



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

**ELAINE CRISTINA PEREIRA LUCETTI**

**EFEITOS CENTRAIS DA CUMARINA (1,2-BENZOPIRONA): ESTUDO  
COMPORTAMENTAL E NEUROQUÍMICO EM CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E  
HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS**

**FORTALEZA-CE  
2010**

**ELAINE CRISTINA PEREIRA LUCETTI**

**EFEITOS CENTRAIS DA CUMARINA (1,2-BENZOPIRONA): ESTUDO  
COMPORTAMENTAL E NEUROQUÍMICO EM CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E  
HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

Orientador (a):  
Prof<sup>ª</sup>. Dra. Silvânia Maria Mendes Vasconcelos

**FORTALEZA – CE  
2010**

L968e Lucetti, Elaine Cristina Pereira

Efeitos centrais da cumarina (1,2-benzopirona): estudo comportamental e neuroquímico em córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos/ Elaine Cristina Pereira Lucetti. – Fortaleza, 2010.

88 f. : il.

Orientador (a): Prof<sup>ª</sup>. Dra. Silvânia Maria Mendes Vasconcelos  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará.  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Fortaleza, Ceará.

1. Cumarínicos. 2. Aminoácidos. 3. Sistema Nervoso Central I.  
Vasconcelos, Silvânia Maria Mendes (orient.). II. Título.

CDD:615.78

**ELAINE CRISTINA PEREIRA LUCETTI**

**EFEITOS CENTRAIS DA CUMARINA (1,2-BENZOPIRONA): ESTUDO  
COMPORTAMENTAL E NEUROQUÍMICO EM CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E  
HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em: 30/07/2010

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Silvânia Maria Mendes Vasconcelos (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal (Co-Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Ana Maria Sampaio Assreuy  
Universidade Estadual do Ceará - UECE

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Danielle Silveira Macêdo  
Universidade Federal do Ceará - UFC

*À Deus, por toda a força e perseverança e por ter colocado na minha vida pessoas tão importantes que estão sempre presentes nos momentos mais difíceis.*

*Aos meus pais, José Eurico Pereira e Maria Ozana S. Pereira, por terem investido na minha vida em todos os aspectos.*

*Aos meus irmãos, Mônica e Cláudio Henrique, pelos momentos de descontração e apoio.*

*Em especial, o amor da minha vida, Daniel Lucetti, que sempre esteve ao meu lado me incentivando e me fazendo acreditar no meu potencial e na realização dos meus sonhos.*

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. **Silvânia Maria Mendes Vasconcelos** pela amizade, paciência, ensinamentos, confiança, conselhos e, principalmente, pela enorme dedicação na orientação deste trabalho.

À Profa. Dra. **Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal**, que gentilmente nos cedeu a substância isolada, pela colaboração fundamental neste trabalho e pela co-orientação.

À Profa. Dra. **Glauce Socorro de Barros Viana**, pessoa a quem tenho admiração e respeito por ser uma grande pesquisadora, agradeço pelo tempo dedicado para a correção do meu trabalho submetido para publicação.

À Profa. Dra. **Danielle Silveira Macedo**, pesquisadora do Laboratório de Neurofarmacologia, por estar sempre presente e solícita, ajudando de maneira essencial na publicação do artigo referente a esta dissertação, e por ter aceito o convite para participar desta banca examinadora.

À Profa. Dra. **Francisca Cléa Florenço de Sousa**, pesquisadora do Laboratório de Neurofarmacologia, pela disponibilidade em deixar o ambiente de pesquisa organizado, contribuindo assim para a realização deste e dos demais trabalhos.

À professora, **Ana Maria Sampaio Assreuy**, por ter gentilmente aceito o convite para participar da Banca Examinadora desta dissertação.

Ao meu esposo e colega de laboratório, **Daniel Luna Lucetti**, por todo o apoio desde o primeiro dia, quando eu não sabia nem manusear os animais, até a confecção desta dissertação. Por toda paciência e dedicação exclusiva nos momentos mais estressantes e, principalmente, por me fazer ver o lado bom de tudo e me fazer a pessoa mais feliz do mundo.

À amiga e mestrande Ana Luiza de Aguiar Rocha Martin (**Aninha**), pela dedicação nos experimentos e companheirismo, e por diretamente ter contribuído para o êxito deste trabalho.

Aos amigos do laboratório de neurofarmacologia, **Valdécio, Eduardo, Sarah, Raquel, Rodrigo, Edna, Clayton, Márcia, Izabela, Samila, Taciana, Valmor**, pela amizade e cooperação.

Aos colegas que também fazem parte do laboratório de neurofarmacologia, **Edith, Emiliano, Nayrton, Carol Porto, Thiciane, Fernando**, enfim, todos que fazem parte desta grande família.

À técnica do Laboratório de Neurofarmacologia, **Vilani Rodrigues Bastos**, pela amizade, companhia e dedicação.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, em especial à **Aura Rhanes, Márcia, Chiquinho, Íris, Alana e Fernando**.

Aos meus familiares, familiares do meu esposo e amigos que sempre me deram sincero apoio e incentivo e, principalmente, por acreditaram na realização do meu trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que contribuíram de maneira direta ou indireta para a realização deste trabalho, o meu MUITO OBRIGADA!!!!!!!!!!

## RESUMO

**EFEITOS CENTRAIS DA CUMARINA (1,2-BENZOPIRONA): ESTUDO COMPORTAMENTAL E NEUROQUÍMICO EM CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS.** Elaine Cristina Pereira Lucetti. Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Silvânia Maria Mendes Vasconcelos. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-graduação em Farmacologia, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2010.

A cumarina (1,2-benzopirona) é um composto aromático encontrado em várias espécies vegetais. Este trabalho objetivou avaliar as ações da cumarina em modelos comportamentais de ansiedade, depressão e sedação, tais como, campo aberto, *rota rod*, labirinto em cruz elevado (LCE), placa perfurada e suspensão da cauda, procurando esclarecer os mecanismos através de doseamento de aminoácidos em córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos através de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Foram utilizados camundongos albinos, variedade *Swiss Webster*, adultos, machos, pesando entre 25-30 g, provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC. A cumarina (CUM) foi administrada de forma aguda por via intraperitoneal nas doses de 5, 20 ou 40 mg/kg. Os resultados mostram que a CUM, em todas as doses utilizadas, diminuiu a atividade locomotora, o número de *rearing* e *grooming* no teste do campo aberto, sugerindo uma possível ação sedativa. No *rota rod* não alterou a coordenação motora ou causou déficit muscular nos animais, sugerindo que seus efeitos não se devem ao bloqueio neuromuscular periférico. No LCE e no teste da placa perfurada, a cumarina mostrou seu efeito ansiogênico, pois reduziu todos os parâmetros analisados no LCE, como o número de entradas nos braços abertos (NEBA), percentagem de entrada nos braços abertos (PEBA), Tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) e percentagem do tempo de permanência nos braços abertos (PTBA), assim como o número de *head dips* na placa perfurada. Ainda com o intuito de esclarecer as alterações ocorridas na atividade locomotora dos animais, foi administrada a levodopa + carbidopa (L-DOPA), que levou a um pequeno aumento na atividade locomotora, em relação ao grupo da CUM. Quando associada ao haloperidol (HALO) - antagonista dopaminérgico, o efeito da L-DOPA foi revertido. HALO + CUM causou uma maior interferência na locomoção, como um efeito sinérgico. A cumarina não apresentou efeito antidepressivo no teste da suspensão da cauda, pois aumentou o tempo de imobilidade dos animais. A imipramina (antidepressivo) diminuiu este parâmetro. No doseamento de aminoácidos neurotransmissores houve aumento nos níveis de GABA no córtex pré-frontal, de maneira semelhante ao diazepam, podendo explicar em parte a diminuição da atividade locomotora. Também aumentaram glutamato, glicina e taurina no grupo tratado com 20 mg/kg de cumarina. No hipocampo os níveis de glutamato foram significativamente reduzidos. Estas ações podem estar ligadas ao aumento ou diminuição nos níveis de aminoácidos excitatórios e inibitórios e envolvimento dopaminérgico. O efeito ansiogênico da cumarina parece envolver a participação da dopamina sobre o estriado. O aumento dos níveis de taurina leva a um balanço nos níveis de glutamato, o que pode explicar o efeito ansiogênico e possivelmente neuroprotetor da cumarina. A cumarina demonstrou ação sedativa e ansiogênica sobre o SNC provavelmente devido atuação como antagonista dopaminérgico. Esse mecanismo pode ter sido modulado pelos sistemas gabaérgico e, principalmente, glutamatérgico no córtex pré-frontal.

**Palavras-chave:** Cumarina. Aminoácidos. Sistema Nervoso Central.

## ABSTRACT

**Central effects of Coumarin (1,2-benzopyrone): behavioral and neurochemical study in mice prefrontal cortex and hippocampus. ELAINE CRISTINA PEREIRA LUCETTI. Supervisor: Prof. Dr. Silvânia Maria Mendes Vasconcelos. Master Dissertation. Program of Post-graduation in Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology, UFC, 2010.**

Coumarin (1,2-benzopyrone) is an aromatic compound found in many plant species. This study proposed to evaluate the coumarin actions in behavioral models of anxiety, depression and sedation activity, such as the open field, rota rod, elevated plus maze (EPM), hole board and tail suspension, still looking to clarify mechanisms by which this compound acts, through amino acids determination studies in mice prefrontal cortex and hippocampus by HPLC (High Performance Liquid Chromatography). The coumarin (CUM) was administered acutely in all tests, at doses of 5, 20 or 40 mg/kg, by intraperitoneal route. The results show that CUM, in all used doses, decreased the locomotor activity, the number of rearing and grooming in open field test, suggesting a possible sedative action. In the rota rod the coumarin did not alter the motor coordination or caused muscular deficit in animals. This suggests that the depressant effect of coumarin should not be exercised by peripheral neuromuscular blockade, but possibly the effects must involve neurons that control the central depressive activity. In the EPM and hole board test, coumarin proved its anxiogenic effect, as it reduced all examined parameters in the EPM, as NEOA, PEOA, TPOA and PTOA, as well as the number of head dips in the hole board. This opposite effect to diazepam was not reversed by flumazenil (benzodiazepine antagonist). This suggests that coumarin does not act in a similar manner to benzodiazepines. Still aiming to clarify the changes in animals locomotor activity, it was administered levodopa + carbidopa (L-DOPA), which led to a small increase in the locomotor activity, compared to CUM group. When associated to haloperidol (HALO) - dopaminergic antagonist, L-DOPA had its effects reversed. HALO + CUM caused greater interference in locomotion, as a synergic effect. The coumarin did not show antidepressant effect in the tail suspension test, because it increased the immobility time of animals. Imipramine (antidepressant) decreased this parameter. In the determination of amino acids neurotransmitters it was observed an increase in the GABA levels in the prefrontal cortex, similar to diazepam, which may partly explain the decrease in locomotor activity. The levels of glutamate, glycine and taurine also increased in the group treated with coumarin 20 mg/kg. In the hippocampus, significant changes occurred in levels of glutamate, which were reduced. It follows, therefore, that the CUM has sedative, anxiogenic and depressant activities. These actions can be linked to an increase or decrease of excitatory and inhibitory amino acids levels and dopaminergic involvement. The anxiogenic effect of coumarin seems to involve the dopamine participation on striatum. Increased levels of taurine leads to a balance in the glutamate levels, which may explain the anxiogenic effect and possible neuroprotective of coumarin. The coumarin demonstrate sedative and anxiogenic action in CNS probably caused by dopaminergic antagonism modulated by gabaergic system, mainly glutamatergic in the prefrontal cortex.

**Keywords:** Coumarin. Amino acids. Central nervous system.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1.</b>	Estruturas químicas de derivados cumarínicos.....	25
<b>FIGURA 2.</b>	Efeito da cumarina e diazepam sobre a atividade locomotora espontânea no teste do campo aberto.....	46
<b>FIGURA 3.</b>	Efeito da cumarina e diazepam sobre o número de <i>rearing</i> no teste do Campo aberto .....	47
<b>FIGURA 4.</b>	Efeito da cumarina e diazepam sobre o número de <i>grooming</i> no teste do campo aberto.....	47
<b>TABELA 1.</b>	Efeito da cumarina sobre o número de quedas e o tempo de permanência na barra no teste do <i>rota rod</i> .....	48
<b>FIGURA 5.</b>	Efeito da cumarina e diazepam sobre o número de <i>head dips</i> no teste da placa perfurada .....	49
<b>FIGURA 6.</b>	Efeito da cumarina e diazepam sobre o número de entradas nos braços abertos (NEBA) no teste do labirinto em cruz elevado .....	50
<b>FIGURA 7.</b>	Efeito da cumarina e diazepam sobre o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) no teste do labirinto em cruz elevado.....	50
<b>FIGURA 8.</b>	Efeito da cumarina e diazepam sobre a percentagem de entrada nos braços abertos (PEBA) no teste do labirinto em cruz elevado.....	51
<b>FIGURA 9.</b>	Efeito da cumarina e diazepam sobre a percentagem do tempo de permanência nos braços abertos (PTBA) no teste do labirinto em cruz elevado .....	51
<b>FIGURA 10.</b>	Avaliação do envolvimento do sistema GABAérgico no efeito sedativo da cumarina no teste do campo aberto .....	52
<b>FIGURA 11.</b>	Avaliação do envolvimento do sistema GABAérgico no efeito sedativo da cumarina sobre o número de <i>rearing</i> no teste do campo aberto .....	53
<b>FIGURA 12.</b>	Avaliação do envolvimento do sistema GABAérgico no efeito sedativo da cumarina sobre o número de <i>grooming</i> em protocolo agudo no teste do campo aberto .....	53
<b>FIGURA 13.</b>	Efeito da cumarina e diazepam sozinhos ou associados com flumazenil sobre o número de <i>head dips</i> no teste da placa perfurada.....	54
<b>FIGURA 14.</b>	Avaliação do envolvimento do sistema dopaminérgico no efeito central da cumarina no teste do campo aberto.....	55

<b>FIGURA 15.</b>	Avaliação do envolvimento do sistema dopaminérgico no efeito da cumarina sobre o número de <i>rearing</i> no teste do campo aberto.....	56
<b>FIGURA 16.</b>	Avaliação do envolvimento do sistema dopaminérgico no efeito da cumarina sobre o número de <i>grooming</i> no teste do campo aberto .....	56
<b>FIGURA 17.</b>	Avaliação do envolvimento do sistema dopaminérgico no efeito sedativo da cumarina sobre o número de <i>head dips</i> no teste da placa perfurada .....	57
<b>FIGURA 18.</b>	Efeito da cumarina e imipramina sobre o tempo de imobilidade no teste da suspensão da cauda .....	58
<b>FIGURA 19.</b>	Efeitos da cumarina sobre os níveis de aminoácidos em córtex pré-frontal .....	60
<b>FIGURA 20.</b>	Efeitos da cumarina sobre os níveis de aminoácidos em hipocampo .....	61

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

±	Mais ou menos
%	Porcentagem
°C	Grau (s) Centígrado (s)
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
3-NP	ácido 3-nitropropiónico
5-HT	serotonina
®	Marca registrada
μL	Microlitro
μg	Micrograma
μg/g	Micrograma/grama
μm	Micromol/grama
μM	Micromolar
ALE	Atividade locomotora
ANOVA	Análise de Variância
cm	Centímetro
AMPA	Propionato de α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ATV	Área tegmentar ventral
C	Carbono
Ca <sup>2+</sup>	Íon cálcio
CA	Cainato
CE	Cumarina 3,4-epóxido
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
Cl <sup>-</sup>	Íon cloreto
COMT	Catecol o-metil transferase
CPF	Córtex pré-frontal
CPFvm	Cortex pré-frontal ventromedial
CUM	Cumarina
CYP	Sistema enzimático P-450
DA	Dopamina
D2	Receptor dopaminérgico do tipo D2
D3	Receptor dopaminérgico do tipo D3
D4	Receptor dopaminérgico do tipo D4
DZP	Diazepam
EAG	extrato de <i>Angelica gigas</i>
EHAs	Extratos hidroalcoólicos
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fe <sup>3+</sup>	Íon férrico
FLU	Flumazenil
G	Grama
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GABA <sub>A</sub>	Receptor do ácido gama-aminobutírico do tipo A
GABA <sub>B</sub>	Receptor do ácido gama-aminobutírico do tipo B
GABA <sub>C</sub>	Receptor do ácido gama-aminobutírico do tipo C

GLU	Glutamato
GLI	Glicina
GCs	Glicocorticóides
H	Hora
HC	Hipocampo
HALO	Haloperidol
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IMI	Imipramina
i.p.	Intraperitoneal
K <sup>+</sup>	Potássio
L-DOPA	L-dopa + carbidopa
LCE	Labirinto em cruz elevado
LTP	Potenciação a longo prazo
M	Molar
MAO	Monoamina oxidase
MEK-1	Map quinase
mL/Kg	Mililitros/quilograma
mg/kg	Miligramas/quilograma
mm	Milímetro
mmol/L	Milimol/litro
mM	Milimol
mL	Mililitros
min	Minuto
NEBA	Número de Entradas nos Braços Abertos
NQ	Número de Quedas
P	Probabilidade
PEBA	Porcentagem de Entrada nos Braços Abertos
PTB	Pentobarbital sódico
PTBA	Porcentagem do Tempo de Permanência nos Braços Abertos
nm	Nanômetros
nmol/min/mg	Nanomol/minuto/miligramas
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPA	<i>O-Phthalaldehyde</i>
proteína Gq	Proteína G estimulatória
proteína Gi	Proteína G inibitória
PTZ	Pentilenotetrazol
PUVA	Terapia com ultravioleta
r.p.m	Rotações por minuto
SNC	Sistema Nervoso Central
SNpc	Substância negra pars compacta
TAU	Taurina
TNF- $\alpha$ .	Fator de necrose tumoral alfa
TH	Tirosinidroxilase
TP	Tempo de Permanência
TPBA	Tempo de Permanência nos Braços Abertos
v.o.	Via oral
v/v	Volume/Volume

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>1.1</b>	<b>DOENÇAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL: ANSIEDADE E DEPRESSÃO</b>	<b>13</b>
<b>1.2</b>	<b>SISTEMA GABAÉRGICO</b>	<b>15</b>
<b>1.3</b>	<b>SISTEMA DOPAMINÉRGICO</b>	<b>16</b>
<b>1.4</b>	<b>AMINOÁCIDOS NEUROTRANSMISSORES</b>	<b>18</b>
<b>1.5</b>	<b>ÁREAS CEREBRAIS (CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E HIPOCAMPO)</b>	<b>22</b>
<b>1.6</b>	<b>CUMARINAS: QUÍMICA, FARMACOLOGIA E TOXICOLOGIA</b>	<b>24</b>
<b>2</b>	<b>RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA</b>	<b>33</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>34</b>
<b>3.1</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b>	<b>34</b>
<b>3.2</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>34</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS</b>	<b>35</b>
<b>4.1</b>	<b>ANIMAIS</b>	<b>35</b>
<b>4.2</b>	<b>DROGAS E REAGENTES</b>	<b>35</b>
<b>4.3</b>	<b>EQUIPAMENTOS</b>	<b>35</b>
<b>5</b>	<b>MÉTODOS</b>	<b>37</b>
<b>5.1</b>	<b>TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS</b>	<b>37</b>
<b>5.2</b>	<b>PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES REAGENTES PARA O HPLC</b>	<b>37</b>
<b>5.2.1</b>	<b>Fase Móvel A para detecção fluorimétrica de aminoácidos em HPLC</b>	<b>37</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Fase Móvel B para detecção fluorimétrica de aminoácidos em HPLC</b>	<b>38</b>
<b>5.2.3</b>	<b>Preparo do Reagente de Derivatização</b>	<b>38</b>
<b>5.2.4</b>	<b>Preparo dos padrões dos aminoácidos</b>	<b>38</b>
<b>5.2.5</b>	<b>Método de utilização do HPLC</b>	<b>38</b>
<b>5.3</b>	<b>AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SEDATIVA, ANSIOLÍTICA E ANTIDEPRESSIVA DA CUMARINA EM CAMUNDONGOS</b>	<b>39</b>
<b>5.3.1</b>	<b>Determinação da atividade locomotora da cumarina no teste do campo aberto</b>	<b>39</b>
<b>5.3.2</b>	<b>Avaliação da coordenação motora no teste do rota rod</b>	<b>40</b>
<b>5.3.3</b>	<b>Determinação da atividade ansiolítica da cumarina no teste da placa perfurada (hole board)</b>	<b>40</b>
<b>5.3.4</b>	<b>Determinação da atividade ansiolítica da cumarina no teste do labirinto em cruz elevado</b>	<b>41</b>
<b>5.3.5</b>	<b>Avaliação do envolvimento do sistema GABAérgico no efeito sedativo da cumarina no teste do campo aberto</b>	<b>41</b>
<b>5.3.6</b>	<b>Avaliação do envolvimento do sistema GABAérgico no efeito da cumarina no teste da placa perfurada</b>	<b>42</b>
<b>5.3.7</b>	<b>Avaliação do envolvimento do sistema dopaminérgico no efeito central da cumarina no teste do campo aberto</b>	<b>42</b>
<b>5.3.8</b>	<b>Avaliação do envolvimento do sistema dopaminérgico no efeito da cumarina no teste da placa perfurada</b>	<b>43</b>
<b>5.3.9</b>	<b>Avaliação da atividade antidepressiva da cumarina no teste da suspensão da cauda</b>	<b>43</b>
<b>5.4</b>	<b>DISSECAÇÃO DAS ÁREAS CEREBRAIS (CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E HIPOCAMPO)</b>	<b>43</b>
<b>5.5</b>	<b>DOSEAMENTO DE AMINOÁCIDOS EM HOMOGENATOS DE ÁREAS CEREBRAIS (CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E HIPOCAMPO) DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM CUMARINA</b>	<b>44</b>

<b>5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>45</b>
<b>6 RESULTADOS</b>	<b>46</b>
<b>6.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE SEDATIVA DA CUMARINA NO TESTE DO CAMPO ABERTO .....</b>	<b>46</b>
<b>6.2 DETERMINAÇÃO DE ALTERAÇÕES NA COORDENAÇÃO MOTORA DOS ANIMAIS PELO TESTE DO ROTA ROD .....</b>	<b>48</b>
<b>6.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANSIOLÍTICA DA CUMARINA NO TESTE DA PLACA PERFURADA (HOLE BOARD).....</b>	<b>48</b>
<b>6.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANSIOLÍTICA DA CUMARINA NO TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO .....</b>	<b>49</b>
<b>6.5 AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA GABAÉRGICA NO EFEITO SEDATIVO DA CUMARINA NO TESTE DO CAMPO ABERTO .....</b>	<b>52</b>
<b>6.6 DETERMINAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA GABAÉRGICO NO EFEITO DA CUMARINA NO TESTE DA PLACA PERFURADA (HOLE BOARD) .....</b>	<b>54</b>
<b>6.7 DETERMINAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO SISTEMA DOPAMINÉRGICO NO EFEITO CENTRAL DA CUMARINA NO TESTE DO CAMPO ABERTO.....</b>	<b>55</b>
<b>6.8 DETERMINAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO SISTEMA DOPAMINÉRGICO NO EFEITO DA CUMARINA SOBRE O NÚMERO DE HEAD DIPS NO TESTE DA PLACA PERFURADA .....</b>	<b>57</b>
<b>6.9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIDEPRESSIVA DA CUMARINA NO TESTE DA SUSPENSÃO DA CAUDA (TAIL SUSPENSION) .....</b>	<b>58</b>
<b>6.10 DOSAGEM DE AMINOÁCIDOS EM CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM CUMARINA ATRAVÉS DE HPLC.....</b>	<b>59</b>
<b>7 DISCUSSÃO</b>	<b>62</b>
<b>8 CONCLUSÃO</b>	<b>71</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>72</b>
<b>APÊNDICE</b>	<b>87</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Doenças do sistema nervoso central: ansiedade e depressão

Os dados da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2001) têm demonstrado que cerca de 450 milhões de pessoas sofrem de transtornos mentais ou comportamentais. A prevalência de ansiedade tem aumentado nos últimos anos (ANDREWS *et al.*, 2000) e transtornos depressivos são comuns e muitas vezes incapacitantes (PAN *et al.*, 2005). Portanto, a busca por novos compostos como alternativas terapêuticas para tais distúrbios têm progredido constantemente (IRIE *et al.*, 2004).

A ansiedade é um estado emocional com componentes psicológicos e fisiológicos, que faz parte do espectro normal das experiências humanas, sendo propulsora do desempenho. Ela passa a ser patológica quando é desproporcional à situação que a desencadeia, ou quando não existe um objeto específico ao qual se direcione (ANDRADE; GORENSTEIN, 1998). Os transtornos de ansiedade estão entre os transtornos psiquiátricos mais frequentes na população geral. Além de serem muito frequentes, os sintomas ansiosos estão entre os mais comuns, podendo ser encontrados em qualquer pessoa em determinados períodos de sua existência.

Em termos biológicos, a ansiedade induz a uma forma particular de inibição comportamental, que ocorre em resposta aos eventos ambientais que são novos, não recompensadores (em condições em que a recompensa é esperada) ou à punição. Em animais, esta inibição comportamental pode tomar a forma de imobilidade ou de supressão de uma resposta comportamental, tal como pressionar uma alavanca para obter comida (RANG; DALE, 2007).

Um agente ansiolítico deve reduzir a ansiedade e exercer um efeito calmante, com pouco ou nenhum efeito sobre as funções motoras ou mentais. Várias drogas ansiolíticas usadas rotineiramente, principalmente os benzodiazepínicos (Diazepam, Alprazolam, Bromazepam, Clonazepam) estão entre as classes de drogas que modulam alostericamente os receptores gabaérgicos do tipo A (OLSON, 2002).

Em psiquiatria, o termo depressão é utilizado para designar um transtorno de humor, uma síndrome em que a principal queixa de alterações exibidas pelo paciente é o humor depressivo e às vezes irritável durante a maior parte do dia. Há uma lentificação das funções psíquicas e da motricidade do indivíduo, além do prejuízo na capacidade de atenção e

concentração. A depressão é muito mais profunda do que a tristeza. Estão presentes pensamentos constantes de cunho negativo, sentimento de culpa e sensação de inutilidade, diminuição do prazer e do ânimo para atividades cotidianas e de lazer e perda da capacidade de planejamento para o futuro (ASSUNÇÃO; GUIMARÃES; SCIVOLETTO, 1998; CORRÊA, 1995). Em qualquer momento particular, cerca de 5-6% da população apresenta depressão (prevalência de ponto), e estima-se que 10% das pessoas podem vir a sofrer depressão durante a sua vida (prevalência em toda a vida) (KATZUNG, 2007).

Em animais, não há condição conhecida que corresponda à condição inata da depressão em seres humanos, mas há vários procedimentos descritos que produzem em animais estados comportamentais (retirada da interação social, perda de apetite, atividade motora reduzida, estresse, situações inescapáveis, entre outros), que mimetizam sintomas da depressão humana (PORSOLT; BERTIN; JALFRE, 1987).

Várias são as teorias para explicar a depressão, dentre elas, a mais aceita na prática clínica é a ‘hipótese das monoaminas’, a qual postula que a depressão é causada pela diminuição da função das monoaminas no cérebro, originado desde observações clínicas iniciais (BERTON; NESTLER, 2006; PITTENGER; DUMAN, 2008). Dois compostos estruturalmente independentes desenvolvidos para condições não-psiquiátricas, iproniazida, tuberculostático, e imipramina, antipsicótico, já eram conhecidos por seus potentes efeitos antidepressivos em humanos e mais tarde foi demonstrado que estes aumentam os níveis de serotonina central e a transmissão noradrenérgica. Reserpina, um antigo agente anti-hipertensivo que depleta as reservas de monoaminas, produziu sintomas depressivos em alguns pacientes. Os agentes antidepressivos de hoje oferecem melhores resultados terapêuticos e menores taxas de efeitos colaterais para a maioria dos pacientes, mas eles ainda são designados a aumentar agudamente a transmissão de monoaminas (BERTON; NESTLER, 2006).

