



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

MARIA IZABEL GOMES SILVA

INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS CENTRAIS E GASTROPROTETORES
DO ISOPULEGOL EM CAMUNDONGOS

FORTALEZA

2009

MARIA IZABEL GOMES SILVA

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS CENTRAIS E GASTROPROTETORES DO
ISOPULEGOL EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa.

FORTALEZA

2009

S581i Silva, Maria Izabel Gomes

Investigação dos efeitos centrais e gastroprotetores do isopulegol em camundongos / Maria Izabel Gomes Silva. – Fortaleza, 2009.

242 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Ansiedade 2. Depressão 3. Convulsões 4. Gastroproteção
I. Sousa, Francisca Cléa Florenço (Orient.) II. Título

CDD: 616.8

MARIA IZABEL GOMES SILVA

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS CENTRAIS E GASTROPROTETORES DO
ISOPULEGOL EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Farmacologia

Aprovada em ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa
Universidade Federal de Sergipe-UFS

Profa. Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida
Universidade Federal do Piauí-UFPI

Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana
Universidade Federal do Ceará-UFC

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

Aos meus pais, irmãos, sobrinhas e ao meu companheiro e amigo de todas as horas, meu esposo, por todo apoio, paciência, incentivo e por representarem juntos a minha real razão de viver!

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais pelo esforço, paciência, dedicação, apoio e incentivo despendidos à minha educação e formação como profissional, mas, sobretudo, como ser humano.

Aos meus irmãos e sobrinhas, pela compreensão de tamanha ausência em momentos tão especiais em suas vidas, mesmo estando sempre presente e ligada pelo coração a todos eles.

Ao meu esposo e amigo, pelo amor, amizade, apoio, incentivo e, principalmente, pelo auxílio e compreensão ao longo de toda essa caminhada, bem como à sua família da qual hoje faço parte, que me acolheu com todo amor e carinho e onde também encontro incentivo e apoio constante.

À minha orientadora, Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa, pelos preciosos conhecimentos transmitidos e dedicação permanente durante toda esta jornada, mas, principalmente, pela amizade e incentivo em todos os momentos. Com ela aprendi muitas coisas, mas aprendi principalmente que, no final, tudo dar certo quando trabalhamos dedicadamente para isto. Muito obrigada!

Aos Professores Dr. Damião Pergentino de Sousa, Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida, Dra. Glauce Socorro de Barros Viana, Dra. Marta Maria de França Fonteles, por terem gentilmente aceito o convite para participarem da banca de avaliação desta tese;

Ao Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa também por ter gentilmente fornecido a substância teste utilizada neste estudo e pelo constante apoio e presteza em todos os momentos que nos auxiliou.

Aos alunos de iniciação científica (à época): Aline Mara, Mariana Lima, Helvira Félix, Izabel Linhares, Helenira Lourenço, Everton Paulo e, principalmente, à Brinell Arcanjo e Rufino de Aquino, pelo constante auxílio, presteza e disposição em ajudar durante todo o período de construção deste estudo.

Aos funcionários do Laboratório de Neurofarmacologia, Vilani e Arnaldo pela dedicação e apoio fornecidos;

Às minhas amigas Patrícia Freire, Thiciane Melo, Maria do Carmo, Francisca Charliane, Edith Teles, Aline Albuquerque, Lissiana Magna e aos amigos Jeferson Falcão, Fernando Luiz, Emiliano Rios e Nayrton Flávio, por terem compartilhado momentos especiais de amizade e ajuda, contribuindo também para a confecção deste trabalho.

À todos os integrantes do Laboratório de Neurofarmacologia, dentre estudantes de iniciação científica, mestrado, doutorado, apoio técnico e professores, que fazem deste local não só um ambiente de trabalho e estudo sério, mas também um lugar de muita amizade, alegria e, principalmente, de muito companheirismo e ajuda mútua;

Aos professores do curso de pós-graduação, pelos conhecimentos transmitidos, paciência e dedicação aos seus alunos, em especial à Profa. Dra. Danielle Silveira Macêdo, pelas valiosas contribuições e amizade.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação, secretárias e funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, em especial à Aura;

Aos funcionários do biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia por terem cedido os animais para este estudo;

À Deus por me iluminar sempre, em todos os momentos de minha vida, pois nele encontro a força necessária para superar os obstáculos que, com a certeza de sua presença constante, nunca serão intransponíveis;

Agradeço especialmente a todas as vidas que foram sacrificadas para tornarem possível a realização deste estudo. A todos os animais utilizados, o meu respeitoso e sincero “Muito Obrigada”!

" Pensamos demasiadamente e sentimos muito pouco... Necessitamos mais de humildade que de máquinas. Mais de bondade e ternura que de inteligência. Sem isso, a vida se tornará violenta e tudo se perderá."

Charles Chaplin

RESUMO

Avaliação dos efeitos centrais e gastroprotetores do isopulegol em camundongos. Maria Izabel Gomes Silva. Orientadora: Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa. Tese de Doutorado. Curso de Pós-graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC, 2009.

O isopulegol é um monoterpene álcool presente no óleo essencial de diversas plantas aromáticas, e tem sido utilizado na manufatura de perfumes com composições florais. No presente estudo, inicialmente, foi realizado um *screening* farmacológico de ação central para a investigação de possíveis alterações comportamentais induzidas pelo isopulegol. Camundongos *Swiss* machos foram tratados com isopulegol (25 e 50 mg/kg) ou veículo (salina a 0,9% em Tween 0,3%) 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes dos experimentos. Flumazenil foi utilizado 15 min antes dos tratamentos com o intuito de investigar a participação dos receptores GABA_A/BZD nas ações do isopulegol. A concentração de monoaminas e seus metabólitos foi também verificada em corpo estriado após a administração aguda de isopulegol. Os resultados dos testes do LCE e *hole board* sugerem que o isopulegol apresenta provável efeito ansiolítico, o qual está relacionado, pelo menos em parte, à modulação positiva dos receptores GABA_A/BZP. Esse efeito não foi acompanhado de ação sedativa em baixas doses, o que foi evidenciado pela ausência de diminuição de ALE no teste do campo aberto. Os parâmetros observados no teste do nado forçado, suspensão da cauda e tempo de sono induzido por pentobarbital sugerem que o isopulegol apresenta possível efeito depressor do SNC. Os efeitos centrais observados foram corroborados por uma redução na concentração de DA e NA, mas não de 5-HT. Com o objetivo de investigar o potencial anticonvulsivante do isopulegol, camundongos foram pré-tratados com isopulegol (25, 50, 100 e 200 mg/kg, i.p. ou v.o.) ou veículo antes de serem expostos ao modelo de convulsão induzida por PTZ (99 mg/kg, s.c.). A participação dos receptores GABA_A/BZD (utilizando a administração prévia de flumazenil), bem como se uma possível atividade antioxidante estaria envolvida nas ações anticonvulsivantes do isopulegol, foram também investigadas. O isopulegol (100 e 200 mg/kg) apresentou significativa atividade anticonvulsivante e bioprotetora contra convulsões induzidas pelo PTZ. Nessas doses, a administração de isopulegol induziu acentuado efeito sedativo (diminuição da ALE em campo aberto). A ação anticonvulsivante observada foi, possivelmente, relacionada à modulação dos receptores GABA_A/BZP, uma vez que o pré-tratamento com flumazenil reverteu o prolongamento da latência para as convulsões induzidas pelo isopulegol. Propriedades antioxidantes também foram relacionadas ao efeito anticonvulsivante, desde que o isopulegol preveniu a peroxidação lipídica, preservou a atividade da catalase e reverteu a redução do conteúdo de GSH induzida pelo PTZ. Com o objetivo de investigar o potencial gastroprotetor do isopulegol em modelo de úlcera gástrica induzida por etanol e indometacina, os animais receberam isopulegol (25, 50, 100 e 200 mg/kg, v.o.) antes do etanol (0,2 mL, v.o.) ou indometacina (20 mg/kg, v.o.). Uma análise histopatológica de amostras dos estômagos foi realizada, bem como possíveis mecanismos de ação foram também investigados. O isopulegol (100 e 200 mg/kg) apresentou significativo efeito gastroprotetor em ambos os modelos de úlcera induzida por etanol e indometacina, ação esta corroborada pelo estudo histopatológico. Observou-se que o pré-tratamento dos animais com indometacina e glibenclamida reverteu a gastroproteção induzida pelo isopulegol. O conteúdo de GSH também foi preservado pela administração prévia do isopulegol. Esses resultados sugerem que o efeito gastroprotetor do isopulegol parece ser mediado, pelo menos em parte, pelas prostaglandinas endógenas, pela abertura dos canais de K_{ATP} e por propriedades antioxidantes referentes ao aumento do conteúdo de GSH.

Palavras-chave: Isopulegol. Ansiedade. Depressão Central. Convulsão. Gastroproteção.

ABSTRACT

Evaluation of the central nervous system and gastroprotective effects of isopulegol in mice. Maria Izabel Gomes Silva. Supervisor: Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa. Doctor degree thesis. Post-graduation course in Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology, UFC, 2009.

Isopulegol is a monoterpene alcohol present in the essential oils of various plants, and has been used in the manufacture of fragrances with blossom compositions. In order to investigate its effects on animal models of CNS actions, isopulegol was administered to male Swiss mice at single doses of 25 and 50 mg/kg 30 (i.p.) or 60 min (p.o.) before the experiments. Control animals received vehicle (saline 0.9% in 0.3% Tween). For investigating the involvement of GABA_A/BZP system, flumazenil was utilized 15 min before the treatments. Monoamines and their metabolites concentration were also investigated in striatum of mice after acute administration of isopulegol. The results in EMP and hole board tests suggest possible anxiolytic-like effects from isopulegol, which were reversed by flumazenil pretreatment, indicating probable positive modulation of benzodiazepine-sensitive GABA_A receptors. The anxiolytic-like effects were not accompanied by sedation, as reduced locomotion was not observed in open field test. Parameters observed in the forced swimming, tail suspension and pentobarbital sleeping time tests support the idea that isopulegol possibly presents depressant activity on the CNS. The observed central effects were corroborated by DA and NE decreased levels (without changes in 5-HT levels). In order to verify whether isopulegol would be able to exert any protector effect in PTZ-induced convulsions, mice received isopulegol (25, 50, 100 and 200 mg/kg, i.p. or p.o.) or vehicle before PTZ (99 mg/kg, s.c.). The involvement of GABA_A/BZP receptors was also investigated by flumazenil pretreatment. Also, it was evaluated whether antioxidant properties from isopulegol would be related to its possible anticonvulsant effect. Results showed that isopulegol (100 and 200 mg/kg) presented anticonvulsant and bioprotective effects against PTZ-induced convulsions. At 100 and 200 mg/kg doses, isopulegol induced marked sedative effect (decreased locomotion in open field test). Flumazenil pretreatment decreased the prolongation of convulsion latency induced by isopulegol, suggesting a possible involvement of direct activation of benzodiazepine site of GABA_A. Isopulegol also significantly prevented PTZ-induced increase in lipid peroxidation, preserved catalase activity in normal levels, and prevented the PTZ-induced loss of GSH in hippocampus of mice. In order to investigate whether isopulegol would be able to promote gastroprotective effects in ethanol- and indomethacin-induced gastric ulcer models, mice received isopulegol (25, 50, 100 and 200 mg/kg, p.o.) before ethanol (0.2 mL, p.o.) or indomethacin (20 mg/kg, p.o.). A histopathological assessment of stomachs was conducted, as well as possible mechanisms involved in gastroprotective action were also investigated. Isopulegol presented significant gastroprotective effect in both ethanol- and indomethacin-induced ulcer models. This effect was corroborated by the histopathological assay, which showed that pretreatment with isopulegol was able to inhibit the ethanol-induced microscopically alterations. The pretreatment with indomethacin and glibenclamide was able to reverse the gastroprotection induced by isopulegol. The PTZ-induced loss of GSH in stomachs and liver was also preserved by pretreatment with isopulegol. These results suggest that the gastroprotective effects induced by isopulegol appear to be mediated, at least in part, by endogenous prostaglandins, K_{ATP} channel opening and antioxidant proprieties related to GSH increased.

Key-words: Isopulegol. Anxiety. Central Depressant. Convulsion. Gastroprotection

LISTA DE FIGURAS

1	Estrutura do isopreno (1), e exemplos de terpenóides: monoterpénóides (2 e 3), sesquiterpenóide (4) e diterpenóide (5).....	25
2	Principais compostos da família <i>p</i> -mentano.....	26
3	Ciclização do (+)-citronelal aos isômeros do isopulegol.....	27
4	Recetor GABA _A	33
5	Representação da região anatômica no camundongo referente ao hipocampo (HIP).....	70
6	Representação da região anatômica no camundongo referente ao corpo estriado (CE).....	70
7	Efeito do isopulegol via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre o número de entradas nos braços abertos (NEBA) no teste do labirinto em cruz elevado.....	75
8	Efeito do isopulegol via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) no teste do labirinto em cruz elevado.....	76
9	Efeito do isopulegol via intraperitoneal (A) e oral (B) sobre o número de entradas nos braços fechados (NEBF) no teste do labirinto em cruz elevado.....	77
10	Efeito do isopulegol via intraperitoneal (A) e oral (B) sobre o tempo de permanência nos braços fechados (TPBF) no teste do labirinto em cruz elevado.....	78
11	Efeito do isopulegol, via intraperitoneal, associados ou não com flumazenil, sobre o número de entradas nos braços abertos (NEBA) (A) e o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) (B) no teste do labirinto em cruz elevado.....	79
12	Efeito do isopulegol e diazepam, via intraperitoneal, associados ou não com flumazenil, sobre o número de entradas nos braços fechados (NEBF) (A) e o tempo de permanência nos braços fechados (TPBF) (B) no teste do labirinto em cruz elevado.....	80
13	Efeito do isopulegol, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre a atividade locomotora espontânea no teste do campo aberto.....	83
14	Efeito do isopulegol, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre o número de <i>rearing</i> no teste do campo aberto.....	84

15	Efeito do isopulegol, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre o número de <i>grooming</i> no teste do campo aberto.....	85
16	Efeito do isopulegol, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre o número de <i>head dips</i> no teste da placa perfurada (<i>hole board</i>).....	87
17	Efeito do isopulegol, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre o tempo de imobilidade, em segundos, no teste do nado forçado.....	89
18	Efeito do isopulegol, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre o tempo de imobilidade, em segundos, no teste da suspensão da cauda.....	91
19	Efeito do isopulegol, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre o tempo de permanência na barra, em segundos, no teste do <i>rota rod</i>	93
20	Efeito do isopulegol, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre a latência do sono, em segundos, no tempo de sono induzido por pentobarbital.....	95
21	Efeito do isopulegol e diazepam, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre a duração do sono, em segundos, no teste do tempo de sono induzido por pentobarbital.....	96
22	Efeito da administração aguda do isopulegol (25 e 50 mg/kg) , i.p. (A) ou v.o. (B) sobre as concentrações de DA, DOPAC e HVA (ng/mg de tecido) em corpo estriado de camundongos.....	99
23	Efeito da administração aguda do isopulegol (25 e 50 mg/kg) , i.p. (A) ou v.o. (B) sobre as concentrações de NA, 5-HT e 5-HIAA (ng/mg de tecido) em corpo estriado de camundongos.....	100
24	Efeito da administração aguda do isopulegol (25 e 50 mg/kg) , i.p. (A) ou v.o. (B) sobre as taxas de DOPAC/DA, HVA/DA e 5-HIAA/5-HT em corpo estriado de camundongos.....	101
25	Efeitos do isopulegol, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre a latência para o desenvolvimento das convulsões induzidas por PTZ em camundongos.....	128
26	Efeitos do isopulegol, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre a latência para a mortalidade induzida por PTZ em camundongos.....	129
27	Efeitos do flumazenil sobre as ações do isopulegol na latência para o desenvolvimento das convulsões (A) e mortalidade (B) induzidas por PTZ em camundongos.....	131
28	Efeito do isopulegol, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre a atividade locomotora espontânea no teste do campo aberto.....	133
29	Efeito do isopulegol sobre a produção de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) em hipocampo de camundongos submetidos à convulsão induzida por PTZ.....	135

30	Efeitos do isopulegol sobre a atividade da catalase em hipocampo de camundongos submetidos ao teste de convulsão induzida por PTZ.....	137
31	Efeitos do isopulegol sobre a concentração da glutathiona reduzida (GSH) em hipocampo de camundongos submetidos ao teste de convulsão induzida por PTZ.....	139
32	Efeitos do isopulegol sobre a produção de nitrito em hipocampo de camundongos submetidos ao teste de convulsão induzida por PTZ.....	141
33	Efeito do tratamento com isopulegol em camundongos expostos ou não à ulceração gástrica induzida por etanol.....	159
34	Efeitos macroscópico e microscópico na mucosa gástrica de camundongos pré-tratados com isopulegol frente às lesões gástricas induzidas por etanol.....	161
35	Efeito do L-NAME na gastroproteção induzida pelo isopulegol em camundongos sujeitos a ulceração gástrica induzida pelo etanol.....	164
36	Efeito do isopulegol e <i>N</i> -acetil-l-cisteína (NAC) sobre o conteúdo de (GSH) em estômago (A) e fígado (B) de camundongos expostos ou não ao etanol.....	166
37	Efeito do pré-tratamento com indometacina nas ações de gastroproteção do isopulegol em camundongos submetidos à ulceração gástrica induzida pelo etanol.....	168
38	Efeito do pré-tratamento com glibenclamida na gastroproteção do isopulegol em camundongos expostos à ulceração induzida por etanol.....	170

LISTA DE TABELAS

1	Efeito da administração intraperitoneal de isopulegol e diazepam associados ou não com flumazenil no teste do labirinto em cruz elevado com camundongos.....	81
2	Avaliação microscópica da mucosa gástrica de camundongos tratados com isopulegol e/ou etanol absoluto.....	162
3	Efeito do tratamento com isopulegol e ranitidina em camundongos expostos ao modelo de úlcera gástrica induzida por indometacina.....	172

LISTA DE QUADROS

1	Classes de terpenóides.....	24
2	Materiais utilizados.....	59
3	Drogas utilizadas.....	60
4	Determinação de escores de lesões gástricas induzidas por indometacina (SZABO <i>et al.</i> , 1985).....	157

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HIAA	Ácido-5-hidroxiindolacético
5-HT	5-hidroxitriptamina ou serotonina
AINE	Anti-inflamatórios não esteroidais
ALE	Atividade locomotora espontânea
AMPc	3',5'-monofosfato de adenosina cíclico
ANOVA	Análise de variância
ATV	Área tegmentar ventral
BSA	Albumina sérica bovina
CE	Corpo estriado
Canais K_{ATP}	Canais de potássio ATP dependentes
COMT	Catecol-o-metil transferase
COX	Ciclooxigenase
CPF	Córtex pré-frontal
DA	Dopamina
DAG	Diacilglicerol
DOPAC	Ácido dihidroxifenilacético
DTNB	Ácido ditiobisnitrobenzóico
DZP	Diazepam
EPM	Erro padrão da média
ERO	Espécie reativa do oxigênio
FLU	Flumazenil
GABA	Ácido γ -amino butírico
GABA-T	GABA transaminase
Gi	Proteína G inibitória
Gs	Proteína G estimulatória
GSH	Glutationa reduzida
GSH-Px	Glutationa peroxidase
GSH-Rd	Glutationa redutase
GSSG	Glutationa oxidase
HCO₃-	Íons bicarbonato
HCl	Ácido clorídrico
HIP	Hipocampo
HPLC	High Performance Liquid Chromatograph (Cromatografia líquida de alta performance)
HVA	Ácido homovanílico

IMP	Imipramina
i.p.	intraperitoneal
ISO	Isopulegol
L-AP4	L(+)-2-amino-4-ácido fosfobutírico
LCE	Labirinto em cruz elevado
L-NAME	L-nitro arginina metil-éster
MAO	Monoamina oxidase
MCPd	Matéria cinzenta periaquidural dorsal
MDA	Malonildialdeído ou malondialdeído
Min	Minuto
NA	Noradrenalina
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NEBA	Número de entradas nos braços abertos
NEBF	Número de entradas nos braços fechados
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMR	Núcleo mediano da rafe
NDR	Núcleo dorsal da rafe
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOSe	Óxido nítrico sintase endotelial
NOSi	Óxido nítrico sintase induzível
NOSn	Óxido nítrico sintase neuronal
PG	Prostaglandina
PTB	Pentobarbital sódico
Proteína G	Guanina nucleotídeo
PTZ	Pentilenotetrazol
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF	Teste do Nado forçado
TGI	Trato gastro intestinal
TPBA	Tempo de permanência nos braços abertos
TPBF	Tempo de permanência nos braços fechados
v.o.	Via oral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Plantas Medicinais.....	19
1.2 Óleos Essenciais	21
1.3 Terpenos e Terpenóides	22
1.4 Isopulegol.....	25
1.5 Modelos Animais de Ansiedade e Depressão	29
1.6 O sistema GABA/Benzodiazepínico e seu Envolvimento na Ansiedade.....	31
1.7 Envolvimento das Monoaminas na Ansiedade e Depressão	34
1.7.1 Envolvimento das monoaminas na ansiedade	34
1.7.2 Envolvimento das monoaminas na depressão	36
1.8 Convulsões.....	38
1.8.1 Fisiopatogenia das convulsões	39
1.8.2 Modelos experimentais de convulsão: o modelo do Pentilenotetrazol (PTZ).....	40
1.8.3 Convulsões e estresse oxidativo	42
1.9 Áreas Cerebrais estudadas: Corpo Estriado (CE) e Hipocampo (HIP).....	46
1.10 Produtos Naturais e Gastroproteção	47
1.11 Lesão Gástrica e Mecanismos de Gastroproteção	48
1.11.1 Etiologia das lesões gástricas	48
1.11.2 Mecanismos de proteção gástrica.....	51
2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	56
3 OBJETIVOS GERAIS	58
4 MATERIAIS, ANIMAIS, DROGAS E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	59
4.1 Principais materiais e drogas utilizados nos experimentos	59
4.2 Animais.....	60
4.3 Preparo das Drogas	61
4.4 Análises estatísticas	62
5 CAPÍTULOS.....	63
5.1 Capítulo I - Investigação dos Efeitos Centrais da Administração Aguda de Isopulegol em Camundongos	63
5.1.1 Introdução.....	63
5.1.2 Objetivos específicos.....	64
5.1.3 Métodos	65

5.1.4 Resultados.....	73
5.1.5 Discussão	102
5.2 Capítulo II - Efeitos do Isopulegol sobre Convulsões Induzidas por Pentilenotetrazol em Camundongos	114
5.2.1 Introdução.....	114
5.2.2 Objetivos específicos.....	115
5.2.3 Métodos	116
5.2.4 Resultados.....	126
5.2.5 Discussão.....	142
5.3 Capítulo III - Efeito Gastroprotetor do Isopulegol em Modelos Experimentais de Lesão Gástrica Aguda	150
5.3.1 Introdução.....	150
5.3.2 Objetivos específicos.....	151
5.3.3 Métodos	152
5.3.4 Resultados.....	158
5.3.5 Discussão.....	173
6 CONCLUSÕES.....	180
REFERÊNCIAS	181
APÊNDICES.....	214

1 INTRODUÇÃO

1.1 Plantas Medicinais

A utilização de plantas medicinais como fonte de produtos terapêuticos acompanha a história da humanidade, nas mais diferentes sociedades. Registros antigos da medicina romana, egípcia, persa e hebraica mostram que as ervas eram utilizadas de forma extensiva para curar praticamente todas as doenças conhecidas pelo homem (SOARES, 2002; FRANCO; FONTANA, 2003). A medicina enquanto ciência só surgiu muitos anos depois e teve suas portas abertas no século XVIII. No entanto, embora a arte da cura tenha sido refinada a partir de então, as plantas continuaram a ocupar uma posição de destaque, onde a grande maioria dos medicamentos oficiais ainda era de origem vegetal (CORRÊA *et al.*, 2003).

Foi a partir do século XIX, com a evolução da química, que a forma de utilização das plantas, do seu uso direto e de seus preparados, se modificou no Ocidente. Passou-se a utilizar as moléculas ativas contidas nas espécies vegetais, chegando-se a reproduzir artificialmente na nascente indústria farmacêutica a substância ativa isolada, atingindo uma produção em escala industrial. Desde então, inúmeros são os exemplos de fármacos desenvolvidos, direta ou indiretamente a partir de plantas, incluindo o ácido acetilsalicílico (AAS), atropina, digitálicos, efedrina, mentol, alguns opiáceos, pilocarpina, quinina, reserpina, teofilina, vimblastina, vincristina, dentre outros (EVANS, 1996; CORRÊA *et al.*, 2003). Nesse contexto, trinta por cento das novas substâncias químicas descobertas entre 1981 e 2005 foram obtidas de produtos naturais. Outros vinte por cento dessas novas moléculas são produtos sintetizados mimetizando estruturas encontradas na natureza (NEWMAN *et al.*, 2003; BALUNAS; KINGHORN, 2005).

Assim, a terapêutica moderna, composta por um grande número de medicamentos com ações específicas sobre receptores, enzimas e canais iônicos, não teria atingido o grau de desenvolvimento atual sem o auxílio dos produtos naturais, notadamente aqueles derivados das plantas superiores (CALIXTO, 2001). Devido a estes fatores, nos últimos anos, as plantas medicinais tornaram-se o grande alvo das indústrias farmacêuticas e institutos de pesquisa,

sobretudo, na busca de novas substâncias isoladas em substituição aos extratos vegetais. Nesse contexto, sendo o Brasil detentor da maior diversidade vegetal do mundo, o nosso país representa uma rica fonte de plantas medicinais, com potencial inesgotável para a descoberta e desenvolvimento de novos compostos terapêuticos (BRASIL, 2002; LORENZI; MATOS, 2006).

Por outro lado, até os dias atuais, no Brasil, especialmente na Região Nordeste, o uso de plantas medicinais e preparações caseiras continua assumindo importância fundamental no tratamento das patologias que afetam as populações de baixa renda, tendo em vista a deficiência da assistência médica, a influência da transmissão oral dos hábitos culturais e a disponibilidade da flora (MATOS, 1989). Assim, as plantas medicinais devem ser consideradas não apenas como matéria-prima para a descoberta de novas moléculas, mas também como um recurso natural potencialmente ativo na forma de fitoterápico padronizado, seguro e eficaz (DI STASI, 1996). No entanto, apesar da rica flora brasileira representar mais de 20% das espécies de plantas medicinais conhecidas no mundo, cerca de 70% dos recursos fitofarmacêuticos não foram suficientemente estudados, a fim de se obter a confirmação necessária sobre eficácia, segurança e qualidade, padrões estes mensurados em bases científicas, com o intuito de garantir a segurança do usuário (PETROVICK, 1999).

Com o objetivo de assegurar o acesso, o uso correto de plantas medicinais e fitoterápicos pela população, bem como a utilização sustentável da biodiversidade brasileira e o desenvolvimento da indústria nacional, foi aprovado no dia 22 de Junho de 2006 a Política Nacional de Plantas Medicinais pelo governo federal (BRASIL, 2006). Essa Política também visa consolidar as iniciativas de relevância no país e as recomendações nacionais e internacionais sobre o tema. A idéia é que se construa no Brasil uma rede de esforços para o desenvolvimento de medidas voltadas à melhoria da atenção à saúde, ao fortalecimento da agricultura familiar, à geração de emprego e renda, à inclusão social e ao desenvolvimento industrial e tecnológico de novos fármacos oriundos de plantas medicinais.

1.2 Óleos Essenciais

A terapia com plantas aromáticas tem suas raízes nas mais antigas práticas curativas da humanidade. Dentre os agentes terapêuticos provenientes dessas plantas, destacam-se os óleos essenciais. Esses óleos, também conhecidos como essências ou óleos voláteis são misturas complexas de substâncias orgânicas oleosas e voláteis, responsáveis pelo aroma característico das plantas aromáticas, bem como por diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal (LEAL-CARDOSO; FONTELES, 1999; SAIKA *et al.*, 2000). Muitos deles, inclusive, possuem propriedades ativas em sistemas biológicos. Pela utilização crescente nas indústrias de alimentos, cosméticos e farmacêutica, o cultivo de espécies aromáticas e a obtenção de óleos essenciais constituem importantes atividades de interesse científico e econômico (MAGALHÃES, 2002; TRASARTI *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

A importância econômica dos óleos essenciais provém de uma larga utilização na indústria, para os mais diversos fins, tais como aromatizantes, repelentes de insetos, em perfumaria, na composição de desinfetantes e cosméticos, na preparação de alimentos e licores (CRAVEIRO *et al.* 1977; ITOKAWA *et al.*, 1981; VYVYAN, 2002). Além do seu vasto uso industrial, esses óleos têm sido aproveitados com fins terapêuticos em aromaterapia, para aplicação tópica através de massagens, banho de compressas, incensos ou mesmo administrado para uso interno (JUCÁ, 2007). Já na medicina popular, são utilizados na forma de chás e infusatos, como sedativos, estomáquicos, antiespasmódicos, antidiarréicos, antiparasitários, antimicrobianos, analgésicos, diuréticos e hipotensores, antimaláricos, anti-hemorroidários, antisifilíticos, no tratamento de rinite alérgica, além de outras indicações (ITOKAWA *et al.*, 1981; MENDONÇA *et al.*, 1991; MAGALHÃES, 2002).

Os óleos essenciais podem ser obtidos de flores, folhas, frutos, sementes, gramas, raízes, rizomas e caules das plantas (SANTOS, 1997; TISSERAND; BALACS, 1999). Os componentes presentes nesses óleos consistem em substâncias classificadas em diferentes grupos químicos como hidrocarbonetos, alcoóis, aldeídos, cetonas, fenóis, dentre outros (JUCÁ, 2007). Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações, no entanto, normalmente, um deles é o composto majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades (traços), por exemplo, o 1,8-cineol (ou eucaliptol) é o

principal composto do óleo de eucalipto, com teor em torno de 80%. Entretanto, esta substância está presente no óleo de bergamota numa concentração 40.000 vezes menor do que no óleo de eucalipto, ou seja, em torno de 0,02% (SIMÕES *et al.*, 1999).

Devido à sua complexa composição, os óleos essenciais demonstram uma variedade de ações farmacológicas cientificamente evidenciadas, tais como atividade anticonvulsivante (DE SOUSA *et al.*, 2007a), ansiolítica (DE ALMEIDA *et al.*, 2004) anti-inflamatória (SANTOS; RAO, 2000), analgésica (AMARAL *et al.*, 2007), antimicrobiana (KUNICKA-STYCZYŃSKA *et al.*, 2009); antioxidante (ADIGUZEL *et al.*, 2009); anticâncer (EDRIS, 2009), dentre muitas outras, tornando-os potenciais fontes para o desenvolvimento de novas drogas.

1.3 Terpenos e Terpenóides

Os terpenos representam uma das maiores e mais diversas classes de substâncias químicas de origem natural, com aproximadamente 55.000 membros isolados até hoje (MAIMONE; BARAN, 2007). São frequentemente encontrados em óleos essenciais, sendo responsáveis pelo aroma das plantas. A palavra terpeno tem origem no termo inglês *terpene* que por sua vez reflete o fato de os primeiros terpenos (alfa-pineno e cânfora) terem sido isolados da terebentina (*turpentine*). Segundo alguns autores, o termo terpeno deve ser utilizado apenas para aqueles compostos que sejam alcenos, enquanto seus derivados contendo oxigênio como alcoóis, aldeídos ou cetonas, são frequentemente designados terpenóides (HILL, 1993).

Tradicionalmente, os terpenos são considerados como derivados de unidades do 2-metil-butadieno, conhecido como isopreno [$\text{CH}_3\text{C}(\text{CH}_2)\text{CHCH}_2$] (**Figura 1**), com 5 átomos de carbono (HILL, 1993). No entanto, verificou-se que o precursor dos terpenos era na verdade o ácido mevalônico, o qual provém da acetil coenzima A, sendo portanto, originados da via do acetato-mevalonato a partir de uma unidade de isopreno (ADAM *et al.*, 2002).

A divisão da estrutura dos terpenos em unidades de isopreno (regra do isopreno) permitiu classificar e estudar de uma maneira simples e didática tais compostos, e continua

sendo utilizada com frequência. Assim, uma classificação racional dos terpenos (também chamados de isoprenóides) foi estabelecida, baseada no número de unidades de isoprenos (C₅H₈) incorporadas no esqueleto molecular básico (RUZICKA, 1953). Os monoterpenóides são compostos por duas unidades de isopreno (C₁₀), os sesquiterpenóides por três (C₁₅), os diterpenóides por quatro (C₂₀), os triterpenóides compostos por seis (C₃₀) e os tetraterpenóides, ou carotenóides, têm oito unidades de isopreno (C₄₀) (ROBBERS, 1997).

Os compostos terpênicos mais freqüentes nos óleos essenciais são os monoterpenos (cerca de 90 % dos óleos essenciais), os quais podem apresentar-se como acíclicos (mirceno e geraniol), monocíclicos (α -terpineol e terpinoleno) e bicíclicos (α -pineno e cânfora). Em cada um desses subgrupos, há ainda outras classificações: hidrocarbonetos insaturados como o limoneno, aldeídos ou cetonas como a mentona e carvona, alcoóis como o mentol e isopulegol, dentre outros (SIMÕES, 2001). O **Quadro 1** apresenta de uma forma resumida as diferentes classes de terpenóides e A **Figura 1** apresenta a estrutura do isopreno (1) e exemplos de terpenóides: monoterpenóides (2 e 3), sesquiterpenóide (4) e diterpenóide (5).

Além de suas propriedades relativas a aromas e fragrâncias, alguns terpenóides vêm sendo reconhecidos por suas propriedades benéficas à saúde humana e animal. A esses compostos tem sido atribuída atividade antitumoral, eficiente atividade antioxidante, antimicrobiana, na prevenção de doenças degenerativas, dentre outras (ZYGADLO; JULIANI, 2001; BASER, 2008; LOIZZO *et al.*, 2008). A diversidade molecular dos terpenos proporciona muitas vantagens e desafios para pesquisadores em vários campos de estudo. Tendo em vista as múltiplas funções dos terpenóides na indústria cosmética e alimentícia, e as crescentes elucidações a respeito de suas atividades funcionais e biológicas (SCHRADER; BERGER, 2001), pesquisas relacionadas a estas substâncias continuarão a despertar crescente interesse da comunidade científica em todo o mundo.

Classe	Unidades isoprenos	Átomos de C	Ocorrência	Aplicação	Exemplos
Hemiterpenóide	1	5	Óleos, compostos voláteis	...	Isopreno
Monoterpenóides	2	10	Óleos, pétalas	Perfumes	Cânfora, isopulegol
Sesquiterpenóides	3	15	Óleos, resinas, pétalas	Aromatizantes, perfumes	Veticadenol
Diterpenóides	4	20	Oleos, resinas	Colas, vernizes	Vitamina A, E, K
Sesterpenóides	5	25	Óleos, resinas	...	Ofiobolina
Triterpenóides	6	30	Resinas, Madeira, cortiça	Produtos farmacêuticos, perfumaria	Ambreína
Carotenóides (ou tetraterpenóides)	8	40	Folhas, raízes, pétalas	Corantes alimentares	β caroteno

Quadro 1. Classes de Terpenóides

Fonte: Adaptado de Araújo (2009)

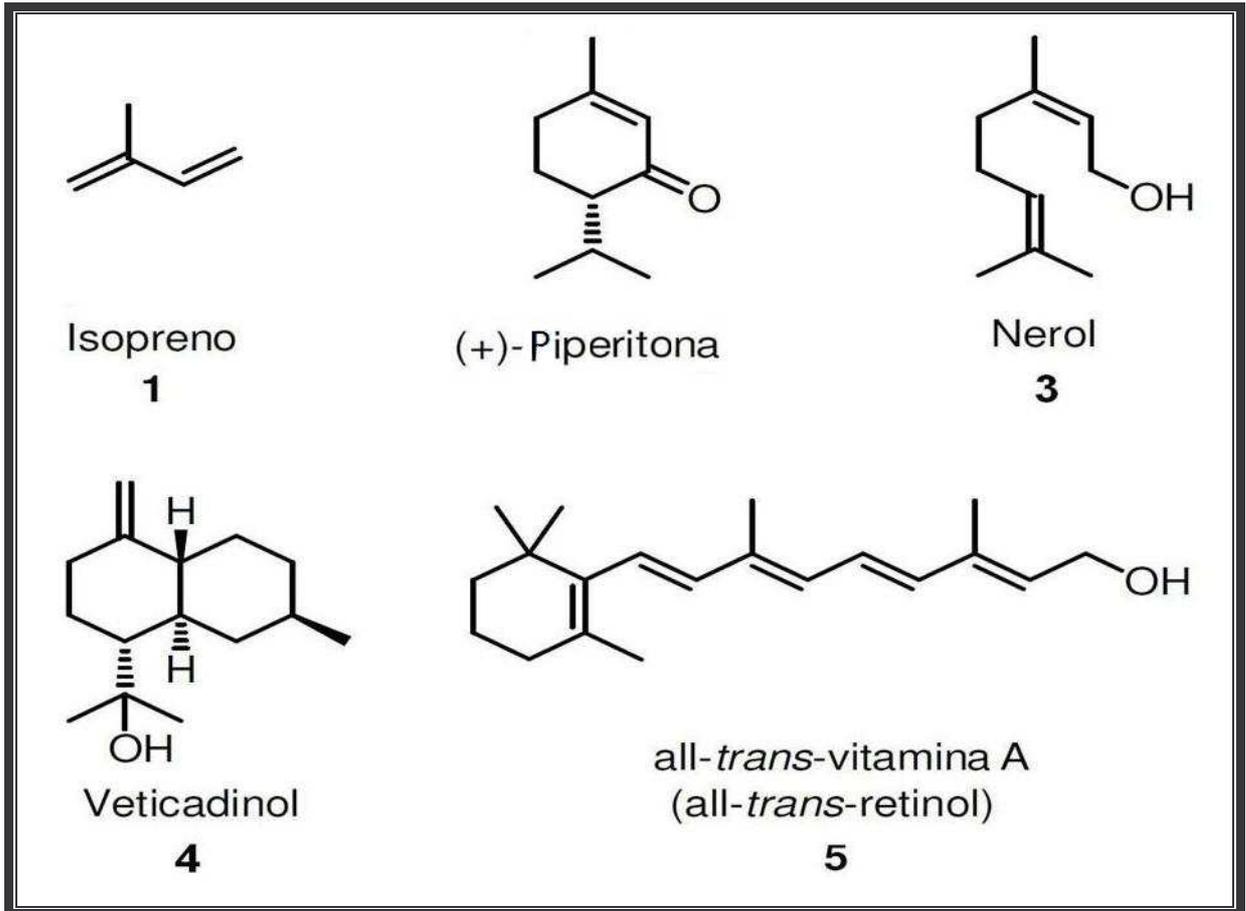


Figura 1. Estrutura do isopreno (1), e exemplos de terpenóides: monoterpénóides (2 e 3), sesquiterpenóide (4) e diterpenóide (5).

Fonte: Banthorpe *et al.* (1972); Serra *et al.* (2003); Siwko *et al.* (2007)

1.4 Isopulegol

Os monoterpénos 3-oxigenados da família do p-mentano são importantes compostos de origem natural. São largamente distribuídos na natureza e usados extensivamente em indústrias de sabores e perfumes, na indústria farmacêutica, de cosméticos, agrotóxicos e substâncias de arrefecimento. Todos os isômeros p-mentanos-3-oxigenados apresentados na **Figura 2 (1-13)** são intermediários na preparação do (–)-mentol. Muitos processos industriais de síntese, extração e transformação de terpenos estão relacionados a esta classe de terpenos devido ao alto valor comercial do (–)-mentol. Estes compostos são também usados como ponto de partida para a síntese de várias substâncias químicas com atividade biológica (SERRA *et al.*, 2003).

Como observado na **Figura 2 (5)**, o isopulegol (p-ment-8-en-3-ol; FM: C₁₀H₁₈O; PM: 154.25; PE: 218°; DL₅₀: ~1.030 ± 100 mg/kg) é um monoterpene álcool, 3-oxigenado, da família do p-mentano (BHATIA *et al.*, 2008). Está presente no óleo essencial de diversas espécies de plantas aromáticas, tais como *Corymbia citriodora* Hook (VERNIN *et al.*, 2004), *Eucalyptus citriodora* Hook (RAO *et al.*, 2003) e *Zanthoxylum schinifolium* (PAIK *et al.*, 2005). Devido às suas propriedades aromáticas, o isopulegol tem sido utilizado na manufatura de perfumes com composições florais. No entanto, o seu principal uso é como intermediário sintético na preparação do mentol (CHUAH *et al.*, 2001).

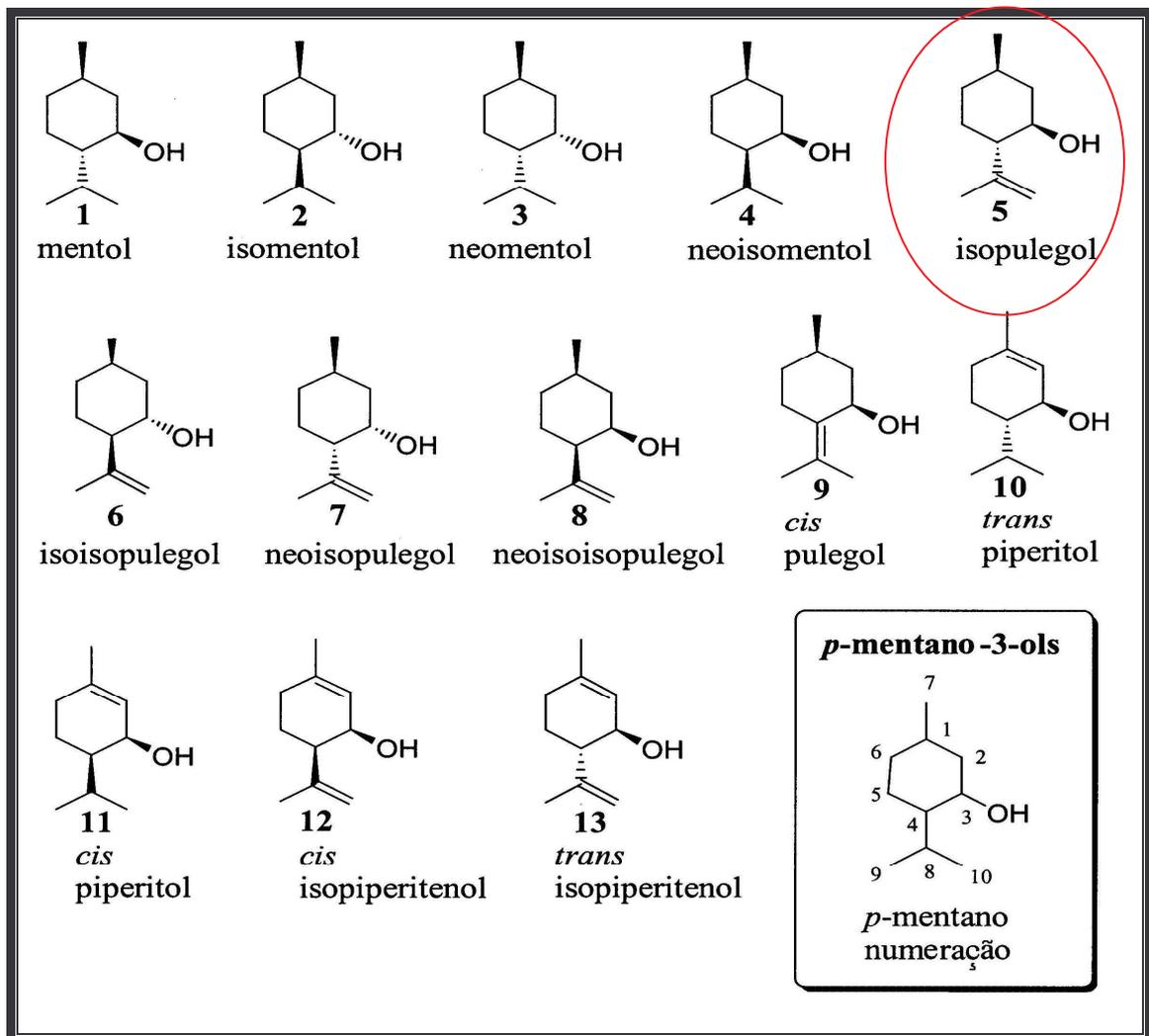


Figura 2. Principais compostos da família *p*-mentano.

Fonte: Serra *et al.* (2003)

Normalmente, o isopulegol é obtido a partir do óleo essencial de citronela, do qual se isola o composto (+)-citronelal, um monoterpene aldeído acíclico, e em seguida faz-se uma ciclização deste monoterpene em meio ácido para gerar uma mistura de isopulegol. Como (+)-citronelal possui dois carbonos proquirais que se tornam centros de assimetria, da ciclização são formados quatro diferentes estereoisômeros do isopulegol: (-)-isopulegol, (+)-neo-isopulegol, (+)-iso-isopulegol e (+)-neoiso-isopulegol, conforme demonstrado na **Figura 3**. Como referido anteriormente, o isopulegol é um importante intermediário na produção de mentóis ($C_{10}H_{20}O$), os quais apresentam cheiro característico de hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.). No entanto, apenas o isômero (-)-isopulegol é utilizado para a produção de (-)-menthol, o único dentre os oito isômeros opticamente ativos do mentol que possui também característica organoléptica de refrescância, além de seu aroma mentolado característico (CHUAH *et al.*, 2001).

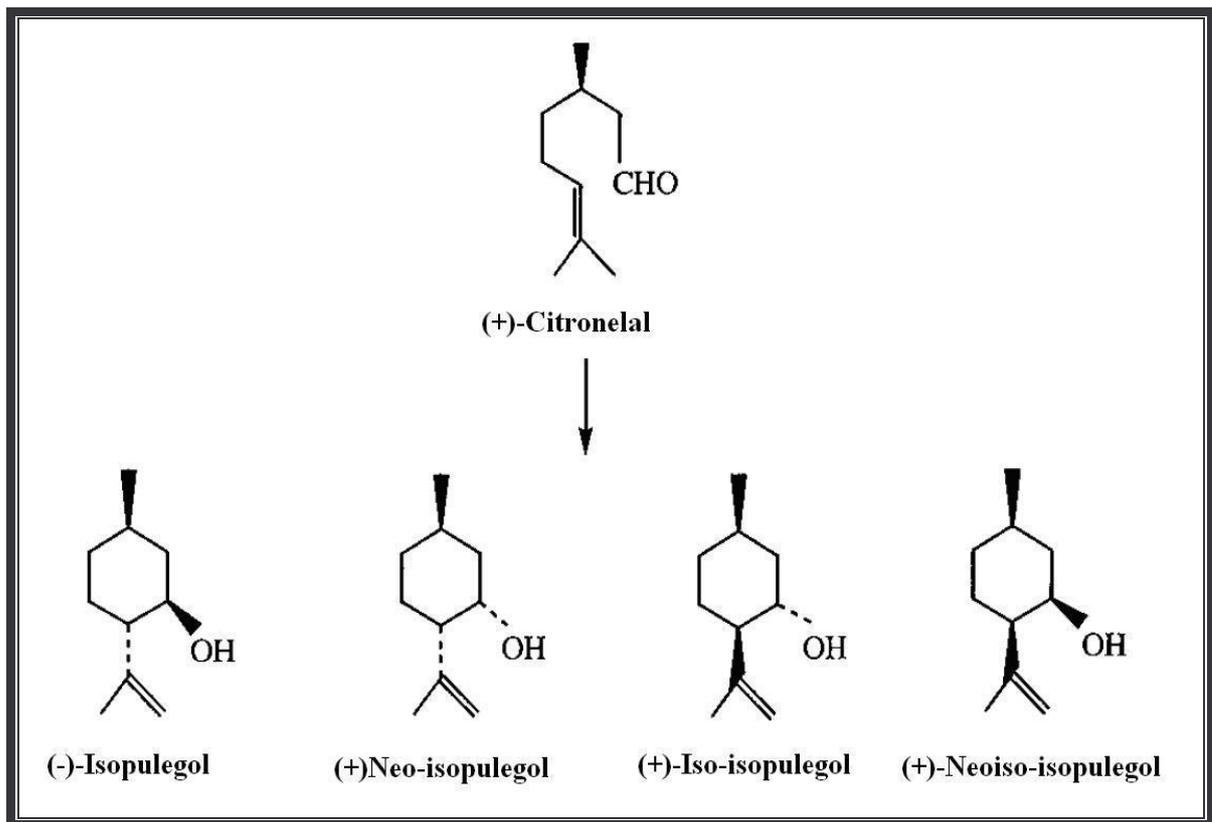


Figura 3. Ciclização do (+)-citronelal aos isômeros do isopulegol.

Fonte: Chuah *et al.* (2001)

Atualmente, existem alguns estudos sobre os processos de obtenção e transformação química do isopulegol, bem como sobre o seu uso como ingrediente de perfumes (CHUAH *et al.*, 2001; SERRA *et al.*, 2003; BHATIA *et al.*, 2008). Em alguns estudos preliminares, o isopulegol apresentou possível efeito depressor em nível de SNC (DE SOUSA *et al.*, 2007b; BHATIA *et al.*, 2008). No entanto, trabalhos referentes às propriedades biológicas, farmacológicas e terapêuticas deste terpeno são escassos na literatura. Desta forma, o interesse do Laboratório de Neurofarmacologia em estudar compostos biologicamente ativos (SOUSA *et al.*, 2004; SOUSA *et al.*, 2005a, 2005b; MELO *et al.*, 2006; AMARAL *et al.*, 2007; DE SOUSA *et al.*, 2007; GOMES *et al.*, 2008), aliados a dados anteriores de possíveis efeitos centrais do isopulegol, nos levou a investigar quais alterações comportamentais seriam induzidas pelo isopulegol em camundongos submetidos à modelos experimentais de *screening* farmacológico de ação central, sobretudo aqueles relacionados a ansiedade e depressão.

Diversos estudos têm também abordado a aplicação terapêutica de monoterpenos contra alguns tipos de doenças degenerativas e vários tipos de cânceres (CROWELL, 1999; LU *et al.*, 2004; RAVIZZA *et al.*, 2008; LEBEDEVA *et al.*, 2008), bem como têm evidenciado o potencial anticonvulsivante de terpenos em modelos animais de convulsão (DE ALMEIDA *et al.*, 2008; ILHAN *et al.*, 2005). Tais ações têm sido frequentemente atribuídas, em parte, às propriedades antioxidantes desses compostos, os quais estão sendo qualificados como antioxidantes naturais (YANISHLIEVA *et al.*, 1999; PEREIRA; MAIA, 2007). Estes dados nos levaram também a investigar o potencial anticonvulsivante e antioxidante do isopulegol.

Ainda, um relevante número de estudos tem evidenciado a ação gastroprotetora de diferentes terpenos, sejam eles constituintes de extratos vegetais ou substâncias isoladas dos mesmos. O extrato obtido a partir das folhas e frutos de *Sapindus saponaria* L., rico em triterpenos pentacíclicos, apresentou atividade antiulcerogênica e antissecretória gástrica, diminuindo a concentração de ácido clorídrico e o pH gástrico (MEYER ALBIERO *et al.*, 2002). O monoterpeno 1,8-cineol demonstrou atividade gastroprotetora contra lesão induzida por etanol em ratos (SANTOS; RAO, 2001). Recentemente, o diterpeno ácido centipédico também demonstrou atividade gastroprotetora em modelo de úlcera induzida por etanol (GUEDES *et al.*, 2008). Nesse contexto, no presente estudo, resolvemos também investigar se

o isopulegol seria capaz de exercer alguma ação protetora em úlceras gástricas induzidas experimentalmente em camundongos e analisar possíveis mecanismos envolvidos nesta ação.

1.5 Modelos Animais de Ansiedade e Depressão

A ansiedade foi descrita por Andrade e Gorenstein (1998) como um estado emocional com componentes psicológicos e fisiológicos, que fazem parte do espectro normal das experiências humanas, sendo propulsora do desempenho. Segundo Nardi (1998), a ansiedade permite ao indivíduo ficar atento a um perigo iminente e tomar as medidas necessárias para lidar com uma ameaça. Assim sendo, é uma emoção que nos protege do desconhecido. É algo que está presente no desenvolvimento humano normal, nas mudanças e nas experiências inéditas. No entanto, ela passa a ser considerada patológica quando é desproporcional à situação que a desencadeia, ou quando não existe um motivo aparente para a sua instalação, ou seja, quando os sintomas são freqüentes e interferem com o funcionamento normal do indivíduo. Neste caso, tem sido uma das causas mais comuns que levam os pacientes a procurarem auxílio médico ou psiquiátrico (ANDRADE; GORENSTEIN, 1998).

Na clínica, a ansiedade é diagnosticada e avaliada principalmente pelo relato dos pacientes, indicando a natureza subjetiva dos transtornos de ansiedade, o que traz uma limitação aparentemente intransponível aos modelos animais de ansiedade. Entretanto, apesar desta limitação, o desenvolvimento dos modelos animais recebeu impulso importante pelo advento de novas drogas ansiolíticas e pela compreensão da neurobiologia da ansiedade (LACERDA, 2006). A descoberta do primeiro benzodiazepínico (clordiazepóxido), que apresentava grande eficácia em termos ansiolíticos, abriu uma nova área na pesquisa da ansiedade, pois, a partir de então, os modelos animais puderam ter uma melhor validação farmacológica. Estes modelos foram desenvolvidos com dois objetivos principais: 1) para se avaliar os efeitos ansiolíticos ou ansiogênicos de determinados compostos e, uma vez discriminadas suas propriedades, identificar seus mecanismos de ação; e 2) para o estudo da neurobiologia da ansiedade (FILE *et al.*, 1993, RODGERS *et al.*, 1997).

Em modelos comportamentais, os animais são comumente expostos a estímulos externos (p.ex. novos ambientes) ou internos (p.ex. substâncias ansiogênicas) capazes de

causar comportamentos defensivos que se traduzem por uma inibição comportamental e podem assumir a forma de imobilidade ou de supressão de uma resposta normal (PRUT, 2003; JUNG *et al.*, 2002). Assim, para que um teste comportamental seja validado como um modelo animal é necessário que ele permita quantificar as respostas produzidas por tais estímulos, interpretadas como análogas à ansiedade, e que são antagonizadas por ansiolíticos reconhecidos (RODGERS *et al.*, 1997). Desta forma, um agente ansiolítico deve reduzir a ansiedade induzindo pouco ou nenhum efeito sobre as funções motoras ou mentais (OLSON, 2002).

Um dos modelos mais largamente utilizados na pesquisa da ansiedade em ratos e camundongos é o labirinto em cruz elevado (LCE). Em geral, os animais demonstram uma ocupação preferencial dos braços fechados, tanto no número de entradas quanto no tempo gasto nesses braços (LISTER, 1987). É considerado um modelo naturalista, já que simula uma situação próxima à encontrada no ambiente natural dos animais, sem requerer aprendizagem prévia nem submeter o animal a condições prévias ao teste, como privação, aprendizagem e outras. Por todas essas vantagens, é um teste amplamente utilizado no estudo da ansiedade. Estudos farmacológicos mostram que a administração de ansiolíticos clássicos (por exemplo, clordiazepóxido, diazepam ou fenobarbital) produz um aumento na exploração dos braços abertos (BECERRA, 2004). Efeitos desse tipo levaram Pellow e colaboradores (1985) a propor que o aumento na exploração dos braços abertos estaria relacionado a uma diminuição dos níveis de ansiedade do animal.

Já a depressão consiste no mais comum dos distúrbios afetivos, sendo considerada uma das condições neuropsiquiátricas mais incapacitantes, com uma prevalência de 10-30 % em mulheres e 7-15 % em homens (NAIR; VAIDYA, 2006; TIERNEY, 2007). Os sintomas da depressão incluem componentes emocionais e biológicos. Dentre os componentes emocionais estão a apatia e o pessimismo, a baixa auto-estima, sentimentos de culpa, de inadaptação e feiúra, assim como a indecisão e a perda de motivação. Os sintomas biológicos incluem o retardo de pensamento e de ação, a perda da libido, distúrbio do sono e perda do apetite (RANG *et al.*, 2008).

Pesquisas pré-clínicas são essenciais para o desenvolvimento de novas terapias e para o estudo da neurobiologia dos transtornos mentais. Em modelos animais não há condição conhecida que corresponda à exata condição inata da depressão em seres humanos, no

entanto, tais modelos são um excelente método na identificação de novos antidepressivos, de seu mecanismo de ação e no estudo da neurobiologia da depressão. Vários procedimentos foram descritos, que produzem em animais estados comportamentais (retirada da interação social, perda de apetite, atividade motora reduzida, estresse, situações inescapáveis, entre outros), análogos à depressão humana (PORSOLT *et al.*, 1978).

Os modelos de depressão comumente utilizados são diversos e foram desenvolvidos baseados nas alterações comportamentais produzidas pelo estresse, drogas ou lesões em estruturas cerebrais (CRYAN *et al.*, 2002). O teste do nado forçado (TNF), desenvolvido por Porsolt *et al.* (1977), tem sido um dos mais empregados para avaliar a atividade antidepressiva pré-clínica, devido a sua fácil utilização, grande reprodutibilidade entre os laboratórios e à habilidade de detectar um grande espectro de agentes antidepressivos (BORSINI; MELI, 1988; CRYAN *et al.*, 2002).

No entanto, os testes do LCE e TNF podem apresentar resultados falsos positivos, como por exemplo, com drogas estimulantes motoras, ou ainda falsos negativos, como por exemplo com drogas relaxantes musculares. Com isso, existe a necessidade de se realizar experimentos adicionais com modelos que avaliem a atividade locomotora geral e a coordenação motora do animal, como os testes do campo aberto e *rota rod*, respectivamente (OHL *et al.*, 2001). Ainda, sejam quais forem os resultados obtidos nos clássicos modelos do LCE e TNF, frequentemente, tem sido recomendado a realização de experimentos adicionais, tais como os testes da placa perfurada (*hole board*) e suspensão da cauda, que terão sua utilidade em respaldar ou não os resultados obtidos nos testes do LCE e TNF, respectivamente.

1.6 O sistema GABA/Benzodiazepínico e seu Envolvimento na Ansiedade

O ácido γ -aminobutírico (GABA), um aminoácido neutro, é o principal neurotransmissor inibitório do SNC de vertebrados. Está presente em 30-50% das sinapses cerebrais, modulando também o funcionamento de outros neurotransmissores (SOGHOMONIAN; CHESSELET, 2000). O GABA é armazenado dentro de vesículas de

onde é liberado, após estímulo específico, para a fenda sináptica. Na fenda, pode interagir com receptores ionotrópicos, GABA_A, ou metabotrópicos, GABA_B. A interação com receptores GABA_A resulta na abertura dos canais de cloro, e um aumento na concentração desses íons gera um potencial negativo, com conseqüente inibição do estímulo nervoso (MACCDONALD; HASS, 2000). Os receptores GABA_B, expressos principalmente na membrana pré-sináptica, regulam canais de K⁺ que quando ativados reduzem a condutância ao Ca⁺⁺ e inibem a produção de AMPc, o que resulta na redução da liberação do neurotransmissor GABA (BOWERY, 2000). Recentemente, foi proposto o receptor GABA_C que se assemelha estreitamente ao receptor GABA_A e exhibe ações farmacológicas ligeiramente diferentes, embora sua importância funcional permaneça desconhecida (RANG *et al.*, 2008).

