effect of Citrus Flavonoids, Naringin and Naringenin, on Metabolic Syndrome and Their Mechanisms of Action. **Adv. Nutr.** v. 5, p. 404-417, 2014.
- ALPER, K.; SCHWARTZ, K. A.; KOLTS, R. L.; KHAN, A. Seizure incidence in psychopharmacological Clinical trials: an analysis of food and drug administration (fda) summary basis of Approval reports. **Biol psychiatry**. v. 62, p. 345–354, 2007.
- ANDREATINI, R.; BOERNGEN-LACERDA, R.; ZORZETTO FILHO, D. Tratamento farmacológico do transtorno de ansiedade generalizada: perspectivas futuras. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 23, n.4, p.233-42, 2001.
- ARAKAWA, O.; IKEDA, T. Apomorphine effects on single and paired rat open-field behavior. **Physiology & Behavior**, v. 50, p. 189-194, 1991.
- ARAUJO, D.; ONOFRE, S. Ação do extrato hidroalcoólico de *Alternanthera brasiliana* (L.) O. Kunt. (Amaranthaceae) sobre a atividade de antimicrobianos utilizados na terapêutica. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**. v. 6, n. 1, p. 1-8, 2011.
- ATRI, P. B.; JULIUS, D. A. Maprotiline hydrochloride associated with a clinical state of catatonic stupor and epileptic encephalogram. **J Clin Psychopharmacol**. v. 4, p. 207– 209, 1984.
- AXELROD, J. Noradrenaline: Fate and control of its biosynthesis. **Science**. V.173, p. 598-606, 1971.
- BAI, W.; WANG, C.; REN, C. Intakes of total and individual flavonoids by US adults. **Int. J. Food Sc. Nutr.** v. 65, p. 9–20, 2014.
- BARDEN, N. Implication of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the physiopathology of depression. **J Psychiatry Neurosci**.v. 29, p. 185–193, 2004.
- BARETTA, I. P. **Efeito tipo ansiolítico do extrato bruto hidroalcoólico de *Achillea millefolium* L (Asteraceae) em modelos animais**. 2012. 171 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.
- BARRY, J. J.; ETTINGER, A. B.; FRIEL, P.; GILLIAM, F. G.; HARDEN, C.L.; HERMANN, B.; et al. Consensus statement: the evaluation and treatment of people with epilepsy and affective disorders. **Epilepsy Behav.** v. 13, p. 1–29, 2008.

BAUMEISTER, A. A.; HAWKINS, M. F.; UZELAC, S. M. The myth of reserpine-induced depression: role in the historical development of the monoamine hypothesis. **J. Hist. Neurosci.** v.12, p. 2017-220, 2003.

BEKING, K.; VIEIRA, A. An assessment of dietary flavonoid intake in the UK and Ireland. **Int. J. Food Sci. Nutr.** v.62, p. 17–19, 2011.

BERG, A. T.; CROSS, J. H. Towards a modern classification of the epilepsies? **Lancet**, v. 9, p.459-61, 2010.

BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A. P. Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. **Behav. Brain Res.**, v. 108, p.197-203, 2000.

BEVILAQUA, F.; MOCELIN, R.; GRIMM, C.; DA SILVA JUNIOR, N. S.; BUZETTO, T. L.; CONTERATO, G. M.; ROMAN, W. A. Jr.; PIATO, A. L. Involvement of the catecholaminergic system on the antidepressant-like effects of *Alpinia zerumbet* in mice. **Pharm Biol.** v. 54, n. 1, p.151-6, 2016.

BILKEI-GORZO, A.; et al. Diminished anxiety- and depression-related behaviors in mice with selective deletion of the *Tacr* gene. **J. Neurosci.**, v.22, p.10046-10052, 2002.

BOER, H. M.; MULA, M.; SANDER, J. W. The global burden and stigma of epilepsy. **Epilepsy Behav.** v. 12, n.4, p. 540–6, 2008.

BOGDANSK, D. F. Norepinephrine uptake dependent upon apparent Mg^{++} ATPase activity and proton transport in storage vesicles in axoplasm. **Synapse.** v. 2, n. 4, p. 424-431, 1998.

BOLDRINI, M.; UNDERWOOD, M. D.; MANN, J. J.; ARANGO, V. Serotonin-1A autoreceptor binding in the dorsal raphe nucleus of depressed suicides. **J Psychiatr Res.** v. 42, n. 6, p. 433-42, 2008.

BONANNO, G.; GIAMBELLI, R.; RAITERI, L.; ET AL. Chronic antidepressants reduce depolarization-evoked glutamate release and protein interactions favoring formation of SNARE complex in hippocampus. **J Neurosci.** v. 25, n. 13, p. 3270-9, 2005.

BORELLI, E.; BOZZI, Y. Dopamine D2 receptor signaling controls neuronal cell death induced by muscarinic and glutamatergic drugs. **Molecular and Cellular Neuroscience.** v. 19, p. 263-271, 2002.

BORRIS, R. P. Natural Products research: perspectives from a major pharmaceutical company, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 51, p. 29-38, 1996.

BORSINI, F.; MELI, A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? **Psychopharmacology**, v. 94, n. 2, p. 147–160, 1988.

BRODIE, M. J.; BARRY, S. J. E.; BAMAGOUS, G. A.; *et al.* Patterns of treatment response in newly diagnosed epilepsy. **Neurology.** v. 78, p. 1548–54, 2012.

BRUNTON, L. L. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. 12^a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012.

BUCKMAN, S. G.; et al. Increased elevated plus maze open-arm time in mice during spontaneous morphine withdrawal. **Behav. Brain Res.**, v. 197, p.454-456, 2009.

BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials, **Nat. Prod. Rep.** v. 25, p. 475-516, 2008.

CALIXTO, J. B.; SCHIDT, C.; OTUK, M. F.; SANTOS, A. R. S. Biological activity of plants extractes: Novel analgesic durgs, **Expert opinion Emerging drugs**. v.6, n. 2, p. 261-279, 2001.

CAROLA, V.; et al. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behavior in inbred mice. **Behav. Brain Res.**, v.21, p.49-57, 2002.

CAVALHEIRO, E. A.; LEITE, J. P.; BORTOLOTTI, Z. A.; TURSKI, W. A.; IKONOMIDOU, C.; TURSKI, L. Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. **Epilepsia**. v. 32, p. 778-782, 1991.

CAVALHEIRO, E. A. The pilocarpine model of epilepsy. *Ital J Neurol Sci*, v.16, n.1-2, p.33-7, 1995.

CHEN, S. W.; et al. Possible anxiolytic effects of taurine in the mouse elevates plus-maze. **Life Sci.**, v.75, p.1503-1511, 2004.

CITÓ, M. C. O.; SILVA, M. I. G.; SANTOS, L. K. X.; FERNANDES, M. L.; MELO, F. H. C.; AGUIAR, J. A. C.; LOPES, I. S.; SOUSA, P. B.; VASCONCELOS, S. M.; MACÊDO, D. S.; SOUSA, F. C. Antidepressant-like effect of Hoodia gordonii in a forced swimming test in mice: evidence for involvement of the monoaminergic system. **Braz J Med Biol Res**. v. 48, p. 57-64, 2015.