Apesar da teoria das monoaminas, foi sugerido que o neurotransmissor dopamina também participa na depressão. A dopamina está implicada na regulação do humor (BROWN; RUSH; McEWEN, 1993) e foi mostrado que, em modelos animais de depressão, os níveis de dopamina extracelular no cérebro estavam diminuídos (ROSSETTI *et al.*, 1993). Além disso, recentemente, vem sendo considerado que a dopamina está envolvida com os efeitos antidepressivos de drogas (JOCA *et al.*, 2000), pois a bupropiona, um inibidor seletivo da recaptação de dopamina, é clinicamente usado em humanos como um antidepressivo ou na terapia de retirada da nicotina (ASCHER *et al.*, 1995; RICHMOND; ZWAR, 2003).

Antidepressivos atuam prevenindo ou revertendo esses processos aumentando as neurotransmissões serotoninérgicas e/ou noradrenérgicas. Dentre as classes utilizadas temos os antidepressivos tricíclicos (Imipramina, Amitriptilina), agentes heterocíclicos (Bupropiona, Venlafaxina), Inibidores seletivos da recaptação de serotonina (Fluoxetina, Citalopram) e os inibidores da monoamina oxidase (MAO) (Tranilcipromina) (KATZUNG, 2007).

Em modelos animais de depressão, como por exemplo, o nado forçado e a suspensão da cauda, verificaram-se que agonistas dos receptores de dopamina aumentam o efeito antidepressivo (JOCA *et al.*, 2000; MAJ; ROGOZ, 1999) e, que este efeito, parece estar relacionado com a ativação dos receptores dopaminérgicos do tipo D2 (WILLNER, 2002).

## 1.2 Sistema Gabaérgico

O ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório no sistema nervoso central (SNC) dos vertebrados. O GABA ativa três diferentes classes de receptores, tais como: GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub> e GABA<sub>C</sub>.

Os receptores GABA<sub>A</sub> estão ligados a canais iônicos de cloreto (Cl<sup>-</sup>) (BORMANN, 1988; SILVIOTTI; NISTRÌ, 1991). Estes receptores são ativados pelo GABA, muscimol e isoguvacina, e são inibidos pela bicuculina, gabazina (SR 95531) e (+)- $\beta$ -hidrastina (WERMUTH; BIZIERE, 1986). Os receptores GABA<sub>B</sub> são ativados pelo GABA, (-)-baclofen, ácido ( $\pm$ )-4-amino-3-(5-cloro-2-tienil)butanóico e ácido 3-aminopropil-(metil)fosfínico (SKF 97541), e são inibidos pelo faclofen, saclofen e 2-hidroxisaclofen (SEABROOK *et al.*, 1990). Estes receptores são conhecidos por estarem ligados a canais de cálcio (Ca<sup>2+</sup>) ou potássio (K<sup>+</sup>), via proteína G (guanina nucleotídeo), tanto quanto por ativar sistemas de segundos mensageiros dentro da célula (BORMANN, 1988; BOWERY, 1993).

Os receptores GABA<sub>A</sub> são os de maior importância por possuírem um papel central na regulação da excitabilidade cerebral, através de seus efeitos inibitórios, e muitas drogas importantes tais como os benzodiazepínicos, apresentam vários efeitos relacionados com este receptor, tais como a sedação e a indução do sono, a redução da ansiedade e da agressão, a redução do tônus muscular e da coordenação, efeito anticonvulsivante, além de amnésia anterógrada, que é a perda da capacidade de reter informações novas. Estes efeitos dos benzodiazepínicos ocorrem através da potencialização da resposta ao GABA, por facilitarem a abertura dos canais de cloreto ativados pelo GABA. Eles se ligam de um modo específico em um sítio regulador do receptor, distinto do sítio ligante de GABA, e agem de modo alostérico, aumentando a afinidade do GABA pelo receptor (RANG; DALE, 2007).

O antagonista competitivo dos benzodiazepínicos mais conhecido é o flumazenil. Ele possui certa atividade ansiogênica e proconvulsivante. Pode ser usado para reverter o efeito da superdosagem de benzodiazepínicos (RANG; DALE, 2007).

### 1.3 Sistema dopaminérgico

A dopamina pertence ao grupo de neurotransmissores chamado de catecolaminas. As características estruturais dessas monoaminas são a presença de um único grupamento amina, um núcleo de catecol (um anel benzeno com dois grupos de hidroxilas adjacentes) e uma cadeia lateral de etilamina ou um de seus derivados (FELDMAN; MEYER; QUENZER, 1997).

O precursor para a síntese da dopamina é o aminoácido L-tirosina. Duas reações transformam a L-tirosina em dopamina: a primeira é catalisada pela enzima tirosina-hidroxilase (TH) a qual converte L-tirosina em L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). A tirosina-hidroxilase é considerada a enzima limitante desta via. O segundo passo é a descarboxilação da L-DOPA, catalisada pela enzima DOPA descarboxilase, a qual produz dopamina (FELDMAN; MEYER; QUENZER, 1997). Após ser sintetizada, a dopamina se difunde pela fenda sináptica e pode ser catabolizada pelas enzimas monoamina oxidase (MAO) e catecol o-metil transferase (COMT) que estão amplamente distribuídas no corpo e no SNC. A MAO está localizada na parte externa da membrana mitocondrial (COSTA; SANDLER, 1972) e pela sua localização intracelular, tem um papel estratégico na inativação das catecolaminas que estão livres na fenda sináptica. A COMT age sobre as catecolaminas extraneuronais.

A L-DOPA ao ser convertida em dopamina exerce sua ação pela ligação a receptores de membrana específicos (GINGRICH; CARON, 1993), os quais pertencem a família de receptores ligados à proteína G com 7 domínios transmembranas. Cinco receptores dopaminérgicos distintos foram isolados, caracterizados e subdivididos em duas sub-famílias, D1- e D2-símile, com base em suas propriedades bioquímicas e farmacológicas.

A sub-família D1-símile compreende os receptores D1- e D5-, enquanto o D2-símile inclui os receptores D2-, D3- e D4-. O C-terminal de ambas sub-famílias contém locais de fosforilação e esterificação, os quais parecem estar envolvidos na dessensibilização do receptor (NG *et al.*, 1994). Ligantes dopaminérgicos facilmente distinguem os receptores das sub-famílias D1- e D2-símile. Entretanto, a maioria deles não diferencia claramente entre os membros da mesma sub-família. Por exemplo, o antagonista do receptor D1, SCH-23390, ou

o agonista SKF-38393 tem afinidade semelhante para ambos receptores D1- e D5. A seletividade farmacológica destes compostos tem ainda de ser determinada em animais vivos. Para esta finalidade o uso de animais *knock-out* de um receptor em particular será de grande ajuda na definição da seletividade de um composto particular para um receptor específico.

Os receptores de dopamina são expressos no cérebro em áreas distintas, porém superpostas. Os receptores D1 são os mais abundantes e os mais generalizados nas áreas que recebem inervação dopaminérgica (especificamente o estriado, o sistema límbico, o tálamo e o hipotálamo), como o são os receptores D2, que também ocorrem na hipófise. Os receptores D3 ocorrem no sistema límbico, porém não no estriado. O receptor D4 é expresso muito mais fracamente, principalmente no córtex e no sistema límbico, porém é um foco de interesse por causa de sua possível relação com o mecanismo da esquizofrenia e da dependência aos fármacos (RANG; DALE, 2007).

As funções das vias dopaminérgicas dividem-se de forma ampla em: controle motor (sistema nigroestriado), efeitos comportamentais (sistema mesolímbico e mesocortical) e controle endócrino (sistema tubero-hipofisário). Antagonistas da dopamina (ex: Haloperidol), usados como fármacos antipsicóticos, devem suas ações aos efeitos no sistema mesolímbico, porém, frequentemente, causam efeitos colaterais motores pelo bloqueio dos receptores no estriado. Há interesse em usar como alvos os receptores D3 e D4 na tentativa de evitar estes efeitos colaterais (RANG; DALE, 2007).

As projeções que constituem a via nigroestriatal originam-se de neurônios sintetizadores de dopamina (DA) do mesencéfalo e substância negra pars compacta (SNpc) que inervam o estriado dorsal (caudado-putamen). A via nigroestriatal está envolvida no controle dos movimentos e sua degeneração leva a patologias, como a doença de Parkinson (GERFEN, 1992; LANG; LOZANO, 1998). A via mesocortical origina-se na área tegmentar ventral (ATV) e inerva diferentes regiões do córtex frontal. Esta via parece estar envolvida em alguns aspectos do aprendizado e memória (FELDMAN; MEYER; QUENZER, 1997). A via mesolímbica origina-se na ATV e inerva o estriado ventral (núcleo accumbens), o tubérculo olfatório e partes do sistema límbico (FELDMAN; MEYER; QUENZER, 1997). Esta via foi implicada no comportamento motivacional (KOOB, 1992; KOOB; BLOOM, 1988). A via tuberoinfundibular inicia a partir de células dos núcleos arqueado e periventricular do hipotálamo (FELDMAN; MEYER; QUENZER, 1997). As projeções desta via alcançam a eminência média do hipotálamo onde ocorre liberação de DA nos espaços perivasculares do plexo capilar do sistema hipotalâmico-hipofisário. Por esta via a DA é transportada para a hipófise anterior onde atua inibindo a liberação de prolactina.

#### 1.4 Aminoácidos neurotransmissores

O ácido  $\gamma$ -aminobutírico, glutamato, glicina e taurina representam os mais importantes aminoácidos neurotransmissores ou derivados de aminoácidos. Os principais neurotransmissores excitatório e inibitório no cérebro são o glutamato e o GABA, respectivamente. O glutamato é o aminoácido excitatório mais abundante e amplamente distribuído no cérebro de mamíferos, principalmente no hipocampo (GOODMAN; GILMAN, 2005). Neurônios glutamatérgicos perfazem cerca de 80% da população total de neurônios no córtex cerebral (SOMOGYL *et al.*, 1998) e assim devido a suas altas concentrações e larga distribuição, estes aminoácidos influenciam todas as funções do SNC. O GABA está presente em todas as partes do sistema nervoso central, mais concentrado na substância negra e no núcleo do globo pálido dos gânglios basais, no hipotálamo e hipocampo. A taurina é um aminoácido, não essencial, que funciona, como a glicina e o GABA, como um transmissor neuroinibitório (GOODMAN; GILMAN, 2005).

Existem algumas doenças associadas a mudanças nos níveis destes neurotransmissores. Um papel para a interrupção da transmissão glutamatérgica na etiologia de doenças neurodegenerativas crônicas e esquizofrenia foi postulado (FARBER; NEWCOMER; OLNEY, 1998; OLNEY; NEWCOMER; FARBER, 1999). Estudos farmacológicos revelaram que a microinjeção de antagonistas de receptores GABA<sub>A</sub> ou agonistas de diferentes subtipos de receptores de glutamato causaram convulsões em experimentos animais *in vivo* (GOODMAN; GILMAN, 2005).

Os neurotransmissores excitatórios e inibitórios fazem a mediação de essencialmente toda comunicação rápida no SNC. O glutamato, desempenha um papel importante no aprendizado e memória (DAVIS; BUTCHER; MORRIS, 1992; WILLNER *et al.*, 1992), e está envolvido em processos patológicos, como epilepsia, assim como em lesões cerebrais características dos distúrbios neurodegenerativos tais como, doença de Huntington, doença de Alzheimer e doença de Parkinson, além de alterações associadas à isquemia cerebral, traumatismo cerebral e encefalopatia devido à síndrome da imunodeficiência humana adquirida (HAYES *et al.*, 1991; LANCASTER, 1992).

Glutamato e aspartato são aminoácidos, não essenciais, que não cruzam a barreira hemato-encefálica, por isso, são sintetizados a partir da glicose e de uma variedade de outros precursores no SNC. A glicose e glutamina parecem ser os precursores da biossíntese do glutamato no cérebro (BRADFORD; THOMAS, 1969). A glicose está disponível na corrente sanguínea em grandes quantidades e como a taxa de metabolização é aumentada na

terminação nervosa, ela é algumas vezes considerada como um importante precursor da síntese do glutamato via ciclo do ácido cítrico e desidrogenase glutâmica (DAVIDSON, 1976). A molécula de  $\alpha$ -cetoglutarato, substância que é convertida em glutamato no sistema nervoso, é um componente importante do ciclo produtor de energia que ocorre na mitocôndria. Por outro lado, a glutamina é fornecida principalmente por células da glia, que ficam ao redor dos neurônios. No interior dos neurônios, a glutamina também é convertida a glutamato por uma reação de hidrólise (SHANK; APRISON, 1977).

Ao contrário das outras células do corpo, os neurônios necessitam de glutamato não somente para as atividades metabólicas normais, mas também para transmissão sináptica. Como conseqüência, as moléculas de glutamato destinadas para agir como neurotransmissores devem ser segregadas do glutamato não-transmissor. Para realizar esta separação, o *pool* de glutamato é estocado em pequenos compartimentos especiais dentro dos neurônios, ou seja, nas vesículas sinápticas, que estão localizadas na região terminal das terminações nervosas (CARTMELL; SCHOEPP, 2000).

A ativação de um neurônio glutamatérgico e emissão de um sinal a neurônios circunvizinhos leva a fusão de vesículas sinápticas que contêm glutamato com a membrana da região terminal e liberam seu conteúdo na fenda sináptica. O glutamato então atravessa a fenda para interagir com receptores no neurônio pós-sináptico, desse modo induzindo excitação do neurônio pós-sináptico. A liberação destes aminoácidos excitatórios de terminações nervosas pode ser  $\text{Ca}^{2+}$ -dependente ou independente, embora os mecanismos não estejam totalmente compreendidos. O  $\text{K}^+$  extracelular estimula o efluxo de aminoácidos excitatórios de neurônios estriatais (KORF; VENEMA, 1985), mas a liberação de glutamato pode depender de muitos outros sinais moleculares, tais como liberação do óxido nítrico (NO) (MCNAUGHT; BROWN, 1998), da ativação de receptores glutamatérgicos metabotrópicos pré-sinápticos bem como de receptores GABAérgicos e de proteínas quinases (PERKINTON; SIHRA, 1999).

O glutamato depois de liberado na fenda sináptica pode se ligar a receptores ionotrópicos (associados a canais iônicos) e a receptores metabotrópicos (ligados à proteína G). Dentre os receptores ionotrópicos podemos citar: NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (propionato de  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole) e cainato (CA). A ativação dos receptores NMDA exige a presença de glicina, bem como de glutamato em sítios de ligação distintos e ambos precisam estar ocupados para a abertura do canal. Esta descoberta foi importante, visto que até então a glicina era considerada um transmissor inibitório, de modo que a constatação de que facilitava a excitação opôs-se à doutrina até então prevalente. A

concentração de glicina necessária é baixa em relação à concentração geralmente presente no cérebro, sugerindo que pode atuar como fator permissivo constante para os efeitos do glutamato mediado pelo receptor NMDA, mais do que como mecanismo regulador. Os receptores AMPA e, em determinadas regiões do cérebro, os receptores de cainato (BLEAKMAN; LODGE, 1998) atuam na mediação da transmissão sináptica excitatória rápida no SNC – absolutamente essencial para o funcionamento do cérebro humano. Os receptores de cainato também desempenham um papel pré-sináptico (FRERKING; NICOLL, 2000). Os receptores AMPA também ocorrem nos astrócitos, que parecem desempenhar um papel de comunicação, bem como sustentação no cérebro. Os receptores de NMDA (que freqüentemente coexistem com os receptores AMPA) contribuem com o componente lento para o potencial pós-sináptico excitatório. Os receptores metabotrópicos do glutamato são divididos em grupos: grupo I - receptores acoplados à proteína G estimulatória (Gq) que ativam a hidrólise do fosfato de inositol. Fosfatos de inositol são conhecidos por regular o transporte através das membranas, assim como o metabolismo da glicose, organização do citoesqueleto e têm como função mais importante, a homeostase do  $Ca^{2+}$  — particularmente, a liberação das reservas de  $Ca^{2+}$  via receptores sensíveis ao 1,4,5- trifosfato de inositol. Os receptores dos Grupos II e III agem via proteína G inibitória (Gi) com inibição da atividade da adenilato ciclase e redução da formação do AMPc o que resulta em inibição dos canais de cálcio operados por voltagem (MOLDRISH *et al.*, 2003).

Os receptores glutamatérgicos desempenham um papel nas alterações adaptativas e patológicas a longo prazo no cérebro, sendo de particular interesse como alvos potenciais para fármacos em particular por causa da plasticidade sináptica e excitotoxicidade mediada por estes receptores. Plasticidade sináptica é um termo utilizado para descrever alterações a longo prazo na conexão e eficácia sinápticas, após alterações fisiológicas da atividade neuronal (como na aprendizagem e memória) ou em decorrência de distúrbios patológicos (como na epilepsia, dor crônica ou dependência de drogas) (MOLDRISH *et al.*, 2003).

Proteínas carreadoras específicas transportam glutamato de volta ao neurônio pré-sináptico e para as células gliais circunvizinhas (NICHOLS, 1994). Além disso, para prevenir a excitação excessiva do neurônio pós-sináptico, este sistema de captação de glutamato recicla o *pool* de glutamato para utilização posterior. As moléculas do neurotransmissor são recaptadas para o neurônio pré-sináptico sendo transportadas diretamente para as vesículas sinápticas. O glutamato transportado para as células gliais é rapidamente convertido a glutamina, que eventualmente pode ser transportada de volta ao neurônio para agir como um precursor para o glutamato. Assim, as células gliais associadas com neurônios

glutamatérgicos ajudam a regular o processo de sinalização por terminar o sinal sináptico e por assegurar um suprimento eficiente de moléculas precursoras. Esse papel das células gliais é único para a transmissão excitatória glutamatérgica, pois outros sistemas neurotransmissores aparentemente não requerem este suporte (GONZÁLES; JANOWSKI, 1997).

A glicina é encontrada em concentrações particularmente altas (5  $\mu\text{mol/g}$ ) na substância cinzenta da medula espinhal. Quando aplicada iontoforicamente a motoneurônios ou a interneurônios, produz hiperpolarização inibitória, que é indistinguível da resposta sináptica inibitória. No entanto, o efeito inibitório da glicina é muito distinto de seu papel na ativação facilitadora dos receptores de NMDA. O receptor da glicina é semelhante ao receptor  $\text{GABA}_A$  sendo um canal iônico multimérico regulado por ligante. Foram encontradas mutações nos receptores da glicina em alguns distúrbios neurológicos hereditários associados a espasmos musculares e hiperexcitabilidade reflexa (RANG; DALE, 2007). A glicina também está envolvida na convulsão, visto que drogas como a estricnina, um veneno com atividade convulsivante que atua principalmente sobre a medula espinhal, bloqueia tanto a resposta inibitória sináptica quanto a resposta à glicina (RANG; DALE, 2007).

A sintonia entre os neurotransmissores é importante para o desenvolvimento do SNC e são responsáveis pela base fisiológica do armazenamento de informações. Desequilíbrios entre respostas excitatórias e inibitórias podem ter conseqüências diversas, desde convulsões ou excitotoxicidade à depressão do SNC similar àquela observada com o uso de sedativos e hipnóticos, estando estes neurotransmissores envolvidos em processos como epilepsia e isquemia (DINGLELINE; MCBAIN, 1999).

O GABA é um neurotransmissor inibitório quantitativamente importante no SNC envolvido direta ou indiretamente na patogênese de muitas doenças neurológicas, principalmente nas convulsões. Por muitos anos acreditou-se que o principal fator patogênico nas epilepsias era a falha na neurotransmissão GABAérgica (MELDRUM, 1975).

Dependendo da região cerebral, 20 a 50% das sinapses usam GABA como transmissor. Foi descoberto mais tarde que a neurotransmissão inibitória pode ter um importante papel na geração e manutenção de certos tipos de convulsão no hipocampo e nos circuitos corticotalâmicos (AVOLI, 1996; ENGEL, 1996). O aumento da atividade da GABA-transaminase no cérebro reduz as concentrações de GABA o que leva à convulsão, coma e morte. A inibição desta enzima eleva consideravelmente a concentração de GABA no cérebro, sendo alvo para o desenvolvimento das novas drogas anticonvulsivantes como a vigabatrina. O papel dos receptores  $\text{GABA}_B$  ainda é controverso no que se refere às convulsões. Em alguns modelos de convulsão, agonistas deste receptor produzem ação

anticonvulsivante, enquanto em outros a ação é proconvulsivante. Como no caso do baclofeno que após infusão intraventricular em roedores e após uso em doses terapêuticas em humanos produz ação proconvulsivante *per se* (SNODGRASS, 1992), mas atenua o desenvolvimento do *kindling* induzido por Pentilenotetrazol (PTZ) em roedores (SNEAD, 1996; DE SARRO *et al.*, 2000).

### **1.5 Áreas cerebrais (córtex pré-frontal e hipocampo)**

O lobo frontal, constituído pelo córtex pré-frontal, córtex pré-motor e córtex motor primário, é responsável pelo planeamento da ação e controle do movimento (KANDEL, 2000). As áreas motoras do córtex cerebral são subdivididas em motora primária e várias áreas pré-motoras. Cada área contém populações de neurônios que se projetam do córtex para o tronco cerebral e coluna vertebral. O córtex motor também recebe impulsos do gânglio basal e do cerebelo. A área motora do córtex cerebral é responsável pelo movimento voluntário (KRAKAUER; GHEZ, 2000). O gânglio basal possui papel importante nos movimentos voluntários normais. Esta região também está envolvida na produção das desordens de movimento. Estudos *postmortem* de pacientes com doença de Parkinson e de Huntington revelaram alterações nesta área cerebral. Essas doenças apresentam três tipos de distúrbios motores: tremor e outros movimentos involuntários, alterações na postura e tônus muscular e finalmente, pobreza e lentidão dos movimentos sem paralisia. Desta forma, distúrbios nos gânglios da base podem resultar tanto na redução de movimento, como a que ocorre na doença de Parkinson, como no movimento excessivo, aquele observado na doença de Huntington.

O córtex pré-frontal (CPF) tem sido associado a diversos processos emocionais, cognitivos, atencionais, entre outros (VERTES, 2006). Até o momento são reconhecidas três grandes regiões funcionais do CPF: a região ventromedial, envolvida com o planeamento de ações e do raciocínio e com o ajuste social do comportamento; a região dorsolateral, encarregada da memória operacional; e a região cingulada anterior, envolvida com as emoções (LENT, 2004). Em humanos, o funcionamento anormal do CPF tem sido correlacionado com psicopatologias incluindo a esquizofrenia, sociopatia, transtorno obsessivo compulsivo, depressão, entre outros. As interconexões do cortex pré-frontal ventromedial (CPFvm) com a formação hipocampal parecem ser unidirecionais, sendo que o CPFvm recebe projeções do hipocampo, principalmente da porção CA1, mas apenas poucas fibras do CPFvm chegam na formação hipocampal (HEIDBREder; GROENEWEGEN,

2003; VERTES, 2006). Os aferentes colinérgicos para o CPFvm são, em grande parte, projeções provenientes do núcleo basal (GAYKEMA *et al.*, 1991) e exercem papel fundamental na atenção, memória, motivação e induzem processos de ansiedade (BERNSTON; SARTER; CACIOPPO, 1998; HASSELMO, 1995). A atividade das vias colinérgicas está aumentada frente a estímulos estressantes, e sugere-se que a hiperatividade das aferências colinérgicas para o CPF pode contribuir para os estados de ansiedade (GIOVANINNI *et al.*, 2001; MILLAN, 2003).

O córtex pré-frontal (CPF) foi originalmente descrito como uma região cortical com uma interação recíproca forte com o núcleo mediodorsal do tálamo (KOLB, 1984; GROENEWEGEN *et al.*, 1990). Existem diferentes tipos celulares no córtex pré-frontal, incluindo neurônios piramidais excitatórios (glutamato), eferentes colinérgicos, interneurônios GABAérgicos inibitórios e interneurônios colinérgicos e esta área, além do que já foi descrito, recebe projeções de várias regiões cerebrais. O CPF recebe projeções eferentes dopaminérgicos provenientes da área tegmentar ventral (ATV) e envia projeções glutamatérgicas para a ATV e núcleo accumbens (SESACK; PICKEL, 1992). Com relação ao glutamato as terminações nervosas glutamatérgicas no CPF medial nascem principalmente de projeções eferentes do núcleo mediodorsal do tálamo, do hipocampo e amígdala (BACON *et al.*, 1996). O núcleo da rafe, área produtora de serotonina (5HT), recebe inervação glutamatérgica proveniente do CPF (SESACK *et al.*, 1989).

O hipocampo é a porção alongada do córtex cerebral que se dobra para formar a superfície ventral de grande parte do interior do ventrículo lateral. Uma extremidade do hipocampo confina o núcleo amigdalóide, e ao longo de sua borda lateral que se funde com o giro parahipocampal, que é o córtex cerebral sobre o ventromedial na superfície externa do lóbulo temporal (GUYTON, 2006).

O hipocampo está tradicionalmente relacionado a processos cognitivos como aprendizado e memória (RIEDEL; MICHEAU, 2001), mas também parece estar envolvido com a resposta ao estresse (LATHE, 2001). Ele é ativado por diferentes estressores (LOPEZ; AKIL; WATSON, 1999) e participa do processamento de informações sobre eventos ameaçadores (GRAY; McNAUGHTON, 2000). O hipocampo possui grande densidade de receptores para glicocorticóides (GCs) que, quando ativados, inibem a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, limitando a resposta ao estresse (HERMAN; CULLINAN, 1997). Além disso, ele também pode se tornar um alvo para os efeitos deletérios do estresse. Eventos estressantes teriam um efeito neurotóxico sobre o hipocampo, provavelmente

mediado pelo aumento de GCs, predispondo ao desenvolvimento da depressão (BROWN; RUSH; McEWEN, 1999).

O hipocampo (e suas estruturas lobulares adjacentes, temporal e parietal, denominados de formação hipocampal) tem numerosas conexões, mas principalmente, conexões indiretas com muitas porções do córtex cerebral, bem como com as estruturas basais do sistema límbico - a amígdala, o hipotálamo, o septo e os corpos mamilares. Quase qualquer tipo de experiência sensorial causa ativação de pelo menos alguma parte do hipocampo. Ele distribui muitos sinais para o tálamo anterior, hipotálamo, e outras partes do sistema límbico, especialmente através do fórnix. Assim, o hipocampo é um canal adicional através do qual sinais sensoriais podem iniciar reações comportamentais para diversos fins (GUYTON, 2006).

Estímulo repetitivo dos neurônios aferentes excitatórios no hipocampo com pulsos elétricos de alta frequência produz um aumento relativamente persistente de respostas sinápticas. Esta resposta sináptica aumentada, chamada de potenciação a longo prazo (LTP), pode ser considerado um modelo de memória (BLISS; COLLINGRIDGE, 1993).

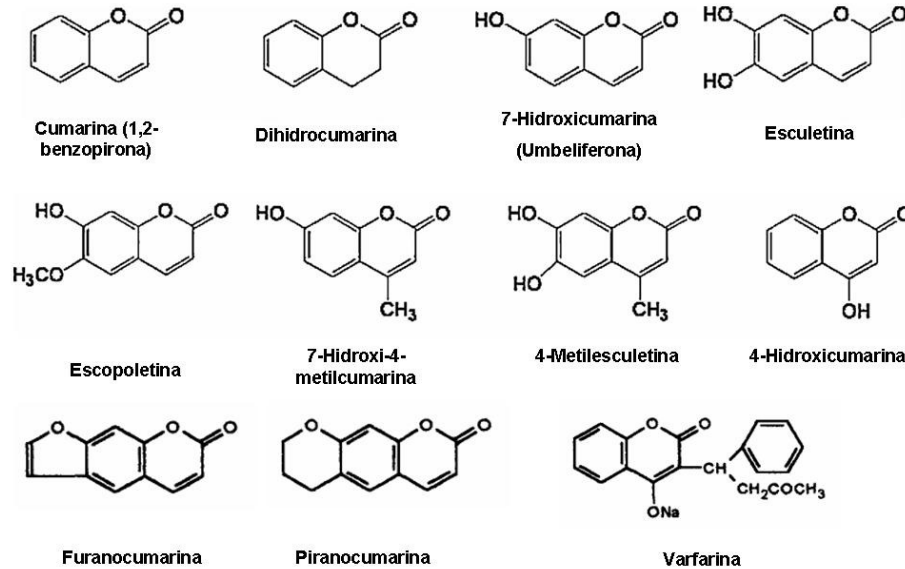
## **1.6 Cumarinas: química, farmacologia e toxicologia.**

Os benzopiranos formam um grupo de compostos que incluem os flavonóides, cumarinas e seus derivados e uma variedade de outras classes (CASLEY-SMITH, 1985).