Os receptores GABA_A merecem destaque por possuírem um papel central na regulação da excitabilidade cerebral, através de seus efeitos inibitórios. Várias drogas ansiolíticas usadas rotineiramente estão entre as classes de substâncias que modulam alostericamente os receptores GABAérgicos do tipo A, sendo os benzodiazepínicos a principal delas. Essas drogas 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, induzindo, com isso, uma potencialização da resposta GABAérgica. Desta forma, os benzodiazepínicos apresentam vários efeitos relacionados com o receptor GABA_A, 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. Além dos benzodiazepínicos, muitas drogas importantes tais como os barbitúricos, neuroesteróides, etanol e alguns anticonvulsivantes e anestésicos gerais, interagem com estes receptores (RANG *et al.*, 2008).

Em níveis moleculares, o receptor GABA_A consiste em um canal iônico acionado por ligante, apresentando estrutura heteropentamérica, ou seja, formado por cinco diferentes subunidades agrupadas (**Figura 4**). Até o momento, são conhecidas 18 subunidades geneticamente diferentes (α 1-6, β 1-4, γ 1-4, δ , η , ρ 1-2) que participam da composição do receptor GABA_A, de modo que as características funcionais e farmacológicas do mesmo são determinadas pela composição de suas subunidades (RUSSEK, 1999; BRITO, 2005). Assim, diferentes efeitos benzodiazepínicos podem estar ligados a diferentes subtipos de receptores

GABA_A, sugerindo a possibilidade de desenvolvimento de novas substâncias com efeitos mais seletivos do que os benzodiazepínicos existentes.

Através do uso de modelos de pesquisa pré-clínica que induzem a ansiedade, foram obtidos muitos achados em relação às manifestações psicológicas e fisiológicas da ansiedade, no entanto, os mecanismos biológicos envolvidos na sua regulação não são completamente conhecidos. Como já referido anteriormente, o labirinto em cruz elevado (LCE) tem sido bastante utilizado para a pesquisa de agentes ansiolíticos como os benzodiazepínicos (PELLOW *et al.*, 1985; RODGERS *et al.*, 1997). Este modelo experimental é muito sensível para determinar a influência do receptor GABA_A/Benzodiazepínico no processo de ansiedade, visto que outras drogas como a buspirona, que atua em receptores serotoninérgicos, apresentam resultados muito variáveis em relação a este teste. De fato, um crescente número de estudos mostram que vários compostos, incluindo aqueles de origem natural como os monoterpênicos (+)- e (-)-borneol (GRANGER *et al.*, 2005), timol (JOHNSTON, 2005) e α,β -epoxi-carvona (DE ALMEIDA *et al.*, 2008), são capazes de modular os receptores ionotrópicos GABAérgicos e são sensíveis ao modelo do LCE. Portanto, este teste consiste em uma relevante ferramenta para detectar compostos que tenham relação com o complexo receptor GABA_A/Benzodiazepínico (RODGERS *et al.*, 1997), como utilizado no presente estudo.

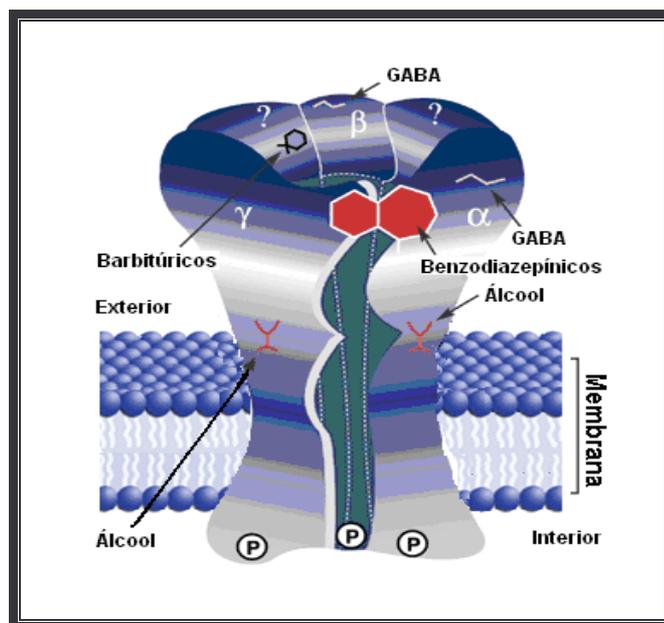


Figura 4. Recetor GABA_A.
Fonte: Mihic e Harris (1997)

Embora o GABA e mecanismos GABAérgicos estejam profundamente implicados no controle da ansiedade, diversas evidências sustentam a participação de outros neurotransmissores e neuromoduladores na ansiedade, incluindo as aminas biogênicas como a noradrenalina, serotonina e dopamina e alguns peptídeos.

1.7 Envolvimento das Monoaminas na Ansiedade e Depressão

1.7.1 Envolvimento das monoaminas na ansiedade

Apesar dos grandes avanços sobre o entendimento do modo de ação de fármacos ansiolíticos, não se compreende ainda a totalidade de fenômenos fisiológicos envolvidos nas reações de defesa normais ou patológicas observadas em todas as espécies animais (GRAEFF, 1994). Como referido anteriormente, os mecanismos GABAérgicos estão profundamente implicados no controle da ansiedade, entretanto, as aminas biogênicas como a noradrenalina, serotonina e dopamina também participam efetivamente deste evento.

No SNC, o grupo mais importante de neurônios que sintetizam noradrenalina situa-se no *locus ceruleus*. As células do *locus ceruleus*, quando ativadas por estímulos estressantes, ameaçadores, produzem uma reação comportamental cardiovascular característica de medo. Acredita-se que o *locus ceruleus* funcione como um “sistema de alarme”, ou seja, exerce a função de atenção, monitorando continuamente o ambiente e preparando o organismo para situações de emergência. Desta forma, os transtornos de ansiedade apresentam evidências contundentes de uma anormalidade do sistema noradrenérgico (MARGIS *et al.*, 2003). A exposição a vários tipos de estresse resulta em comportamento ansiogênico em testes animais que avaliam a ansiedade (HATA *et al.*, 2001) e, na resposta aguda à situação estressante, há um aumento importante de noradrenalina na fenda sináptica, resultando em um aumento da resposta sináptica evocada (MARGIS *et al.*, 2003). Desta forma, a hiperatividade da noradrenalina ocasiona ansiedade e inquietação. Mas, por outro lado, os medicamentos capazes de aumentar a atividade noradrenérgica melhoram muito os quadros de depressão com apatia, desinteresse e lentidão psicomotora.

Alguns estudos demonstram que a via mesocorticolímbica é particularmente sensível aos estímulos relacionados ao medo e, portanto, eles têm sugerido uma associação entre situações estressantes e alterações na transmissão dopaminérgica. Triagens clínicas têm indicado que a buspirona, um agonista dos receptores 5-HT_{1A}, é efetiva no tratamento da ansiedade, com eficácia e dosagens semelhantes ao diazepam. Entretanto, esta droga, cujo mecanismo de ação ainda não está completamente elucidado, não parece interagir diretamente com o sistema GABA/benzodiazepínicos, nem estimulando e nem inibindo este sistema. É largamente documentado na literatura que a buspirona não produz sedação e nem relaxamento muscular; não apresenta ação anticonvulsivante e nem potencializa as ações induzidas por depressores do SNC. Também não parece apresentar qualquer potencial de abuso ou dependência física (TAYLOR *et al.*, 1982). A buspirona parece interagir com o sistema dopaminérgico com razoável potência e exibe propriedades de ambos agonistas e antagonistas dopaminérgicos. De fato, um estudo realizado por Jadhav e colaboradores (2008), demonstrou que a buspirona em doses baixas bloqueou seletivamente os receptores D2 pré-sinápticos mesolímbicos, o que levou à uma liberação de DA, a qual estimulou os receptores D1 e D2 pós-sinápticos. Em altas doses, esta droga bloqueou os receptores D1 e D2 pós-sinápticos estriatais e mesolímbicos. Assim, considerando que a buspirona interage no sistema dopaminérgico e é frequentemente utilizada como ansiolítico, sugere-se fortemente que a dopamina também está implicada na etiologia e expressão da ansiedade. Desta forma, em uma situação de estresse, há evidências de que ocorre o aumento da liberação e metabolismo da dopamina em áreas cerebrais envolvidas na produção de respostas ao estresse, como o córtex pré-frontal ou corpo estriado, por exemplo (DE OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Em testes de conflito, onde a resposta do animal (como a de pressionar uma barra) é mantida pela apresentação de uma recompensa (água ou alimento), mas ao mesmo tempo suprimida pela aplicação de um estímulo nocivo, os ansiolíticos reduzem a supressão comportamental em uma larga faixa de doses, enquanto outros compostos psicotrópicos não afetam o comportamento punitivo. Neste sentido, observou-se que drogas ou lesões que diminuam a atividade de neurônios contendo 5-HT reduzem o comportamento punido, ou seja, os animais têm menos medo. Por outro lado, tratamentos farmacológicos que aumentam a atividade destes neurônios tendem a acentuar a supressão das respostas punidas, ou seja, os animais apresentam mais medo. Assim, várias evidências foram obtidas sugerindo que a ação dos tranqüilizantes menores poderia envolver vias nervosas que utilizam a 5-HT como neurotransmissor. Desse modo, quando se verificou que os benzodiazepínicos diminuam a

taxa de renovação de 5-HT no tronco cerebral do rato, aventou-se a hipótese de que a ação ansiolítica destes compostos era devida à redução da atividade serotoninérgica nas vias neurais ativadas pela punição (BRANDÃO, 2003).

Por outro lado, acredita-se atualmente que a serotonina exerça um duplo papel na regulação do comportamento de defesa. O núcleo mediano (NMR) e o núcleo dorsal da rafe (NDR) são as principais fontes de inervação serotoninérgica do cérebro. O NMR projeta suas fibras para o hipocampo, o qual está associado com processo emocional e cognitivo. Já o NDR projeta as fibras serotoninérgicas para várias regiões do cérebro e está envolvido em uma variedade de funções fisiológicas, como, por exemplo, a regulação do humor e de funções motoras e sensoriais (ANDRADE *et al.*, 2004). Os sinais de perigo estimulam o sistema de defesa através da amígdala e, ao mesmo tempo, ativam os neurônios serotoninérgicos do NDR, os quais, por vias nervosas diferentes, inervam tanto a amígdala quanto a matéria cinzenta periaquidural dorsal (MCPd). Quando os sinais de perigo tornam-se explícitos, mas encontram-se ainda à longa distância, a reação típica é a de imobilidade tensa (congelamento ou inibição comportamental defensiva), cujo substrato neural provavelmente seja a porção ventral da MCPd do mesencéfalo. Assim, aumentando a atividade serotoninérgica de estruturas límbicas do cérebro (como a amígdala) ocorreria um aumento dos índices comportamentais de ansiedade, enquanto uma diminuição serotoninérgica levaria a efeitos ansiolíticos (DOMBROWSKI, 2005). Porém, com um aumento de 5-HT na MCPd, as reações ativas de defesa seriam inibidas. As respostas mediadas pela serotonina teriam, portanto, um sentido adaptativo, já que para níveis de perigo potencial ou distal é conveniente que os comportamentos de luta e fuga sejam inibidos, possibilitando a adoção de estratégias mais adequadas, como exploração cautelosa e inibição comportamental. Poder-se-ia dizer, ainda, que a serotonina aumenta a ansiedade atuando na amígdala e contém o pânico agindo na MCPd (MARGIS *et al.*, 2003; DOMBROWSKI, 2005).

1.7.2 Envolvimento das monoaminas na depressão

Sob o ponto de vista neuroquímico, a teoria clássica para explicar a patogenia da depressão consiste na hipótese das monoaminas, que afirma que a depressão é causada por um déficit funcional das monoaminas transmissoras em certos locais no cérebro, enquanto a

mania resulta de um excesso funcional (MANJI *et al.*, 2001). Esta hipótese surgiu originalmente das associações entre os efeitos clínicos de vários fármacos que causam ou aliviam os sintomas da depressão e seus efeitos neuroquímicos conhecidos sobre a transmissão monoaminérgica no cérebro. Um exemplo disso foi a introdução da reserpina, no início da década de 50, quando se tornou evidente que a droga era capaz de induzir depressão em pacientes em tratamento da hipertensão e da esquizofrenia, bem como em indivíduos normais. Nos anos subsequentes, os estudos farmacológicos revelaram que o principal mecanismo de ação da reserpina consistia em inibir o armazenamento de neurotransmissores amínicos, como a serotonina e a noradrenalina, nas vesículas das terminações nervosas pré-sinápticas. A reserpina induzia depressão e provocava depleção dos neurotransmissores amínicos; por esse motivo foi deduzido que a depressão devia estar associada a uma diminuição da transmissão sináptica funcional amino-dependente (KATZUNG, 2006).

Além da participação das monoaminas 5-HT e NA, foi sugerido que o neurotransmissor dopamina também participa da fisiopatogenia da depressão (BROWN *et al.*, 1993; KAPUR; MANN, 1992). A dopamina está implicada na regulação do humor (BROWN *et al.*, 1993) e foi mostrado que, em modelos animais de depressão, a concentração de dopamina extracelular no cérebro estava diminuída (ROSSETTI *et al.*, 1993). Além disso, recentemente, tem sido considerado que a dopamina está envolvida com os efeitos antidepressivos de drogas (JOCA *et al.*, 2000), pois a bupropiona, um inibidor seletivo da captação de dopamina, é clinicamente usado em humanos como um antidepressivo ou na terapia de retirada da nicotina (ASCHER *et al.*, 1995; RICHMOND; ZWAR, 2003).

A principal objeção da hipótese dopaminérgica da depressão é que clinicamente os antidepressivos efetivos inibem a captação de serotonina ou noradrenalina, mas não dopamina. Existe uma aparente contradição no mecanismo de ação desses antidepressivos, pois, apesar do bloqueio da captação de serotonina e noradrenalina ocorrer imediatamente após o tratamento agudo, o efeito clínico dos antidepressivos acontece apenas após duas ou quatro semanas de tratamento. Essa afirmativa pode fortalecer a hipótese dopaminérgica, pois estudos mostram que o tratamento crônico com todos os inibidores da captação de serotonina e noradrenalina potenciam a transmissão dopaminérgica no núcleo *accumbens* (SERRA *et al.* 1992).

1.8 Convulsões

Os episódios convulsivos afetam cerca de 1 - 2% da população mundial e podem ocorrer em todas as idades, sendo mais comuns em crianças do que em adultos. As convulsões se caracterizam por descargas anormais em um grupo de neurônios cerebrais, levando a uma alteração da atividade cerebral, caracterizada clinicamente por manifestações motoras, sensitivas, sensoriais, psíquicas ou neurodegenerativas. Podem ser tônicas (contrações mantidas durante algum tempo), clônicas (contrações intermitentes, onde os músculos são contraídos e relaxados de forma alternada) ou tônico-clônicas (LÖSCHER, 1998).

Fundamentalmente, as convulsões se dividem em dois grandes grupos: parciais e generalizadas. As crises parciais originam-se em um grupo pequeno de neurônios que constituem o foco da convulsão. Desta forma, a sintomatologia depende da localização do foco no cérebro. Tais crises podem ser do tipo parcial simples (sem alteração da consciência) ou parcial complexa (com alteração da consciência). Já as crises generalizadas envolvem os dois hemisférios do cérebro desde o seu início. As crises generalizadas podem consistir apenas de movimentos motores (mioclônicos, clônicos ou tônicos) ou uma abrupta perda do tônus (atonia). A crise generalizada mais comum é a tônico-clônica também chamada de grande mal (MELDRUM; CHAPMAN, 1999; WESTBROOK *et al.*, 2000). Uma única convulsão generalizada pode ocorrer em um indivíduo normal, em reação ao estresse fisiológico, privação do sono, efeito do álcool ou drogas ou traumatismo craniocéfálico. Processos infecciosos, tóxicos ou metabólicos podem originar convulsões recidivantes e limitadas, em indivíduos com um limiar reduzido, hereditário, sem síndrome epiléptica (QUINTANS-JÚNIOR *et al.*, 2007)

A epilepsia é uma desordem cerebral relativamente comum, que afeta cerca de 50 milhões de pessoas no mundo todo (SCHEUER; PEDLEY, 1990). Este termo é usado a um grupo de condições crônicas cujas principais manifestações clínicas são a ocorrência de convulsões espontâneas e recorrentes (QUINTANS-JÚNIOR *et al.*, 2002). Entre as possíveis causas da epilepsia estão lesões cerebrais decorrentes de traumatismos na cabeça, tumores, distúrbios cerebrais degenerativos, infecções (meningite, por exemplo), abuso de bebidas alcoólicas ou de drogas e complicações durante o parto. Porém, na maior parte dos casos, não

existe uma origem clara para o desenvolvimento das convulsões, ou seja, acredita-se que, nessas situações, elas sejam precipitadas por fatores genéticos (LÖSCHER, 1998; HOLMES, 2005). Na ausência de um fator etiológico específico, na maioria dos casos a terapia se faz necessária para controlar os sintomas. Sabe-se que, 70 a 80% das pessoas com epilepsia podem ter uma vida normal se tiverem um tratamento adequado (BEAGLEHOLE *et al.*, 1996). Se um episódio convulsivo inicial contribui para o desenvolvimento da epilepsia, o tratamento após a primeira convulsão pode ser um fator de extrema importância para redução deste risco (FUCHS *et al.*, 2004).

Embora atualmente exista um vasto arsenal de drogas anticonvulsivantes utilizados na clínica, a farmacoresistência e um número considerável de reações adversas dificultam o tratamento, deixando uma parcela de cerca de 30% dos pacientes sem um tratamento adequado com tais fármacos (LÖSCHER; SCHMIDT, 2002; MELDRUM; ROGAWSKI, 2007). Conseqüentemente, a decisão de iniciar uma terapia com anticonvulsivantes é tomada apenas quando os riscos de novas convulsões superam os riscos do tratamento (SIRVEN, 2002). Desta forma, novos medicamentos antiepilépticos eficazes são necessários para melhorar a qualidade de vida de muitas pessoas acometidas pela epilepsia. Assim, a investigação de novas drogas anticonvulsivantes com baixa toxicidade, poucos efeitos colaterais e grande potencial terapêutico pode contribuir sobremaneira para o tratamento da epilepsia, melhorando a qualidade de vida e restabelecimento físico e mental dos portadores dessa doença em todo o mundo.

1.8.1 Fisiopatogenia das convulsões

Os neurotransmissores excitatórios e inibitórios (glutamato, aspartato, GABA e glicina) fazem a mediação de essencialmente toda comunicação neuronal rápida. Devido a suas altas concentrações e larga distribuição, estes aminoácidos influenciam todas as funções do SNC (WATKINS; OLVERMAN, 1987). Desequilíbrios entre respostas excitatórias e inibitórias podem ter conseqüências diversas, indo 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; RIBEIRO *et al.*, 2005). Particularmente, vários estudos sugerem que os

principais mecanismos envolvidos na gênese da convulsão estão relacionados a um desequilíbrio ocasionado por um aumento da transmissão excitatória glutamatérgica e/ou diminuição da resposta inibitória GABAérgica (RIBEIRO *et al.*, 2005).

Como referido anteriormente, o GABA é o principal neurotransmissor inibitório no SNC, envolvido direta ou indiretamente na patogênese de muitas doenças neurológicas e, principalmente, em episódios convulsivos. Dependendo da região cerebral, 20 a 50 % das sinapses usam GABA como transmissor e 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). Dos receptores GABAérgicos, o receptor GABA_A, é alvo da ação de muitas drogas anticonvulsivantes que agem potencializando esta neurotransmissão. O papel dos receptores 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 (SNORDGRASS, 1992). Como referido anteriormente neste trabalho, os receptores GABA_A possuem sítios de ligação para os benzodiazepínicos e barbitúricos, dentre outros, os quais atuam como agonistas da neurotransmissão inibitória do GABA, sendo fármacos comumente usados no tratamento de convulsões (MEHTA; TCKU, 1999).

Além dos sistemas glutamatérgico e GABAérgico, sabe-se que a atividade convulsiva está associada também a outros aminoácidos e neurotransmissores, como a glicina, aspartato, dopamina, serotonina (CAVALHEIRO *et al.*, 1994; MARINHO *et al.*, 1997); bem como ao metabolismo dos carboidratos, aos sistemas de segundos mensageiros e expressão gênica, além de processos envolvidos na fisiopatologia das alterações neuronais (SIMONIC *et al.*, 2000).

1.8.2 Modelos experimentais de convulsão: o modelo do Pentilenotetrazol (PTZ)

Os modelos experimentais têm sido utilizados ao longo dos anos na realização de triagens (*screening*) farmacológicas de drogas antiepilépticas, onde o principal objetivo é a contenção das crises convulsivas por drogas em estudo, ou seja, um tratamento sintomático, mas não necessariamente curativo. Paralelamente, eles contribuíram substancialmente com

informações a respeito dos mecanismos envolvidos na gênese e manutenção das crises convulsivas. Com o objetivo de aproximar os modelos animais dos fenômenos observados em humanos, ao longo dos tempos, várias técnicas têm sido desenvolvidas mimetizando tipos específicos de epilepsia (MELLO *et al.*, 1986). Nesse sentido, torna-se fundamental a diversificação desses métodos gerando distintos pontos de vista e permitindo uma compreensão mais abrangente dos fenômenos que caracterizam as epilepsias.

O pentilenotetrazol (PTZ) foi o primeiro analéptico (estimulante do SNC, convulsivante) sintético, desenvolvido em 1924. Historicamente, o PTZ teve algumas utilizações terapêuticas. Foi utilizado como estimulante cardíaco e empregado como estimulante do SNC no tratamento de overdose depressiva (sendo considerado menos efetivo que a picrotoxina e a estricnina). O PTZ é uma das principais substâncias indutoras de convulsão que são utilizadas na triagem pré-clínica de novos fármacos anticonvulsivantes. O desenvolvimento de benzodiazepínicos e barbitúricos no tratamento das crises convulsivas veio a partir de estudos com o PTZ (LÖSCHER, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2004, SWIADER *et al.*, 2006; SMITH *et al.*, 2007; QUINTANS-JÚNIOR *et al.*, 2007).

O modelo das quimioconvulsões ou das convulsões induzidas pelo PTZ reproduz um quadro parecido ao encontrado no “pequeno-mal” epiléptico (SAGRATELLA, 1998). O PTZ inicialmente produz espasmos mioclônicos, movimentos fugazes de excitação ou de relaxamento muscular que acarretam uma contração rápida e sincronizada dos músculos envolvidos, que se tornam subsequente mantidos e podem levar a uma crise tônico-clônica generalizada. Ao nível sináptico, acredita-se que o PTZ promove convulsões por inibir canais de cloreto associados com receptores GABA_A, reduzindo assim a neurotransmissão inibitória (CRESTANI *et al.*, 2002). Nesse contexto, drogas como os benzodiazepínicos e alguns barbitúricos parecem atuar promovendo a potencialização da inibição sináptica mediada por GABA, reduzindo a excitabilidade neuronal e aumentando o limiar convulsivante (LILLY; TIETZ, 2000). Assim, no modelo de convulsões induzidas pelo PTZ, o aumento da latência para o aparecimento das convulsões é um forte indicativo de uma ação anticonvulsivante. De fato, é largamente difundido na literatura que drogas como o diazepam e clonazepam aumentam este parâmetro (DE SARRO *et al.*, 1996; QUINTANS-JÚNIOR *et al.*, 2002). Ainda, atualmente, diversos terpenos constituintes de óleos essenciais têm também demonstrado atividade anticonvulsivante no modelo do PTZ, tais como o

citronelol e o α,β -epoxy-carvona (GALATI *et al.*, 2004; DE SOUSA *et al.*, 2006a; DE ALMEIDA *et al.*, 2008).

1.8.3 Convulsões e estresse oxidativo

1.8.3.1 Espécies reativas derivadas do oxigênio (ERO)

O estresse oxidativo é o resultado da excessiva produção de espécies químicas reativas, como os radicais livres. O termo radical livre faz referência a um átomo ou molécula altamente reativo, que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. O não-emparelhamento de elétrons da última camada é que confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas. Em verdade, o termo radical livre não é adequado para designar os agentes reativos patogênicos, pois alguns deles não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada. Como em sua maioria estas substâncias são derivadas do metabolismo do O_2 , o termo “espécies reativas do oxigênio” (ERO) torna-se mais apropriado (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990; HALLIWELL, 1992).

As ERO, encontradas em todos os sistemas biológicos, são capazes de gerar estresse oxidativo em consequência de suas propriedades oxidantes e reação com os constituintes celulares (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; SIES, 1991). Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbico, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H_2O . Durante esse processo são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroperoxila (H_2O^{\cdot}) e hidroxila (OH^{\cdot}) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Normalmente a redução completa do O_2 ocorre na mitocôndria, e a reatividade da ERO é neutralizada com a entrada dos quatro elétrons. Visto que participam de reações essenciais para o organismo, as ERO são constantemente formadas e podem ser prejudiciais, quando sua produção foge do controle exercido por sistemas antioxidantes endógenos de defesa.

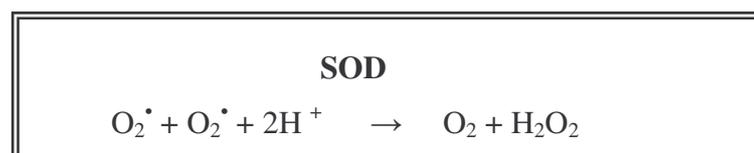
Ainda, a redução incompleta do O_2 ocorre também em situações não-fisiológicas, e o organismo humano está exposto às ERO geradas por radiações ionizantes, agentes tóxicos,

poluentes ambientais, dentre outros (SIES, 1991). Não controlados, as ERO atacam muitas moléculas importantes, incluindo enzimas, lipídios de membrana e DNA. Clinicamente, o estresse oxidativo pode causar lesão tecidual relacionada com muitas desordens fisiopatológicas como a hipóxia, a inflamação e a isquemia tecidual e de reperfusão. Outras teorias afirmam que o estresse oxidativo pode estar relacionado com disfunção neurológica associada a doenças incluindo a doença de Parkinson, Alzheimer, epilepsias, dentre outras (BEYER *et al.*, 1998).

1.8.3.2 Sistemas de defesa antioxidante contra as ERO

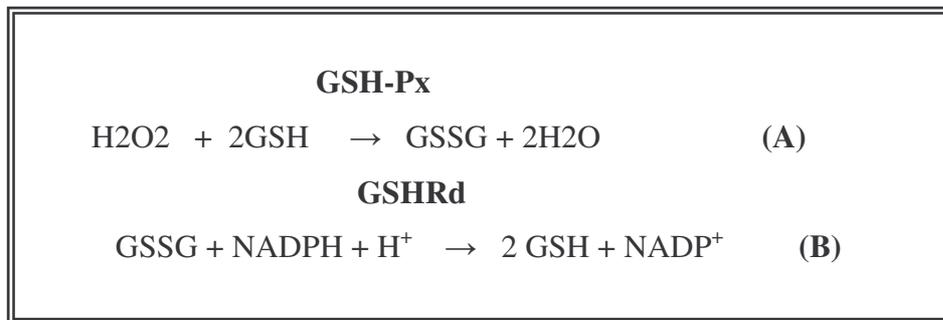
Em sistemas aeróbicos, é essencial o equilíbrio entre os agentes oxidantes (como as ERO) e o sistema de defesa antioxidante. Os mecanismos de defesa contra as ERO incluem o tripeptídeo glutatona reduzida (GSH) e enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase, glutatona-peroxidase (GSH-Px) e glutatona redutase (GSHRd) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997), além de outros compostos antioxidantes (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1992) como o ácido ascórbico e α -tocoferol (vitamina E), que normalmente mantêm essas espécies sob controle.

Em condições fisiológicas, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é formado na mitocôndria em função da atividade metabólica (CHANCE *et al.*, 1979). A superóxido dismutase (SOD) é uma enzima essencial para todas as células aeróbicas, pois catalisa a dismutação do radical superóxido, formando H_2O_2 e O_2 (FRIDOVICK, 1978). Esta reação é conhecida como reação de Fenton:



A catalase é uma hemoproteína citoplasmática que catalisa a redução de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (SCOTT *et al.*, 1991). Pode ser encontrada no cérebro, sangue, medula óssea, mucosas, rim e fígado (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). A glutatona

peroxidase (GSH-Px) era considerada uma enzima responsável apenas pela degradação do H₂O₂, tal como a catalase. Atualmente, esta enzima, que é encontrada em muitos tecidos animais, é considerada um dos principais sistemas antioxidantes. A GSH-Px consiste em uma das principais responsáveis pela remoção de peróxido de hidrogênio gerado pelas SOD no citosol e mitocôndria (e peróxidos orgânicos) para seus correspondentes alcoóis (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Ela catalisa a reação de redução de H₂O₂ com a glutathiona reduzida (GSH) para formar glutathiona oxidada (GSSG) e água (A). Fisiologicamente, a GSH-Px atua acoplada a enzima glutathiona redutase (GSHRd) que, por sua vez, catalisa redução de GSSG a GSH, usando NADPH como coenzima (B) (MILLS, 1960; MAIORINO *et al.*, 1990):



A GSH (L-γ-glutamil-L-cisteinil-glicina), um tripeptídeo formado por resíduos de glicina, cisteína e ácido glutâmico, existe em concentrações milimolares em todas as células humanas e desempenha outros papéis igualmente importantes no metabolismo de xenobióticos e na síntese de leucotrienos (HALLIWELL, 1994). Pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes como íons ferro, oxigênio hiperbárico, radiações ionizantes e luz ultravioleta (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

1.8.3.3 Envolvimento do estresse oxidativo em convulsões

Vários estudos têm sugerido que o aumento na quantidade de radicais livres e/ou a diminuição na atividade das defesas antioxidantes podem ser reportados durante os processos convulsivos (NAFFAH-MAZZACORATTI *et al.*, 2001). Em modelos epiléticos em

roedores, mostrou-se que o estresse oxidativo contribuiu em grande parte na morte de células neuronais e gliais (ARNAIZ *et al.*, 1998). A prolongada excitação dos neurônios durante as convulsões pode levar a injúria e morte celular, resultante de mecanismos bioquímicos desconhecidos. Um plausível mecanismo de injúria celular envolve a formação de uma quantidade excessiva de ERO (REITER *et al.*, 1997) levando a alterações estruturais em proteínas celulares, membranas lipídicas, DNA e RNA (estresse oxidativo) (BENI; MORETTI, 1995).

O processo de oxidação de ácidos graxos poliinsaturados da membrana celular é denominado de lipoperoxidação e pode comprometer a estrutura da membrana, danificando-a ou eventualmente causar completa destruição culminando com a morte celular. O cérebro é um alvo preferencial do processo peroxidativo, pois apresenta uma grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados (HALLIWELL, 1994; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; NAFFAH-MAZZACORATTI *et al.*, 2001).

As ERO produzidas durante as convulsões e estado epiléptico podem também ativar os mecanismos envolvidos na excitotoxicidade glutamatérgica *in vitro* (BONFOCO *et al.*, 1995) e *in vivo* (UEDA *et al.*, 1997). A estimulação de receptores de glutamato induz a liberação de óxido nítrico (NO) neuronal (NAKAKI *et al.*, 2000). O NO desempenha um importante papel em praticamente todos os sistemas do organismo (EISERICH *et al.*, 1998). Embora exerça diversas funções fisiológicas úteis, quando em excesso, o NO pode exercer efeitos nocivos. Em determinadas condições, o NO e o O_2^- podem interagir, resultando na formação de peroxinitrito ($ONOO^-$), um produto extremamente tóxico. Esse composto é capaz de reagir com diversas moléculas: proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos, danificando-as. Além disso, seus prováveis produtos de decomposição, o radical OH^- e o dióxido de nitrogênio, dentre outros, têm semelhante potencial deletério (RADENOVIC *et al.*, 2003).

Alguns estudos utilizando o modelo experimental de convulsão induzida pelo PTZ demonstraram um aumento em diversos marcadores de formação de espécies reativas, como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (BASHKATOVA *et al.*, 2003; PATSOUKIS *et al.*, 2004) e proteína carbonila (PATSOUKIS *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2004), o que sugere que a geração de ERO estaria relacionada com os efeitos convulsivantes e neurotóxicos do PTZ. Por outro lado, o tratamento com antioxidantes, incluindo substâncias naturais como óleos essenciais (ILHAN *et al.*, 2005), foi capaz de atenuar as convulsões

induzidas por esse composto e/ou o dano induzido pelas espécies reativas (KABUTO; OGAWA *et al.*, 1998; BASHKATOVA *et al.*, 2003). Apesar dessas evidências, o envolvimento das ERO no mecanismo das convulsões epiléticas ainda não está bem esclarecido.

1.9 Áreas Cerebrais Estudadas: Corpo Estriado (CE) e Hipocampo (HIP)

O gânglio basal possui grande papel nos movimentos voluntários normais. Esta região também está envolvida na produção das desordens do movimento. Os quatro principais núcleos dos gânglios da base são o corpo estriado, *globus pallidus*, substância negra e núcleo subtalâmico. Dentro dos núcleos da base, o corpo estriado é o principal receptor de impulsos de entrada provenientes do córtex cerebral, tálamo e tronco encefálico. Seus neurônios se projetam para o globo pálido e substância negra. Todas as áreas do córtex mandam projeções glutamatérgicas excitatórias para porções específicas do corpo estriado. Esta área também recebe projeções dopaminérgicas do mesencéfalo e impulsos de entrada serotoninérgicos dos núcleos da rafe, além de uma abundante projeção de neurônios GABAérgicos (DELONG *et al.*, 2000).

O corpo estriado consiste de três importantes subdivisões: o núcleo caudado, o putamen e o estriado ventral, o qual inclui o *nucleus accumbens*, uma região envolvida com a emoção e memória (DELONG, 2000). Embora os estudos dos níveis de catecolaminas no núcleo accumbens estejam centralizados na DA e NA (CHRISTIE *et al.*, 1986), outras amins biogênicas tais como adrenalina também podem ser afetadas. Estas alterações catecolaminérgicas no núcleo accumbens têm importantes implicações funcionais porque este núcleo é considerado como a interface principal entre os sistemas límbico e motor, portanto uma estrutura chave fazendo o fluxo entre motivação e ação (MOGENSON *et al.*, 1980) e, por isso, foi escolhida no presente estudo para a quantificação de monoaminas e seus metabólitos.

Tradicionalmente, o hipocampo é uma estrutura cerebral relacionada a processos cognitivos como aprendizado e memória (RIEDEL; MICHEAU, 2001). Estudos mostram que esta estrutura também está profundamente envolvida no surgimento e na disseminação de

episódios convulsivos. A formação hipocampal compreende quatro regiões corticais: o giro dentado, o hipocampo propriamente dito, o complexo subicular e o córtex entorrinal. Estudos revelam que os animais com epilepsia apresentaram intensa morte neuronal predominando em regiões do hipocampo propriamente dito (SCORZA *et al.*, 2005). O mecanismo exato através do qual uma crise epiléptica conduziria a morte celular ainda não foi completamente esclarecido. Acredita-se que a liberação de substâncias excitotóxicas em grande quantidade na fenda sináptica, como o glutamato, ocasionaria hiperexcitabilidade neuronal com conseqüente morte celular. Baseado nesta teoria, é possível explicar a susceptibilidade variável de determinadas regiões cerebrais à lesão, como o hipocampo e o neocórtex temporal, os quais possuem maior quantidade de terminações nervosas excitatórias (BRIELLMANN *et al.*, 2001). Nesse contexto, considerando as possíveis alterações neuropatológicas encontradas na citoarquitetura hipocampal em animais durante episódios convulsivos (SCORZA *et al.*, 2005), no presente estudo resolvemos investigar a participação do estresse oxidativo induzido pelo PTZ nesta área cerebral.

1.10 Produtos Naturais e Gastroproteção

Como referido anteriormente, no mundo inteiro muitas espécies vegetais têm sido utilizadas na medicina popular para o tratamento de diversas enfermidades, dentre elas, os distúrbios gastrintestinais (LANFRANCO, 1992; UNESCO, 1996, 1998; SILVA *et al.*, 2006). *Usnea longissima* consiste em uma espécie empregada no tratamento tradicional de úlceras pépticas em várias cidades do mundo. O efeito antiulcerogênico do extrato aquoso obtido dessa espécie foi investigado experimentalmente em ratos, onde se observou efeito protetor contra úlceras, o qual foi atribuído ao potencial antioxidante da mesma (HALICI *et al.*, 2005). *Campomasia xanthocarpa*, espécie conhecida popularmente no Brasil pelo nome de “gabirola”, é usada no tratamento convencional de doenças gástricas e a administração oral do extrato hidroalcoólico de suas folhas demonstrou efetiva ação gastroprotetora em ratos (MARKMAN *et al.*, 2004). No entanto, o uso e a comercialização dessas espécies vegetais, sobretudo em países em desenvolvimento como o Brasil, têm precedido à avaliação farmacológica e toxicológica (PETROVICK, 1999).

A grande variedade de substâncias isoladas de produtos naturais, que exercem atividade antiulcerogênica e contra distúrbios do TGI, apresenta estruturas químicas diversas e distintos mecanismos de ação (SCHMEDA-HIRSCHMANN; YESILADA, 2005). Lactonas sesquiterpênicas, isoladas de *Artemisia douglasiana*, demonstraram atividade antiulcerogênica atribuída à produção de muco e de compostos sulfidrilas (GUARDIÃ *et al.*, 1994). Estudos realizados no Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal do Ceará (LPN-UFC) evidenciaram a ação gastroprotetora de uma variedade de plantas medicinais e de seus princípios ativos isolados, dentre eles o monoterpeneo 1,8-cineol (SANTOS; RAO, 2001), as resinas α - e β -amirina isoladas de *Protium heptaphyllum* (OLIVEIRA *et al.*, 2004) e a ternatina, um flavonóide isolado de *Egletes viscosa* Less (macela) (RAO *et al.*, 1997). Recentes estudos realizados em nosso Laboratório (Neurofarmacologia, UFC) também evidenciaram a ação gastroprotetora de diversas substâncias isoladas de plantas, dentre elas estão a riparina I, o Dehidrodieugenol (DDE) e os monoterpeneos α -bisabolol e (-)-mentol, cujas ações de gastroproteção foram atribuídas a variados mecanismos de ação, envolvendo PGs, canais de potássio, NO e atividade antioxidante (dados sob processo de publicação). Nesse contexto, devido a sua ampla utilização na medicina popular, as plantas medicinais e os compostos isolados a partir delas apresentam relevância farmacológica como agentes terapêuticos de desordens gástricas (SCHMEDA-HIRSCHMANN; YESILADA, 2005).

1.11 Lesão Gástrica e Mecanismos de Gastroproteção

1.11.1 Etiologia das lesões gástricas

A úlcera é definida como uma abertura na mucosa do trato digestivo, que se estende através da musculatura da mucosa à submucosa ou mais profundamente (THOMOPOULOS *et al.*, 2004). Úlcera péptica é uma denominação genérica, comumente utilizada para designar as úlceras que surgem principalmente no estômago e no intestino e, por isso, recebe também a designação de úlcera gastroduodenal, embora possa ocorrer em qualquer nível do trato gastrointestinal. Individualmente, uma úlcera no estômago é denominada de úlcera péptica gástrica (ou úlcera gástrica), enquanto uma úlcera na parte superior do intestino delgado, ou

duodeno, recebe o nome de úlcera péptica duodenal (ou úlcera duodenal) (DAYAL; LELLIS, 1989).

As úlceras ocorrem mais freqüentemente no duodeno (úlcera duodenal), onde mais de 95% estão localizadas na sua primeira porção, e 90% próximo à junção do piloro com a mucosa duodenal. No estômago (úlcera gástrica), as úlceras se localizam mais comumente no antro (60%) e na junção do antro com o corpo, na pequena curvatura (25%). A incidência de úlceras gástricas parece ser ligeiramente maior em homens em relação às mulheres (ABITBOL, 2007). Embora menos prevalente do que a úlcera duodenal, a úlcera gástrica (0,1% da população em países desenvolvidos) apresenta maior grau de mortalidade e morbidade associados, resultantes de hemorragias, perfurações e obstruções (SIVRI, 2004).

De acordo com Glavin e Szabo (1992), acreditava-se que a secreção de ácido gástrico era o principal fator envolvido na ulceração da mucosa gástrica. Contudo, em 1987, Isenberg e colaboradores demonstraram que pacientes com úlcera duodenal apresentavam também diminuição da secreção de bicarbonato. Dessa forma, percebeu-se que não só o excesso de um fator agressivo, mas também, a deficiência de um mecanismo de defesa estava contribuindo com a ulceração da mucosa. Atualmente, está bem estabelecido que independentemente da etiologia da úlcera, esta é formada quando ocorre um desequilíbrio entre os fatores de defesa da mucosa (bicarbonato, muco, prostaglandinas, fluxo sanguíneo, óxido nítrico, fatores de crescimento, etc.) e fatores agressivos, que compreendem os agentes químicos endógenos (ácido clorídrico/HCl, pepsina) ou exógenos (etanol, anti-inflamatórios não esteroidais), e agentes biológicos (*Helicobacter pylori*) (NATALE *et al.*, 2004; DEMBINSKI *et al.*, 2005).

Geralmente, os estímulos lesivos sobre a mucosa, responsáveis pela formação de úlceras pépticas, são acompanhados por danos microvasculares locais, com conseqüente isquemia, diminuição da distribuição de nutrientes, formação de radicais livres e necrose tecidual (TARNAWSHI, 2005). Sob condições de estresse, o SNC é alterado com estimulação do hipotálamo e do centro medular causando alterações na motilidade gastrointestinal, aumento da secreção ácida e de pepsina, alteração da liberação de substâncias endógenas como glicocorticóides, catecolaminas e histamina; e também alterações da microcirculação causando isquemia, que provocam diminuição da vitalidade das células gástricas e de capilares, levando a necrose e ao desenvolvimento de úlceras (PACHALY *et al.*, 1993).

A identificação e isolamento da bactéria *Helicobacter pylori* pelos pesquisadores Marshall e Warren, em 1982, proporcionou um enorme desenvolvimento no conhecimento acerca da úlcera péptica (MARSHALL; WARREN, 1984). A infecção gástrica pela *H. pylori* é hoje responsável por mais de 90% dos casos de úlcera duodenal e 70% dos casos de úlcera gástrica (SIVRI, 2004). Embora a patogênese da doença ulcerosa não esteja completamente esclarecida, a infecção pelo *H. pylori* leva a alterações importantes da fisiologia gástrica, em especial dos mecanismos de secreção ácida que estão intimamente ligados à gênese da doença (QUEIROZ *et al.*, 1993; CRABTREE *et al.*, 1995; HOOGERWERF; PASRICHA, 2006).

Outra etiologia fortemente associada à úlcera péptica consiste no consumo de medicamentos que inibem a produção de prostaglandinas, como os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), os quais promovem danos à mucosa gástrica, constituindo um fator de risco para eventos adversos como ulceração, sangramento e perfuração gástrica (WHITTLE, 2004; NEWTON, 2005). O uso destes medicamentos constitui a segunda forma mais comum de doença ulcerosa, especialmente na população idosa, embora 85 % destas úlceras não tenham impacto relevante na clínica. A incidência dos efeitos gastrintestinais graves e potencialmente fatais (hemorragia e perfuração) é de cerca de 2 % por ano, podendo atingir 10 % em utilizadores de AINES que acumulem outro fator de risco acrescido para gastropatia (BRAZER *et al.*, 1990). O elemento crítico da ação lesiva dessas drogas consiste, principalmente, na supressão da forma constitutiva da ciclooxigenase (COX-1) na mucosa, mas também da forma induzida (COX-2) (WALLACE *et al.*, 2000), com conseqüente produção diminuída das prostaglandinas citoprotetoras, PGE2 e PGI2. No estômago, as PGs têm um papel vital na proteção da mucosa (HAWKINS; HANKS, 2000), como descrito em maiores detalhes adiante.

Doenças do trato gastrointestinal relacionadas ao álcool também possuem um papel importante na gastroenterologia clínica. A lesão da mucosa gástrica ocorre devido a uma diminuição de função da barreira de muco, a principal proteção contra o ácido gástrico. Altas concentrações de etanol levam a um aumento da permeabilidade epitelial, como conseqüência da re-difusão de íons H⁺ através da mucosa lesada, e a danos da mucosa, principalmente devido aos distúrbios vasculares e diminuição do fluxo sanguíneo local (SIEGMUND *et al.*, 2003). O etanol também induz estresse oxidativo, danos ao DNA e diminuição dos grupamentos sulfidrílicos não-protéicos (GSH) das células, que consistem em um dos mais

importantes fatores de proteção da mucosa gástrica (REPETTO; LLESUY, 2002). De fato, as ERO têm sido reportadas como mediadoras dos distúrbios microvasculares que precedem as lesões da mucosa gástrica induzidas por etanol, e também por AINEs e estresse (RASTOGI *et al.*, 1998; REPETTO; LLESUY, 2002).

Ainda, diversos outros fatores também favorecem o surgimento de ulceração na mucosa gástrica. Entre eles estão o aumento de secreção gástrica de ácido, aumento das catecolaminas circulantes, isquemia da mucosa gástrica, fatores genéticos e o estilo de vida (que engloba o estresse, uso abusivo de álcool, fumo e hábitos alimentares) (BAGGIO *et al.*, 2003; ELLIOT ; WHITTLE, 2004).).

1.11.2 Mecanismos de proteção gástrica

Em condições fisiológicas, a integridade da mucosa gástrica é mantida devido a um balanço entre fatores agressores e mecanismos de defesa (ABDEL-SALAM *et al.*, 2001; WALLACE *et al.*, 2001a). Os mecanismos de defesa da mucosa gastrointestinal podem ser divididos em pré-epitelial, epitelial e subepitelial, que funcionam em conjunto para prevenir a lesão. Esta divisão é arbitrária e realizada apenas para fins didáticos, pois as funções epiteliais como um todo funcionam em conjunto para prevenir as lesões (FLEMSTRÖM; ISENBERG, 2001).

De uma maneira geral, a proteção gástrica pré-epitelial é realizada pela barreira mucobicarbonato. O epitélio gástrico é coberto por uma camada contínua de muco e bicarbonato, os quais constituem a primeira linha de defesa da mucosa do estômago e duodeno contra agentes nocivos como o HCl, a pepsina luminal e outros agentes lesivos (MOJŽIŠ *et al.*, 2000; BI; KAUNITZ, 2003). O muco é secretado por células secretoras de muco encontradas entre as células epiteliais superficiais por toda a mucosa gástrica. Consiste de um gel viscoso, elástico, aderente e transparente formado por 95% de água e 5% de glicoproteínas (REPETTO; LLESUY, 2002). As células epiteliais superficiais secretam também um líquido aquoso contendo íons bicarbonato (HCO_3^-). O Bicarbonato é retido no muco viscoso, tornando alcalina a camada mucosa e criando um gradiente de pH de 6-7 na superfície mucosa, mesmo com o pH na luz do estômago sendo extremamente ácido (1-3). A secreção

de muco e HCO_3^- é induzida por estímulo colinérgico, pelas PGs e pela presença de um baixo pH luminal (FLEMSTRÖM; ISENBERG, 2001). Assim, o gel mucoso protetor que se forma sobre a superfície luminal do estômago e as secreções alcalinas nele contidas constituem a barreira muco-bicarbonato de proteção gástrica.

A segunda linha de defesa da mucosa gástrica é realizada pelas células epiteliais (defesa epitelial). As células epiteliais gástricas têm propriedades intrínsecas de proteção tanto por sua disposição anatômica quanto por sua constituição bioquímica (SZABO, 1991). As propriedades físicas da membrana das células apicais (fosfolipídios anfóteros) e as junções intercelulares são responsáveis pela prevenção da difusão dos íons H^+ na mucosa e pela resistência aos agentes hidrofílicos agressores, tais como a aspirina, promovendo assim uma barreira física de proteção gástrica (SHORROCK; REES, 1988; FORSELL, 1988). Porém, quando as barreiras gástricas são destruídas e ocorre a morte celular, as células necróticas podem ser repostas pela migração das células epiteliais sobreviventes nas bordas da lesão ou pela divisão das células do colo glandular que migram até o lúmen e diferenciam-se em células epiteliais superficiais (SZABO, 1991; WALLACE; GRANGER, 1996). Desta forma, os fatores de crescimento que estimulam importantes elementos celulares de cicatrização da úlcera, como a angiogênese, formação de tecido de granulação e re-epitelização, são relevantes componentes da proteção epitelial (SZABO; VINCZE, 2000).

Juntamente com os aspectos anatômicos da gastroproteção epitelial, os aspectos bioquímicos são também de fundamental importância para esta proteção. Como referido anteriormente, ERO são geradas constantemente nas células durante alguns processos, como na cadeia transportadora de elétrons (na fosforilação mitocondrial), durante o metabolismo de xenobióticos e durante a resposta inflamatória. Assim, defesas celulares antioxidantes são também necessárias para manter a homeostase celular gástrica (ZHU; KAUNITZ, 2008). De maneira semelhante às demais células do corpo, o estresse oxidativo gástrico pode ser prevenido tanto por ação enzimática (SOD, catalase e GPx), quanto por defesas antioxidantes químicas (vitaminas, flavonóides da dieta, carotenóides e GSH) (CNUBBEN *et al.*, 2001; MÓZSIK *et al.*, 2007). Como citado anteriormente, a GSH participa em muitos aspectos do metabolismo oxidativo, incluindo remoção de hidroperóxidos, proteção contra radiação ionizada, manutenção do padrão fisiológico de proteínas sulfidrílicas e condensação com xenobióticos ou compostos reativos endógenos, para ajudar na sua detoxificação e excreção. Desta forma, no epitélio gástrico, a GSH atua como um “varredor” de radicais livres e de

substâncias tóxicas ingeridas na alimentação e/ou produzidas diretamente no TGI. Assim, a manutenção das concentrações de GSH normais contribui seriamente para integridade da mucosa gástrica (SHIRIN *et al.*, 2001).

Recentemente, o óxido nítrico tem sido também reconhecido como um mediador fundamental nos mecanismos de defesa gástrica. De fato, vários estudos demonstraram que as lesões na mucosa gástrica induzidas por agentes químicos são reduzidas pela administração de NO e agravadas com a sua remoção (CHO, 2001; UCHIDA *et al.*, 2001). Este efeito tem sido relacionado à habilidade do NO de aumentar o fluxo sanguíneo da mucosa e a produção de muco, além de inibir a aderência de neutrófilos às células endoteliais e participar do controle da secreção ácida e alcalina (CORUZZI *et al.*, 2000; BAYIR *et al.*, 2006). O NO é sintetizado pela NO sintase (NOS) a partir do oxigênio molecular (O₂) e L-arginina. Existem três isoformas conhecidas da NOS: uma forma induzida - iNOS (expressa em macrófagos, células de Kupffer, neutrófilos, fibroblastos, músculo liso vascular e células endoteliais, em resposta a estímulos patológicos como microorganismos invasores) e duas ditas constitutivas (cNOS), que estão presentes em condições fisiológicas no endotélio (eNOS) e nos neurônios (nNOS) (CHO, 2001; UCHIDA *et al.*, 2001).

Estudos demonstraram que a administração de L-NAME (L-nitro arginina metil-éster, um inibidor da NOS) acentua as lesões gástricas induzidas por etanol, enquanto doadores de NO (ex.: nitroprussiato) reparam as lesões induzidas por etanol em ratos (BULUT *et al.*, 1999). No entanto, alguns estudos trazem informações contraditórias a respeito do papel do NO no trato gastrointestinal (HASEBE *et al.*, 2001). Takeuchi e colaboradores (1993) mostraram que a inibição da produção de NO pela administração de L-NAME aumentou a secreção de íons bicarbonato, protegendo, desta forma, a mucosa duodenal contra a acidez gástrica. Recentes estudos demonstram que o NO atua de maneira bifásica na resposta ulcerogênica da mucosa gastrointestinal dependendo da isoforma da NOS envolvida, ou seja, o NO produzido pela cNOS apresentaria efeito protetor, e o NO originário da iNOS teria um efeito próulcerogênico (NISHIO *et al.*, 2006).

As prostaglandinas endógenas (PGs), principalmente as da série E (E₁ e E₂) e a PGI₂, também desempenham importante papel na defesa da mucosa gastrintestinal (MAITY *et al.*, 2003; ZHU; KAUNITZ, 2008). A prostaglandina E2 (PGE2) e a prostaciclina (PGI2) constituem as principais prostaglandinas sintetizadas pela mucosa gástrica. Apresentam

efeitos citoprotetores como conseqüência de vários mecanismos indiretos, como o aumento da produção de muco e bicarbonato que recobrem as células epiteliais, a inibição da motilidade gástrica, a inibição da secreção ácida gástrica, a manutenção do fluxo sanguíneo gástrico, a inibição da apoptose, a inibição da ativação de mastócitos, e a diminuição da aderência leucocitária ao endotélio vascular (ATAY *et al.*, 2000).

As prostaglandinas são sintetizadas a partir do ácido araquidônico, através das enzimas ciclooxygenases (COX). Está bem estabelecido que existam pelo menos duas isoformas distintas da COX, denominadas COX-1 (constitutiva) e COX-2 (induzida) (PESKAR, 2001). A isoforma COX-1, provavelmente, promove a produção de PGs protetoras da mucosa gástrica, as quais possuem um papel importante na manutenção da homeostase (RODRÍGUEZ-TÉLLEZ *et al.*, 2001). A expressão da COX-2 geralmente é baixa sob condições basais e se eleva em certas condições patofisiológicas como a inflamação, dano tecidual e transformação maligna (PESKAR, 2001). Recentemente, foram descritas variantes da COX-1, uma das quais foi chamada de “COX-3” (KIS *et al.*, 2006).

Vários estudos têm especulado acerca da contribuição da COX-2 nos mecanismos de defesa da mucosa gástrica e de cicatrização de úlceras (WALLACE *et al.*, 2000; PERINI *et al.*, 2003; JUGDUTT, 2007). Enquanto a isoforma COX-1 produz a maior parte das prostaglandinas na mucosa gástrica normal, refere-se que a COX-2 atua como um fator importante na cicatrização das úlceras, desempenhando portanto, importante papel na gastroproteção (WALLACE, 2001b). Estudos prévios sugerem que a inibição da COX-2 aumenta o tempo de cicatrização das úlceras tanto por via dependente quanto independente de prostaglandinas (PERINI *et al.*, 2003). Segundo Wallace (2001b), em pacientes com úlceras pré-existentes, tem-se sugerido utilizar derivados de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) que liberam NO ao invés de inibidores seletivos de COX-2, pois estes “NO-AINEs” não interferem na cicatrização das úlceras e, em alguns casos, podem acelerar sua cicatrização.

A proteção em nível subepitelial é dada pelo fluxo sanguíneo, que protege a mucosa por assegurar a chegada de uma quantidade ótima de oxigênio, nutrientes e bicarbonato. Evidências experimentais têm enfatizado o papel do fluxo sanguíneo e, em particular a microcirculação na patogênese de injúrias na mucosa gástrica. Quando o ácido gástrico ou outro agente irritante invade o compartimento subepitelial, neurônios sensoriais aferentes são

capazes de disparar um rápido aumento no fluxo sanguíneo da mucosa que permite o tamponamento do ácido e uma rápida remoção de substâncias tóxicas, limitando, desta forma, sua penetração em camadas mais profundas da mucosa (WALLACE; GRANGER, 1996). Estudos com o NO também foram realizados para avaliar sua participação na motilidade gastrointestinal e no fluxo sanguíneo gástrico. Enquanto o papel do NO na motilidade gastrointestinal é fortemente controlado pela nNOS, os efeitos nas funções vasculares ocorrem, em maior parte, através da eNOS. A maior parte do fluxo sanguíneo do trato gastrointestinal entra pela vasculatura mesentérica e é regulado, em grande parte, pelas arteríolas. O papel do NO neste processo foi evidenciado por inibidores de NO, que reduziram o fluxo sanguíneo em artérias mesentéricas (KUSAYAMA *et al.*, 1996). De maneira similar ao NO, as prostaglandinas também desempenham importante papel no controle do fluxo sanguíneo da mucosa gástrica (FORSELL, 1998).

2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

O uso de plantas medicinais no tratamento de diversas enfermidades tem sido relatado desde os primórdios da humanidade. A utilização das substâncias ativas isoladas de plantas e de seus extratos vegetais como protótipos para a obtenção de fármacos, de adjuvantes, ou ainda, de medicamentos fitoterápicos, tem despertado crescente interesse da indústria farmacêutica na produção de agentes terapêuticos de origem natural, inclusive em países de clima tropical, como o Brasil, que apresenta a maior biodiversidade do mundo.

O isopulegol, um monoterpene isolado de várias espécies de plantas e utilizado como ingrediente de perfumes, apresentou em estudos preliminares possível efeito depressor em nível de SNC, provavelmente relacionado ao sistema GABA/BZP. Considerando que estes efeitos foram pouco estudados, aliado ao fato de que pesquisas pré-clínicas são essenciais para o desenvolvimento de novas terapias e para o estudo da neurobiologia dos transtornos mentais, no presente estudo, nós resolvemos investigar as ações comportamentais do isopulegol em vários modelos experimentais relacionados com a ação central, sobretudo à ansiedade e depressão. Para corroborar com os resultados de tais experimentos, sendo o corpo estriado uma área cerebral com importante papel no movimento voluntário e, portanto, frequentemente utilizado em estudos das desordens do humor, cognição e comportamento, no presente estudo foi também realizada a quantificação das monoaminas cerebrais e seus metabólitos em corpo estriado de animais tratados com isopulegol.

Diversos estudos têm também relatado a ação de produtos naturais, como os monoterpenos, contra episódios convulsivos, alguns tipos de doenças degenerativas e vários tipos de cânceres, ações estas frequentemente atribuídas, em parte, às propriedades antioxidantes desses compostos. Diante da crescente busca por novos fármacos mais eficazes e seguros contra episódios convulsivos, estes dados nos levaram também a investigar o potencial anticonvulsivante e antioxidante do isopulegol.

Por fim, um relevante número de estudos tem evidenciado a ação gastroprotetora de diferentes terpenos. Drogas inibidoras de bomba protônica são efetivas e muito utilizadas no tratamento de lesões gastrintestinais; porém, o uso prolongado desses fármacos pode levar a

risco de câncer. Isso demonstra a necessidade de estudos adicionais para a compreensão desta condição clínica, assim como para a busca por métodos e tratamentos capazes de promover a sua total remissão de forma segura e eficaz. Nesse contexto, no presente estudo, nós resolvemos também investigar o potencial gastroprotetor do isopulegol em camundongos e analisar os possíveis mecanismos envolvidos nesta ação.

3 OBJETIVOS GERAIS

Para facilitar a leitura e compreensão do presente estudo, o mesmo foi dividido em três capítulos, cujos objetivos gerais estão listados a seguir.