CLARK, J. A.; FLICK, R. B.; PAI, L. Y.; SZALAYOVA I, KEY, S.; CONLEY, R.K. Glucocorticoid modulation of tryptophan hydroxylase-2 protein in raphe nuclei and 5-hydroxytryptophan concentrations in frontal cortex of C57/Bl6 mice. *Mol Psychiatry*. v.13, p. 498-506, 2008.

CLINCKERS, R.; SMOLDERS, I.; MEURS, A.; EBINGER, G.; MICHOTTE, Y. Anticonvulsant action of hippocampal dopamine and serotonin is independently mediated by D2 and 5-HT1A receptors. **J. Neurochem**. v.89, p. 834-843, 2004.

CLINCKERS, R.; ZGAVE, T.; VERMOESEN, K.; MEURS, A.; MICHOTTE, Y.; SMOLDERS, I. Pharmacological and neurochemical characterization of the involvement of hippocampal adrenoreceptor subtypes in the modulation of acute limbic seizures. **J. Neurochem**. v. 115, p. 1595-1607, 2010.

COOLS, A. R., SPRUIJT, B. M., ELLENBROEK, B. A. apud SERAFIM, A. P., FELÍCIO, L. F. Dopaminergic modulation of grooming behavior in virgin na pregnan rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 34, p. 1465-1470, 2001.

COPPEN, A. The biochemistry of affective disorders. **Br J Psychiatry**, v. 113, n. 504, p. 1237- 64, 1967.

CORNÉLIO, A. M.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Open elevated plus maze-induced antinociception in rats: A non-opioid type of pain inhibition? **Physiol. Behav.**, v.96, p. 440-447, 2009.

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

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads, **Pure Appl. Chem.** v. 77, p. 7–24, 2005.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta.** v.1830, n.6, p. 3670-3695, 2013.

CRYAN, J. F.; MOMBÉREAU, C.; VASSOUT, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 29, n. 4-5, p. 571-625, 2005.

CUNHA, M. P.; PAZINI, F. L.; OLIVEIRA, A.; BETTIO, L. E. B.; ROSA, J. M.; MACHADO, D. G.; RODRIGUES, A. L. The activation of $\alpha 1$ -adrenoceptors is implicated in the antidepressant-like effect of creatine in the tail suspension test. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 44, p. 39–50, 2013.

CURRAN, S.; de PAUW, K. Selecting an antidepressant for use in a patient with epilepsy. Safety considerations. **Drug Saf.** v.18, n. 2, p. 125–133, 1998.

DANYSZ, W.; KOSTOWSKI, W.; KOZAK, W.; HAUPTMANN, M. On the role of noradrenergic neurotransmission in the action of desipramine and amitriptyline in animal models of depression. **Pol. J. Pharmacol. Pharm.**, v. 38, p.285-298, 1986.

DAVIDSON, J. Seizures and bupropion: a review. **J Clin Psychiatry.** v. 50, n.7, p. 256–261,1989.

DELIGIANNIDIS, K. M.; FREEMAN, M. P. Complementary and alternative medicine for the treatment of depressive disorders in women. **Psychiatr Clin N Am.** v. 33, p. 441–63, 2010.

de SOUSA, F. C. F.; OLIVEIRA, I. C. M.; SILVA, M. I. G.; de MELO, C. T. V.; SANTIAGO, V. R., de CASTRO, C. R.; FERNANDES, M. L.; GUTIERREZ, S. J.; VASCONCELOS, S. M.; MACÊDO, D. S.; BARBOSA FILHO, J. M. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of riparin I from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 28, p. 95–103, 2014.

DHIR, A.; KULKARNI, S. K. Involvement of nitric oxide (NO) signaling pathway in the antidepressant action of bupropion, a dopamine reuptake inhibitor. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 568, p.177-185, 2007.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs, **Life Science**, v. 65, n.4, p, 337-53, 1999.

DIXON, R. A.; PASINETTI, G. M. Flavonoids and Isoflavonoids: From Plant Biology to Agriculture and Neuroscience, **Plant Physiology**, v. 154, p. 453–457, 2010.

DRAGO, F.; CONTARINO, A.; BUSA, L. The expression. Of neuropeptide-induced excessive grooming behavior in dopamine D1 and D2 receptor-deficient mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 365, p. 125-131, 1999.

DRAPER, H.H.; HADELY, M. Malondialdehyde determination as na index of lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, p. 421-431, v. 186, 1990.

ENGLAND, M. J.; LIVERMAN, C.T.; SCHULTZ, A. M.; STRAWBRIDGE, L. M. Epilepsy across the spectrum: promoting health and understanding. A summary of the Institute of Medicine report. **Epilepsy Behav.** v. 25, n. 2, p. 266–76, 2012.

FAVALE, E.; RUBINO, V.; MAINARDI, P.; LUNARDI, G.; ALBANO, C. Anticonvulsant effect of fluoxetine in humans. **Neurology**. v. 45, n. 10, p. 1926–7, 1995.

FELDMAN, R. S.; MEYER, J. S.; QUENZER, L. F. catecholamines, Principles of neuropsychopharmacology. **Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.** p. 277-344, 1997.

FELIPPOTTI, T. T. **Efeito da Neurotransmissão Noradrenérgica no Locus Ceruleus na Antinociceção Pós-ictal.** 2010. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP).Ribeirão Preto, São Paulo, 2010.

FERNANDES, M. J. da S. Epilepsia do lobo temporal: mecanismos e perspectivas. **Estud.av.** v. 27, n.77, 2013.

FIEST, K. M.; DYKEMAN, J.; PATTEN, S. B.; WIEBE, S.; KAPLAN, G. G.; MAXWELL, C. J.; ET AL. Depression in epilepsy: a systematic review and meta-analysis. **Neurology**. v.80, n. 6, p.590–9, 2013.

FISHER, R. S.; ACEVEDO, C.; ARZIMANOGLU, A.; BOGACZ, A.; CROSS, J. H.; ELGER, C.; ENGEL, J.J. Jr.; FRENCH, J. A.; GLYNN, M.; HESDORFFER, D.C.; LEE, B.I.; MATHERN, G.; MOSHÉ, S. L.; PERUCCA, E.; SCHEFFER, I.E.; TOMSON, T.; WATANABE, M.; WIEBE, S. An Operational Clinical Definition of Epilepsy. Apresentado no Simpósio Presidencial no Congresso ILAE, 2014.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, M. L.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas Medicinais Como fontes de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **Multiciência (UNICAMP)**. v. 7, 2006.

FLÜGGE, G.; VAN KAMPEN, M.; MEYER, H.; FUCHS, E. Alpha2A and alpha2C adrenoceptor regulation in the brain: alpha2A changes persist after chronic stress. **Eur. J. Neurosci.**, v.17, p. 917-928, 2003.