As cumarinas são uma grande classe de substâncias fenólicas encontradas em plantas como *Torresea cearensis* Fr. All. (*Amburana cearensis*), *Justicia pectoralis* Jacq., *Eclipta alba* Hassk., *Pterodon polygaliflorus* Benth. e *Hybanthus ipecacuanha* Oken, e compostas por anéis de benzeno fundido e  $\alpha$ -pirona (**Figura 1**) (MURRAY; MENDEZ; BROWN, 1982). Milhares de substâncias têm sido identificadas, principalmente como metabólitos secundários em plantas verdes, mas também em fungos e bactérias. Estruturalmente são lactonas do ácido *o*-hidróxi-cinâmico (2H-1-benzopiran-2-onas), sendo o representante mais simples a cumarina (também conhecida como 1,2-benzopirona), que tem sido bastante estudada (MURRAY, 1991).

Os derivados cumarínicos, muito numerosos, fornecem uma particularidade comum a quase todos. Possuem um átomo de oxigênio em C(7) pertencente a uma hidroxila ou a seu éter metílico; ou ainda este átomo pode encontrar-se muitas vezes combinado a um terceiro anel, nas duas posições possíveis: 6-7 (tipo linear) e 7-8 (tipo angular), como ocorre nas furanocumarinas (anel constituído por 5 membros) ou piranocumarina (anel constituído

por 6 membros). Em uma outra classe de cumarinas, a hidroxila está ligada ao anel pirano, como a 4-hidroxicumarina (COSTA, 1977).



**FIGURA 1** – Estruturas químicas de derivados cumarínicos

A observação das estruturas dadas acima para algumas das cumarinas revela que a substituição pode ocorrer em sítios diferentes. Existem muitas permutações possíveis fornecidas pela substituição e conjugação, e isto explica claramente por que tantas destas substâncias ocorrem naturalmente. Todavia, a maioria dos estudos farmacológicos e bioquímicos no homem tem sido feitos com a própria cumarina e seu metabólito primário, 7-hidroxicumarina, também conhecido como umbeliferona.

As cumarinas são derivadas do metabolismo da fenilalanina, sendo um dos primeiros precursores do ácido *p*-hidróxi-cinâmico (ácido *p*-cumarínico), que é hidroxilado na posição C-2' (*orto*-hidroxilação). O derivado *orto*-hidroxilado sofre isomerização fotocatalizada da ligação dupla (E → Z). O isômero Z lactoniza-se espontaneamente, produzindo a umbeliferona. A prenilação do anel benzênico nas posições 6 ou 8 do derivado 7-hidróxi-cumarina é o passo inicial na biogênese das furano- e piranocumarinas. A ciclização dos derivados 6- ou 8-isoprenilcumarina ocorre por ataque nucleofílico do grupo hidroxila em C-7 ao epóxido formado pela oxidação da ligação dupla do resíduo isopentenila. Dependendo da orientação do ataque nucleofílico, o produto será o hidróxi-isopropil-dihidrofuranocumarina ou será o hidróxi-dimetil-di-hidropiranocumarina. A maioria das cumarinas é derivada biogeneticamente da via do ácido chiquímico, mas um número significativo delas parece derivar de uma via mista (ácido chiquímico e acetato) como as 4-

fenilcumarinas. As 4-*n*-propilcumarinas, por exemplo, derivam totalmente da via do acetato (STRACK, 1997).

A biogênese de cumarinas pode ser induzida em resposta a um estresse biótico e abiótico, por uma deficiência nutricional, por mensageiros químicos como os hormônios vegetais e por outros metabólitos externos (CABELLO-HURTADO *et al.*, 1998). As cumarinas escopoletina e aiapina, por exemplo, encontradas no girassol (*Helianthus annuus* L.), acumulam-se nos tecidos da planta após ter sofrido lesão mecânica, ataque por insetos ou inoculação com fungos. Tem sido mostrado que variedades de girassol com elevados níveis dessas cumarinas são resistentes ao ataque de insetos (CARMEN-GUTIERREZ *et al.*, 1995). No vegetal, compostos fenólicos incluindo as cumarinas, têm sido classificados como redutores da taxa de crescimento natural da planta, estando possivelmente envolvidos na regulação do desenvolvimento vegetal (KEFELI; KADYROV, 1971).

As cumarinas possuem inúmeras propriedades farmacológicas descritas na literatura, incluindo atividade antiinflamatória, antioxidante, antibacteriana, antiviral, antitrombótica, antimutagênica e vasodilatadora (HOULT; PAYÁ, 1996; PAYA; HALLIWEL; HOULT, 1992a).

As furanocumarinas são utilizadas desde épocas remotas para o tratamento de doenças da pele, tais como psoríase, hanseníase, vitiligo, leucoderma, micoses, dermatite e eczemas (DIAWARA; TRUMBLE, 1997). No vitiligo, o uso tópico ou oral é acompanhado por uma exposição controlada à radiação ultravioleta como forma de induzir a repigmentação da pele, porém sua utilização necessita de uma avaliação risco-benefício rigorosa (SIMÕES *et al.*, 2004). A furanocumarina mais utilizada é o metoxsaleno (8-metóxi-psoraleno), embora o trioxisaleno (trimetilpsoraleno) seja também empregado. A terapia consiste na ingestão da furanocumarina na dose única de 20 a 40 mg, seguida da irradiação da pele com luz UVA (320 a 380 nm) ou luz solar após 2 horas. A exposição à luz UVA pode ser inicialmente rápida (10 a 15 minutos) e progressivamente prolongada. Os resultados esperados são geralmente obtidos após 20 sessões. O tratamento localizado é possível, entretanto deve ser conduzido com precaução e acompanhado por especialistas, devido ao reconhecido potencial carcinogênico da terapia (GROOT; WEYLAND; NATER, 1994) e considerando os potenciais efeitos adversos, tais como catarata e degeneração actínica da pele (DIAWARA; TRUMBLE, 1997).

Uma série de dezesseis cumarinas simples foram testadas em diversos sistemas envolvendo espécies reativas de oxigênio para caracterizar seu perfil antioxidante (PAYÁ; HALLIWEL; HOULT, 1992a, 1992b; PAYA *et al.*, 1994). Estes experimentos foram

realizados pelos crescentes interesses nas espécies reativas de oxigênio e radicais livres derivados de oxigênio como causadores de dano tecidual e doenças humanas, e pela consciência de que os antioxidantes que neutralizam o estresse oxidativo podem exercer ações protetoras importantes (EMERIT; CHAUDIÈRE, 1989; HALLIWELL; GUTTERIDGE; CROSS, 1992). Também foi observado que várias das cumarinas fenólicas derivadas de plantas podem desempenhar um papel como antioxidantes na dieta humana via consumo de frutas e legumes.

Dez cumarinas testadas - 4-hidroxycumarina, 7-hidroxycumarina (umbeliferona), 7-metilcumarina, 7-metoxicumarina (hemiarina), 7-hidroxi-4-metilcumarina (4-metilumbeliferona), 7-metoxi-4-metilcumarina, 7-hidroxi-6-metoxicumarina (escopoletina), 7-hidroxi-6-O-glucosilcumarina (esculina), 7-hidroxi-6-metoxi-8-O-glucosilcumarina (fraxina) e 3,4-dihidrocumarina – não inibiram a peroxidação lipídica e os níveis de radicais superóxido ou o ácido hipocloroso, embora a maioria foi capaz de reagir rapidamente com os radicais hidroxila, e algumas - 4-hidroxycumarina, 7-hidroxi-6-metoxicumarina (escopoletina), 7-hidroxi-6-O-glucosilcumarina (esculina) e 7-hidroxi-6-metoxi-8-O-glucosilcumarina (fraxina) – eliminaram radicais alquil peroxi. Estas espécies reativas de oxigênio são geradas como resultado da atividade fagocitária descontrolada nos estados associados com a defesa antioxidante inadequada ou com o estresse oxidativo, como a sobrecarga de íons ferro, ou seguindo a ação de toxinas redox-ativas. De grande interesse foram os resultados obtidos com as seis cumarinas dihidroxiladas - 7,8-dihidroxi-6-metoxicumarina (fraxetina), 6,7-dihidroxycumarina (esculetina), 6,7-dihidroxi-4-metilcumarina (4-metilesculetina), 5,7-dihidroxi-4-metilcumarina, 7,8-dihidroxycumarina (dafnetina), 7,8-dihidroxi-4-metilcumarina (4-metildafnetina). Estes compostos inibiram a peroxidação lipídica microsomal dependente de  $Fe^{3+}$ -ascorbato assim como os radicais alquil peroxil aquosos, e também seqüestraram radicais ânions superóxido (HOULT; PAYÁ, 1996).

Em um ensaio duplo-cego randomizado em um grande grupo de pacientes com linfedema e elefantíase filiarítica crônica na Índia, a cumarina causou uma significativa redução de todos os graus da doença. Embora o efeito tenha sido lento, o baixo preço da droga, a baixa toxicidade e a capacidade de melhorar outros efeitos colaterais desagradáveis desta angustiante condição fazem com que seja uma escolha prática (CASLEY-SMITH; JAMAL, 1993).

Pacientes com linfedema pós-mastectomia do braço responderam a cumarina, com reduções graduais do inchaço acima de 10 meses, enquanto que, sem tratamento, o inchaço continuou a aumentar (CLODIUS; PILLER, 1982). Embora o mecanismo destes efeitos da

cumarina de início lento não seja claro, parece que eles não agem reduzindo a permeabilidade capilar. Em vez disso, tem sido sugerido que, devido a droga se tornar fortemente ligada às proteínas plasmáticas, é provável que seja transportada através de microvasos nos espaços teciduais (CASLEY-SMITH; WINDOW, 1976). Supõe-se que a droga e sua proteína transportadora são posteriormente fagocitadas pelos macrófagos, reduzindo proteína extravascular (e, portanto, diminuindo a pressão coloidal nos espaços teciduais). Outras evidências também apontam para a ativação de macrófagos e proteólise devido a enzimas lisossomais liberadas como uma explicação plausível para estes efeitos (CASLEY-SMITH; PILLER, 1974; CASLEY-SMITH; GAFFNEY, 1981). Recentemente Cheng *et al.* (2004) mostraram a bioatividade de uma série de cumarinas e sua estreita relação estrutura-atividade sobre a inibição da produção de TNF- $\alpha$ .

Um trabalho realizado por Leal *et al.*, (2000), teve como objetivo estudar, de maneira comparativa, as atividades antinociceptiva, antiinflamatória e broncodilatadora dos extratos hidroalcoólicos (EHAs) de *Torresea cearensis* Fr. All., *Justicia pectoralis* Jacq., *Eclipta alba* Hassk., *Pterodon polygaliflorus* Benth. e *Hybanthus ipecacuanha* Oken, plantas medicinais Brasileiras que têm a cumarina como um de seus constituintes ativos.

A administração oral dos extratos hidroalcoólicos destas plantas inibiu entre 21 a 55% as contorções abdominais induzidas por ácido acético. Efeitos semelhantes foram observados com a cumarina isolada. A administração oral dos extratos hidroalcoólicos reduziu o tempo de lambadura das patas em ambas as fases, no teste da formalina, que avalia ação nociceptiva. Todos os extratos exibiram melhores efeitos sobre a segunda fase da resposta nociceptiva. Já a cumarina isolada reduziu o tempo de lambadura das patas de maneira dose-dependente, causando inibições de 15 e 40% na primeira fase e de 43 e 69% na segunda fase da resposta nociceptiva, respectivamente. Os efeitos dos extratos e da cumarina foram parcialmente revertidos pela naloxona. O efeito antinociceptivo da cumarina ocorreu por mecanismos independentes da ativação de receptores opióides, enquanto, o óxido nítrico se mostrou importante na antinocicepção induzida pela cumarina. O EHA da *T. cearensis* por via oral reduziu o edema de pata induzido por carragenina em 48% na quarta hora. A cumarina causou inibições similares, de 22 a 44% no mesmo período. Os demais extratos produziram resultados significativos apenas por via intraperitoneal. Porém, no modelo do edema de pata induzido por dextrana, os extratos não causaram redução significativa. Em traquéia de porco da índia pré-contraída com carbachol, os EHAs e a cumarina causaram um relaxamento dose-dependente. Os melhores efeitos foram observados com *J. pectoralis* e *P.*

*polygaliflorus*. A cumarina e outros compostos (ex. taninos e flavonóides) são provavelmente os responsáveis pela atividade destas plantas (LEAL *et al.*, 2000).

Cumarinas, devido sua atividade vasodilatadora, podem ser utilizadas no tratamento da impotência masculina. Para ocorrer ereção, as artérias do pênis precisam dilatar para aumentar o fluxo de sangue. As cumarinas osthol, imperatorina, xantotoxina e isopimpinellina isoladas de frutos de *Cnidium monnieri* (L.) Cusson, uma planta chinesa usada na impotência masculina exibiram propriedades relaxantes em *corpus cavernosum* de coelhos com endotélio intacto (CHIOU *et al.*, 2001).

Para a escoparona (6,7-dimetóxi-cumarina), isolada da planta chinesa *Artemisia scoparia* Waldst. et Kit. (Asteraceae), foram apontadas atividades imunossupressora, relaxante vascular, hipolipidêmica e hipotensora. O ostol (7-metóxi-8-[3-metilpent-2-enil] cumarina) é uma das substâncias ativas isolada de *Angelica pubescens* Maxim. (Apiaceae), cujos extratos administrados por via endovenosa provocaram, em cães, uma resposta hipotensora de curta duração (HOULT; PAYÁ, 1996). Esta substância também inibiu a agregação plaquetária e demonstrou atividade relaxante das musculaturas lisa e cardíaca, possivelmente devido à inibição das enzimas cAMP- e cGMP-fosfodiesterases e do influxo de cálcio (NEUHAUS-CARLISLE; VIERLING; WAGNER, 1997). A atividade antiespasmódica de alguns extratos vegetais de espécies de *Viburnum* (Caprifoliaceae) tem sido atribuída ao teor de escopoletina e outras cumarinas (ROBBERS; TYLER; SPEEDIE, 1996). Do mesmo modo, diversas di-hidrofurano- e di-hidropiranocumarinas, isoladas de plantas da família Apiaceae, mostraram atividades vasodilatadora, espasmolítica e antitrombótica. Propriedades semelhantes foram também relatadas para uma cumarina sintética denominada cloricromeno (THASTRUP *et al.*, 1985).

A cumarina (1,2-benzopirona) é um composto orgânico heterocíclico, aromático, encontrado em várias espécies vegetais e foi isolada pela primeira vez a partir de *Dipteryx odorata* (fava-tonka), espécie denominada anteriormente *Coumarouna odorata*, daí o termo cumarina (FEUER, 1974). Muitos derivados cumarínicos simples possuem odor característico, destacando-se a substância isolada, cumarina, que foi amplamente utilizada como aromatizante em alimentos industrializados. No entanto, com base em dados sobre toxicidade hepática verificada em ratos, a agência americana *Food and Drug Administration* (FDA) classificou como substância tóxica, passando a considerar sua adição em alimentos como adulteração (Federal Register, v. 19, p. 1239, 03/1954); posteriormente, tal uso foi também banido na Europa. Por outro lado, a cumarina, pelas vantagens decorrentes do seu

odor acentuado, estabilidade e baixo custo, continua a ser amplamente utilizada nas indústrias de produtos de limpeza e cosméticos (SIMÕES *et al.*, 2004).

Na área de medicamentos destacam-se os derivados da 4-hidróxi-cumarina, descobertos durante a investigação de uma doença hemorrágica no gado alimentado com trevo-de-cheiro-amarelo fermentado (*Melilotus officinalis* Lam.), o que levou à descoberta da ação anticoagulante do dicumarol. Esse foi o primeiro fármaco com essa ação por via oral e constituiu o modelo para o desenvolvimento de uma classe de anticoagulantes com o núcleo básico da 4-hidróxi-cumarina, do qual derivam importantes fármacos como a varfarina, entre outros (HARDMAN; LIMBIRD, 1996).

Vários trabalhos vêm demonstrando os efeitos da cumarina sobre o sistema nervoso central. De acordo com Ariza *et al.* (2007), a cumarina aumentou significativamente, embora em menor grau que o diazepam (0,5 mg/kg, ip), o tempo de sono induzido por pentobarbital (40 mg/kg, ip); o diazepam também reduziu o período de latência. No sono induzido por éter, tanto a cumarina como o diazepam aumentaram significativamente o período de sono. Todavia, a cumarina não apresentou efeitos miorelaxantes no teste do arame que avalia efeitos miorelaxantes das drogas. Além disso apresentou efeito notório no teste de esconder esferas, que avalia atividade ansiolítica das drogas, sugestivo de um mecanismo relacionado à recaptação de serotonina (BORSINI; PODHORNÁ; MARAZZITI, 2002).

A cumarina também produziu resultados protetores no teste de convulsão por eletrochoque; em contrapartida, os resultados foram negativos no teste de convulsão por pentilenotetrazol (ARIZA *et al.* 2007). Grande parte dos anticonvulsivantes disponíveis no mercado, incluindo a fenitoína sódica e a carbamazepina, são ativos no modelo de convulsão por eletrochoque, um modelo de crises tônico-clônicas, e ineficazes frente ao pentilenotetrazol, modelo de crises de ausência (SWINYARD *et al.*, 1991). Isso fica claro já que se tratam de transtornos convulsivos de fisiopatogênese diferentes. Deveriam ser consideradas possíveis interações diretas ou indiretas da cumarina com canais de sódio voltagem-dependentes, tendo em vista a sua proteção frente a descarga por eletrochoque (TASSO *et al.*, 2004).

Derivados cumarínicos com efeitos centrais incluem: di-hidropiranocumarinas, que exerce efeitos neuroprotetores contra a excitotoxicidade do glutamato (KANG *et al.*, 2005) e furocumarinas (isoladas da raiz da *Psoralea corylifolia*) que mostraram possuir efeitos antidepressivos, associados com a inibição da MAO-A e MAO-B bem como inibição da superóxido dismutase e malondialdeído (CHEN *et al.*, 2005). Decursin e decursinol isolados das raízes da planta *Angelica gigas* mostraram atividades neuroprotetora e inibitória

da acetilcolinesterase *in vitro* e efeito anti-amnésico *in vivo* (KANG *et al.*, 2003, 2005). Em estudos preliminares, efeitos depressores foram obtidos em testes comportamentais, como o campo aberto, placa perfurada e labirinto em cruz elevado (KANG; KIM, 2007).

A cumarina é um composto em que a toxicidade depende do metabolismo pelo sistema enzimático P450 (CYP), podendo ser metabolizada por várias vias incluindo 3,4-epoxidação, 3-hidroxilação e 7-hidroxilação. Especificamente, as enzimas P450 das subfamílias 1A e 2E convertem a cumarina ao metabólito tóxico cumarina 3,4-epóxido (CE) (BORN *et al.*, 2002). O composto CE é instável e rearranja-se, com a perda de dióxido de carbono, a o-hidroxifenilacetaldeído, que pode ainda ser metabolizado a o-hidroxifeniletanol e a ácido o-hidroxifenilacético (BORN *et al.*, 1997; LAKE, 1999). Muitos estudos têm demonstrado que a 3,4-epoxidação da cumarina é a maior via de metabolismo em ratos e camundongos (BORN *et al.*, 2000, 2003). Em contrapartida, estudos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado que a 7-hidroxilação realizada pela CYP2A6 é a via mais importante do metabolismo da cumarina em humanos, com o ácido o-hidroxifenilacético (derivado da 3,4-epoxidação da cumarina) sendo apenas uma pequena parte do metabólito urinário da cumarina (MEINEKE *et al.*, 1998; PELKONEN *et al.*, 2000). De acordo com a espécie animal envolvida, a cumarina apresenta diferenças quanto ao seu metabolismo e ao grau de hepatotoxicidade em roedores e em humanos (LAKE, 1999).

Registros de efeitos tóxicos em seres humanos resultantes do tratamento com cumarina são raros. Há apenas um caso de hepatotoxicidade induzida pela cumarina no homem. Ocorreu com uma paciente de 33 anos com síndrome de Turner, após tratamento durante 8 semanas com um produto contendo cumarina. A função hepática retornou ao normal duas semanas após a interrupção do tratamento (FAURSCHOU, 1982).

O grupo de anticoagulantes, representado pela varfarina e análogos (cumarinas e indandionas), é o mais utilizado na atualidade e o mais frequentemente envolvido nas exposições e intoxicações registradas nos Centros de Controle de Intoxicações. As cumarinas e indandionas atuam pela inibição da enzima K<sub>1</sub> epóxido-redutase e vitamina K redutase do ciclo da vitamina K no fígado, que leva à depleção da vitamina KH<sub>2</sub>, forma ativa da vitamina K, e, conseqüentemente, à diminuição dos fatores da coagulação vitamina K dependentes (II, VII, IX e X), levando ao prolongamento do tempo de protrombina. Além disso, agem diretamente nos vasos, aumentando a permeabilidade capilar no organismo (OGA, 2003).

Estudos (GARTNER *et al.*, 1993; STRUWE; REINWEIN; STIER, 1984; ZIPPRICH; CANZLER; HUNSDORFER, 1987) revelaram que a terapia anticoagulante com derivados cumarínicos (4-hidroxicumarina), varfarina e dicumarol, durante a gravidez

pode causar malformações. Como são capazes de atravessar a placenta são contra-indicados durante a gestação, principalmente durante o terceiro trimestre, devido a seu efeito teratogênico (defeitos no sistema nervoso central, prematuridade e aborto espontâneo). A presença de varfarina já foi relatada no leite materno, porém sem atividade anticoagulante (ANDRADE FILHO; CAMPOLINA; DIAS, 2001)

Todas as espécies de *Melilotus* contêm, principalmente nas folhas jovens, o melilotosídeo (glicosídeo do ácido 2'-hidróxi-cinâmico), que se hidrolisa facilmente e, por lactonização, forma a cumarina. Além disso, contém ácido *o*-cumarínico e flavonóides. O dicumarol, um potente anticoagulante, pode ser obtido a partir do ácido *o*-hidróxi-cinâmico, e é também encontrado nas folhas imprópriamente fermentadas e nas inflorescências de *Melilotus officinalis*. Sob certas condições, tal como o acúmulo de mofo nas forragens, a cumarina é convertida no dicumarol, que interfere no mecanismo de coagulação sanguínea, conduzindo assim, a processos hemorrágicos. Os sintomas de envenenamento dos animais que comeram essa pastagem fermentada estão relacionados com a perda demasiada de sangue, surgindo edema sob a pele, devido o acúmulo de sangue e hemorragias internas, seguidas de choque e óbito (SIMÕES *et al.*, 2004).

As furanocumarinas, como a maioria das cumarinas, são substâncias que absorvem fortemente energia na região do ultravioleta (UV) e, por isso, são altamente reativas sob a incidência de luz. A faixa de comprimento de onda para essa fotorreatividade situa-se entre 300 e 400 nm (UVA). Após absorver um fóton, as furanocumarinas formam um estado triplete excitado, que pode reagir com moléculas, tais como as bases pirimídicas ou com o oxigênio no estado fundamental. Disso resulta a formação de oxigênio singlete ou oxirradicais tóxicos como os radicais superóxido e hidróxi. Essas moléculas podem reagir com DNA, RNA, proteínas e lipídios, ocasionando injúria das células que os contém. As furanocumarinas ligam-se às bases pirimídicas do DNA causando mutações citoplasmáticas. Essa capacidade das furanocumarinas de reagirem, quando fotoativadas, com os blocos construtores do organismo vivo, constitui a base para a compreensão de sua toxicidade para mamíferos, insetos, vírus, bactérias, fungos e até mesmo para outras plantas (DIAWARA; TRUMBLE, 1997).

A manifestação mais comum da toxicidade das furanocumarinas em mamíferos é a fitofotodermatite, uma reação epidérmica caracterizada por erupções bolhosas, hiperpigmentação, eritema e formação de vesículas. Elas alcançam a pele por contato direto com vegetais que as contém (frutas cítricas, por exemplo) ou por ingestão. A reação de fototoxicidade depende da concentração dos compostos cumarínicos existentes no vegetal em

questão e, também, da hipersensibilidade individual (DIAWARA; TRUMBLE, 1997). Quando utilizadas na terapia com luz ultravioleta (PUVA) para o tratamento de várias dermatoses em seres humanos, possui algumas desvantagens devido às reações adversas ocasionadas, tais como eritema, formação de bolhas, náuseas, prurido, dor de cabeça e depressão, o que provoca descontinuação do tratamento. O uso terapêutico dessas substâncias está relacionado à incidência de câncer de pele. A terapia PUVA é contra-indicada para mulheres grávidas e crianças, em casos de desordens cutâneas agravadas pela luz, e em casos de insuficiência renal e cardíaca (LINDELOF *et al.*, 1991).

## **2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA**

Doenças relacionadas ao Sistema Nervoso Central (SNC) têm-se mostrado cada vez mais comuns em meio à sociedade em que vivemos: ansiedade e depressão hoje estão entre as doenças mais comuns da humanidade. Assim, continua incessante a busca de alternativas para o tratamento de diversas patologias que envolvem este sistema, como doenças neurodegenerativas e convulsões.

A procura por medicamentos de origem vegetal tem conduzido a um renovado interesse farmacêutico em cumarinas e produtos naturais fenólicos relacionados, como os flavonóides, pelo fato dessas substâncias mostrarem atividades farmacológicas potentes e relevantes e ser de baixa toxicidade para mamíferos (HOULT; PAYÁ, 1996). Esta combinação desejável de propriedades sugere que as cumarinas poderiam ser de interesse farmacêutico. Apesar de poucos estudos realizados acerca das atividades centrais da cumarina, é de grande interesse que uma substância já utilizada na clínica, mesmo que para outras indicações, seja investigada quanto ao seu potencial no tratamento de doenças relacionadas ao SNC.

O interesse do Laboratório de Neurofarmacologia em estudar compostos isolados e biologicamente ativos, aliados a dados anteriores de possíveis efeitos centrais da cumarina, levou-nos a investigar esta substância.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Verificar os efeitos da cumarina no sistema nervoso central de camundongos, particularmente através do estudo das alterações comportamentais em diferentes modelos, já padronizados, de locomoção, ansiedade e depressão, e seu envolvimento com os sistemas glutamatérgico e dopaminérgico, bem como as alterações neuroquímicas produzidas no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos com o intuito de contribuir para o entendimento dos efeitos centrais da cumarina.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade motora dos animais submetidos ao tratamento com cumarina nos modelos de campo aberto e *rota rod*;
- Avaliar o nível de ansiedade de camundongos tratados com cumarina nos modelos de labirinto em cruz elevado e placa perfurada;
- Avaliar a atividade depressiva de camundongos tratados com cumarina no modelo de suspensão da cauda;
- Avaliar a participação do sistema gabaérgico sobre as ações centrais da cumarina;
- Avaliar a participação do sistema dopaminérgico sobre as ações centrais da cumarina;
- Estudar as alterações neuroquímicas produzidas no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos tratados com cumarina, através de determinações dos níveis de aminoácidos (GABA, glutamato, glicina e taurina).

## 4 MATERIAIS

### 4.1 Animais

Camundongos albinos (*Mus musculus*), variedade *Swiss Webster*, adultos, machos, pesando entre 25-30 g, provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, foram acondicionados em caixas de polipropileno, à temperatura de  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ , com ciclos de claro/escuro de 12 em 12 h, recebendo ração padrão (Purina Chow) e água *ad libitum*. Os protocolos experimentais utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFC (Protocolo nº 10 / 08).

### 4.2 Drogas e reagentes

<b>Drogas e reagentes</b>	<b>Origem</b>
Água destilada	Deionizador
Cumarina	Sigma, U.S.A.
Diazepam	União Química Brasil
Flumazenil	Sigma, U.S.A.
Haloperidol	União Química Brasil
Imipra® (Imipramina)	Cristália
Levodopa + carbidopa	Teuto
Tween 80 – Polyoxyethylene Sorbitan Mono-oleate	Sigma, U.S.A.
GABA, Glicina, Glutamato, Taurina	Sigma, U.S.A.