Capítulo I:

- ❖ Investigar o potencial farmacológico do isopulegol em modelos de ação no sistema nervoso central, bem como determinar a concentração de monoaminas e seus metabólitos em corpo estriado de camundongos após administração aguda de isopulegol.

Capítulo II:

- ❖ Investigar o potencial anticonvulsivante e antioxidante do isopulegol nas convulsões induzidas por pentilenotetrazol em camundongos e verificar possíveis mecanismos de ação envolvidos.

Capítulo III:

- ❖ Investigar o potencial antiulcerogênico do isopulegol em modelos experimentais de úlcera gástrica em camundongos e verificar os possíveis mecanismos de ação envolvidos.

4 MATERIAIS, ANIMAIS, DROGAS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

4.1 Principais materiais e drogas utilizados nos experimentos

Material	Marca / Modelo
- Balança analítica	Modelo H5, Mettler, Suíça
- Balança para animais	Filizola, Brasil
- Banho Maria	Modelo 102/1, FANEN, SP, Brasil
- Bomba para HPLC	LC-10AD Shimadzu Corp., Japan
- Centrífuga refrigerada	Modelo Marathon 26 KMR, Fisher Scientific
-Cubetas de plástico para leitura em espectrofotômetro	Sarstedt, Alemanha Oriental
- Cronômetro	Incoterm, Brasil
- Deionizador	USF, Elga, USA
- Detector eletroquímico	L-ECD-6 ^a , Shimadzu Corp., Japan;
- Espectrofotômetro	Modelo Beckman DU 640B, Fullerton, CA, USA
- Equipamento da Placa Perfurada	Ugo Basile, Italy
- Equipamento de Campo Aberto	Fabricação não industrial
- Equipamento de Labirinto em cruz elevado	Fabricação não industrial
- Equipamento do <i>Rota Rod</i>	Ugo Basile, Italy
- Pipetas Automáticas	H.E., Dinamarca
- Ponteiras para pipetas automáticas	Sigma
- Recipiente do Nado Forçado	Fabricação não industrial
- Vidrarias	Pirex, Brasil
-Freezer a – 70 °C	Modelo ULT 2586-3D14, Revco Scientific, Inc. Asheville, N.C. ,USA

Quadro 2 - Materiais utilizados

	Droga	Dose/Concentração	Via	Origem
Capítulo 1	Diazepam	1 ou 2 mg/kg	i.p.	União Química/Brasil
	Flumazenil	2,5 mg/kg	i.p.	União Química/Brasil
	Imipramina	10 ou 30 mg/kg	i.p.	Geigy
	Isopulegol	25 e 50 mg/kg	i.p. e v.o.	Dierberger/Brasil
	Pentobarbital	40 mg/kg	i.p.	Abbot
Capítulo 2	Diazepam	1 mg/kg	i.p.	União Química/Brazil
	Flumazenil	2,0 mg/kg	i.p.	União Química/Brazil
	Isopulegol	25, 50, 100 e 200 mg/kg	i.p. e v.o.	Dierberger/Brazil
	Pentilenotetrazol	99 mg/kg	s.c.	União Química/Brazil
Capítulo 3	Ciproeptadina	10 mg/kg	i.p.	Sigma-Brasil
	Etanol absoluto	PA	v.o.	CPQ-Brazil
	Glibenclamida (4% de glicose)	10 mg/kg	i.p.	Sigma-USA
	Indometacina	10 e 20 mg/kg	v.o.	Sigma-USA
	Isopulegol	25, 50, 100 e 200 mg/kg	v.o.	Dierberger/Brazil
	L-NAME	10 mg/kg	i.p.	Sigma-USA
	NAC	750 mg/kg	i.p.	União Química-Brasil
	Ranitidina	20 mg/kg	i.p.	União Química-Brazil

Quadro 3 - Drogas utilizadas

4.2 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos com peso variando entre 25–30 g provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Durante todos os experimentos os animais foram mantidos em gaiolas com no máximo 30 animais, em condições ambientais semelhantes, com ciclos de alternância claro/escuro de 12 horas, com

temperatura em torno de 25 °C, recebendo ração tipo Purina e água *ad libitum*. Os experimentos foram realizados de acordo com o guia de cuidados com o uso de animais de laboratório e ética para investigação de dor experimental em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas Animais da Universidade Federal do Ceará (UFC).

4.3 Preparo das Drogas

O isopulegol foi separado e obtido por coluna de cromatografia de grade técnica (isopulegol/Dierberger - Brazil). Todo o processo de purificação foi realizado pelo laboratório de produtos naturais da Universidade Federal da Paraíba, sob a supervisão do Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa, o qual nos forneceu gentilmente o isopulegol isolado e purificado para a realização deste estudo. As doses da substância teste foram escolhidas a partir da realização de experimentos prévios em estudo piloto. As doses das demais drogas foram utilizadas de acordo com estudos previamente descritos na literatura pertinente.

Para a realização dos experimentos, o isopulegol foi emulsificado com Tween 80 a 3 %, dissolvido em água destilada e administrado via intraperitoneal ou oral nas doses de 25, 50, 100 e 200 mg/kg, dependendo do protocolo experimental utilizado. Os grupos controles receberam veículo (solução salina a 0,9 % em 3% de Tween 80). As demais drogas utilizadas na investigação de ação central e atividade anticonvulsivante, tais como o diazepam (1 ou 2 mg/kg), imipramina (10 mg/kg ou 30 mg/kg), pentobarbital sódico (40 mg/kg), pentilenotetrazol (99 mg/kg) e flumazenil (2,5 mg/kg) foram dissolvidas e diluídas diretamente em água destilada. Para a investigação da atividade gastroprotetora, foi utilizado etanol absoluto; a indometacina (10 ou 20 mg/Kg) foi suspensa em 0,5% de carboximetilcelulose e dissolvida em água destilada. L-NAME (N (G)-nitro-L- arginine methyl ester, 10 mg/kg), ciproptadina (10 mg/kg), ranitidina (20 mg/kg), NAC (N-acetyl cysteine, 750 mg/kg) e glibenclamida (10 mg/kg, preparada em 4% de glicose), foram dissolvidas em água destilada.

4.4 Análises estatísticas

A análise estatística dos dados foi realizada através do software GraphPad Prism versão 4.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego California EUA. Copyright (c) 1994-1999 por GraphPad Software. Os resultados que obedeciam a uma distribuição paramétrica foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) seguido pelo teste de Student Newman Keuls (*post hoc*), sendo os valores representados pela Média \pm Erro Padrão da Média (EPM). Os dados não-paramétricos foram analisados pelo mesmo programa utilizando o teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunns (*post hoc*), sendo os valores representados como mediana (+ valor mínimo e valor máximo). O critério de significância utilizado foi $p < 0,05$. Os asteriscos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) caracterizam o grau de significância, assim como os demais símbolos #, a e b utilizados.

5 CAPÍTULOS

5.1 Capítulo I - Investigação dos Efeitos Centrais da Administração Aguda de Isopulegol em Camundongos

5.1.1 Introdução

A saúde mental e a promoção do bem-estar psicológico é um assunto de importância crescente nas sociedades contemporâneas, sendo a ansiedade e a depressão os transtornos mais frequentes na prática clínica psiquiátrica (ANDREWS *et al.*, 2000; BEARD *et al.*, 2008; KANTORSKI, 2008). Nesse contexto, diversos estudos têm sido realizados no mundo inteiro visando a descoberta de novas alternativas terapêuticas para tais transtornos (IRIE *et al.*, 2004; KLODZINSKA *et al.*, 2004; DE SOUSA *et al.*, 2006b; RABBANI *et al.*, 2008), incluindo os estudos realizados por nosso grupo (SOUSA *et al.*, 2004, 2005a, 2005b; MELO *et al.*, 2006).

Como referido anteriormente, o (-)-isopulegol é um monoterpeno álcool encontrado em óleos essenciais de várias espécies de plantas (VERNIN *et al.*, 2004; PAIK *et al.*, 2005) e tem sido usado na manufatura de perfumes e aromatizantes (CHUAH *et al.*, 2001). Porém, o seu principal uso é como intermediário sintético na preparação do mentol, um composto de grande utilidade em indústrias farmacêuticas, cosméticas, dentre outras (SERRA *et al.*, 2003). Foi sugerido que o isopulegol apresenta possível efeito depressor no SNC, enquanto o mentol, o seu análogo estrutural, demonstrou uma possível ação psicoestimulante (UMEZU *et al.*, 2001; UMEZU; MORITA, 2003). No entanto, estudos investigando as propriedades farmacoterapêuticas do isopulegol em nível de SNC são escassos na literatura.

Assim, no presente capítulo é abordada a investigação dos efeitos do isopulegol em modelos experimentais de ação no SNC, em especial, aqueles referentes à ansiedade e depressão.

5.1.2 Objetivos específicos

- Investigar os efeitos da administração aguda do isopulegol no sistema nervoso central, através do estudo das alterações comportamentais de camundongos nos seguintes modelos:
 - Labirinto em cruz elevado (*Plus maze*)
 - Campo aberto
 - Placa perfurada (*hole board*)
 - Nado forçado
 - Suspensão da cauda
 - *Rota rod*
 - Tempo de sono induzido por pentobarbital

- Investigar a possível participação do sistema GABAérgico na atividade ansiolítica do isopulegol.

- Determinar a concentração de monoaminas e seus metabólitos em corpo estriado de camundongos após administração aguda de isopulegol.

5.1.3 Métodos

5.1.3.1 Investigação de Atividade no SNC em Testes de Ansiedade e Depressão

➤ **Protocolo experimental**

Antes da realização dos experimentos, os animais foram colocados em um 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. O teste do labirinto em cruz elevado (LCE ou *plus maze*) e do campo aberto foram realizados sob iluminação de baixa densidade (lâmpada vermelha de 15 W). Os animais foram tratados com o isopulegol nas doses de 25 e 50 mg/kg, 30 minutos (i.p.) ou 1 hora (v.o.) antes dos experimentos. Os grupos controles receberam veículo (solução salina a 0,9% com 3 % de Tween 80, i.p. ou v.o.) no mesmo volume dos grupos tratados com a substância teste (10 ml/kg).

De acordo com a literatura, os benzodiazepínicos, tais como o diazepam, agem como ansiolíticos (em doses baixas) e anticonvulsivantes, produzindo também sedação e efeito relaxante muscular em doses mais altas (ONAIVI *et al.*, 1992; WOLFFGRAMM *et al.*, 1994). Por esta razão, no presente trabalho, foram utilizadas diferentes doses de diazepam nos testes realizados. Diazepam 1 mg/kg, i.p. foi utilizado como referência ansiolítica nos testes do labirinto em cruz elevado e placa perfurada, e diazepam 2 mg/kg, i.p., no campo aberto, como referência sedativa. Diazepam 2 mg/kg, i.p., foi usado também no modelo do *rota rod*, como padrão para atividade relaxante muscular, assim como diazepam 1 mg/kg, i.p., foi ainda utilizado nos modelos de tempo de sono induzido por pentobarbital e convulsão induzida por pentilenotetrazol como padrão para atividade sedativa e anticonvulsivante, respectivamente.

Com a finalidade de investigar o mecanismo de ação do isopulegol, em um grupo adicional, os animais receberam flumazenil (2,5 mg/kg, i.p.), um antagonista do receptor benzodiazepínico, 15 min antes do isopulegol (25 e 50 mg/k, i.p.) ou do diazepam (1 mg/kg, i.p.). Ainda, em alguns modelos comportamentais, tais como campo aberto, labirinto em cruz

elevado, tempo de sono e convulsão, após a observação de cada animal, foi utilizado álcool a 70 % para a remoção de resíduos e odor do animal.

➤ **Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) ou *Plus Maze***

O labirinto em cruz elevado para camundongos (LISTER, 1987) consiste de dois braços abertos opostos (30 x 5 cm) e dois fechados (30 x 5 x 25 cm), também opostos, em forma de cruz. Os braços abertos e fechados estão conectados entre si por uma plataforma central (5 x 5 cm), elevada a 45 cm do chão. A plataforma e as paredes laterais dos braços fechados são confeccionadas em acrílico transparente e o chão em acrílico preto. Após 30 (i.p.) ou 60 (v.o.) minutos dos tratamentos, os animais foram colocados no centro do aparelho com a cabeça voltada para um dos braços fechados e o seu comportamento observado por 5 minutos. As medidas comportamentais registradas no LCE foram: número de entradas nos braços abertos e braços fechados (NEBA e NEBF) e tempo de permanência do animal em cada um desses braços (TPBA e TPBF). Para este teste, foram utilizados 10-15 animais por grupo.

Subseqüentemente, com a finalidade de investigar o mecanismo de ação do isopulegol, um grupo de animais foi tratado com flumazenil (2,5 mg/kg, i.p.) 15 min antes de receberem veículo (solução salina a 0,9% com 3 % de Tween 80, i.p.) (FLU-2,5 + veículo); dois outros grupos receberam flumazenil (2,5 mg/kg, i.p.) 15 min antes da administração de isopulegol (25 e 50 mg/kg, i.p.) (FLU-2,5 + ISO-25 e FLU-2,5 + ISO-50); um outro grupo de camundongos recebeu flumazenil (2,5 mg/kg, i.p.) 15 min antes do diazepam (1 mg/kg, i.p.) (FLU-25 + DZP-1). Os grupos controles receberam apenas veículo ou diazepam (1 mg/kg, i.p.) Os grupos experimentais foram conduzidos ao labirinto 30 min após a administração dos tratamentos. A dose do flumazenil foi utilizada de acordo com estudo previamente descrito (NASSIRI-ASL *et al.*, 2007).

➤ **Teste do Campo Aberto**

Este teste foi realizado para avaliar a atividade exploratória do animal, de acordo com o método descrito por Archer (1973). O aparato utilizado na realização do experimento (para camundongos) é feito de acrílico (paredes transparentes e piso preto, 30 x 30 x 15 cm) e dividido em 9 quadrantes iguais. Após 30 (i.p.) ou 60 minutos (v.o.) da administração dos tratamentos, os animais, um por vez, foram colocados no centro do campo aberto onde o número de cruzamentos com as quatro patas (atividade locomotora espontânea; ALE), número de comportamentos de auto-limpeza (*grooming*) e o número de levantamentos verticais (*rearing*), sem encostar as patas nas paredes, foram registrados durante um tempo de 5 minutos. Para este teste, foram utilizados 8-15 animais por grupo.

➤ **Teste da Placa Perfurada**

O método seguido foi o proposto por Clark *et al.* (1971). O aparato usado foi um Ugo Basile de 60 x 30 cm com 16 buracos espaçados uniformemente com sensores de infravermelho. O parâmetro analisado foi o número de *head dips* (número de vezes que o animal coloca a cabeça nos buracos) durante 5 minutos. Os animais, um por vez, foram colocados na plataforma 30 ou 60 minutos após os tratamentos i.p. ou v.o., respectivamente. A contagem do número de *head dips* foi realizada automaticamente através do sensor localizado nos buracos e registrada no aparelho. Para este teste, foram utilizados 8-15 animais por grupo.

➤ **Teste do Nado Forçado**

Para este experimento, descrito por Porsolt *et al.* (1977), foram utilizados tanques de 22 cm de diâmetro e 40 cm de altura contendo água fresca a $23 \pm 1^\circ \text{C}$ até a metade do tanque, cerca de 20 cm. Após 30 (i.p.) ou 60 (v.o.) minutos dos tratamentos, os animais foram colocados, um por vez, no tanque, onde o tempo de imobilidade, em segundos, foi contado durante cinco minutos. O animal foi considerado imóvel quando permaneceu flutuando na

água, fazendo apenas movimentos suaves necessários para manter a cabeça acima da água. Para este teste, foram utilizados 10-13 animais por grupo.

➤ **Teste da Suspensão da Cauda**

Para a realização deste teste, 30 (i.p.) ou 60 (v.o.) minutos após os tratamentos, os animais, um por vez, foram suspensos, presos com uma fita adesiva a cerca de 1 cm da ponta da cauda, numa plataforma 58 cm acima da bancada, e observados durante 6 minutos (STERU *et al.*, 1985). O parâmetro observado foi o tempo de imobilidade do animal, em segundos. Para este teste, foram utilizados 8-15 animais por grupo.

➤ **Teste do Rota Rod**

A coordenação motora dos animais foi medida neste teste, utilizando o método adaptado de Egashira *et al.* (2004). Para este experimento, 30 (i.p.) ou 60 (v.o.) minutos após os tratamentos, os camundongos foram colocados com as quatro patas sobre uma barra giratória de 2,5 cm de diâmetro, elevada a 25 cm do piso, em rotações de 5, 15 ou 40 rpm. O parâmetro analisado foi o tempo de permanência na barra giratória, em segundos (s), durante um tempo total de 2 min de observação. Foram utilizados diferentes grupos de animais para cada rotação testada. Para este teste, foram utilizados 8 animais por grupo.

➤ **Teste do Tempo de Sono Induzido por Pentobarbital**

Para este experimento, 30 (i.p.) ou 60 (v.o.) minutos após os tratamentos, foi administrado pentobarbital sódico (PTB) na dose de 40 mg/kg, via i.p. O tempo desde a administração do PTB até a perda do reflexo de endireitamento foi registrado como latência do sono, em segundos. Após terem adormecido, os animais foram colocados na posição de decúbito dorsal, e o tempo decorrido entre a perda e a recuperação do reflexo de

endireitamento foi registrado como duração do sono, em segundos (WAMBEBE, 1985; ROLLAND *et al.*, 1991). A perda do reflexo de endireitamento representa a incapacidade do animal de voltar à posição normal quando colocado em decúbito dorsal. O critério para a recuperação desse reflexo foi determinado quando o animal saiu da posição por três vezes consecutivas (CARLINI *et al.*, 1986; MATTEI *et al.*, 1998). Resumidamente, os parâmetros avaliados neste teste foram: a latência do sono e a duração do sono cujo tempo máximo foi de 240 minutos. Para este teste, foram utilizados 8-15 animais por grupo.

5.1.3.2 Dissecção das Áreas Cerebrais (CE e HIP)

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, os encéfalos retirados rapidamente e colocados sobre papel alumínio em uma placa de Petri com gelo. O corpo estriado (CE) foi dissecado 30 min após a administração intraperitoneal de isopulegol ou veículo (salina a 0,9% em 3% de Tween 80), para a análise da concentração das monoaminas e seus metabólitos nesta área cerebral. O hipocampo foi dissecado após os experimentos de convulsão induzida por pentilenotetrazol (PTZ) (descrito mais adiante), para a realização das dosagens bioquímicas de GSH, catalase, peroxidação lipídica e dosagem de nitrito.

Acompanhando a fissura sagital mediana, a camada cortical cerebral foi retirada das leptomeninges com o auxílio de uma pinça reta de microdissecção, 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 (**HIP**) (**Figura 5**) que, com divulsionamento, foi descolado e retirado (apenas após os experimentos de convulsão induzida por PTZ). O corpo estriado (**CE**) (**Figura 6**) (caudado, putamen e núcleo accumbens) foi isolado das estruturas circunjacentes por divulsionamento com uma tesoura de microdissecção, sendo a sua retirada orientada pelo diâmetro da porção tuberosa visível desses núcleos, após o rebatimento lateral do córtex.

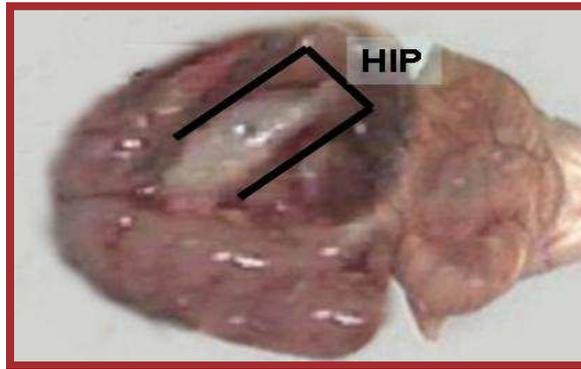


Figura 5. Representação da região anatômica no camundongo referente ao hipocampo (HIP)

Fonte: Adaptado de Oliveira (2005)

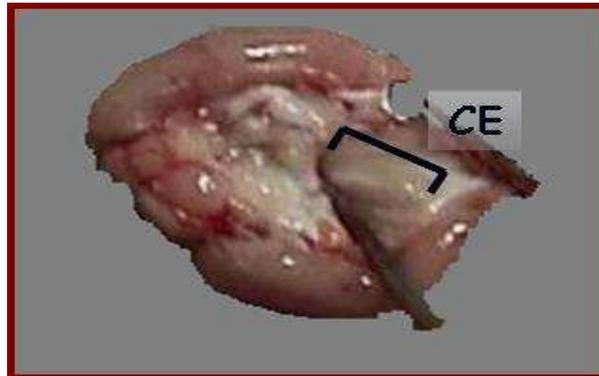


Figura 6. Representação da região anatômica no camundongo referente ao corpo estriado (CE)

Fonte: Macêdo (2003)

Terminada a dissecação, cada área (CE ou HIP) 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 6 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).

5.1.3.3 Determinação da Concentração de Monoaminas e seus Metabólitos em HPLC

➤ **Método**

Para a determinação da concentração de monoaminas foi utilizado o equipamento de cromatografia líquida de alta performance (High Performance Liquid Chromatograph/HPLC). Na cromatografia líquida clássica, um adsorvente (alumina ou sílica) é empacotado em uma coluna e é eluído por um líquido ideal (fase móvel). Uma mistura para ser separada é introduzida na coluna e é carregada através da mesma por um líquido eluente. 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 medem a condutância do eluente, ou a corrente associada com a oxidação ou redução dos solutos. Para ser capaz de detectar, no primeiro caso os solutos devem ser iônicos e no segundo caso, os solutos devem ter a característica de serem relativamente fáceis de se oxidarem ou reduzirem.

Detectores eletroquímicos que medem corrente associada com a redução ou oxidação de solutos são chamados detectores amperométricos ou coulométricos. 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 produzir um derivado ortoquinona com a liberação de dois elétrons.

➤ **Procedimento experimental**

Grupos de animais (n= 6-8) foram tratados intraperitonealmente com isopulegol (25 e 50 mg/kg) ou veículo (salina a 0,9% com 3% de Tween 80, i.p.). Trinta minutos após os

tratamentos, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e a área cerebral (CE) foi dissecada sob gelo para a confecção dos homogenatos a 10 %. O CE foi sonicado em ácido perclórico (HClO_4 , a 1%) por 30 s e centrifugados por 15 minutos em centrífuga refrigerada a 15.000 rpm. Uma alíquota de 20 μL do sobrenadante foi, então, injetada no equipamento de HPLC, para a análise química.

Para a análise das monoaminas, uma coluna CLC-ODS(M) com comprimento de 25 cm, calibre 4,6 mm e diâmetro da partícula de 3 μm , da Shimadzu, Japão, foi utilizada. A fase móvel utilizada era composta por tampão ácido cítrico 0,163 M, pH 3,0, contendo ácido octanosulfônico sódico, 0,69 M (SOS), como reagente formador do par iônico, acetonitrila 4 % v/v e tetrahidrofurano 1,7 % v/v. Noradrenalina (NA), dopamina (DA), ácido diidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA), serotonina (5-HT) e ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) foram eletronicamente detectados usando um detector amperométrico (Modelo L-ECD-6A da Shimadzu, Japan) pela oxidação em um eletrodo de carbono vítreo fixado em 0,85 V relativo a um eletrodo de referência de Ag-AgCl. (HALLMAN; JONSSON, 1984).

➤ Soluções reagentes

▪ Fase móvel

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

▪ Ácido perclórico 0.1 M

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

▪ Padrões

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

5.1.4 Resultados

5.1.4.1 Avaliação da Atividade Ansiolítica

➤ Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

Neste modelo experimental, a administração aguda do isopulegol nas doses de 25 e 50 mg/kg, por via intraperitoneal, aumentou de maneira significativa o número de entradas nos braços abertos (NEBA) (ISO-25: $9,61 \pm 0,50$; ISO-50: $10,15 \pm 0,49$; $p < 0,05$), com relação ao grupo controle ($4,50 \pm 0,70$) (**Figura 7 A**), assim como aumentou também o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) (ISO-25: $127,20 \pm 3,44$ s; ISO-50: $97,33 \pm 3,11$ s; $p < 0,05$), quando comparado ao controle ($64,00 \pm 6,32$ s) (**Figura 8 A**). Por outro lado, o número de entradas nos braços fechados (NEBF) foi significativamente diminuído com ambas as doses testadas (ISO-25: $6,00 \pm 0,55$; ISO-50: $6,23 \pm 0,66$; $p < 0,05$), com relação ao grupo controle ($9,40 \pm 0,60$) (**Figura 9 A**), assim como o tempo de permanência nos braços fechados (TPBF) (Controle: $219,1 \pm 5,02$ s; ISO-25: $156,90 \pm 2,85$ s; ISO-50: $182,30 \pm 5,91$ s; $p < 0,05$) (**Figura 10 A**).

A administração oral de isopulegol nas doses de 25 e 50 mg/kg também promoveu significativo aumento do NEBA (Controle: $4,87 \pm 0,44$; ISO-25: $7,50 \pm 0,96$; ISO-50: $7,14 \pm 0,91$; $p < 0,05$) (**Figura 7 B**), bem como do TPBA (Controle: $61,00 \pm 7,34$ s; ISO-25: $131,70$

$\pm 4,79$ s; ISO-50: $113,70 \pm 11,49$ s; $p < 0,05$) (**Figura 8 B**), quando comparados aos seus respectivos controles. O NEBF não foi alterado significativamente com a administração de ambas as doses de isopulegol e comparado ao controle (Controle: $8,87 \pm 0,76$; ISO-25: $7,85 \pm 0,63$; ISO-50: $7,87 \pm 0,54$) (**Figura 9 B**), enquanto ocorreu uma diminuição no TPBF nas duas doses de isopulegol testadas (Controle: $222,3 \pm 6,41$; ISO-25: $170,30 \pm 10,35$; ISO-50: $175,9 \pm 12,74$; $p < 0,05$) (**Figura 10 B**).

O diazepam (1 mg/kg, i.p.), utilizado como droga padrão, aumentou significativamente os parâmetros de NEBA (DZP-1: $11,44 \pm 0,60$; $p < 0,05$) e TPBA (DZP-1: $198,3 \text{ s} \pm 10,28$ s; $p < 0,05$), bem como diminuiu o NEBF (DZP-1: $5,44 \pm 0,84$; $p < 0,05$) e o TPBF (DZP-1: $79,60 \pm 12,67$ s; $p < 0,05$), quando comparados aos grupos controles (**Figuras 7 a 10 A e B**).

A investigação do envolvimento dos receptores benzodiazepínicos no efeito ansiolítico do isopulegol, por via intraperitoneal, mostrou que o flumazenil (2,5 mg/kg) reverteu as ações do isopulegol em ambas as doses e em todos os parâmetros observados: NEBA (FLU + ISO-25: $4,23 \pm 0,50$; FLU + ISO-50: $4,91 \pm 0,48$; $p < 0,05$) e TPBA (FLU + ISO-25: $65,92 \pm 3,57$ s; FLU + ISO-50: $58,15 \pm 4,67$ s; $p < 0,05$) (**Figura 11 A e B**), bem como NEBF (FLU + ISO-25: $9,07 \pm 0,73$; FLU + ISO-50: $8,07 \pm 0,83$; $p < 0,05$) e TPBF (FLU + ISO-25: $226,30 \pm 5,22$; FLU + ISO-50: $213,10 \pm 6,08$; $p < 0,05$) (**Figura 12 A e B**), quando comparados às doses de 25 e 50 mg/kg de isopulegol administrado intraperitonealmente. De maneira semelhante, o flumazenil (2,5 mg/kg) reverteu também as ações do diazepam: NEBA (FLU + DZP-1: $5,90 \pm 0,69$; $p < 0,05$) e TPBA (FLU + DZP-1: $79,60 \pm 6,51$ s; $p < 0,05$) (**Figura 11 A e B**), assim como NEBF (FLU + DZP-1: $8,66 \pm 0,83$; $p < 0,05$) e TPBF (FLU + DZP-1: $192,4 \pm 11,23$ s; $p < 0,05$) (**Figura 12 A e B**), em relação ao grupo tratado apenas com DZP. Por outro lado, o grupo tratado com flumazenil e veículo (FLU-2,5 mg/kg + veículo) não demonstrou alteração em nenhum dos parâmetros observados (NEBA: $4,88 \pm 0,88$; TPBA: $63,50 \pm 4,42$ s; NEBF: $8,44 \pm 0,76$; TPBF: $215,60 \pm 5,588$ s), em relação ao controle tratado intraperitonealmente (**Figura 11 e 12 A e B**).

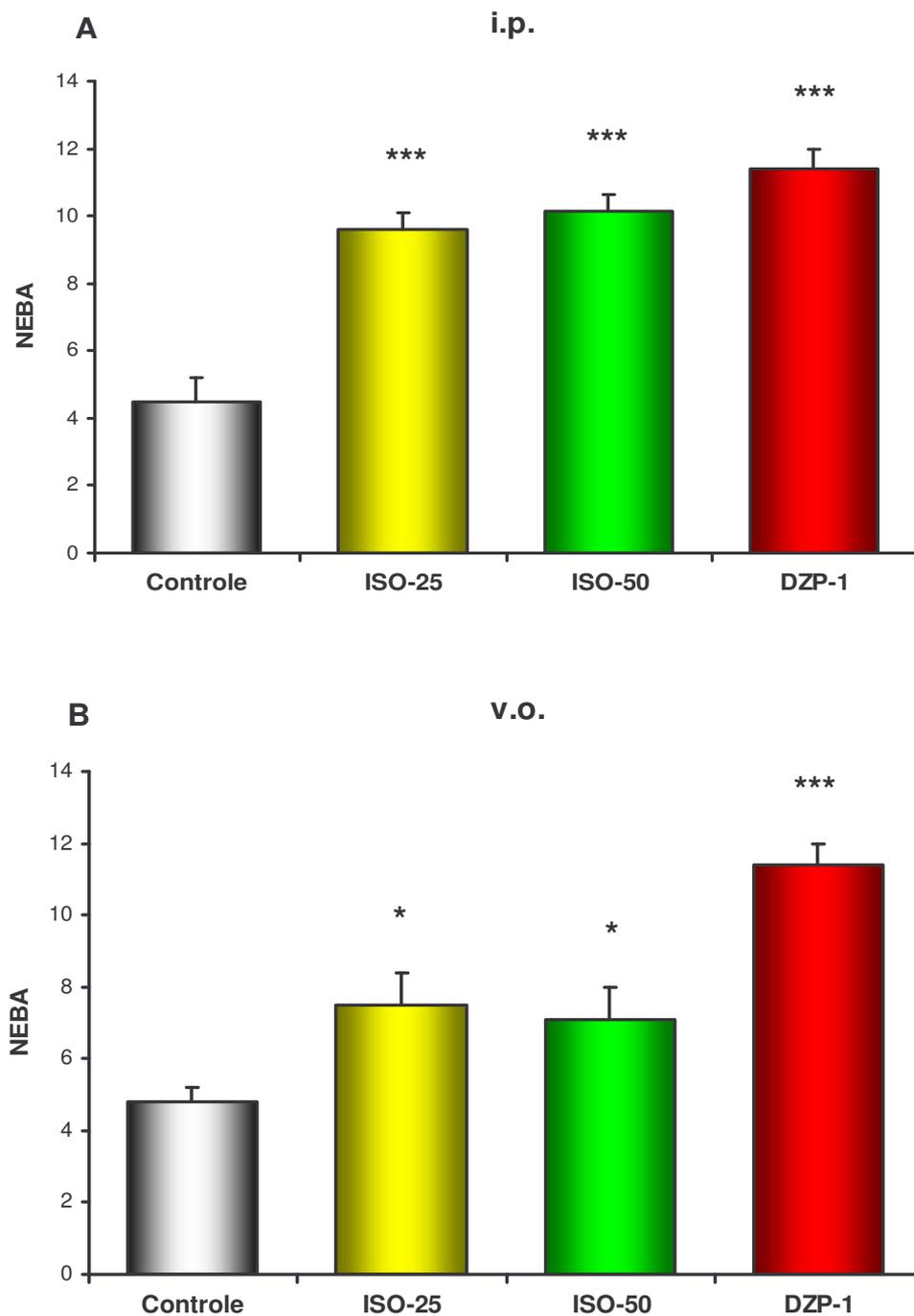


Figura 7. Efeito do isopulegol, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre o número de entradas nos braços abertos (NEBA) no teste do labirinto em cruz elevado.

Nota: Isopulegol (ISO 25 e 50 mg/kg, i.p. ou v.o.), diazepam (DZP, 1 mg/kg, i.p.) ou veículo/controle (salina a 0,9% em 3% de Tween 80, i.p. ou v.o.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores representam a média ± E.P.M. do número de entradas nos braços abertos (NEBA) durante 5 min (n = 8-12 camundongos). Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs controle.

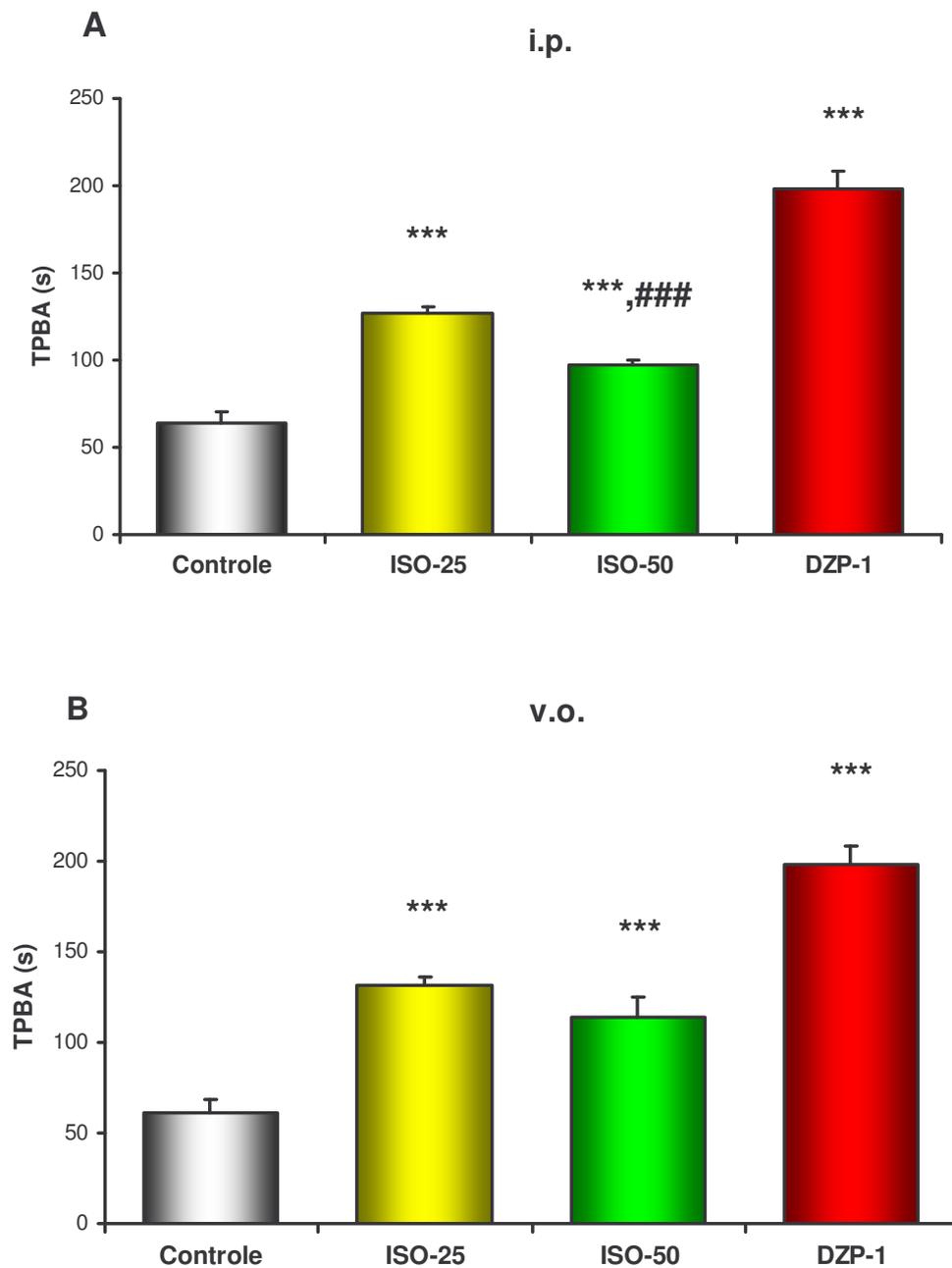


Figura 8. Efeito do isopulegol, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) no teste do labirinto em cruz elevado.

Nota: Isopulegol (ISO 25 e 50 mg/kg, i.p. ou v.o.), diazepam (DZP, 1 mg/kg, i.p.) ou veículo/controle (salina a 0,9% em 3% de Tween 80, i.p. ou v.o.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores representam a média \pm E.P.M. do tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) durante 5 min ($n = 8-12$ camundongos). Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. *** $p < 0,001$ vs controle; ### $p < 0,001$ vs ISO 25.

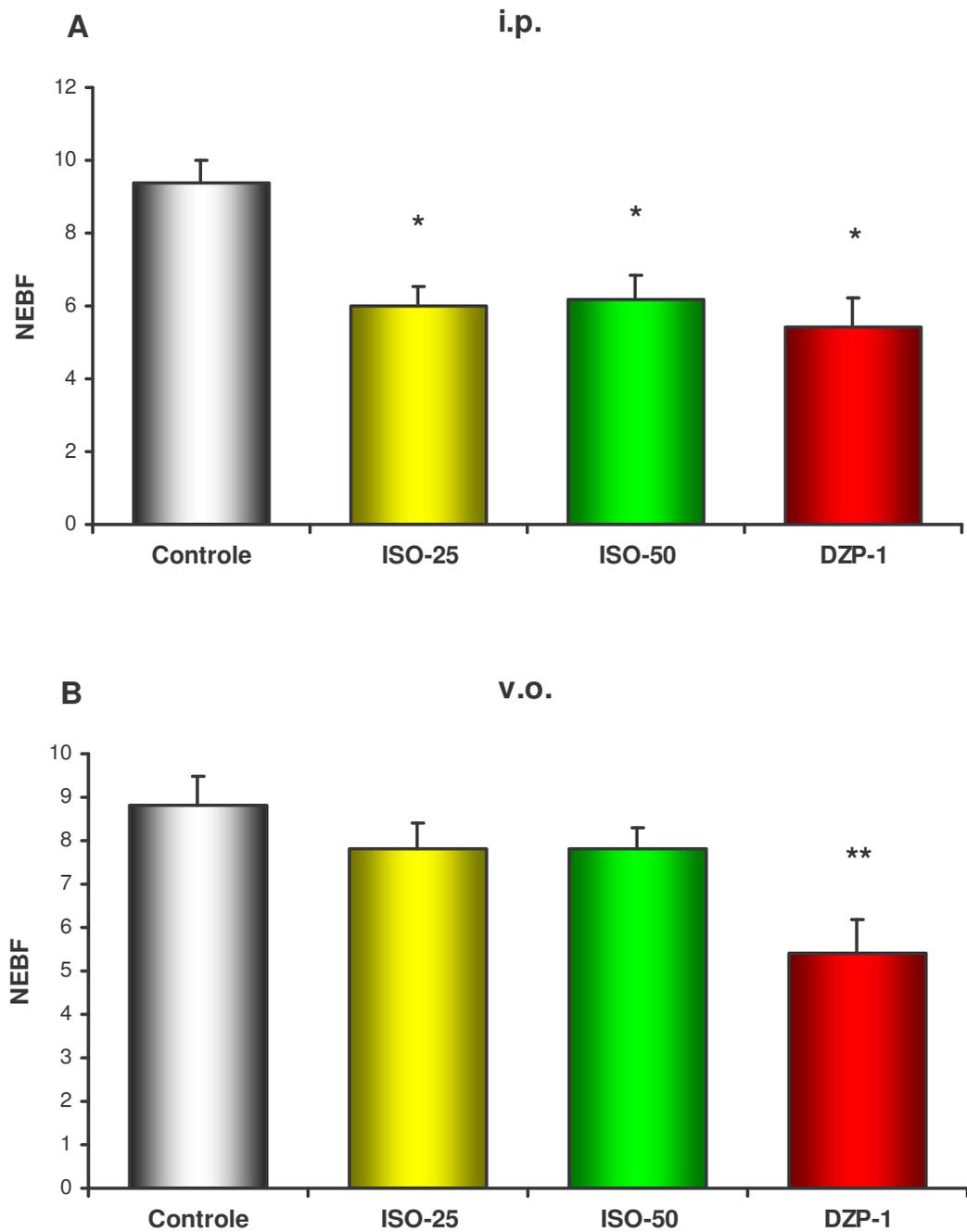


Figura 9. Efeito do isopulegol, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre o número de entradas nos braços fechados (NEBF) no teste do labirinto em cruz elevado.

Nota: Isopulegol (ISO 25 e 50 mg/kg, i.p. ou v.o.), diazepam (DZP, 1 mg/kg, i.p.) ou veículo/controle (salina a 0,9% em 3% de Tween 80, i.p. ou v.o.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores representam a média ± E.P.M. do número de entradas nos braços fechados (NEBF) durante 5 min (n = 8-12 camundongos). Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs controle.

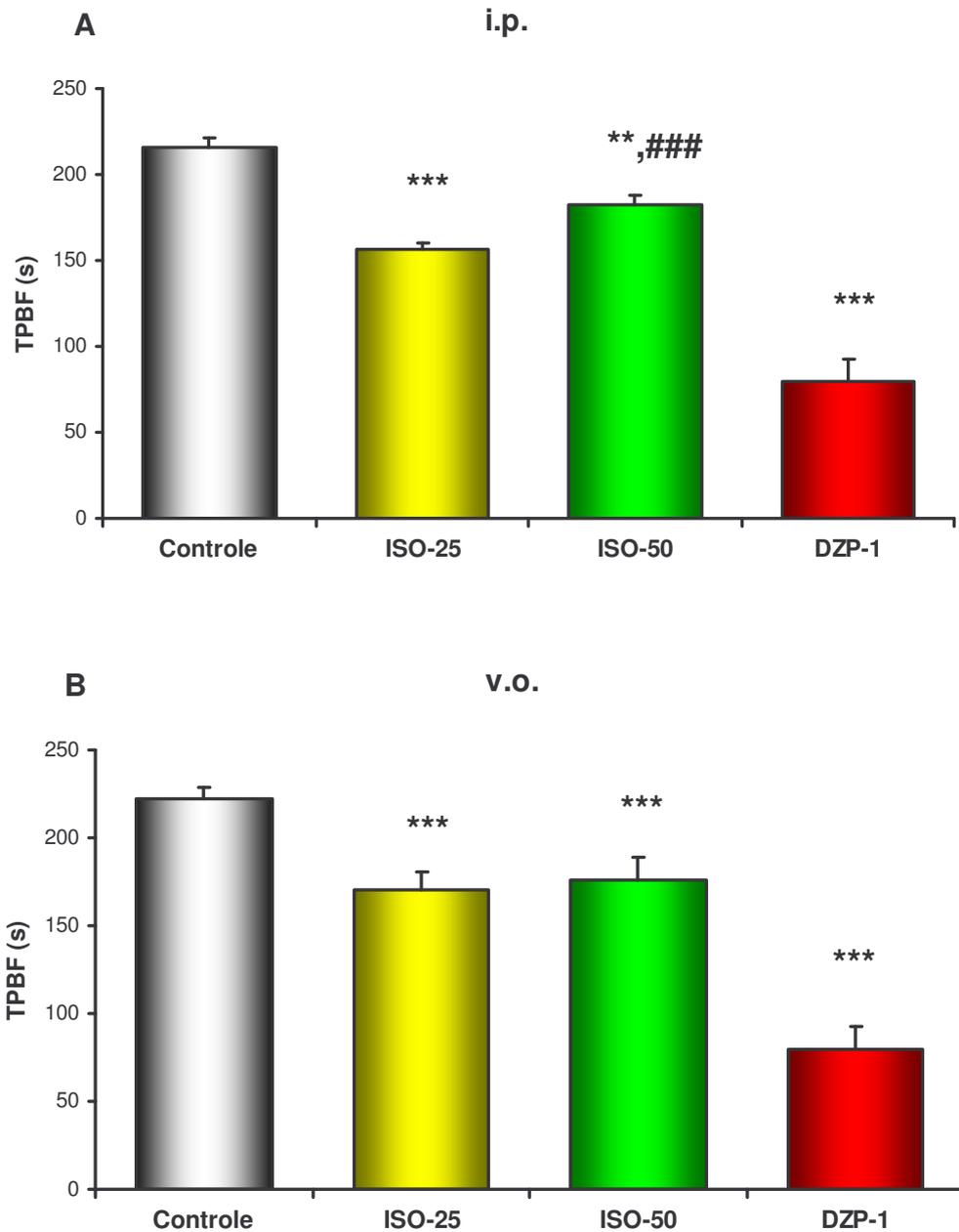


Figura 10. Efeito do isopulegol, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre o tempo de permanência nos braços fechados (TPBF) no teste do labirinto em cruz elevado.

Nota: Isopulegol (ISO 25 e 50 mg/kg, i.p. ou v.o.), diazepam (DZP, 1 mg/kg, i.p.) ou veículo/controle (salina a 0,9% em 3 % de Tween 80, i.p. ou v.o.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores representam a média \pm E.P.M. do tempo de permanência nos braços fechados (TPBF) durante 5 min (n = 8-12 camundongos). Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs controle; ### $p < 0,001$ vs ISO 25.

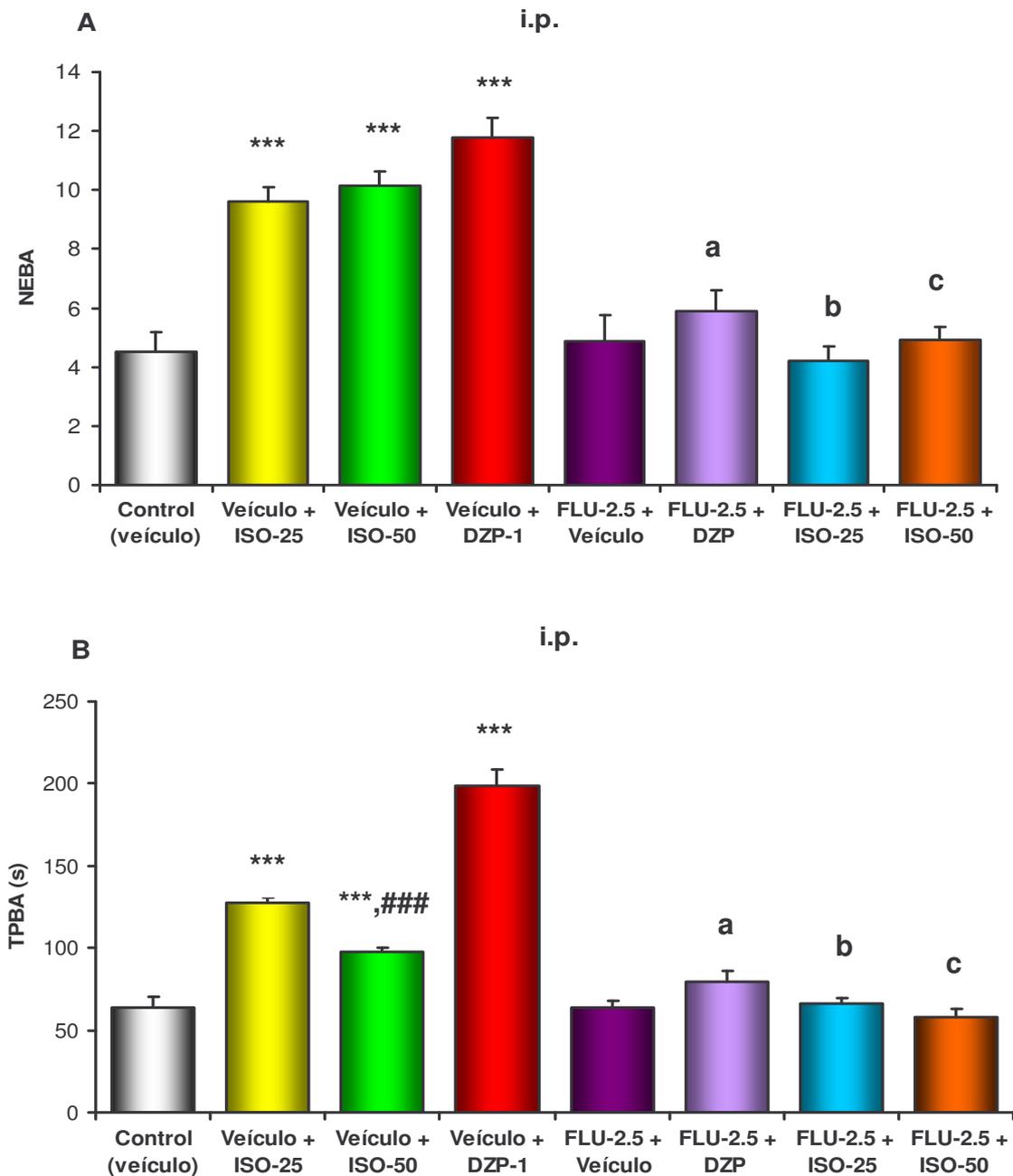


Figura 11. Efeito do isopulegol e diazepam, via intraperitoneal, associados ou não com flumazenil, sobre o número de entradas nos braços abertos (NEBA) (A) e o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) (B) no teste do labirinto em cruz elevado.

Nota: Isopulegol (ISO 25 e 50 mg/kg, i.p. ou v.o.), diazepam (DZP, 1 mg/kg, i.p.) ou veículo/controle (salina a 0,9% em 3 % de Tween 80, i.p. ou v.o.), quando sozinhos, foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Quando associados, o flumazenil (FLU, 2,5 mg/kg, i.p.), foi administrado 15 min antes de cada tratamento. Os valores representam a média ± E.P.M. (n = 8-12 camundongos). Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. *** $p < 0,001$ vs controle; ### $p < 0,001$ vs ISO 25; a $p < 0,001$ vs DZP-1; b $p < 0,001$ vs ISO-25; c $p < 0,001$ vs ISO-50.

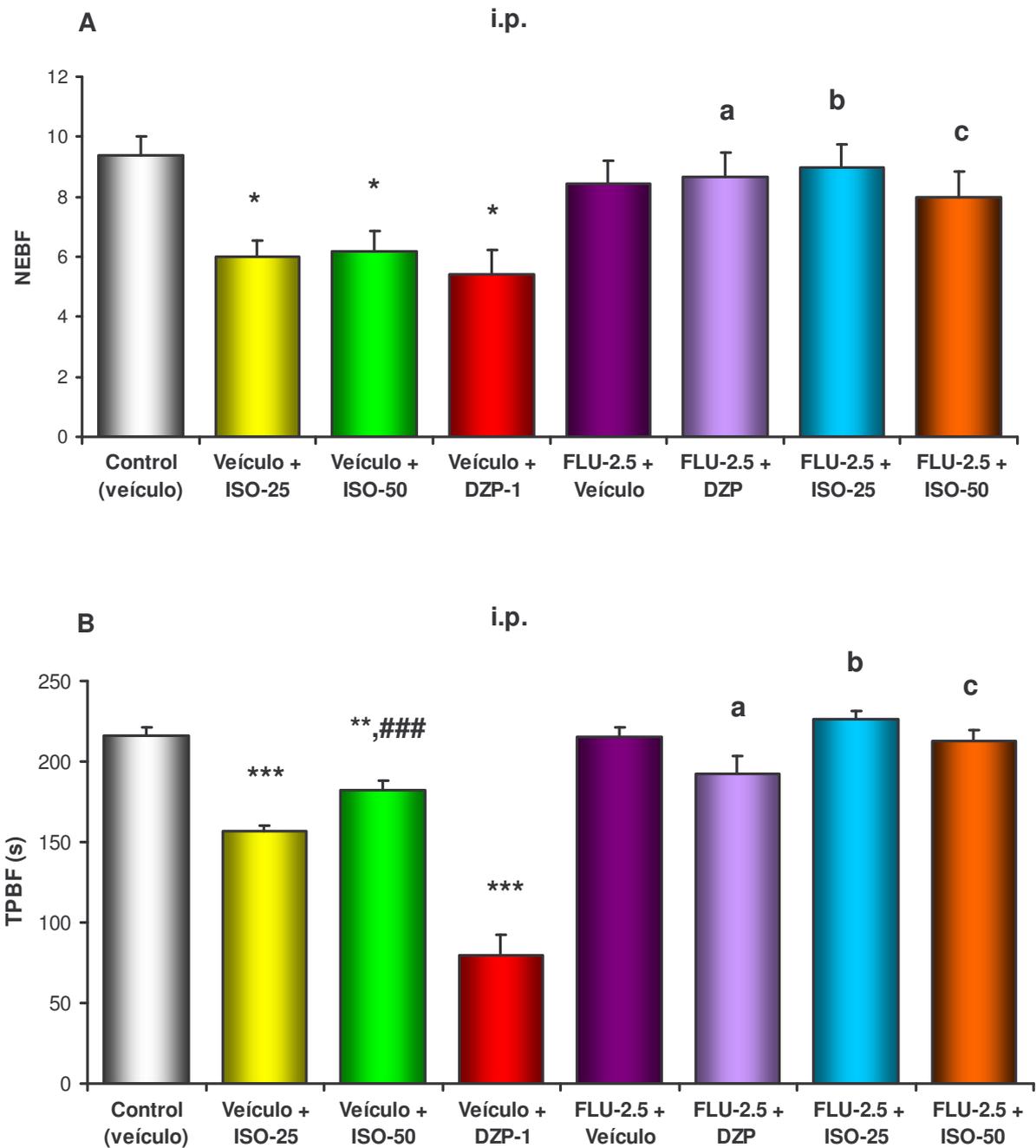


Figura 12. Efeito do isopulegol e diazepam, via intraperitoneal, associados ou não com flumazenil, sobre o número de entradas nos braços fechados (NEBF) (A) e o tempo de permanência nos braços fechados (TPBF) (B) no teste do labirinto em cruz elevado. Nota: Isopulegol (ISO 25 e 50 mg/kg, i.p.), diazepam (DZP, 1 mg/kg, i.p.) ou veículo/controle (salina a 0,9% em 3 % de Tween 80, i.p.), quando sozinhos, foram administrados 30 min antes do experimento. Quando associados, o flumazenil (FLU, 2,5 mg/kg, i.p.), foi administrado 15 min antes de cada tratamento. Os valores representam a média ± E.P.M. (n = 8-12 camundongos). Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs controle; ### $p < 0,001$ vs ISO 25; a $p < 0,05$ vs DZP-1; b $p < 0,05$ vs ISO-25; c $p < 0,05$ vs ISO-50.

Tabela 1 – Efeito da administração intraperitoneal de isopulegol e diazepam associados ou não com flumazenil no teste do labirinto em cruz elevado com camundongos.

Grupos	NEBA	TPBA (s)	NEBF	TPBF (s)
Controle	4,50 ± 0,70	64,00 ± 6,32	9,40 ± 0,60	219,1 ± 5,02
ISO-25	9,61 ± 0,50***	127,20 ± 3,44***	6,00 ± 0,55*	156,90 ± 2,85***
ISO-50	10,15 ± 0,49***	97,33 ± 3,11***,###	6,23 ± 0,66*	182,30 ± 5,91**,###
DZP-1	11,44 ± 0,60***	198,3 s ± 10,28***	5,44 ± 0,84*	79,60 ± 12,67***
Flu-2,5	4,88 ± 0,88	63,50 ± 4,42	8,44 ± 0,76	215,60 ± 5,58
Flu-2,5 + DZP-1	5,90 ± 0,69 ^a	79,60 ± 6,51 ^a	8,66 ± 0,83 ^a	192,4 ± 11,23 ^a
Flu 2,5 + ISO-25	4,23 ± 0,50 ^b	65,92 ± 3,57 ^b	9,07 ± 0,73 ^b	226,30 ± 5,22 ^b
Flu 2,5 + ISO-50	4,91 ± 0,48 ^c	58,15 ± 4,67 ^c	8,07 ± 0,83 ^c	213,10 ± 6,08 ^c

Nota: Isopulegol (ISO 25 e 50 mg/kg, i.p.), diazepam (DZP, 1 mg/kg, i.p.) ou veículo/controle (salina a 0,9% em 3 % de Tween 80, i.p.), quando sozinhos, foram administrados 30 min antes do experimento. Quando associados, o flumazenil (FLU, 2,5 mg/kg, i.p.), foi administrado 15 min antes de cada tratamento. Os parâmetros avaliados foram o número de entradas nos braços abertos (NEBA) e o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA), bem como o número de entradas nos braços fechados (NEBF) e o tempo de permanência nos braços fechados (TPBF). Os valores representam a média ± E.P.M. (n = 8-12 camundongos). Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs controle; ### $p < 0,001$ vs ISO 25; a $p < 0,05$ vs DZP-1; b $p < 0,05$ vs ISO-25; c $p < 0,05$ vs ISO-50.

➤ Teste do Campo Aberto

Os parâmetros analisados neste teste foram a atividade locomotora espontânea (ALE), *rearing* e *grooming* e os resultados foram expressos como o número de travessias, de *rearing* e de *grooming*. Após o tratamento intraperitoneal com isopulegol, não foi observada nenhuma alteração significativa na atividade locomotora dos animais [ALE (i.p.): ISO-25: $56,73 \pm 5,48$; ISO-50: $59,36 \pm 5,32$], com relação ao controle ($55,73 \pm 3,75$) (**Figura 13 A**). Similarmente, o tratamento oral não induziu alteração significativa neste parâmetro [ALE (v.o.): ISO-25: $66,90 \pm 3,66$; ISO-50: $57,50 \pm 2,11$], quando comparado ao controle oral ($59,89 \pm 2,80$) (**Figura 13 B**). O diazepam 2 mg/kg, i.p., usado como droga padrão, reduziu significativamente a ALE, com relação aos grupos controles i.p. e v.o. (DZP-2, i.p.: $34,15 \pm 2,42$) (**Figura 13 A e B**).

O comportamento de *rearing*, nas duas vias e doses administradas, não foi significativamente alterado, quando comparado aos seus respectivos controles [(i.p.) Controle: $8,66 \pm 1,37$; ISO-25: $7,28 \pm 0,94$; ISO-50: $7,07 \pm 1,16$] (**Figura 14 A**) e [(v.o.) Controle: $11,56 \pm 0,50$; ISO-25: $13,33 \pm 0,66$; ISO-50: $13,63 \pm 1,05$] (**Figura 14 B**). Enquanto o diazepam 2mg/kg, i.p., reduziu este parâmetro comportamental em relação aos grupos controles i.p. e v.o. (DZP-2, i.p.: $3,0 \pm 0,58$; $p < 0,05$) (**Figura 14 A e B**).

Conforme a **Figura 15 (A e B)**, o comportamento de *grooming* foi reduzido de maneira significativa em ambas as doses e vias administradas [(i.p.) Controle: $3,91 \pm 0,31$; ISO-25: $2,69 \pm 0,36$; ISO-50: $2,53 \pm 0,36$; $p < 0,05$] e [(v.o.) Controle: $4,11 \pm 0,26$; ISO-25: $3,00 \pm 0,28$; ISO-50: $2,66 \pm 0,28$; $p < 0,05$]. Semelhante redução deste parâmetro também foi observada após o tratamento com diazepam em relação aos grupos controles i.p. e v.o. (DZP-2, i.p.: $1,64 \pm 0,3$; $p < 0,05$).