GAITAZIZ, A.; TRIMBLE, M. R.; SANDER, J. W. The psychiatric comorbidity of epilepsy. **Acta Neurol Scand.** v. 110, n. 4, p. 207-20, 2004.

GEORGIEV, V.; ANANGA, A.; TSOLOVA, V. Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. **Nutrients.** v. 6, p. 391-415, 2014.

GIANNI, A. J.; PRICE, W. A. Amoxapine-induced seizures: case reports. **J Clin Psychiatry.** v. 45, p. 358-9, 1984.

GIORGI, F. S.; PIZZANELLI C.; BIAGIONI F.; MURRI, L.; FORNAI, F. The role of norepinephrine in epilepsy: from the bench to the bedside. **Neurosci. Biobehav. Rev.** v. 28, p. 507-524, 2004.

GIRISH, C.; RAJ, V.; ARYA, J.; BALAKRISHNAN, S. Evidence for the involvement of the monoaminergic system, but not the opioid system in the antidepressant-like activity of ellagic acid in mice. **Eur J Pharmacol.**, v. 682, p. 118-25, 2012.

GLUCK, M. R.; JAYATILLEKE, E.; SHAW, S.; ROWAN, A. J.; HAROUTUNIAN, V. CNS oxidative stress associated with the kainic acid rodent model of experimental epilepsy. **Epilepsy Research**, n. 39, p. 63-71, 2000.

GOBERT, A.; RIVET, J. K.; AUDINOT, V.; NEWMAN-TANCREDI, A.; CISTARELLI, L.; MILLAN, M. J. Simultaneous quantification of serotonin, dopamine and noradrenaline levels in single frontal cortex dialysates of free-moving rats reveals a complex pattern of reciprocal auto- and heteroreceptor-mediated control release. **Neuroscience.** v. n. 84, p. 413-429, 1998.

GOLECHHA, M.; SARANGAL, V.; BHATIA, J.; CHAUDHRY, U.; SALUJA, D.; ARYA, D. S. Naringin ameliorates pentylenetetrazol-induced seizures and associated oxidative stress, inflammation, and cognitive impairment in rats: Possible mechanisms of neuroprotection. **Epilepsy & Behavior.** v. 41, p. 98-102, 2014.

GOMES, T. K. C.; OLIVEIRA, S. L.; ATAÍDE, T. R.; TRINDADE, E. M. T. F. O papel da dieta cetogênica no estresse oxidativo presente na epilepsia experimental. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, p. 1676-2649, n. 2, v.17, 2011.

GORMAN, J.M.; SULLIVAN, G. Noradrenergic approaches to antidepressant therapy. **J. Clin. Psychiatry.** v. 1, p. 13-6, 2000.

GRABOWSKA-GRZYB, A.; JEDRZEJCZAK, J.; NAGAŃSKA, E.; FISZER, U. Risk factors for depression in patients with epilepsy. **Epilepsy Behav.** v. 8, n. 2, p. 411-417, 2006.

GRAHAM, A. R.; JOHNSTON. Flavonoid nutraceuticals and ionotropic receptors for the inhibitory neurotransmitter GABA. **Neurochemistry International.** v. 89, p. 120- 125, 2015.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER P. L.; WISHNOK J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and (15N) nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, p. 131-138, v.126, 1982.

GRUNDMANN, O.; NAKAJIMA, J.; KAMATA, K.; SEO, S.; BUTTERWECK, V. Kaempferol from the leaves of *Apocynum venetum* possesses anxiolytic activities in the elevated plus maze test in mice. **Phytomedicine**, v.16, p.295-302, 2009.

GUARRERA, M. P. Traditional Phytotherapy in central Italia. **Fitoterapia**. v.76, n. 1, p. 1-25, 2005.

GUILHOTO, L. M. F. F. Revisão Terminológica e Conceitual para Organização de Crises e Epilepsias: Relato da Comissão da ILAE de Classificação e Terminologia, 2005-2009. Novos Paradigmas. **J Epilepsy Clin Neurophysiol**. v. 17, n. 3, p. 100-105, 2011.

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

HAMID, H.; KANNER, A. M. Should antidepressant drugs of the selective serotonin reuptake inhibitor family be tested as antiepileptic drugs? **Epilepsy Behav**. v. 26, p. 261-5, 2013.

HENNINGSSEN, K.; ANDREASEN, J. T.; BOUZINOVA, E. V.; JAYATISSA, M. N.; JENSEN, M. S.; REDROBE, J. P.; WIBORG, O. Cognitive deficits in the rat chronic mild stress model for depression: Relation to anhedonic-like responses. **Behav. Brain Res.**, v.198, n.1, p.136-141, 2009.

HESDORFFER, D. C.; ISHIHARA, L.; MYNEPALLI, L.; WEBB, D. J.; WEIL, J.; HAUSER, W.A. Epilepsy, suicidality, and psychiatric disorders: a bidirectional association. **Ann Neurol**. v. 72, p. 184-91, 2012.

HEYDENDAEL, W.; JACOBSON, L. Glucocorticoid status affects antidepressant regulation of locus coeruleus tyrosine hydroxylase and dorsal raphe tryptophan hydroxylase gene expression. **Brain Res**. v. 1288, p. 69-78, 2009.

HIEBLE, J. P. Subclassification and nomenclature of alpha- and beta-adrenoceptors. **Curr. Top. Med. Chem**. v. 7, p. 129-134, 2007.

HOFFMAN, B. F.; WACHSMUTH, R. Maptrotiline and seizures. **J Clin Psychiatry**. v. 43, p.117-8, 1982.

HONCHAR, M. P.; VOGLER, G. P.; GISH, B. G.; SHERMAN, W. R. Evidence that phosphoinositide metabolism in rat cerebral cortex stimulated by pilocarpine, physostigmine, and pargyline *in vivo* is not changed by chronic lithium treatment. **Journal Neurochemical**, v.55, p. 172-180, 1990.

HOVATTA, I.; JUHILA, J.; DONNER, J. Oxidative stress in anxiety and comorbid disorders. **Neurosci Res** v. 68, n.4, p. 261-275, 2010.

International League Against Epilepsy. Quick Overview of the 2010 proposal for organization of the epilepsies. 2011. Disponível em: <http://www.ilae-epilepsy.org/Visitors/Centre/ctf/documents/ILAEHandoutV10_000.pdf>. Acesso em 05 de julho de 2016.

IUPAC, flavonoids (isoflavonoids and neoflavonoids). Disponível em: <http://goldbook.iupac.org/PDF/F02424.pdf>, 2015.

JABBARI, B.; BRYA, G. E.; MARSH, E. E.; GUNDERSON, C. H. Incidence of seizures with tricyclic and tetracyclic antidepressants. **Arch Neurol**. v. 42, n.5, p. 480–481, 1985.

JACOBY, A.; BAKER, G. A.; STEEN, N.; POTTS, P.; CHADWICK, D. W. The clinical course of epilepsy and its psychosocial correlates: findings from a U.K. community study. **Epilepsia**. v. 37, p. 148–61, 1996.