### 4.3 Equipamentos

<b>Equipamentos</b>	<b>Origem</b>
Balança analítica	Modelo H5, Mettler, Suíça.
Balança para animais	Filizola ID-1500 – (Brasil)
Banho Maria	Modelo 102/1, FANEN, SP, Brasil.
Campo Aberto para camundongos	Fabricação própria
Centrífuga refrigerada	Modelo 215 – <i>Fanem</i> (Brasil)

Cronômetros	Incoterm, Brasil
Deionizador USF	Elga, USA
Equipamento de HPLC (Cromatografia Líquida da Alta Performance) Detector de fluorescência e eletroquímico	Shimadzu, Japão
Freezer (-75°C)	Legacy Sistem, U.S.A
Guilhotina	Harvard, USA
Homoginizadores manuais	Bellico, USA
Labirinto em cruz elevado para camundonogs	Fabricação própria
Material cirúrgico	
Micropipetas, H.E.	Pedersen, Dinamarca
Placa Perfurada	Ugo Basile, Italy
Equipamento do <i>Rota Rod</i>	Ugo Basile, Italy
Sonicador	Modelo PT 10-35. Brinkmann Instruments Inc. NY, USA

## 5 MÉTODOS

### 5.1 Tratamento farmacológico dos grupos experimentais

Antes dos experimentos, os animais foram colocados num ambiente fechado, desprovido de barulho externo e com a temperatura constante ( $24 \pm 1^\circ \text{C}$ ), de modo que se adaptassem com o ambiente do experimento e separados por grupos que variavam de 5 a 8 animais.

Os testes do campo aberto e *rota rod* foram realizados com os mesmos grupos de animais da maneira descrita a seguir: primeiramente os animais, um por vez, foram colocados no campo aberto onde foram avaliados durante 5 minutos e, em seguida, foram transferidos para o *rota rod*, onde a atividade foi registrada por 1 minuto. Os outros testes comportamentais tais como, labirinto em cruz elevado, placa perfurada e suspensão da cauda, foram realizados com diferentes grupos de animais. Em todos os testes, com exceção da suspensão da cauda, após a observação de cada animal, foi utilizado álcool 10% para a remoção de resíduos e odores do animal.

Para os estudos neuroquímicos, os animais foram tratados com cumarina, de forma aguda, nas doses de 20 ou 40 mg/kg através da via intraperitoneal (i.p.). Os animais foram submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado 30 min após o tratamento. Para a avaliação da atividade ansiolítica foi utilizado diazepam 1 mg/kg, i.p.

A cumarina foi dissolvida com Tween 80 a 2% e diluída em água deionizada, obtendo-se a concentração final de 0,5, 2,0 ou 4,0 mg/mL para ser administrada nas doses 5, 20 ou 40 mg/kg, respectivamente. Os grupos controles receberam veículo (água deionizada emulsificada a 2% com Tween 80). As drogas utilizadas ao longo dos experimentos tais como, diazepam (1 e 2 mg/kg), flumazenil (2,5 mg/kg), imipramina (30 mg/kg), haloperidol (0,1 mg/kg) ou levodopa + carbidopa (400 mg/kg) foram dissolvidas e diluídas diretamente em água deionizada. O volume total de solução administrada nos animais foi de 10 mL/kg.

### 5.2 Preparação das soluções reagentes para o HPLC

#### 5.2.1 Fase Móvel A para detecção fluorimétrica de aminoácidos em HPLC

Foram utilizados 50 mM de ácido perclórico em 20% de metanol (v/v), ajustado para um pH de 5,5 no volume final de 250 mL.

### **5.2.2 Fase Móvel B para detecção fluorimétrica de aminoácidos em HPLC**

Foi utilizado metanol puro grau HPLC.

### **5.2.3 Preparo do Reagente de Derivatização**

Foram pesados 6,75 mg de *O-Phthaldialdehyde* (OPA) e adicionada em 125  $\mu$ L de etanol 99% e em 5  $\mu$ L de 2-mercaptoetanol e adicionado em seguida 1,125 mL de tampão borato. Todo este procedimento foi realizado em capela com exaustor. Esta solução de derivatização foi deixada por 24 horas em repouso e em uma temperatura em torno de 20°C. Após este período, a solução foi utilizada no máximo por duas semanas, e após a primeira semana foi adicionado 5  $\mu$ L de 2-mercaptoetanol. O tampão borato foi feito com 1,24 g de bórax em água miliQ num volume final de 50 mL e ajustado o pH para 9,3 com hidróxido de sódio.

### **5.2.4 Preparo dos padrões dos aminoácidos**

Todos os aminoácidos foram preparados na concentração de 2,5 mmol/L ou 2,5 mM. GABA, glutamato, glicina e taurina foram solubilizados em ácido perclórico 0,1M. O ácido perclórico foi preparado adicionando 1,8 mL do ácido e completado o volume para 300 mL com água mili-Q.

### **5.2.5 Método de utilização do HPLC**

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

existem diferenças na adsorção pelo sólido. Os detectores eletroquímicos pedem a condutância de eluente, ou a corrente associada com a oxidação ou redução dos solutos. Para ser capaz de detectar, no primeiro caso os solutos devem ser iônicos, e no segundo caso os solutos devem ter a característica de serem relativamente fáceis de se oxidarem ou reduzirem.

Detectores eletroquímicos que medem corrente associada com a redução ou oxidação de soluto são chamados detectores amperométricos ou colorimétricos. Neste estudo, foi utilizado o tipo amperométrico que reage com uma quantidade muito menor de soluto, em torno de 1 %. Todas as técnicas eletroquímicas envolvem a aplicação de um potencial para um eletrodo (geralmente de carbono vítreo), oxidação da substância que está sendo estudada próximo à superfície do eletrodo, seguindo a amplificação e medida da corrente produzida. As catecolaminas são oxidadas nos grupos de anel hidroxil para conduzir em derivado ortoquinona com a liberação de dois elétrons.

Uma coluna CLC-ODS(M) com comprimento de 15 cm, calibre 4,6 mm e diâmetro de partícula de 3 µm. da Shimadzu-Japão, foi utilizada. A fase móvel foi utilizada em gradiente utilizando duas fases: A- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (50 mM) e metanol (20% v/v), em pH 5,5; B- metanol puro (100 %). Ácido γ-aminobutírico (GABA), Glutamato (GLU), Glicina (GLI) e Taurina (TAU) foram detectados usando um detector de fluorescência (Modelo RF-535 da Shimadzu, Japão) com comprimento de ondas de EX-Wavelength (370 nm) e EM-Wavelength (450 nm). Os cromatogramas foram registrados e quantificados por um computador usando um software da Shimadzu. A quantidade dos aminoácidos foi calculada por comparação da altura dos picos obtidos com a média dos padrões e os resultados foram expressos em µg/g de tecido.

## **ESTUDOS FARMACOLÓGICOS**

### **5.3 Avaliação da atividade sedativa, ansiolítica e antidepressiva da cumarina em camundongos**

#### **5.3.1 Determinação da atividade locomotora da cumarina no teste do campo aberto**

Camundongos divididos em grupos de 5 a 10 animais, foram utilizados para determinar a atividade da cumarina em nível de SNC, conforme descrito abaixo.

Um campo aberto, confeccionado em acrílico (paredes transparentes e piso preto, 30 x 30 x 15 cm) dividido em 9 quadrantes iguais foi utilizado para avaliar a atividade

exploratória dos animais: sua movimentação espontânea (número de cruzamentos, com as quatro patas, entre as divisões do campo), o número de comportamentos de auto-limpeza (“*grooming*”) e de levantar (“*rearing*”) registrados durante um período de 4 minutos, após 1 minuto de habituação (ARCHER, 1973). O teste foi realizado 30 minutos após o tratamento com CUM (5, 20 e 40 mg/Kg, i.p.), com veículo (2 % de Tween 80 em água destilada, 10 mL/Kg, i.p.) ou diazepam (2 mg/Kg, i.p.). A tendência natural do animal em um ambiente novo é a de explorá-lo, apesar do conflito com o medo provocado pela situação nova (MONTGOMERY, 1955). Assim, esse teste permite uma avaliação da atividade estimulante ou depressora de um dado composto, podendo ainda indicar atividades mais específicas como a ansiolítica.

### **5.3.2 Avaliação da coordenação motora no teste do *rota rod***

Camundongos divididos em grupos de 4-8 animais, foram tratados com cumarina nas doses de 5, 20 e 40 mg/kg, via i.p., veículo (2 % de Tween 80 em água destilada, 10 mL/Kg, i.p.) ou diazepam (1 mg/Kg, i.p.) como controle positivo, 30 min antes do teste. O aparelho é constituído de uma barra de 2,5 cm de diâmetro, subdividida em compartimentos de igual largura, colocada a 25 cm de altura e girando a 12 r.p.m. Os animais são selecionados, 24 h antes do teste, em sessões de 2 min de duração, antes da administração da substância em estudo, sendo escolhidos aqueles que permanecerem na barra giratória por esse período. Os animais selecionados receberam o tratamento no dia do teste e, após 30 min foram colocados no *rota rod* por 1 min. Foi registrado o tempo de permanência na barra giratória (em segundos), com três reconduções, no máximo, à barra. É também possível registrar o número de quedas no período, se não se limitar o número de reconduções à barra. Este teste permite avaliar se os tratamentos promovem incoordenação motora nos animais, por sedação e/ou relaxamento muscular.

### **5.3.3 Determinação da atividade ansiolítica da cumarina no teste da placa perfurada (*hole board*)**

O *hole board* consiste numa caixa quadrada de acrílico preto (50 x 50 cm) a 10 cm de altura, com 16 orifícios de 2 cm de diâmetro, equidistantes uns dos outros e das bordas. Foi registrado durante 5 minutos o número de vezes que os animais espreitaram os orifícios, usando-se como condição mínima de espreitamento a colocação da cabeça nos orifícios até o

nível das orelhas dos animais para avaliação de possível ação ansiolítica/ansiógênica da cumarina. Um aumento no número e no tempo despendido espreitando os orifícios implica numa maior atividade exploratória ou uma ação ansiolítica, assim como uma redução nos três parâmetros, quando comparados aos valores do grupo controle, é compatível com uma ação sedativa (FILE; PELLOW, 1985).

#### **5.3.4 Determinação da atividade ansiolítica da cumarina no 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. Uma hora (v.o.) ou meia hora (i.p.) após os tratamentos ou o veículo, os camundongos foram colocados no centro do aparelho com a cabeça voltada para um dos braços fechados e o seu comportamento observado por 5 min (PELLOW *et al.*, 1985).

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 é obtida pela soma simples das frequências de entradas nos braços abertos e nos fechados. 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), e o inverso é verdade para compostos ansiógênicos. O número de entradas nos braços fechados avalia a atividade motora dos animais (RODGERS *et al.*, 1997).

#### **5.3.5 Avaliação do envolvimento do sistema GABAérgico no efeito sedativo da cumarina no teste do campo aberto**

Uma provável interação existente entre a cumarina e o flumazenil, um antagonista competitivo dos benzodiazepínicos, foi verificado utilizando o modelo do campo aberto, conforme descrito no item anterior, em tratamento agudo por via intraperitoneal em camundongos. Camundongos foram separados em grupo que variaram de 6 a 10 animais por

grupo. Os grupos foram selecionados da seguinte forma: Controle (Tween 80 a 2%), CUM 40, Diazepam 1mg/kg, Flumazenil 2,5 mg/kg, Flumazenil + Diazepam ou Flumazenil + Cumarina. Todos os grupos foram tratados por via intraperitoneal e 30 minutos depois os animais foram colocados na arena. Os animais tratados com flumazenil receberam 15 minutos depois a cumarina ou Diazepam.

### **5.3.6 Avaliação do envolvimento do sistema GABAérgico no efeito da cumarina no teste da placa perfurada**

Uma provável interação existente entre a cumarina e o flumazenil, um antagonista competitivo dos benzodiazepínicos, foi verificado utilizando o modelo da placa perfurada, conforme descrito no item anterior, em tratamento agudo por via intraperitoneal em camundongos. Os grupos foram selecionados da seguinte forma: Controle (Tween 80 a 2%), cumarina 40, Diazepam 1mg/kg, Flumazenil + Diazepam ou Flumazenil + Cumarina. Todos os grupos foram tratados por via intraperitoneal e 30 minutos depois os animais foram colocados na arena. Os animais tratados com flumazenil receberam 15 minutos depois a cumarina ou o Diazepam.

### **5.3.7 Avaliação do envolvimento do sistema dopaminérgico no efeito central da cumarina no teste do campo aberto**

Uma provável interação existente entre a cumarina, o haloperidol, um agente bloqueador dopaminérgico, e a levodopa foi verificado utilizando o modelo do campo aberto, conforme descrito anteriormente, em tratamento agudo por via intraperitoneal em camundongos. Os grupos foram selecionados da seguinte forma: Controle (Tween 80 a 2%), Cumarina 40, levodopa + carbidopa 400 mg/kg, Haloperidol 0,1 mg/kg, Haloperido + Levodopa, Cumarina + Levodopa e Cumarina + Haloperidol. Todos os grupos foram tratados por via intraperitoneal e 30 minutos depois os animais foram colocados na arena, exceto o grupo Levodopa, tratado por via oral e testado após 1 hora. Os animais tratados com haloperidol receberam 30 minutos depois a cumarina.

### **5.3.8 Avaliação do envolvimento do sistema dopaminérgico no efeito da cumarina no teste da placa perfurada**

Uma provável interação existente entre a cumarina e o haloperidol, um agente bloqueador dopaminérgico, foi verificado utilizando o modelo da placa perfurada, conforme descrito anteriormente, em tratamento agudo por via intraperitoneal em camundongos. Os grupos foram selecionados da seguinte forma: Controle (Tween 80 a 2%), Cumarina 40, Levodopa 400 mg/kg, Haloperidol 0,1 mg/kg, Levodopa + Haloperidol, Cumarina + Haloperidol e Cumarina + Levodopa. Todos os grupos foram tratados por via intraperitoneal e 30 minutos depois os animais foram colocados na arena, exceto o grupo Levodopa, tratado por via oral e testado após 1 hora. Os animais tratados com haloperidol receberam 30 minutos depois a cumarina.

### **5.3.9 Avaliação da atividade antidepressiva da cumarina no teste da suspensão da cauda**

Trata-se de uma modificação do teste proposto por Stéru *et al.* (1985) para avaliar possíveis ações antidepressivas. O procedimento experimental consiste em suspender os animais pela cauda, por um período de 6 min, no qual é registrado o tempo total de imobilidade para cada animal, além da latência para a apresentação de tal comportamento, a partir do segundo minuto. Os antidepressivos em geral aumentam a latência para a imobilidade e reduzem o tempo de imobilidade apresentado pelos animais (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002).

## **ESTUDOS NEUROQUÍMICOS**

### **5.4 Dissecção das áreas cerebrais (Córtex pré-frontal e hipocampo)**

Logo após os testes comportamentais os animais foram sacrificados por rápida decapitação e os encéfalos foram retirados rapidamente e colocados sobre papel alumínio em uma placa de Petri com gelo.

Para a retirada do córtex pré-frontal (CPF), a porção anterior dos lobos frontais (em torno de 1,5 mm a partir do bulbo olfatório) foi removida e feita uma secção bilateral com o auxílio de uma tesoura de microdissecção (MACHADO, 2000).

Como as áreas corticais dos camundongos são geralmente menos evoluídas, menos diferenciadas e menos segregadas que o córtex cerebral de primatas existia uma controvérsia na literatura se realmente primatas e roedores possuíam córtex frontal. A conclusão (UYLINGS; GROENEWEGEN; KOLB, 2003) é que estes animais possuem um córtex frontal que pode ser definido anatomicamente e funcionalmente como córtex pré-frontal, o qual é subdividido em uma região orbital-símile e outra região que pode incluir as estruturas dorsolateral e anterior cingulado-símile.

Após a retirada do CPF, acompanhando a fissura sagital mediana, a camada cortical cerebral foi retirada das leptomeninges com o auxílio de uma pinça reta de microdissecação, a qual, progredindo delicada e tangencialmente aos ventrículos laterais, divulsionou o córtex em toda a sua extensão fronto-occipital. O córtex já divulsionado foi rebatido para os lados, expondo parte do hipocampo. O hipocampo (HC) foi isolado das estruturas circunjacentes por divulsionamento com uma tesoura de microdissecação.

Terminada a dissecação, cada área (CPF e HC) foi colocada em papel alumínio sobre gelo devidamente identificada, pesada e conservada a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  para uso posterior. Quando necessária a estocagem por um certo período de tempo (no máximo 3 meses a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) os tecidos foram considerados como tendo a mesma viabilidade para experimentação que os ensaiados imediatamente ou 24 h após a dissecação (BURKE; GREENBAUN, 1987).

### **5.5 Doseamento de aminoácidos em homogenatos de áreas cerebrais (córtex pré-frontal e hipocampo) de camundongos tratados com cumarina**

Os camundongos foram tratados de forma aguda com solução controle (Tween 80 A 2%), CUM 20 ou 40 mg/kg, i.p. ou Diazepam (1 mg/kg, i.p.). Logo após os testes comportamentais eles foram sacrificados por decapitação em guilhotina e as regiões cerebrais foram imediatamente removidas e colocadas em papel alumínio sobre uma placa de Petri conservada em gelo. O córtex pré-frontal e o hipocampo foram dissecados como descrito anteriormente. Foi feito um tampão utilizando um volume de 10% da área cerebral com 0,1 M de ácido perclórico e uma alíquota de 20  $\mu\text{L}$  foi derivatizada com a mesma quantidade de reagente de derivatização (solução alcoólica de *o*-ftaldialdeído na presença de 2-mercaptoetanol) e, em seguida injetado na coluna do HPLC (*high performance liquid chromatography*), para detecção fluorimétrica por um gradiente de concentração. As concentrações de aminoácidos foram determinadas utilizando curvas padrão para cada aminoácido e os resultados foram expressos em  $\mu\text{g/g}$  de tecido.

## 5.6 Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada através do software GraphPad Prism versão 5.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego California EUA.

Os resultados que obedeciam a uma distribuição paramétrica foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) seguido pelo teste de Student Newman Keuls (*post hoc*). Os dados não-paramétricos foram analisados pelo mesmo programa utilizando o teste Kruskal - Wallis seguido pelo teste de Dunns (*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 ( $p < 0,05$ ).

## 6 RESULTADOS

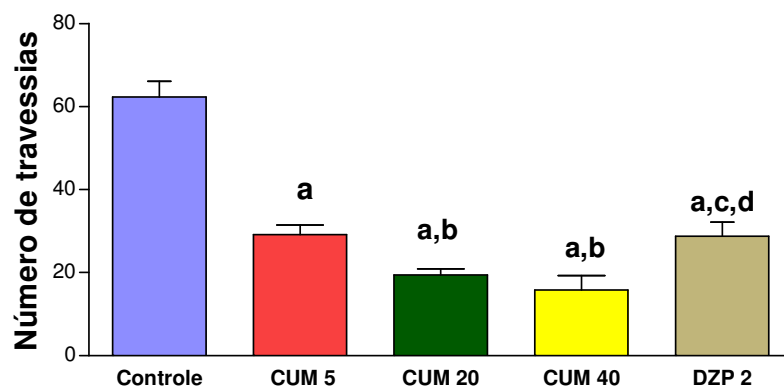
### ESTUDOS FARMACOLÓGICOS

#### 6.1 Determinação da atividade sedativa da cumarina no teste do campo aberto

A atividade locomotora espontânea (ALE), *rearing* e *grooming* foram os parâmetros analisados e os resultados foram expressos como número de travessias, de *rearing* e *grooming*. A cumarina em todas as doses utilizadas [5mg/kg:  $29,02 \pm 7,07$  (10); 20mg/kg:  $19,4 \pm 4,69$  (10); 40mg/kg:  $15,83 \pm 8,4$  (6)] diminuiu a atividade locomotora [F(4,40)= 44,45;  $p < 0,0001$ ] quando comparada ao controle [ $62,3 \pm 11,97$  (10)]. Nas doses maiores, a cumarina reduziu a atividade locomotora em comparação com o grupo do diazepam (**Figura 2**). O diazepam 2 mg/kg, i.p., usado como droga padrão, reduziu a atividade locomotora em relação aos controles. [DZP-2:  $28,8 \pm 7,53$  (5); controle:  $62,3 \pm 11,97$  (10)].

De maneira semelhante a cumarina diminuiu o número de *rearing* [F(4,44)= 18,62;  $p < 0,0001$ ] em todas as doses utilizadas [5mg/kg:  $19,8 \pm 4,42$  (10); 20mg/kg:  $10,0 \pm 6,24$  (10); 40mg/kg:  $4,0 \pm 5,27$  (10)] quando comparado com o controle [ $26,2 \pm 10,94$  (10)]. Da mesma forma, diazepam 2 mg/kg, i.p. também diminuiu o número de *rearing* [DZP-2:  $4,2 \pm 1,3$  (5)] comparando com o controle [ $26,2 \pm 10,94$  (10)] (**Figura 3**)

Quanto ao número de *grooming* (**Figura 4**), a cumarina somente diminuiu esse parâmetro nas maiores doses [20mg/kg:  $1,4 \pm 1,26$  (10); 40mg/kg:  $1,0 \pm 0,93$  (8)] comparando com os controles [ $2,8 \pm 1,23$  (10)]. Diazepam 2 mg/kg, i.p., também diminuiu este parâmetro [DZP-2:  $1,6 \pm 1,14$  (5)] comparando com o grupo controle [ $2,8 \pm 1,23$  (10)].



**FIGURA 2** - Efeito da cumarina e diazepam sobre a atividade locomotora espontânea no teste do campo aberto. Controle (veículo), cumarina (CUM: 5, 20 ou 40 mg/kg) ou diazepam (DZP: 2 mg/kg) (i.p.) foram administrados 30 min antes do experimento. Os valores da figura representam a média  $\pm$  EPM do número de travessias durante 5 min. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos com  $p < 0,05$ . a, b, c e d comparados ao controle, cumarina CUM 5, CUM 20 e CUM 40, respectivamente.

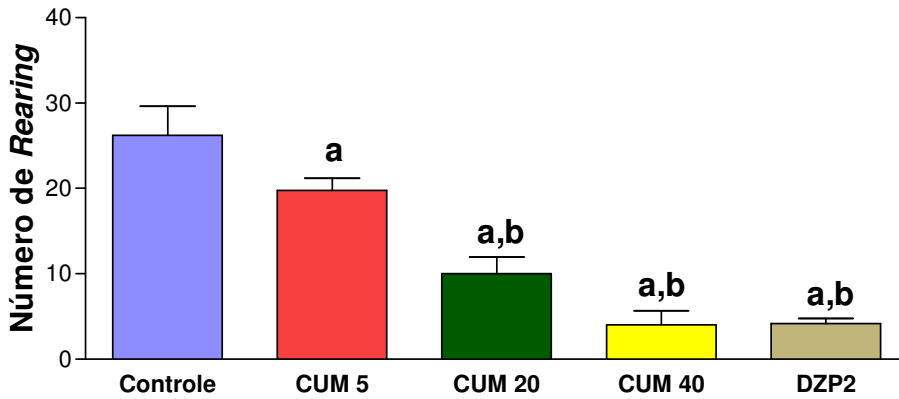


FIGURA 3 - Efeito da cumarina e diazepam sobre o número de *rearing* no teste do campo aberto. Controle (veículo), cumarina (CUM: 5, 20 ou 40 mg/kg) ou diazepam (DZP: 2 mg/kg) (i.p.) foram administrados 30 min antes do experimento. Os valores da figura representam a média ± EPM do número de *rearing* durante 5 min. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos com  $p < 0,05$ . a, b, c e d comparados ao controle, CUM 5, CUM 20 e CUM 40, respectivamente.

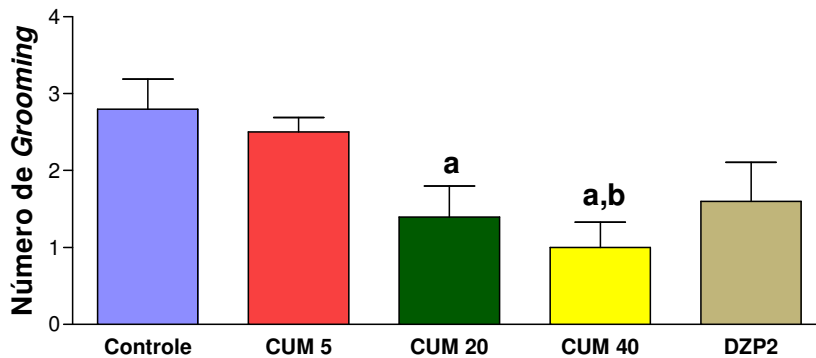


FIGURA 4 - Efeito da cumarina e diazepam sobre o número de *grooming* no teste do campo aberto. Controle (veículo), cumarina (CUM: 5, 20 ou 40 mg/kg) ou diazepam (DZP: 2 mg/kg) (i.p.) foram administrados 30 min antes do experimento. Os valores da figura representam a média ± EPM do número de *grooming* durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos com  $p < 0,05$ . a e b quando comparados ao controle e CUM 5, respectivamente.

## 6.2 Determinação de alterações na coordenação motora dos animais pelo teste do *Rota Rod*

Os animais tratados com cumarina nas doses de 5, 20 ou 40mg/kg não apresentaram alterações significativas ( $p > 0,05$ ) no número de quedas (**Tabela 1**) [(NQ) 5mg/kg:  $0,8 \pm 1,09$  (5); 20mg/kg:  $2,0 \pm 1,41$  (5); 40mg/kg:  $0,5 \pm 1,0$  (4)] ou no tempo de permanência na barra (**Tabela 2**), em segundos, [(TP) 5mg/kg:  $54,2 \pm 7,95$  (5); 20mg/kg:  $37,2 \pm 18,78$  (5); 40mg/kg:  $58,2 \pm 4,02$  (5)] em relação ao grupo controle [(NQ) controle:  $0,4 \pm 0,55$  (5); (TP) controle:  $53,8 \pm 7,36$  (5)].

Como padrão positivo, o diazepam 2 mg/kg, i.p. aumentou o número de quedas (NQ) e diminuiu o tempo de permanência (TP) na barra quando comparado ao grupo controle (NQ:  $2,50 \pm 0,19$  (8); TP:  $35,25 \pm 0,67$  (8)) (**Tabelas 1 e 2**).

**TABELA 1 - Efeito da cumarina sobre o número de quedas e o tempo de permanência na barra no teste do *rota rod*.**

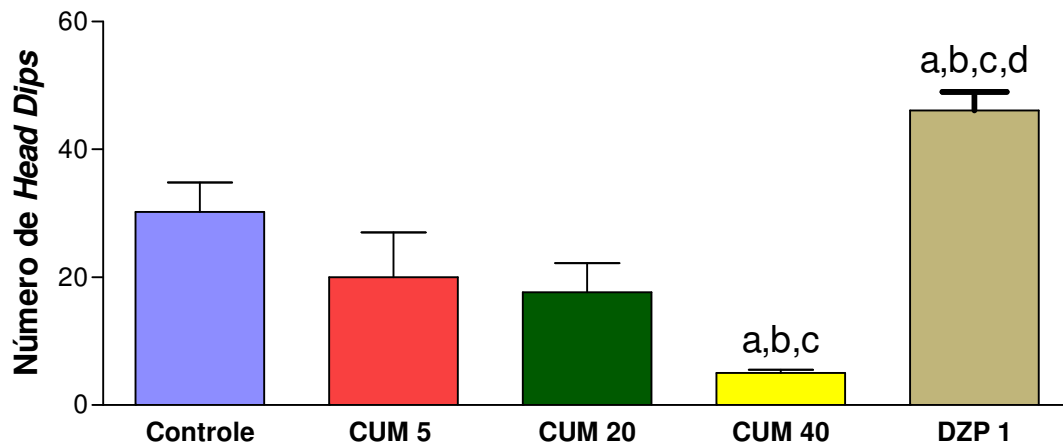
Grupo	Dose (mg/kg)	Número de Quedas	Tempo de Permanência (s)
Controle	-	$0,4 \pm 0,55$ (5)	$53,8 \pm 7,36$ (5)
CUM	5	$0,8 \pm 1,09$ (5)	$54,2 \pm 7,95$ (5)
CUM	20	$2,0 \pm 1,41$ (5)	$37,2 \pm 18,78$ (5)
CUM	40	$0,5 \pm 1,0$ (4)	$58,2 \pm 4,02$ (5)
DZP	2	$2,50 \pm 0,19$ (8)*	$35,25 \pm 0,67$ (8)

Os valores representam a média  $\pm$  EPM do número de quedas. O número de animais está representado entre parênteses. Para análise estatística foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido por Dunns como teste *post hoc*. Valores significativos: \* $p < 0,05$  vs controle.