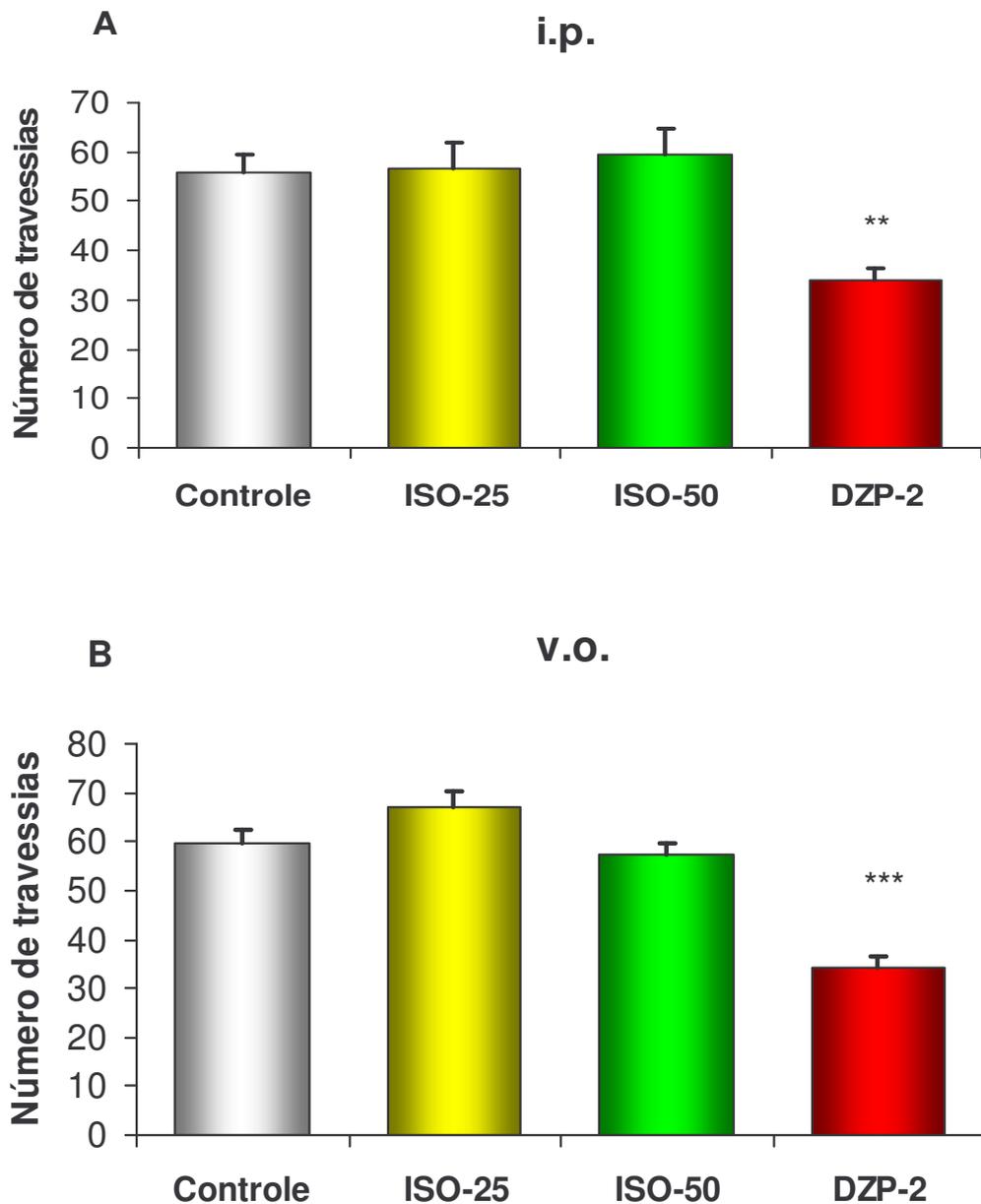


Figura 13. Efeito do isopulegol, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre a atividade locomotora espontânea no teste do campo aberto

Nota: Isopulegol (ISO 25 e 50 mg/kg, i.p. ou v.o.), diazepam (DZP, 2 mg/kg, i.p.) ou veículo/controle (salina a 0,9% em 3% de Tween 80, i.p. ou v.o.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores representam a média \pm E.P.M. do número de travessias durante 5 min ($n = 10-15$ camundongos). Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle.

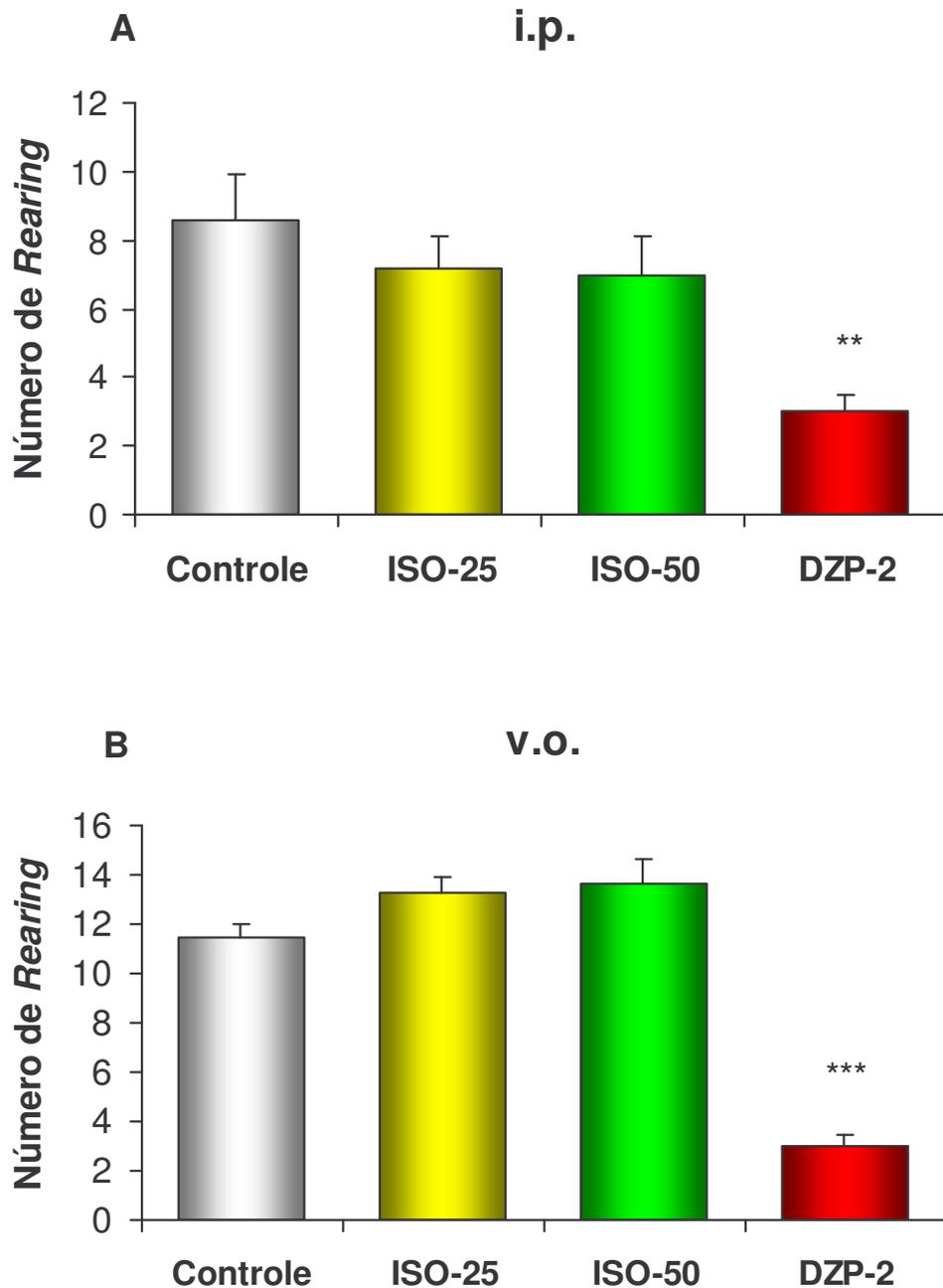


Figura 14. Efeito do isopulegol e diazepam via intraperitoneal (A) e oral (B) sobre o número de *rearing* no teste do campo aberto.

Nota: Isopulegol (ISO 25 e 50 mg/kg, i.p. ou v.o.), diazepam (DZP, 2 mg/kg, i.p.) ou veículo/controle (salina 0,9% em 3 % de Tween 80, i.p. ou v.o.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores representam a média \pm E.P.M. do número de *rearing* durante 5 min ($n = 10-15$ camundongos). Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle.

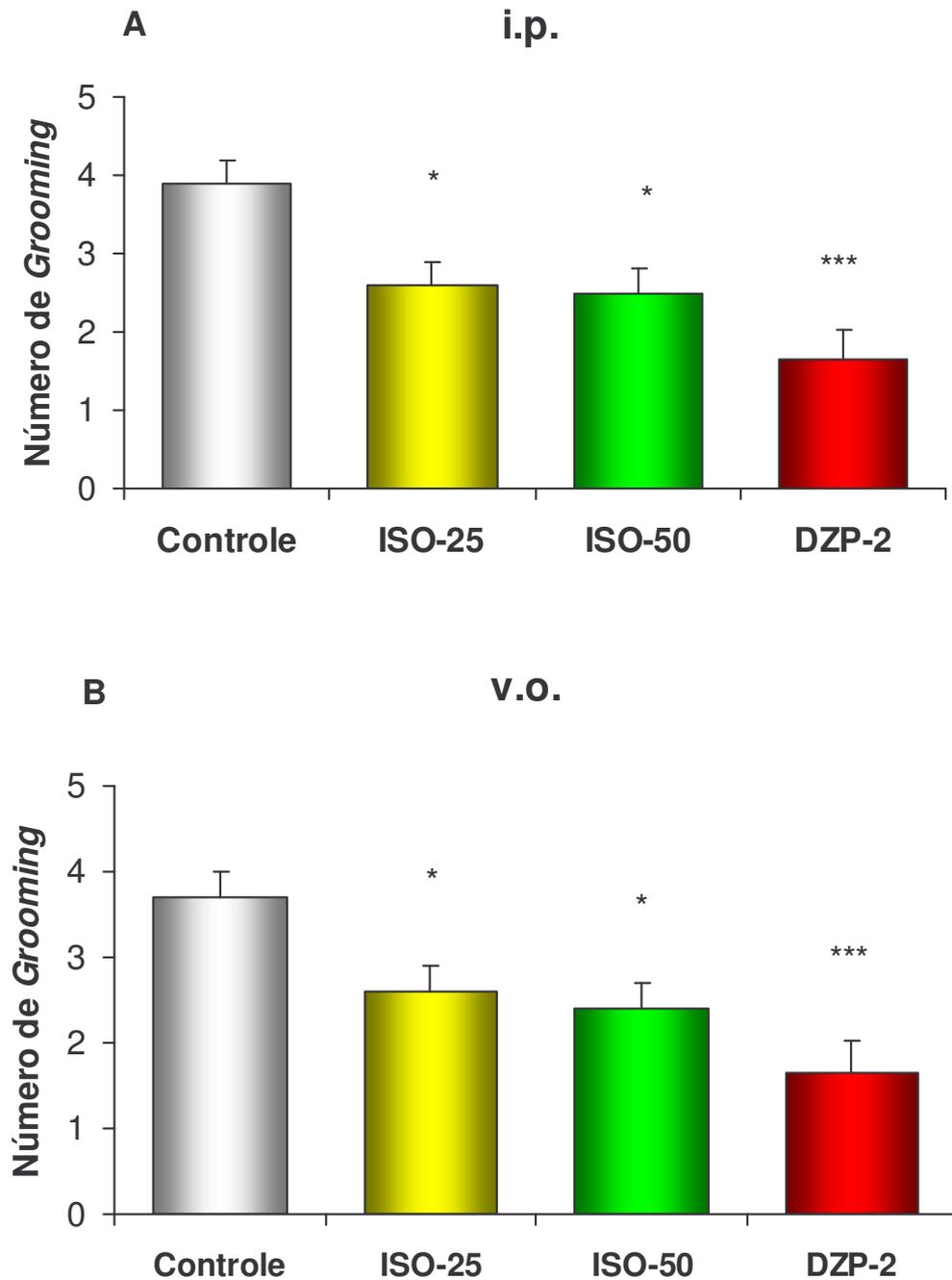


Figura 15. Efeito do isopulegol, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre o número de grooming no teste do campo aberto.

Nota: Isopulegol (ISO 25 e 50 mg/kg, i.p. ou v.o.), diazepam (DZP, 2 mg/kg, i.p.) ou veículo/controle (salina a 0,9% em 3 % de Tween 80, i.p. ou v.o.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores representam a média \pm E.P.M. do número de grooming durante 5 min (n = 10-15 camundongos). Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs controle.

➤ **Teste da Placa Perfurada (*Hole Board*)**

Após a administração aguda de isopulegol nas doses de 25 e 50 mg/kg, foi observado um significativo aumento do número de vezes que o animal colocou a cabeça no orifício da placa perfurada (*head dips*), tanto por via intraperitoneal (Controle: $30,89 \pm 3,20$; ISO-25: $45,50 \pm 2,44$; ISO-50: $44,25 \pm 3,42$; $p < 0,05$) (**Figuras 16 A**), como por via oral (Controle: $18,75 \pm 1,01$; ISO-25: $32,50 \pm 1,35$; ISO-50: $30,38 \pm 1,58$) (**Figuras 16 B**), quando comparado aos respectivos grupos controle.

O efeito do diazepam (DZP) 1 mg/kg, i.p., usado como droga padrão no teste da placa perfurada, é também mostrado na **Figura 16 A e B**. Comparado com os grupos controles (i.p. e v.o.), os animais tratados com diazepam manifestaram um aumento significativo do número de *head dips* ($40,63 \pm 1,38$; $p < 0,05$).

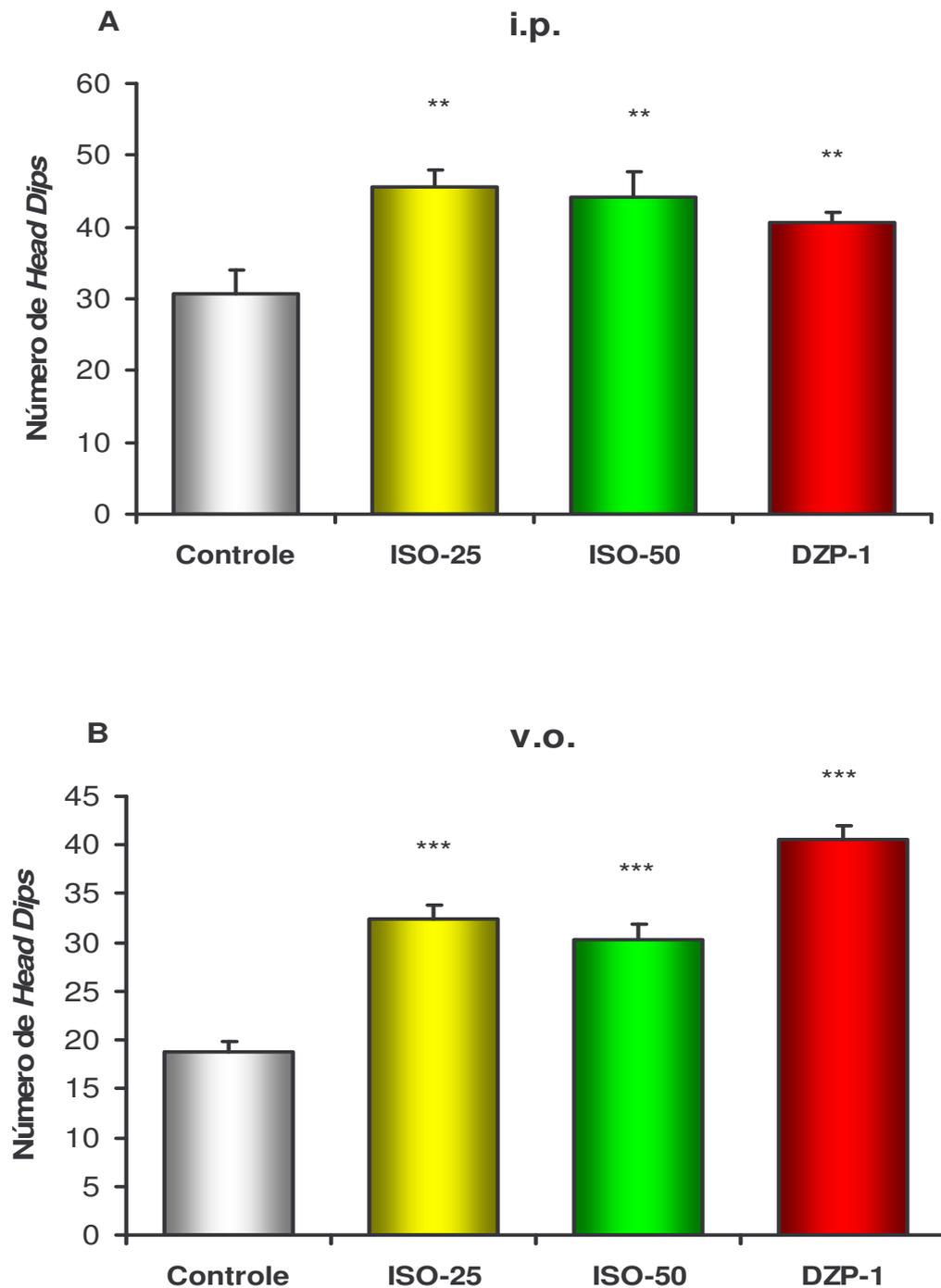


Figura 16. Efeito do isopulegol, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre o número de *head dips* no teste da placa perfurada (*hole board*).

Nota: Isopulegol (ISO 25 e 50 mg/kg, i.p. ou v.o.), diazepam (DZP, 1 mg/kg, i.p.) ou veículo/controle (salina a 0,9% em 3% de Tween 80, i.p. ou v.o.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores representam a média ± E.P.M. do número de *head dips* durante 5 min (n = 8-10 camundongos). Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs controle.

5.1.4.2 Avaliação da Atividade Depressora

➤ **Teste do Nado Forçado**

Neste modelo experimental, os animais tratados intraperitonealmente com isopulegol nas doses de 25 e 50 mg/kg apresentaram aumento significativo no tempo de imobilidade (s) (ISO-25: $130,20 \pm 7,27$ s; ISO-50: $123,80 \pm 4,42$ s; $p < 0,05$) em relação ao grupo controle ($83,67 \pm 5,78$ s) (**Figura 17 A**). O tratamento oral dos animais com ambas as doses de isopulegol promoveu semelhante alteração neste parâmetro (ISO-25: $118,9 \pm 7,06$ s; ISO-50: $117,3 \pm 8,21$ s; $p < 0,05$), quando comparado ao respectivo controle ($84,63 \pm 2,42$ s) (**Figura 17 B**).

O cloridrato de imipramina 10 mg/kg, i.p., foi usado como droga padrão e reduziu o tempo de imobilidade dos animais (IMP-10: $21,00 \pm 2,61$ s; $p < 0,05$), em relação aos grupos controles (**Figura 17 A e B**).

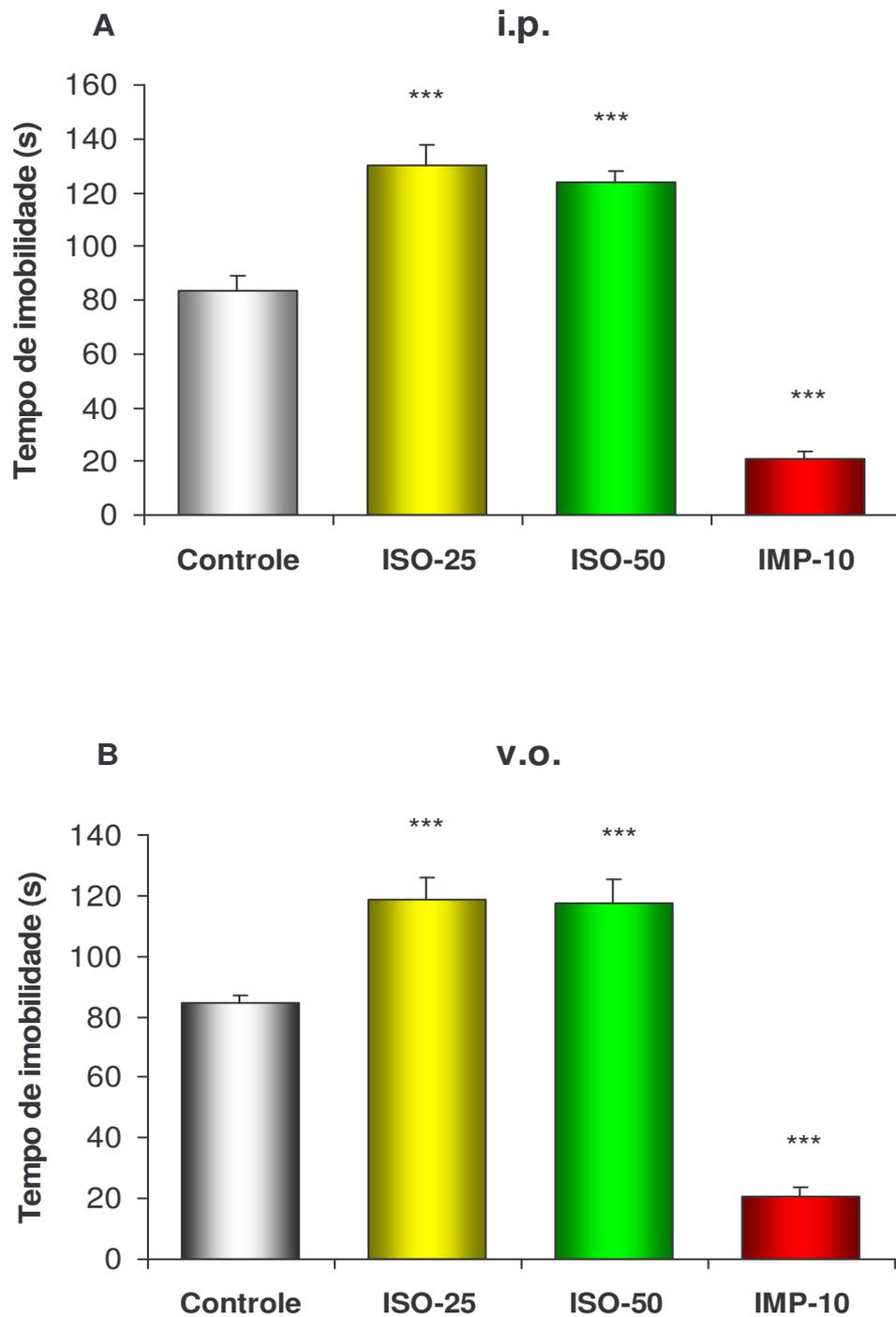


Figura 17. Efeito do isopulegol, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre o tempo de imobilidade, em segundos, no teste do nado forçado.

Nota: Isopulegol (ISO 25 e 50 mg/kg, i.p. ou v.o.), imipramina (IMP, 10 mg/kg, i.p.) ou veículo/controle (salina a 0,9% em 3 % de Tween 80, i.p. ou v.o.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores representam a média \pm E.P.M. do tempo de imobilidade (s) dos animais durante 5 min ($n = 8-12$ camundongos). Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. *** $p < 0,001$ vs controle.

➤ **Teste da Suspensão da Cauda**

O tratamento intraperitoneal com isopulegol nas doses de 25 e 50 mg/kg também promoveu um aumento significativo no tempo de imobilidade (s) dos animais no teste da suspensão da cauda (ISO-25: $159,30 \pm 13,97$ s; ISO-50: $119,70 \pm 17,15$ s; $p < 0,05$) em relação ao grupo controle ($86,20 \pm 12,44$ s) (**Figura 18 A**). O tratamento oral dos animais com ambas as doses de isopulegol promoveu semelhante alteração neste parâmetro (ISO-25: $131,90 \pm 5,99$ s; ISO-50: $141,3 \pm 6,60$ s; $p < 0,05$), quando comparado ao respectivo controle ($97,75 \pm 5,64$) (**Figura 18 B**).

A administração do cloridrato de imipramina 30 mg/kg, i.p., usado como droga padrão, reduziu o tempo de imobilidade dos animais (IMP-30: $25,20 \pm 3,75$ s; $p < 0,05$), em relação aos grupos controles i.p. e v.o. (**Figura 18 A e B**).

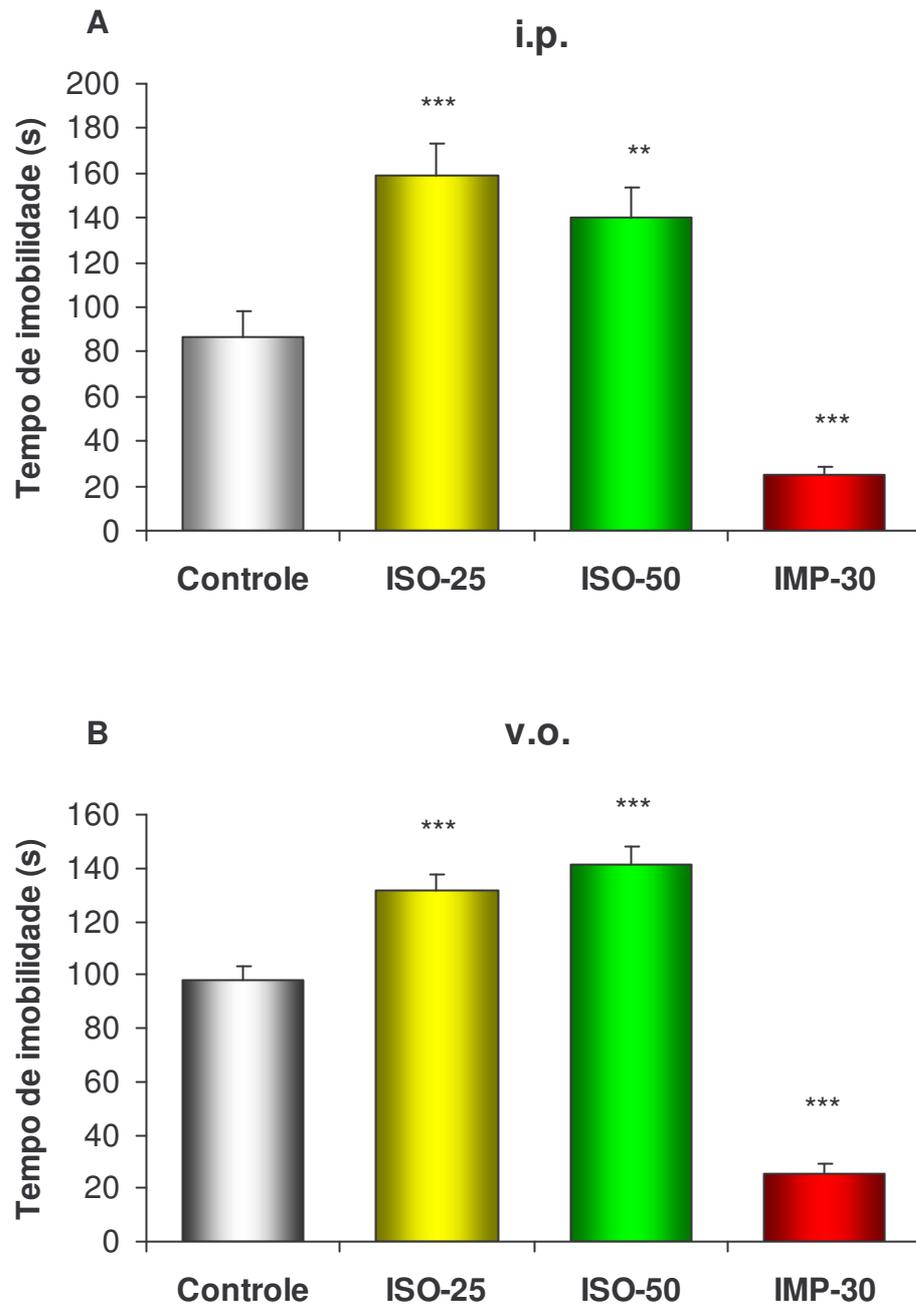


Figura 18. Efeito do isopulegol, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre o tempo de imobilidade, em segundos, no teste da suspensão da cauda.

Nota: Isopulegol (ISO 25 e 50 mg/kg, i.p. ou v.o.), imipramina (IMP, 30 mg/kg; i.p.) ou veículo/controle (salina a 0,9% em 3 % de Tween 80, i.p. ou v.o.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores representam a média \pm E.P.M. do tempo de imobilidade (s) dos animais durante 5 min ($n = 8-10$ camundongos). Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle.

➤ **Rota rod**

Neste experimento, nenhuma alteração significativa foi observada no tempo de permanência dos animais (s) na barra giratória com a administração intraperitoneal de isopulegol nas doses de 25 e 50 mg/kg, nas três rotações analisadas (5 rpm - Controle: $118,50 \pm 0,65$; ISO-25: $117,80 \pm 0,72$ s; ISO-50: $116,00 \pm 2,39$ s), (15 rpm - Controle: $115,60 \pm 1,051$; ISO-25: $116,30 \pm 1,08$ s; ISO-50: $113,50 \pm 2,34$ s) e (40 rpm - Controle: $93,38 \pm 2,28$; ISO-25: $92,13 \pm 3,42$ s; ISO-50: $90,13 \pm 3,47$ s) (**Figura 19 A**).

De maneira semelhante, nenhuma alteração significativa foi observada nestes parâmetros com a administração de isopulegol por via oral, nas mesmas doses e rotações testadas (5 rpm - Controle: $118,50 \pm 0,98$; ISO-25: $117,30 \pm 1,28$ s; ISO-50: $113,40 \pm 2,06$ s), (15 rpm - Controle: $108,90 \pm 3,00$; ISO-25: $114,00 \pm 1,40$ s; ISO-50: $115,90 \pm 1,55$ s) e (40 rpm - Controle: $101,10 \pm 3,77$; ISO-25: $101,90 \pm 4,13$ s; ISO-50: $105,30 \pm 4,99$ s) (**Figura 19 B**).

O diazepam 2 mg/kg, i.p., utilizado como padrão positivo, diminuiu significativamente o tempo de permanência na barra nas três rotações observadas, quando comparado aos grupos controles (5rpm: $94,13 \pm 4,69$; 15rpm: $93,00 \pm 4,16$; 40rpm: $71,75 \pm 4,41$; $p < 0,05$) (**Figura 19 A e B**).

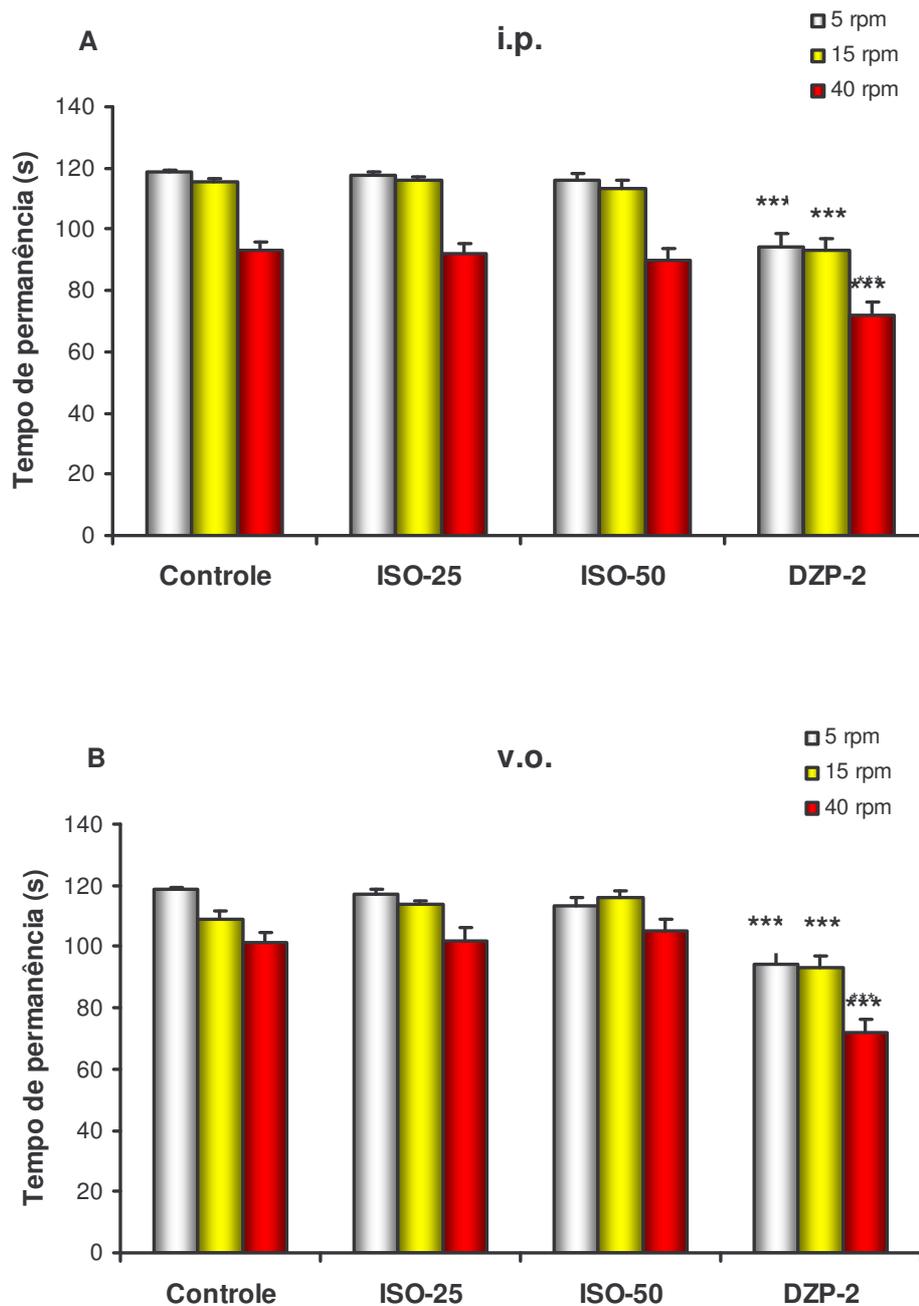


Figura 19. Efeito do isopulegol, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre o tempo de permanência na barra, em segundos, no teste do *rota rod*.

Nota: Isopulegol (ISO 25 e 50 mg/kg, i.p. ou v.o.), diazepam (DZP, 2 mg/kg; i.p.) ou veículo/controle (salina a 0,9% em 3% de Tween 80, i.p. ou v.o.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores representam a média \pm E.P.M. do tempo de permanência (s) dos animais na barra durante 2 min ($n = 8$ camundongos). RPM = rotação por minuto. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. *** $p < 0,001$ vs controle.

➤ **Teste do Tempo de Sono Induzido por Pentobarbital**

Neste experimento foram observados dois parâmetros: o tempo de latência de sono (s), que corresponde ao tempo que o animal leva para adormecer, e a duração total do sono (s). Após a administração intraperitoneal de isopulegol 25 e 50 mg/kg, observou-se uma redução significativa no tempo de latência do sono dos animais, quando comparado ao grupo controle (Controle: $292,60 \pm 30,48$ s; ISO-25: $197,80 \pm 14,86$ s; ISO-50: $209,70 \pm 15,52$ s; $p < 0,05$) (**Figura 20 A**), bem como um aumento significativo na duração do sono nas duas doses testadas, em relação ao controle (Controle: $1.723,00 \pm 363,60$ s; ISO-25: $3.329 \pm 177,20$ s; ISO-50: $2992,00 \pm 155,60$ s; $p < 0,05$) (**Figura 21 A**).

De maneira semelhante, observou-se uma redução significativa no tempo de latência de sono após administração oral do isopulegol nas mesmas doses usadas (Controle: $296,30 \pm 27,53$ s; ISO-25: $183 \pm 9,50$ s; ISO-50: $174 \pm 12,46$ s; $p < 0,05$) (**Figura 20 B**), bem como na duração do sono em ambas as doses (Controle: $2.327 \pm 296,7$ s; ISO-25: $3.256 \pm 199,6$ s; ISO-50: $3.839 \pm 251,9$ s) (**Figura 21 B**).

Como esperado, o diazepam 1 mg/kg, i.p., usado como padrão positivo, reduziu o tempo de latência do sono ($177,70 \pm 4,04$ s; $p < 0,05$) e aumentou a duração do sono ($4334,00 \pm 155,6$ s; $p < 0,05$) em relação aos grupos controle i.p. e v.o. (**Figuras 20 e 21 A e B**).

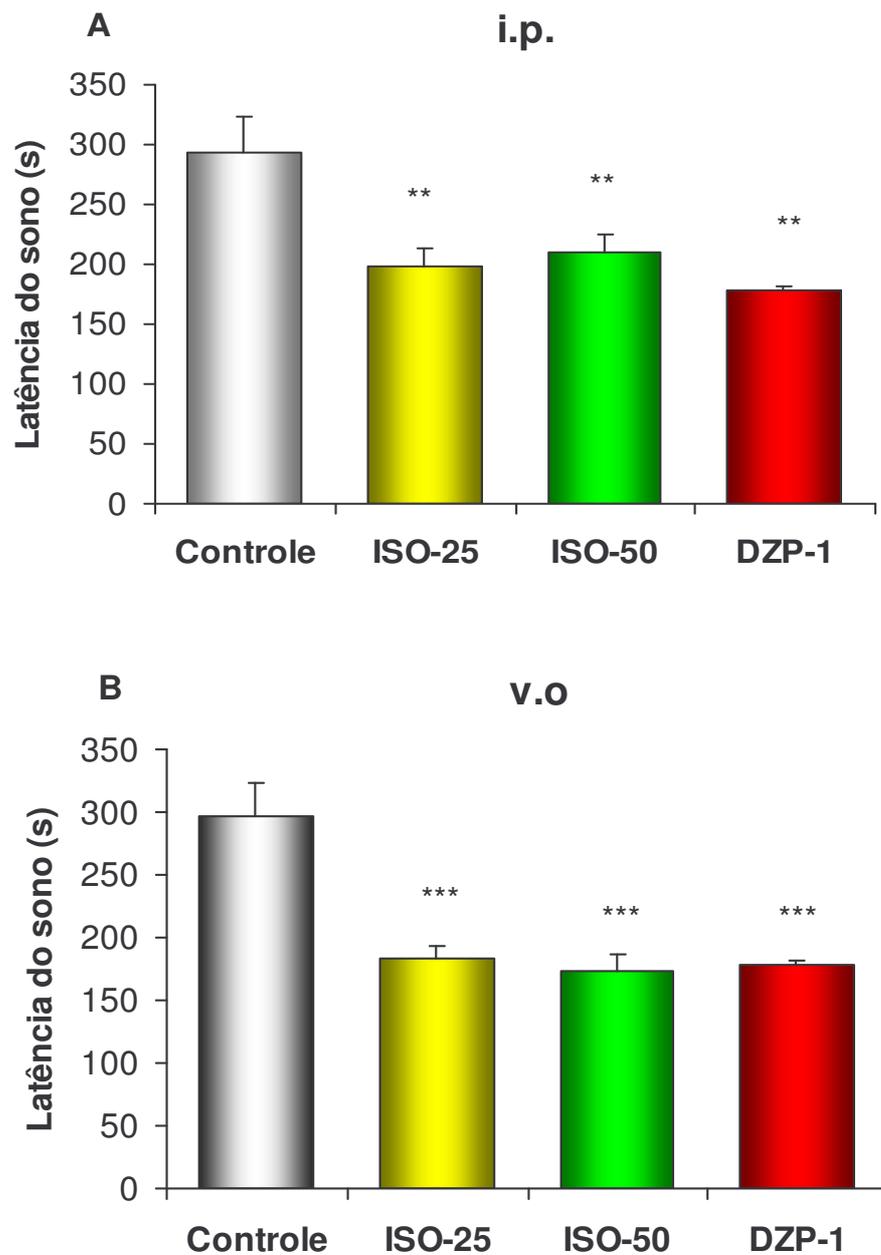


Figura 20. Efeito do isopulegol, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre a latência do sono, em segundos, no tempo de sono induzido por pentobarbital.

Nota: Isopulegol (ISO 25 e 50 mg/kg, i.p. ou v.o.), diazepam (DZP, 1 mg/kg; i.p.) ou veículo/controle (salina a 0,9% em 3 % de Tween 80, i.p. ou v.o.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores representam a média \pm E.P.M. da latência do sono (s) (n = 8-10 camundongos). Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs controle.

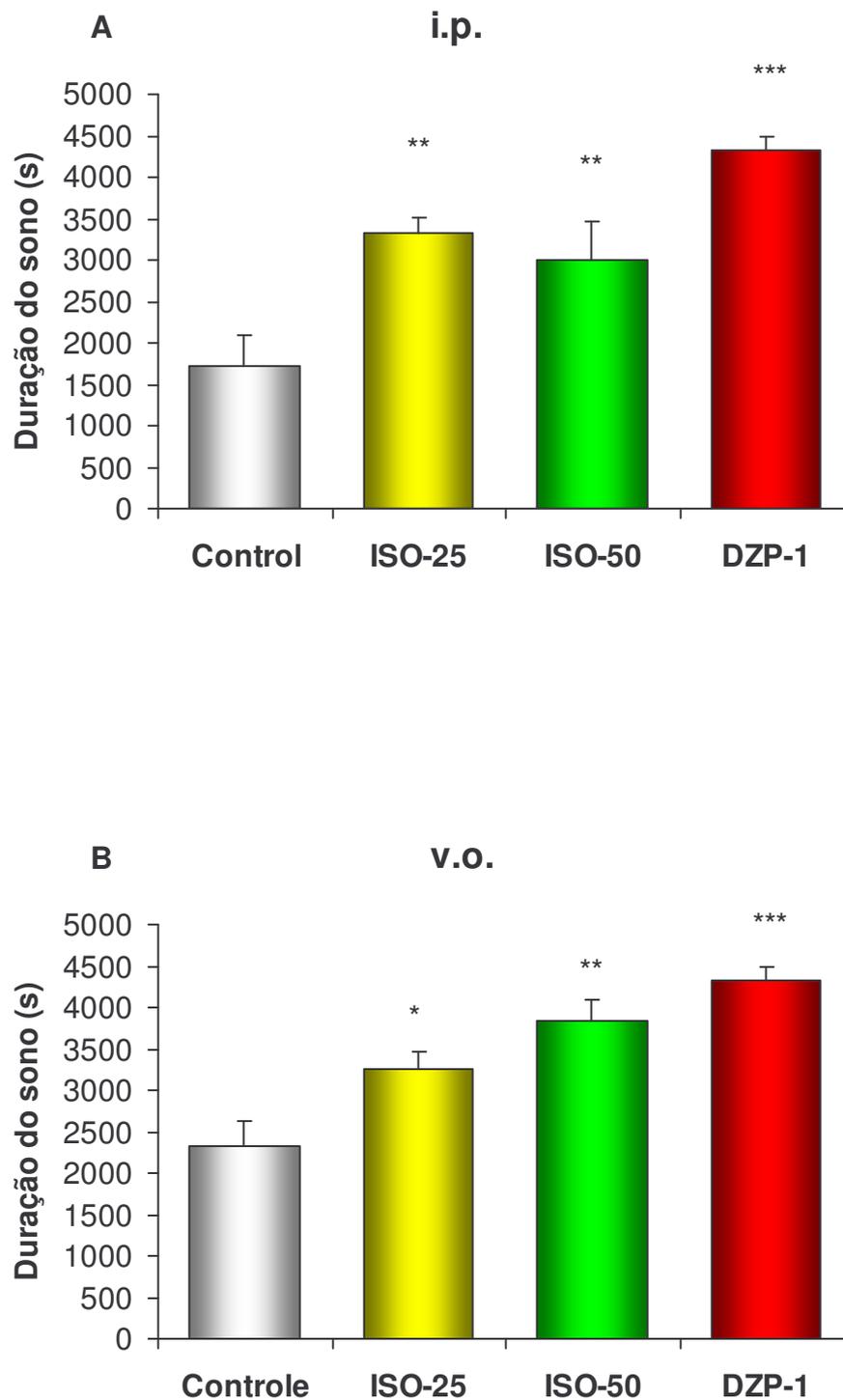


Figura 21. Efeito do isopulegol, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre a duração do sono, em segundos, no teste do tempo de sono induzido por pentobarbital.

Nota: Isopulegol (ISO 25 e 50 mg/kg, i.p. ou v.o.), diazepam (DZP, 1 mg/kg; i.p.) ou veículo/controle (salina em 3% de Tween 80, i.p. ou v.o.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores representam a média \pm E.P.M. da duração do sono (s) (n = 8-10 camundongos). Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle.

5.1.4.3 Dosagens de monoaminas

A concentração das monoaminas e seus metabólitos em corpo estriado de camundongos após a administração aguda de isopulegol (25 e 50 mg/kg, i.p. e v.o.) estão apresentados nas **Figuras 22 e 23 A e B**.

A administração intraperitoneal de isopulegol nas doses de 25 e 50 mg/kg induziu significativa redução no conteúdo de dopamina (DA) (Controle: $3.153 \pm 189,7$; ISO-25: $2.081 \pm 248,7$; ISO-50: $1699 \pm 315,6$; $p < 0,05$), bem como no conteúdo de seus metabólitos, DOPAC (Controle: $620 \pm 42,99$; ISO-25: $326,70 \pm 25,67$; ISO-50: $291 \pm 43,79$; $p < 0,05$) e HVA (Controle: $428,10 \pm 45,33$; ISO-25: $265,90 \pm 29,82$; ISO-50: $295,3 \pm 27,86$; $p < 0,05$), no corpo estriado dos animais, quando comparado aos respectivos controles. A administração oral de isopulegol, embora em menor intensidade, também induziu semelhantes alterações nas concentrações de DA (Controle: $2.891 \pm 142,60$; ISO-25: $1.991 \pm 229,50$; ISO-50: $2.120 \pm 250,20$; $p < 0,05$) e seu metabólito DOPAC (Controle: $554,2 \pm 68,05$; ISO-25: $349,0 \pm 34,64$; ISO-50: $378,5 \pm 43,79$; $p < 0,05$), embora não tenha alterado significativamente a concentração de HVA (Controle: $335,7 \pm 37,17$; ISO-25: $280,1 \pm 22,24$; ISO-50: $303,7 \pm 30,33$), quando comparado aos seus respectivos controles (**Figura 22 A e B**).

A **Figura 23 A e B** mostra que o tratamento intraperitoneal com isopulegol em ambas as doses foi capaz de promover significativa redução na concentração de noradrenalina (NA) (ISO-25: $614,2 \pm 93,53$; ISO-50: $712,2 \pm 73,06$; $p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle ($1.122 \pm 76,25$). Resultados semelhantes foram observados com a administração oral de isopulegol nas duas doses testadas (Controle: $1.041 \pm 68,73$; ISO-25: $789,3 \pm 44,85$; ISO-50: $811 \pm 64,15$; $p < 0,05$). No entanto, não foram observadas alterações significantes na concentração de serotonina (5-HT i.p.= Controle: $777,7 \pm 53,86$; ISO-25: $751,8 \pm 78,87$; ISO-50: $676 \pm 89,76$; 5-HT v.o.= Controle: $747,5 \pm 47,73$; ISO-25: $751,8 \pm 78,87$; ISO-50: $808,9 \pm 61,22$) e de seu metabólito (5-HIAA i.p.= Controle: $134,4 \pm 16,99$; ISO-25: $154,4 \pm 23,24$; ISO-50: $158,5 \pm 13,54$; 5-HIAA v.o.= Controle: $172,6 \pm 21,95$; ISO-25: $155,8 \pm 13,15$; ISO-50: $146,8 \pm 17,06$) em nenhuma das doses e vias administradas, quando comparado aos seus respectivos controles.

A **Figura 24 A e B** apresenta o efeito do isopulegol (25 e 50 mg/kg, ip e v.o.) administrado de forma aguda sobre as taxas de metabolização DOPAC/DA, HVA/DA e 5-HIAA/5-HT em corpo estriado de camundongos.

Não foram observadas alterações significantes nas taxas de DOPAC/DA com ambas as doses intraperitonealmente testadas (ISO-25: $0,15 \pm 0,02$; ISO-50: $0,17 \pm 0,01$), quando comparado ao controle ($0,19 \pm 0,01$). De forma semelhante, também não foram encontradas alterações para as taxas de HVA/DA, (Controle: $0,13 \pm 0,01$; ISO-25: $0,12 \pm 0,02$; ISO-50: $0,15 \pm 0,01$) e 5-HIAA/5-HT (Controle: $0,17 \pm 0,02$; ISO-25: $0,20 \pm 0,01$; ISO-50: $0,21 \pm 0,02$) quando comparado aos seus respectivos controles. A administração oral de isopulegol também não causou alterações significantes em nenhuma das taxas metabólicas calculadas, DOPAC/DA (Controle: $0,19 \pm 0,02$; ISO-25: $0,17 \pm 0,01$; ISO-50: $0,17 \pm 0,01$), HVA/DA (Controle: $0,11 \pm 0,01$; ISO-25: $0,14 \pm 0,01$; ISO-50: $0,14 \pm 0,01$) e 5-HIAA/5-HT (Controle: $0,23 \pm 0,02$; ISO-25: $0,20 \pm 0,02$; ISO-50: $0,18 \pm 0,02$).

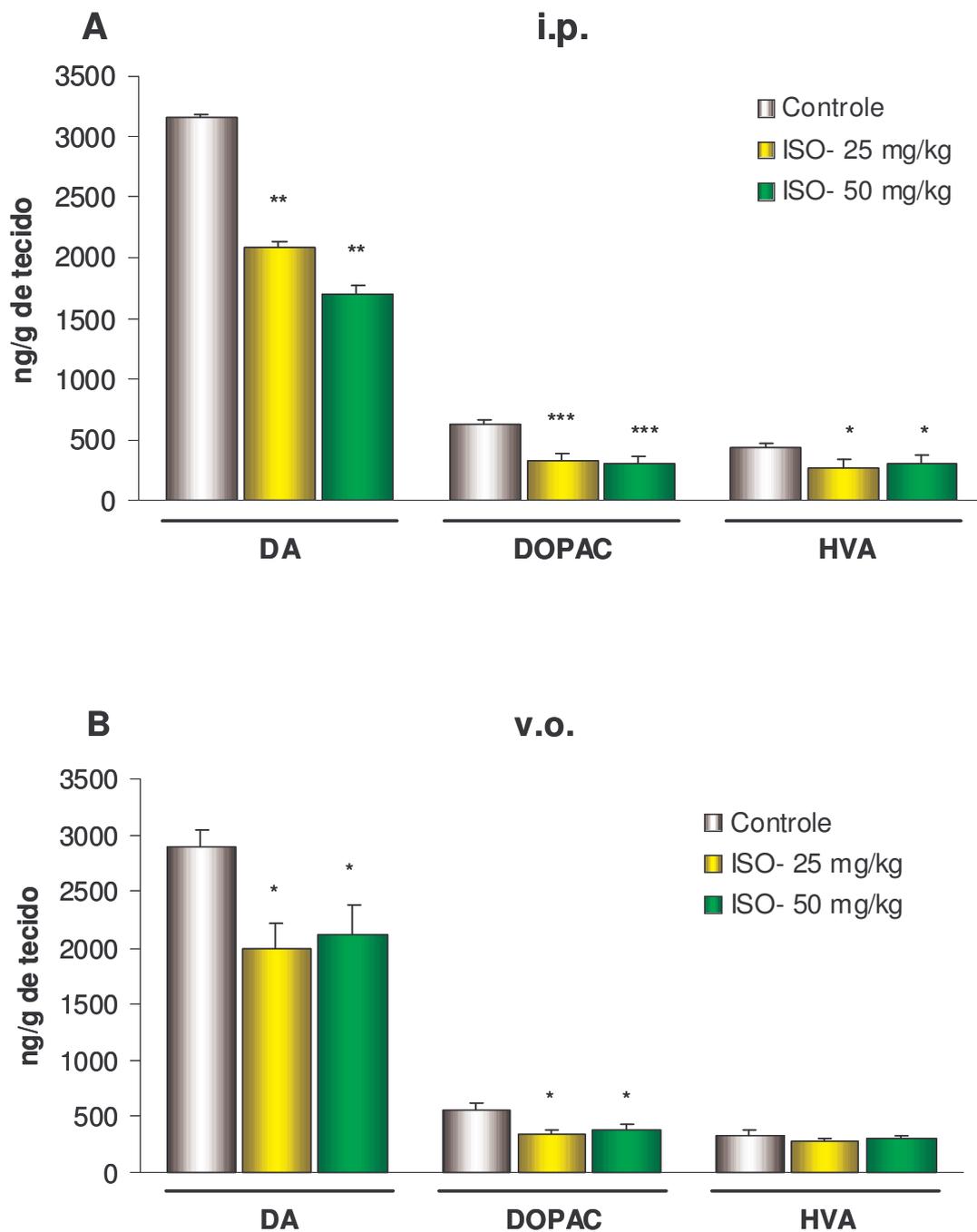


Figura 22. Efeito da administração aguda do isopulegol (25 e 50 mg/kg), i.p. (A) ou v.o. (B), sobre as concentrações de DA, DOPAC e HVA (ng/mg de tecido) em corpo estriado de camundongos.

Nota: Os animais foram tratados com isopulegol (25 e 50 mg/kg, i.p.) ou veículo/controle (salina em 3% de Tween 80, i.p.). Trinta min após os tratamentos, o corpo estriado foi dissecado. Os valores foram expressos como média \pm E.P.M. (n = 5-7). Para a análise estatística, foram utilizados ANOVA e teste de Student Newman Keuls como teste *post hoc*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ quando comparado aos respectivos controles. Dopamina (DA); ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA), foram detectados eletroquimicamente através da técnica de HPLC.

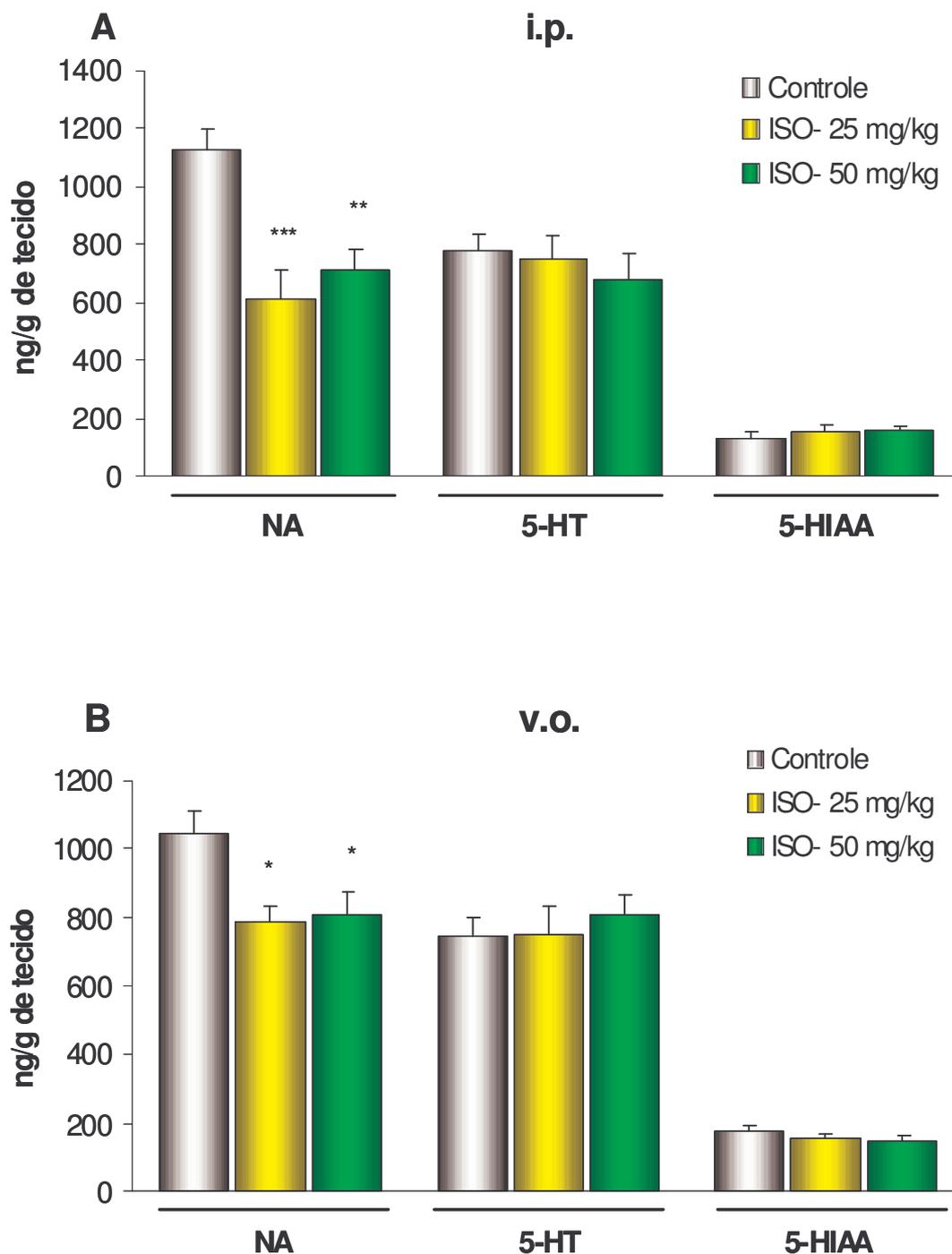


Figura 23. Efeito da administração aguda do isopulegol (25 e 50 mg/kg), i.p. (A) ou v.o. (B), sobre as concentrações de NA, 5-HT e 5-HIAA (ng/mg de tecido) em corpo estriado de camundongos.

Nota: Os animais foram tratados com isopulegol (25 e 50 mg/kg, i.p.) ou veículo/controle (salina em 3% de Tween 80, i.p.). Trinta min após os tratamentos, o corpo estriado foi dissecado. Os valores foram expressos como média \pm EPM (n = 5-7). Para a análise estatística, foram utilizados ANOVA e teste de Student Newman Keuls como teste *post hoc*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ quando comparado aos respectivos controles. Noradrenalina (NA), serotonina (5-HT) e ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) foram detectados eletroquimicamente através da técnica de HPLC.