JAGER, A. K.; SAABY, L. Flavonoids and the CNS. **Molecules**. v. 16, p. 1471–1485, 2011.

JAIN, P. K.; KHARYA, M. D.; GAJBHIYE, A.; SARA, U.V.S.; SHARMA, V. K. Flavonoids as nutraceuticals. A review. **Herba Pol**. v. 56, p. 105–117, 2010.

JOBE, P. C.; DAILEY, J. W.; WERNICKE, J. F. A noradrenergic and serotonergic hypothesis of the linkage between epilepsy and affective disorders. **Crit Rev Neurobiol**. v. 13, n. 4, p. 317–56, 1999.

JOHNSTON, G.A. R. Flavonoid nutraceuticals and ionotropic receptors for the inhibitory neurotransmitter GABA. **Neurochemistry International** . v. 89, p. 120-125, 2015.

JOHANSSON, C.; AHLENIUS, S. Evidence for the involvement of 5-HT1A receptors in the mediation of exploratory locomotor activity in the rat. **J. Psychopharmacol.**, v. 3, p. 32-35; 1989.

JORM, C. M.; STAMFORD, J. A. Actions of the hypnotic anaesthetic, dexmedetomidine, on noradrenaline release and cell firing in rat locus coeruleus slices. **Br. J. Anaesth**. v.71, p. 447-449, 1993.

JUDGE, B. S.; RENTMEESTER, L. L. Antidepressant overdose-induced seizures. **Neurol Clin**. v. 29, p. 565–80, 2011.

KALININ, V. V.; ZEMLYANAYA, A. A.; KRYLOV, O. E.; ZHELEZNOVA, E. V. Handedness, alexithymia, and focus laterality as risk factors for psychiatric comorbidity in patients with epilepsy. **Epilepsy Behav** . v.17, n. 3, p. 389–94, 2010.

KANDRATAVICIUS, L.; RUGGIERO, R. N.; HALLAK, J. E.; GARCIA-CAIRASCO, N.; LEITE, J. P. Fisiopatologia dos transtornos de humor na epilepsia do lobo temporal. **Official Journal of the Brazilian Psychiatric Association**. v. 34, 2012.

KANNER, A. M. Depression and epilepsy: A bidirectional relation? **Epilepsia**. v. 52, 21-27, 2011.

KANNER, A. M. Management of psychiatric and neurological comorbidities in epilepsy. **Nature Reviews | Neurology**. v. 12, 2016

KANNER, A. M.; BARRY, J. J.; GILLIAM F, HERMANN, B.; MEADOR, K. J. Anxiety disorders, subsyndromic depressive episodes, and major depressive episodes: do they differ on their impact on the quality of life of patients with epilepsy? **Epilepsia**. v. 51, n. 7, p. 1152–8, 2010.

KAROLEWICZ, B.; PAUL, I. A. Group housing of mice increases immobility and antidepressant sensitivity in the forced swim and tail suspension tests. **Eur J Pharmacol** v. 415 n.2, p. 197-201, 2001

KAUFMAN, P. B.; CSEKE, L. J.; WARBER, S.; DUKE, J. A.; BRIELMANN, H. L. Natural products from plants. **Boca Raton: CRC Press**. 1999.

KONDZIELLA, D.; ALVESTAD, S.; VAALER, A.; SONNEWALD, U. Which clinical and experimental data link temporal lobe epilepsy with depression? **J Neurochem**. v. 103, n. 6, p. 2136-52, 2007.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**, v. 455, n. 7215, p. 894-902, 2008

KUMLIEN, E.; LUNDBERG, P. O. Seizure risk associated with neuroactive drugs: data from the WHO adverse reactions database. **Seizure**. v. 19, n. 2, p. 69–73, 2010.

KUNIEDA, T.; ZUSCICK, M. J.; BOONGIRD, A.; PEREZ, D. M.; LUDERS, H. O.; NAJM, I. M. Systemic overexpression of the $\alpha 1B$ adrenergic receptor in mice: an animal model of epilepsy. **Epilepsia**. v. 43, n.11, p. 1324-1329, 2002.

L'HEUREUX, R.; DENNIS, T.; CURET, O.; SCATTON, B. Measurement of endogenous noradrenaline release in the rat cerebral cortex in vivo by transcortical dialysis: effects of drugs affecting noradrenergic transmission. **J. Neurochem.**, v.46, p. 1794-1801, 1986.

LALL, N.; KISHORE, N. J. Are plants used for skin care in South Africa fully explored? **Ethnopharmacology**, v.153, n.1, p.61-84, 2014.

LANDMARK, C. J.; HENNING, O.; JOHANNESSEN, S. I. Proconvulsant effects of antidepressants—What is the current evidence? **Epilepsy & Behavior** xxx (2016) xxx–xxx

LANFUMEY, L.; MONGEAU, R.; COHEN-SALMON, C.; HAMON, M. Corticosteroid-serotonin interactions in the neurobiological mechanisms of stress-related disorders. **Neurosci Biobehav Rev**. v. 32, p.1174–84, 2008.

LAPIN, I. P. Only Controls: Effect of Handling, Sham Injection, and Intraperitoneal Injection of Saline on Behavior of mice in an Elevated Plus-Maze. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, v.34, p.73-77, 1995.

LATIF, R. Flavonoids as novel neuroprotective nutraceuticals. **Saudi J. Health Sci**. v. 4, p. 1–4, 2015.

- LEE, S. K. Old versus New: Why Do We Need New Antiepileptic Drugs? **J Epilepsy Res.** v. 4, n.2, p.29-44, 2014.
- LEITE, J.P.; BORTOLOTTI, Z.A.; CAVALHEIRO, E.A. Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 14, p. 511-517, 1990.
- LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 29, p. 180-185, 1987.
- LITOVITZ, T. L.; TROUTMANWG. Amoxapine overdose. Seizures and fatalities. **Jama.** v. 250, n. 8, p. 1069-71, 1983.
- LÓPEZ, J.; GONZÁLEZ, M. E.; LORIGADOS, L.; MORALES, L.; RIVERÓN, G.; BAUZÁ, J. Y. Oxidative stress markers in surgically treated patients with refractory epilepsy. **Clinical Biochemistry**, n. 40, p. 292-298, 2007.
- MacFARLAND, C. G.; REEDER, W. G. Cleaning symbiosis involving Galapagos tortoises and two species of Darwin's finches. **Zeitschrift fur Tierpsychol.**, v. 34, p. 464-483, 1974.
- MAKINO, S.; SMITH, M. A.; GOLD, P. W. Regulatory role of glucocorticoids and glucocorticoid receptor mRNA levels on tyrosine hydroxylase gene expression in the locus coeruleus during repeated immobilization stress. **Brain Res.** v. 943, p. 216-223, 2002.
- MARAIS, J. P. J; DEAVOURS, B.; DIXON, R. A.; FERREIRA, D.: The Stereochemistry of Flavonoids In: Grotewold; The Science of Flavonoids, Springer Science + Business Media, Inc.; p.1-46, 2006.
- MARCHETTI, R. L. Transtornos mentais associados à epilepsia. **J. Rev. Psiq. Clín.** v.32, n.3, p.170-182, 2005.
- MARES, P.; KUBOVÁ, H. What is the role of neurotransmitter systems in cortical seizures? **Physiol Res.**, v.57, p. 111-120, 2008.
- MARTINEZ, D. M.; BARCELLOS, A.; CASARIL, A. M.; SAVEGNAGO. L.; LERNARDÃO, E. J. Antidepressant-like activity of dehydrozingerone: involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 127, p. 111-7, 2014.
- MASUDA, Y.; OHNUMA, S.; SUGIYAMA, T. Alpha 2-adrenoceptor activity induces the antidepressant-like glycolipid in mouse forced swimming. **Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.**, v. 23, p. 19-21, 2001.
- MCCAGH, J.; FISK, J. E.; BAKER, G. A. Epilepsy, psychosocial and cognitive functioning. **Epilepsy Res.** v. 86, n. 1, p. 1-14, 2009.
- MENSAH, S. A.; BEAVIS, J. M.; THAPAR, A. K.; KERR, M. P. A community study of the presence of anxiety disorder in people with epilepsy. **Epilepsy Behav.** v. 11, p. 118-24, 2007.