## 6.3. Determinação da atividade ansiolítica da cumarina no teste da placa perfurada (*hole board*)

Neste modelo experimental, após a administração aguda de cumarina na dose de 40 mg/kg, i.p., foi observada uma significativa diminuição do número de vezes que o animal colocou a cabeça no orifício da placa perfurada (*head dips*) [ $F(4,31) = 19,51$ ;  $p < 0,0001$ ] [5mg/kg:  $20,0 \pm 7,05$  (5); 20mg/kg:  $17,67 \pm 4,56$  (6); 40mg/kg:  $5,0 \pm 0,53$  (8)] quando comparado ao grupo controle [ $30,2 \pm 4,64$  (5)] (**Figura 5**).

O efeito do diazepam (DZP) 1 mg/kg, i.p., administrado 30 min antes do teste da placa perfurada é também mostrado na **Figura 5**. Comparado ao grupo controle, os animais tratados com diazepam manifestaram um aumento do número de *head dips*, [DZP-1:  $46,13 \pm 2,89$  (8)].



**FIGURA 5** - Efeito da cumarina e diazepam sobre o número de *head dips* no teste da placa perfurada. Controle (veículo), cumarina (CUM: 5, 20 e 40 mg/kg, i.p.) ou diazepam (DZP; 1 mg/kg,i.p.) (i.p.) foram administrados 30 min antes do experimento. Os valores representam a média  $\pm$  EPM do número de *head dips* durante 5 min. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos com  $p < 0,05$ . a, b, c e d comparados ao controle, CUM 5, CUM 20 e CUM 40, respectivamente.

#### 6.4. Determinação da atividade ansiolítica da cumarina no teste do labirinto em cruz elevado

O tratamento agudo com as doses de 5, 20 ou 40 mg/kg, i.p. de cumarina diminuiu o NEBA [ $F(4,43) = 21,69$ ;  $p = 0,0001$ ] no teste do labirinto em cruz elevado (**Figura 6**) nas maiores doses [20 mg/kg:  $4,11 \pm 0,59$  (9); 40 mg/kg:  $2,89 \pm 0,45$  (9)] comparando com o controle [ $6,11 \pm 0,56$  (9)], assim como diminuiu TPBA [ $F(4,44) = 12,21$ ;  $p < 0,0001$ ] (**Figura 7**) em todas as doses [5 mg/kg:  $73,33 \pm 8,9$  (9); 20 mg/kg:  $64,22 \pm 8,37$  (9); 40 mg/kg:  $37,44 \pm 6,12$  (9)] comparando com o controle [ $119 \pm 18,32$  (10)]. Também foi observada uma diminuição no PEBA [ $F(4,43) = 7,73$ ;  $p = 0,0001$ ] (**Figura 8**) e PTBA [ $F(4,43) = 19,43$ ;  $p < 0,0001$ ] (**Figura 9**) com as doses de cumarina [PEBA= 5 mg/kg:  $37,44 \pm 3,05$  (9); 20 mg/kg:  $40,98 \pm 4,59$  (9); 40 mg/kg:  $34,11 \pm 3,99$  (9); controle:  $54,14 \pm 4,28$  (9); PTBA= 5 mg/kg:  $23,78 \pm 3,01$  (9); 20 mg/kg:  $24,01 \pm 3,31$  (8); 40 mg/kg:  $14,13 \pm 2,18$  (9); controle:  $44,5 \pm 6,45$  (10)].

Diazepam 1 mg/kg aumentou todos os parâmetros: NEBA [9,0 ± 0,33 (8)]; TPBA [136,1 ± 8,18 (8)]; PEBA [57,71 ± 1,53 (8)] e PTBA [61,81 ± 4,13 (8)] em relação aos controles (Figuras 6, 7, 8 e 9).

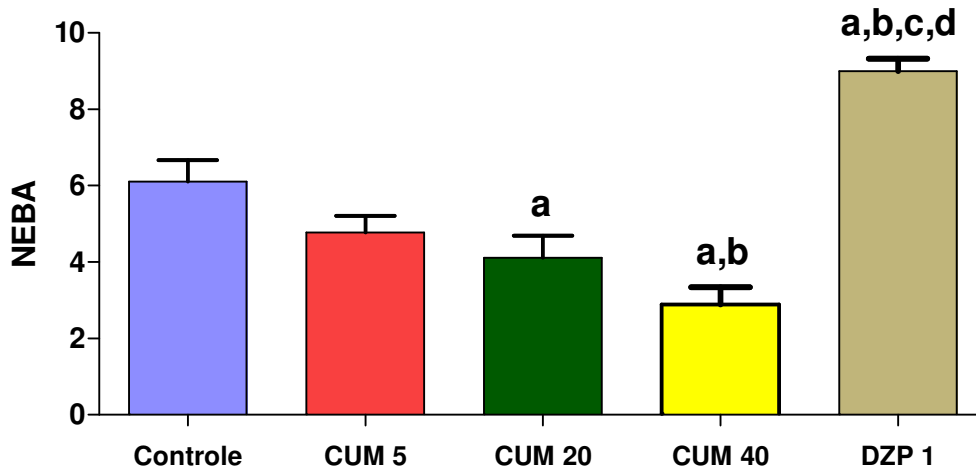


FIGURA 6 - Efeito da cumarina e diazepam sobre o número de entradas nos braços abertos (NEBA) no teste do labirinto em cruz elevado. Controle (veículo), cumarina (5, 20 ou 40 mg/kg, i.p.) ou diazepam (DZP: 1 mg/kg) (i.p.) foram administrados 30 min antes do experimento. Os valores representam a média ± EPM do número de entradas nos braços abertos (NEBA) durante 5 min. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos  $p < 0.05$ . a, b, c e d comparados ao controle, CUM 5, CUM 20 e CUM 40, respectivamente.

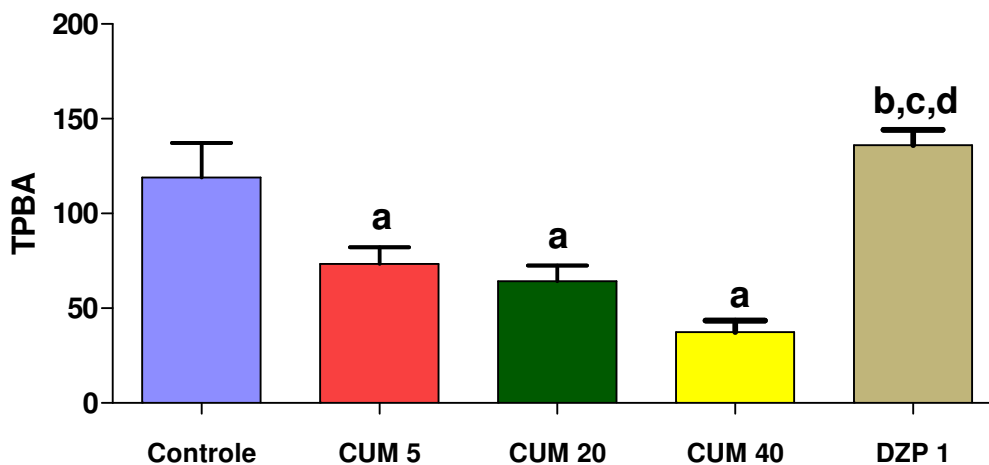


FIGURA 7 - Efeito da cumarina e diazepam sobre o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) no teste do labirinto em cruz elevado. Controle (veículo), cumarina (5, 20 ou 40 mg/kg, i.p.) ou diazepam (DZP: 1 mg/kg, i.p.) foram administrados 30 min antes do experimento. Os valores representam a média ± EPM do tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) durante 5 min. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos  $p < 0.05$ . a, b, c e d comparados ao controle, CUM 5, CUM 20 e CUM 40, respectivamente.

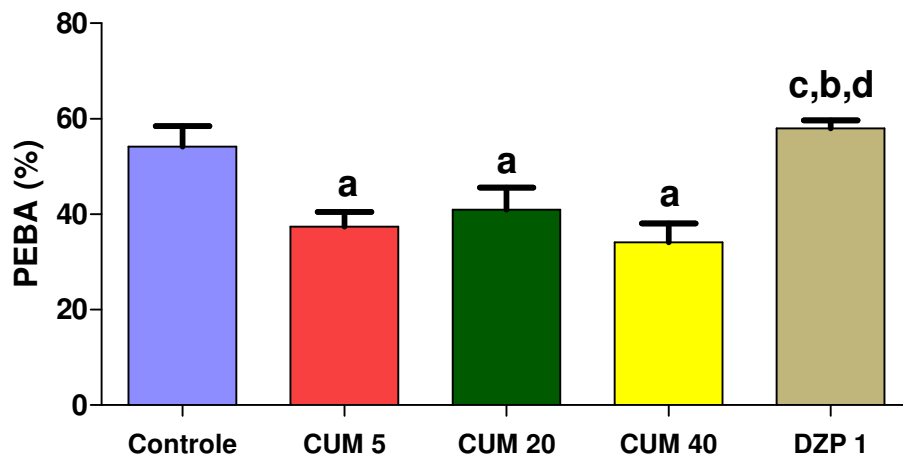


FIGURA 8 - Efeito da cumarina e diazepam sobre a percentagem de entrada nos braços abertos (PEBA) no teste do labirinto em cruz elevado. Controle (veículo), cumarina (5, 20 ou 40 mg/kg, i.p.) ou diazepam (DZP: 1 mg/kg, i.p.) foram administrados 30 min antes do experimento. Os valores representam a média  $\pm$  EPM da percentagem de entrada nos braços abertos (PEBA) durante 5 min. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos  $p < 0.05$ . a, b, c e d comparados ao controle, CUM 5, CUM 20 e CUM 40, respectivamente.

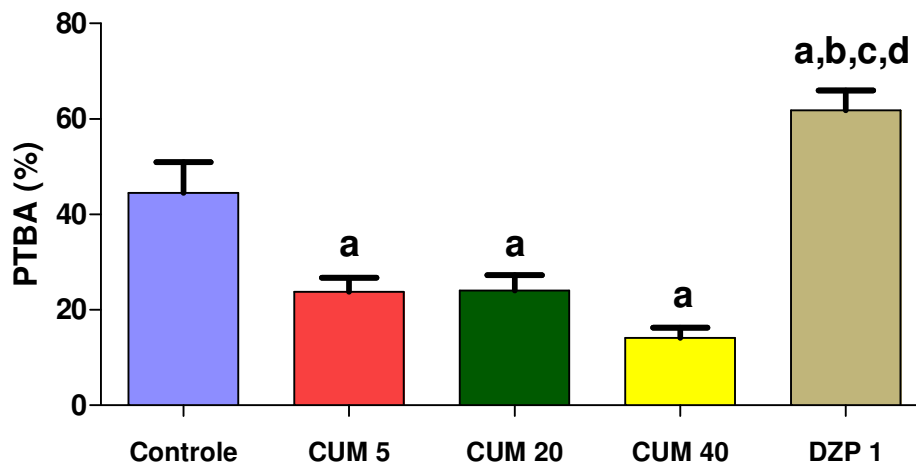
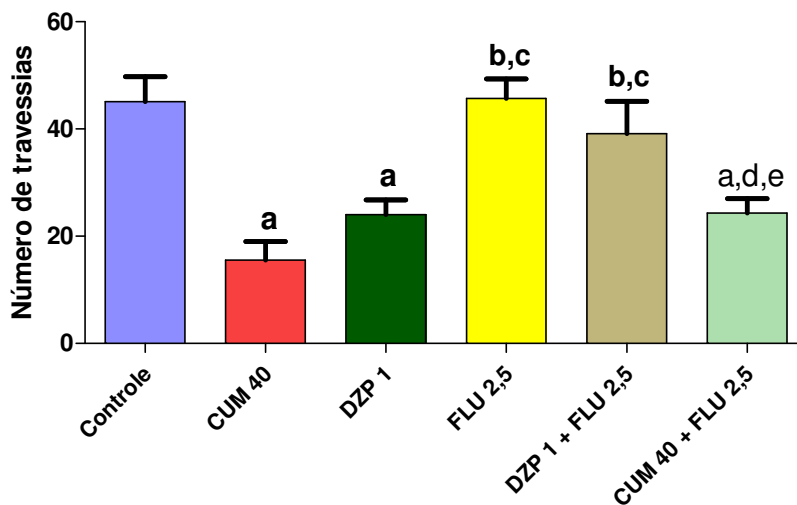


FIGURA 9 - Efeito da cumarina e diazepam sobre a percentagem do tempo de permanência nos braços abertos (PTBA) no teste do labirinto em cruz elevado. Controle (veículo), cumarina (5, 20 ou 40 mg/kg, i.p.) ou diazepam (DZP: 1 mg/kg) (i.p.) foram administrados 30 min antes do experimento. Os valores representam a média  $\pm$  EPM da percentagem do tempo de permanência nos braços abertos (PTBA) durante 5 min. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos  $p < 0.05$ . a, b, c e d comparados ao controle, CUM 5, CUM 20 e CUM 40, respectivamente.

### 6.5 Avaliação da participação do sistema GABAérgica no efeito sedativo da cumarina no teste do campo aberto

A relação entre a CUM e o flumazenil foi verificada após tratamento agudo por via intraperitoneal no teste do campo aberto em camundongos avaliando-se os movimentos exploratórios, caracterizados pelo número de travessias, o número de *rearing* e *grooming*.

A CUM na dose de 40 mg/kg [ $15,5 \pm 3,46$  (6)] foi capaz de reduzir a atividade locomotora dos animais [ $F(5,50) = 9,01$ ;  $p < 0,0001$ ], assim como o DZP-1 [ $24,0 \pm 2,79$  (8)], quando comparados ao grupo controle [ $45,1 \pm 4,66$  (10)]. O FLU-2,5 administrado sozinho [ $45,7 \pm 3,61$  (10)], conforme esperado, não apresenta diferença em relação ao controle e administrado junto com a CUM [ $24,33 \pm 2,66$  (9)] não reverte o efeito da droga testada. Porém, reverte o efeito do diazepam [ $39,13 \pm 6,06$  (8)], conforme mostrado na **Figura 10**. Resultados semelhantes foram também obtidos nos outros dois parâmetros analisados, o *rearing* [ $F(5,51) = 8,1$ ;  $p < 0,0001$ ] (**Figura 11**) e no *grooming* [ $F(5,55) = 4,05$ ;  $p = 0,0037$ ] (**Figura 12**).



**FIGURA 10** – Avaliação do envolvimento do sistema GABAérgico no efeito sedativo da CUM no teste do campo aberto. Controle (veículo), cumarina (CUM: 40 mg/kg) ou diazepam (DZP: 1 mg/kg) (i.p.), quando sozinhos, foram administrados 30 min antes do experimento; quando associados, foram administrados 15 min após a administração de flumazenil (FLU: 2,5 mg/kg) e, então, 30 min depois foram submetidos aos experimentos. Os valores da figura apresentam a média ± EPM do número de travessias durante 5 min. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos com  $p < 0,05$ . a, b, c, d e e comparados ao controle, CUM 40, DZP-1, FLU-2,5 e DZP-1 + FLU-2,5, respectivamente.

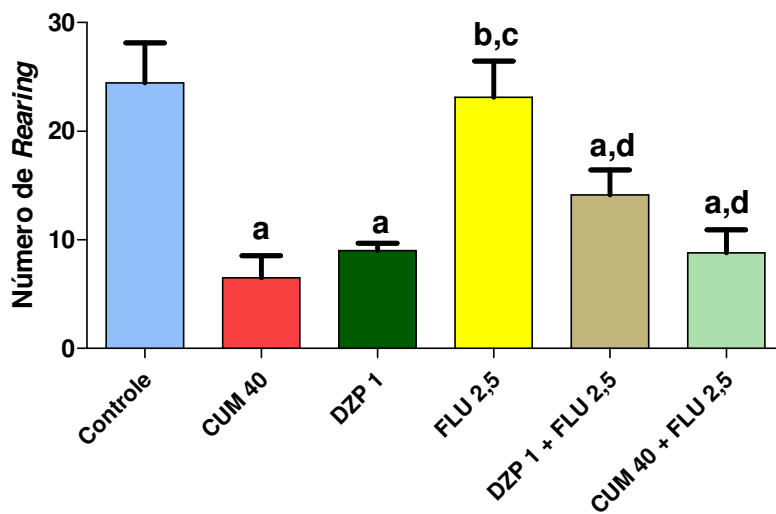


FIGURA 11 – Avaliação do envolvimento do sistema GABAérgico no efeito sedativo da CUM no teste do campo aberto. Controle (veículo), cumarina (CUM: 40 mg/kg) e diazepam (DZP: 1 mg/kg), quando sozinhos, foram administrados 30 min antes do experimento; quando associados, foram administrados 15 min após a administração de flumazenil (FLU: 2,5 mg/kg) e, então, 30 min depois foram submetidos ao experimento. Os valores da figura apresentam a média ± EPM do número de *rearing* durante 5 min. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos com  $p < 0.05$ . a, b, c e d quando comparados ao controle, CUM 40, DZP-1 e FLU-2,5, respectivamente.

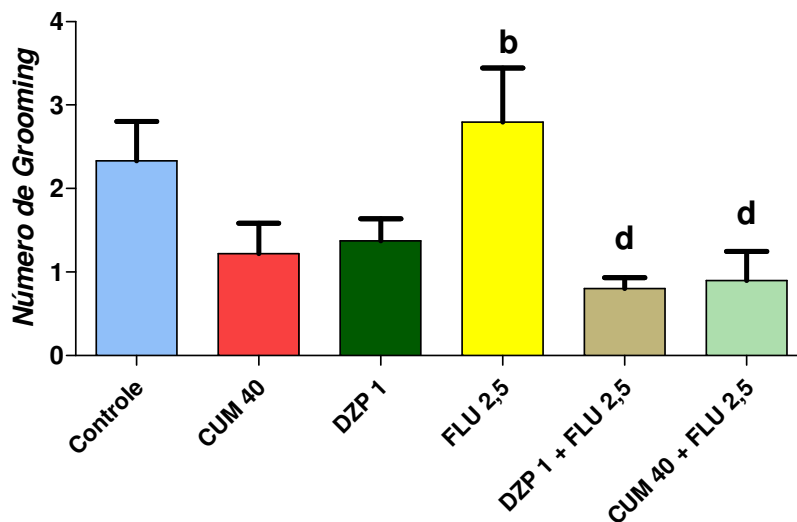
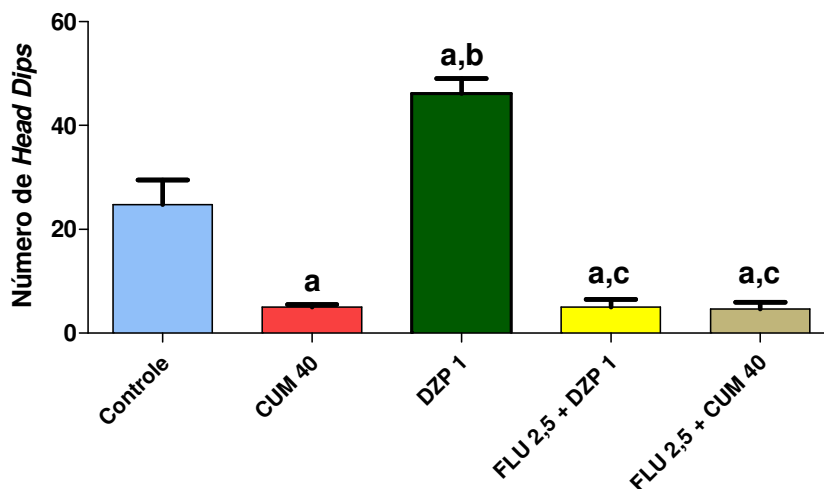


FIGURA 12 – Avaliação do envolvimento do sistema GABAérgico no efeito sedativo da CUM no teste do campo aberto. Controle (veículo), cumarina (CUM: 40 mg/kg) ou diazepam (DZP: 1 mg/kg) (i.p.), quando sozinhos, foram administrados 30 min antes do experimento; quando associados, foram administrados 15 min após a administração de flumazenil (FLU: 2,5 mg/kg) e, então, 30 min depois foram submetidos ao experimento. Os valores da figura apresentam a média ± EPM do número de *grooming* durante 5 min. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos com  $p < 0.05$ . a, b, c e d quando comparados ao controle, CUM 40, DZP-1 e FLU-2,5, respectivamente.

## 6.6 Determinação da participação do sistema GABAérgico no efeito da cumarina no teste da placa perfurada (*hole board*)

Para pesquisar a participação de mecanismos gabaérgicos no mecanismo de ação da CUM em relação a seu efeito ansiogênico, utilizamos o flumazenil, o diazepam e a própria CUM por via intraperitoneal administrados isoladamente ou associados no teste da placa perfurada em camundongos.

A análise do envolvimento dos receptores benzodiazepínicos no efeito da CUM mostrou que o grupo (FLU-2,5 + CUM 40, i.p.) não alterou o efeito depressor da cumarina no parâmetro avaliado, diminuição do número de vezes que o animal colocou a cabeça no buraco da placa perfurada (*head dips*), [ $4,62 \pm 1,31$  (8)] [ $F(4,38) = 54,62$ ;  $p < 0,0001$ ] (**Figura 13**) quando este grupo foi comparado ao grupo da CUM 40 [ $5,0 \pm 0,53$  (8)]. A associação (FLU-2,5 + DZP-1) reverteu o efeito ansiolítico do diazepam no parâmetro analisado [FLU-2,5 + DZP-1:  $5,0 \pm 1,53$  (8); DZP-1:  $46,13 \pm 2,89$  (8)].

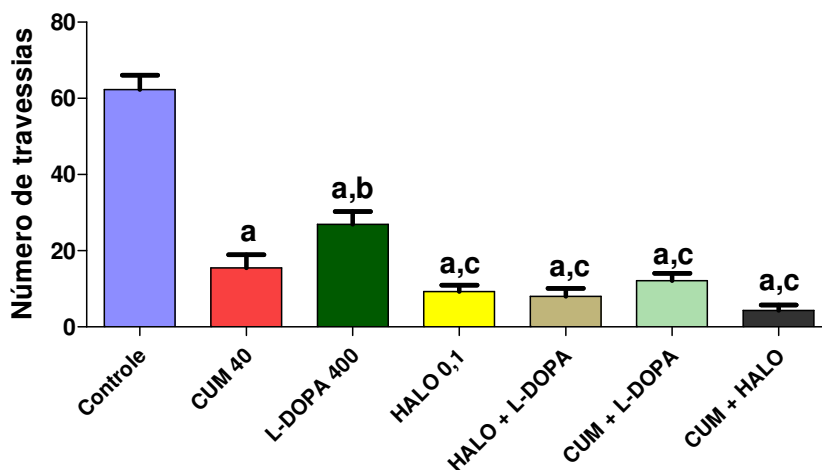


**FIGURA 13** - Efeito da cumarina e diazepam sozinhos ou associados com flumazenil sobre o número de *head dips* no teste da placa perfurada. Controle (veículo), cumarina (CUM: 5, 20 ou 40 mg/kg) ou diazepam (DZP: 1 mg/kg) (i.p.), quando sozinhos, foram administrados 30 min antes do experimento; quando associados, foram administrados 15 min após a administração de flumazenil (FLU: 2,5 mg/kg) e, então, 30 min depois foram submetidos ao experimento. Os valores da figura representam a média ± EPM do número de *head dips* durante 5 min. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos  $p < 0,0001$ . a, b e c quando comparados ao controle, CUM 40 e DZP-1, respectivamente.

## 6.7 Determinação do envolvimento do sistema dopaminérgico no efeito central da cumarina no teste do campo aberto

O envolvimento dos receptores dopaminérgicos no efeito da cumarina por via intraperitoneal foi verificado no teste do campo aberto em camundongos, utilizando a L-dopa 400 mg/kg (v.o.) e o antagonista dos receptores dopaminérgicos, o haloperidol (HALO) 0,1mg/kg. Os parâmetros avaliados neste experimento foram os movimentos exploratórios, caracterizados pelo número de travessias, número de *rearing* e *grooming*.

A CUM na dose de 40 mg/kg [ $15,5 \pm 3,46$  (6)] foi capaz de reduzir a atividade locomotora dos animais [ $F(6,60)= 56,80$ ;  $p < 0,0001$ ], assim como a L-DOPA 400, que levou a uma diminuição menos acentuada [ $26,9 \pm 3,43$  (10)], quando comparados ao grupo controle [ $62,3 \pm 3,79$  (10)]. O HALO administrado sozinho [ $9,3 \pm 1,65$  (10)], conforme o esperado, diminuiu significativamente a atividade locomotora dos animais em relação ao controle, assim como sua administração associada com a CUM [CUM 40 +HALO 0,1:  $4,28 \pm 1,5$  (7)] acentua os efeitos da droga testada e da L-DOPA [ $26,9 \pm 3,43$  (10)], conforme detalhado na **Figura 14**. Resultados semelhantes foram também obtidos nos outros dois parâmetros analisados, o *rearing* [ $F(6,78)= 28,62$ ;  $p < 0,0001$ ] (**Figura 15**) e no *grooming* [ $F(6,71)= 12,08$ ;  $p < 0,0001$ ] (**Figura 16**).



**FIGURA 14** – Avaliação do envolvimento do sistema dopaminérgico no efeito central da CUM no teste do campo aberto. Controle (veículo), cumarina (CUM: 40 mg/kg), haloperidol (HALO: 0,1 mg/kg) (i.p.) ou L-dopa (L-DOPA: 400 mg/kg) (v.o.), quando sozinhos, foram administrados 30 min ou 60 min antes do experimento; ou quando associados, foram administrados 30 min após a administração do HALO e, então, 30 min depois foram submetidos ao experimento. Os valores da figura apresentam a média  $\pm$  EPM do número de travessias durante 5 min. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos com  $p < 0,05$ . a, b e c quando comparados ao controle, CUM 40 e L-DOPA 400, respectivamente.

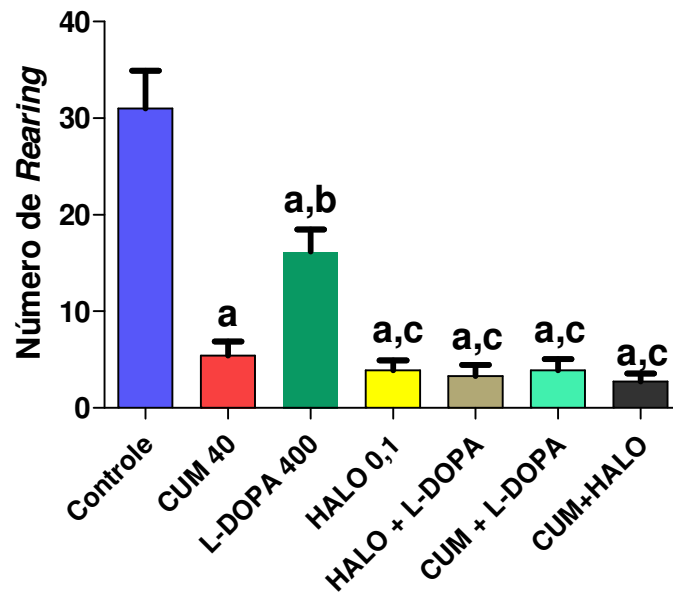


FIGURA 15 – Avaliação do envolvimento do sistema dopaminérgico no efeito central da CUM sobre o número de *rearing* no teste do campo aberto. Controle (veículo), cumarina (CUM: 40 mg/kg), haloperidol (HALO: 0,1 mg/kg) (i.p.) ou L-dopa (L-DOPA: 400 mg/kg) (v.o.) quando sozinhos, foram administrados 30 min ou 60 min antes do experimento; ou quando associados, foram administrados 30 min após a administração do HALO e, então, 30 min depois foram submetidos ao experimento. Os valores da figura apresentam a média  $\pm$  EPM do número de *rearing* durante 5 min. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos com  $p < 0.05$ . a, b, c e d quando comparados ao controle, CUM 40, L-DOPA 400 e HALO + L-DOPA, respectivamente.