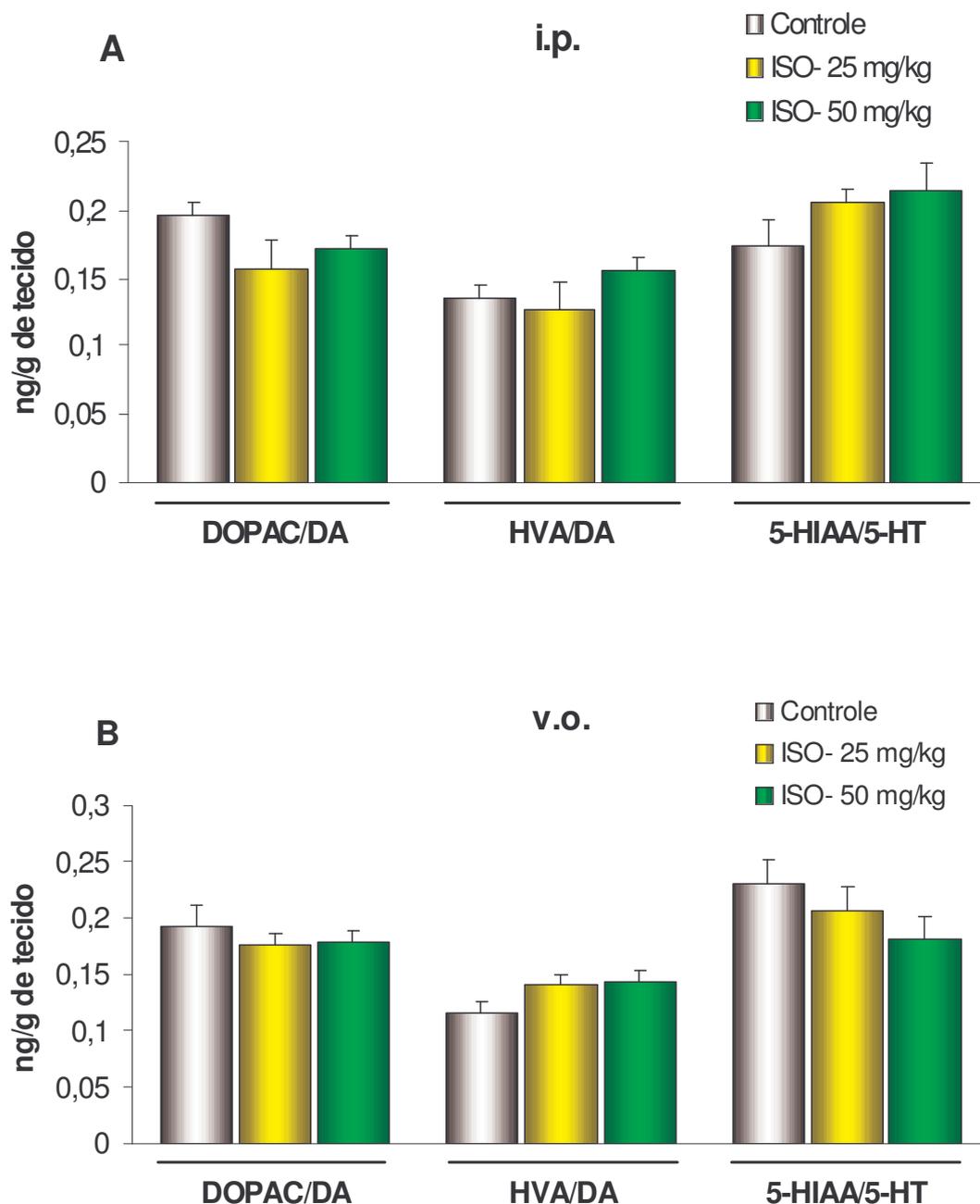


Figura 24. Efeito da administração aguda do isopulegol (25 e 50 mg/kg), i.p. (A) ou v.o. (B), sobre as taxas de DOPAC/DA, HVA/DA e 5-HIAA/5-HT em corpo estriado de camundongos.

Nota: Os animais foram tratados com isopulegol (25 e 50 mg/kg, i.p.) ou veículo/controle (salina em 3% de Tween 80, i.p.). Trinta min após os tratamentos, o corpo estriado foi dissecado. Os valores foram expressos como média \pm EPM (n = 5-7). Para a análise estatística, foram utilizados ANOVA e teste de Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Dopamina (DA), ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA), Noradrenalina (NA), serotonina (5-HT) e ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) foram detectados eletroquimicamente através da técnica de HPLC.

5.1.5 Discussão

Considerando os possíveis efeitos depressores centrais do isopulegol em estudos prévios (DE SOUSA *et al.*, 2007b, 2008), aliado ao interesse do Laboratório de Neurofarmacologia em estudar substâncias biologicamente ativas, no presente capítulo é descrito a investigação dos efeitos do isopulegol em modelos experimentais de atividade no SNC, tais como o labirinto em cruz elevado, campo aberto, placa perfurada, nado forçado, suspensão da cauda, *rota rod* e tempo de sono induzido por pentobarbital. Estes testes são modelos clássicos para *screening* de atividades sobre o SNC em animais e fornecem informações tais como desempenho psicomotor, locomoção, atividade ansiolítica, miorelaxante e depressora. Os resultados apresentados neste capítulo demonstram pela primeira vez uma provável atividade ansiolítica e depressora do SNC promovidas pela administração oral e intraperitoneal de isopulegol em camundongos.

Como referido anteriormente, a ansiedade é um termo utilizado para descrever um estado emocional ligado à percepção de determinados contextos ambientais. É frequentemente acompanhada de variadas sensações físicas, reflexos autônomos e comportamentos defensivos, que funcionam como um sinal de alerta e capacitam o indivíduo a tomar medidas para enfrentar ameaças (JOLIN *et al.*, 2008). As drogas atualmente disponíveis para o tratamento da ansiedade patológica, além de apresentarem efeitos indesejados como sedação, podem ainda induzir tolerância e dependência física (WALKER, 1990), o que tem direcionado a pesquisa para novos, mais efetivos e seguros agentes ansiolíticos.

Nos animais, a ansiedade os prepara para fuga ou para a luta, pois estes são os meios de se preservarem. Embora não se possa provar que um animal vivencia a ansiedade da mesma maneira que um ser humano, diferentes modelos comportamentais em roedores indicam ansiedade através de mudanças comportamentais e periféricas induzidas por situações estressantes (OHL, 2001). Como referido anteriormente, nos últimos anos, o teste do labirinto em cruz elevado (LCE) tem sido amplamente utilizado como um procedimento rápido e simples para detectar efeito ansiolítico ou ansiogênico de drogas em ratos e camundongos (PELLOW *et al.*, 1985). Este teste baseia-se no fato de que roedores possuem aversão a lugares abertos e elevados (MONTGOMERY, 1958) e, portanto, os animais geralmente restringem a maioria de suas atividades aos braços fechados, e uma atividade

relativamente baixa nos braços abertos é indicativa de ansiedade. No presente estudo, o isopulegol 25 e 50 mg/kg, administrado intraperitonealmente, induziu um significativo aumento no número de entradas (NEBA) e tempo de permanência (TPBA) nos braços abertos, bem como reduziu o número de entradas (NEBF) e o tempo de permanência nos braços fechados (TPBF). A administração oral de isopulegol demonstrou resultados semelhantes, exceto no NEBF. Os resultados desse estudo fornecem evidências de que o isopulegol, nas doses testadas, apresenta provável efeito ansiolítico. O diazepam, usado como droga ansiolítica de referência, como esperado, também reduziu a aversão natural dos animais em relação aos braços abertos, promovendo aumento da exploração destes e confirmando, assim, sua atividade ansiolítica.

O LCE é considerado um dos testes mais validados para investigar novos agentes ansiolíticos do tipo benzodiazepínicos (BZD), que agem sobre o sistema GABA-BZD-canal de cloreto (PELLOW *et al.*, 1985; RODGERS *et al.*, 1997). Como referido anteriormente, os receptores GABAérgicos são de três tipos distintos: o receptor GABA_A, o GABA_B e o receptor GABA_C. Os benzodiazepínicos possuem afinidade pelo subtipo GABA_A, que constitui o maior sistema de inibição neuronal do SNC. Eles atuam nestes receptores potencializando o efeito inibitório do GABA e consistem nos depressores do SNC mais largamente prescritos (LILLY; TIETZ, 2000). Com a finalidade de investigar o possível envolvimento do sistema gabaérgico no mecanismo de ação do efeito ansiolítico do isopulegol, foi utilizado o flumazenil, um antagonista competitivo do receptor GABA_A/Benzodiazepínico. A via de administração usada para tratar os animais nesta investigação foi a via intraperitoneal, por ter apresentado efeitos ansiolíticos mais evidentes. Os resultados mostraram que o flumazenil reverteu o efeito ansiolítico do isopulegol em todos os parâmetros analisados, do mesmo modo que reverteu os efeitos do diazepam, sugerindo assim, que o efeito ansiolítico do isopulegol parece estar relacionado com o sistema GABAérgico, mais especificamente, com os receptores GABA_A/BZD.

Um crescente número de estudos mostram que vários compostos de origem natural são capazes de modular os receptores ionotrópicos GABAérgicos em sítios de ação diferentes daqueles dos benzodiazepínicos, incluindo os monoterpênicos (+)- e (-)-borneol (GRANGER *et al.*, 2005), timol (JOHNSTON, 2005) e α,β -epoxi-carvona (DE ALMEIDA *et al.*, 2008). Como mencionado anteriormente no presente estudo, o isopulegol [Figure 2 (5)] é um análogo estrutural do mentol [Figure 2 (1)] e ambos monoterpênicos apresentaram ação como

moduladores alostéricos positivos nos receptores GABA_A em estudo recente (WATT *et al.*, 2008). Em estudos de competição, o flumazenil não interferiu nas ações do mentol, sugerindo que os efeitos desse monoterpene não envolvem os sítios de ação benzodiazepínicos clássicos (THOMET *et al.*, 2000). Por contraste, o possível efeito ansiolítico apresentado pelo isopulegol no presente estudo, parece estar relacionado aos sítios benzodiazepínicos de ação no receptor GABA_A, corroborando os achados de Watt *et al.* (2008). De forma semelhante, os efeitos de outros monoterpenos, tais como o epinepetalactona (GALATI *et al.*, 2004) e timoquinona (HOSSEINZADEH *et al.*, 2005), foram também revertidos pelo flumazenil, sugerindo um possível sítio de ação no receptor GABA_A comum a esses monoterpênóides e aos BZD.

Estudos prévios mostram uma relação estrutura-atividade para a modulação nos receptores GABA por vários monoterpenos (HALL *et al.*, 2004). Comparando as estruturas químicas, observa-se que o isopulegol difere do mentol apenas por apresentar uma dupla ligação em sua cadeia alifática [**Figura 2 (1 e 5)**], entretanto, essa tênue diferença acarreta em diferentes efeitos farmacológicos. Quando administrado a roedores, o (+)- mentol promoveu ambulação (UMEZU *et al.*, 2001), enquanto o seu enantiômero é dotado de propriedades analgésicas (GALEOTTI *et al.*, 2002). No presente estudo, e em estudo prévio conduzido por De Sousa *et al.* (2007b), o isopulegol apresentou possível efeito depressor do SNC no teste do tempo de sono induzido por pentobarbital, enquanto o (-)- mentol foi ineficaz nesse teste (DE SOUSA *et al.*, 2007b). Assim, a variação nas atividades exibidas pelos análogos (-)- mentol e isopulegol sugerem que diferenças estruturais entre os monoterpênóides podem também influenciar no sítio de ligação dos receptores GABA_A e, conseqüentemente, refletir em diferentes ações farmacológicas. De fato, as propriedades terapêuticas dos variados tipos de benzodiazepínicos podem resultar de ações em distintos subtipos de receptor GABA_A, por exemplo, a subunidade $\alpha 1$ -GABA_A tem sido relacionada às propriedades sedativas dos BZD, enquanto a subunidade $\alpha 2$ -GABA_A é responsável pelas propriedades ansiolíticas (MCKERNAN *et al.*, 2000). Nesse contexto, a investigação precisa da natureza da interação do isopulegol ao receptor GABA_A consiste em uma promissora linha para pesquisas futuras.

O teste da placa perfurada (*hole board*) foi executado para corroborar ou não com o possível efeito ansiolítico do isopulegol evidenciado no LCE. Este teste mensura o comportamento exploratório de roedores (FILE; WARDILL, 1975), e o número de vezes que o animal coloca a cabeça no orifício da placa perfurada (*head dips*) tem sido registrado como

um parâmetro para avaliar as condições de ansiedade em animais. 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). No entanto, este efeito ansiolítico é revertido com doses maiores de benzodiazepínicos (SUZUKI *et al.*, 1990), os quais induzem sedação. Por outro lado, estudos realizados com compostos ansiogênicos mostraram que estas drogas reduziram o número de *head dips* (TAKEDA *et al.*, 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 estimados usando o teste da placa perfurada (TAKEDA *et al.*, 1998). Com base nestes estudos, nossos resultados forneceram evidências de que o isopulegol apresentou efeito ansiolítico também neste modelo, uma vez que induziu aumento no comportamento de *head dips* nos animais, tanto por via intraperitoneal como oral, em ambas as doses testadas.

Dados da literatura demonstraram que substâncias psicoestimulantes, tais como a cafeína e anfetamina, promovem aumento na atividade motora em humanos e em modelos animais (MUELLER *et al.*, 1989; PELLOW *et al.*, 1985), o que pode levar a resultados falso-positivos em testes como o LCE e *hole board*. Ou seja, substâncias estimulantes comportamentais normalmente promovem nestes testes resultados semelhantes àqueles apresentados por compostos ansiolíticos. Desta forma, nós decidimos estudar os efeitos do isopulegol no teste do campo aberto, um modelo animal clássico usado para avaliar os efeitos autonômicos de uma droga e a atividade geral dos animais (NOVAS *et al.*, 1988). A tendência natural do animal em um ambiente novo é a de explorá-lo, apesar do estresse e do conflito provocado por este ambiente (MONTGOMERY, 1958). Assim, a atividade locomotora espontânea (ALE), *rearing* (exploração vertical) e *grooming* (auto-limpeza) em roedores, observados no campo aberto, são os parâmetros comportamentais mais usados para descrever influências dos eventos da vida ou da administração de drogas (MONTGOMERY, 1958; REX *et al.*, 1996).

Estudos demonstram que a ALE dá uma indicação do nível de excitabilidade do SNC (MANSUR *et al.*, 1971) e, portanto, como referido acima, substâncias psicoestimulantes aumentam este parâmetro neste teste (MUELLER *et al.*, 1989). No presente estudo, a administração tanto intraperitoneal quanto oral do isopulegol, em ambas as doses, não alterou a atividade locomotora dos animais. Desta forma, é improvável que os efeitos promovidos pelo isopulegol nos testes do LCE e *hole board*, sejam baseados na estimulação da atividade

motora geral dos animais. Por outro lado, estudos prévios afirmam que a redução na ALE pode estar relacionada com a sedação resultante da depressão do SNC (OZTURK *et al.*, 1996; PEREZ *et al.*, 1998). De fato, o diazepam, usado na dose de 2 mg/kg como padrão positivo de ação sedativa, diminuiu a atividade locomotora, comprovando o seu potencial sedativo nesta dose. Considerando tais dados, nossos resultados sugerem que, nas doses e vias de administração testadas, a atividade ansiolítica do isopulegol, evidenciada no LCE e *hole board*, não foi acompanhada de efeito sedativo no campo aberto (não reduziu a ALE), uma característica comum e indesejável da maioria dos ansiolíticos disponíveis.

A atividade de *rearing* em roedores é descrita como um comportamento estereotipado complexo (DANDIYA *et al.*, 1969), sendo um parâmetro variável na literatura. Alguns autores relataram que o *rearing* reflete um comportamento exploratório do animal (JOHANSSON; AHLENIUS, 1989) e, portanto, substâncias ansiolíticas induziriam um aumento da atividade de *rearing* ou não alterariam este parâmetro (YOUNG; JOHNSON, 1991). Entretanto, outros estudos relacionam o *rearing* com os níveis de excitabilidade do sistema nervoso central (CUNHA; MASUR, 1978), e sugerem que agentes ansiolíticos e sedativos diminuem este parâmetro (HUGHES, 1972; STOUT, 1994). No presente estudo, o isopulegol não alterou o número de *rearing*, nas duas doses usadas, em ambas as vias de administração. Enquanto o diazepam, usado na dose de 2 mg/kg, reduziu o número de *rearing*, demonstrando que, em uma dose sedativa, este parâmetro é significativamente reduzido. Assim, nossos resultados sugerem que o efeito ansiolítico induzido pelo isopulegol nos testes do LCE e *hole board* não foi depressor suficiente para alterar o comportamento de *rearing* no teste do campo aberto.

O terceiro parâmetro observado no teste do campo aberto é o comportamento de *grooming*. De acordo com MacFarland e Reeder (1974), quase todos os animais gastam uma significativa parte do tempo realizando *grooming*, que consiste da lambadura das patas e limpeza da cabeça e focinho, com movimentos repetitivos usando as patas (KRUK *et al.*, 1998). 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 este parâmetro no campo aberto (BARROS *et al.*, 1994; MOODY *et al.*, 1993). No presente estudo, houve uma significativa redução de *grooming* no campo aberto induzido pelo isopulegol, em ambas as vias e doses utilizadas,

corroborando com nossos resultados anteriores que apontam um possível efeito ansiolítico induzido pelo isopulegol.

A atividade depressora do isopulegol foi também avaliada no teste do tempo de sono induzido por pentobarbital. Este teste permite verificar se determinada droga possui um efeito sedativo/hipnótico, considerando que, quando duas drogas possuem o mesmo efeito farmacológico, eles se somam (sinergismo). Portanto, o princípio deste teste é verificar se uma droga possui a capacidade de potencializar o efeito sedativo e hipnótico do pentobarbital sódico, embora algumas drogas desprovidas de ação central, como por exemplo, a adrenalina e a histamina, também apresentam resultados positivos (RILEY; SPINKS, 1958).

Os nossos resultados mostraram que o isopulegol induziu uma diminuição da latência do sono e um aumento da duração do sono total, em ambas as vias e doses testadas. Estes são parâmetros classicamente relatados por drogas sedativas e depressoras do SNC (WILLIANSO *et al.*, 1996). No entanto, quando utilizado sozinho, o isopulegol não foi capaz de induzir uma ação sugestiva de sedação (redução de ALE) no teste do campo aberto. Assim, é possível que este monoterpene, por si só, não apresente um potencial sedativo nas doses testadas, mas, como se trata de uma substância possivelmente depressora do SNC (potencializando o efeito inibitório do GABA), o isopulegol, por sinergismo, pode ter contribuído para um aumento da depressão induzida pelo pentobarbital.

Clinicamente, a depressão é considerada uma desordem psiquiátrica extremamente comum, debilitante, com uma significativa incidência na população mundial (LERER; MACCIARDI, 2002). O modelo animal mais utilizado para a investigação de novas drogas antidepressivas é o teste do nado forçado estabelecido por Porsolt *et al.* (1977). Este teste consiste em expor o animal a uma situação inescapável, onde o mesmo alterna o seu comportamento entre períodos de atividade vigorosa (“comportamento de fuga”) e de imobilidade (que reflete um estado de “desespero comportamental” no qual o animal é rendido em seu desejo de escapar) (STERU *et al.*, 1985). Embora a relação entre imobilidade e depressão sejam controversas (GARDIER *et al.*, 2001), é bem documentado que drogas com reconhecida atividade antidepressiva, como a imipramina, reduzem o tempo de imobilidade do animal neste teste (FERNANDEZ-TERUEL *et al.*, 1990).

Embora alguns estudos prévios demonstrem que drogas ansiolíticas, tais como a buspirona e o diazepam não apresentam atividade antidepressiva no teste do nado forçado (PRZEGALINSKI *et al.*, 1990; ABDEL SALAM; BAIUOMY, 2008), há relatos na literatura de substâncias apresentando concomitante atividade ansiolítica e antidepressiva (SOUSA *et al.*, 2004). Desta forma, com o intuito de conhecermos o comportamento do isopulegol em um dos modelos de depressão mais utilizados na literatura, o teste do nado forçado foi realizado. Os nossos resultados mostraram que o isopulegol aumentou o tempo de imobilidade dos animais, em ambas as doses e vias utilizadas. Enquanto a imipramina, uma droga antidepressiva clássica, usada como controle positivo, como esperado, diminuiu o tempo de imobilidade neste teste, indicando o seu potencial antidepressivo. Esses resultados sugerem uma atividade depressora do SNC promovida pelo isopulegol.

Com o intuito de corroborar com os resultados obtidos no teste do nado forçado, um outro modelo experimental foi utilizado, o teste de suspensão da cauda. Este teste também consiste em um modelo de desespero comportamental e é freqüentemente utilizado para a investigação de efeito antidepressivo ou depressor de substâncias. Baseia-se no fato de que camundongos, quando suspensos pela cauda, também demonstram um padrão temporal, alternando entre períodos de atividade (“comportamento de fuga”) e imobilidade (“comportamento de espera”), refletindo um “desespero comportamental” (PORSOLT *et al.*, 1978). No presente estudo, em ambas as vias e doses utilizadas, o isopulegol induziu semelhante aumento no tempo de imobilidade dos animais suspensos pela cauda, confirmando os resultados observados no modelo do nado forçado. Estes achados fortemente sugerem uma provável atividade depressora do SNC promovida pelo isopulegol.

Considerando que um déficit na coordenação motora, muito provavelmente, afetaria o desempenho dos animais nos modelos do nado forçado e suspensão da cauda, nós decidimos investigar os efeitos do isopulegol no teste da barra giratória *rota rod*. Este teste foi proposto por Dunham e Miya (1957) e mede o efeito de relaxamento muscular ou incoordenação motora. Os resultados demonstraram que o isopulegol não alterou a coordenação motora dos animais em nenhuma das rotações testadas, diferenciando-se do diazepam 2 mg/kg (que nesta dose apresenta efeito relaxante muscular), o qual diminuiu o tempo de permanência na barra em todas as rotações. Estes resultados sugerem que o aumento da imobilidade dos animais observado nos testes do nado forçado e suspensão da cauda, pode não ter sido exercido através do bloqueio neuromuscular periférico, mas provavelmente tais efeitos devem envolver

neurônios que controlam a atividade depressora central (AMOS *et al.*, 2001; ADZU *et al.*, 2002).

Como referido anteriormente, os mecanismos GABAérgicos estão profundamente implicados no controle da ansiedade, entretanto, as aminas biogênicas como a noradrenalina, serotonina e dopamina também participam efetivamente deste evento (SOUTHWICK *et al.*, 1999; MILLAN, 2003).

Um importante substrato biológico para a ansiedade é o neurônio noradrenérgico, que apresenta seu corpo celular na área do tronco cerebral conhecida como *locus ceruleus* e projeta-se para o córtex cerebral, sistema límbico, tronco cerebral e medula. Na resposta aguda à situação estressante, há um aumento importante de noradrenalina na fenda sináptica, resultando em um aumento da resposta simpática evocada (MARGIS *et al.*, 2003). Em animais experimentais, a estimulação elétrica do *locus ceruleus*, tornando-o hiperativo, cria estado análogo à ansiedade. Deste modo, acredita-se que os estados de ansiedade sejam acompanhados de hiperatividade dos neurônios noradrenérgicos. De fato, exemplos de sintomas de ansiedade consistentes com hiperatividade adrenérgica incluem taquicardia, tremores e sudorese. Como os receptores alfa 2 terminais e somatodendríticos são receptores de *feedback* negativo, quando são ocupados pela noradrenalina, interrompem a liberação deste neurotransmissor. Assim, a administração de agonistas alfa 2 (como a clonidina) é capaz de reduzir a ansiedade, enquanto o bloqueio desses receptores promove a liberação de noradrenalina, aumentando assim a ansiedade. Uma diminuição dos sintomas autonômicos da ansiedade também ocorre mediante o bloqueio de receptores pós sinápticos através do uso de beta-bloqueadores (como o propranolol).

No presente estudo, o efeito ansiolítico do isopulegol observado nos testes do LCE e *hole board* foi acompanhado por uma redução da concentração de noradrenalina no corpo estriado dos animais após tratamento agudo com isopulegol. Embora drogas α_2 -agonistas e beta-bloqueadores sejam capazes de aumentar a exploração dos braços abertos no teste do LCE e o número de *head dips* no teste da placa perfurada (HANDLEY; MITHANI, 1984), no presente estudo, não é possível afirmar que a ação ansiolítica induzida pelo isopulegol nesses testes esteja relacionada diretamente com receptores noradrenérgicos. Por outro lado, considerando que o isopulegol, possivelmente, estaria atuando via sistema GABAérgico, cujas vias neuronais desempenham importante ação inibitória sobre as demais vias nervosas, é

possível que a redução na concentração de noradrenalina observada em corpo estriado se deva à uma inibição de neurônios adrenérgicos nesta área cerebral. No entanto, uma possível interação direta em receptores adrenérgicos não pode ser descartada e requer investigação em futuros estudos.

Enquanto o papel da noradrenalina na ansiedade autonômica é conhecido, a participação da serotonina ainda não está completamente elucidada. As inervações serotoninérgicas originadas do núcleo dorsal (NRD) e medial da rafe (NRM) localizam-se no tronco cerebral (MOLLIVER, 1987). Regiões como o estriado e córtex frontal recebem preferencialmente inervações serotoninérgicas do NRD (McQUADE; SHARP, 1997). Vários modelos de ansiedade aguda em ratos estão associados com aumento de serotonina no hipocampo. Isto foi observado em experimentos de microdiálise nos quais ratos foram expostos em diferentes testes de ansiedade, como por exemplo, o labirinto em cruz elevado (WRIGHT *et al.*, 1992) e interação social (CADOGAN *et al.*, 1994). Rex *et al.* (1993) encontraram aumento de serotonina em córtex frontal de cobaio exposto ao labirinto. Eles observaram que este efeito foi atenuado pelo diazepam, um ansiolítico benzodiazepínico. Demonstraram também que o antagonista do receptor benzodiazepínico, flumazenil, reverteu ambos efeitos comportamentais e neuroquímicos do diazepam.

No presente estudo, os nossos resultados mostraram que o efeito ansiolítico do isopulegol não foi acompanhado por uma redução da 5-HT no corpo estriado dos animais, a qual permaneceu em níveis normais, semelhante ao observado com a concentração de seu metabólito 5-HIAA, indo de confronto aos estudos acima citados. No entanto, diversos estudos evidenciam uma conflitante relação entre os efeitos ansiolíticos de drogas e o aumento de serotonina. Esses resultados conflitantes sugerem uma complexa interação entre as diferentes vias serotoninérgicas (e de seus vários subtipos de receptores) e outros sistemas alvo conhecidos, os quais participam de forma diferenciada em cada modalidade de distúrbio emocional, o que explica, de certa forma, as peculiaridades das respostas terapêuticas encontradas na clínica. Assim, acredita-se atualmente que a 5-HT exerça um duplo papel na regulação do comportamento de defesa, aumentando a ansiedade quando atuando na amígdala e contendo o pânico agindo na MCPd (MARGIS *et al.*, 2003, DOMBROWSKI, 2005). Desta forma, sabe-se que o efeito ansiolítico associado a redução de serotonina depende da área cerebral estudada.

Estudos demonstram que o hipocampo possui uma densa concentração de receptores GABAérgicos e, por isso, diversos relatos prévios evidenciam que este seria o principal local de ação de benzodiazepínicos e de seus agonistas contra estados de ansiedade geral, inclusive promovendo uma redução na concentração serotoninérgica nesta área (DEKLOET *et al.*, 1982; ZETTERSTROM; FILLENZ, 1989; JOHNSON *et al.*, 1995). Desta forma, considerando que o isopulegol, pelo menos em parte, estaria atuando em nível de SNC mediante sistema GABA-BZP e que o hipocampo seria uma área mais rica em receptores GABAérgicos do que o corpo estriado, é possível que as doses utilizadas no presente estudo não tenham sido suficientes para induzirem alterações serotoninérgicas em corpo estriado, o que talvez tivesse sido evidenciado em hipocampo. No entanto, a investigação da concentração monoaminérgica nesta área cerebral será realizada em estudos futuros.

A interação do sistema GABAérgico com o sistema neurotransmissor dopaminérgico tem despertado notável interesse nos últimos anos (LEUNG *et al.*, 2003). Estudos remotos demonstram que o sistema GABAérgico desempenha um importante papel na regulação da função de neurônios dopaminérgicos (DI CHIARA *et al.*, 1978). Evidências indicam que há uma elevada concentração de GABA na substância negra e, anatomicamente, a maioria dos neurônios que vêm da substância negra e chegam ao estriado são dopaminérgicos. Assim, uma estimulação GABAérgica na substância negra diminuiria a função dopaminérgica no corpo estriado e em outras áreas cerebrais (DI CHIARA *et al.*, 1978, 1979; GERFEN, 2004). De fato, foi observado que benzodiazepínicos como o diazepam manifestaram marcada redução na concentração extracelular da dopamina, enquanto um aumento da liberação deste neurotransmissor foi elicitada pelo antagonista benzodiazepínico, flumazenil (FINLAY *et al.*, 1992). No presente estudo, foi observada semelhante redução na concentração de dopamina induzida pelo isopulegol no corpo estriado dos animais, com conseqüente redução dos metabólitos DOPAC e HVA, sugerindo uma inibição do sistema dopaminérgico na área estudada. Considerando que o isopulegol, pelo menos em parte, estaria atuando via sistema GABAérgico, esses resultados estão de acordo com o que preconiza a literatura sobre uma modulação GABAérgica de neurônios dopaminérgicos (DICHARA *et al.*, 1978, 1979).

Como referido anteriormente, embora seja bem estabelecido que a depressão está relacionada a uma redução de noradrenalina e serotonina (BLIER; MONTIGNY, 1994), atualmente é largamente aceito que a dopamina também participa da fisiopatogenia da depressão (BROWN *et al.*, 1993; JOCA *et al.*, 2000). Estes achados são evidenciados em

modelos animais de depressão, nos quais a concentração de dopamina extracelular no cérebro estivera diminuída (ROSSETTI *et al.*, 1993). Essa teoria é também fundamentada a partir da observação de efeitos antidepressivos de drogas (JOCA *et al.*, 2000), como exemplo, a bupropiona, um inibidor seletivo da captação de dopamina, clinicamente usado em humanos como um antidepressivo ou na terapia de retirada da nicotina (ASCHER *et al.*, 1995; RICHMOND; ZWAR, 2003). A principal objeção da hipótese dopaminérgica da depressão é que clinicamente os antidepressivos efetivos inibem a captação de serotonina ou noradrenalina, mas não dopamina. Existe uma aparente contradição no mecanismo de ação desses antidepressivos, pois, apesar do bloqueio da captação de serotonina e noradrenalina ocorrer imediatamente após o tratamento agudo, o efeito clínico dos antidepressivos acontece apenas após duas ou quatro semanas de tratamento. Essa afirmativa pode fortalecer a hipótese dopaminérgica, pois estudos mostram que o tratamento crônico com todos os inibidores da captação de serotonina e noradrenalina potenciam a transmissão dopaminérgica no núcleo *accumbens* (SERRA *et al.* 1992). Assim, a diminuição da concentração de dopamina e seus metabólitos associada à redução de noradrenalina em corpo estriado observada após o uso de isopulegol é consistente tanto com os efeitos ansiolíticos observados nos testes de LCE e *hole board*, quanto com o seu efeito depressor evidenciado no teste do nado forçado.

Estudos mostram que administração sistêmica de agonistas dopaminérgicos D1 em ratos aumenta o comportamento de *grooming* (auto-limpeza), mas não aumenta significativamente a locomoção ou outros comportamentos estereotipados (JACKSON; WESTLIND-DANIELSSON, 1994). Entretanto, de forma oposta, a injeção de antagonistas desses receptores, tais como SCH-23390 reduzem o mesmo comportamento, de maneira dose e tempo-dependente (MEYER *et al.*, 1993). No presente estudo, o isopulegol induziu redução de comportamento de *grooming* no campo aberto, bem como diminuiu a concentração de DA em corpo estriado, o que está de acordo com tais estudos citados. No entanto, estudos futuros voltados à investigação das ações (indiretas ou diretas) do isopulegol sobre receptores dopaminérgicos são necessários.

Em conclusão, os resultados dos testes do LCE e *hole board* sugerem que o isopulegol apresenta provável efeito ansiolítico, o qual está relacionado, pelo menos em parte, ao sistema GABA_A/BZP. Esta ação ansiolítica induzida pelo isopulegol não foi acompanhada de efeito sedativo, o que foi evidenciado pela ausência de diminuição de ALE no teste do campo aberto. Os parâmetros observados no teste do nado forçado, suspensão da cauda e tempo de

sono induzido por pentobarbital sugerem fortemente que o isopulegol apresenta possível efeito depressor do SNC e corroboram com a sua ação ansiolítica observada inicialmente. Em conjunto, esses resultados são também consistentes com a redução na concentração das monoaminas cerebrais observadas em corpo estriado. Nossos resultados demonstraram que o isopulegol, mesmo sendo um análogo estrutural do mentol, apresentou atividade farmacológica depressora do SNC, em oposição aos efeitos psicoestimulantes apresentados pelo mentol em estudos prévios. Esta divergência de resultados pode ser explicada por uma tênue diferença estrutural existente entre ambas as substâncias.

5.2 Capítulo II - Efeitos do Isopulegol sobre Convulsões Induzidas por Pentilenotetrazol em Camundongos

5.2.1 Introdução

Estima-se que a incidência de epilepsia e desordens convulsivas seja de, aproximadamente, 43 casos por cada 100.000 habitantes de países desenvolvidos, e quase o dobro de casos nos países em desenvolvimento (MCHUGH; DELANTY, 2008). Embora os novos fármacos anticonvulsivantes disponíveis, com efeitos adversos menos frequentes e maiores índices terapêuticos, sejam comumente usados para controlar e prevenir convulsões, seu uso prolongado acarreta em risco considerável de morbidade (SIRVEN, 2002). Nesse contexto, substâncias com propriedades anticonvulsivantes têm sido exaustivamente estudadas na tentativa de se desenvolver drogas com eficácia terapêutica cada vez maior, com menor morbidade e baixos custos. Dentre tais substâncias, diversos compostos extraídos de plantas têm apresentado notável potencial anticonvulsivante em estudos experimentais conduzidos no mundo todo (DE SOUSA *et al.*, 2006; KUBACKA *et al.*, 2006; NASSIRI-ASL *et al.*, 2007; DE ALMEIDA *et al.*, 2008).

Estudos demonstram que o bloqueio das convulsões induzidas pelo PTZ (um bloqueador seletivo da transmissão GABAérgica) é uma característica de substâncias com efeitos depressores do SNC (DE ALMEIDA *et al.*, 2008), presumivelmente, por elas aumentarem os efeitos inibitórios do GABA. Nesse contexto, o PTZ tem sido comumente utilizado em modelos animais para investigar o potencial anticonvulsivante de substâncias (OLIVEIRA *et al.*, 2004; SWIADER *et al.*, 2006). Considerando que vários monoterpenos, incluindo o isopulegol (WATT *et al.*, 2008), foram mostrados como moduladores positivos dos receptores GABA_A, o presente capítulo teve como objetivo investigar se o isopulegol seria capaz de promover alguma proteção contra as convulsões induzidas por PTZ em camundongos. Ainda, a ação anticonvulsivante de alguns monoterpenos esteve associada às suas propriedades antioxidantes (DE ALMEIDA *et al.*, 2008). Esses dados nos levaram também a investigar, no presente estudo, o potencial antioxidante do isopulegol frente ao estresse oxidativo induzido pelo PTZ em hipocampo de camundongos.

5.2.2 Objetivos específicos

- Investigar o potencial anticonvulsivante do isopulegol no modelo de convulsão induzida por pentilenotetrazol (PTZ) em camundongos e verificar o possível envolvimento dos sítios receptores benzodiazepínicos nesta ação.
- Verificar o potencial sedativo do isopulegol nas doses de 100 e 200 mg/kg através da determinação da ALE no teste do campo aberto.
- Determinar a taxa de peroxidação lipídica e a produção de nitrito em hipocampo de camundongos expostos ao modelo de convulsão induzida por PTZ.
- Verificar a atividade da enzima antioxidante catalase e a concentração de glutathione reduzida (GSH) em hipocampo de camundongos expostos ao modelo de convulsão induzida por PTZ.

5.2.3 Métodos

5.2.3.1 Determinação da Atividade Anticonvulsivante, ALE e Participação do Estresse Oxidativo

➤ **Protocolo experimental**

Para a investigação de uma possível atividade anticonvulsivante do isopulegol, os animais foram tratados com o isopulegol nas doses de 25, 50, 100 e 200 mg/kg, 30 minutos (i.p.) ou 1 hora (v.o.) antes da administração do pentilenotetrazol (PTZ) em uma dose necessária para causar convulsões em 97% dos animais (99 mg/kg, s.c.), de acordo com Swiader *et al.* (2006). Os grupos controles receberam veículo (salina a 0,9 % com 3 % de Tween 80, i.p. ou v.o.) no mesmo volume dos grupos tratados com a substância teste (10 ml/kg). Como referência de uma droga anticonvulsivante, foi utilizado diazepam 1 mg/kg, i.p.. Com a finalidade de investigar o mecanismo de ação do isopulegol, em um grupo adicional, os animais receberam flumazenil (2,0 mg/kg, i.p.), um antagonista do receptor benzodiazepínico, 15 min antes do isopulegol (100 e 200 mg/k, i.p., doses que apresentaram significativo efeito anticonvulsivante) ou do diazepam (1 mg/kg, i.p.). Após a administração do PTZ, os animais foram colocados em ambiente reservado para observação dos grupos pelo período de até 20 minutos (estudo comportamental). Os animais que não sobreviveram até o final do período de observação foram decapitados logo após a morte e os sobreviventes foram sacrificados por deslocamento cervical e decapitados logo após o estudo comportamental. O hipocampo foi imediatamente removido sob gelo e armazenado à -70°C para a realização das seguintes dosagens bioquímicas: catalase, GSH, peroxidação lipídica e nitrito.

➤ **Teste da convulsão induzida por Pentilenotetrazol (PTZ)**

Este experimento foi realizado seguindo a metodologia descrita por Swinyard *et al.* (1952), e teve a finalidade de avaliar a possível ação anticonvulsivante da droga teste. Trinta

minutos (i.p.) ou uma hora (v.o.) após os tratamentos com isopulegol (25, 50, 100 e 200 mg/kg), veículo (salina a 0,9% com 3% de Tween 80), ou diazepam (1 mg/kg, i.p.), todos os grupos experimentais foram tratados com PTZ (99 mg/kg, s.c.). Em seguida os camundongos foram colocados em gaiolas individuais e observados por até 30 minutos. Durante o período de observação dos animais, foram registrados os seguintes parâmetros: o tempo de manifestação da primeira convulsão do tipo clônica ou tônico-clônica (latência de convulsão) e o tempo gasto entre a 1ª convulsão e a morte (latência de morte). O percentual de proteção contra a morte foi também calculado e descrito (mas não apresentado graficamente). Para este experimento, foram utilizados 8-10 animais por grupo.

Subsequentemente, com a finalidade de investigar um possível envolvimento dos sítios benzodiazepínicos de receptores GABA_A na ação anticonvulsivante do isopulegol, um grupo de animais foi tratado com flumazenil (2,0 mg/kg, i.p.) 15 min antes de receberem veículo (salina a 0,9% com 3% de Tween 80, i.p.) (FLU-2,0 + veículo); dois outros grupos receberam flumazenil (2,0 mg, i.p.) 15 min antes da administração de isopulegol (100 e 200 mg/kg, i.p.) (FLU-2,0 + ISO-100 e FLU-2,0 + ISO-200); um outro grupo de camundongos recebeu flumazenil (2,0 mg, i.p.) 15 min antes do diazepam (1 mg/kg, i.p.) (FLU-2,0 + DZP-1). Os grupos controles receberam apenas veículo ou diazepam (1 mg/kg, i.p.). A dose (NASSIRI-ASL *et al.*, 2007) e tempo (HOSSEINZADEH *et al.*, 2005) utilizados para a investigação do mecanismo de ação GABAérgico com flumazenil foram utilizadas conforme previamente descrito. Os grupos experimentais foram expostos à convulsão induzida por PTZ 30 min após a administração dos tratamentos.

➤ **Teste do Campo Aberto**

Este teste foi realizado para avaliar a atividade exploratória do animal, de acordo com o método descrito por Archer (1973). O aparato utilizado na realização do experimento (para camundongos) é feito de acrílico (paredes transparentes e piso preto, 30 x 30 x 15 cm) e dividido em 9 quadrantes iguais. Após 30 (i.p.) ou 60 minutos (v.o.) da administração dos tratamentos, os animais, um por vez, foram colocados no centro do campo aberto onde o número de cruzamentos com as quatro patas (atividade locomotora espontânea; ALE), número de comportamentos de auto-limpeza (*grooming*) e o número de levantamentos

verticais (*rearing*), sem encostar as patas nas paredes, foram registrados durante um tempo de 5 minutos. Para este teste, foram utilizados 8-15 animais por grupo.

➤ **Determinação da produção de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS)/ Avaliação da peroxidação lipídica**

▪ **Método**

A peroxidação lipídica é uma das mais importantes expressões orgânicas do estresse oxidativo induzido pela reatividade de radicais livres do oxigênio. O método mais empregado para a determinação do malonildialdeído (MDA) em amostras biológicas é baseado na sua reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA). Nesta reação, duas moléculas de TBA reagem estequiometricamente com uma molécula de MDA para formar uma solução de cor rosa, que tem absorvância máxima em pH ácido em 532 a 535 nm. O coeficiente de extinção deste cromóforo em um comprimento de onda de 535 nm e pH 1,0 é de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. O método utilizado neste experimento foi descrito por HUANG *et al.* (1998), com leves modificações.

▪ **Procedimento experimental**

Os hipocampos foram homogeneizados em tampão fosfato 0,05 M, pH 7,0 a 10 % (peso/volume). Após obtenção dos homogenatos, uma alíquota de 250 µl de cada homogenato foi incubada a 37 °C por 1 h. Após o período de incubação, foi acrescentado aos homogenatos 400 µl de ácido perclórico a 35% e, em seguida, a mistura foi centrifugada durante 20 min a uma rotação de 14.000 rpm. Após centrifugação, o sobrenadante foi separado e acrescido a este 200 µL de ácido tiobarbitúrico 1,2 %. Após agitação, essa mistura foi mantida em banho maria com água fervente (100 °C) por 30 min e, logo em seguida à retirada do banho maria, a mistura foi colocada em um banho de gelo para o retorno da reação à temperatura ambiente. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado para 532 nm. Como padrão, foram utilizadas várias

concentrações de MDA (0,627 a 16,77 μmol). Os resultados foram expressos como $\mu\text{mol/mg}$ de proteína. As proteínas foram determinadas utilizando o método de Lowry *et al.* (1951).

- **Curva-padrão de Malonildialdeído (MDA)**

A partir da solução padrão de MDA (6mols), foram preparadas as soluções a 0,627; 1,247; 2,463; 4,8; 9,16 e 16,77 μmol . O branco foi confeccionado com água destilada. A leitura da absorbância foi realizada a 532nm para determinação da equação da curva-padrão de MDA.

- **Soluções reagentes**

Foram utilizadas as seguintes soluções reagentes:

- **Tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM**

1,36 mg de KH_2PO_4 (Reagen, RJ, Brasil) foram dissolvidos em 1000 mL de água destilada e o pH ajustado para 7,4.

- **Solução de ácido tricloroacético**

10 mL de ATC (Sigma, MO, EUA) mais 90mL de água bidestilada.

- **Solução de ácido tiobarbitúrico (TBA)**

50mg de TBA (Sigma, St. Louis, MO, EUA) em 50mL de água bidestilada.

➤ **Determinação da atividade da Catalase**

▪ **Método**

A atividade da catalase foi medida pelo método que usa o peróxido de hidrogênio para gerar H₂O e O₂ (MAEHL Y & CHANCE, 1954).

▪ **Procedimento experimental**

A área cerebral (HIP) foi homogeneizada em tampão fosfato 0,05 M, pH 7,0 a 10 % (peso/volume). O primeiro passo para determinação da atividade da catalase foi o preparo do meio de reação que é constituído por 9 mL de peróxido de hidrogênio diluído em água destilada (1/1000) em 0,5 mL de tampão tris-HCl 1 M EDTA 5mM, pH 8 e 0,5 mL de água mili Q. Após centrifugação de 40 µL de homogenato a 14.000 rpm por 30 min, uma amostra de 20 µL do sobrenadante foi adicionada a 980 µL do meio de reação. Após 1 min e 6 min, as absorbâncias inicial e final foram registradas a um comprimento de onda de 230 nm e os resultados expressos em µM/min/µg de proteína.. A curva padrão foi realizada utilizando catalase purificada (Sigma, MO, USA) sob condições idênticas às do ensaio. As proteínas foram determinadas utilizando o método de Lowry *et al.* (1951).

▪ **Soluções reagentes**

Foram utilizadas as seguintes soluções reagentes:

• **H₂O₂ diluído**

10 µL de peridol 30 % foram diluídos em água destilada q.s.p. 10 ml.

• **Tampão Tris-HCl 1M EDTA 5mM, pH 8,0**

Foram pesados 12,11 g de trizma base e 0,1861 g de EDTA e diluídos para 100 mL de água destilada e o pH foi ajustado para 8,0 com ácido clorídrico.

➤ **Determinação da concentração da glutathiona reduzida (GSH)**

▪ **Método**

A determinação da concentração da GSH baseia-se na reação do reagente de Ellman, o 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) com o tiol livre originando um dissulfeto misto mais ácido 2-nitro-5-tiobenzóico. A medida do produto de reação formado é feita por leitura da absorbância a 412 nm, conforme descrito anteriormente por Sedlak e Lindsay (1968).

▪ **Procedimento experimental**

A dosagem de GSH foi realizada em HIP em experimentos de convulsões, bem como em estômago e fígado após experimentos de gastroproteção (como descrito mais adiante).

Após experimentos de convulsão, homogenatos de HIP foram preparados a 10% em EDTA 0,02 M. Em seguida, foi retirado 400 µL desse homogenato e adicionado 320 µL de água destilada e 80 µL de ácido tricloroacético a 50%. O material foi agitado e centrifugado a 3.000 rpm por 15 min. Em seguida, foi recolhido 400 µL do sobrenadante e acrescido 800 µL de tampão Tris-HCl 0,4 M, pH 8,9 e 20 µL de DTNB 0,01 M. Após 1 minuto da reação, foi feita a leitura da coloração em 412 nm, através de um espectrofotômetro Beckman DU, acoplado a um sistema de modernização da Gilford, USA, o que permitiu leitura automática em sistema digital e forneceu maior sensibilidade. A concentração da glutathiona reduzida foi expressa em µg de GSH/mg de proteína. Para a realização deste experimento, foram utilizados 7-8 animais por grupo.

- **Curva-padrão de glutathiona (GSH)**

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

- **Soluções reagentes**

Foram utilizadas as seguintes soluções reagentes:

- **Solução de ácido etilenodiaminotetracético**

EDTA (Sigma, St. Louis, MO, EUA), 521,1 mg em 70 mL de água bidestilada, para preparar EDTA 0,2M. Em seguida foi retirado 30 mL desta solução inicial e acrescido mais 270 mL de água bidestilada.

- **Tampão Tris-HCl**

14,352 gramas de Tris-HCl (Trizma base, Sigma, Brasil) foram diluídos em 30 mL de EDTA 0,2 mM, mais 300 mL de água bidestilada, obtendo-se uma concentração de 0,4 M. O pH foi ajustado com solução HCl 0,1 N (MERCK, Rio de Janeiro, Brasil) para pH 8,9.

- **Solução de ácido 5:5-ditiobis-2-nitrobenzoato**

DTNB (Sigma, St. Louis, MO, EUA) 39,6mg em 10 mL de metanol absoluto.

- **Solução de ácido tricloroacético**

ATC (Sigma, St. Louis, MO, EUA) 50 mL mais 50 mL de água bidestilada.

- **Solução de glutathiona**

GSH (Sigma, St. Louis, MO, EUA) 50 mg em 50 mL de água bidestilada.

➤ **Dosagem de nitrito**

- **Método**

O reativo de Griess (N-1-naftiletilenodiamina a 0,1 % em água, sulfanilamida 1 % em ácido fosfórico 5 %) revela a presença de nitrito em uma amostra (urina, plasma, homogenato tecidual) por uma reação de diazotização que forma um cromóforo de cor róseo, com um pico de absorvância em 560 nm (GREEN *et al.*, 1981)

- **Procedimento experimental**

A área cerebral (HIP) foi homogeneizada em salina a 10 % (peso/volume). Para a realização do ensaio foram usados 100 µL do reagente de Greiss e adicionados 100 µL do sobrenadante (centrifugado) do homogenato da área cerebral de cada animal ou 100 µL dos padrões nas várias concentrações. Para o branco foram usados 100 µL do reagente de Greiss e adicionados 100 µL de salina. A leitura da absorvância foi feita em 560 nm por espectrofotometria. As leituras da absorvância dos padrões (y) foram plotadas contra as concentrações de cada padrão (x), então se determinou a equação da reta, que foi usada para a determinação da concentração de cada amostra. Para a realização deste experimento, foram utilizados 8-10 animais por grupo

- **Soluções reagentes**

Foram utilizadas as seguintes soluções reagentes:

- **NEED 0,1 % (N-1-naftiletilenodiamina)**

0,1 g de N-1-naftiletilenodiamina (Sigma, EUA) foram diluídos em 100 mL de água destilada.

- **Ácido fosfórico 5 %**

5 ml do ácido fosfórico (Sigma, EUA) foram diluídos para um volume final de 100 mL em balão volumétrico.

- **Sulfanilamida 1 % em ácido fosfórico 5 %**

1 g de sulfanilamida (Sigma, EUA) foram dissolvidos em um volume final de 100 mL de ácido fosfórico.

- **Reagente de uso (Reagente de Greiss)**

Misturaram-se partes iguais de NEED 0,1 %, água bidestilada, sulfanilamida a 1 % e ácido fosfórico a 5 % (1:1:1:1).

➤ **Dosagem de proteína (Método de Lowry)**

- **Método**

A quantidade de proteína em homogenatos de HIP (quando para a determinação da concentração de GSH, peroxidação lipídica, nitrito e atividade da catalase), bem como em estômago ou fígado (quando para a determinação da concentração de GSH), foi determinada a 25 °C utilizando albumina sérica bovina como padrão, de acordo com o método previamente descrito (LOWRY *et al.*, 1951), que utiliza duas reações de formação de cor para analisar a concentração proteica fotometricamente. Inicialmente é feita uma reação biureto de baixa eficiência na qual os íons de cobre alcalino produzem uma cor azulada na presença de

ligações peptídicas. Esta cor biureto é característica de todas as proteínas e fornece uma cor básica de fundo para a próxima etapa de ensaio. Depois o método emprega uma mistura complexa de sais inorgânicos, o reagente Folin-Ciocalteu, que produz uma cor verde azulada intensa na presença de tirosina ou triptófano livres ou ligados a proteínas. Como as quantidades desses dois aminoácidos são geralmente constantes nas proteínas solúveis, com poucas exceções, a cor das reações (verde-azulada) é indicativa da presença de proteína e a intensidade da cor proporcional à concentração. Esta coloração foi medida em 750 nm, através de espectrofotômetro Beckman DU 640B, acoplado a um sistema de modernização da Gilford, USA. A dosagem de proteínas foi realizada utilizando os mesmos homogenatos confeccionados para cada uma das dosagens de: peroxidação lipídica, GSH e atividade da catalase.

- **Soluções reagentes**

- **Reagente A:**

Na_2CO_3 (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) a 2 % em NaOH (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) 0,1 N;

- **Reagente B:**

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 0,5 % em $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Grupo Química, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) a 1 %;

- **Reagente C:**

Solução de cobre alcalino (24 mL do reagente A com 1 mL do reagente B, misturados no momento de usar);

- **Reagente de Folin:**

Ciocalteu - Fenol (Labordin, Piraquara, PR, Brasil), 1:1 em água bidestilada;

- **Solução de albumina sérica bovina**

1 mg/mL de albumina sérica bovina (Sigma, St Louis, MO, USA) em água bidestilada.

5.2.4 Resultados

5.2.4.1 Estudo comportamental

➤ Efeitos do isopulegol nas convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol

Como mostrado na **Figura 25 A**, o pré-tratamento dos animais com isopulegol, intraperitonealmente, na dose de 200 mg/kg promoveu um significativo aumento na latência (s) para o desenvolvimento das convulsões, quando comparado ao grupo controle tratado com veículo previamente ao PTZ (Salina + PTZ: $144,2 \pm 20,10$ s; ISO-200 + PTZ: $919,3 \pm 90,70$ s; $p < 0,05$). O aumento observado com as doses de 25 mg/kg (ISO-25 + PTZ: $173,9 \pm 23,23$ s), 50 mg/kg (ISO-50 + PTZ: $204,6 \pm 32,24$ s) e 100 mg/kg (ISO-100 + PTZ: $293,3 \pm 78,61$) não foram considerados estatisticamente significantes, quando comparado ao controle tratado com veículo. Como esperado, o DZP promoveu um significativo aumento na latência (s) para as convulsões (DZP-1 + PTZ: $856,9 \pm 118,90$ s, $p < 0,05$), quando comparado ao controle.

A **Figura 26 A** mostra que o isopulegol, i.p., causou um aumento dose-dependente na latência para a mortalidade dos animais em três doses testadas (Salina + PTZ: $478,3 \pm 67,38$ s; ISO-50 + PTZ: $725,1 \pm 70,79$ s; ISO-100 + PTZ: $824,9 \pm 116,10$ s; ISO-200 + PTZ: $1.200,0 \pm 0,0$ s; $p < 0,05$), comparadas ao controle, enquanto a dose de 25 mg/kg não induziu alteração significativa (ISO-25 + PTZ: $596,1 \pm 78,44$ s). Como esperado, resultados semelhantes foram obtidos com o DZP (DZP-1 + PTZ: $1.200,0 \pm 0,0$ s; $p < 0,05$). Quando calculado o percentual de mortalidade, verificou-se que, similarmente ao DZP, o isopulegol na dose de 200 mg/kg protegeu 100 % dos animais da morte, enquanto a dose de 50 e 100 mg/kg causaram uma proteção de 12,5%, quando comparado ao controle (0,0% de proteção).

Quando administrado oralmente, o isopulegol também causou aumento significativo na latência para o desenvolvimento das convulsões apenas na dose de 200 mg/kg, quando comparado ao controle tratado com veículo previamente ao PTZ (Salina + PTZ: $66,36 \pm 3,23$ s; ISO-200 + PTZ: $177,4$ s; $p < 0,05$). De maneira semelhante ao observado com a administração intraperitoneal, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes

nas doses de 25 mg/kg (ISO-25 + PTZ: $107,2 \pm 18,86$ s), 50 mg/kg (ISO-50 + PTZ: $110,3 \pm 10,74$ s) e 100 mg/kg (ISO-100 + PTZ: $133,4 \pm 12,12$). Como esperado, o DZP também promoveu um significativo aumento na latência (s) para as convulsões (DZP-1 + PTZ: $363,6 \pm 47,76$ s, $p < 0,05$), quando comparado ao controle (**Figura 25 B**).

A **Figura 26 B** mostra que o isopulegol administrado oralmente também causou um aumento dose-dependente na latência para a mortalidade dos animais em três doses testadas (Salina + PTZ: $296,9 \pm 26,43$ s; ISO-50 + PTZ: $629 \pm 77,14$ s; ISO-100 + PTZ: $871,7 \pm 117,3$ s; ISO-200 + PTZ: $1075 \pm 79,36$ s; $p < 0,05$), enquanto a dose de 25 mg/kg não induziu alterações significantes (ISO-25 + PTZ: $447,8 \pm 68,24$ s), quando comparado ao controle. Como esperado, resultados semelhantes foram obtidos com o DZP (DZP-1 + PTZ: $1030 \pm 109,8$ s; $p < 0,05$). Quando calculado o percentual de mortalidade, verificou-se que o isopulegol na dose de 100 e 200 mg/kg protegeram 25 e 50 % dos animais da morte, respectivamente, enquanto nas doses de 25 e 50 mg/kg não foram observados animais sobreviventes, quando comparado ao controle (0,0 % de sobrevivência). O Diazepam (1 mg/kg, v.o.) protegeu 62,5% da morte.

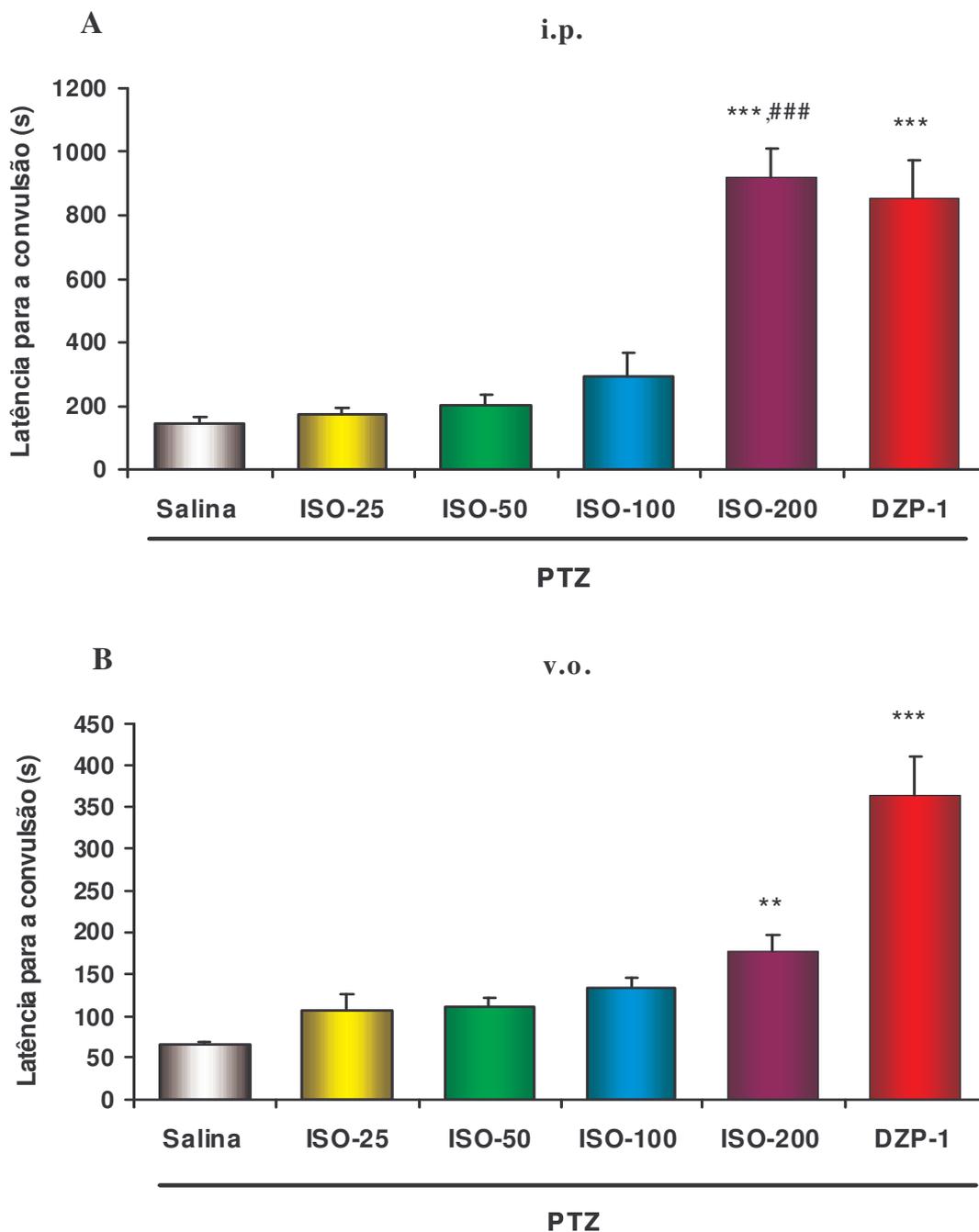


Figura 25. Efeitos do isopulegol, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre a latência para o desenvolvimento das convulsões induzidas por PTZ em camundongos.