MEYER, J.H.; GOUDING, V.S.; WILSON, A.A.; HUSSEY, D.; CHRISTENSEN, B.K.; HOULE, S. - Bupropion Occupancy of the Dopamine Transporter is Low During Clinical Treatment. **Psychopharmacology**, v. 163, n.1, p.102-105, 2002.

MILLER, A. H.; MELETIC, V.; RAISON, C. L. Inflammation and Its Discontents: The Role of Cytokines in the Pathophysiology of Major Depression. **Biological Psychiatry**, v. 65, n.9, p. 732–741, 2009.

MOODY, T. W.; MERALI, Z.; CRAWLEY, J. N. The effects of anxiolytics and other agents on rat grooming behavior. In: COLBERT, D. L.; GISPEN, W. H. (ed.). Neural mechanisms and biological significance of grooming behavior. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 525, p. 281-290, 1988.

MONTGOMERY, K. C. The relationship between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour. **J. Comp. Physiol. Psychol.**, v. 48, p. 254-260, 1958.

MOTAWI, T. K.; TELEB, Z. A.; EL-BOGHADADY, N. A.; IBRAHIM, S. A. Efeito da sinvastatina e naringenina a co-administração de fragmentação do DNA de fígado de rato e da atividade do citocromo P450: in vivo e in vitro e em estudo. **J. Physiol Biochem**. v. 70, n. 1, p. 225-37, 2014.

MUSCHIETTI, L.V.; MARTINO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e moderna farmacognosia**. 4. ed. Itajaí –SC: Editora UNIVALI, 2014.

MUTHAIAH, V. P.; VENKITASAMY, L.; MICHAEL, F. M.; CHANDRASEKAR, K.; VENKATACHALAM, S. Neuroprotective role of naringenin on carbaryl induced neurotoxicity in mouse neuroblastoma cells. **J Pharmacol Pharmacother**, n. 4, p. 192–7, 2013.

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

NEJM M, B.; HAIDAR, A. A.; MARQUES, M. J.; HIRATA, A. E.; NOGUEIRA, F. N.; CAVALHEIRO, E. A.; SCORZA, F. A.; CYSNEIROS, R. M. Fish oil provides protection against the oxidative stress in pilocarpine model of epilepsy. **Metabolic Brain Disease**, p.903-909, 2015

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v.75, n.3, p.311–335, 2010.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002, **J. Nat. Prod.** v. 66, p. 1022-1037, 2003.

NUNES, S. O. V.; PRADO, E.; BARBORA, D. S.; MELO, L. P.; MOYLAN, S.; DODD, S.; BERK, M. The shared role of oxidative stress and inflammation in major depressive disorder and nicotine dependence. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 37, n. 8, p. 1336–1345, 2013.

OLIVEIRA, B. L. M. B.; MARIANE SANTOS PARREIRAS, M. S.; DORETTO, M. C. Epilepsia e Depressão: Falta diálogo entre a Neurologia e a Psiquiatria? **J Epilepsy Clin Neurophysiol**, v. 13, n.3, p. 109-113, 2007.

OLSEN, H. T.; STAFFORD, G. I.; VAN STADEN, J.; CHRISTENSEN, S. B.; JÄGER, A. K. Isolation of the MAO inhibitor naringenin from *Mentha aquatica* L. **J Ethnopharmacol**, v. 117, n.3, p. 500–2, 2008.

ORDWAY, G.A.; SCHENK, J.; STOCKMEIER, C.A.; MAY, W.; KLIMEK, V. Elevated agonist binding to alpha2-adrenoceptors in the locus coeruleus in major depression. **Biol. Psychiatry**. v. 53, p. 315-323, 2003.

ORREGO-LAGARÓN, N.; MARTÍNEZ-HUÉLAMO, M.; VALLVERDÚ-QUERALT, A.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M.; ESCRIBANO-FERRER, E. High gastrointestinal permeability and local metabolism of naringenin: influence of antibiotic treatment on absorption and metabolism, **Br. J. Nutr.** v. 114 p. 169–180, 2015.

ORREGO-LAGARÓN, N.; VALLVERDÚ-QUERALT, A.; MARTÍNEZ-HUÉLAMO, M.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M.; ESCRIBANO-FERRER, E. Metabolic profile of naringenin in the stomach and colon using liquid chromatography/electrospray ionization linear ion trap quadrupole-Orbitrap-mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS) and LC-ESI-MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 120, p. 38–45, 2016.

PATEL, K.; SINGH, G. K.; PATEL D. K. A review on pharmacological and analytical aspects of naringenin. **Chin J Integr Med.**, 2014.

PALANZA, P. Animal models of anxiety and depression: how are females different? **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.25, p.219-233, 2001.

PELLOW, S.; *et al.* Validation of open:closed arm entries in an elevated plus maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, p. 149–167, 1985.

PELLOW, S.; FILE, S. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 24, p. 525, 1986.

PETERSON, S. L.; TRZECIAKOWSKI, J. P. S. T.; MARY, J. S. Chronic but not acute treatment with antidepressants enhances the electroconvulsive seizure response in rats. **Neuropharmacology**. v. 24, n. 10, p. 941–6, 1985.

PINEDA, E.; SHIN, D.; SANKAR, R.; MAZARATI, A. M. Comorbidity between epilepsy and depression: experimental evidence for the involvement of serotonergic, glucocorticoid, and neuroinflammatory mechanisms. **Epilepsia**. v. 51, p. 110-14. 2010.

PIOTROWSKA, A.; SIWEK, A.; WOLAK, M.; POCHWAT, B.; SZEWCZYK, B.; OPOKA W.; POLESZAK, E.; NOWAK, G. Involvement of the monoaminergic system in the antidepressant-like activity of chromium chloride in the forced swim test. **J Physiol Pharmacol**, v. 64, p.493–8, 2013.