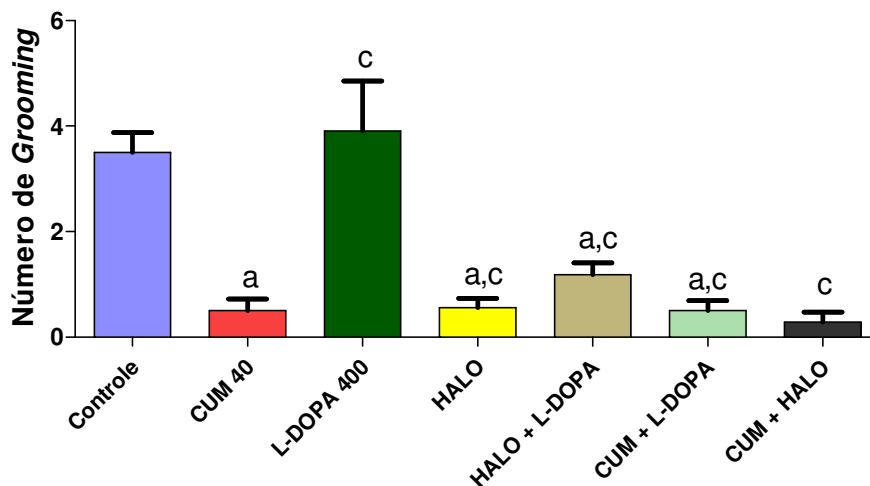
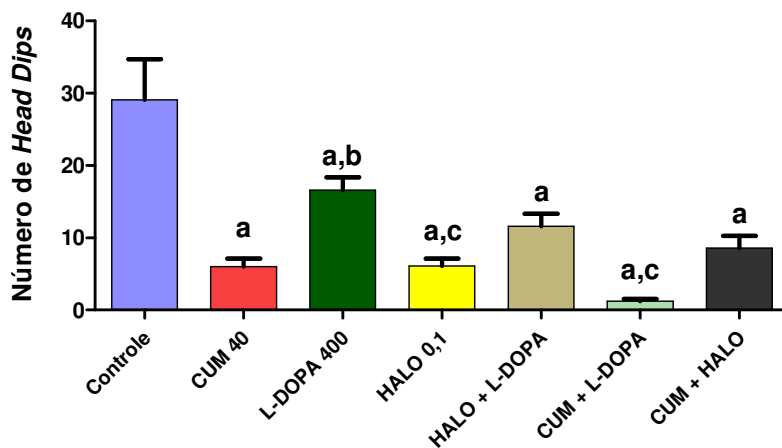


FIGURA 16 – Avaliação do envolvimento do sistema dopaminérgico no efeito central da CUM sobre o número de *grooming* no teste do campo aberto. Controle (veículo), cumarina (CUM: 40 mg/kg), haloperidol (HALO: 0,1 mg/kg) (i.p.) ou L-dopa (L-DOPA: 400 mg/kg) (v.o.), quando sozinhos, foram administrados 30 min ou 60 min antes do experimento; quando associados, foram administrados 30 min após a administração do HALO e, então, 30 min depois foram submetidos ao experimento. Os valores da figura representam a média  $\pm$  EPM do número de *grooming* durante 5 min. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos com  $p < 0.05$ . a, b e c quando comparados ao controle, CUM 40 e L-DOPA 400, respectivamente.

## 6.8 Determinação do envolvimento do sistema dopaminérgico no efeito da cumarina sobre o número de *head dips* no teste da placa perfurada

O envolvimento dos receptores dopaminérgicos no efeito central da cumarina foi verificado em experimento agudo determinado através do teste da placa perfurada em camundongos por via intra-peritoneal conforme descrito em Materiais e Métodos, utilizando a L-dopa 400 mg/kg (v.o.) e o seu antagonista, o haloperidol (HALO) 0,1mg/kg. O parâmetro avaliado neste experimento foi o número de vezes que o animal colocou a cabeça no buraco da placa perfurada (*head dips*).

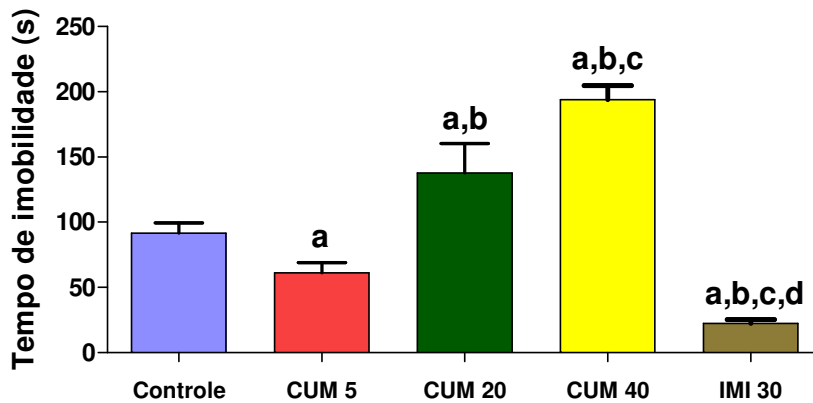
A CUM na dose de 40 mg/kg [ $6,0 \pm 1,1$  (9)] foi capaz de reduzir o número de *head dips*, como visto anteriormente, [ $F(6,67) = 12,61$ ;  $p < 0,0001$ ], assim como a L-DOPA 400, que levou a uma diminuição menos acentuada [ $16,58 \pm 1,8$  (12)] quando comparados ao grupo controle [ $29,09 \pm 5,62$  (11)]. O HALO administrado sozinho [ $6,08 \pm 1,04$  (12)] diminuiu de maneira semelhante o número de *head dips* em relação ao controle, assim como sua administração concomitante com a CUM [CUM 40 +HALO 0,1:  $8,57 \pm 1,72$  (7)]. Neste teste, não houve diferença significativa entre o grupo que recebeu somente L-DOPA e o que recebeu a associação HALO + L-DOPA [ $11,57 \pm 1,76$  (7)] (**Figura 17**).



**FIGURA 17** – Avaliação do envolvimento do sistema dopaminérgico no efeito sedativo da CUM sobre o número de *head dips* no teste da placa perfurada. Controle (veículo), cumarina (CUM: 40 mg/kg), haloperidol (HALO: 0,1 mg/kg) (i.p) ou L-dopa (L-DOPA: 400 mg/kg) (v.o.) quando sozinhos, foram administrados 30 min ou 60 min antes do experimento; ou quando associados, foram administrados 30 min após a administração do HALO e, então, 30 min depois foram submetidos ao experimento. Os valores da figura apresentam a média ± EPM do número de *grooming* durante 5 min. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos com  $p < 0,05$ . a, b e c quando comparados ao controle, CUM 40 e L-DOPA 400, respectivamente.

### 6.9 Determinação da atividade antidepressiva da cumarina no teste da suspensão da cauda (*tail suspension*)

Neste experimento, a administração intraperitoneal de cumarina aumentou o tempo de imobilidade [ $F(4,45)= 33,9$ ;  $p < 0,0001$ ] nas doses maiores [20 mg/kg:  $137,8 \pm 22,57$  (8); 40 mg/kg:  $194 \pm 10,67$ ] relacionando ao grupo controle [ $91,6 \pm 7,94$  (10)] (**Figura 18**). Pelo contrário, a imipramina 30 mg/kg, utilizada como controle positivo, diminuiu o tempo de imobilidade [IMI-30:  $22,44 \pm 2,86$  (9)] em relação ao controle.



**FIGURA 18** - Efeito da cumarina e imipramina sobre o tempo de imobilidade no teste da suspensão da cauda. Controle (veículo), cumarina (CUM: 5, 20 e 40 mg/kg) ou imipramina (IMI: 30 mg/kg) (i.p.) foram administrados 30 min antes do experimento. Os valores da figura representam a média  $\pm$  EPM do tempo de imobilidade (s) durante 6 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos  $p < 0,05$ . a, b, c e d:  $p < 0,05$  se comparados ao controle, CUM 5, 20 e 40, respectivamente.

## ESTUDO NEUROQUÍMICO

### 6.10 Dosagem de aminoácidos em córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos tratados com cumarina através de HPLC

#### Córtex pré-frontal

A **Figura 19** mostra os resultados, após administrações de cumarina (CUM 20 ou 40 mg/kg, i.p.) ou diazepam (DZP1 1 mg/kg, i.p.), sobre os níveis de aminoácidos ( $\mu\text{mol/g}$  de tecido) em córtex pré-frontal de camundongos. Os níveis de GABA aumentaram em 24, 19 e 398% respectivamente, após cumarina (CUM20:  $618,3 \pm 24,88$ ; CUM40:  $584,2 \pm 32,24$ ) e diazepam (DZP1:  $1876 \pm 303,8$ ) quando comparados aos controles ( $471,7 \pm 8,325$ ) [F (3, 30) = 193,3;  $p < 0,0001$ ]. Cumarina elevou para 76% as concentrações de GLU, somente na dose de 20 mg/kg ( $1479 \pm 52,04$ ) e o diazepam reduziu de maneira significativa o nível deste aminoácido ( $177,4 \pm 50,48$ ) comparado ao controle ( $360,7 \pm 62,73$ ) [F (3, 30) = 161,5;  $p < 0,0001$ ]. Porém, nenhuma alteração foi verificada nos valores de GLU após o tratamento com cumarina na dose de 40 mg/kg ( $383,6 \pm 13,38$ ) quando comparados ao grupo controle. Além disso, a maior dose de cumarina elevou os níveis de GLI (CUM40:  $499,3 \pm 37,23$ ) enquanto o diazepam reduziu ( $255,6 \pm 50,41$ ) quando comparado ao grupo controle ( $388,5 \pm 27,74$ ) [F (3, 30) = 8,366;  $p = 0,0004$ ]. Concentrações elevadas de TAU [F (3, 30) = 37,45;  $p < 0,0001$ ] foram observadas após a cumarina, na dose de 20 mg/kg (CUM20:  $729,4 \pm 54,07$ ), e diazepam ( $1418 \pm 216,4$ ), comparando ao controle ( $324,5 \pm 26,92$ ).

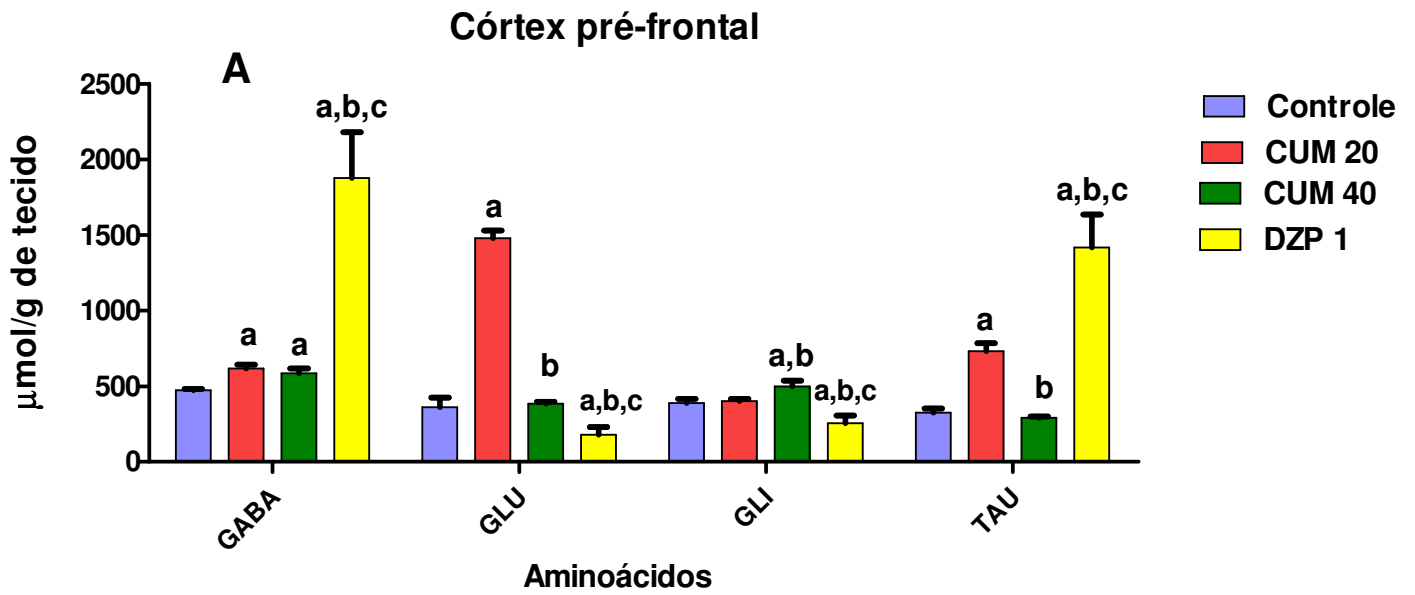
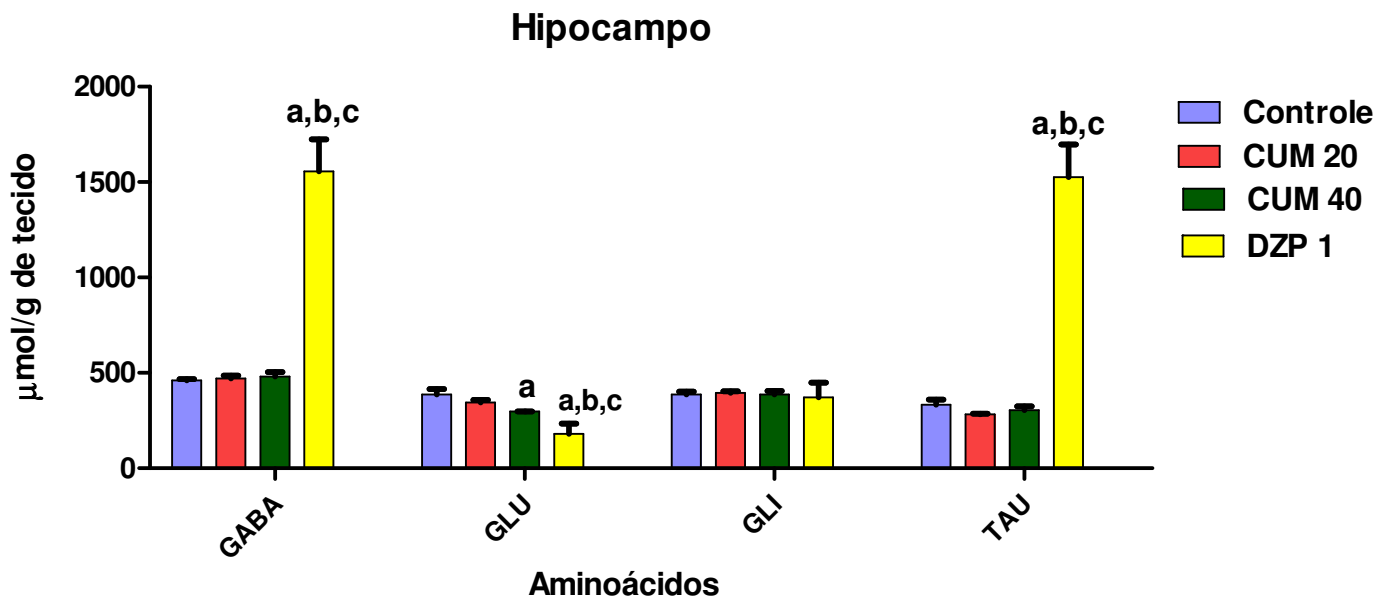


FIGURA 19. Efeitos da cumarina sobre os níveis de aminoácidos em córtex pré-frontal. Controle (veículo), cumarina (20 ou 40 mg/kg) (i.p.) ou diazepam 1 mg/kg foram administrados 30 min antes do experimento. Dados em  $\mu\text{mol/g}$  de tecido são apresentados como média  $\pm$  EPM ( $n = 7-9$ ). a, b e c quando comparados aos controles, CUM 20 e 40, respectivamente. GABA: ácido  $\gamma$ -aminobutírico; GLU: glutamato; GLI: glicina; TAU: taurina.

## Hipocampo

Não foram observadas diferenças significativas nas concentrações de GLI no hipocampo de camundongos, após a administração da cumarina (20 ou 40 mg/kg, i.p.) ou diazepam (1 mg/kg, i.p.). Todavia, os níveis de GLU reduziram-se de maneira estatisticamente significante após a dose de 40 mg/kg ( $296,9 \pm 0,9767$ ) e diazepam ( $181 \pm 53,63$ ), comparando-se aos controles ( $388,0 \pm 28,62$ ) [F (3,30) = 10,39;  $p=0,0001$ ]. Nenhum efeito significativo foi observado nos níveis de GABA e TAU após administração de cumarina em ambas as doses. Além disso, as concentrações de GABA [F (3, 30) = 70,03;  $p<0,0001$ ] e TAU [F (3, 30) = 84,10;  $p<0,0001$ ] foram elevadas após administração de diazepam (GABA= $1555 \pm 169,9$ ; TAU:  $1525 \pm 172,5$ ) quando comaradas ao grupo controle (GABA= $460,4 \pm 6,92$ ; TAU= $333,1 \pm 25,82$ ) (**Figura 20**).



**FIGURA 20.** Efeitos da cumarina sobre os níveis de aminoácidos em hipocampo. Controle (veículo), cumarina (20 e 40 mg/kg) ou diazepam (1 mg/kg) (i.p.) foram administrados 30 min antes do experimento. Dados em  $\mu\text{mol/g}$  de tecido são apresentados como média  $\pm$  EPM ( $n = 7-9$ ). a, b e c quando comparados aos controles, CUM 20 e 40, respectivamente. GABA: ácido  $\gamma$ -aminobutírico; GLU: glutamato; GLI: glicina; TAU: taurina.

## 7 DISCUSSÃO

### Efeitos sedativos e ansiogênicos

Neste trabalho, os efeitos da cumarina foram estudados em vários modelos de comportamento animal, tais como o campo aberto, *rota rod*, placa perfurada, labirinto em cruz elevado e suspensão da cauda. Estes testes são modelos clássicos para triagem de atividades sobre o sistema nervoso central em animais e fornece informações tais como desempenho psicomotor, locomoção, atividades ansiolítica, miorelaxante e antidepressiva.

A cumarina foi avaliada primeiramente no teste do campo aberto, um modelo animal clássico que permite medições através das quais é possível avaliar efeitos autonômicos de drogas e atividade geral dos animais (NOVAS *et al.*, 1988). A cumarina, em todas as doses utilizadas, diminuiu significativamente a atividade locomotora dos animais quando expostos a este teste. Estes resultados sugerem uma ação sedativa sobre o SNC caracterizada pela diminuição da atividade locomotora espontânea, talvez por uma excitabilidade reduzida do SNC (PEREZ *et al.*, 1998).

Normalmente o procedimento consiste em confrontar o animal com a novidade do ambiente e observar comportamentos como locomoção (número de linhas cruzadas no chão da arena pelo animal), frequência de exploração vertical (*rearing*), tempo de autolimpeza (*grooming*), defecação, tempo gasto para deixar a área central. Os roedores parecem preferir a periferia ao centro do aparelho, normalmente ambulando em contato com as paredes, ou seja, apresentam tigmotaxia. Portanto, assim como no labirinto em cruz elevado, a tigmotaxia estaria relacionada com a ansiedade no campo aberto (CAROLA *et al.*, 2002; PRUT *et al.*, 2003).

A avaliação de comportamento relacionado à ansiedade em modelos animais é baseada na garantia de que a ansiedade em animais é comparável à ansiedade em humanos. Mudanças comportamentais e periféricas parecem acompanhar elevada atividade nervosa simpática (HALL, 1936). Levando em consideração as diversas maneiras de manter o animal sob estresse, é bem conhecido a partir de observações laboratoriais que roedores tendem evitar áreas desprotegidas de um novo ambiente quando entram pela primeira vez neste local (BARNETT, 1975; TREIT; FUNDYTUS, 1989).

Tem sido proposto o emprego do modelo do campo aberto na avaliação da ansiedade, considerando-se que um aumento na ambulação do animal e maior permanência do mesmo na região central seriam indicativos de uma redução da ansiedade. Entretanto, esta

proposta tem sido criticada por alguns autores, principalmente pelo fato das medidas avaliadas poderem ser influenciadas por vários fatores outros além da própria ansiedade, como atividade locomotora e exploração. A novidade de uma primeira exposição pode gerar imobilidade ou extrema locomoção na periferia do aparelho (FILE, 1993).

Dados na literatura demonstraram que a redução na atividade locomotora espontânea dá uma indicação do nível de excitabilidade do sistema nervoso central (MANSUR; MARTZ; CARLINI, 1971), e, esta redução pode estar relacionada com a sedação resultante da depressão do sistema nervoso central (PEREZ *et al.*, 1998). O diazepam, na dose de 2 mg/kg, diminuiu a atividade locomotora mostrando seu efeito sedativo (SOUSA *et al.*, 2007).

Com a administração da CUM em camundongos, ainda no teste do campo aberto, observamos um decréscimo do número de *rearing* de maneira dose-dependente. O *rearing* é um aspecto do comportamento exploratório onde o camundongo fica em pé com apenas duas patas e é geralmente diminuído quando o animal é colocado diante de uma nova situação ou em condições de estresse, e pode aumentar quando drogas ansiolíticas são administradas (JOHANSSON; AHLENIUS, 1989).

A cumarina diminuiu o número de *grooming* nas doses de 20 e 40 mg/kg, i.p. O comportamento de autolimpeza ou *grooming* geralmente é aumentado na ansiedade ou presença de medo em roedores e é um índice de adaptação emocional a uma situação de tensão. Drogas ansiolíticas diminuem o *grooming* no teste do campo aberto (KAMETANI, 1988).

No teste do *rota rod* a cumarina não alterou a coordenação motora ou causou déficit muscular nos animais. O diazepam aumentou o número de quedas e diminuiu o tempo de permanência na barra. A dose de diazepam utilizada foi de 2 mg/kg, dose esta que apresenta efeito relaxante muscular (SOUSA *et al.*, 2007). Isto sugere que a cumarina não exerce bloqueio neuromuscular periférico (ADZU *et al.*, 2002).

Segundo Carlini e Burgos (1979), esse teste mede o efeito de relaxamento muscular ou incoordenação motora. Nesse caso, quanto mais intenso for o efeito, menor será o tempo em que o animal consegue se equilibrar sobre a barra. Ressalta-se, no entanto, que se trata de um método não-específico, uma vez que mede indistintamente, efeitos neurológicos, estimulantes e depressores sobre a coordenação motora (DALLMEIER; CARLINI, 1981).

Além do campo aberto, outra possibilidade de aumentar a aversão de um roedor contra uma área desprotegida é impedindo o animal de ver o chão ou a bancada, ou elevando a bancada, como pode ser visto nos testes da placa perfurada e labirinto em cruz elevado,

respectivamente. Desse modo, para verificar se a cumarina tem efeitos ansiolíticos, foram realizados mais dois testes para drogas ansiolíticas, a placa perfurada e o LCE.

No teste da placa perfurada a cumarina, nas três doses (5, 20 ou 40 mg/kg), mostrou diminuição do número de *head dips*. Este teste foi estudado para explorar o potencial ansiolítico da cumarina, onde é medido o comportamento exploratório em roedores (FILE; WARDILL, 1975). Neste modelo, doses não-sedativas de benzodiazepínicos e outras drogas ansiolíticas, aumentaram o número de *head dips* em camundongos, enquanto seus antagonistas o reduziram (CRAWLEY, 1985).

Com base em estudos e informações de que a expressão de um estado ansiolítico em animais pode ser refletida por um aumento no comportamento de *head dips*, os resultados deste estudo forneceram evidências de que a cumarina apresentou efeito ansiogênico, ao diminuir este comportamento. Este efeito também pode ter ocorrido porque, nestas doses, a cumarina causou redução da atividade locomotora dos animais. Estudos realizados com compostos ansiogênicos, tais como, FG7142 e  $\beta$ -CCM, ambos derivados da  $\beta$ -carbolina, mostraram que estas drogas reduziram o número de *head dips* (TAKEDA; TSUJI; MATSUMIYA, 1998). Estes efeitos sugerem que a redução no comportamento de *head dips* pode refletir estado ansiogênico do animal, e que ambos os estados ansiolíticos e ansiogênicos podem ser avaliados usando o teste da placa perfurada (TAKEDA; TSUJI; MATSUMIYA, 1998).

Um outro modelo experimental utilizado para avaliação da ansiedade foi o labirinto em cruz elevado (*Plus-maze*). Neste teste os resultados mostraram que a cumarina foi capaz de diminuir de modo significativo o tempo de permanência e o número de entrada nos braços abertos. A cumarina administrada agudamente nas doses de 20 e 40 mg/kg, i.p., foi capaz de alterar os parâmetros de forma significativa indicando uma atividade ansiogênica. Este efeito provavelmente ocorre porque, nestas doses, a cumarina causou uma redução na atividade locomotora dos animais. Estudos prévios mostraram que drogas que alteram a atividade locomotora podem levar a resultados falso positivos/negativos no LCE (ONAIWI *et al.*, 1992).

A ansiedade pode ser caracterizada como a antecipação emocional de uma situação aversiva, de difícil controle e de provável ocorrência. Medo, no entanto, pode ser definido como uma reação a uma situação perigosa real e bem definida e é visto por vários autores como uma entidade independente da ansiedade. Ainda assim, por vezes pode ser difícil uma separação entre as duas. Alguns modelos animais de ansiedade evocam, pela simples exposição do animal a um novo ambiente ou estímulo, comportamentos de medo ou

defensivos, análogos a manifestações ansiosas em indivíduos com transtornos de ansiedade. Por exemplo, animais expostos ao LCE apresentam um comportamento denominado de avaliação de risco, o que pode ser relacionado à hipervigilância, apresentada por indivíduos ansiosos (RAMOS *et al.*, 1997). Agentes ansiolíticos aumentam e agentes ansiogênicos reduzem a entrada e o tempo gasto nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (PELLOW *et al.*, 1985).

Montgomery (1955) constatou que ratos apresentavam alto grau de exploração de espaços fechados em comparação aos abertos e numa chance de escolha como num labirinto em Y, preferiam consistentemente os braços fechados. Em seu estudo, Montgomery interpretou a aversão aos braços abertos como sendo gerada pela neofobia (“medo da novidade”, que induziria aversão e curiosidade) e pela elevação do braço aberto (RODGERS *et al.*, 1996).

Para melhor esclarecer o efeito sedativo apresentado pela cumarina foi utilizado o mesmo modelo do campo aberto e o diazepam como ansiolítico de referência, e ainda, a associação com o flumazenil, antagonista competitivo dos receptores benzodiazepínicos (BDZs). Os resultados demonstraram que a CUM na dose de 40 mg/kg, i.p. apresentou efeito oposto ao diazepam, diminuindo bastante a atividade locomotora. O flumazenil não reverteu os efeitos da CUM, mas como esperado, reverteu os efeitos do diazepam, sendo estes efeitos observados também nos outros dois parâmetros estudados neste modelo do campo aberto (*rearing* e *grooming*).

O flumazenil é um derivado imidabenzodiazepina, é um dos vários derivados 1,4-benzodiazepínico com alta afinidade pelo receptor benzodiazepínico que age como antagonista competitivo. Ele é o único antagonista dos receptores BDZs utilizado na clínica, onde sua ação consiste em bloquear algumas das ações dos BDZs, porém não antagoniza os efeitos de outros sedativos-hipnóticos no SNC como etanol, opióides e anestésicos gerais. O flumazenil também é utilizado como droga para o diagnóstico de intoxicação pelos BDZs. Flumazenil liga-se especificamente aos receptores BDZs no cérebro bloqueando os efeitos comportamentais, neurológicos e eletrofisiológicos de vários benzodiazepínicos, mas é desprovido de efeitos farmacológicos (KLEINGEIST *et al.*, 1998). Diante disto, os resultados sugerem que a cumarina não apresenta um mecanismo de ação similar aos benzodiazepínicos ou não age no sítio de ação dos benzodiazepínicos.

Procurando esclarecer melhor este efeito sedativo provocado pela cumarina, foi utilizado o modelo da placa perfurada, associando-se o flumazenil e a cumarina. Os resultados obtidos mostraram que a cumarina na dose de 40 mg/kg, i.p., tem um efeito oposto ao

diazepam, e a associação com o flumazenil diminuiu bastante o número de *head dips*, de maneira similar a resposta da cumarina sozinha.

Estudos realizados por Takeda, Tsuji e Matsumiya (1998), demonstraram que, ansiolíticos benzodiazepínicos, tais como, o diazepam e o clordiazepóxido, apresentaram efeitos consistentes no comportamento de *head dips* no teste da placa perfurada, ou seja, ambos aumentaram o número de *head dips* em doses que estes compostos não produziam sedação. Esta observação é consistente com resultados anteriores, que mostraram aumento na frequência de *head dips* após injeções de doses não sedativas de diazepam.