Nota: Os animais receberam isopulegol (25, 50, 100 e 200 mg/kg, i.p. ou v.o.), DZP (1 mg/kg, i.p. ou v.o.) ou veículo (salina em 3% de Tween 80, i.p. ou v.o.) 30 min (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes de receberem PTZ (99 mg/kg, s.c.). A latência para o desenvolvimento das convulsões é mostrada em **A** (i.p.) e **B** (v.o.). Os valores representam a média \pm E.P.M. (n = 8-10 camundongos). Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs controle; ### $p < 0,001$, quando comparado ao grupo do ISO-100.

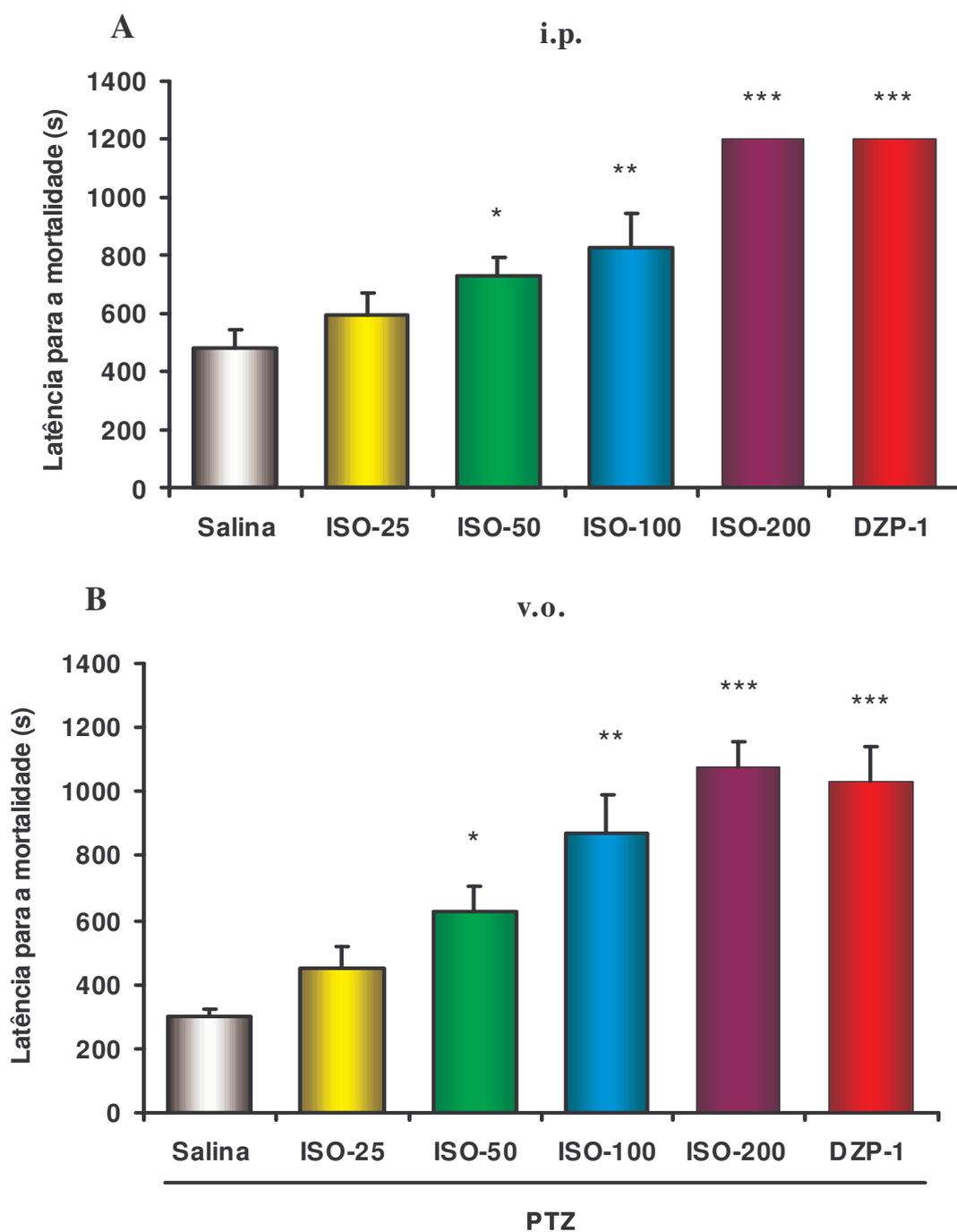


Figura 26. Efeitos do isopulegol, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre a latência para a mortalidade induzida por PTZ em camundongos.

Nota: Os animais receberam isopulegol (25, 50, 100 e 200 mg/kg, i.p. ou v.o.), DZP (1 mg/kg, i.p. ou v.o.) ou veículo (salina em 3% de Tween 80, i.p. ou v.o.) 30 min (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes de receberem PTZ (99 mg/kg, s.c.). A latência para a mortalidade dos animais é mostrada em **A** (i.p.) e **B** (v.o.). Os valores representam a média \pm E.P.M. (n = 8-10 camundongos). Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs controle.

➤ **Efeitos do flumazenil na atividade anticonvulsivante do isopulegol**

Quando comparado ao grupo controle tratado com veículo (Salina + PTZ: $139,1 \pm 18,1$ s), o tratamento com isopulegol (200 mg/kg, i.p.) aumentou a latência para o início das convulsões, e o pré-tratamento dos animais com flumazenil (2 mg/kg, i.p.) reverteu esta alteração (Salina + ISO-200 + PTZ: $959,4 \pm 86,5$ s; FLU-2 + ISO-200 + PTZ: $318,7 \pm 75,9$ s; FLU-2 + Salina + PTZ: $90,6 \pm 26,8$ s; $p < 0,05$), de forma semelhante ao ocorrido para o diazepam (Salina + DZP-1 + PTZ: $911,6 \pm 66,61$ s; FLU-2 + DZP-1 + PTZ: $186,3 \pm 44,5$ s; $p < 0,05$), (**Figura 27 A**). Entretanto, o flumazenil não promoveu reversão no aumento do tempo de latência para a mortalidade induzido pelo isopulegol (Salina + ISO-200 + PTZ: $1.200 \pm 0,00$; FLU-2 + ISO-200 + PTZ: $1.200 \pm 0,00$ s), e pelo diazepam (Salina + DZP-1 + PTZ: $1200 \pm 0,00$ s; FLU-2 + DZP-1 + PTZ: $1166 \pm 22,19$ s; $p < 0,05$) (**Figura 27 B**). Conseqüentemente, não foi observada reversão no percentual de morte nos animais pré-tratados com isopulegol e diazepam, quando comparado ao grupo controle (0,0%). Os animais tratados apenas com flumazenil não apresentaram nenhuma alteração significativa nos parâmetros observados, quando comparado aos respectivos controles (**Figura 27 A e B**).

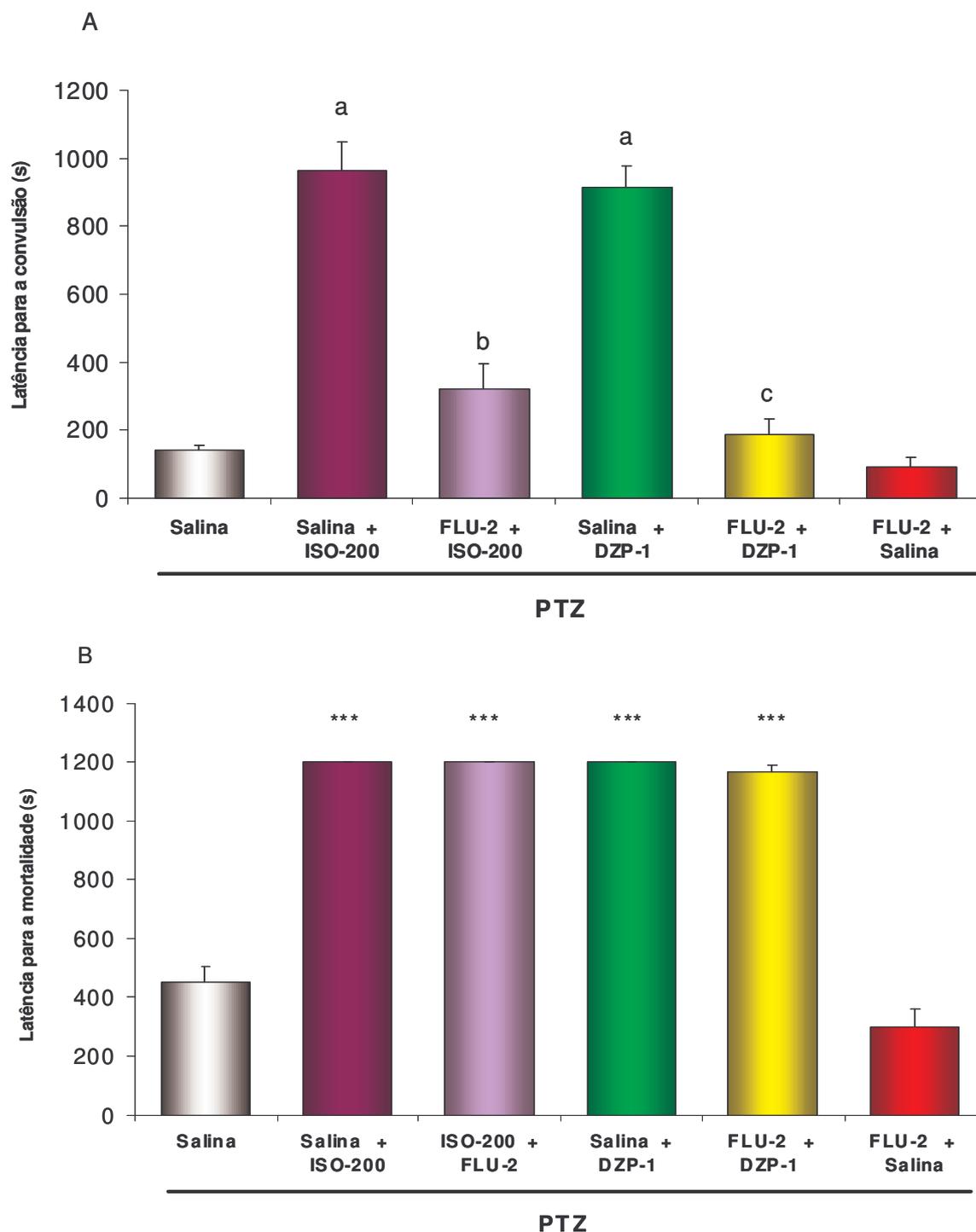


Figura 27. Efeitos do flumazenil sobre as ações do isopulegol na latência para o desenvolvimento das convulsões (A) e mortalidade (B) induzidas por PTZ em camundongos.

Nota: Os animais receberam flumazenil (2 mg/kg, i.p.) 15 min antes dos tratamentos com isopulegol (25, 50, 100 e 200 mg/kg, i.p.), DZP (1 mg/kg, i.p.) ou veículo (salina em 3% de Tween 80, i.p.). Após 30 min, eles receberam receberem PTZ (99 mg/kg, s.c.). A latência para o desenvolvimento das convulsões é mostrada em **A**, enquanto a latência para a mortalidade dos animais é mostrada em **B**. Os valores representam a média \pm E.P.M. (n = 8-10 camundongos). Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. a $p < 0,001$ vs controle; b $p < 0,001$ vs ISO-200; c $p < 0,001$ vs DZP-1; *** $p < 0,001$ vs controle.

➤ **Atividade locomotora espontânea no teste do campo aberto**

Considerando a possível propriedade depressora do isopulegol, a ALE dos animais foi também observada no teste do campo aberto com as doses utilizadas no presente capítulo (100 e 200 mg/kg , i.p. e v.o.).

O tratamento intraperitoneal com isopulegol nas doses de 100 e 200 mg/kg foi capaz de induzir significativa redução na atividade locomotora dos animais, em ambas as doses testadas e de maneira dose dependente [ALE (i.p.): ISO-100: $51,44 \pm 3,35$; ISO-200: $24,56 \pm 2,77$; $p < 0,05$], com relação ao controle intraperitoneal ($61,25 \pm 1,78$) (**Figura 28 A**). Similarmente, o tratamento oral também induziu alteração significativa neste parâmetro, embora em intensidade menor [ALE (v.o.): ISO-100: $69,4 \pm 4,50$; ISO-200: $59,8 \pm 5,41$; $p < 0,05$], quando comparado ao controle oral ($81,2 \pm 3,52$) (**Figura 28 B**). O diazepam 2 mg/kg, i.p., usado como droga padrão, como esperado, também reduziu a ALE dos animais, com relação aos grupos controles i.p. e v.o. (DZP-2, i.p.: $33,6 \pm 2,44$; DZP-2, v.o.: $42,78 \pm 3,35$; $p < 0,05$) (**Figura 28 A e B**).

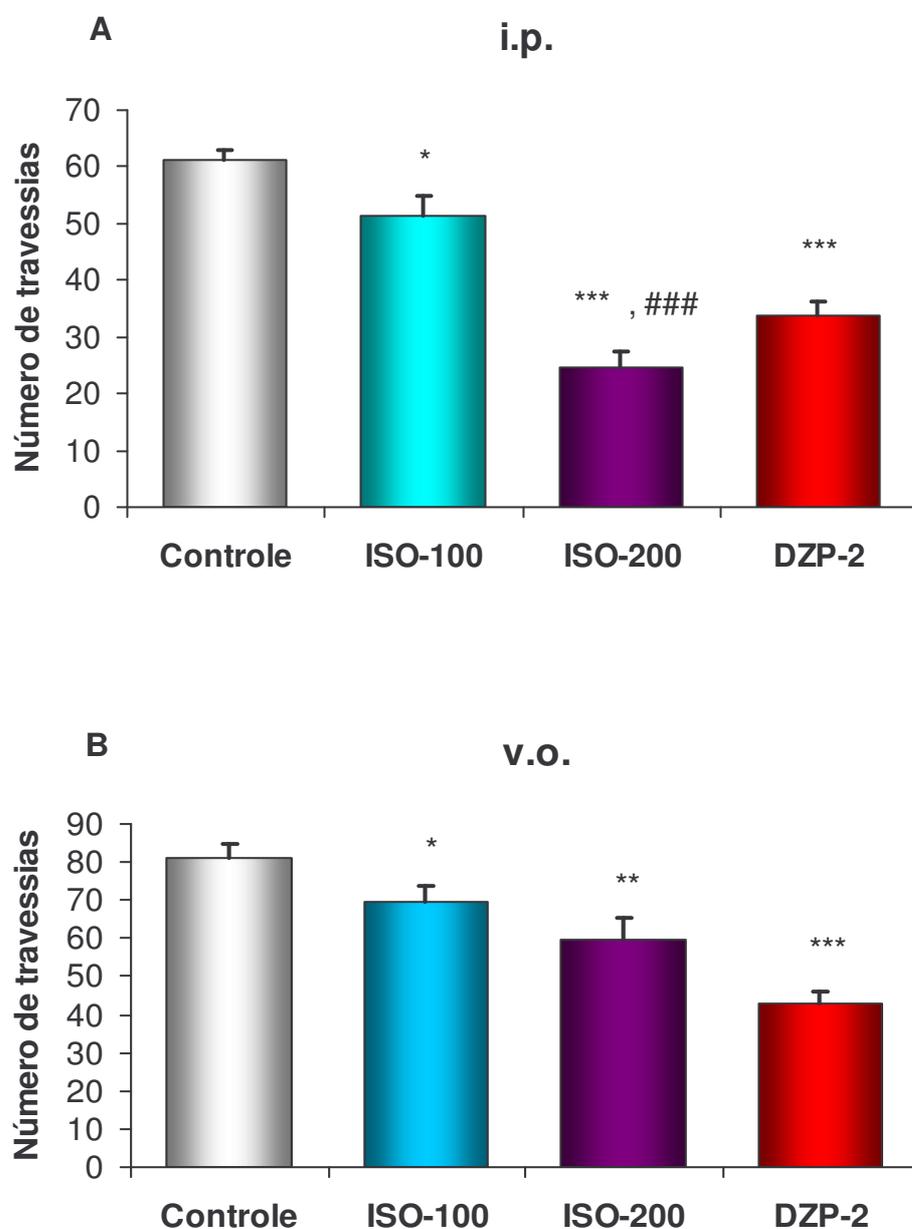


Figura 28. Efeito do isopulegol, via intraperitoneal (A) e oral (B), sobre a atividade locomotora espontânea no teste do campo aberto.

Nota: Isopulegol (ISO 100 e 200 mg/kg, i.p. ou v.o.), diazepam (DZP, 2 mg/kg, i.p.) ou veículo/controle (salina a 0,9% em 3 % de Tween 80, i.p. ou v.o.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores representam a média ± E.P.M. do número de travessias durante 5 min (n = 8 camundongos). Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs controle; ### $p < 0,001$ vs ISO-100.

5.2.4.2 Dosagens bioquímicas em hipocampo de camundongos

➤ **Efeitos do isopulegol sobre a produção de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) em hipocampo de camundongos submetidos ao teste de convulsão induzida por PTZ.**

Os resultados da análise da produção de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) em hipocampo de camundongos foram expressos em μmol de MDA (malonildialdeído)/ mg de proteína, como um indicador de peroxidação lipídica.

Um aumento significativo na concentração de MDA, em relação ao grupo controle, foi evidenciado no hipocampo dos animais tratados com PTZ. Esse aumento foi revertido pelo pré-tratamento com isopulegol em ambas as doses testadas (Salina: $8,2 \pm 0,39$; Saline + PTZ: $9,9 \pm 0,39$; ISO-100 + PTZ: $8,0 \pm 0,44$; ISO-200 + PTZ: $8,1 \pm 0,31$; $p < 0,05$). Os animais tratados apenas com isopulegol, em ambas as doses, e não expostos ao agente estressor não apresentaram alterações na concentração de MDA em relação ao grupo controle (ISO-100 + Salina: $8,5 \pm 0,33$; ISO-200 + Salina: $8,5 \pm 0,49$) (**Figura 29**).

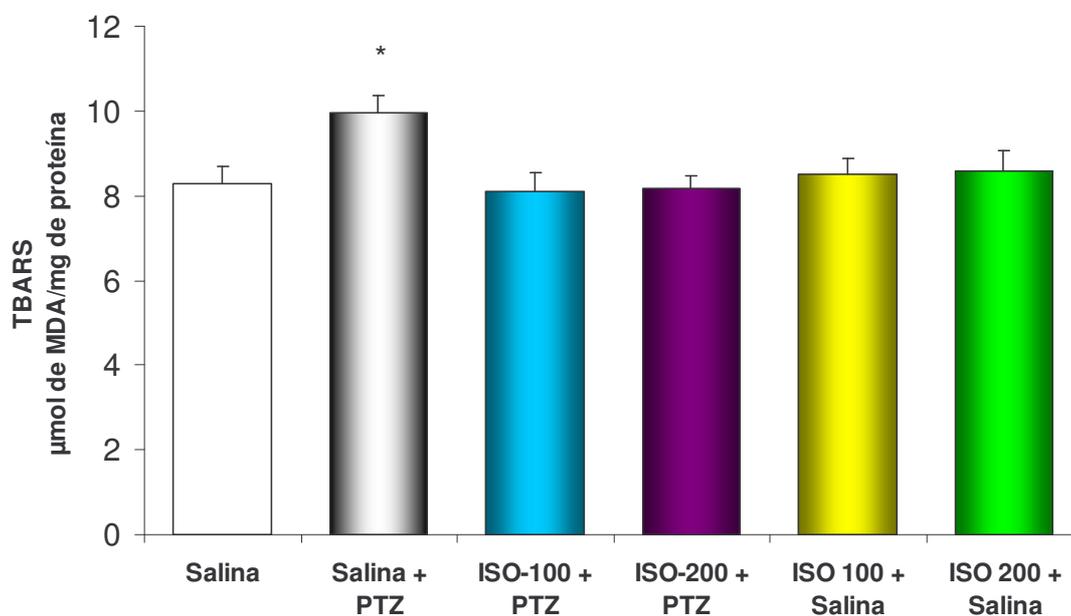


Figura 29. Efeito do isopulegol sobre a produção de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) em hipocampo de camundongos submetidos à convulsão induzida por PTZ.

Nota: Os animais foram tratados com isopulegol (100 e 200 mg/kg, i.p) ou veículo (salina em 3% de Tween 80, i.p.) 30 min antes de receberem PTZ (99 mg/kg, s.c.). Grupos distintos de animais receberam apenas isopulegol (100 e 200 mg/kg, i.p) ou veículo e não foram expostos ao PTZ. Os valores representam a média \pm E.P.M. (n = 8-10 camundongos). Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste post hoc. * $p < 0,05$ vs controle. MDA: malonildialdeído.

➤ **Efeitos do isopulegol sobre a atividade da catalase em hipocampo de camundongos submetidos ao teste de convulsão induzida por PTZ.**

A **Figura 30** mostra uma significativa redução na atividade da catalase, evidenciada no hipocampo dos animais tratados com PTZ, quando comparado com o grupo controle tratado com veículo (Salina: $40,8 \pm 3,2$; Salina + PTZ: $26,4 \pm 3,0$; $p < 0,05$). O pré-tratamento dos animais com isopulegol, em ambas as doses testadas, foi capaz de manter a atividade da catalase aos níveis normais, semelhante ao observado no grupo controle tratado apenas com salina (ISO-100 + PTZ: $41,1 \pm 2,8$; ISO-200 + PTZ: $35,4 \pm 2,8$). A atividade da catalase nos animais tratados apenas com isopulegol, em ambas as doses, não foi estatisticamente diferente dos valores observados no controle (ISO-100 + Salina: $39,56 \pm 3,78$; ISO-200 + Salina: $42,55 \pm 2,84$).

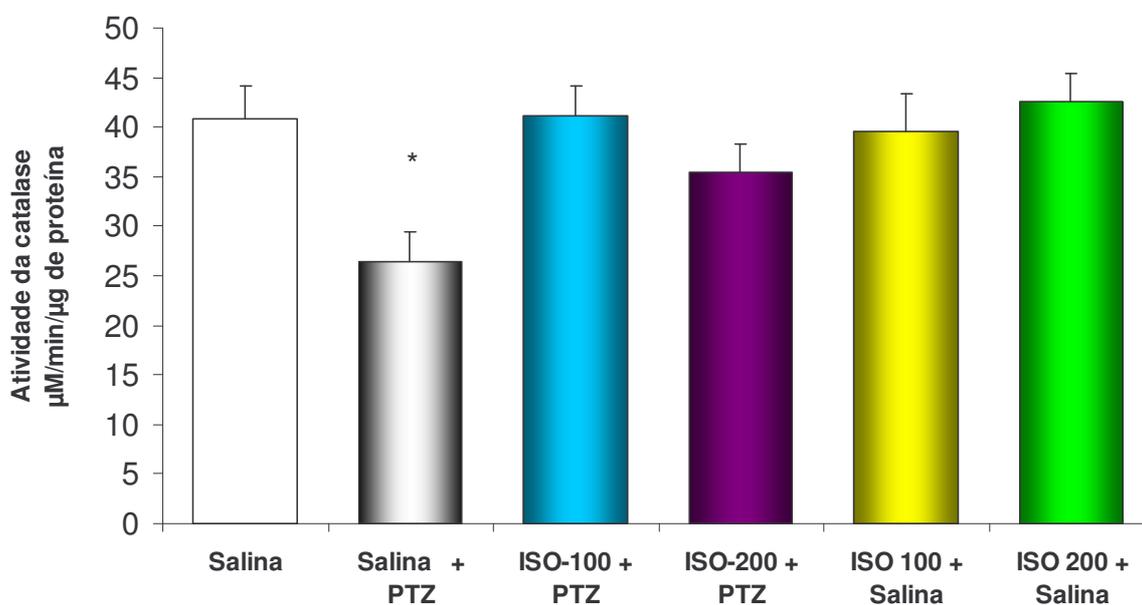


Figura 30. Efeitos do isopulegol sobre a atividade da catalase em hipocampo de camundongos submetidos ao teste de convulsão induzida por PTZ.

Nota: Os animais foram tratados com isopulegol (100 e 200 mg/kg, i.p) ou veículo (salina em 3% de Tween 80, i.p.) 30 min antes de receberem PTZ (99 mg/kg, s.c.). Grupos distintos de animais receberam apenas isopulegol (100 e 200 mg/kg, i.p) ou veículo e não foram expostos ao PTZ. Os valores representam a média \pm E.P.M. (n = 8-10 camundongos). Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste post hoc. * $p < 0,05$ vs controle.

➤ **Efeitos do isopulegol sobre a concentração da glutathiona reduzida (GSH) em hipocampo de camundongos submetidos ao teste de convulsão induzida por PTZ.**

Na **Figura 31** observa-se que o tratamento dos animais com PTZ resultou em conteúdo de GSH significativamente diminuído em hipocampo, quando comparado ao grupo controle tratado com veículo (salina: $390,0 \pm 18,11$; Salina + PTZ: $264,2 \pm 23,31$; $p < 0,05$). Interessantemente, o pré-tratamento com isopulegol não apenas restaurou o conteúdo de GSH (na dose de 100 mg/kg) (ISO-100 + PTZ: $359,6 \pm 14,70$; $p < 0,05$), mas também promoveu um significativo aumento do GSH nos animais pré-tratados com a mais alta dose de isopulegol (ISO-200 + PTZ: $537,2 \pm 57,52$; $p < 0,05$), quando comparado ao controle. A concentração de GSH também foi aumentada nos grupos tratados com isopulegol e não expostos ao agente estressor (ISO-100 + Salina: $469,1 \pm 46,71$; ISO-200 + Salina: $535,2 \pm 35,19$; $p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle.

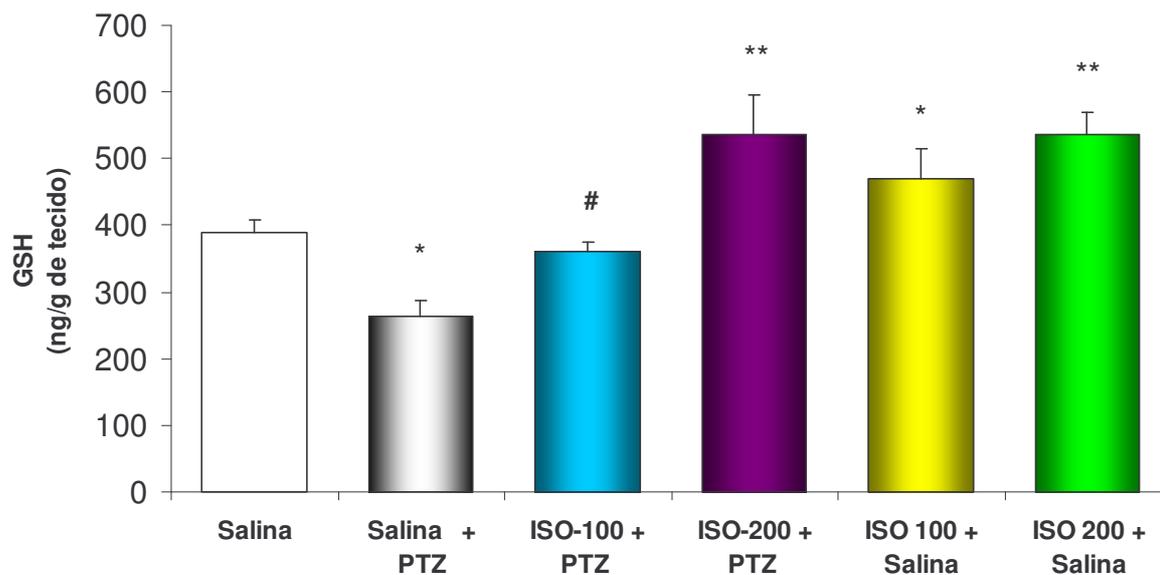


Figura 31. Efeitos do isopulegol sobre a concentração da glutathiona reduzida (GSH) em hipocampo de camundongos submetidos ao teste de convulsão induzida por PTZ.

Nota: Os animais foram tratados com isopulegol (100 e 200 mg/kg, i.p) ou veículo (salina em 3% de Tween 80, i.p.) 30 min antes de receberem PTZ (99 mg/kg, s.c.). Grupos distintos de animais receberam apenas isopulegol (100 e 200 mg/kg, i.p) ou veículo e não foram expostos ao PTZ. Os valores representam a média \pm E.P.M. (n = 8-10 camundongos). Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste post hoc. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs controle; # $p < 0,05$ vs PTZ.

➤ **Efeitos do isopulegol sobre a produção de nitrito em hipocampo de camundongos submetidos ao teste de convulsão induzida por PTZ.**

A produção de nitrito em hipocampo de camundongos tratados ou não com isopulegol (100 e 200 mg/kg, i.p.) antes da administração de PTZ (99 mg/kg, s.c.) é mostrada na **Figura 32**. Um aumento significativo na concentração de nitrito foi evidenciado no hipocampo dos animais tratados apenas com PTZ, em relação ao grupo controle (Salina: $3,1 \pm 0,28$; Salina + PTZ: $5,5 \pm 0,64$; $p < 0,05$). O pré-tratamento com isopulegol não foi capaz de reverter esse aumento (ISO-100 + PTZ: $5,2 \pm 0,41$; ISO-200 + PTZ: $5,7 \pm 0,68$).

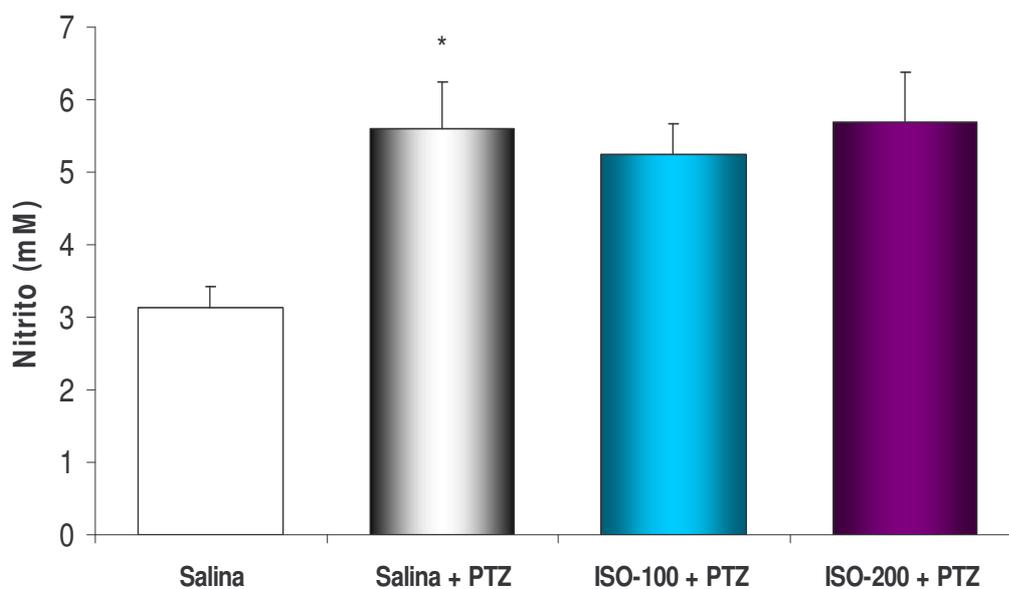


Figura 32. Efeitos do isopulegol sobre a produção de nitrito em hipocampo de camundongos submetidos ao teste de convulsão induzida por PTZ.

Nota: Os animais foram tratados com isopulegol (100 e 200 mg/kg, i.p) ou veículo (salina em 3% de Tween 80, i.p.) 30 min antes de receberem PTZ (99 mg/kg, s.c.). Os valores representam a média \pm E.P.M. (n = 8 camundongos). Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste post hoc. * $p < 0,05$ vs controle/salina.

5.2.5 Discussão

Estudos prévios evidenciaram um provável efeito depressor do SNC induzido pelo isopulegol (DE SOUSA *et al.*, 2008). Corroborando com esses dados, no **Capítulo I** foi mostrado que o isopulegol apresentou possíveis efeitos ansiolítico e depressor do CNS em modelos experimentais de ansiedade e depressão. Tais ações foram, possivelmente, relacionadas ao sistema GABAérgico, em específico, ao sítio de ação benzodiazepínico. Considerando que o bloqueio das convulsões induzidas por PTZ, em roedores, é uma característica frequentemente encontrada em substâncias com efeitos depressores do SNC, o presente capítulo teve como objetivo verificar se o isopulegol seria capaz de promover proteção contra convulsões induzidas por PTZ em camundongos, bem como investigar possíveis mecanismos envolvidos nesta ação. Os resultados deste estudo demonstram pela primeira vez uma possível atividade anticonvulsivante do isopulegol em camundongos.

Nossos resultados mostraram que o isopulegol, na maior dose testada, prolongou a latência para o desenvolvimento das convulsões induzidas por PTZ, e aumentou a latência de morte dos animais de uma maneira dose dependente. Quando calculado o percentual de proteção contra a mortalidade, observou-se que todos os animais sobreviveram com a maior dose de isopulegol testada, administrado intraperitonealmente. Similarmente, no grupo que recebeu DZP, como esperado, ocorreu um aumento da latência para o desenvolvimento das convulsões, bem como foi observado ausência de mortalidade quando administrado intraperitonealmente. Quando doses relativamente baixas de PTZ (ex.: 60 mg/kg) são usadas, as substâncias que completamente inibem as convulsões são consideradas apresentarem potencial anticonvulsivante, semelhantemente aos efeitos promovidos por altas doses de DZP (ex.: 4 mg/kg) (OLIVEIRA *et al.*, 2006; DE ALMEIDA *et al.*, 2008). No entanto, quando altas doses de PTZ são usadas (SWIADER *et al.*, 2006), como no presente estudo, o aumento da latência para o aparecimento das convulsões (sem inibir completamente tais convulsões) é um forte indicativo de uma ação anticonvulsivante, o que também foi observado com diazepam na dose de 1 mg/kg, usado no presente estudo. Já a proteção contra a mortalidade caracteriza um potencial bioprotetor da substância. Nesse contexto, nossos resultados sugerem que o isopulegol apresenta uma possível ação anticonvulsivante e bioprotetora (contra a morte), semelhante àquela promovida pelo DZP e por diversos outros terpenos (GALATI *et al.*, 2004; HOSSEINZADEH *et al.*, 2005; DE ALMEIDA *et al.*, 2008).

O receptor GABA_A medeia a maioria da neurotransmissão inibitória no SNC dos mamíferos e, conseqüentemente, consiste em um alvo para as pesquisas sobre a fisiopatogenia e terapêutica da epilepsia (GROVES *et al.*, 2006). É largamente reconhecido que o PTZ leva a convulsões tônico-clônicas por suprimir os efeitos inibitórios da transmissão GABAérgica (FRADLEY *et al.*, 2007; CRESTANI *et al.*, 2002). De forma semelhante a vários monoterpenos, tais como o mentol e isomentol (WATT *et al.*, 2008), borneol (GRANGER *et al.*, 2005; JOHNSTON *et al.*, 2009) e timol (PRIESTLEY *et al.*, 2003), como referido anteriormente, o isopulegol foi recentemente descrito como um modulador alostérico positivo dos receptores GABA_A (WATT *et al.*, 2006). Considerando os dados destes estudos, para investigar se a possível ação anticonvulsivante do isopulegol seria dependente dos receptores GABA, especialmente no sítio de ação benzodiazepínico (BZP), foi utilizado o flumazenil, um antagonista dos receptores GABA_A/BZP. Nossos resultados mostraram que o pré-tratamento com flumazenil diminuiu o aumento da latência para a convulsão induzido pelo isopulegol e dizepam, sugerindo um possível envolvimento da ativação dos sítios benzodiazepínicos do receptor GABA_A. Esses resultados estão de acordo com aqueles mostrados no **Capítulo I**, onde foi observado que a provável ação ansiolítica induzida pelo isopulegol foi revertida pela prévia administração de flumazenil.

Por outro lado, nossos resultados mostraram que o flumazenil não foi capaz de reverter o aumento da latência para a mortalidade dos animais e, conseqüentemente, os percentuais de proteção contra a morte, calculados para o isopulegol e DZP, também não foram significativamente alterados. Nassiri-Asl *et al.* (2007) relataram que, após o tratamento prévio com flumazenil, o diazepam continuou protegendo os animais da morte em 70%, porém, foi observada uma reversão significante de 30 %. A divergência entre os estudos, provavelmente, se deve ao período total de observação dos animais (*cut-off*). No presente trabalho, foi utilizado um tempo de *cut-off* de 20 minutos, enquanto no estudo citado foi de 30 min. Desta forma, a morte dos animais nos grupos pré-tratados com flumazenil observada por Nassiri-Asl e colaboradores, provavelmente, pode ter sido observada mais tardiamente. Desta forma, no presente estudo, em um período menor de observação dos animais, não foi detectada a reversão da proteção de morte pelo uso prévio do flumazenil. Ainda, uma dose maior de PTZ foi utilizada no presente estudo. Mesmo considerando a reversão significante da mortalidade do diazepam com a utilização prévia do flumazenil no estudo citado, observa-se que a proteção continuou ocorrendo em grande percentual, sugerindo que outros mecanismos

possam estar envolvidos na ação bioprotetora do diazepam. Desta forma, nossos resultados sugerem que outros mecanismos de proteção neuronal possam estar envolvidos também nas ações anticonvulsivantes do isopulegol.

Como referido anteriormente, diversos estudos têm evidenciado o envolvimento das ERO nas convulsões e efeitos neurotóxicos induzidos pelo PTZ (OBAY *et al.*, 2008; AKBASA *et al.*, 2005). Nas últimas décadas, várias substâncias de origem natural dotadas de atividade anticonvulsivante apresentaram também propriedades antioxidantes (HSIEH *et al.*, 1999; ILHAN *et al.*, 2005). Nesse contexto, no presente capítulo, nós também investigamos se alguma ação antioxidante estaria envolvida na provável atividade anticonvulsivante do isopulegol. Para isto, foi investigado o grau de peroxidação lipídica, a concentração de GSH e de nitrito, bem como foi verificada a atividade da catalase no hipocampo dos animais.

Todos os componentes da célula são suscetíveis à ação das ERO, porém a membrana é uma das mais atingidas em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na sua estrutura e permeabilidade (VAN DER KRAAIJ *et al.*, 1988). Conseqüentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos (como o malonaldeído), culminando com a morte celular (HERSHKO, 1989). Embora nem sempre os processos de lipoperoxidação sejam prejudiciais, pois seus produtos são importantes na reação em cascata a partir do ácido araquidônico (formação de prostaglandinas) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990), o excesso de tais produtos pode ser lesivo (ROSS; MOLDEUS, 1991), sobretudo ao cérebro, que contém grande quantidade de lipídeos de membrana.

Estudos mostram que o PTZ é capaz de disparar a ativação de fosfolipases de membrana, proteases e nucleases, as quais causam a degradação de fosfolipídeos de membrana e a lise de proteínas do citoesqueleto (AKBASA *et al.*, 2005; OBAY *et al.*, 2008). De fato, de acordo com estes dados, os resultados do presente estudo mostraram que as convulsões induzidas pelo PTZ levaram a um aumento de peroxidação lipídica no hipocampo dos camundongos. O pré-tratamento dos animais com ambas as doses de isopulegol (100 e 200 mg/kg) significativamente preveniu este efeito, quando comparado aos animais controle tratados apenas com veículo. Dados na literatura mostram que convulsões seguidas por elevação de peroxidação lipídica em tecidos cerebrais podem ser diminuídas pela administração de substâncias com propriedades anticonvulsivantes, incluindo compostos

naturais como monoterpenos (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Assim, nossos resultados sugerem que, pelo menos em parte, as atividades anticonvulsivante e bioprotetora do isopulegol estão, provavelmente, relacionadas à possíveis efeitos antioxidantes contra peroxidação lipídica no hipocampo dos animais.

Espécies reativas do oxigênio tais como o íon superóxido, o radical hidroxila e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), são constantemente produzidas no cérebro, em decorrência do metabolismo celular aeróbico. A conversão do H₂O₂ à H₂O pode ser feita pelas enzimas catalase e glutathione peroxidase. De fato, a super expressão dos genes para estas enzimas em culturas hipocámpais e corticais primárias de fetos de ratos, reduziu a neurotoxicidade induzida por ácido cáinico, glutamato, cianeto de sódio e deprivação cerebral de oxigênio/glicose, a qual foi acompanhada por reduções do acúmulo de peróxido de hidrogênio e da extensão da peroxidação lipídica (WANG *et al.*, 2003).

No presente estudo, foi observada uma redução da atividade da catalase nos hipocampus dos animais tratados com PTZ, demonstrando uma alteração nas defesas antioxidantes nessa região cerebral após a administração do agente estressor. Estudos prévios (FREITAS *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2006) mostraram que a catalase está envolvida com a patogênese da epilepsia induzida pela pilocarpina. No entanto, neste modelo de convulsão os autores observaram um aumento na atividade da catalase no cerebelo, hipocampo, CPF e CE. Por outro lado, a catalase também já foi demonstrada estar envolvida nas convulsões induzidas por PTZ e, nesses estudos, foi observada uma redução da atividade desta enzima (OBAY *et al.*, 2008), semelhante ao observado no presente estudo. Desta forma, pode ser observado que diferentes drogas convulsivantes interferem com a atividade da catalase de maneiras diversificadas. Assim, a redução da atividade da catalase causada pelo PTZ observada no presente estudo pode estar associada a um aumento excessivo no conteúdo de H₂O₂ e possível geração de radicais hidroxil, sugerindo a participação do stresse oxidativo nas ações do PTZ no cérebro de camundongos. Além disso, estudos demonstram que, quando produzidas em excesso, as ERO podem causar inativação enzimática (SHARMA *et al.*, 2007), como observado em nossos resultados. Quando os animais foram pré-tratados com isopulegol, verificou-se que a atividade da catalase foi preservada aos níveis normais observados no grupo controle. Esses resultados sugerem que o isopulegol poderia estar auxiliando as células cerebrais no combate à superprodução de ERO e conseqüente dano oxidativo induzido pelo PTZ.

A glutathiona reduzida (GSH) é um tripeptídeo endógeno presente em todas as células de mamíferos. Pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes como íons ferro (GALLEANO; PUNTARULO, 1995), oxigênio hiperbárico, ozônio, radiação e luz ultravioleta (DENEKE; FANBURG, 1989). Além disso, participa da eliminação de produtos da lipoperoxidação e do combate às ERO (OLIVEIRA *et al.*, 2006). O poder antioxidante da GSH foi demonstrado pelo aumento da sobrevivência de 90 % de ratos submetidos à hiperóxia e tratados com instilação de eritrócitos na traquéia. Este resultado foi atribuído à GSH intra-eritrocitária, que protege contra o choque de pulmão induzido pelo estresse oxidativo resultante da hiperóxia (VAN ASBECK *et al.*, 1985).

No presente estudo, o tratamento dos animais com PTZ resultou na diminuição da concentração de GSH em seus hipocampos. Estudos prévios demonstraram similares resultados após convulsões induzidas por PTZ (OBAY *et al.*, 2008), bem como induzidas por outros agentes convulsivantes (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Interessantemente, a administração prévia do isopulegol não apenas preveniu a perda de GSH induzida pelo PTZ, como também promoveu um aumento em seu conteúdo nos animais que não foram expostos ao agente estressor. Esses resultados sugerem que o isopulegol, por si só, poderia estar induzindo um aumento na concentração de GSH nos hipocampos dos animais. No entanto, o mecanismo pelo qual o isopulegol estaria aumentando o conteúdo de GSH (se prevenindo a depleção ou aumentando a síntese), necessita de investigações futuras.

As ERO produzidas durante processos convulsivos podem também ativar os mecanismos envolvidos na excitotoxicidade glutamatérgica (BONFOCO *et al.*, 1995; UEDA *et al.*, 1997). A ativação dos receptores glutamatérgicos pelo glutamato, principalmente os receptores NMDA, provoca um aumento na atividade da NOS, com consequente produção de NO neuronal à partir da L-arginina (NAKAKI *et al.*, 2000). Em determinadas condições, o NO e o O_2^- podem interagir, resultando na formação de peroxinitrito (ONOO⁻), um produto extremamente tóxico, capaz de reagir com diversas moléculas como proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos, danificando-as, além da ação deletéria de seus prováveis produtos de decomposição (o radical OH⁻ e o dióxido de nitrogênio) (RADENOVIC *et al.*, 2003). Nesse contexto, embora o papel do NO nos episódios convulsivos permaneça controverso, estudos recentes relatam o seu envolvimento nas convulsões evidenciadas em

diferentes testes experimentais, incluindo o modelo do PTZ, pilocarpina e outros (UZÜM *et al.*, 2005; REHNI *et al.*, 2009).

O NO no SNC pode ser produzido pela NOS endotelial (NOSe), uma enzima constitutiva, e pela NOS neuronal (NOSn). Bagetta *et al.* (2002) relataram que a expressão de NOSe no cérebro não está correlacionada com convulsões e lesão neuronal. Outra parte do NO é sintetizada pela NOS induzível (NOSi) que regula a resposta imune. O excesso de NOSi foi detectada em hipocampo de camundongos geneticamente epiléticos (MURASHIMA *et al.*, 2002). O nitrito (metabólito estável do NO) tem sido implicado em muitos mecanismos moleculares envolvidos nas convulsões, podendo modular uma cascata de efeitos excitotóxicos no SNC e participar do subsequente dano neuronal (DALKARA *et al.*, 1994). Os nossos resultados mostraram um aumento na concentração de nitrito no hipocampo dos animais tratados com PTZ, confirmando a participação desse metabólito no processo convulsivo. Esse aumento de nitrito poderia estar relacionado a um aumento de NO cerebral, que pode ter ocorrido por ação da NOSi. O pré-tratamento com isopulegol, todavia, não foi capaz de reduzir a produção de nitrito no hipocampo (por motivos técnicos, não foi possível a inserção dos dados referentes à administração do isopulegol sozinho). Dessa forma, nossos dados revelam que os efeitos protetores do isopulegol contra as convulsões induzidas por PTZ, provavelmente, não estão relacionados à via do NO.

Estudos prévios sugeriram que o estresse oxidativo também poderia ocorrer durante a terapia com alguns agentes anticonvulsivantes (ONO *et al.*, 2000). Os nossos resultados estão de acordo com prévios estudos que sugerem a participação de estresse oxidativo durante os episódios convulsivos (AKBASA *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2006; OBAY *et al.*, 2008) e com aqueles que demonstraram atividade antioxidante de produtos naturais (ILHAN *et al.*, 2005; DE ALMEIDA *et al.*, 2008), mas eles divergem dos estudos que evidenciaram estresse oxidativo e diminuição das defesas antioxidantes durante a terapia anticonvulsivante (ONO *et al.*, 2000), uma vez que o pré-tratamento com isopulegol induziu certo grau de proteção antioxidante (através da elevada concentração de GSH).

No **Capítulo I**, nós evidenciamos atividade farmacológica induzida pelo isopulegol nas doses de 25 e 50 mg/kg. No presente capítulo, doses mais altas de isopulegol foram necessárias para a obtenção de efeito anticonvulsivante significativo contra as convulsões induzidas pelo PTZ. A toxicidade aguda do isopulegol já foi investigada em ratos (BHATIA

et al., 2008). Os resultados obtidos e o valor da DL50 ($\sim 1.030 \pm 100$ mg/kg) representam uma toxicidade relativamente baixa do isopulegol, a qual foi particularmente relacionada às suas propriedades depressoras do SNC. Apesar dos monoterpenos frequentemente apresentarem baixa toxicidade (DE SOUSA *et al.*, 2007a; SUN, 2007), nós assumimos que estudos futuros considerando a segurança quanto ao uso do isopulegol são necessários.

Assim, considerando a possível propriedade depressora do isopulegol, nós resolvemos avaliar o comportamento dos animais no teste do campo aberto quando tratados com doses mais altas de isopulegol (100 e 200 mg/kg, v.o. e i.p.), usadas no presente capítulo, com o intuito de observar o nível de excitabilidade do SNC (MANSUR *et al.*, 1971) através da observação do parâmetro atividade locomotora espontânea (ALE). No **Capítulo I**, a administração tanto intraperitoneal quanto oral do isopulegol, em ambas as doses testadas (25 e 50 mg/kg), não alterou a ALE dos animais. No entanto, quando os mesmos receberam isopulegol nas doses de 100 e 200 mg/kg, após 30 min (i.p.) ou 60 min (v.o.) dos tratamentos, observou-se uma redução significativa na ALE, sendo mais acentuada com a dose mais alta e pela via intraperitoneal, o que se justifica devido ao metabolismo de primeira passagem no fígado quando da administração oral. Esses resultados demonstram que a redução na ALE dos animais está relacionada com a sedação resultante da depressão do SNC (OZTURK *et al.*, 1996; PEREZ *et al.*, 1998), o que, de certa forma, seria esperado com o aumento da dose de uma substância possivelmente depressora do SNC. De forma semelhante, o diazepam, usado na dose de 2 mg/kg como padrão positivo de ação sedativa, também diminuiu a ALE, comprovando o seu potencial sedativo nesta dose.

Nossos resultados demonstram que a atividade anticonvulsivante considerada efetiva do isopulegol (na dose mais elevada) é acompanhada de forte efeito sedativo no animal (observado no teste do campo aberto pela redução da atividade locomotora). No entanto, apesar desse efeito apresentar relevância clínica em determinadas condutas de contenção de alguns episódios convulsivos (quando o intuito é, de fato, também sedar o paciente), sabe-se que uma terapêutica anticonvulsivante profilática continuada dotada de acentuada sedação acarretaria em diversos inconvenientes ao usuário, o que a tornaria inviável. Nesse contexto, nós reconhecemos que futuros estudos da mesma natureza avaliando a atividade anticonvulsivante do isopulegol sobre doses mais baixas do agente convulsivante são necessários, com o intuito de observar se o isopulegol não seria efetivo também em doses menores, as quais promovessem menor efeito sedativo.

Em resumo, os resultados do presente capítulo sugerem que o isopulegol apresentou provável atividade anticonvulsivante e bioprotetora contra convulsões induzidas quimicamente pelo PTZ. Estas ações estão, possivelmente, relacionadas à modulação positiva dos receptores GABA_A/BZP e às propriedades antioxidantes do isopulegol. Entretanto, estudos adicionais são necessários para se investigar o exato mecanismo envolvido em tais ações.

5.3 Capítulo III - Efeito Gastroprotetor do Isopulegol em Modelos Experimentais de Lesão Gástrica Aguda

5.3.1 Introdução

A úlcera péptica, até pouco tempo atrás, era considerada uma doença de etiologia desconhecida, de evolução em geral crônica, resultante de perda de tecido em regiões do trato digestivo capazes de entrar em contato com a secreção cloridropéptica do estômago (COELHO *et al.*, 2005). Como referido anteriormente, atualmente, sabe-se que a lesão celular (reversível ou irreversível) ocorre como resultado de uma ou várias causas, incluindo a hipóxia e isquemia (com conseqüente diminuição do suprimento de sangue, do transporte de O₂ e de atividade das enzimas antioxidantes do tecido), a ação de agentes químicos e drogas (etanol, indometacina), agentes biológicos (vírus, bactérias, fungos), fatores físicos (força mecânica, temperaturas extremas, choque elétrico, radiações ionizantes), bem como defeitos genéticos e o estresse (BÓDIS *et al.*, 1998). Atualmente, agentes anti-secretórios (ex.: pantoprazol) representam uma das melhores opções na terapia contra úlcera péptica (GISBERT, 2005), entretanto seu uso prolongado tem sido associado à incidência de fraturas e câncer (YANG *et al.*, 2006; LEEDHAM *et al.*, 2007), o que justifica a pesquisa continuada por fármacos gastroprotetores cada vez mais efetivos e seguros.

A relação entre os produtos oriundos de fontes naturais e gastroproteção é antiga. No entanto, muitas espécies de plantas são usadas empiricamente, sem respaldo científico quanto à eficácia e segurança (TAKASE *et al.*, 1994). Porém, nos últimos anos, compostos de origem natural tem sido objeto de estudos incessantes na busca de uma substância com efeito terapêutico gastroprotetor ideal aliado a baixos custos. Nesse contexto, estudos recentes têm evidenciado a ação gastroprotetora de diversas plantas medicinais e de substâncias isoladas a partir delas (BRZOZOWSKI *et al.*, 2005; NARAYAN *et al.*, 2005; ANDREO *et al.*, 2006; DA ROCHA LAPA *et al.*, 2007), incluindo vários terpenos (MATSUNAGA *et al.*, 2000; GUEDES *et al.*, 2008), como o monoterpeno 1,8-cineol e o diterpeno ácido. Tais estudos nos levaram a investigar se o isopulegol, um monoterpeno álcool, seria capaz de exercer alguma ação protetora em úlceras induzidas experimentalmente em camundongos e analisar possíveis mecanismos envolvidos em tal ação.

5.3.2 Objetivos específicos

- Investigar o potencial antiulcerogênico gástrico do isopulegol em modelos experimentais de lesões gástricas induzidas por etanol ou indometacina em camundongos.

- Investigar a possível participação das prostaglandinas (PG's), óxido nítrico (NO), glutathiona reduzida (GSH) e canais de potássio ATP-dependentes (K_{ATP}) no efeito gastroprotetor do isopulegol em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.

5.3.3 Métodos

5.3.3.1 Avaliação da Atividade Gastroprotetora do Isopulegol

➤ **Protocolo experimental**

Inicialmente, os animais foram tratados oralmente com isopulegol nas doses de 25, 50, 100 e 200 mg/kg, v.o., com o intuito de se investigar uma possível relação dose-resposta contra as lesões gástricas induzidas por etanol ou indometacina. Subsequentemente, para investigar os possíveis mecanismos de ação envolvidos na gastroproteção, foram utilizadas as doses de isopulegol de 100 e 200 mg/kg, v.o. (as quais apresentaram significativa atividade antiúlcera). Para a indução das lesões gástricas, foi utilizado 0,2 mL de etanol absoluto, v.o., ou indometacina na dose de 20 mg/Kg, v.o.. Os controles receberam veículo (solução salina a 0,9% com 3 % de Tween 80, 10 ml/kg, v.o.). A ciproeptadina (10 mg/kg, i.p.) foi utilizada como uma droga padrão para atividade gastroprotetora no modelo de úlcera induzido por etanol, enquanto ranitidina (20 mg/kg,i.p.) foi utilizada como padrão positivo no modelo da indometacina. Após a indução das lesões por etanol, uma amostra do corpo dos estômagos foi fixada em formalina a 10% para subsequente avaliação histopatológica.

Para a investigação dos mecanismos de ação envolvidos na atividade de gastroproteção, foi utilizado o modelo de úlcera gástrica induzida por etanol (UGIE). Os animais foram pré-tratados com indometacina (10 mg/kg, v.o.) para se investigar a participação das prostaglandinas. Para a investigação da participação do NO, os animais receberam L-NAME (N (G)-nitro-L- arginine methyl ester, 10 mg/kg, i.p.), antes dos tratamentos com a droga teste ou veículo, enquanto glibenclamida foi pré-administrada para a investigação da participação dos canais de potássio. Com o objetivo de avaliar uma possível atividade antioxidante do isopulegol na ação de gastroproteção, a GSH foi quantificada em tecidos de estômago e fígado.

➤ **Avaliação da atividade gastroprotetora do isopulegol em modelo de úlcera gástrica induzida por etanol em camundongos**

As lesões gástricas agudas foram induzidas pela administração oral de 0,2 mL de etanol absoluto a cada animal, uma dose que induz significativa ulceração gástrica, de acordo com método previamente descrito por Robert *et al.* (1979), com poucas modificações. Após um período de jejum de 15 h, grupos de animais (n = 8) foram tratados com diferentes doses de isopulegol (25, 50, 100 e 200 mg/kg, v.o.) ou veículo (solução salina a 0,9% com 3 % de Tween 80, 10 ml/kg, v.o.). Os controles positivos receberam ciproceptadina, 10 mg/kg, i.p. (OHTAU *et al.*, 1999). Uma hora após os tratamentos, os animais receberam oralmente 0,2 mL de etanol absoluto. Para investigar se o isopulegol seria capaz de causar injúria por si só, grupos de animais foram também tratados com diferentes doses de isopulegol (25, 50, 100 e 200 mg/kg, v.o.) ou veículo e não foram expostos ao etanol. Decorridos 30 min da administração do etanol_{abs}, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e seus estômagos foram removidos. Subsequentemente, cada estômago foi aberto pela grande curvatura, lavado em solução salina 0,9 % e comprimido entre dois vidros de relógio para uma melhor visualização. O contorno das lesões da porção glandular do estômago foi traçado usando um papel filme transparente, como descrito previamente por Iwata *et al.* (1997). O percentual de área gástrica lesionada foi determinado com o auxílio de um programa de planimetria computadorizada (*ImageJ*). A área ulcerada foi expressa em termos de percentagem em relação à área total do corpo gástrico. As áreas lesionadas foram medidas por um único observador, que não conhecia a identificação dos grupos experimentais (estudo cego).

➤ **Avaliação histopatológica da mucosa gástrica de camundongos tratados com isopulegol e/ou etanol**

Para o estudo histopatológico, uma amostra do estômago (n= 5/grupo) foi fixada em solução de formol 10%, onde permaneceu por 24 horas. Em seguida as amostras foram transferidas para uma solução de álcool 70%, onde permaneceram até a realização dos procedimentos histológicos. Logo após, o material biológico foi seccionado e embebido em

parafina. Foram feitos cortes de 4 μm (micrômetros), colocados numa lâmina e corados com hematoxilina-eosina para o estudo em microscopia óptica. As amostras foram avaliadas de acordo com os critérios de Laine e Weinstein (1988): edema na superfície da mucosa (escores de 0-4), dano hemorrágico (escores de 0-4), infiltração de células inflamatórias (escores de 0-3) e perda de células epiteliais (escores de 0-3). Toda a avaliação histopatológica foi realizada através de um estudo cego.

➤ **Papel do óxido nítrico (NO) no efeito protetor do isopulegol sobre lesão gástrica induzida por etanol em camundongos**

Para investigar o envolvimento do NO no efeito gastroprotetor do isopulegol, NG-nitro-L-arginina-metilester (L-NAME, 10 mg/kg, i.p.), um inibidor da NOS, foi administrado 15 min antes da administração oral de isopulegol (100 e 200 mg/kg, v.o.) ou veículo (salina a 0,9% com 3 % de Tween 80, 10 ml/kg, v.o.). As doses e tempos de administração do L-NAME foram usadas de acordo com estudos prévios (GÜRBÜZ *et al.*, 1999; CHANDRANATH *et al.*, 2002). Dois grupos foram tratados com veículo antes da administração do isopulegol (100 e 200 mg/kg, v.o.). Os controles receberam apenas veículo. Subsequentemente, 60 min após os tratamentos, as lesões da mucosa gástrica foram induzidas por etanol_{abs}. Um grupo foi tratado com veículo e não foi exposto ao etanol_{abs}. Decorridos 30 min da administração do etanol_{abs}, os animais foram sacrificados, os estômagos retirados, as lesões foram medidas e expressas como descrito anteriormente. Para este experimento, foram utilizados 8 animais por grupo.