PISANI, F.; OTERI, G.; COSTA, C. D. I.; RAIMONDO, G. D. I.; PERRI, R. Effects of psychotropic drugs on seizure threshold. **Drug Saf.** v. 25, p. 91–110, 2002.

PIZZANELLI, C.; LAZZERI, G.; FULCERI, F.; GIORGI, F. S.; PASQUALI, L.; CIFELLI, G.; MURRI, L.; FORNAI, F. Lack of $\alpha 1b$ -adrenergic receptor protects against epileptic seizures. **Epilepsia.** v. 50, p. 59–64, 2009

POMPILI, M.; GIRARDI, P.; RUBERTO, A.; TATARELLI, R. Suicide in the epilepsies: a metaanalytic investigation of 29 cohorts. **Epilepsy Behav.** v. 7, n. 2, p. 305–10, 2005.

PORTER, R. J.; GALLAGHER, P.; WATSON, S.; YOUNG, A. H. Corticosteroid-serotonin interactions in depression: a review of the human evidence. **Psychopharmacology** (Berl). v.173, p. 1-17, 2004.

PRESKORN, S. H.; FAST, G. A. Tricyclic antidepressant-induced seizures and plasma drug concentration. **J Clin Psychiatry.** v. 53, n. 5, p. 160–2, 1992.

PUPO, A. S.; MINNEMAN, K. P. Adrenergic pharmacology: focus on the central nervous system. **CNS Spectr,** v. 6, p. 656-662, 2001.

RABBANI, M.; SAJJADI, S. E.; MOHAMMADI, A. Evaluation of the anxiolytic effect *Nepeta persica* Boiss. In mice. **eCAM,** v.2, p.181-186, 2008.

RAMOS, E. H. S.; DUARTE, H. S. D.; Jiménez, G. C. Perfil toxicológico das fases II e III do exsudato extraído do fruto de *Mangifera indica* L. **Revista Cubana de Plantas Medicinales.** v. 20, n.1, p. 75-87, 2015.

RAUPP, I. M. et al. Anxiolytic-like effect of chronic treatment with *Erythrina velutina* extract in the elevated plus-maze test. **J. Ehnopharmacol.,** v.118, p.295-299, 2008.

RAVINDRAN, A.V.; LAM, R. W.; FILTEAU, M. J.; LESPÉRANCE, F.; KENNEDY, S. H.; PARIKH, S. V.; ET AL. Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT). Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) clinical guidelines for the management of major depressive disorder in adults. V. Complementary and alternative medicine treatments. **J Affect Disord.** v.117, p. S54–64, 2009.

RAZA, S. S.; KHAN, M. M.; AHMAD, A.; ASHAFAQ, M.; ISLAM, F.; WAGNER, A. P. Neuroprotective effect of naringenin is mediated through suppression of NF- κ B signaling pathway in experimental stroke. **Neuroscience,** v. 230, p. 157–71, 2013.

RENDEIRO, C.; RHODES, J. S.; SPENCER, J. P. E. The mechanisms of action of flavonoids in the brain: Direct versus indirect effects. **Neurochemistry International** . v. 89, p. 126-139, 2015.

RENDEIRO, C.; RHODES, J. S.; SPENCER, J. P. E. The mechanisms of action of flavonoids in the brain: Direct versus indirect effects. **Neurochemistry International.** v. 89, p. 126-139, 2015.

RÉUS, G. Z.; FRIES, G. R.; STERTZ, L.; BADAWY, M.; PASSOS, I. C.; BARICHELLO, T.; KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J. The role of inflammation and microglial activation in the pathophysiology of psychiatric disorders. **Neuroscience**, v. 300, n. 6, p. 141–154, 2015.

REX, A.; STEPHENS, D. N.; FINK, H. “Anxiolytic” action of diazepam and abecarnil in a modified open field test. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v. 53, p. 1005-1012, 1996.

RIAD, M.; GARCIA, S.; WATKINS, K.C.; ET AL. Somatodendritic localization of 5-HT1A and preterminal axonal localization of 5-HT1B serotonin receptors in adult rat brain. **J Comp Neurol**. v .417, n. 2, p. 181-94, 2000.

RIBEIRO, C. A. S. **Investigação do envolvimento de subtipos de adrenoceptores $\alpha 1$ no efeito anti-imobilidade da imipramina no teste de suspensão pela cauda**. 2015. 64 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo, 2015.

RIBEIRO, A. C. S.; PUPO, A.S. Involvement of $\alpha 1B$ -adrenoceptors in the anti-immobility effect of imipramine in the tail suspension test. **European Journal of Pharmacology**, v. 750, p. 39–42, 2015.

RIBOT, R.; OUYANG, B.; KANNER, A. M. Do antidepressants have an impact in seizure frequency and psychiatric symptoms in patients with epilepsy? **Epilepsy Curr**. v. 13, p. 489, 2012.

ROBERT, J.; WILLIAMS, JEREMY, P. E.; SPENCER. Flavonoids, cognition, and dementia: Actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for Alzheimer disease. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 52, p. 35–45, 2012.

ROBINSON, R. T.; DRAFTS, B. C.; FISHER, J. L. Fluoxetine increases GABA(A) receptor activity through a novel modulatory site. **J Pharmacol Exp Ther**. v. 304, n. 3, p. 978-84, 2003.

RODRIGUES, L. de S.; MARTINS, L.V.; BANTIM, I. C.F.; MEIRELES, M. S de D.; FERREIRA, P. M. P.; PERON, A.P. Flavonoides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico Flavonoids: Chemical composition, medical actions and toxicity. **Acta Toxicol. Argent**. v. 23, n.1, p. 36-43, 2015.

SALGADO, H.; KOHR, G.; TREVINO, M. Noradrenergic “Tone” determines dichotomus controlo f cortical spike timing-dependent plasticity. **Scientific reports**. v. 417, n. 2, p, 1-7, 2012.

SANACORA, G.; MASON, G. F.; ROTHMAN, D. L.; KRYSTAL, J. H. Increased occipital cortex GABA concentrations in depressed patients after therapy with selective serotonin reuptake inhibitors. **Am J Psychiatry**. v.159, n.4, p. 663-665, 2002.

SANACORA, G. Cortical inhibition, gamma-aminobutyric acid, and major depression: there is plenty of smoke but is there fire? **Biol Psychiatry**. v. 67, n. 5, p. 397-8, 2010.

SANTELLO, M.; VOLTERRA, A. TNF α in synaptic function: switching gears. **Trends Neurosci**, v.35, n.10, p. 638–647, 2012.

SARRIS, J.; KAVANAGH, D. J. Kava and St. John's Wort: current evidence for use in mood and anxiety disorders. **J Altern Complement Med.** v. 15, p. 827–36, 2009.

SCHILDKRAUT, J. J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. **Am J Psychiatry**, v. 122, n. 5, p. 509-22, 1965.