Ainda com o intuito de esclarecer as alterações ocorridas na atividade locomotora dos animais, verificamos o envolvimento do sistema dopaminérgico. Em relação aos efeitos da cumarina já vistos no teste do campo aberto e levando em consideração que alguns autores afirmam que os receptores dopaminérgicos D1 e D2 interagem na locomoção e na estereotipia; e ainda, que a locomoção depende da ativação dos receptores D1 (STARR *et al.*, 1989), enquanto o comportamento estereotipado depende do receptor D2, pode-se sugerir que a CUM não estimula os receptores dopaminérgicos do tipo D1, já que reduziu a atividade locomotora espontânea. Além disso, tem sido relatado que a redução da atividade locomotora é causada pela diminuição da dopamina, de forma que a locomoção depende do aumento ou redução desta monoamina (STARR *et al.*, 1989). A levodopa + carbidopa (L-DOPA) sozinha levou a um pequeno aumento na atividade locomotora, em relação ao grupo da cumarina, talvez por levar a um aumento de dopamina, estimulando os receptores dopaminérgicos nos gânglios basais e melhorando o equilíbrio entre a atividade colinérgica e a dopaminérgica, o que melhora a modulação dos impulsos nervosos voluntários transmitidos ao córtex motor (GOODMAN; GILMAN, 2005). O haloperidol (0,1 mg/kg) sozinho e associado com L-DOPA diminuiu a atividade locomotora dos camundongos, e quando associado à cumarina, causou uma maior interferência na locomoção, como um efeito sinérgico.

O haloperidol, antagonista da dopamina e usado na clínica como fármaco antipsicótico, frequentemente causa efeitos colaterais motores pelo bloqueio dos receptores no estriado (RANG; DALE, 2007). Em um estudo que mostra os efeitos do haloperidol sobre a atividade locomotora, as doses usadas foram positivamente correlacionadas com a catalepsia (um fenômeno de imobilidade). A catalepsia nos grupos tratados com 0,2 e 0,4 mg/kg de haloperidol foi observada em 30 e 70% dos animais, respectivamente. A dose de 0,1 mg/kg de haloperidol não induziu catalepsia, sugerindo que somente em doses mais elevadas é que esta substância é capaz de causar grande inibição da locomoção (HUANG; SHYU; HSIAO, 2010).

Com relação ao *rearing* e o *grooming* (comportamentos estereotipados), já foi visto que a cumarina diminui ambos e alguns autores afirmam que há envolvimento dos receptores dopaminérgicos do tipo D2 nestes parâmetros. Desta maneira, pode-se sugerir que há um envolvimento da CUM com esse tipo de receptor dopaminérgico, provavelmente estimulando os receptores D2 pré-sinápticos. O haloperidol (0,1 mg/kg) também reduziu o número de *rearing*, assim como as associações com L-DOPA e CUM. A atividade de *rearing* parece estar relacionada com a hiperatividade dopaminérgica. Estudos apontam que o aumento da atividade dopaminérgica induz um maior comportamento de *rearing* (SWANSON *et al.*, 1997).

De acordo com MacFarland e Reeder (1974), quase todos os animais gastam uma significativa parte do tempo no comportamento de *grooming*. Embora vários transmissores possam modular a expressão deste comportamento, a dopamina está particularmente envolvida. Neste estudo, houve uma redução de *grooming* no campo aberto, com a cumarina sozinha e associada à L-DOPA e ao HALO. Na literatura, é referido que o aumento de *grooming* é observado em roedores apreensivos (ARCHER, 1973), e em um grande número de estudos, pesquisadores observaram que drogas ansiolíticas reduzem o *grooming* no campo aberto (DUNN *et al.*, 1981; MOODY; MERALI; CRAWLEY, 1993).

Acredita-se que o estresse e a depressão são fenômenos inter-relacionados. O estresse é tipicamente implicado na etiologia das desordens depressivas ou como uma consequência delas (TURNER; LLOYD, 1999). Os modelos animais de depressão são tipicamente baseados na exposição de animais a condições estressantes (situação ameaçadora), e há vários testes específicos para medir as respostas comportamentais e psicológicas. Os dois modelos animais mais amplamente utilizados para triagem de novas drogas antidepressivas são os testes do nado forçado e da suspensão da cauda. Esses testes são bastante sensíveis e relativamente específicos para a maioria das classes de drogas antidepressivas, incluindo, os antidepressivos tricíclicos, os inibidores seletivos da recaptação de serotonina, os inibidores da MAO e os atípicos (PORSOLT; BERTIN; JALFRE, 1977; STERU *et al.*, 1985).

Os resultados deste trabalho mostraram que a cumarina aumentou o tempo de imobilidade, nas doses maiores. Segundo Steru *et al.* (1985) uma diminuição no tempo de imobilidade de um grupo submetido à administração de uma droga padrão ou teste, em relação ao grupo controle, sugere uma ação antidepressiva. Esses efeitos sugerem que a cumarina apresenta efeito depressor. Este resultado foi oposto aos efeitos ansiolíticos apresentados por uma cumarina presente no extrato de *Hygrophila tytha Leonard* (planta

usada na medicina tradicional da Colômbia para o tratamento de ansiedade) (ARIZA *et al.*, 2007).

A imipramina (inibidor da recaptação de noradrenalina e serotonina) usada como padrão positivo no teste da suspensão da cauda diminuiu o tempo de imobilidade dos animais, corroborando com os estudos que mostram a sensibilidade destes testes às várias classes de drogas antidepressivas (PORSOLT; BERTIN; JALFRE, 1977).

O papel dos aminoácidos como neurotransmissores e suas funções no sistema nervoso central, tem sido foco de um grande número de pesquisas nos últimos anos. Desta forma, procuramos estudar a influência da cumarina administrada de forma aguda e por via intraperitoneal nas concentrações dos aminoácidos mais pesquisados recentemente, que são ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), glutamato (GLU), glicina (GLI) e taurina (TAU) (DANBOLT, 2001).

Neste estudo, os níveis de GABA, GLU, GLI e TAU foram determinados no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos, após administração de cumarina (20 ou 40 mg/kg, i.p.) ou diazepam (1 mg/kg, i.p.) usado como padrão.

Após administração aguda de cumarina, os níveis de GABA aumentaram no córtex pré-frontal. Em um estudo prévio, nós observamos que a cumarina 20 e 40 mg/kg diminuíram a atividade locomotora, no teste do campo aberto (PEREIRA *et al.*, 2008), confirmando o efeito inibitório da cumarina, e sugerindo que este efeito comportamental está relacionado com uma elevação nas concentrações de GABA no córtex pré-frontal. Um estudo delineado por Franklin e Druhan (2000) mostrou que o sistema gabaérgico no córtex pré-frontal inibe os neurônios de saída para regiões subcorticais, e isto também poderia estar relacionado à inibição da atividade locomotora observada.

Recentemente foi relatado que a imperatorina (uma furanocumarina isolada dos frutos de *Angelica archangelica*) inibiu GABA-transaminase (a enzima responsável pela degradação de GABA) e, assim, levou ao aumento do teor de GABA na fenda sináptica dos neurônios (CHOI *et al.*, 2005). Drogas que aumentam a neurotransmissão do GABA no cérebro possuem, provavelmente, efeito anticonvulsivante (CZUCZWAR; PATSALOS, 2001)

Nós também demonstramos um aumento dos níveis de GLU somente após administração de cumarina na dose de 20 mg/kg. Acreditamos que a curva dose-resposta da cumarina no córtex pré-frontal deve ser de maneira dose-seletiva: em baixas doses há aumento dos níveis de GLU, e estes níveis são diminuídos em doses elevadas. De acordo com Del Arco e Mora (1999) o glutamato tem um efeito modulatório sobre o sistema gabaérgico em que um aumento de glutamato endógeno no córtex pré-frontal está relacionado com níveis

aumentados de GABA extracelular. O córtex pré-frontal funcionalmente regula a liberação de dopamina no estriado dorsolateral, que é circundado por receptores do ácido  $\gamma$ -aminobutírico tipo A (GABA<sub>A</sub>), alterando as funções de locomoção e *rearing*. Isto poderia explicar a diminuição da atividade locomotora em camundongos observada nos testes comportamentais.

Estudos prévios têm demonstrado que surangin B, uma cumarina natural com atividade inseticida, causa liberação de GABA [<sup>3</sup>H] e ácido glutâmico de sinaptossomas de mamíferos (NICHOLSON; ZHANG, 1995). Yanshen *et al.* (2003) demonstraram que concentrações micromolares de surangin B estimulam a liberação de certa quantidade de aminoácidos endógenos, incluindo taurina, também de sinaptossomas de cérebro de mamíferos. Dentro deste grupo, há substâncias conhecidas por sua importante função sinalizadora no cérebro, assim como os neurotransmissores glutamato, aspartato e GABA.

Nesta pesquisa, a administração aguda de diazepam causou uma diminuição nos níveis de GLU, no córtex pré-frontal. Este resultado foi de acordo com estudos prévios que demonstram o efeito de um pré-tratamento com diazepam sobre a resposta a estresse repetido, no córtex pré-frontal de ratos. A injeção de diazepam, 30 min antes do primeiro estímulo estressor, bloqueou o aumento do GLU extracelular (BAGLEY; MOGHADDAM, 1997).

Também foi demonstrado que os níveis de GLI, um transmissor neuroinibitório, apresentaram-se elevados no córtex pré-frontal após administração da cumarina na maior dose estudada, quando comparado ao grupo controle. GLI é um simples aminoácido não-essencial, formado por uma molécula de carbono ligado a um grupo amino e um grupo carboxil. Na membrana plasmática, ele ativa um canal de cloro que hiperpolariza ou estabiliza o potencial de membrana. Como resultado disto, ele bloqueia a entrada de cálcio intracelular, que estimula a cascata de formação de citocinas (ZHONG, 2003). GLI apresenta ações antiinflamatórias, citoprotetoras e imunomoduladoras. Isto deve possivelmente explicar as ações neuroprotetoras de algumas cumarinas, como mostrado em um estudo realizado com componentes das raízes da *A. gigas*. Sua fração n-butanol também demonstrou ter uma significativa atividade neuroprotetora. Cumarinas isoladas da fração n-butanol, também apresentam uma significativa atividade neuroprotetora (LEE *et al.*, 2003; YAN *et al.*, 2004).

Além disso, um aumento nos níveis de TAU, outro neurotransmissor inibitório, foi visto no córtex pré-frontal, após administração da cumarina (20 mg/kg) e diazepam (1 mg/kg). Nós sugerimos que a cumarina altera os níveis de TAU de maneira dose seletiva, assim como ocorreu com o GLU, nesta área cerebral. Taurina, um aminoácido inibitório, tem exercido um importante papel na manutenção da homeostase cerebral. Em vários estudos, TAU tem ativado receptores de glicina, em concentrações moderadas, e apresenta-se como um fraco

agonista dos receptores GABA<sub>A</sub> (SMITH *et al.*, 2006). TAU protege os neurônios dos efeitos excitotóxicos causados pelos aminoácidos excitatórios e atenua o influxo de cálcio durante a isquemia (WANG *et al.*, 2007). Em outro estudo, TAU elevou a condutância da membrana íon cloreto, ao abrir os canais de cloreto induzindo a hiperpolarização dos neurônios no hipocampo, e reduzindo a excitabilidade celular (DEL OLMO *et al.*, 2000).

O hipocampo é uma região do lobo temporal, responsável por alguns aspectos da neurobiologia da memória (GOODMAN; GILMAN, 2005), como a consolidação da memória, enquanto que o neurotransmissor acetilcolina está envolvido na modulação da memória. A ativação seletiva dos receptores glutamatérgicos AMPA e NMDA, assim como os receptores metabotrópicos, é seguida por uma intervenção seqüencial de várias vias metabólicas mediadas por proteínas quinases pré e pós sinápticas que também ativam proteínas necessárias a formação da memória (LENT, 2004). Neste caso, nós sugerimos que a cumarina, por reduzir os níveis de glutamato no hipocampo, deve interferir com estes mecanismos, alterando os processos de memória. Todavia, estudos mais específicos devem ser realizados para elucidar estas questões.

Após a administração de diazepam, a concentração de GABA e TAU elevaram-se significativamente no hipocampo. Este fato já foi descrito por Hashimoto *et al.* (2006), quando a concentração de GABA foi significativamente elevada no hipocampo e no cerebelo, no grupo tratado com diazepam. Todavia, nós mostramos que os níveis de GLU diminuíram significativamente no hipocampo, após administração de diazepam. Várias linhas de evidência têm mostrado que o diazepam, um regulador do receptor GABA<sub>A</sub>, prejudica a função da memória em humanos e animais e bloqueia a potenciação de longa duração no hipocampo (HIGASHIMA; KINOSHITA; KOSHINO, 1998).

Recentemente tem sido descrito que o extrato de *Angelica gigas* e o decursinol, uma cumarina isolada da *A. gigas*, mostra uma potente atividade inibitória da acetilcolinesterase *in vitro* (KANG *et al.*, 2001). Há importantes achados de que uma administração a longo prazo de extrato de *Angelica gigas* (EAG) e seu componente, decursinol, protege os camundongos do dano de memória induzido pelo peptídeo  $\beta$ -amilóide. Isto sugere que o EAG e o decursinol podem ser considerados potentes agentes neuroprotetores contra o dano de memória relacionado ao peptídeo  $\beta$ -amilóide, responsável pela doença de Alzheimer (YAN *et al.*, 2004).

## **8 CONCLUSÃO**

A cumarina demonstrou ação sedativa e ansiogênica sobre o SNC provavelmente devido atuação como antagonista dopaminérgico. Esse mecanismo pode ter sido modulado pelos sistemas gabaérgico e, principalmente, glutamatérgico no córtex pré-frontal.

## REFERÊNCIAS

- ADZU, B.; AMOS, S.; DZARMA, S.; WAMBEBE, C.; GAMANIEL, K. Effect of *Zizyphus spina-christi* Willd aqueous extract on the central nervous system in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 79, p. 13-16, 2002.
- ANDRADE, L. H. S. G.; GORENSTEIN, C. Aspectos gerais das escalas de avaliação de ansiedade. **Rev. Psiquiatr. Clín.**, v. 25, n. 6, p. 285-290, 1998.
- ANDRADE FILHO, A.; CAMPOLINA, D.; DIAS, M. B. **Toxicologia na prática clínica**, Belo Horizonte: Folium, 2001.
- ANDREWS, G.; SANDERSON, K.; SLADE, T.; ISSAKIDIS, C. Why does the burden of disease persist? Relating the burden of anxiety and depression to effectiveness of treatment. **Bull. World Health Organ.**, v. 78, p. 446-454, 2000.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Anim. Behav.**, v. 21, p. 205-235, 1973.
- ARIZA, S. Y.; RUEDA, D. C.; RINCÓN V. J.; LINARES, E. L.; GUERRERO, M. F. Efectos farmacológicos sobre el sistema nervioso central inducidos por cumarina, aislada de *Hygrophila tytha* Leonard. **Rev. Fac. Quím. Farm.**, v. 14, n. 2, 2007.
- ASCHER, J. A.; COLE, J. O.; COLIN, J. N.; FEIGHNER, J. P.; FERRIS, R. M.; FIBIGER, H. C.; GOLDEN, R. N.; MARTIN, P.; POTTER, W. Z.; RICHELSON, E.; SULSER, F. Bupropion: a review of its mechanism of antidepressant activity. **J. Clin. Psychiatry**, v. 56, p. 395-401, 1995.
- ASSUNÇÃO, S. S. M.; GUIMARÃES, D. B. S.; SCIVOLETTO, S. Depressão. **Rev. Bras. Med.**, v. 55, n. 7, p. 459-469, 1998.
- AVOLI, M. GABA-mediated synchronous potentials and seizure generation. **Epilepsia**, v. 37, p. 1035-1042, 1996.
- BACON, S. J.; HEADLAM, A. J.; GABBOTT, P. L.; SMITH, A. D. Amygdala input to medial prefrontal cortex (mPFC) in the rat: a light and electron microscope study. **Brain Res.**, v. 720, p. 211-219, 1996.
- BAGLEY, J.; MOGHADDAM, B. Temporal dynamics of glutamate efflux in the prefrontal cortex and in the hippocampus following repeated stress: effects of pretreatment with saline or diazepam. **Neuroscience**, v. 77, p. 65-73, 1997.
- BARNETT, S. A. **The Rat: a Study in Behavior**. Chicago: University of Chicago Press, 1975.
- BERNSTON, G. G.; SARTER, M.; CACIOPPO, J. T. Anxiety and cardiovascular reactivity: the basal forebrain cholinergic link. **Behav. Brain Res.**, v. 94, p. 225-248, 1998.
- BERTON, O.; NESTLER, E. J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 7, p. 137-151, 2006.

- BLEAKMAN, D.; LODGE, D. Neuropharmacology of AMPA and kainate receptors. **Neuropharmacology**, v. 37, p. 1197-1204, 1998.
- BLISS, T. V. P.; COLLINGRIDGE, G. L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, v. 361, p. 31-39, 1993.
- BORMANN, J. Electrophysiology of GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptor subtypes. **Trends Neurosci.**, v. 11, p. 112-116, 1988.
- BORN, S. L.; RODRIGUEZ, P. A.; EDDY, C. L.; LEHMAN-McKEEMAN, L. D. Synthesis and reactivity of coumarin 3,4-epoxide. **Drug Metab. Dispos.**, v. 25, p. 1318-1324, 1997.
- BORN, S. L.; FIX, A. S.; CAUDILL, D.; LEHMAN-McKEEMAN, L. D. Selective Clara cell injury in mouse lung following acute administration of coumarin. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 151, p. 45-56, 1998.
- BORN, S. L.; CAUDILL, D.; SMITH, B. J.; LEHMAN-McKEEMAN, L. D. In vitro kinetics of coumarin 3,4-epoxidation: application to species differences in toxicity and carcinogenicity. **Toxicol. Sci.**, v. 58, p. 23-31, 2000.
- BORN, S. L.; CAUDILL, D.; FLITER, K. L.; PURDON, M. P. Identification of the cytochromes P450 that catalyze coumarin 3,4-epoxidation and 3-hydroxylation. **Drug Metab. Dispos.**, v. 30, n. 5, p. 483-487, 2002.
- BORN, S. L.; API, A. M.; FORD, R. A.; LEFEVER, F. R.; HAWKINS, D. R. Comparative metabolism and kinetics of coumarin in mice and rats. **Food Chem. Toxicol.**, v. 41, p. 247-258, 2003.
- BORSINI, F.; PODHORNA, J.; MARAZZITI, D. Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants? **Psychopharmacology**, v. 163, p. 121-141, 2002.
- BOWERY, N. G. GABA<sub>B</sub> receptor pharmacology. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 33, p. 109-147, 1993.
- BRADFORD, H. F.; THOMAS, A. J. **Metabolism of glucose and glutamate by synaptosomes from mammalian cerebral cortex.** *J. Neurochem.*, v. 16, p. 1495-1504, 1969.
- BROWN, E. S.; RUSH, A. J.; McEWEN, B. Hippocampal remodelling and damage by corticosteroids: implications for mood disorders. **Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 4, p. 474-484, 1999.
- BROWN, G. W. The role of life events in the aetiology of depressive and anxiety disorders. In: STANNFORD S.; SAMON, P. (Ed). **Stress: from synapse to syndrome.** London: Academic Press, 1993. p. 23-50.
- BURKE, R. E.; GREENBAUM, D. Effect of post-mortem factors on muscarinic receptor subtypes in rat brain. **J. Neurochem.**, v. 49, p. 529-596, 1987.

CABELLO-HURTADO, F.; DURST, F.; JORRÍN, J. V.; WERCK-REICHHART, D. Coumarins in *Helianthus tuberosus*: characterization, induced accumulation and biosynthesis. **Phytochemistry**, v. 49, p. 1029-1036, 1998.

CARLINI, E.A.; BURGOS, V. *Screening* farmacológico de ansiolíticos: metodologia laboratorial e comparação entre o diazepam e o clorobenzapam. **Rev. Assoc. Bras. Psiquiatr.**, v. 1, p. 25-31, 1979.

CARMEN-GUTIERREZ, M.; PARRY, A.; TENA, M.; JORRIN, J.; EDWARDS, R. Abiotic elicitation of coumarin phytoalexins in sunflower. **Phytochemistry**, v. 38, p. 1185-1191, 1995.

CAROLA, V.; D'OLIMPIO; BRUNAMONTI, E.; MANGIA, F.; RENZI, P. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behavior in inbred mice. **Behav. Brain Res.**, v. 134, p. 49-57, 2002.

CARTMELL, J.; SCHOEPP, D. D. Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors. **J. Neurochem.**, v. 75, p. 889-907, 2000

CASLEY-SMITH, J. R.; PILLER, N. B. The pathogenesis of oedemas and the therapeutic action of coumarin and related compounds. **Fol. Angiolog.**, v. 3, p. 33-37, 1974.

CASLEY-SMITH, J. R.; WINEOW, J. Quantitative morphological correlations of alterations in capillary permeability, following histamine and moderate burning, in the mouse diaphragm, and the effects of benzopyrones. **Microvasc. Res.**, v. 11, p. 279-305, 1976.

CASLEY-SMITH, J. R.; GAFFNEY, R. M. Excess plasma proteins as a cause of chronic inflammation and lymphoedema: quantitative electron microscopy. **J. Pathol.**, v. 133, p. 69-74, 1981.

CASLEY-SMITH, J. R. **Benzopyrones for treatment of high protein edema in animals.** PCT Int. Appl. Wo 85 03,865 (Cl. A61K31/35), 12 Sep. 1985, Av Appl. 84/ 3,874, 01 Mar. 1984; 14 p.

CASLEY-SMITH, J. R.; JAMAL, S. Reduction of filiaritic lymphoedema and lephantiasis by 5,6 benzomt-pyrone (coumatin), and the effects of diethylcarbamazine (DEC). **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 8, p. 247-258, 1993.

CHEN, Y.; KONG, L. D.; XIA, X.; KUNG, H. F.; ZHANG, L. Behavioral and biochemical studies of total furocoumarins from seeds of *Psoralea corylifolia* in the forced swimming test in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 96, p. 451-459, 2005.

CHENG, J. F.; CHEN, M.; WALLACE, D.; TITH, S.; ARRHENIUS, T.; KASHIWAGI, H.; ONO, Y.; ISHIKAWA, A.; SATO, H.; KOZONO, T.; SATO, H.; NADZAN, A. M. Discovery and structure-activity relationship of coumarin derivatives as TNF-alpha inhibitors. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 14, p. 2411-2415, 2004.

CHIOU, W. F.; HUANG, Y. L.; CHEN, C. F.; CHEN, C. C. Vasorelaxing effect of coumarins from *Cnidium monnieri* on rabbit corpus cavernosum. **Planta Med.**, v. 67, p. 282-284, 2001.

CHOI, S. Y.; AHN, E. M.; SONG, M. C.; KIM, D. W.; KANG, J. H.; KWON, O. S.; KANG, T. C.; BAEK, N. I. In vitro GABA-transaminase inhibitory compounds from the root of *Angelica dahurica*. **Phytother. Res.**, v. 19, p. 839–845, 2005.

CLODIUS, L.; PILLER, N. B. The conservative treatment of postmastectomy in patients with coumarin results in a marked continuous reduction in swelling. In: BARTOS, V.; DAVIDSON, J. W. (Ed.). **Advances in lymphology**. Prague: Avicenum, 1982. p. 471-474.

CORRÊA, A. C. O. A fenomenologia das depressões: da nosologia psiquiátrica clássica aos conceitos atuais. **Psiquiatr. Biol.**, v. 3, n. 3, p. 61-72, 1995.

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

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1977.

COTÊ, L.; CRUTCHER, M. D. The basal ganglia. In: KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M. (Ed.). **Principles of neural science**. 3<sup>rd</sup> ed. Elsevier, New York, 1991, p. 647-658.

CRAWLEY, J. N. Exploratory behavior models of anxiety in mice. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 9, p. 37-44, 1985.

CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 23, p. 238-245, 2002.

CZUCZWAR, S. J.; PATSALOS, P. N. The new generation of GABA enhancers potential in the treatment of epilepsy. **CNS Drugs**, v. 15, p. 339–350, 2001.

DALLMEIER, K.; CARLINI, E. A. Anesthetic, hypothermic, myorelaxant and anticonvulsant effects of synthetic eugenol derivatives and natural analogues. **Pharmacology**, v. 22, p. 113-127, 1981.

DANBOLT, C.N. Glutamate uptake. **Progr. Neurobiol.**, v.65, p.1-105, 2001.

DAVIDSON, A. F. An evaluation of the treatment and aftercare of a hundred alcoholics. **Br. J. Addict.**, v. 71, p. 217-224, 1976.

DAVIS, S.; BUTCHER, S. P.; MORRIS, R. G. M. The NMDA receptor antagonist D-2 amino-5-phosphonopentanoate (DAP5) impairs spatial learning and LTP *in vivo* at intracerebral concentrations comparable to those that block LTP *in vitro*. **J. Neurosci.**, v. 12, p. 21–34, 1992.

DEL ARCO, A.; MORA, F. Effects of endogenous glutamate on extracellular concentrations of GABA, dopamine, and dopamine metabolites in the prefrontal cortex of the freely moving rat: Involvement of NMDA and AMPA/KA receptors. **Neurochem. Res.**, v. 24, p. 1027–1035, 1999.

DEL OLMO, N.; BUSTAMANTE, J.; DEL RIO, R. M.; SOLIS, J. M. Taurine activates GABA (A) but not GABA (B) receptors in rat hippocampal CA1 area. **Brain Res.**, v. 864, p. 298–307, 2000.

DeLONG, M. R. The basal ganglia. In: KANDEL, E. R.; SCHWART, J. H.; JESSELL, T. M. (Ed.). **Principles of neural science**. 4<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill, 2000. cap. 43, p. 853–867.

DE SARRO, G.; PALMA, E.; COSTA, A.; MARRA, R.; GRATTERI, S.; DE SARRO, A.; ROTIROTI, D. Effects of compounds acting on GABAB receptors in the pentylenetetrazole kindling model of epilepsy in mice. **Neuropharmacology**, v. 39, p. 2147–2161, 2000.

DIAWARA, M. M.; TRUMBLE, J. T. Linear furanocoumarins. In: FELIX D’MELLO, J. P. (Ed.). **Handbook of plant and fungal toxicants**. Boca Raton: CRC, 1997.

DINGLEDINE, R.; MCBAIN, C. Glutamate and Aspartate. In: SIEGEL, G. J.; AGRANOFF, B. W.; ALBERS, R. W.; FISHER, S. K.; UHLER, M. D. (Ed.). **Basic Neurochemistry, molecular cellular and medical aspects**. 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins, 1999. p. 315.

DUNN, A.J.; GUILD, A.L.; KRAMARCY, N.R.; WARE, M.D. Benzodiazepines decrease grooming in response to novelty but not ACTh or beta-endorphin. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 15, p. 605-608, 1981.

EMERIT, J.; CHAUDIÈRE J. Free radicals and lipid peroxidation in cell pathology. In: MIQUEL, J.; QUINTANILHA, A. T.; WEBER, H. **Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine**. Boca Raton: CRC Press, 1989. v. 1, p. 177-185.

ENGEL JR., J. Excitation and inhibition in epilepsy. **Can. J. Neurol. Sci.**, v. 23, p. 167–74, 1996.

FARBER, N. B.; NEWCOMER, J. W.; OLNEY, J. W. The glutamate synapse in neuropsychiatric disorders. Focus on schizophrenia and Alzheimer’s disease. **Prog. Brain Res.**, v. 116, p. 421–437, 1998.

FAURSHOU, P. Toxic hepatitis due to benzo-pyrone. **Hum. Toxicol.**, v. 1, p.149-150,1982.

FELDMAN, R. S.; MEYER, J. S.; QUENZER, L. F. **Catecholamines: principles of neuropsychopharmacology**. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1997. p. 277–344.

FENNER, R.; BETTI, A.H.; MENTZ, L.A.; RATES, S. M. K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Rev. Bras. Ciênc. Farm. Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 42, n. 3, 2006.

FERRO, D. **Fitoterapia: conceitos clínicos**. São Paulo: Atheneu, 2006.

FEUER, G. The metabolism and biological actions of coumarins. **Prog. Med. Chem.**, v. 10, p. 85–158, 1974.

FILE, S.E.; WARDILL, A.G. Validity of head-dipping as a measure of exploration in a modified hole-board. **Psychopharmacology**, v. 44, p. 53-59, 1975.

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

FILE, S. E. The interplay of learning and anxiety in the elevated plus-maze. **Behav. Brain Res.**, v. 58, p. 199-202, 1993.