➤ **Quantificação da glutathiona (GSH) no estômago e fígado de camundongos tratados com isopulegol e expostos ao etanol.**

Para investigar uma possível ação antioxidante na atividade gastroprotetora do isopulegol, a quantificação da glutathiona (GSH, uma sulfidril não proteica) foi conduzida nos estômagos dos camundongos. Para investigar um possível efeito sistêmico, dosagens de GSH foram também realizadas no fígado dos animais. A concentração de GSH nos tecidos foi

medida de acordo com o método descrito por Sedlak e Lindsay (1968), com poucas modificações. A determinação dos grupos SH-NP neste método baseia-se na reação do reagente de Ellman, o DTNB, com o tiol livre originando um dissulfeto misto mais ácido, o ácido 2-nitro-5-tiobenzóico.

O isopulegol (100 e 200 mg/kg, v.o.) foi administrado aos camundongos 1 h antes da administração do etanol_{abs} (0,2 mL, p.o.) ou veículo (solução salina a 0,9% com 3 % de Tween 80, 10 ml/kg, v.o.). O grupo controle recebeu apenas veículo, enquanto o controle positivo recebeu N-acetilcisteína (NAC, 750 mg/Kg, i.p.), um aminoácido essencial na formação do GSH, antes da administração do etanol_{abs}. Um grupo de animais foi tratado apenas com veículo e não foi exposto ao etanol. Decorridos 30 min da administração do etanol_{abs}, os animais foram sacrificados por estiramento cervical e tiveram os seus estômagos e fígados retirados. Para a dosagem do GSH, o segmento glandular de cada estômago, bem como todo o tecido hepático foram individualmente homogeneizados a 10% (peso/volume) em uma solução gelada de EDTA 0,02 M. À alíquotas de 400 µl dos homogenatos foram misturadas a 320 µl de água destilada e 80 µl de ácido tricloroacético (50%) e centrifugadas a uma rotação de 3000 rpm durante 15 min (para os estômagos) e a 6000 rpm por 30 min (para os fígados). Após a centrifugação, 400 µl dos sobrenadantes foram misturados com 800 µl de tampão Tris (0,4 M, pH 8.9). Por fim, foi adicionado 20 µL de DTNB (5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoico ácido) 0,01M). O material foi então agitado durante 3 minutos e a absorbância foi mensurada a 412 nm em espectrofotômetro. Uma alíquota do sobrenadante foi separada e a sua concentração de proteínas foi medida usando o método de Lowry *et al.* (1951), descrito anteriormente. Os valores de absorbância foram extrapolados a partir de uma curva-padrão (descrita anteriormente) e expressos em µg de GSH/mg de proteína. Para este experimento, foram utilizados 8 animais por grupo.

➤ **Papel das prostaglandinas (PGs) no efeito gastroprotetor do isopulegol em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos**

Para investigar a possível participação das prostaglandinas no efeito gastroprotetor do isopulegol sobre as lesões gástricas induzidas por etanol, a indometacina foi utilizada em uma

dose que inibe a síntese de prostaglandinas, mas não induz ulceração gástrica (10 mg/kg, dissolvida em 0,5% de carboximetilcelulose e diluída em água destilada, v.o.), de acordo com estudo previamente descrito (ADEYEMI *et al.*, 2005). Grupos de animais (n = 8-10) foram pré-tratados com indometacina 2 h antes da administração de isopulegol (100 e 200 mg/kg, v.o.) ou veículo (salina a 0,9% com 3 % de Tween 80, 10 ml/kg, v.o.) (OLINDA *et al.*, 2008). Um grupo recebeu apenas veículo e dois grupos adicionais foram tratados com veículo seguido pela administração de isopulegol (100 e 200 mg/kg, v.o.). Subsequentemente, decorridos 60 min dos tratamentos, os camundongos foram expostos ao etanol_{abs} para a indução das lesões gástricas. Um grupo de animais recebeu veículo e não foi exposto ao etanol. Trinta minutos após a administração do etanol_{abs}, os animais foram sacrificados, os estômagos retirados, as lesões foram medidas e expressas como descrito anteriormente.

➤ **Papel dos canais de potássio ATP-dependentes (K_{ATP}), no efeito gastroprotetor do isopulegol em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos**

Para investigar o possível envolvimento dos canais de K_{ATP} no efeito gastroprotetor do isopulegol, glibenclamida (um potente antagonista dos canais de K_{ATP} , preparada com 4% de glicose, para minimizar hipoglicemia), na dose de 10 mg/kg, i.p., foi administrada 30 min antes da administração de isopulegol (100 e 200 mg/kg, v.o.) ou veículo (solução salina a 0,9% com 3 % de Tween 80, 10 ml/kg, v.o.), de acordo com Peskar *et al.* (2002). Em grupos adicionais, veículo foi administrado seguido por isopulegol (100 e 200 mg/kg, v.o.) antes da administração do etanol_{abs}. Os controles receberam apenas veículo. Após 60 min da administração dos tratamentos, os animais foram expostos ao etanol_{abs} para a indução das lesões. Um grupo de animais recebeu veículo e não foi exposto ao etanol. Trinta minutos após a administração do etanol_{abs}, os animais foram sacrificados, os estômagos retirados, as lesões foram medidas e expressas como descrito anteriormente. Para este experimento, foram utilizados 8 animais por grupo.

➤ **Lesões gástricas induzidas por indometacina em camundongos**

As lesões gástricas foram induzidas pela indometacina (20 mg/kg, dissolvida em 0,5% de carboximetilcelulose e diluída em água destilada, v.o.), como descrito previamente (MOLINA *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2005). Após um período de jejum de 15 h, os animais (n= 8) foram tratados com isopulegol (25, 50, 100 e 200 mg/kg, p.o.), veículo (salina a 0,9% com 3 % de Tween 80, 10 ml/kg, v.o.) ou ranitidina (20 mg/kg, v.o., como controle positivo) 60 min antes da administração da indometacina, enquanto o grupo controle recebeu veículo e não foi exposto ao agente agressor. De acordo com Bhargava e colaboradores (1973), 8 h após a indução das úlceras, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e tiveram seus estômagos removidos. Subsequentemente, cada estômago foi aberto pela grande curvatura, lavados em salina 0,9 % e a extensão das lesões foi registrada, atribuindo-se escores, de acordo com a escala de Szabo *et al.* (1985), evidenciada no **Quadro 4**. As áreas lesionadas foram medidas por um único observador, que não conhecia a identificação dos grupos experimentais (estudo cego).

Injúria	Escores
Perda de pregas da mucosa	1 ponto
Descoloração da mucosa	1 ponto
Edema	1 ponto
Hemorragias	1 ponto
Número de petéquias	
- Até 10	2 pontos
- Mais de 10	3 pontos
Intensidade da ulceração	
- Úlceras ou erosão de até 1mm	N x 2
- Úlceras ou erosão maiores que 1mm	N x 3
- Úlceras perfuradas	N x 4

Quadro 4. Determinação de escores de lesões gástricas induzidas por indometacina

Fonte: Szabo *et al.* (1985)

Nota: N = número de úlceras encontradas

5.3.4 Resultados

➤ Efeito do isopulegol nas lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos

Os efeitos do isopulegol e ciproeptadina sobre as lesões gástricas induzidas por etanol estão mostrados na **Figure 33**. A administração oral de etanol absoluto (0,2 ml/animal) a camundongos pré-tratados com veículo induziu extensa área de lesão da mucosa gástrica (Salina + Etanol: $19,99 \pm 1,36$ %). O pré-tratamento com isopulegol, v.o., reduziu o percentual de área ulcerada com todas as doses testadas (25, 50, 100 e 200 mg/kg), mas apenas nas maiores doses (100 e 200 mg/kg), essa redução foi estatisticamente significativa, e dose-dependente, quando comparado ao grupo controle tratado com veículo + etanol (ISO-25: $17,62 \pm 0,78$ %; ISO-50: $16,78 \pm 0,69$ %; ISO-100: $9,81 \pm 1,38$ %; ISO-200: $5,68 \pm 1,18$ %; $p < 0,05$). A ciproeptadina (10 mg/kg, i.p.), usada como controle positivo, como esperado, induziu significativo efeito gastroprotetor (CIP-10: $4,10 \pm 1,72$ %; $p < 0,05$).

A administração de isopulegol, por si só, não foi capaz de induzir qualquer lesão gástrica na mucosa dos animais, em todas as doses testadas, ou seja, os resultados foram semelhantes àqueles observados no controle que recebeu apenas veículo.

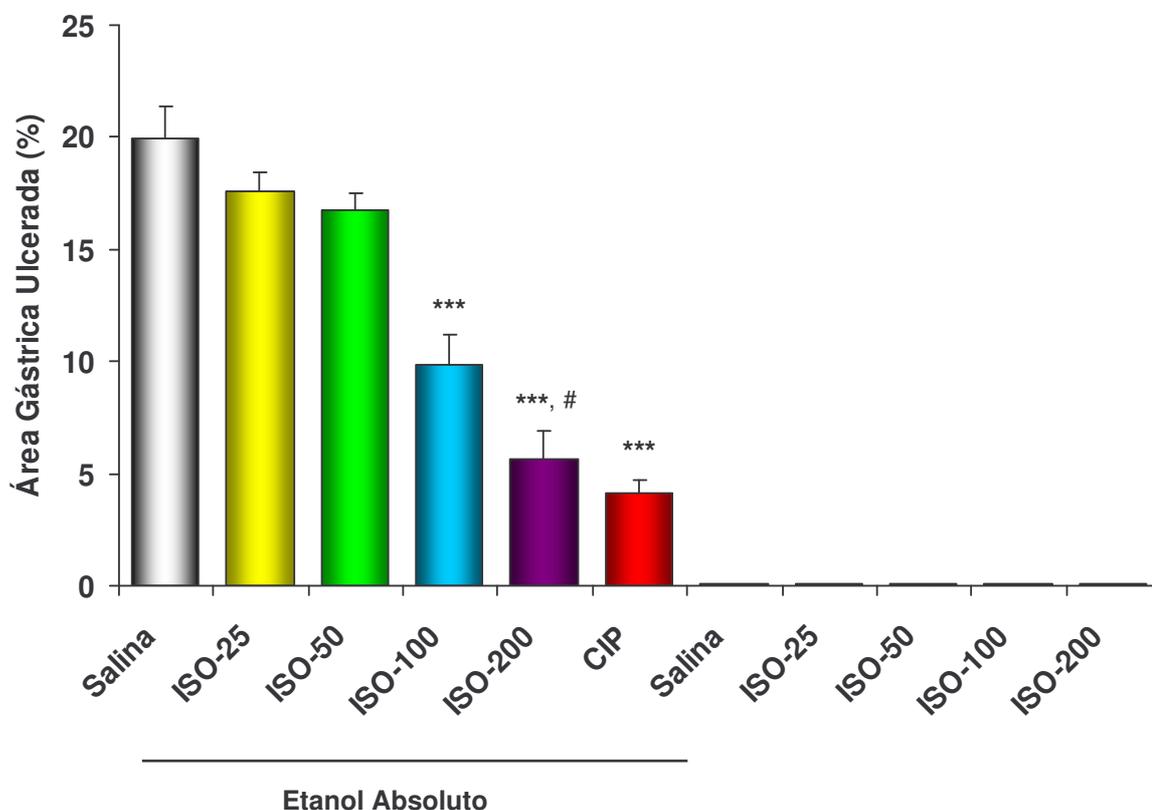


Figura 33. Efeito do tratamento com isopulegol em camundongos expostos ou não à ulceração gástrica induzida por etanol.

Nota: Etanol absoluto (0,2 ml/animal) foi oralmente administrado à camundongos após 15 h de jejum. Isopulegol (ISO-25, 50, 100 e 200 mg/kg, v.o.), cipropeptadina (CIP, 10 mg/kg, i.p.) ou veículo (salina a 0,9 % com 3% de Tween 80, v.o.) foram administrados aos animais 60 min antes da administração do etanol. Grupos adicionais receberam diferentes doses de isopulegol ou veículo e não foram expostos ao etanol. Os resultados são expressos como média \pm E.M.P. (n = 8). Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. *** $p < 0,001$, significância estatística vs o grupo salina + etanol; # $p < 0,001$ vs o grupo do ISO-100 + etanol.

➤ **Avaliação histopatológica da mucosa gástrica de camundongos tratados com isopulegol e/ou etanol**

Os resultados referentes à análise histopatológica da mucosa gástrica dos camundongos estão demonstrados na **Figura 34** e na **Tabela 2**. Os animais tratados apenas com isopulegol (100 e 200 mg/kg, v.o.) (**Figura 34 C e D**) não apresentaram qualquer alteração microscópica da mucosa gástrica, quando comparado aos controles tratados apenas com veículo e não expostos ao agente estressor (**Figura 34 A**). No entanto, lesões severas foram observadas após a administração do etanol (**Figura 34 B**), caracterizadas por dano hemorrágico, edema, perda de células epiteliais e infiltrado inflamatório. O pré-tratamento com isopulegol inibiu o dano induzido por etanol em ambas as doses testadas (**Figura 34 E e F**), sendo observado um melhor resultado na maior dose (200 mg/kg).

A **Table 2** mostra o resultado do somatório dos escores de todos os parâmetros histopatológicos avaliados, ou seja, da hemorragia (0-4 escores), do edema (0-4 escores), da perda de células epiteliais (0-3 escores) e do infiltrado inflamatório (0-3 escores). Verifica-se que o isopulegol, em ambas as doses testadas (100 e 200 mg/kg) diminuiu de forma significativa os efeitos do etanol sobre esses parâmetros.

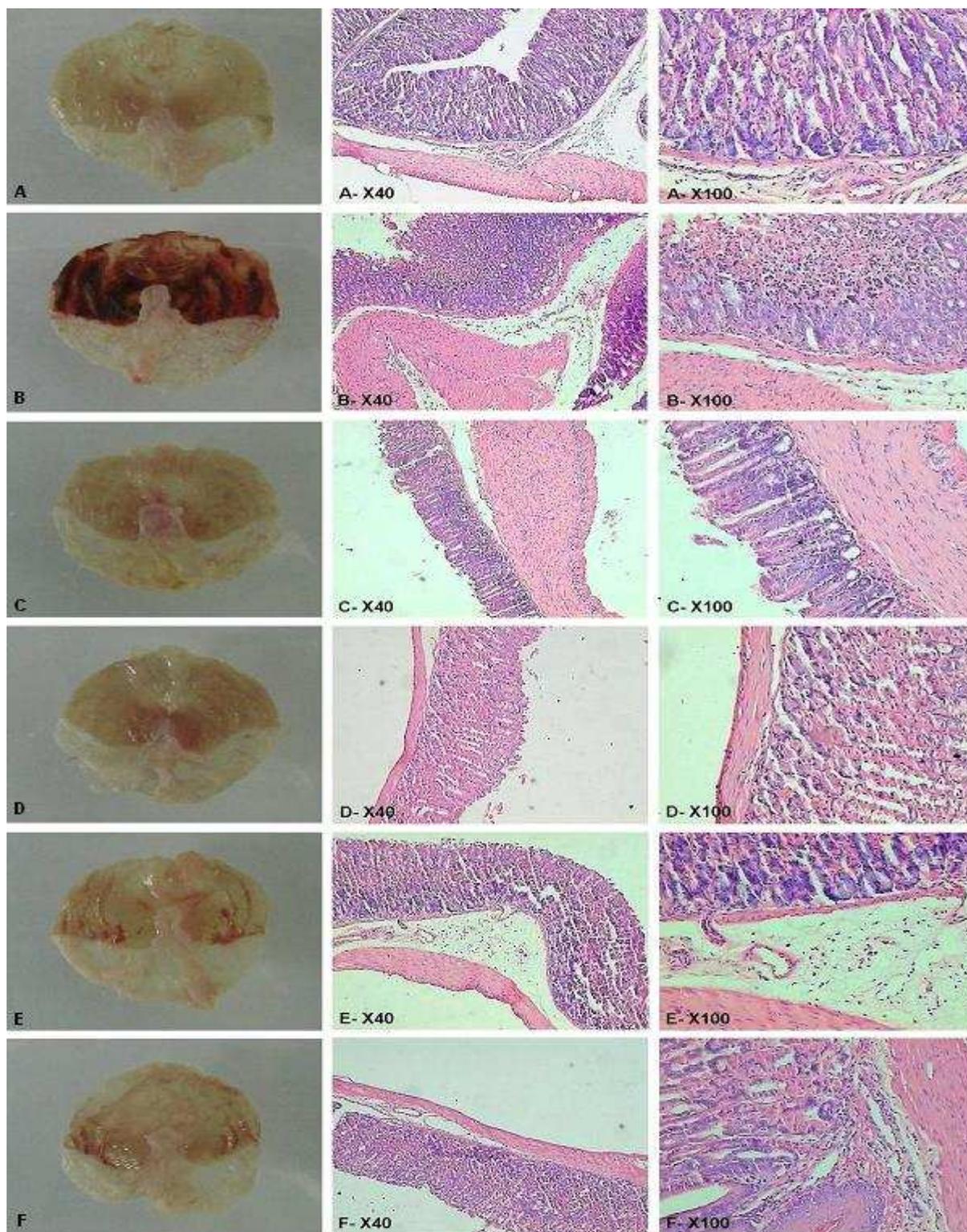


Figura 34. Efeito macroscópico e microscópico na mucosa gástrica de camundongos pré-tratados ou não com isopulegol e submetidos às lesões gástricas induzidas por etanol.

Nota: Fotografias dos estômagos abertos ao longo da grande curvatura (A-F) e análise microscópica com ampliação de 40 e 100 X para cada grupo (A-F X 40 e 100). (A) Animais tratados apenas com veículo (salina a 0,9% com 3% de Tween 80, v.o.), mostrando aspectos histológicos normais; (B) Tratamento com etanol (0,2 mL/animal), evidenciando intensa infiltração inflamatória, edema, e moderada hemorragia e perda de células epiteliais; (C e D) Tratamento apenas com isopulegol (100 e 200 mg/kg), mostrando aspectos histológicos semelhantes ao controle normal; (E e F) Pré-tratamento com isopulegol (100 e 200 mg/kg, v.o.) antes da administração do etanol, mostrando preservação da mucosa gástrica, embora áreas de edema sejam ainda observadas com a dose de 100 mg/kg de isopulegol (E). Os resultados quantitativos desta análise são mostrados na **Tabela 2**.

Tabela 2. Avaliação microscópica da mucosa gástrica de camundongos tratados com isopulegol e/ou etanol absoluto.

Tratamento	Escore Microscópico			
	Edema (escore 0–4)	Dano Hemorrágico (escore 0–4)	Infiltrado Inflamatório (escore 0–3)	Perda de Células Epiteliais (escore 0–3)
Veículo (Salina, 10 ml/kg)	0	0	0	0
ISO (100 mg/kg) + Veículo	0	0	0	0
ISO (200 mg/kg) + Veículo	0	0	0	0
Veículo + Etanol (0,2 mL)	3 (2-4)	3 (1-4)	3 (2-3)	2 (1-2)
ISO (100 mg/kg) + Etanol (0,2 mL)	2 (1-2)	0 (0-1) *	1 (0-1)*	0 (0-1)
ISO (200 mg/kg) + Etanol (0,2 mL)	1 (0-1)*	0 (0-1) **	0 (0-1) **	0 (0-1)

Nota: Os animais (n=8) foram tratados oralmente com veículo (salina a 0,9 % com 3% de Tween 80, v.o.) ou isopulegol (ISO-100 e 200 mg/kg, v.o.) 60 min antes da administração do etanol (0,2 mL, v.o.). Outros grupos de animais receberam isopulegol (100 e 200 mg/kg, p.o.) seguido por veículo, v.o. As alterações histopatológicas da porção glandular dos estômagos foram avaliadas de acordo com os critérios descritos por Laine e Weinstein (1988): 1- edema (escore 0–4), 2- dano hemorrágico (escore 0–4), 3- infiltrado inflamatório (escore 0–3) e 4- perda de células epiteliais (score 0–3). Os resultados são apresentados como mediana, com valores máximos e mínimos mostrados entre parênteses (n = 5). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs veículo + etanol. Foi utilizado o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* seguido pelo teste de *Dunn* como *post hoc*.

➤ **Papel do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor do isopulegol em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.**

A **Figura 35** apresenta os efeitos do pré-tratamento dos animais com L-NAME na ação gastroprotetora do isopulegol. No grupo pré-tratado com salina, o etanol_{abs} induziu severo dano na mucosa gástrica (Salina + Etanol: $20,18 \pm 1,08$ %), o qual foi intensificado pela administração de L-NAME (10 mg/kg, i.p.) (L-NAME + Etanol: $41,11 \pm 1,99$ %; $p < 0,05$). A administração do isopulegol reverteu os danos provocados pelo etanol (ISO-100: $9,93 \pm 1,21$ %; ISO-200: $6,30 \pm 1,21$ %; $p < 0,05$), e este efeito não foi revertido pelo pré-tratamento com L-NAME (L-NAME + ISO-100: $10,71 \pm 1,30$ %; L-NAME + ISO-200: $7,02 \pm 1,20$ %). Como esperado, o grupo tratado com veículo e não exposto ao etanol, não apresentou lesões ulceradas na mucosa gástrica.

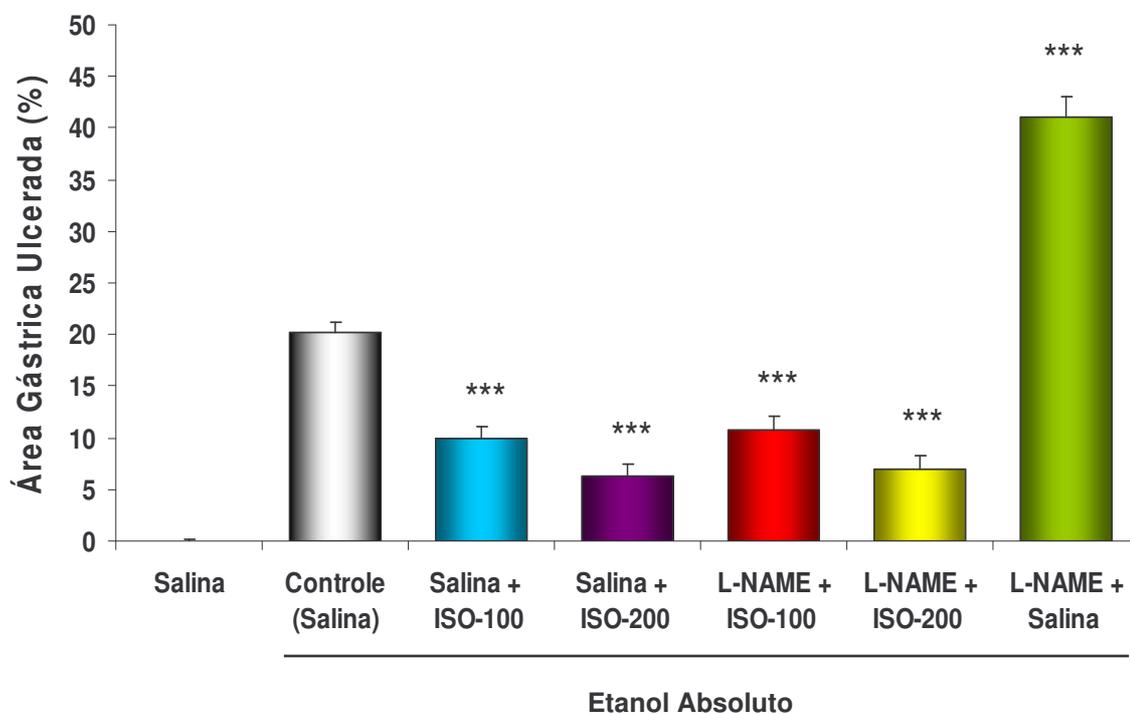


Figura 35. Efeito do L-NAME na gastroproteção induzida pelo isopulegol em camundongos submetidos à ulceração gástrica induzida pelo etanol.

Nota: L-NAME (10 mg/kg, i.p.) ou veículo (salina a 0,9% com 3% de Tween 80, v.o.), foram administrados 15 min antes do isopulegol (ISO-100 e 200 mg/kg, p.o.). Um grupo recebeu L-NAME seguido de veículo, enquanto o controle foi tratado apenas com veículo. Uma hora após os tratamentos, as lesões gástricas foram induzidas com etanol_{abs} (0,2 mL, v.o.). Um grupo adicional recebeu veículo e não foi exposto ao etanol. Os resultados são apresentados como média ± E.P.M. (n = 8). Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. *** $p < 0,001$, significância estatística vs o grupo veículo/controle + etanol.

➤ **Determinação da concentração de glutathiona (GSH) na mucosa gástrica e fígado de camundongos tratados com isopulegol e/ou etanol.**

A influência do tratamento com isopulegol e NAC no conteúdo de GSH de estômagos (A) e fígados (B) de camundongos é mostrada na **Figura 36**. Quando comparado aos controles normais (sem exposição ao agente estressor) (Controle: $136,50 \pm 17,20$), o grupo tratado com etanol mostrou uma concentração significativamente mais baixa de GSH nos estômagos (Salina + Etanol: $60,39 \pm 4,85$, $p < 0,05$). O pré-tratamento com isopulegol (200 mg/kg, v.o.) e NAC (750 mg/kg, i.p.) reverteu essas alterações na maior dose testada (ISO-200 + Etanol: $119,30 \pm 11,82$; NAC + Etanol: $127,30 \pm 11,90$; $p < 0,05$). Interessantemente, quando administrado sozinho, o isopulegol, em ambas as doses testadas, induziu significativo aumento no conteúdo de GSH (ISO-100: $194,80 \pm 21,04$; ISO-200: $248,50 \pm 23,89$; $p < 0,05$), quando comparado aos animais controle tratados com veículo e não expostos ao etanol (**Figura 36 A**).

Quando comparado ao controle tratado apenas com veículo (sem exposição ao etanol (Controle: $199,10 \pm 18,22$), o conteúdo de GSH no fígado dos animais também foi diminuído após administração oral de etanol (Salina + Etanol: $121,60 \pm 12,32$; $p < 0,05$), e o pré-tratamento com isopulegol (100 e 200 mg/kg, v.o.) reverteu essa alteração (ISO-100 + Etanol: $210,90 \pm 17,99$; ISO-200 + Etanol: $220,50 \pm 9,36$; $p < 0,05$). De forma semelhante ao ocorrido nos estômagos dos animais, o isopulegol administrado sozinho (sem a exposição ao etanol) promoveu um significativo aumento na concentração de GSH também nos tecidos hepáticos, em ambas as doses testadas (ISO-100: $289,20 \pm 28,17$; ISO-200: $312,70 \pm 21,32$; $p < 0,05$), quando comparado ao controle tratado apenas com veículo (**Figura 36 B**).

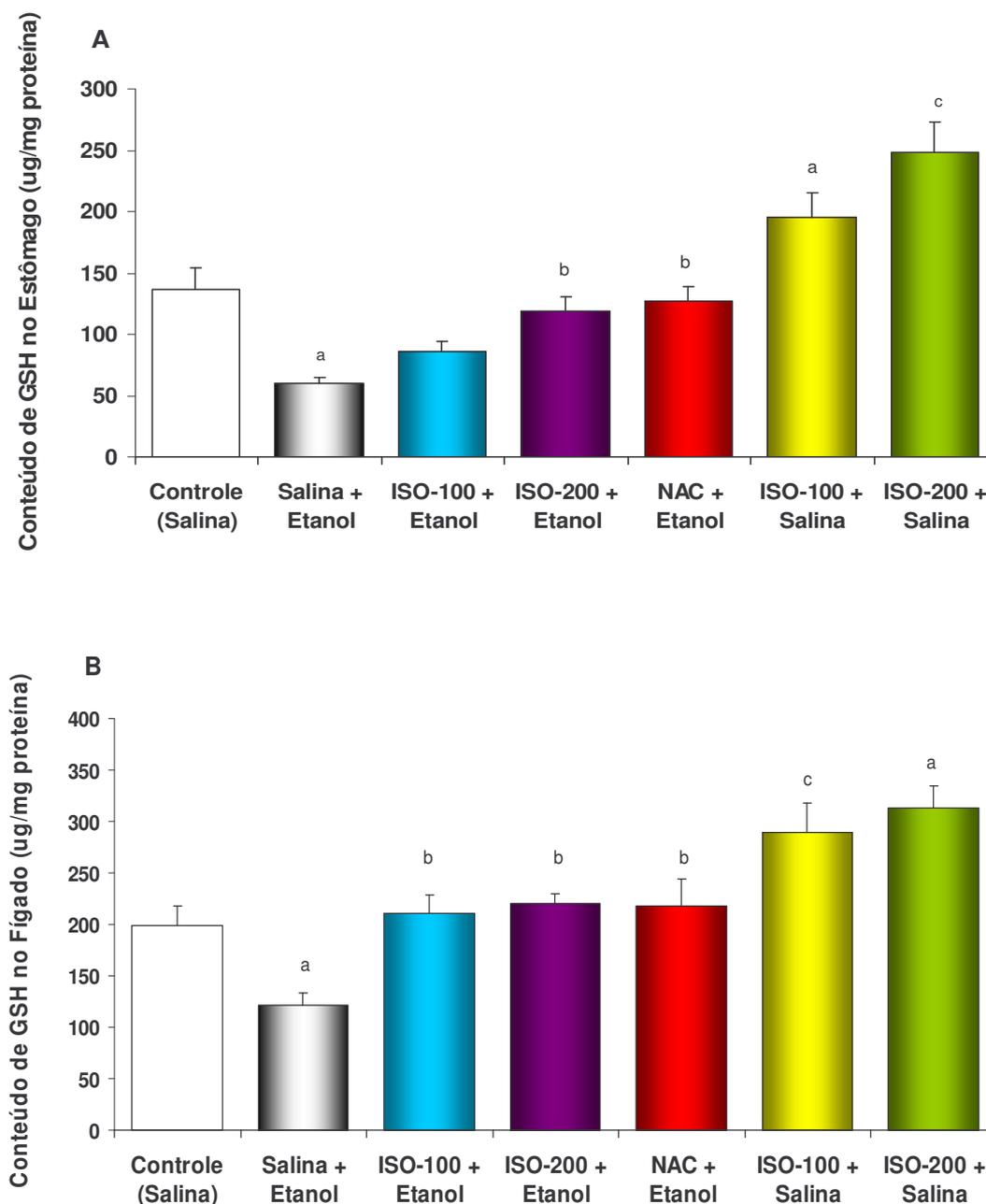


Figure 36. Efeito do isopulegol e *N*-acetil-l-cysteína (NAC) sobre o conteúdo de (GSH) em estômago (A) e fígado (B) de camundongos expostos ou não ao etanol

Nota: Isopulegol (ISO-100 e 200 mg/kg, v.o.), veículo (salina a 0,9% com 3% de Tween 80, v.o.) ou NAC (750 mg/kg, v.o.) foram administrados aos camundongos 1 h antes da administração do etanol_{abs} (0,2 mL, v.o.). Grupos de animais receberam isopulegol (100 e 200 mg/kg, v.o.) seguidos de veículo e um grupo foi tratado apenas com veículo e não foi exposto ao agente agressor. Os resultados são apresentados como média ± E.P.M. (n = 8). Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. (A) ^a $p < 0,01$ vs controle (veículo/salina); ^b $p < 0,01$ vs salina + etanol; ^c $p < 0,001$ vs controle (veículo/salina). (B) ^a $p < 0,01$ vs controle (salina), ^b $p < 0,01$ vs salina + etanol; ^c $p < 0,05$ vs controle (veículo/salina).

➤ **Papel das prostaglandinas (PGs) no efeito gastroprotetor do isopulegol em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.**

A **Figura 37** mostra os resultados do pré-tratamento com indometacina no efeito gastroprotetor do isopulegol. As lesões de mucosa gástrica induzidas pelo etanol (Salina + Etanol: $16,7 \pm 2,02$ %) foram significativamente atenuadas pelo isopulegol (ISO-100 + Etanol: $8,35 \pm 0,95$ %; ISO-200 + Etanol: $5,68 \pm 1,28$ %; $p < 0,05$). O pré-tratamento dos animais com indometacina (10 mg/kg, v.o.) reduziu significativamente o efeito protetor induzido pelo isopulegol, apenas na dose de 100 mg/kg v.o., (Indo + ISO-100: $13,85 \pm 0,74$ %; $p < 0,05$). O grupo pré-tratado com indometacina, seguido por veículo e etanol (Indo + Etanol: $20,19 \pm 1,83$ %; $p < 0,05$), mostrou lesões gástricas superiores às observadas no grupo tratado com veículo + etanol. Como esperado, o grupo tratado com veículo e não exposto ao etanol, não apresentou lesões ulceradas na mucosa gástrica.

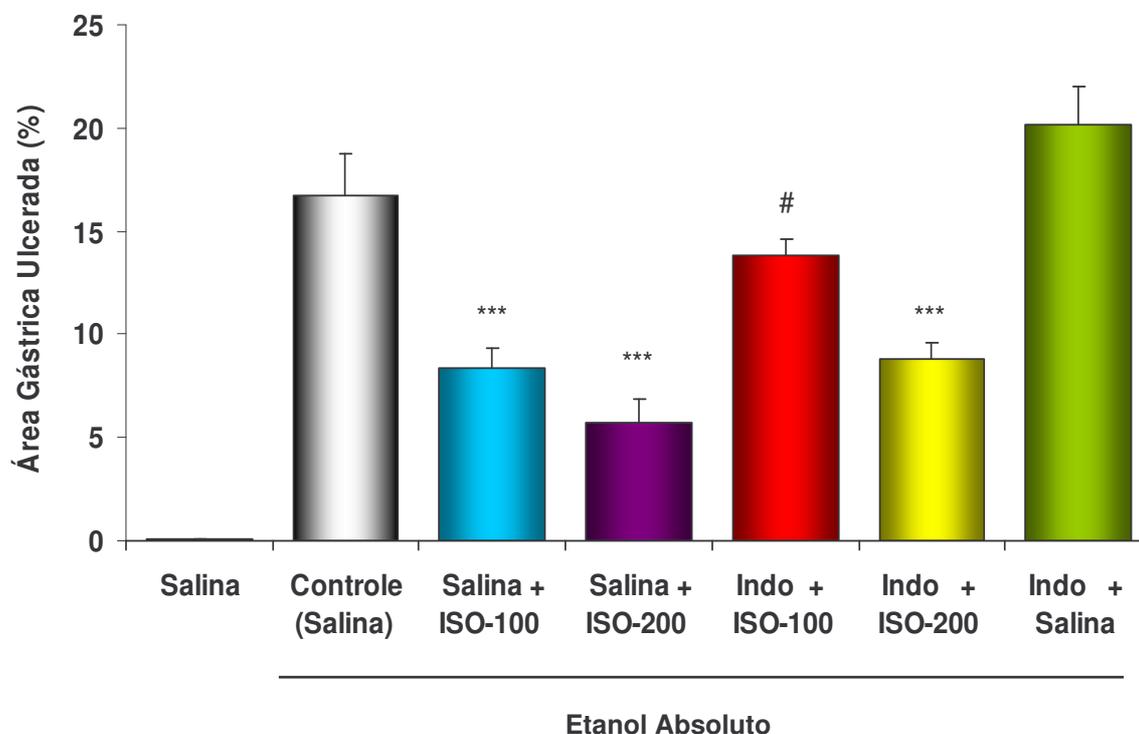


Figura 37. Efeito do pré-tratamento com indometacina na gastroproteção do isopulegol em camundongos submetidos à ulceração gástrica induzida pelo etanol.

Nota: Os animais foram pré-tratados com indometacina (10 mg/kg, v.o.) ou veículo (salina a 0,9% com 3% de Tween 80, v.o.) 2 horas antes da administração do isopulegol (100 e 200 mg/kg, v.o.). Um grupo recebeu indometacina seguido de veículo, enquanto o grupo controle recebeu apenas veículo. Após 60 min dos tratamentos, os camundongos foram expostos ao etanol_{abs} (0,2 mL). Um grupo de animais recebeu veículo e não foi exposto ao etanol. Os resultados são apresentados como média ± E.P.M. (n = 8). Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. *** $p < 0,001$, significância estatística vs controle/salina + ethanol; # $p < 0,05$ vs salina + ISO-100.

➤ **Papel dos canais de potássio ATP-dependentes (K_{ATP}) no efeito gastroprotetor do isopulegol em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.**

O papel dos canais de potássio ATP-dependentes (K_{ATP}) no efeito gastroprotetor do isopulegol pode ser observado na **Figura 38**. No grupo pré-tratado com salina, o etanol_{abs} induziu severo dano na mucosa gástrica (Salina + Etanol: $27,45 \pm 1,36$ %), o qual foi revertido pela administração do isopulegol (ISO-100: $9,81 \pm 1,38$ %; ISO-200: $5,68 \pm 1,18$ %; $p < 0,05$). O pré-tratamento dos animais com glibenclamida (10, mg/kg, i.p.), um bloqueador de K_{ATP} , significativamente reduziu a gastroproteção oferecida pelo isopulegol, na dose de 100 mg/kg, v.o. (Glib + ISO-100: $17,33 \pm 1,25$ %; $p < 0,05$). Como esperado, o grupo tratado com veículo e não exposto ao etanol, não apresentou lesões ulceradas na mucosa gástrica.

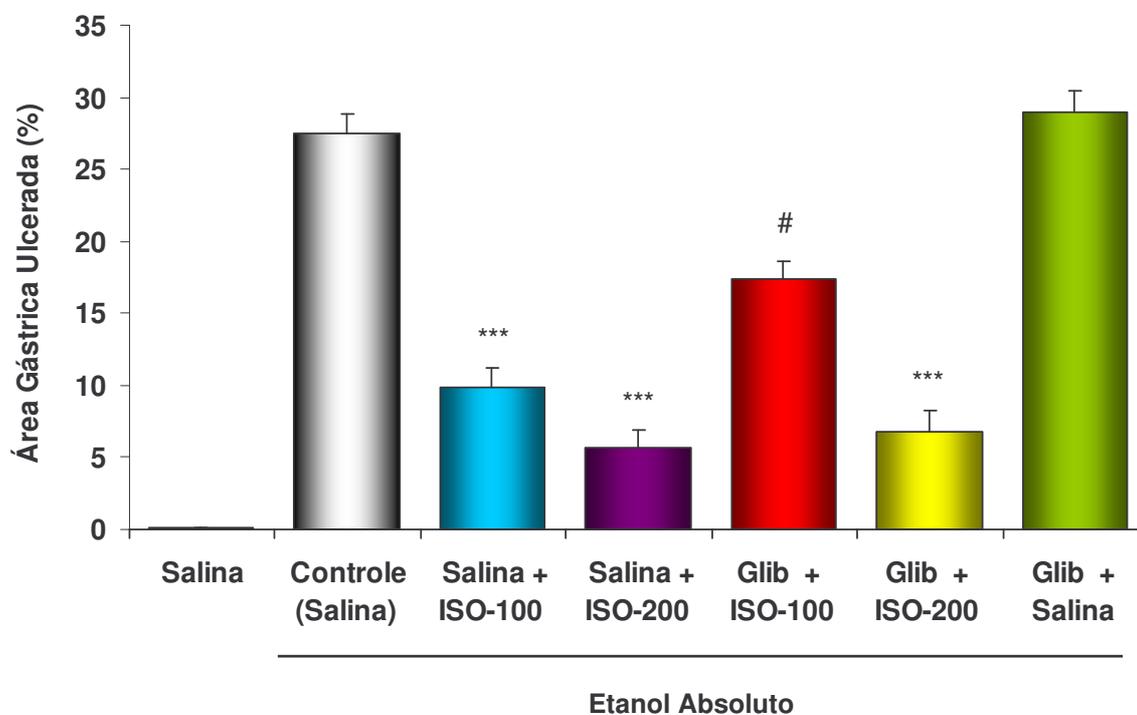


Figura 38. Efeito do pré-tratamento com glibenclamida na gastroproteção do isopulegol em camundongos expostos à ulceração induzida por etanol.

Nota: Os animais foram pré-tratados com glibenclamida (Glib, 10mg/kg, i.p.) ou veículo (salina a 0,9% com 3% de Tween 80, v.o.) 15 min antes da administração do isopulegol (100 e 200 mg/kg, v.o.). Um grupo recebeu glibenclamida seguido de veículo, enquanto o grupo controle recebeu apenas veículo. Após 60 min dos tratamentos, os camundongos foram expostos ao etanol_{abs} (0,2 mL). Um grupo de animais recebeu veículo e não foi exposto ao etanol. Os resultados são apresentados como média ± E.P.M. (n = 8). Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. *** $p < 0,001$, significância estatística vs controle/salina + etanol; # $p < 0,05$ vs salina + ISO-100.

➤ **Efeito do isopulegol nas lesões gástricas induzidas por indometacina em camundongos.**

Neste modelo, o tratamento dos animais com indometacina (20 mg/kg, v.o.) após veículo foi capaz de induzir severo dano sobre a mucosa gástrica [Salina + Indo: 12 (9-13)], (**Tabela 3**). Em todas as doses testadas (25, 50, 100 e 200 mg/kg, v.o.), o pré-tratamento com isopulegol diminuiu as lesões gástricas, mas apenas nas maiores doses (100 e 200 mg/kg), essa redução foi estatisticamente significativa [ISO-100 + Indo: 5 (4-7); ISO-200 + Indo: 3 (1-7); $p < 0,05$], quando comparado ao grupo exposto ao agente estressor. Ranitidina (20 mg/kg, i.p.), usada como controle positivo, como esperado, promoveu significativa redução nas lesões [Ranitidina: 3 (2-7); $p < 0,05$].

Tabela 3. Efeito do tratamento com isopulegol em camundongos expostos ao modelo de úlcera gástrica induzida por indometacina.

Grupos e Doses (n = 8/grupo)	Escore das Lesões Gástricas
Veículo (Salina, 10 ml/kg)	0
Veículo (Salina, 10 ml/kg) + Indometacina (20 mg/kg)	12 (9-13)
ISO (25 mg/kg) + Indometacina (20 mg/kg)	9 (6-13)
ISO (50 mg/kg) + Indometacina (20 mg/kg)	8 (6-12)
ISO (100 mg/kg) + Indometacina (20 mg/kg)	5 (4-7) *
ISO (200 mg/kg) + Indometacina (20 mg/kg)	3 (1-7) **
Ranitidina (20 mg/kg) + Indometacina (20 mg/kg)	3 (2-7) **

Nota: Os animais receberam veículo (salina a 0,9% com 3% de Tween 80, v.o.), isopulegol (25, 50, 100 e 200 mg/kg, v.o.) ou ranitidina (20 mg/kg, v.o.) 60 min antes da administração de indometacina (20 mg/kg, v.o.), enquanto o grupo controle recebeu apenas veículo. O grau de ulceração foi graduado de acordo com uma escala arbitrária descrita por Szabo *et al.* (1985) (**Quadro 4**). Os resultados são apresentados como mediana, com valores mínimos e máximos mostrados entre parêntese (n = 8). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, significância estatística quando comparado com o grupo veículo + indometacina. Para a análise estatística foi usado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn como *post hoc*.

5.3.5 Discussão

Nos últimos anos, vários estudos têm documentado a atividade gastroprotetora de constituintes fitoquímicos, tais como flavonóides (RAO *et al.*, 1997), resinas (PAIVA *et al.*, 1998), alcalóides (BAGGIO *et al.*, 2005), saponinas (MORIKAWA *et al.*, 2006) e vários terpenos (LEWIS; HANSON, 1991; PERTINO *et al.*, 2007). No presente capítulo, nós decidimos investigar se o isopulegol, um monoterpene álcool, seria capaz de apresentar algum efeito gastroprotetor em modelos experimentais clássicos de úlcera gástrica aguda e avaliar os possíveis mecanismos de ação envolvidos. Os resultados do presente capítulo demonstram pela primeira vez a atividade anti-ulcerogênica do isopulegol em camundongos.

Vários mecanismos têm sido envolvidos na produção de úlcera gástrica. Essas lesões parecem ser desenvolvidas quando há um desequilíbrio entre as forças lesivas (HCl, pepsina, gastrina, proteases, radicais livres, etanol, nicotina, isquemia, leucotrienos, AINES, estresse e *Helicobacter pylori*) e os mecanismos de defesa da mucosa (óxido nítrico, grupos sulfidrílicos não-protéicos, prostaglandinas, muco, bicarbonato e fluxo sanguíneo na mucosa) (GLAVIN; SZABO, 1992). Nesse contexto, não é possível propor apenas um único mecanismo para o efeito gastroprotetor de uma droga em particular (SINGH *et al.*, 2008). Assim, diferentes modelos e ensaios experimentais têm sido citados para avaliar a atividade gastroprotetora de substâncias (ROBERT *et al.*, 1979; BHARGAVA *et al.*, 1973; SZABO *et al.*, 1985; SEDLAK; LINDSAY, 1968).

O álcool é um dos principais agressores da mucosa gástrica em humanos. Essa substância é conhecida como uma toxina entérica que afeta a estrutura e função de vários elementos do trato gastrintestinal. Entre as complicações mais graves do trato gastrintestinal provocadas pelo consumo indiscriminado de etanol, estão a gastrite e as úlceras gástricas. De fato, é bem documentado na literatura que a administração de etanol em altas concentrações causa severas lesões na mucosa gástrica, envolvendo extensas hemorragias e destruição de tecido (LACY, 1988). Dessa forma, a úlcera gástrica induzida por etanol (UGIE) em ratos e camundongos é considerado um dos principais modelos utilizados para estudar a patogênese de ulcerações de mucosa gástrica (RAHGOZAR *et al.*, 2002). Neste capítulo, diferentes doses de isopulegol foram testadas no modelo de UGIE, com o objetivo de determinar a(s) dose(s) efetiva(s) necessária(s) a um possível efeito antiulcerogênico. Nossos resultados mostraram

que o pré-tratamento dos animais com isopulegol diminuiu o dano gástrico induzido pelo etanol em todas as doses testadas, mas apenas nas doses mais altas (100 e 200 mg/kg) este parâmetro foi significativo, e dose-dependente. Esses resultados sugerem que o isopulegol, provavelmente, atua como um agente citoprotetor/antiulcerogênico direto.

Os resultados obtidos com a análise histopatológica da mucosa gástrica dos animais confirmaram microscopicamente os achados da análise macroscópica. Foi observado que a administração do etanol induziu severos danos na mucosa, caracterizados por hemorragia, edema, perda de células epiteliais e infiltrado inflamatório. Esses resultados estão de acordo com diversos estudos previamente descritos, os quais relatam que o etanol é capaz de induzir, microscopicamente, hemorragias subepiteliais focais na mucosa gástrica. Esses estudos afirmam que tais efeitos são causados pelas ações tóxicas diretas do etanol e, indiretamente, por mediadores e outras moléculas de sinalização as quais provocam inflamação ou apoptose, e ainda, pela redução do fluxo sanguíneo gástrico (PARL *et al.*, 1979; SZABO *et al.*, 1985; LEE *et al.*, 2005; YEO *et al.*, 2008; ZHAO *et al.*, 2009). Além disso, o etanol promove peroxidação de lipídios nas membranas celulares, um evento crítico responsável pela hemorragia e edema nas células musculares lisas e endoteliais (JONSSON; PALMBLAD, 2001; ALTURA; GEBREWOLD, 2002). Os achados microscópicos do pré-tratamento com isopulegol também corroboram aqueles macroscópicos, desde que esse monoterpene foi capaz de inibir significativamente as alterações histopatológicas na mucosa gástrica induzidas pelo etanol. Assim, a análise estatística de escores macro- e microscópicos revelaram uma excelente correlação, confirmando a efetividade da avaliação macroscópica. Juntos, esses resultados sugerem fortemente um significativo efeito protetor do isopulegol contra lesões gástricas induzidas por etanol.

Embora os mecanismos da UGIE não sejam completamente compreendidos, é extensamente documentado que a patogênese dessas lesões em animais é multifatorial (OATES; HAKKINEN, 1988; TAN *et al.*, 2002). O etanol provoca uma diminuição da função da barreira muco-bicarbonato e do grupamento sulfidrílico não-protéico (GSH), induz estresse oxidativo, aumenta a permeabilidade epitelial e provoca danos à mucosa, principalmente, devido à lesões vasculares e diminuição do fluxo sanguíneo da mucosa gástrica (REPETTO; LLESUY, 2002; SIEGMUND *et al.*, 2003). Patofisiologicamente, a lesão gástrica provocada pelo álcool é mediada ou modulada por diversos fatores tais como a cicloxigenase, lipoxigenase, citocinas, tromboxanos e radicais livres derivados do oxigênio

(SAIKA *et al.*, 2000; TARNAWISK *et al.*, 1998). Na tentativa de analisar a participação de fatores protetores da mucosa gástrica contra o etanol, no presente capítulo nós investigamos o envolvimento do NO, PGs, canais de K_{ATP} e GSH no efeito gastroprotetor do isopulegol.

Diversos estudos têm sugerido que a vasodilatação é importante na manutenção da integridade gástrica porque aumenta o fluxo sanguíneo, mas também previne a ativação de fatores inflamatórios e remove substâncias irritantes (KONTUREK *et al.*, 1993; WALLACE; GRANGER, 1996). Desta forma, o NO, um potente agente vasodilatador produzido via NOS, é considerado um regulador da hemodinâmica da mucosa gástrica tanto em condição de repouso quanto após o uso do etanol (RAHGOZAR *et al.*, 2002). Além de atuar na regulação do fluxo sanguíneo capilar da parede gastrintestinal, no estômago, o NO também participa do controle da produção de muco e secreção de bicarbonato, e atua como agente citoprotetor, anti-inflamatório e como complemento aos efeitos protetores das prostaglandinas (MUSCARA; WALLACE, 1999, LI *et al.*, 2000), desempenhando, portanto, papel significativo no mecanismo de gastroproteção (LONG-RUI *et al.*, 2005; OLINDA *et al.*, 2008). Por outro lado, em altas concentrações, o NO pode induzir a formação de radicais derivados do nitrogênio, que são tóxicos para várias linhagens celulares (WALLACE; MILLER, 2000). No presente estudo, o pré-tratamento dos animais com L-NAME, um inibidor da atividade da NOS, não foi capaz de reverter a gastroproteção promovida pelo isopulegol contra UGIE, sugerindo que o seu efeito antiúlcera, provavelmente, não é mediado pela via do NO.

Estudos prévios têm demonstrado que o mecanismo da atividade gastroprotetora de vários terpenos envolve o reforço de diferentes fatores defensivos da mucosa gástrica, além da inibição de fatores agressivos tais como a secreção de ácido gástrico ou pepsina (SÁNCHEZ *et al.*, 2006; RODRÍGUEZ *et al.*, 2005). O estresse oxidativo tem sido considerado um fator comum na patogênese de úlceras induzidas por diferentes modelos experimentais e clínicos (DEMIR *et al.*, 2003; ANDRADE *et al.*, 2007). As ERO são lesivas através de uma variedade de mecanismos, dentre eles a peroxidação dos ácidos graxos das membranas celulares. As mudanças conformacionais nos ácidos graxos resultantes da peroxidação lipídica alteram a permeabilidade e fluidez da membrana, prejudicando as funções dos receptores, canais iônicos e outras proteínas que fazem parte da membrana (FREEMAN; CRAPO, 1982). Neste contexto, estudos demonstram que o tratamento agudo com etanol promove estresse oxidativo com conseqüente aumento da peroxidação lipídica, aumentando assim os níveis de

malonildialdeído, e depletando os níveis dos grupos sulfidrilas não-proteicos, tais como GSH, em tecido de estômago (REPETTO *et al.*, 2002; PONGPIRIYADACHA *et al.*, 2003).

Assim, considerando que o estresse oxidativo se apresenta como um dos fatores mais importantes na fisiopatologia das úlceras gástricas induzidas por etanol, compostos antioxidantes podem ser ativos nesse modelo experimental complexando-se com os radicais livres e, assim, produzir efeitos antiulcerogênicos (MATSUDA *et al.*, 1999; HIRUMA-LIMA *et al.*, 2009). Como exemplo, estão os compostos sulfidrilas, que desempenham um importante papel no reparo de danos celulares quando agentes oxidantes estão envolvidos no processo de injúria (SZABO *et al.*, 1981). A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo composto de glutamato, glicina e cisteína, e está presente em altas concentrações no estômago quando comparado com outros órgãos, sugerindo o seu papel protetor como um composto antioxidante endógeno (MILLER *et al.*, 1985; DEMIR *et al.*, 2003). Normalmente, a GSH atua como um “seqüestrador” de radicais livres e de substâncias tóxicas presentes no TGI, produzidas durante a alimentação (SHIRIN *et al.*, 2001). Sob condições de estresse oxidativo, como no tratamento com etanol, as ERO são reduzidas pelo GSH com a concomitante formação de glutathiona oxidada (GSSG). Além da sua ação como um antioxidante químico, a GSH também atua na primeira linha de defesa antioxidante como um cofator da glutathiona peroxidase na redução de peróxidos que também resulta na formação de GSSG (CNUBBEN *et al.*, 2001).

Na tentativa de determinar uma possível ação antioxidante do isopulegol, nós avaliamos a participação da GSH no efeito gastroprotetor desse monoterpene em modelo de úlcera induzido pelo etanol. De acordo com estudos prévios (TRIER *et al.*, 1987; PONGPIRIYADACHA *et al.*, 2003), nossos resultados mostraram que a concentração de GSH na mucosa gástrica foi significativamente reduzida após a administração de etanol. Quando os animais foram pré-tratados com isopulegol, observou-se uma reversão de tais alterações, de forma semelhante ao observado para N-acetilcisteína (NAC), um doador de sulfidrilas usado como controle positivo no presente estudo. Esses resultados sugerem que, possivelmente, o isopulegol seja capaz de promover gastroproteção através de um mecanismo que dependa também de uma ação antioxidante. Esses resultados também refletem estudos já estabelecidos na literatura os quais demonstram o papel antioxidante atribuído a vários terpenóides (SANTOS; RAO, 2001; GUEDES *et al.*, 2008; GOMES *et al.*, 2009). Ainda, esta provável ação antioxidante apresentada pelo isopulegol está de acordo com os dados

obtidos no segundo capítulo deste estudo, onde o isopulegol não apenas foi capaz de reverter a diminuição de GSH induzida pelo PTZ no hipocampo de animais, como também preveniu o aumento de peroxidação lipídica e preservou a atividade da enzima catalase.

De forma semelhante ao observado no **Capítulo II**, no presente capítulo, quando o isopulegol foi administrado sozinho (sem a exposição posterior ao agente agressor), a concentração de GSH foi significativamente maior do que aquela apresentada pelos animais controle normais (tratados apenas com veículo e não expostos ao etanol). Esses resultados sugerem que o isopulegol preveniu a redução de GSH induzida pelo etanol, possivelmente, induzindo um aumento no conteúdo de GSH gástrico. De fato, é documentado na literatura que a proteção de células contra o estresse oxidativo está relacionada a um conteúdo elevado de GSH intracelular (MEISTER, 1991), o que corrobora a nossa hipótese.

É também bem documentado que uma grande quantidade de GSH é encontrada em vários órgãos digestivos além do estômago, especialmente no fígado e baço (SUGAI *et al.*, 1968), e que a exposição aguda ao etanol promove também uma significativa diminuição do conteúdo de GSH nesses tecidos (KIM *et al.*, 2008). Para investigar se o isopulegol estaria atuando localmente no estômago ou se um possível envolvimento sistêmico estaria presente na sua ação, nós decidimos quantificar também o conteúdo de GSH hepático nos camundongos pré-tratados com isopulegol e expostos ou não ao etanol. Como esperado, o tratamento com etanol_{abs} resultou em acentuada diminuição do GSH nos homogenatos de fígado, o que está de acordo com Speisky *et al.* (1985). O pré-tratamento com isopulegol foi capaz não apenas de reverter a diminuição do GSH hepático induzida pelo etanol, como também induziu aumento de GSH nos camundongos normais tratados apenas com veículo. Desta forma, os resultados obtidos na presente dosagem hepática corroboram a nossa hipótese de que o isopulegol, por si só, poderia estar induzindo um aumento no conteúdo normal de GSH nos tecidos estudados. Nossos resultados sugerem ainda que, a provável ação antioxidante do isopulegol referente à GSH tenha, possivelmente, um componente sistêmico. No entanto, estudos adicionais são necessários para esclarecer se o isopulegol estaria promovendo aumento no conteúdo de GSH por prevenir a sua depleção ou por induzir a sua síntese.

Diversos estudos têm também demonstrado que as prostaglandinas endógenas estão envolvidas no efeito gastroprotetor de diferentes terpenos naturais ou sintéticos (MATSUDA

et al., 2002; SÁNCHEZ *et al.*, 2006). Este efeito citoprotetor tem sido estabelecido desde que a administração de prostaglandinas exógenas foi capaz de proteger a mucosa gástrica contra diferentes agentes necrosantes (ROBERT *et al.*, 1979; KUNIKATA *et al.*, 2001). Na mucosa estomacal, as prostaglandinas parecem estimular a secreção de bicarbonato e muco, manter o fluxo sanguíneo, inibir a secreção ácida, bem como regular a renovação e reparo celular (RAINSFORD, 1987). Desta forma, drogas anti-inflamatórias não esteroidais, tais como a aspirina e indometacina, são conhecidas por induzir úlceras durante o curso da terapia anti-inflamatória (JASZEWSKI *et al.*, 1992). A ulceração induzida por essas drogas é atribuída, principalmente, à inibição da síntese de prostaglandinas via caminho das cicloxigenases (COX-1 e 2) (RAINSFORD, 1987; WALLACE *et al.*, 2001b).

Para investigar o papel das prostaglandinas na gastroproteção oferecida pelo isopulegol, os camundongos foram pré-tratados com indometacina, um inibidor não seletivo da cicloxigenase, antes da indução das úlceras por etanol. Nossos resultados mostraram que o pré-tratamento dos animais com indometacina reduziu significativamente a proteção oferecida pelo isopulegol (100 mg/kg) contra as lesões gástricas. A ausência de efeitos na dose mais alta de isopulegol (200 mg/kg) pode estar relacionada à dose de indometacina usada, a qual, provavelmente, não foi suficiente para superar o efeito do isopulegol em sua maior dose. Os resultados obtidos no presente experimento sugerem que, possivelmente, as prostaglandinas, participam, pelo menos em parte, do efeito gastroprotetor do isopulegol.