SCHILDKRAUT, J. J. Biogenic amines and affective disorders. **Annu Rev Med**, v. 25, n. 0, p. 333-48, 1974.

SHUKLA, S.; GUPTA, S., Apigenin: a promising molecule for cancer prevention, **Pharm. Res**, 27, 962, 2010.

SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. **Angewandte Chemie**, v. 25, p. 1058-1071, 1986.

SIES, H.; STAHL, W.; SEVANIAN, A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. **J Nutr.** 135 (5), p. 969-72, 2006 SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. **Angewandte Chemie**, v. 25, p. 1058-1071, 1986.

SILVERS, K. M.; WOOLLEY, C. C.; HEDDERLEY, D. Dietary supplement use in people being treated for depression. **Asia Pac J Clin Nutr.** v. 15, p. 30–4, 2006.

SONAVANE, G. S.; et al. Anxiogenic activity of *Myristica fragrans* seeds. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.71, p.239-244, 2002.

STAHL, S. M. Transtornos ansiosos e ansiolíticos. In psicofarmacologia: Bases Neuroquímicas e aplicações práticas. 3ª. Ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan.** v. 14, p. 481-519, 2010.

STERU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P. Tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v. 85, p. 367-370, 1985.

STOCKMEIER, C. A.; SHAPIRO, L. A.; DILLEY, G. E.; KOLLI, T. N.; FRIEDMAN, L.; RAJKOWSKA, G. Increase in serotonin-1A autoreceptors in the midbrain of suicide victims with major depression-postmortem evidence for decreased serotonin activity. **J Neurosci.** v. 18, n. 18, p. 7394-401, 1998.

STONE, E. A.; ZHANG, Y.; ROSENGARTEN, H.; YERETSIAN, J.; QUARTERMAIN, D. Brain alpha 1-adrenergic neurotransmission is necessary for behavioral activation to environmental change in mice. **Neuroscience**, v. 94, n. 4, p. 1245-52, 1999.

STONE, E. A.; QUARTERMAIN, D.; LIN, Y.; LEHMANN, M. L. Central alpha1-adrenergic system in behavioral activity and depression. **Biochemical pharmacology**, v. 73, n. 8, p. 1063-75, 2007.

STONE, E. A.; LIN, Y.; ITTEERA, A.; QUARTERMAIN, D. Pharmacological evidence for the role of central alpha 1B-adrenoceptors in the motor activity and spontaneous movement of mice. **Neuropharmacology**, v. 40, n. 2, p. 254-61, 2001.

STONE, E. A.; COTECCHIA, S.; LIN, Y.; QUARTERMAIN, D. Role of brain alpha 1B-adrenoceptors in modafinil-induced behavioral activity. **Synapse**, v. 46, n. 4, p. 269-70, 2002.

- STONE, E. A.; LIN, Y.; ROSENGARTEN, H.; KRAMER, H.K.; QUARTERMAIN, D. Emerging evidence for a central epinephrine-innervated alpha 1-adrenergic system that regulates behavioral activation and is impaired in depression. **Neuropsychopharmacology**. v. 28, p. 1387-1399, 2003.
- STONE, E. A.; QUARTERMAIN, D. Alpha-1-noradrenergic neurotransmission, corticosterone, and behavioral depression. **Biological psychiatry**. v. 46, n. 9, p. 1287-300, 1999.
- SWANSON, C. J.; HEATH, S.; STRATFORD, T. R.; KELLEY, A. E. Differential behavioral responses to dopaminergic stimulation of nucleus accumbens subregions in the rat. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 58, p. 933-945, 1997.
- SZABO, S.T.; BLIER, P. Effect of the selective noradrenergic reuptake inhibitor reboxetine on the firing activity of noradrenaline and serotonin neurons. **Eur. J. Neurosci**. v.13, p. 2077-2087, 2001a.
- SZABO, S. T.; BLIER, P. Functional and pharmacological characterization of the modulatory role of serotonin on the firing activity of locus coeruleus norepinephrine neurons. **Brain Res**. v. 922, p. 9-20, 2001b.
- TABASSUM, N.; HAMDANI, M. Plants used to treat skin diseases. **Pharmacognosy Reviews**, v.8, n.15, p.52-60, 2014.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 4. ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc., 2006.
- TAPAS, D. M.; SAKARKAR, R. B.; KAKDE. Flavonoids as nutraceuticals: a review. **Trop. J. Pharm. Res.** v. 7, p. 1089–1099, 2008.
- TIMMONS, S. D.; GEISERT, E.; STEWART, A. E.; LORENZON, N. M.; FOEHRING, R. C. Alpha 2-adrenergic receptor-mediated modulation of calcium current in neocortical pyramidalneurons. **Brain Res**. v. 1014, p. 184 –196, 2004.
- TOMALIK-SCHARTE, D.; LAZAR, A.; FUHR, U.; KIRCHHEINER, J. The clinical role of genetic polymorphisms in drug-metabolizing enzymes. **Pharmacogenomics J**. v. 8, n. 1, p. 4–15, 2008.
- TRABER, J.; SPENCER, D. J.; GLASER, T.; GISPEN, W. H. 1988 apud SERAFIM, A. P.; FELÍCIO, L. F. Dopaminergic modulation of grooming behavior in virgin and pregnant rats. **Braz. J. Med. Biol.Res.**, v. 34, p. 1465-1470, 2001.
- TURNER, D. M. Natural product source material use in the pharmaceutical industry: the Glaxo experience. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 51, p. 39-44, 1996.
- TURSKI, L.; IKONOMIDOU, C.; TURSKI, W. A.; BORTOLOTTA, Z. A.; CAVALHEIRO, E. A. Review: cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy, **Synapse**, v. 3, p. 154-71, 1989.

TURSKI, W. A.; CAVALHEIRO, E. A.; COIMBRA, C.; BERZAGHI, M. P.; IKONOMIDOU-TURSKI, C.I.; TURSKI, L. Only certain antiepileptic drugs prevent seizures induced by pilocarpine. **Brain Res. Reviews**, v.12, p. 281-305, 1987.

TURSKI, W. A.; CAVALHEIRO, E. A.; SCHWARZ, M.; CZUCZWAR, S. J. Z. KLEINRONK, Z.; TURSKI, L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study, **Behav. Brain Res.**, v.9, n.3, p.315–335, 1983

VAN DER KOOIJ, M. A.; GLENNON, J. C. Animal models concerning the role of dopamine in attention-deficit hyperactivity disorder. **Neurosci Biobehav Rev.**, v. 31, n. 4, p. 597-618, 2007

VARANDA, E. A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 27, n. 1, p. 1-7, 2006.

VERROTTI, A.; CARROZZINO, D.; MILIONI, M.; MINNA, M.; FULCHERI, M. Epilepsy and its main psychiatric comorbidities in adults and children. **Journal of the Neurological Sciences**. v. 343, p. 23–29, 2014.