FRANKLIN, T. R.; DRUHAN, J. P. Involvement of the nucleus accumbens and medial prefrontal cortex in the expression of conditioned cortex in 5-HT receptor-induced inhibition of 5-HT neuronal hyperactivity to a cocaine-associated environment in rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 23, p. 633-644, 2000.

FRERKING, M.; NICOLL, R. A. Synaptic kainate receptors. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 10, p. 342-351, 2000.

GARTNER, B. C.; SEIFERT, C. B.; MICHALK, D. V.; ROTH, B. Phenprocoumon therapy during pregnancy: case report and comparison of the teratogenic risk of different coumarin derivatives. **Z. Geburtshilfe Perinatol.**, v. 197, p. 262-265, 1993.

GAYKEMA R. P.; GAÁL G.; TRABER J.; HERSH L. B.; LUITEN P. G. The basal forebrain cholinergic system: efferent and afferent connectivity and long-term effects of lesions. **Acta Psychiatr. Scand. Suppl.**, v. 366, p.14-26, 1991.

GERFEN, C. R. The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 15, p. 285-320, 1992.

GINGRICH, J. A.; CARON, M. G. Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 16, p. 299-321, 1993.

GIOVANNINI, M. G.; RAKOVSKA, A.; BENTON, R. S.; PAZZAGLI, M.; BIANCHI L.; PEPEU, G. Effects of novelty and habituation on acetylcholine, GABA, and glutamate release from the frontal cortex and hippocampus of freely moving rats. **Neuroscience**. v. 106, p. 43-53, 2001.

GONZALES, R. A.; JAWORSKI, J. N. Alcohol and glutamate. **Alcohol. Health Res. World.**, v. 21, p. 120-127, 1997.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. G.; HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **As bases farmacologicas da terapeutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005.

GRAY, J.; McNAUGHTON, N. **The neuropsychology of anxiety**. 2<sup>nd</sup> edition. Oxford: Oxford University Press, 2000.

GROENEWEGEN, H. J.; BERENDSE, H. W.; WOLTERS, J. G.; LOHMAN, A. H. M. The anatomical relationship of the prefrontal cortex with the striatopallidal system, the thalamus, and the amygdala: evidence for a parallel organization. **Prog. Brain Res.**, v. 85, p. 95-118, 1990.

GROOT, A. C.; WEYLAND, J. W.; NATER, J. P. (Ed.). **Unwanted effects of cosmetics and drugs used in dermatology**. Amsterdam: Elsevier, 1994.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Textbook of medical physiology**. 11<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2006.

HALL, C. S. Emotional behaviour in the rat: III. The relationship between emotionality and ambulatory activity. **J. Comp. Physiol. Psychiatr.**, v. 22, p. 345-352, 1936.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; CROSS, C. E. Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now? **J. Lab. Clin. Med.**, v. 119, p. 598-620, 1992.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. (Ed.). **Goodman e Gilman's: the pharmacological basis of therapeutics**. 10. ed. New York: McGraw Hill, 2005.

HASHIMOTO, Y.; ARAKI, H.; SUEMARU, K.; GOMITA, Y. Effects of drugs acting on the GABA-benzodiazepine receptor complex on flurothyl-induced seizures in Mongolian gerbils. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 536, p. 241-247, 2006.

HASSELMO, M. E. Neuromodulation and cortical function: modeling the physiological basis of behavior. **Behav. Brain Res.**, v. 67, p. 1-27, 1995.

HAYES, S. N.; MOYER, T. P.; MORLEY, D.; BOVE, A. A. Intravenous cocaine causes epicardial coronary vasoconstriction in the intact dog. **Am. Heart J.**, v. 121, p.1639-1648, 1991.

HEIDBREDE C. A.; GROENEWEGEN H. J. The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 27, p. 555-579, 2003.

HERMAN, J. P.; CULLINAN, W. E. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. **Trends Neurosci.**, v. 20, p. 78-84, 1997.

HIGASHIMA, M.; KINOSHITA, H.; KOSHINO, Y. Differences in the effects of zolpidem and diazepam on recurrent inhibition and long-term potentiation in rat hippocampal slices. **Neurosci. Lett.**, v. 245, p. 77-80, 1998.

HOULT J. R. S.; PAYÁ, M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. **Gen. Pharmacol.**, v. 27, p. 713-722, 1996.

HUANG, A. C. W.; SHYU, B. C.; HSIAO, S. Dose-dependent dissociable effects of haloperidol on locomotion, appetitive responses, and consummatory behavior in water-deprived rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 95, n. 3, p. 285-291, 2010.

IRIE, Y.; ITOKAZUA, N.; ANJIKI, N.; ISHIGE, A.; WATANABE, K.; KEUNG, W. M. Eugenol exhibits antidepressant-like activity in mice and induces expression of etallothionein-III in the hippocampus. **Brain Res.**, v. 1011, p. 243-246, 2004.

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

JOHANSSON, C.; AHLENIUS, S. Evidence for the involvement of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the mediation of exploratory locomotor activity in the rat. **J. Psychopharmacol.**, v. 3, p. 32-35; 1989.

KAMETANI, H. Analysis of age-related-changes in stress-induced grooming in the rat – differential behavioral profile of adaptation to stress. **Ann. NY Acad. Sci.**, v.525, p.101-113, 1988.

KANDEL, E. R. The brain and behavior. In: KANDEL, E. R.; SCHWART, J. H.; JESSELL, T. M. (Ed.). **Principles of neural science**. 4th ed. New York: McGraw-Hill, 2000. cap. 1, p. 5-17.

KANG, S. Y.; LEE, K. Y.; SUNG, S. H.; PARK, M. J.; KIM, Y. C. Coumarins isolated from *Angelica gigas* inhibit acetylcholinesterase: structure– activity relationships. **J. Nat. Prod.**, v. 64, p. 683–685, 2001.

KANG, S. Y.; LEE, K. Y.; MARKELONIS, G. J.; OH, T. H.; KIM, Y. C. Decursin from *Angelica gigas* mitigates amnesia induced by scopolamine in mice. **Neurobiol. Learn. Mem.**, v. 79, p. 11–18, 2003.

KANG, S. Y.; LEE, K. Y.; SUNG, S. H.; KIM, Y. C. Four new neuroprotective dihydropyranocoumarins from *Angelica gigas*. **J. Nat. Prod.**, v. 68, p. 56–59, 2005.

KANG, S. Y.; KIM, Y. C. Decursinol and decursin protect primary cultured rat cortical cells from glutamate-induced neurotoxicity. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 59, p. 863–870, 2007.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica e clínica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Mcgraw-Hill, 2007.

KEFELI, V. I.; KADYROV, Ch. Natural growth inhibitors, their chemical and physiological properties. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, v. 22, p. 185-196, 1971.

KLEINGEIST, B.; BOCKER, R.; GEISLINGER, G.; BRUGGER, R. Isolation and Pharmacological Characterization of Microsomal Human Liver Flumazenil Carboxylesterase. **J. Pharm. Pharmaceut. Sci.**, v. 1, p. 38-46, 1998.

KOLB, B. Functions of the frontal cortex of the rat: a comparative review. **Brain Res. Rev.**, v. 8, p. 65-98, 1984.

KOOB, G. F. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 13, p. 177-184, 1992.

KOOB, G. F.; BLOOM, F. E. Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. **Science**, v. 242, p. 715-723, 1988.

KORF, J.; VENEMA, K. Amino acids in rat striatal dialysates: methodological aspects and changes after electroconvulsive shock. **J. Neurochem.**, v. 45, p. 1341-1348, 1985.

KRAKAUER, J.; GHEZ, C. Voluntary movement. In: KANDEL, E. R.; SCHWART, J. H.; JESSELL, T. M. (Ed.). **Principles of neural science**. 4th ed. New York: McGraw-Hill, 2000. cap. 38, p. 756-781.

LAKE, B. G. Coumarin metabolism, toxicity, and carcinogenicity: relevance for human risk assessment. **Food Chem. Toxicol.**, v. 37, p. 423-453, 1999.

LANCASTER, F. E. Alcohol, nitric oxide, and neurotoxicity: is there a connection? A review. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 16, p. 539-41, 1992.

LANG, A. E.; LOZANO, A. M. Parkinson's disease. First of two parts. **N. Engl. J. Med.**, v. 339, p. 1044-1053, 1998.

LATHE, R. Hormone and hippocampus. **J. Endocrinol.**, v. 169, p. 205-231, 2001.

LEAL, L. K. A. M.; FERREIRA, A. A. G.; BEZERRA, G. A.; MATOS, F. J. A.; VIANA, G. S. B. Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. **J. Ethnopharmacol.**, v. 70, p. 151-159, 2000.

LEE, J. K.; CHOID, S. S.; LEE, H. K.; HAN, K. J.; HAN, E. J.; SUH, H. W. Effects of ginsenoside Rd and decursinol on the neurotoxic response induced by kainic acid in mice. **Planta Med.**, v. 69, p. 230-234, 2003.

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios: Conceitos fundamentais de neurociência**. São Paulo: Atheneu, 2004.

LEWIS, A. **Problems Presented by the Ambiguous Word "Anxiety" as Used in Psychopathology**. In: The Later Papers of Sir Aubrey Lewis. *Oxford University Press*, 1979.

LINDELOF, B.; SIGURGEIRSSON, B.; TEGNER, E.; LARKO, O.; JOHANNESON, A.; BERNE, B.; CHRISTENSEN, O. B. ANDERSSON, T.; TORNGREN, M.; MOLIN, L.; NYLANDER-LUNDQUIVIST, E.; EMTESTAM, L. PUVA and cancer: a large-scale epidemiological study. **Lancet**, v. 338, p. 91-93, 1991.

LOPEZ, J. F.; AKIL, H.; WATSON, S. J. Role of biological and psychological factors in early development and their impact on adult lifeneural circuits mediating stress. **Biol. Psychiatr.**, v. 46, p.1461-1471, 1999.

MacFARLAND, C.G.; REEDER, W.G. Cleaning symbiosis involving Galapagos tortoises and two species of Darwin's finches. **Zeitschrift Tierpsychol.**, v. 34, p. 464-483, 1974.

MACHADO, A. B. M. **Neuroanatomia funcional**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

MAJ, J.; ROGOZ, Z. Sinergistic effect of pramipexole and sertraline in the forced swimming test. **Pol. J. Pharmacol.**, v. 51, p. 471-475, 1999.

MANSUR, J.; MARTZ, R. M. W.; CARLINI, E. A. Effects of acute and chronic administration of cannabis sativa and (-) 9-*trans* tetrahydrocannabinol on the behaviour of rats in open field arena. **Psychopharmacology**, v. 19, p. 338-397, 1971.

MCNAUGHT, K. S.; BROWN, G. C. Nitric oxide causes glutamate release from brain synaptosomes. **J. Neurochem.**, v. 70, p. 1541-1546, 1998.

MEINEKE, I.; DESEL, H.; KAHL, R.; KAHL, G. F.; GUNDERT-REMY, U. Determination of 2-hydroxyphenylacetic acid (2HPAA) in urine after oral and parenteral administration of coumarin by gas-liquid chromatography with flame-ionization detection. **J. Pharm. Biomed.**, v. 17, p. 487-492, 1998.

MELDRUM, B. S. Epilepsy and gamma-aminobutyric acid-mediated inhibition. **Int. Rev. Neurobiol.**, v. 17, p. 1-36, 1975.

MILLAN M. J. The neurobiology and control of anxious states. **Prog. Neurobiol.**, v. 70, p. 83-244, 2003.

MOLDRICH, R. X.; CHAPMAN, A. G.; DE SARROC, G.; MELDRUM, B. S. Glutamate metabotropic receptors as targets for drug therapy in epilepsy. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 476, p. 3-16, 2003.

MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novelty stimulation and exploratory behaviour. **J. Comp. Physiol. Psychol.**, v. 48, p. 254-260, 1955.

MOODY, T.W.; MERALI, Z.; CRAWLEY, J. N. The effects of anxiolytics and other agents on rat grooming behavior. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 90, p. 281-290, 1993.

MURRAY, R. D. H.; MÉNDEZ, J.; BROWN, R. A. **The Natura/Coumarins**. New York: John Wiley and Sons, 1982.

MURRAY, R. D. H. Coumarins. In: HERR W.; KIRBY, G. W.; STEGLICH, W.; TAMM, C. (Ed.). **Progress in the chemistry of organic natural products**. New York: Springer-Verlag, 1991. v. 58, p. 84-316,

NEUHAUS-CARLISLE, K.; VIERLING, W.; WAGNER, H. Screening of plant extracts and plant constituents for calcium-channel blocking activity. **Phytomedicine**, v. 4, p. 67-69, 1997.

NG, G. Y.; MOUILLAC, B.; GEORGE, S. R.; CARON, M.; DENNIS, M.; BOUVIER, M.; O'DOWD, B. F. Desensitization, phosphorylation and palmitoylation of the human dopamine D1 receptor. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 267, p. 7-19, 1994

NICHOLS, D. E. **Medicinal chemistry and structure-activity relationships**. In: Amphetamine and Its Analogs (Cho AK and Segal DS eds) pp 3-41, Academic Press, San Diego, 1994.

NICHOLSON, R. A.; ZHANG, A. Surangin B: insecticidal properties and mechanism underlying its transmitter releasing action in nerve terminal fractions isolated from mammalian brain. **Pestic Biochem. Physiol.**, v. 53, p. 152-163, 1995.

NOVAS, M. L.; WOLFMAN, C.; MEDINA, J. H.; DE ROBERTIS, E. Proconvulsant and “anxiogenic” effects of n-butyl beta carboline-3-carboxylate, an endogenous benzodiazepine binding inhibitor from brain. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 30, p. 331-336, 1988.

OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

OLNEY, J. W.; NEWCOMER, J. W.; FARBER, N. B. NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia. **J. Psychiatry Res.**, v. 33, p. 523-533, 1999.

OLSON, R. Gaba. In: DAVIS, K.; CHARNEY, D.; COYLE, J.; NEMEROFF, C. (Ed.). **Neuropsychopharmacology: The fifth generation of progress**. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2002.

ONAIWI, E. S.; MAQUIRE, P. A.; TSAI, N. F.; DAVIES, M. F.; LOEW, G. H. Comparison of behavioral and central BDZ binding profile in three rat lines. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 43, p. 825-831, 1992.

PAN, Y.; KONG, L.; XIA, X.; ZHANG, W.; XIA, Z.; JIANG, F. Antidepressant-like effect of icariin and its possible mechanism in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 82, p. 686-694, 2005.

PANDEY, M.; BORAH, A.; VARGHESE, M.; BARMAN, P. K.; MOHANAKUMAR, K. P.; USHA, R. Striatal dopamine level contributes to hydroxyl radical generation and subsequent neurodegeneration in the striatum in 3-nitropropionic acid-induced Huntington's disease in rats. **Neurochem. Int.**, v. 55, n. 6, p. 431-437, 2009.

PAYA, M.; HALLIWEL, B.; HOULT, J. R. Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species. Scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals. **Biochem. Pharmacol.**, v. 44, p. 205-214, 1992a.

PAYÁ, M.; HALLIWEL, B.; HOULT, J. R. Peroxyl radical scavenging by a series of coumarins. **Free Rad. Res. Comms.**, v. 17, p. 293-298, 1992b.

PAYÁ, M.; GOODWIN, P. A.; DE LAS HERAS, B.; HOUK, J. R. S. **Superoxide scavenging activity in leukocytes and absence of cellular toxicity of a series of coumarins**. *Biochem. Pharmacol.*, v. 48, p. 445-451, 1994.

PELKONEN, O.; RAUTIO, A.; RAUNIO, H.; PASANEN, M. CYP2A6: a human coumarin 7-hydroxylase. **Toxicology**, v. 144, p. 139-147, 2000.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entrier in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J. Neurosci. Meth.**, 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.

- PEREIRA, E. C.; LUCETTI, D. L.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CABRAL, A. G. S.; SANTOS, T. N.; LIMA, N. M.; PATROCÍNIO, M. C. A.; SOUSA, F. C. F.; MENDONÇA, A. R., MARTIN, A. L. A. R., MONTEIRO, V. S.; VASCONCELOS, S. M. M. Atividades centrais da cumarina da *Amburana cearensis* em camundongos. In: REUNIÃO REGIONAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 3., 2008, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza, 2008.
- PEREZ, R. M. G.; PEREZ, J. A. L.; GARCIA, L. D. M.; SOSSA, H. M. Neuropharmacological activity of *Solanum nigrum* fruit. **J. Ethnopharmacology**, v. 62, p. 43-48, 1998.
- PERKINTON, M. S.; SIHRA, T. S. A high-affinity presynaptic kainate-type glutamate receptor facilitates glutamate exocytosis from cerebral cortex nerve terminals (synaptosomes). **Neuroscience**, v. 90, p. 1281–1292, 1999.
- PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N.P.; EPIFÂNIO, R.A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Quim. Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.
- PITTENGER, C.; DUMAN, R. S. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, p. 88–109, 2008.
- PORSOLT, R. D; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, v. 229, p. 327-36, 1977.
- PRUT, L.; BELZUNG, C. The open-field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 60061, p.1-31, 2003.
- RAMOS, A.; BERTON, O.; MORMEDE, P.; CHAUOFF, F. A multiple-test study of anxietyrelated behaviours in six inbred rat strains. **Behav. Brain Res.**, v. 85, p. 57-69, 1997.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.
- RICHMOND, R.; ZWAR, N. Review of bupropion for smoking cessation. **Drug Alcohol Rev.**, v. 22, p. 203-220, 2003.
- RIEDEL, G.; MICHEAU, J. Function of the hippocampus in memory formation: desperately seeking resolution. *Prog. Neuropsychopharmacol.* **Biol. Psychiatry**, v. 25, n. 4, p. 835-853, 2001.
- ROBBERS, J. E.; TYLER, V. E.; SPEEDIE, M. K. **Pharmacognosy & Pharmacobiotechnology**. New York: William & Wilkim, 1996.
- RODGERS, R. J.; JOHNSON, N. J.; COLE, J. C.; DEWAR, C. V.; KIDD, G. R.; KIMPSON, P. I. I. Plus-maze retest profile in mice: Importance of initial stages of trial and response to post-trial cholinergic receptor blockade. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 54, p. 41-50, 1996.
- RODGERS, R. J.; DALVI, A. **Anxiety, defence and the elevated plus-maze**. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, v. 21, p. 801–810, 1997.

ROSSETTI, Z. L.; LAI, M.; HMAIDAN, Y.; GESSA, G. L. Depletion of mesolimbic dopamine during behavioral despair: partial reversal by chronic imipramine. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 242, p. 313-315, 1993.

SESACK, S. R.; DEUTCH, A. Y.; ROTH, R. H.; BUNNEY, B. S. Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. **J. Comp. Neurol.**, v. 290, p. 213-242, 1989.

SESACK, S. R.; PICKEL, V. M. Prefrontal cortical efferents in the rat synapse on unlabeled neuronal targets of catecholamine terminals in the nucleus accumbens septi and on dopamine neurons in the ventral tegmental area. **J. Comp. Neurol.**, v. 320, p. 145-160, 1992.

SHANK, R. P.; APRISON, M. H. Glutamine uptake and metabolism by the isolated toad brain: evidence pertaining to its proposed role as a transmitter precursor. **J. Neurochem.**, v. 28, p. 1189-1196, 1977.

SILVILOTTI, L.; NISTRÌ, A. GABA receptor mechanisms in the central nervous system. **Prog. Neurobiol.**, v. 36, p. 35-92, 1991.

SIMÕES, M. O.; GUERRA, M. P. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. rev. e ampl. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2004.

SMITH, P. D.; McLEAN, K. J.; MURPHY, M. A.; TURNLEY, A. M.; COOK, M. J. Functional dentate gyrus neurogenesis in a rapid kindling seizure model. **Eur. J. Neurosci.**, v. 24, p. 3195–3203, 2006.

SNEAD III, O. C. Antiabsence seizure activity of specific GABAB and gammahydroxybutyric acid receptor antagonist. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 53, p. 73-79, 1996.

SNORDGRASS, S. R. GABA and epilepsy: their complex relationship and the evolution of our understanding. **J. Child Neurol.**, v. 7, p. 77-86, 1992.

SOMOGYL, P.; TAMAS, G.; LUJAN, R.; BUHL, E. H. Salient features of synaptic organization in the cerebral cortex. **Brain Res. Rev.**, v. 26, p. 113–135, 1998.

SOUSA, F. C. F.; LEITE, C. P.; MELO, C. T. V.; ARAÚJO, F. L. O.; GUTIERREZ, S. J. C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; FONTELES, M. M. F.; VASCONCELOS, S. M. M.; VIANA, G. S. B. Evaluation of Effects of *N*-(2-Hydroxybenzoyl) Tyramine (Riparin II) from *Aniba riparia* (NEES) MEZ (Lauracea) in Anxiety Models in Mice. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 30, n. 7, p. 1212—1216, 2007.

STARR, M. S.; STAAR, B. S. Behavioural synergism between the dopamine agonist SKF 38393 and LY 171555 in dopamine-depleted mice: Antagonism by sulpiride reveals only stimulant postsynaptic D2 receptors. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 33, n.1, p. 41-44, 1989.

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.

STRUWE, F. E.; REINWEIN, H.; STIER, R. Coumarin embryopathy. **Radiology**, v. 4, p. 68-71, 1984.

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.

SWINYARD, E. A.; WHITE, H. S.; WOLF, H. H.; BONDINELL, W. E. Anticonvulsant profiles of the potent and orally active GABA uptake inhibitors SK&F 89976-A and SK&F 100330-A and four prototype antiepileptic drugs in mice and rats. **Epilepsia**. v. 32, n. 4, p. 569-577, 1991.

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

TASSO, S. M.; MOON, S. Ch.; BRUNO-BLANCH, L. E.; ESTIU, G. L. **Characterization of the anticonvulsant profile of valpromide derivatives.** Bioorg Med Chem., v. 12 (14), p. 3857-3869, 2004.

THASTRUP, O.; KNUDSEN, J. B.; LEMMICH, J.; WINTHER, K. Inhibition of human platelet aggregation by dihydropyrano- and dihydrofuranocoumarins, a new class of cAMP-phosphodiesterase inhibitors. **Biochem. Pharmacol.**, v. 34, p. 2137-2140, 1985.

TREIT, D.; FUNDYTUS, M. Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 31, p. 959-962, 1989.

TURNER, R.J .; LLOYD, D. A. The stress process and the social distribution of depression. **J. Health Soc. Behav.**, v. 40, p. 4374-404, 1999.

UYLINGS, H. B. M.; GROENEWEGEN, H. J.; KOLB, B. Do rats have a prefrontal cortex? **Behav. Brain Res.**, v. 146, p. 3-17, 2003.

VERTES R. P. Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. **Neuroscience**, v. 142, p. 1-20, 2006.

WANG, G. H.; JIANG, Z. L.; FAN, X. J.; ZHANG, L.; LI, X.; KE, K. F. Neuroprotective effect of taurine against focal cerebral ischemia in rats possibly mediated by activation of both GABAA and glycine receptors. **Neuropharmacology**, v. 52, p. 1199-1209, 2007.

WERMUTH, C. G.; BIZIERE, K. Pyridazinyl-GABA derivatives: a new class of synthetic GABAA antagonist. **TIPS**, v. 7, p. 421-424, 1986.

WHO. **Mental health: new understanding new hope.** Geneva, 2001.

WILLNER, P. Dopamine and depression. In: DI CHIARA, G. (Ed.). **Handbook of Experimental Pharmacology: Dopamine in the CNS**. Berlin: Springer, 2002. p. 213-234.

WILLNER, J.; GALLAGHER, M.; GRAHAM, P. W.; CROOKS JR., G. B. N-Methyl-Daspartate antagonist D-APV selectively disrupts taste potentiated odor aversion learning. **Behav. Neurosci.**, v. 106, p. 315-323, 1992.

YAN, J. J.; KIM, D. H.; MOON, Y. S.; JUNG, J. S.; AHN, E. M.; BAEK, N. I.; SONG, D. K. Protection against beta-amyloid peptide-induced memory impairment with long-term administration of extract of *Angelica gigas* or decursinol in mice. **Prog. Neuro-psychoph.**, v. 28, p. 25-30, 2004.

YANSHEN, D.; NICHOLSON, R. A. Stimulation by surangin B of endogenous amino acid release from synaptosomes. **Toxicon**, v. 42, 351–357, 2003.

ZHONG, Z.; WHEELER, M. D.; LI, X.; FROH, M.; SCHEMMER, P.; YIN, M.; BUNZENDAUL, H.; BRADFORD, B.; LEMASTERS, J. J. L-Glycine: a novel antiinflammatory, immunomodulatory and cytoprotective agent. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**, v. 6, p. 229-240, 2003.

ZIPPRICH, K.; CANZLER, E.; HUNDSDORFER, S. Teratogenic effect of coumarins. **Zentralblatt für Gynäkologie**, v. 109, p. 364-368, 1987.

## APÊNDICE

### Trabalho publicado referente ao estudo farmacológico da cumarina pela autora desta dissertação

PEREIRA, E.C.; LUCETTI, D.L.; BARBOSA-FILHO, J.M.; BRITO, E.M.; MONTEIRO, V.S.; PATROCÍNIO, M.C.A.; MOURA, R.R.; LEAL, L.K.A.M.; MACEDO, D.S.; SOUSA, F.C.F.; VIANA, G.S.B.; VASCONCELOS, S.M.M. Coumarin effects on amino acid levels in mice prefrontal cortex and hippocampus. *Neurosci. Lett.*, v. 454, p. 139–142, 2009.

NCBI Resources How To My NCBI Sign In

PubMed.gov  
U.S. National Library of Medicine  
National Institutes of Health

Search: PubMed  
RSS Save search Limits Advanced search Help

Coumarin[Title] AND effects[Title] AND amino[Title] AND acid[Title] AND lev Search Clear

Display Settings: Abstract Send to: ELSEVIER FULL-TEXT ARTICLE

We found 1 article by title matching your search:

Neurosci Lett. 2009 Apr 24;454(2):139-42. Epub 2009 Mar 6.

**Coumarin effects on amino acid levels in mice prefrontal cortex and hippocampus.**

Pereira EC, Lucetti DL, Barbosa-Filho JM, de Brito EM, Monteiro VS, Patrocínio MC, de Moura RR, Leal LK, Macedo DS, de Sousa FC, de Barros Viana GS, Vasconcelos SM. Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Rua Cel. Nunes de Melo 1127, CEP 60431-270, Fortaleza, Brazil.

**Abstract**

Coumarin is a compound known to be present in a wide variety of plants, microorganisms and animal species. Most of its effects were studied in organs and systems other than the central nervous system. The present work evaluated the effect of coumarin administration on the levels of gamma-aminobutyric acid (GABA), glutamate (GLU), glycine (GLY) and taurine (TAU) in the prefrontal cortex and hippocampus of mice. Male Swiss mice were treated with distilled water (controls), coumarin (20 or 40 mg/kg, i.p.) or diazepam (1 mg/kg, i.p.). Results showed that in the prefrontal cortex, coumarin at the lowest dose increased the levels of GLU and TAU, while GABA increased with both doses studied and GLY had its levels increased only at the dose of 40 mg/kg. Diazepam (DZP) increased the levels of GABA and TAU and decreased the levels of GLU and GLY in this area. In the hippocampus, only glutamate had its levels decreased after coumarin treatment, while diazepam increased the levels of GABA and TAU and decreased the levels of GLU in this brain region. We concluded that coumarin stimulates the release of endogenous amino acids, increasing the levels of inhibitory and excitatory amino acids in the prefrontal cortex, and decreasing glutamate levels in the hippocampus. Together, these results are of interest, considering that some neurodegenerative diseases and seizures are related to the imbalance of the amino acid levels in the CNS suggesting a perspective of a therapeutic use of coumarins in these disorders.

PMID: 19429071 [PubMed - indexed for MEDLINE]

+ Publication Types, MeSH Terms, Substances

+ LinkOut - more resources

Related citations

Effects of acute and chronic lamotrigine treatment on basal and stimu: [Brain Res. 2004]

Changes in hippocampal amino acid concentrations after chro [Pharmacol Rep. 2007]

Metabolic changes in rat prefrontal cortex and hippocampus induced by [Neurochem Int. 2007]

Review The importance of glutamate, glycine, and gamma-ami [Toxicol Appl Pharmacol. 2005]

Review Inhibitors of mammalian central nervous system selectiv [Curr Med Chem. 2000]

See reviews...

See all...

All links from this record

Related Citations

Compound (MeSH Keyword)

Substance (MeSH Keyword)