VEZZANI, A.; FRIEDMAN, A.; DINGLEDINE, R. J. The role of inflammation in epileptogenesis. **Neuropharmacology**, v.69, p.16-24, 2013.

VIZZOTO, M.; KROLOW, A. C.; WEBER, G. E. B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. **Pelotas: Embrapa Clima Temperado**. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 316). P. 16, 2010.

WEINSHENKER, D.; SZOT, P. The role of catecholamines in seizure susceptibility: new results using genetically engineered mice. **Pharmacol. Therap.** v. 94, p. 213-233, 2002.

WHITE, N.; LITOVITZ, T.; CLANCY, C. Suicidal antidepressant overdoses: a comparative analysis by antidepressant type. **J Med Toxicol** . v. 4, n. 4, p. 238–50, 2008.

WILLIAMS, R. J.; SPENCER, J. P. E. Flavonoids, cognition, and dementia: Actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for Alzheimer disease. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 52, p. 35–45, 2012.

YACUBIAN, E. M. T. Proposta de Classificação das Crises e Síndromes Epilépticas. Correlação Videoeletrencefalográfica. **Rev. Neurociências** . v. 10, n. 2, p. 49-65, 2002.

YAO, C. Y.; WANG, J.; DONG, D.; QIAN, F. G.; XIE J.; PAN, S. L. Laetispicine, an amide alkaloid from *Piper laetispicum*, presents antidepressant and antinociceptive effects in mice. **Phytomedicine**, v. 16, p.823-829, 2009.

YI, L.; LI, C.; ZHAN, X.; CUI, C.; XIAO, F.; ZHOU, L.; XIE, Y. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the flavonoid naringenin in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**. v.34, p. 1223–1228, 2010.

YI, L.; LI, J.; LI, H.; SU, D.; QUAN, X.; HE, X.; WANG, X. Antidepressant-like behavioral, neurochemical and neuroendocrine effects of naringenin in the mouse repeated tail suspension test. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**. v. 39, p. 175–181, 2012.

YI, L.; LIU, B.; LI, J.; LUO, L.; LIU, L.; GENG, D.; TANG, Y.; XIA, Y.; WU, D. BDNF signaling is necessary for the antidepressant-like effect of naringenin. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**. v. 48, p. 135–141, 2014.

ZAKI, H. F.; ABD-ELFATTAH, M. A.; ATTIA, A. S. Naringenin protects against scopolamine-induced dementia in rats. **Bulletin of Faculty of Pharmacy**. v. 52, p. 15–25, 2014.

ZHONG, H.; MINNEMAN, K. P. Alpha1-adrenoceptor subtypes. **European journal of pharmacology**. v. 375, n. 1-3, p. 261-76, 1999.

ZOBEL, A.; WELLMER, J.; SCHULZE-RAUSCHENBACH, S.; ET AL. Impairment of inhibitory control of the hypothalamic pituitary adrenocortical system in epilepsy. **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci**. v. 254, n. 5, p. 303-11, 2004.

ZUSCICK, M. J.; SANDS, S.; ROSS, S. A.; WAUGH, D. J. J.; GAIVIN, R. J.; MORILAK, D.; PEREZ, D. M. Overexpression of the $\alpha 1B$ adrenergic receptor causes apoptotic neurodegeneration: multiple system atrophy. **Nat. Med**. v.6, p. 1388-1394, 2000.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL (CEPA)

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM ANIMAIS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - UNIFOR/CE
APRECIAÇÃO ÉTICA SOBRE PROJETO DE PESQUISA OU AULA PRÁTICA

PESQUISADOR RESPONSÁVEL/TUTOR: Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar

PROJETO:	Pesquisa	x	Aula Prática	PARECER	
INFORMAÇÕES GERAIS					
1. TÍTULO DO PROJETO: ESTUDO DOS EFEITOS NEUROPROTETORES DO DIOSMIN EM MODELO DE CONVULSÃO INDUZIDA POR PILOCARPINA EM CAMUNDONGOS				ADEQUADO	x
I Comentários:				NÃO ADEQUADO	
2. RESPONSÁVEL E EQUIPE				ADEQUADO	x
2.1 EXPERIÊNCIA				NÃO ADEQUADO	
COMENTÁRIOS:				ADEQUADO	x
3. RESUMO				NÃO ADEQUADO	
J Comentários:				ADEQUADO	x
4. OBJETIVOS:				NÃO ADEQUADO	
I Comentários:				ADEQUADO	x
5. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA				ADEQUADO	x
COMENTÁRIOS:				NÃO ADEQUADO	
6. MODELO ANIMAL				ADEQUADO	x
COMENTÁRIOS:				NÃO ADEQUADO	
7. METODOLOGIA				ADEQUADO	x
7.1. AVALIAÇÃO DO MATERIAL TESTE E DO CONTROLE:			J Comentários:		
I. Animais envolvidos			ok	ADEQUADO	x
II. Grupos experimentais			ok		
III. Protocolos			ok		
V. Análise estatística			ok	NÃO ADEQUADO	
7.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL				ADEQUADO	x
COMENTÁRIOS: A PI SÓ SERÁ USADA JUSTO CASO O PORQUÊ NÃO AGRAVEM OS ANIMAIS.				NÃO ADEQUADO	
8. Grau de inovação				ADEQUADO	x
9. CUIDADOS COM ANIMAIS (ITENS 9.6 a 11)				NÃO ADEQUADO	
COMENTÁRIOS:				ADEQUADO	x
ITEM 10.2 MARCADO				NÃO ADEQUADO	
10. EUTANÁSIA				ADEQUADO	x
COMENTÁRIOS:				NÃO ADEQUADO	
11. DESTINO DO ANIMAL APÓS O EXPERIMENTO				ADEQUADO	x
12. RESUMO DO PROCEDIMENTO: ADEQUADO				NÃO ADEQUADO	
				ADEQUADO	x
				NÃO ADEQUADO	
13. ORÇAMENTO PATROCÍNIO (VIABILIDADE ECONÔMICA):				ADEQUADO	x
				NÃO ADEQUADO	
14. CRONOGRAMA DE REALIZAÇÃO DO PROJETO:				ADEQUADO	x
				NÃO ADEQUADO	
15. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:				ADEQUADO	x
				NÃO ADEQUADO	
16. APRESENTAÇÃO DA DOCUMENTAÇÃO EXIGIDA:				ADEQUADO	x
I. Declaração de responsabilidade do pesquisador			J Submissão		
II. Protocolo de licenciamento do projeto junto à CI/PA			ok		
III. Carta de encaminhamento			ok		
IV. Certificado Lattes do pesquisador responsável			ok	NÃO ADEQUADO	
V. Projeto de Pesquisa ou de Aula Prática			ok		
17. DEMANDAS, E JUSTIFICOU OS QUESTIONAMENTOS	GERAIS:	A	PESQUISADORA:	ATENDEU	A
				ADEQUADO	x
				NÃO ADEQUADO	
PARECER FINAL: SIMILAR APROVAÇÃO.					

Fortaleza, 10 de novembro de 2015.