Os canais de potássio ATP-dependentes (K_{ATP}) são uma classe de proteínas reguladas por ligantes que parecem estar envolvidas com uma variedade de funções fisiológicas do estômago, tais como a regulação do fluxo sanguíneo gástrico, a secreção ácida e a contratibilidade estomacal (GARCIA *et al.*, 1997). No sistema vascular, esses canais estão implicados no relaxamento do músculo liso vascular, possuindo um papel importante no controle da pressão sanguínea (NELSON; QUAYLE, 1995). Essa vasodilatação pode ser bloqueada pela glibenclamida, uma sulfoniluréia que causa bloqueio dos canais de K_{ATP} . A diminuição do fluxo sanguíneo gástrico é uma das possibilidades pelas quais a glibenclamida poderia aumentar as lesões gástricas induzidas por etanol. Também foi mostrado que o efeito lesivo direto da indometacina na mucosa gástrica de rato pode ser agravado pelo uso da glibenclamida. Entretanto esse efeito pode ser inibido com o uso de cromacalina ou diazóxido, substâncias que ativam e abrem os canais de potássio em diversos tecidos (AKAR *et al.*, 1999; GOMES *et al.*, 2006). Ainda, Peskar *et al.* (2002) demonstraram que a

gastroproteção promovida pelas prostaglandinas é inibida não somente pela indometacina, mas também pela glibenclamida. Estes dados sugerem que o mecanismo de ação das prostaglandinas endógenas e exógenas envolve a ativação dos canais de K_{ATP} . Recentes estudos têm também sugerido a participação dos canais de K_{ATP} nos modelos de úlcera induzida por indometacina (GOMES *et al.*, 2006) e por etanol (MEDEIROS *et al.*, 2008), nos quais as prostaglandinas foram mostradas como prováveis ativadores desses canais.

No presente estudo, foi investigado o papel dos canais de K_{ATP} no efeito gastroprotetor do isopulegol no modelo de UGIE. Nossos resultados mostraram que os efeitos do isopulegol foram revertidos pelo pré-tratamento com glibenclamida, um potente antagonista dos canais de K_{ATP} . Com base nesses resultados, nós podemos, então, sugerir a participação dos canais de K_{ATP} no efeito gastroprotetor do isopulegol, onde, possivelmente, as prostaglandinas poderiam estar envolvidas na ativação desses canais.

Para confirmar ou não a participação das prostaglandinas no efeito gastroprotetor do isopulegol, nós conduzimos também o modelo de lesões gástricas induzidas por indometacina. Neste experimento, o pré-tratamento com isopulegol promoveu uma redução no dano gástrico em todas as doses testadas, porém, apenas nas doses mais elevadas (100 e 200 mg/kg), os resultados foram estatisticamente significantes e dose-dependentes, semelhantemente à ranitidina, usada como controle positivo. Considerando que as ulcerações induzidas pela indometacina são atribuídas, principalmente, à inibição de síntese de prostaglandinas, os resultados do presente teste corroboram os nossos achados acima citados, e fortemente sugerem o envolvimento das prostaglandinas na gastroproteção oferecida pelo isopulegol.

Em resumo, os resultados do presente capítulo demonstraram que o isopulegol apresentou significativo efeito gastroprotetor em ambos os modelos de úlcera gástrica induzida por etanol e indometacina. Este efeito parece ser mediado, pelo menos em parte, pelas prostaglandinas endógenas, pela abertura dos canais de K_{ATP} e por propriedades antioxidantes referentes ao aumento no conteúdo de GSH. Entretanto, o potente efeito depressor do SNC induzido por este monoterpene em altas doses, como visto no **Capítulo II**, deve ser considerado. Neste sentido, futuros estudos são ainda necessários para esclarecer o exato mecanismo de ação gastroprotetora do isopulegol, como também para avaliar o perfil de segurança de seu uso.

6 CONCLUSÕES

A investigação dos efeitos farmacológicos centrais e da atividade gastroprotetora da administração aguda de isopulegol em camundongos permitiu as seguintes conclusões:

- Os resultados dos testes do LCE e *hole board* sugerem que o isopulegol apresenta efeito ansiolítico, o qual está relacionado, pelo menos em parte, à modulação positiva dos receptores GABA_A/BZP. Este efeito não foi acompanhado de ação sedativa em doses baixas de isopulegol, o que foi evidenciado pela ausência de diminuição de ALE no teste do campo aberto.
- Os parâmetros observados no teste do nado forçado, suspensão da cauda e tempo de sono induzido por pentobarbital sugerem que o isopulegol apresenta possível efeito depressor do SNC e corroboram com a sua ação ansiolítica observada.
- Os resultados observados nos experimentos comportamentais de ansiedade e depressão são consistentes com a redução na concentração das monoaminas cerebrais (DA e NA) observadas em corpo estriado.
- O isopulegol apresentou atividade anticonvulsivante e bioprotetora contra convulsões induzidas pelo PTZ. Tais efeitos foram dependentes da dose, os quais foram mais evidentes nas doses mais altas testadas. Estas ações estão, possivelmente, relacionadas à modulação positiva dos receptores GABA_A/BZP e às propriedades antioxidantes do isopulegol.
- O isopulegol apresentou significativo efeito gastroprotetor em ambos os modelos de úlcera gástrica induzida por etanol e indometacina. Este efeito foi também dependente da dose e parece ser mediado, pelo menos em parte, pelas prostaglandinas endógenas, pela abertura dos canais de K_{ATP} e por propriedades antioxidantes referentes ao aumento de conteúdo de GSH.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-SALAM, O.M.; BAIUOMY, A.R. Effect of buspirone on inflammation, pain and gastric injury in mice. **Internet J. Pharmacol.**, v. 6, n. 1, 2008.
- ABDEL-SALAM, O.M.E.; CZIMMER, J.; DEBRECENI, A.; SZOLCSÁNYI, J.; MÓZSIK, G. Gastric mucosal integrity: gastric mucosal blood flow and microcirculation. An overview. **J. Physiol.**, v. 95, p. 105-127, 2001.
- ABITBOL, R.A. Doença ulcerosa péptica. *In*: MEDSTUDENTS: Rotinas de Clínica Médica. Disponível em: <<http://www.medstudents.com.br/rotinas/clinmed/dup.htm>>. Acesso em: 9 mar. 2009.
- ADAM, P.; HECHT, S.; EISENREICH, W.; KAISER, J.; WERT, T.G.; ARIGONI, D.; BACHER, A. Biosynthesis of terpenes: studies on 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase. **PNAS**, v. 99, n. 19, p. 12108–121013, 2002.
- ADEYEMI, E.O.; BASTAKI, S.A.; CHANDRANATH, I.S.; HASAN, M.Y.; FAHIM, M.; ADEM, A. Mechanisms of action of leptin in preventing gastric ulcer. **World J. Gastroenterol.**, v. 11, n 27, p. 4154-4160, 2005.
- ADIGUZEL, A.; OZER, H.; SOKMEN, M.; GULLUCE, M.; SOKMEN, A.; KILIC, H.; SAHIN, F.; BARIS, O. Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of *Nepeta cataria*. **Pol. J. Microbiol.**, v. 58, n. 1, p. 69-76, 2009.
- ADZU, B.; AMOS, S.; MUAZZAM, I.; INYANG, U.S.; GAMANIEL, K.S. Screening of *Diospyros mespiliformis* in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 83, p.139-143, 2002.
- AKAR, F.; UYDES-DOGAN, B.S.; BUHARALIOGLU, C.K.; ABBAN, G.; HEINEMANN, A.; HOLZER, P.; VAN DE VOORDE, J. Protective effect of cromokalim, diazóxide and proulcerogenic effect of glibenclamide on indomethacin-induced gastric injury. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 25, p. 461-470, 1999.
- AKBASA, S.H.; YEGINB, A.; OZBENC, T. Effect of pentylenetetrazol-induced epileptic seizure on the antioxidant enzyme activities, glutathione and lipid peroxidation levels in rat erythrocytes and liver tissues. **Clin. Biochem.**, v. 38, p. 1009-1014, 2005.
- ALTURA, B.M.; GEBREWOLD, A. Inhibitor of nuclear factor-Kappa B activation attenuates venular constriction, leukocyte rolling/adhesion and microvessel rupture induced by ethanol in intact rat brain microcirculation: relation to ethanol-induced brain injury. **Neurosci. Lett.**, v. 334, p. 21–24, 2002.
- AMARAL, J. F.; SILVA, M.I.; AQUINO NETO, M.R.; TEIXEIRA NETO, P.F.; MOURA, B.A.; MELO, C.T.M.; ARAÚJO, F.L.O.; SOUSA, D.P.; VASCONCELOS, P.F.; VASCONCELOS, S.M.M.; SOUSA, F.C.F. Antinociceptive Effect of the Monoterpene R-(+)-Limonene in Mice. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 30, n. 7, p. 1217-1220, 2007.

AMOS, S.; ADZU, B.; BINDA, L.; WAMBEBE, C.; GAMANIEL, K. Europharmacological effect of the aqueous extract of *Sphaeranthus senegalensis* in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 78, p. 33-37, 2001.

ANDRADE, L.H.S.G.; GORESTREIN, C. Aspectos gerais das escalas de avaliação de ansiedade. **Rev. Psiquiatr. Clin.**, v. 25, n. 6, p. 285-290, 1998.

ANDRADE, S.F.; LEMOSA, M.; COMUNELLO, E.; NOLDIN, V.F.; CECHINEL FILHO, V.; NIERO, R. Evaluation of the antiulcerogenic activity of *Maytenus robusta* (Celastraceae) in different experimental ulcer models. **J. Ethnopharmacol.**, v. 113, p. 252-257, 2007.

ANDRADE, T.G.; MACEDO, C.E.; ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F.G. Anxiolytic-like effects of median raphe nucleus lesion in the elevated T-maze. **Behav. Brain Res.**, v. 153, p. 55-60, 2004.

ANDREO, M.A.; BALLESTEROS, K.V.; HIRUMA-LIMA, C.A.; MACHADO DA ROCHA, L.R.; SOUZA BRITO, A.R.; VILEGAS, W. Effect of *Mouriri pusa* extracts on experimentally induced gastric lesions in rodents: role of endogenous sulfhydryls compounds and nitric oxide in gastroprotection. **J. Ethnopharmacol.**, v. 107, n. 3, p. 431-441, 2006.

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.

ARAÚJO, M.E.M. Química dos produtos naturais. Textos de apoio às aulas, 28/10 DQB, 2009. Disponível em: < <http://www.dqb.fc.ul.pt/cup/44361/>>. Acesso em: 22 jan. 2009.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice. A review. **Anim. Behav.**, v. 21, p. 205-235, 1973.

ARNAIZ, S.L.; TRAVACIO, M.; LLESUY, S.; ARNAIZ, G. Regional vulnerability to oxidative stress in a model of experimental epilepsy. **Neurochem. Res.**, v. 23, p. 1477-1483, 1998.

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.

ATAY, S.; TARNAWSKI, A. S.; DUBOIS, A. Eicosanoids and the stomach. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, v. 61, n. 3/4, p. 105-124, 2000.

AVOLI, M. GABA-mediated synchronous potentials and seizure generation. **Epilepsia**, v. 37, p. 1035-1042, 1996.

BAGETTA, G.; PAOLETTI, A. M.; LETA, A.; DEL DUCA, C.; NISTICO, R.; ROTIROTI, D.; CORASANITI, M. T. Abnormal expression of neuronal nitric oxide synthase triggers limbic seizures and hippocampal damage in rat. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 291, p. 255-260, 2002.

BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; RIECK, L.; MARQUES, M.C.A. Gastroprotective effects of a crude extract of *Baccharis illinita* DC in rats. **Pharmacol. Res.**, v. 47, p. 93-98, 2003.

BAGGIO, C.H.; MARTINI OTOFUJI, G.; DE SOUZA, W.M.; DE MORAES SANTOS, C.A.; TORRES, L.M.; RIECK, L.; DE ANDRADE MARQUES, M.C.; MESIA-VELA, S. Gastroprotective mechanisms of indole alkaloids from *Himantanthus lancifolius*. **Planta Méd.**, v. 71, p. 733-738, 2005.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug Discovery from Medicinal Plants. **Life Sci.**, v. 78, p. 431-441, 2005.

BANTHORPE, D.V.; LE PATOUREL, G.N.J.; FRANCIS, M.J.O. Biosynthesis of Geraniol and Nerol and their P-D-Glucosides in *Pelargonium graveolens* and *Rosa dilecta*. **Biochem. J.**, v. 130, p. 1045-1054, 1972.

BARROS, H.M.; TANNHAUSER, S.L.; TANNHAUSER, A.L.; TANNHAUSER M. The effects of GABAergic drugs on grooming behavior in the open field. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 74, p. 339-344, 1994.

BASER, K.H. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. **Curr. Pharm. Des.**, v. 14, n. 29, p. 3106-3019, 2008.

BASHKATOVA, V.; NARKEVICH, V.; VITSKOVA, G.; VANIN, A. The influence of anticonvulsivant drugs on nitric oxide levels and lipid peroxidation in the rat brain during pentylenetetrazole-induced epileptiform model seizures. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 27, p. 487-492, 2003.

BAYIR, Y.; ODABASOGLU, F.; CAKIR, A.; ASLAN, A.; SULEYMAN, H.; HALICI, M.; KAZAZ, C. The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil-infiltration in rats by the lichen constituent diffractaic acid. **Phytomedicine**, v. 13, p. 584-590, 2006.

BEAGLEHOLE, R.; BONITA, R.; KJELLSTROM, T. **Epidemiologia básica**. 1. ed. [S.l]: Lis Gráfica Editora Ltda, 1996.

BEARD, J.R.; GALEA, S.; VLAHOV, D. Longitudinal population-based studies of affective disorders: Where to from here? **BMC Psychiatry**, v. 8, n. 83, 2008.

BECERRA, A.M.G. **Efeitos Farmacológicos de Drogas Ditas Ansiolíticas e Ansiogênicas Administradas em Ratos Testados no Labirinto em Cruz Elevado na Presença e Ausência de Luminosidade**. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências da Psicobiologia) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Riberão Preto, 2004.

BENI, G.; MORETTI, A. Are reactive oxygen species involved in Alzheimer's disease? **Neurobiol. Aging.**, v. 16, p. 661-674, 1995.

BEYER, C. E.; STEKETEE, J. D.; SAPHIER, D. Antioxidant properties of melatonin – an emerging mystery. **Biochem. Pharmacol.**, v. 56, p. 1265-1272, 1998.

BHARGAVA, K.P.; GUPTA, M.B.; TANGRI, K.K. Mechanism of ulcerogenic activity of indomethacin and oxyphenbutazone. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 22, n. 2, p. 191-195, 1973.

BHATIA, S. P.; MCGINTY, D.; LETIZIA, C. S.; API, A. M. A toxicologic and dermatologic review of isopulegol when used as a fragrance ingredient is presented. **Food Chem. Toxicol.**, v. 46, n. 11, S.185-189, 2008.

BI, L. C.; KAUNITZ, J. D. Gastroduodenal mucosal defense: an integrated protective response. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 19, p. 526-532, 2003.

BLIER, P.; DE MONTIGNY, C. Current advances and trends in the treatment of depression. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 15, p. 220-225, 1994.

BÓDIS, B.; NÉMETH, P.; MÓZSIK, G. Cytoprotection or organoprotection? *In:_____*. **Organoprotection and cytoprotection in the stomach**. Budapest: Akadémiai Kiadó, 1998.

BONFOCO, E.; KRAINIC, D.; ANKARCRONA, M.; NOCOTERA, P.; LIPTON, A.S. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 92, p. 7162-7166, 1995.

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

BOWERY, N.G. GABAB receptors: structure and function. *In: MARTIN, D.L.; OLSEN, R.W. (Ed.). GABA in the nervous system: the view at fifty years*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 233-244.

BRANDÃO, M.L.; VIANNA, D.M.; MASSON, S.; SANTOS, J. Organização neural de diferentes tipos de medo e suas implicações na ansiedade. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v. 25, p. 36-41, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Decreto no. 5.813, de 22 de Junho de 2006. Aprova a política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2006.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidade e Florestas. **Biodiversidade brasileira: avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade brasileira**. Brasília, DF, 2002.

BRAZER, S.R.; BRAZER, S.R.; TYOR, M.P.; PANCOTTO, F.S.; NICKL, N.J.; WILDERMANN, N.M.; HARRELL, F.E.; PRYOR, D.B. Studies of gastric ulcer disease by community-based gastroenterologists. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 85, n. 7, p. 824-828, 1990.

BRIELLMANN, R.S.; NEWTON, M.R.; WELLARD, R.M.; JACKSON, G.D. Hippocampal sclerosis following brief generalized seizures in adulthood. **Neurology**, v. 57, p. 315-7, 2001.

BRITO, V. N. **Estudo do gene da subunidade alfa-1 do receptor tipo A do ácido gama-aminobutírico (GABRA1) e avaliação eletroencefalográfica em meninas com puberdade**

precoce dependente de gonadotrofinas. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina, Departamento de Clínica Médica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

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.

BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, P.C.; DROZDOWICZ, D.; KONTUREK, S.J.; ZAYACHIVSKA, O.; PAJDO, R.; KWIECIEN, S.; PAWLIK, W.W.; HAHN, E.G. Grapefruit-seed extract attenuates ethanol-and stress-induced gastric lesions via activation of prostaglandin, nitric oxide and sensory nerve pathways. **World J. Gastroenterol.**, v. 11, n. 41, p. 6450-6458, 2005.

BULUT, R.; UNLUCERCI, Y.; BEKPINAR, S.; KUNTSAL, L. Nitric oxide-mediated regulation of gastric H⁺, K⁺ -ATPase and alcohol dehydrogenase following ethanolinduced injury in rats. **Dig. Dis. Sci.**, v. 7, p. 1417-1422, 1999.

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.

CADOGAN, A. K.; KENDALL, D.A.; FINK, H.; MARSDEN, C.A. Social interaction increases 5-HT release and cAMP efflux in the rat ventral hippocampus in vivo. **Behav. Pharmacol.**, v. 5, p. 299-305, 1994.

CALIXTO, J. B. Medicamentos fitoterápicos *In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Plantas medicinais sob a ótica da química moderna.* Chapecó: Editora Argos, 2001. p. 297-315.

CARLINI, E.A.; CONSTAR, J.D.P.; SILVA-FILHO, A.R.; SILVEIRA-FILHO, N.G.; FROCHTENGARTEN, M.I.; BUENO, O.V.A. Pharmacology of Lemon-grass (*Cymbopogon citratus* Stapf). Effects of teas prepared from leaves on laboratory-animals. **J. Ethnopharmacol.**, v. 17, p. 37-64, 1986.

CAVALHEIRO, E.A.; FERNANDES, M.J.; TURSKI, L.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M.G. Spontaneous recurrent seizures in rats: amino acid and monoamine determination in the hippocampus. **Epilepsia**, v. 35, p. 1-11, 1994.

CHANCE, A.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol. Rev.**, v. 59, p. 527-605, 1979.

CHANDRANATH, S.I.; BASTAKI, S.M.A.; SINGH, J.A. Comparative study on the activity of lansoprazole, omeprazole and PD-136450 on acidified ethanol- and indomethacin-induced gastric lesions in the rat. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 29, n. 3, p. 173-180, 2002.

CHO, C. H. Current roles of nitric oxide on gastrointestinal disorders. **J. Physiol.**, v. 95, p. 253-256, 2001.

CHRISTIE, M.J.; ROWE, P.J.; BEART, P.M. Effect of excitotoxin lesions in the medial prefrontal cortex on cortical and subcortical catecholamine turnover in the rat. **J. Neurochem.**, v. 47, p. 1593-1597, 1986.

CHUAH, G.K.; LIU, S.H.; JAENICKE, S.; HARRISON, L.J. Cyclisation of Citronellal to Isopulegol Catalysed by Hydrous Zirconia and Other Solid Acids. **J. Catalysis**, v. 200, p. 352-359, 2001.

CLARK, G.; KOSTER, A.G.; PERSON, D.W. Exploratory behavior in chronic disulfoton poisoning in mice. **Psychopharmacology**, v. 20, p.169–171, 1971.

CNUBBEN, N.H.P.; RIETJENS, I.M.C.M.; WORTELBOER, H.; VAN ZANDEN, J.; VAN BLADEREN, P.J. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 10, p. 141-152, 2001.

COELHO, L.G.V. Úlcera péptica. *In*: JATENE, F.B. *et al.* (Org.). **Projeto Diretrizes**. São Paulo: Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina, 2005. v. 3, p. 377-388. 2005.

CORRÊA, A.D.; BATISTA, R.S.; QUINTAS, L.E.M. **Plantas medicinais, do cultivo à terapêutica**. 6. ed. Petrópolis, RJ: Vozes, 2003.

CORUZZI, G.; ADAMI, M.; MORINI, G.; POZZOLI, C.; CENA, C.; BERTINARIA, M.; GASCO, A. Antisecretory and gastroprotective activities of compounds endowed with H₂ antagonistic and nitric oxide (NO) donor properties. **J. Physiol.**, v. 94, n. 1, p. 5-10, 2000.

CRABTREE, J. E.; COVACCI, A.; FARMERY, S.M.; XIANG, Z.; TOMPKINS, D.S.; PERRY, S.; LINDLEY, I.J.; RAPPUOLI, R. Helicobacter pylori induced interleukin-8 expression in gastric epithelial cells is associated with cagA-positive phenotype. **J. Clin. Pathol.**, v. 48, p. 41-45, 1995.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W. Óleos essenciais de canelas silvestres regionais. **Cienc. Cult.**, v. 29, p. 445, 1977.

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

CRESTANI, F.; ASSANDRI, R.; TAUBER, M.; MARTIN, J.R.; RUDOLPH, U. Contribution of the alpha1-GABAA receptor subtype to the pharmacological actions of benzodiazepine site inverse agonists. **Neuropharmacology**, v. 43, p. 679-684, 2002.

CROWELL, P.L. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. **J. Nutr.**, v. 129, p. 775-758, 1999.

CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: Recent developments and future needs. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 23, n. 5, p. 238-245, 2002.

CUNHA, J. M.; MASUR, J. Evaluation of psychotropic drugs with a modified open field test. **Pharmacology**, v. 16, p. 259-267, 1978.

DA ROCHA LAPA, F.; FREITAS, C.S.; BAGGIO, C.H.; MISSAU, F.C.; PIZZOLATTI, M.G.; SANTOS, A.R.; MARQUES, M.C. Gastroprotective activity of the hydroalcoholic

extract obtained from *Polygala paniculata* L. in rats. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 59, n. 10, p. 1413-1419, 2007.

DALKARA, T.; YOSHIDA, T.; IRIKURA, K.; MOSKOWITZ, M.A. Dual role of nitric oxide in focal cerebral ischemia. **Neuropharmacology**, v. 33, p. 1447-1452, 1994.

DANDIYA, P. C.; GUPTA, B. D.; GUPTA, M. L.; PATNI, S. K. Effects of LSD on open field performance in rats. **Psychopharmacology**, v. 15, p. 333-340, 1969.

DAYAL, Y.; DE LELLIS, R. A. Trato Gastrintestinal. *In*: ROBBINS, S.L.; KUMAR, V.; CONTRAN, R.S. **Patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1989.

DE ALMEIDA, R. N.; MOTTA, S. C.; DE BRITO FATURI, C.; CATALLANI, B.; LEITE, J.R. Anxiolytic-like effects of rose oil inhalation on the elevated plus-maze test in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 77, n. 2, p. 361-364, 2004.

DE ALMEIDA, R.N.; DE SOUSA, D.P.; NÓBREGA, F.F.F.; CLAUDINO, F.S.; ARAÚJO, D.A.M.; LEITE, J.R.; MATTE, R. Anticonvulsant effect of a natural compound α,β -epoxy-carvone and its action on the nerve excitability. **Neurosci. Lett.**, v. 443, p. 51-55, 2008.

DE OLIVEIRA, A. R.; REIMER, A. E.; BRANDÃO, M. L. Role of dopamine receptors in the ventral tegmental area in conditioned fear. **Behav. Brain Res.**, v. 199, n. 2, p. 271-277, 2009.

DE SARRO, G.; GITTO, R.; RIZZO, M.; ZAPPIA, M.; DE SARRO, A. 1,4-Benzodiazepine derivatives as anticonvulsant agents in DBA/2 mice. **Gen. Pharmacol.**, v. 27, n. 6, p. 935-941, 1996.

DE SOUSA, D. P.; GONÇALVES, J. C. R.; QUINTANS-JÚNIOR, L.; CRUZ, J. S.; ARAÚJO, D. A. M.; ALMEIDA, R. N. Study of anticonvulsant effect of citronellol, a monoterpene alcohol, in rodents. **Neurosci. Lett.**, v. 401, p. 231-235, 2006a.

DE SOUSA, D. P.; QUINTANS, J. L.; ALMEIDA, R. N. Evaluation of the Anticonvulsant Activity of alfa-Terpineol. **Pharm. Biol.**, v. 45, p. 69-70, 2007a.

DE SOUSA, D.P.; RAPHAEL, E.; BROCKSOM, U.; BROCKSOM, T.J.. Sedative effect of monoterpene alcohols in mice: a preliminary screening. **Z. Naturforsch. [C]**, v. 62, n. 7/8, p. 563-566, 2007b.

DE SOUSA, D.P.; SCHEFER, R.R.; BROCKSOM, U.; BROCKSOM, T.J. Synthesis and antidepressant evaluation of three para-benzoquinone mono-oximes and their oxy derivatives. **Molecules (Basel)**, v. 11, p. 148-155, 2006b.

DE SOUSA, F.C.F.; LEITE, C.P.; DE MELO, C.T.; DE ARAÚJO, F.L.; GUTIERREZ, S.J.; BARBOSA-FILHO, J.M.; FONTELES, M.M.; DE VASCONCELOS, S.M.; DE BARROS VIANA, G.S. 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.

DEKLOET, E.R.; KOVACS, G.L.; SZABO, G.; TELEGDY, G.; BOHUS, B.; VERSTEEG, D.H.G. Decreased serotonin turnover in the dorsal hippocampus of rat brain shortly after adrenalectomy: selective normalization after corticosterone substitution. **Brain Res.**, v. 239, p. 659-663, 1982.

DELONG, M.R. The basal ganglia. *In*: KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T. M. (Ed.). **Principles of neural sciences**. New York: McGraw-Hill, 2000. p. 853-867.

DEMBINSKI, A.; WARZECHA, Z.; CERANOWICZ, P.; BRZOZOWSKI, T.; DEMBINSKI, M.; KONTUREK, S.J.; PAWLIK, W.W. Role of capsaicin sensitive nerve and histamine, H1, H2 and H3 receptors in the gastroprotective effect of histamine against stress ulcer in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v.508, p.211-222, 2005.

DEMIR, S.; YILMAZ, M.; KÖSEÖĞLU, M.; AKALIN, N.; ASLAN, D.; AYDIN, A. Role of free radicals in peptic ulcer and gastritis. **Turk J. Gastroenterol.**, v. 14, n. 1, p. 39-43, 2003.

DENEKE, S. M.; FANBURG, B. L. Regulation of cellular glutathione. **Am. J. Physiol.**, v. 257, p. 163-173, 1989.

DI CHIARA, G.; MORELLI, M.; PORCEDDU, M. L.; GESSA, G. L. Evidence that nigral GABA mediates behavioural responses elicited by striatal dopamine receptor stimulation. **Life Sci.**, v. 23, n. 20, p. 2045-2051, 1978.

DI CHIARA, G.; PORCEDDU, M. L.; MORELLI, M.; MULAS, M. L.; GESSA, G. L. Evidence for a GABAergic projection from the substantia nigra to the ventromedial thalamus and to the superior colliculus of the rat. **Brain Res.**, v. 176, n. 2, p. 273-284, 1979.

DI STASI, L.C. **Plantas medicinais: arte e ciência: um guia de estudo Interdisciplinar**. São Paulo: UNESP, 1996.

DINGLEDINE, R.; MCBAIN, C. Glutamate and Aspartate. *In*: SIEGEL, G. J. *et al.* (Ed.). **Basic Neurochemistry, molecular cellular and medical aspects**. 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins, 1999. p. 315.

DOMBROWSKI, P.A. **Inativação reversível do núcleo dorsal da rafe bloqueia o efeito antipânico da imipramina crônica no labirinto em t elevado**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

DUNHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficits in rats and mice. **J. Am. Pharm. Assoc.**, v. 46, n. 3, p. 208, 1957.

EDRIS, A.E. Anti-cancer properties of *Nigella* spp. essential oils and their major constituents, thymoquinone and beta-elemene. **Curr. Clin. Pharmacol.**, v. 4, n. 1, p. 43-46, 2009.

EGASHIRA, N.; TANOUE, A.; HIGASHIHARA, F.; MISHIMA, K.; FUKUE, Y.; TAKANO, Y.; TSUJIMOTO, G.; IWASAKI, K.; FUJIWARA, M. V1a receptor knockout mice exhibit impairment of spatial memory in an eight-arm radial maze. **Neurosci. Lett.**, v. 356, p.195-198, 2004.

EISERICH, J.P.; PATEL, R.P.; O'DONNELL, V.B. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. **Mol. Aspects Med.**, v. 19, p. 221-357, 1998.

ELLIOTT, S. N.; WALLACE, J.L.; McKNIGHT, W.; GALL, D.G.; HARDIN, J.A.; OLSON, M.; BURET, A. Bacterial colonization and healing of gastric ulcers: the effects of epidermal growth factor. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 278, n. 1, p. G105-112, 2000.

ENGEL JR., J. Excitation and inhibition in epilepsy. **Can. J. Neurol. Sci.**, v. 23, p. 167-174, 1996.

EVANS, W.C. Orders and families of medicinal plants; animal-derived drugs. *In*: EVANS, W.C. (Ed.). **Pharmacognosy**: Trease and Evans pharmacognosy. 14th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1996. cap. 2, p.28-55.

FERNANDEZ-TERUEL, A.; ESCORRIHUELA, R. M.; NUNUEZ, J. F.; ZAPATA, A.; BOIX, F.; SALAZAR, W.; TOBENA, A. The early acquisition of two-way (shuttle-box) avoidance as an anxiety-mediated behavior: psychopharmacological validation. **Brain Res. Bull.**, v. 26, n. 1, p. 173-176, 1990.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

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

FILE, S.E.; ZANGROSSI JR., H.; VIANA, M.; GRAEFF, F.G. Trial 2 in the elevated plus-maze: a different form of fear? **Psychopharmacology**, v. 111, p. 491-494, 1993.

FINLAY, J.M.; DAMSMA, G.; FIBIGER, H.C. Benzodiazepine-induced decreases in extracellular concentration of dopamine in the nucleus accumbens after acute and repeated administration. **Psychopharmacology**, v. 106, p. 202-208, 1992.

FLEMSTRÖM, G.; ISENBERG, J. I. Gastroduodenal Mucosal Alkaline Secretion and Mucosal Protection. **News Physiol. Sci.**, v. 16, p. 23-28, 2001.

FORSELL, H. Gastric mucosal defence mechanisms: a brief review. **Scand. J. Gastroenterol. Suppl.**, v. 155, p.23-28, 1988.

FRADLEY, R. L.; GUSCOTT, M. R.; BULL, S.; HALLETT, D. J.; GOODACRE, S. C.; WAFFORD, K. A.; GARRETT, E. M.; NEWMAN, J. R.; O'MEARA, G. F.; WHITING, P. J.; ROSAHL, T. W.; DAWSON, G. R.; REYNOLDS, D. S.; Atack, J.R. Differential contribution of GABAA receptor subtypes to the anticonvulsant efficacy of benzodiazepine site ligands. **J. Psychopharm.**, v. 21, n. 4, p. 384-391, 2007.

FRANCO, I.J.; FONTANA, V.L. **Ervas & plantas**: a medicina dos simples. 8. ed. Erexim,RS: Edelbra, 2003.

FREEMAN, B.A.; CRAPO, J.D. Free radicals and tissue injury. **La Invest.**, v. 47, p. 412-426, 1982.

FREITAS, R. M.; NASCIMENTO, V.S.; VASCONCELOS, S.M.M.; SOUSA, F.C.F.; VIANA, G.S.B; FONTELES, M.M.F. Catalase activity in cerebellum, hippocampus, frontal cortex and striatum after status epilepticus induced by pilocarpine in Wistar rats. **Neurosci. Lett.**, v. 365, p. 102-105, 2004.

FRIDOVICK, I. The biology of oxygen radicals. **Science**, v. 201, p. 875-880, 1978.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. **Farmacologia Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. cap 43, p. 536-553.

GALATI, E. M.; MICELI, N.; GALLUZZO, M.; TAVIANO, M. F.; TZAKOU, O. Neuropharmacological effects of epinepetalactone from *Nepeta sibthorpii* behavioral and anticonvulsant activity. **Pharm. Biol.**, v. 42, n. 6, p. 391-395, 2004.

GALEOTTI, N.; MANNELLI, G.; MAZZANTI, A.; BARTOLINI, C. Menthol: a natural analgesic compound. **Neurosci. Lett.**, v. 322, p. 145-148, 2002.

GALLEANO, M.; PUNTARULO, S. Effect of mild iron overload on liver and kidney lipid peroxidation. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 27, p. 349-358, 1994.

GARCIA, M. L.; HANNER, M.; KNAUS, H. G.; KOCH, R.; SCHMALHOFER, W.; SLAUGHTER, R.S.; KACZOROWSKI, G.J. Pharmacology of potassium channels. **Adv. Pharmacol.**, v. 39, p. 425-471, 1997.

GARDIER, A.M.; BOURIN, M. Appropriate use of “knockout” mice as models of depression or models of testing the efficacy of antidepressants. **Psychopharmacology**, v. 153, p. 393-394, 2001.

GERFEN, C.R. Basal ganglia. *In*: PAXINOS, G. **The rat nervous system**. 3rd ed. Elsevier, 2004, p. 455-508.

GISBERT, J. P. Potent gastric acid inhibition in *Helicobacter pylori* eradication. **Drugs**, v. 65, p. 83-96, 2005.

GLAVIN, G. B.; SZABO, S. Experimental gastric mucosal injury. Laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. **FASEB J.**, v. 6, p. 825-831, 1992.

GOMES, A. S.; LIMA, L. M. F.; SANTOS, C. L.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A.; SOUZA, M. H. L. P. LPS from *E.coli* protects indomethacin-induced gastropathy in rats – role of ATP-sensitive K channels. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 547, n. 1/3, p. 136-142, 2006.

GOMES, P.B.; NORONHA, E.C.; DE MELO, C.T.; BEZERRA, J.N., NETO, M.A.; LINO, C.S, VASCONCELOS, S.M.;VIANA, G.S.; DE SOUSA, .FC. Central effects of isolated fractions from the root of *Petiveria alliacea* L. (tipi) in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 120, n. 2, p. 209-214, 2008.

GOMES, R.C.; BONAMIN, F.; DARIN, D.D.; SEITO, L.N.; DI STASI, L.C.; DOKKEDAL, A.L.; VILEGAS, W.; SOUZA BRITO, A.R.; HIRUMA-LIMA, C.A. Antioxidative action of methanolic extract and buthanolic fraction of *Vochysia tucanorum* Mart. in the gastroprotection. **J. Ethnopharmacol.**, v. 121, n. 3, p. 466-471, 2009.

GRAEFF, F. G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defense behaviors related emotions in animal. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, p.811-830, 1994.

GRANGER, R. E.; CAMPBELL, E. L.; JOHNSTON, G. A. R. (+)- and (-)-borneol: efficacious positive modulators of GABA action at human recombinant $\alpha_1\beta_2\gamma_2L$ GABA(A) receptors. **Biochem. Pharmacol.**, v. 69, p. 1101-1111, 2005.

GREEN, L. C.; TANNEMBAUN, S. R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v. 212, p. 56-58, 1981.

GROVES, J.O.; GUSCOTT, M.R.; HALLETT, D.J.; ROSAHL, T.W.; PIKE, A.; DAVIES, A.; WAFFORD, K.A.; REYNOLDS, D.S. The role of GABAA b2 subunit-containing receptors in mediating the anticonvulsant and sedative effects of loreclezole. **Eur. J. Neurosci.**, v. 24, p.167-174, 2006.

GUARDIA, T.; GUZMAN, J.A. Mucus synthesis and sulphhydryl groups in citoprotection mediated by dehydroleucodine, a sesquiterpene lactone. **J. Nat. Prod.**, v. 57, n. 4, p. 507-509, 1994.

GUEDES, M. M. Gastroprotective mechanisms of centipedic acid, a natural diterpene from *Egletes viscosa* LESS. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 31, n. 7, p. 1351-1355, 2008.

GUEDES, M.M.; CARVALHO, A.C.; LIMA, A.F.; LIRA, S.R.; DE QUEIROZ, S.S.; SILVEIRA, E.R.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S. Gastroprotective mechanisms of centipedic acid, a natural diterpene from *Egletes viscosa* LESS. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 31, n. 7, p.1351-1255, 2008.

GÜRBÜZ, V.; ALICAN, I.; BERRAK; YEGEN, C.; BOZKURT, A.; OKTAR, B.; HAKLAR, G.; YÜKSEL, M.; KURTEL, H. Role of nitric oxide in indomethacin-induced gastric mucosal dysfunction in the rat. **Exp. Physiol.**, v. 84, n. 2, p.319-332, 1999.

HALICI, M.; ODABASOGLU, F.; SULEYMAN, H.; CAKIR, A.; ASLAN, A.; BAYIR, Y. Effects of water extract of *Usnea longissima* on antioxidant enzyme activity and mucosal damage Caused by indomethacin in rats. **Phytomedicine**, v. 12, n. 9, p.656-662, 2005.

HALL, A.C.; TURCOTTEA, C.M.; BETTSA, B.A.; YEUNGA, W.Y.; AGYEMANA, A.S.; BURKB, L.A. Modulation of human GABAA and glycine receptor currents by menthol and related monoterpenoids. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 506, p. 9-16, 2004.

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

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? **Lancet**, v. 344, p. 721-724, 1994.

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

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

HANDLEY, S. E.; MITHANIM, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonist and antagonists in a maze-exploration model of "fear"-motivated behaviour. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v. 327, p. 1-5, 1984.

HASEBE, K.; HORIE, S.; KOMASAKA, M.; YANO, S.; WATANABE, K. Stimulatory effects of nitric oxide donors on gastric acid secretion in isolated mouse stomach. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 420, p. 159-164, 2001.

HATA, T.; NISHIKAWA, H.; ITOH, E.; FUNAKAMI, H. Anxiety-Like Behavior in Elevated Plus-Maze Tests in Repeatedly Cold-Stressed Mice. **Jpn. J. Pharmacol.**, v. 85, p. 189 –196, 2001.

HAWKINS, C.; HANKS, G. W. The gastroduodenal toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. A review of the literature. **J. Pain Symptom Manage.**, v. 20, n. 2, p. 140-151, 2000.

HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Semin. Hematol.**, v. 26, p.277-285, 1989.

HILL, R.A. Terpenoids. *In*: THOMPSON, R.H. **The Chemistry of Natural Products**. London: Blackie Academic & Professional; New York: Champman & Hall, 1993. p. 106-139.

HIRUMA-LIMA, C.A.; RODRIGUES, C.M.; KUSHIMA, H.; MORAES, T.M.; LOLIS, S.F.; FEITOSA, S.B.; MAGRI, L.P.; SOARES, F.R.; COLA, M.M.; ANDRADE, F.D.; VILEGAS, W.; SOUZA BRITO, A.R. The anti-ulcerogenic effects of *Curatella americana* L. **J. Ethnopharmacol.**, v. 121, n. 3, p. 425-432, 2009.

HOLMES, G. L. Effects of seizures on brain development: lessons from the laboratory. **Pediatr. Neurol.**, v. 33, p. 1-11, 2005.

HOOGERWERF, W. A.; PASRICHA, P. J. Pharmacotherapy of Gastric Acidity, Peptic Ulcer, and Gastroesophageal Reflux Disease. *In*: BRUNTON, L.; LAZO, J.; PARKER, K. (Ed.). **Goodman & Gilman's: the pharmacological basis of therapeutics**. 11th ed. [S.l]: McGraw-Hill, 2006. p. 869-882.

HOSSEINZADEH, H.; PARVARDEH, S.; NASSIRI-ASL, M.; MANSOURI, M.T. Intracerebroventricular administration of thymoquinone, the major constituent of *Nigella sativa* seeds, suppress epileptic seizures in rats. **Med. Sci. Monit.**, v. 11, n. 4, p. 106-110, 2005.

HSIEH, C.L.; TANG, N.Y., CHIANG, N.Y.; HSIEH, C.T.; LIN, J.G. Anticonvulsive and free radical scavenging actions of two herbs, *Uncaria rhynchophylla* (MIQ) Jack and *Gastrodia elata* BL, in kainic acid-treated rats. **Life Sci.**, v. 65, p. 2071-2082, 1999.

HUANG, S.H.; LEONARD, S.; SHI, X.; GOINS, M. R.; VALLYATHAN, V. Antioxidant activity of lazaroid (U-75412E) and its protective effects against crystalline silica-induced cytotoxicity. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 24, p. 529-536, 1998.

HUGHES, R.N. Chlordiazepoxide-modified exploration in rats. **Psychopharmacology**, v. 24, p. 462-469, 1972.

ILHAN, A.; GUREL, A.; ARMUTCU, F.; KAMISLI, S.; IRAZ, M. Antiepileptogenic and antioxidant effects of *Nigella sativa* oil against pentylenetetrazol-induced kindling in mice. **Neuropharmacology**, v. 49, p. 456-464, 2005.

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.

ISENBERG, J. I.; SELLING, J. A.; HOGAN, D. L.; KOSS, M. A. Impaired proximal duodenal mucosal bicarbonate secretion in patients with duodenal ulcer. **N. Engl. J. Med.**, v. 316, n. 7, p. 374-379, 1987.

ITOKAWA, H.; AIYAMA, R.; IKUTA, A. A pungent diarylheptanoid from *Alpinia oxyphylla*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 4, p.769-771, 1981.

IWATA, F.; KOO, A.; ITOH, M.; KOO, A.; ITOH, M.; LAM, K.; LEUNG, J.W.; LEUNG, F.W. Functional evidence linking potassium channels and afferent nerve-mediated mucosal protection in rat stomach. **Life Sci.**, v. 61, n. 17, p.1713-1720, 1997.

JACKSON, D. M.; WESTLIND-DANIELSSON, A. Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. **Pharmacol. Ther.**, v. 64, p. 291-370, 1994.

JADHAV, S.A.; GAIKWAD, R.V.; GAONKAR, R.K.; THORAT, V.M.; GURSALE, S.C.; BALSARA, J.J. Dose-dependent response of central dopaminergic systems to buspirone in mice. **Indian J. Exp. Biol.**, v. 46, n. 10, p. 704-714, 2008.

JASZEWSKI, R.; GRAHAM, D.Y.; STROMATT, S.C. Treatment of nonsteroidal antiinflammatory drug-induced gastric ulcers with misoprostol. **Dig. Dis. Sci.**, v. 37, n. 12, p.1820-1824, 1992.

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. Neuropsychopharmacol.**, v. 10, p. 223-228, 2000.

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

JOHNSON, M. R.; LYDIARD, B. The Neurobiology of Anxiety Disorders. **Psychiatric Clin. North Am.**, v.15, n. 4, p. 681-725, 1995.

JOHNSTON, G. A. GABA(A) receptor channel pharmacology. **Curr. Pharm. Des.**, v. 11, n. 15, p. 1867-1885, 2005.

JOHNSTON, G.A.R.; CHEBIB, M.; DUKE, R.K.; FERNANDEZ, S.P.; HANRAHAN, J.R.; HINTON, T.; MEWETT, K.N. Herbal Products and GABA Receptors. **Enc. Neurosci.**, v. 4, p. 1095-1101, 2009.

JOLIN, E. M.; WELLER, E. B.; WELLER, R. A . Anxiety symptoms and syndromes in bipolar children and adolescents. **Curr. Psychiatry Rep.**, v. 10, n. 2, p.123-129, 2008.

JONSSON, A. S.; PALMBLAD, J. E. Effects of ethanol on NF-kappaB activation, production of myeloid growth factors, and adhesive events in human endothelial cells. **J. Infect. Dis.**, v. 184, p. 761-769, 2001.

JUCÁ, D.M. **Propriedades farmacológicas dos monoterpenos α - e β -pineno no músculo liso gastrointestinal de ratos: efeito miiorrelaxante e pró-cinético.** Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

JUGDUTT, B.I. Cyclooxygenase inhibition and adverse remodeling during healing after myocardial infarction. **Circulation**, v. 115, p. 288-291, 2007.

JUNG, M. E.; LAL, H.; GATCH, M.B. The discriminative stimulus effects of pentylentetrazole as a model of anxiety: recent developments. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 26, n. 4, p. 429- 439, 2002.

KABUTO, H.; OGAWA, N. Melatonin inhibits iron-induced epileptic discharges in rats by supressing peroxidation. **Epilepsis**, v. 39, p.237-243, 1998.

KANTORSKI, L.P. Transtornos mentais. **Rev. Eletrônica Saúde Mental Álcool Drog.**, v. 4, n. 1, 2005.

KAPUR, S.; MANN, J.J. Role of the dopaminergic system in depression. **Biol. Psychiatry**, v. 32, p. 1-17, 1992.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica e clínica.** 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

KIM, S. J.; JUNG, Y. S.; KWON, D. Y.; KIM, Y. C. Alleviation of acute ethanol-induced liver injury and impaired metabolomics of S-containing substances by betaine supplementation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 368, n. 4, p. 893-898, 2008.

KIS, B.; SNIPES, J.A.; GASPAR, T.; LENZSER, G.; TULBERT, C.D.; BUSIJA, D.W. Cloning of cyclooxygenase-1b (putative COX-3) in mouse. **Inflamm. Res.**, v. 55, n. 7, p.274-278, 2006.

KLODZINSKA, A.; TATARCZYNSKA, E.; CHOJNACKA-WÓJCIK, E.; NOWAKA, G.; COSFORD, N.D.P.; PILC, A. Anxiolytic-like effects of MTEP, a potent and selective mGlu5 receptor agonist does not involve GABAA signaling. **Neuropharmacology**, v. 47, p. 342-350, 2004.

KONTUREK, S. J.; BRZOZOWSK, T.; MAJKA, J.; PYTKO-POLONCZYK, J.; STACHURA, J. Inhibition of nitric oxide synthase delays healing of chronic gastric ulcers. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 239, p. 215-217, 1993.

KRUK, M. R.; WESTPHAL, K. G.; VAN ERP, A. M.; VAN ASPEREN, J.; CAVE, B. J.; SLATER, E.; DE KONING, J.; HALLER, J. The hypothalamus: cross-roads of endocrine and behavioural regulation in grooming and aggression. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 23, p. 163–177, 1998.

KUBACKA, M.; LIBROWSKI, T.; CZARNECKI, R.; FRACKOWIAK, B.; LOCHYNSKI, S. Anticonvulsant and antidepressant activity of the selected terpene GABA derivatives in experimental tests in mice. **Pharmacol. Rep.**, v. 58, n. 6, p. 936-943, 2006.

KUNICKA-STYCZYŃSKA, A.; SIKORA, M.; KALEMBA, D. Antimicrobial activity of lavender, tea tree and lemon oils in cosmetic preservative systems. **J. Appl. Microbiol.**, June 12, 2009. [Epub ahead of print].

KUNIKATA, T.; ARAKI, H.; TAKEEDA, M.; KATO, S.; TAKEUCHI, K. Prostaglandin E prevents indomethacin-induced gastric and intestinal damage through different EP receptor subtypes. **J. Physiol.**, v. 95, n. 1-6, p. 157-163, 2001.

KUSAYAMA, T.; YAMAZAKI, J.; NAGAO, T. Flow dependence of nitric oxidemediated pressure change in rat mesenteric beds with different tonus. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 312, p. 301–307, 1996.

LACERDA, G.F.M.L. **Ansiedade em modelos animais: efeito de drogas nas dimensões extraídas da análise fatorial.** 2006. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

LACY, E.R. Epithelial restitution in the gastrointestinal tract. **J. Clin. Gastroenterol.**, v. 10, p.72-77, 1988.

LAINÉ, L.; WEINSTEIN, W.M. Histology of alcoholic hemorrhagicgastritis: a prospective evaluation. **Gastroenterology**, v. 94, p. 1254-1262, 1988.

LANFRANCO, G. Popular Use of Medicinal Plants in the Maltese Islands. **Insula**, n.1, p. 34-35, 1992.

LEAL-CARDOSO, J.H.; FONTELES, M.C. Pharmacological effects of essential oils of plants of the northeast of Brazil. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 71, n. 2, p. 207-213, 1999.

LEBEDEVA, I.V.; SU, Z.Z.; VOZHILLA, N.; CHATMAN, L.; SARKAR, D.; DENT, P.; ATHAR, M.; FISHER, P.B. Chemoprevention by perillyl alcohol coupled with viral gene therapy reduces pancreatic cancer pathogenesis. **Mol. Cancer Ther.**, v. 7, n. 7, p. 2042-2050, 2008.

LEE, J. S.; OHB, T.Y.; KIMC, Y.K.; BAIK, J.H.; SOC, S.; HAHMB, K.B.; SURH Y.J. Protective effects of green tea polyphenol extracts against ethanol-induced gastric mucosal damages in rats: Stress-responsive transcription factors and MAP kinases as potential targets. **Mutat. Res.**, v. 579, n. ½, p. 214–224, 2005.

LEEDHAM, S.; JANKOWSKY, J. The evidence base of proton pump inhibitor chemopreventive agents in Barrett's esophagus- the good, the bad, and the flawed! **Am. J. Gastroenterol.**, v. 102, p. 21-23, 2007.

LERER, B.; MACCIARDI, F. Pharmacogenetics of antidepressant and mood-stabilizing drugs: a review of candidate-gene studies and future research directions. **Int. J. Neuropsychopharmacol.**, v. 5, n. 3, p. 255-275, 2002.

LEUNG, W.C.; ZHENG, H.; HUEN, M.; LAW, S.L.; XUE, H. Anxiolytic-like action of orally administered *dl*-tetrahydropalmatine in elevated plus-maze. **Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatr.**, v. 27, p. 775-779, 2003.

LEWIS, D.A.; HANSON, P. J. Anti-ulcer drugs of plant origin. **Progr. Med. Chem.**, v. 28, p. 201-231, 1991.

LI, Y.; WANG, W.P., WANG, H.Y., CHO, C.H. Intragastric administration of heparin enhances gastric ulcer healing through a nitric oxide dependent mechanism in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 399, p. 205-214, 2000.

LILLY, S. M.; TIETZ, E. I. Chronic cocaine differentially affects diazepam's anxiolytic and anticonvulsant actions q Relationship to GABA receptor subunit expression A. **Brain Res.**, v. 882, p.139-148, 2000.

LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, p. 180-185, 1987.

LOIZZO, M. R.; TUNDIS, R.; MENICHINI, F.; SAAB, A.M.; STATTI, G. A.; MENICHINI, F. Antiproliferative effects of essential oils and their major constituents in human renal adenocarcinoma and amelanotic melanoma cells. **Cell Prolif.**, v. 41, p. 6, p.1002-1012, 2008.

LONG-RUI, P.; QIANG, T.; QIN, F.; BEN-RONG, H.; JI-ZHOU, X.; JIA-QING, Q. Roles of nitric oxide in protective effect of berberine in ethanol-induced gastric ulcer mice. **Acta Pharmacol. Sin.**, v. 26, n. 11, p.1334-1338, 2005.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. **Plantas Mediciniais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas.** Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2006.

LÖSCHER, W. New visions in the pharmacology of anticonvulsion. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 342, p. 1-13, 1998.

LÖSCHER, W.; SCHMIDT, D. New horizons in the development of antiepileptic drugs. **Epilepsy Res.**, v. 50, p. 3-16, 2002.

LOWRY, H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurements with the follin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LU, X.G.; ZHAN, L.B.; FENG, B.A.; QU, M.Y.; YU, L.H.; XIE, J.H. Inhibition of growth and metastasis of human gastric cancer implanted in nude mice by dlimonene. **World J. Gastroenterol.**, v. 10, p. 2140-2144, 2004.

MACCDONALD, R.L.; HASS, K.F. Kinetic properties of GABAA receptors channel. *In: MARTIN, D.L.; OLSEN, R.W. (Ed.). GABA in the nervous system: the view at fifty years.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 141-166.

MACÊDO, D. S. **Estudo farmacológico e de alterações neuroquímicas em córtex pré-frontal e corpo estriado de camundongos após convulsões e morte induzidas por overdose de cocaína.** 2005. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

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

MAEHLY, A. C.; CHANCE, B. The assay of catalases and peroxidases. **Methods Biochem. Anal.**, v. 1, p. 357-424, 1954.

MAGALHÃES, P. J. C. **Estudo farmacológico do óleo essencial do Croton nepetaefolius Baill. sobre os músculos lisos traqueal e vascular e sobre as propriedades eletrofisiológicas de neurônios fásicos de gânglio celíaco.** 2002. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.

MAIMONE, T. J.; BARAN P. S. Modern synthetic efforts toward biologically active terpenes. **Nat. Chem. Biol.**, v. 3, n. 7, p. 396-407, 2007.

MAIORINO, M.; GREGOLIN, C.; URSINI, F. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. **Methods Enzymol.**, v. 186, p. 448-457, 1990.

MAITY, P.; BISWAS, K.; ROY, S.; BANERJEE, R.K.; BANDYOPADHYAY, U. Smoking and the pathogenesis of gastroduodenal ulcer – recent mechanistic update. **Mol. Cell Biochem.**, v. 253, p. 329–338, 2003.

MANJI, H.K.; DREVETS, W.C.; CHARNEY, D.S. The cellular neurobiology of depression. **Nat. Med.**, v. 7, p. 541-547, 2001.

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.

MARGIS, R.; PICON, P.; COSNER, A.F.; SILVEIRA, R.O. Relação entre estressores, estresse e ansiedade. **Rev. Psiquiatr. RS**, v. 25, supl. 1, p. 65-74, 2003.

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

MARKMAN, O.E.O.; BACCHI, E.M.; KATO, E.T.M. Antiulcerogenic effects of Campomanesia xanthocarpa. **J. Ethnopharmacol.**, v. 94, n. 1, p.55-57, 2004.

MARSHALL, B.J.; WARREN, J.R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. **Lancet**, v. 1, p. 1311-1315, 1984.

MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais**: guia de seleção e aproveitamento de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil. Fortaleza: IOCE, 1989.

MATSUDA, H.; LI, Y.; YOSHIKAWA, M. Roles of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulfhydryls, and prostaglandins in gastroprotection by momordin Ic, an oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats. **Life Sci.**, v. 65, n. 2, p. 27-32, 1999.

MATSUNAGA, T.; HASEGAWA, C.; KAWASUJI, T.; SUZUKI, H.; SAITO, H.; SAGIOKA, T.; TAKAHASHI, R.; TSUKAMOTO, H.; MORIKAWA, T.; AKIYAMA, T. Isolation of the antiulcer compound in essential oil from the leaves of *Cryptomeria japonica*. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 23, p. 595-598, 2000.

MATTEI, R.; DIAS, R.F.; ESPÍNOLA, E.B.; CARLINI, E.A.; BARROS, S.B.M. Guaraná (*Paulinea cupana*): toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidant activity in vitro. **J. Ethnopharmacol.**, v. 60, p. 111-116, 1998.

MCHUGH, J. C.; DELANTY, N. Epidemiology and classification of epilepsy: gender comparisons. **Int. Rev. Neurobiol.**, v. 83, p. 11-26, 2008.

McKERNAN, R. M.; ROSAHL, T. W.; REYNOLDS, D. S.; SUR, C.; WAFFORD, K. A.; ATTACK, J. R.; FARRAR, S.; MYERS, J.; COOK, G.; FERRIS, P.; GARRETT, L.; BRISTOW, L. Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABAA receptor alpha(1) subtype. **Nat. Neurosci.**, v. 3, p. 587-592, 2000.

McQUADE, R.; SHARP, T. Functional mapping of dorsal and median raphe 5-hydroxytryptamine pathways in forebrain of the rat using microdialysis. **J. Neurochem.**, v. 69, p. 791-796, 1997.

MEDEIROS, J. V.; GADELHA, G. G.; LIMA, S. J.; GARCIA, J. A.; SOARES, P. M.; SANTOS, A. A.; BRITO, G. A.; RIBEIRO, R. A.; SOUZA, M. H. Role of the NO/cGMP/K(ATP) pathway in the protective effects of sildenafil against ethanol-induced gastric damage in rats. **Br. J. Pharmacol.**, v. 153, n. 4, p. 623-624, 2008.

MEHTA, A. K.; TICKU, M. K. An update on GABAA receptors. **Brain Res. Rev.**, v. 29, p.196-217, 1999.

MEISTER, A. Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal: Applications in research and therapy. **Pharmacol. Ther.**, v. 51, p.155-194, 1991.

MELDRUM, B. S.; AKBAR, M. T.; CHAPMAN, A. G. Glutamate receptors and transporters in genetic and acquired models of epilepsy. **Epilepsy Res.**, v. 36, p. 189-204, 1999.

MELDRUM, B. S.; ROGAWSKI, M. A. Molecular Targets for Antiepileptic Drug Development. **Neurotherapeutics**, v. 4, n. 1, p.18-61, 2007.

MELDRUM, B.; CHAPMAN, A. Epileptic seizures and epilepsy. *In: SIEGEL, G. J. et al.* (Ed.). **Basic neurochemistry molecular, cellular and medical aspects**. [S.l.]: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. p.758.

MELLO, L.; BORTOLOTTI, Z.A.; CAVALHEIRO, E.A. Modelos experimentais de epilepsia: uma revisão. **Neurobiol**, v. 49, p.231-268, 1986.

MELO, C.T.V.; MONTEIRO, A.P.; LEITE, C.P.; ARAÚJO, F.L.O.; LIMA, V.T.; BARBOSA-FILHO, J.M.; FONTELES, M.M.F.; VASCONCELOS, S.M.M.; VIANA, G.S.B.; SOUSA, F.C.F. Anxiolytic-Like Effects of (*O*-Methyl)-*N*-2,6-dihydroxybenzoyl-tyramine (Riparin III) from *Aniba riparia* (NEES) MEZ (Lauraceae) in Mice. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 29, n. 3, p. 451-454, 2006.

MENDONÇA, V. L. M.; OLIVEIRA, C. L. A.; CRAVEIRO, A. A. Pharmacological and toxicological evaluation of *Alpinia speciosa*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 93-97, 1991.

MEYER ALBIERO, A. L.; ABOIN SERTIÉ, J. A.; BACCHI, E. M. Antiulcer activity of *Sapindus saponaria* L. in the rat. **J. Ethnopharmacol.**, v. 82, n. 1, p. 44-44, 2002.

MEYER, M.E.; VAN HARTESVELDT, C.; POTTER, T.J. Effects of dopamine D1 antagonists SCH23390 and SKF83566 on locomotor activities in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 44, p. 429-432, 1993.

MIHIC, S.J.; HARRIS, R.A. GABA and the GABA_A receptor. **Alcohol Health Res. World**, v. 21, n. 2, p.127-131, 1997.

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

MILLER, T.A.; LI, D.; KUO, Y.; SCHMIDT, K.L.; SHANBOUR, L.L. Nonprotein sulphhydryl compounds in canine gastric mucosa: Effects of PGE₂ and ethanol. **Am. J. Physiol.**, v. 249, p. 137, 1985.

MILLS, G. C. Glutathione peroxidase and the destruction of hydrogen peroxidase in animal tissues. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 86, p. 1-5, 1960.

MOGENSEN, G.J.; JONES, D.L.; YIM, C.Y. From motivation to action: functional interface between limbic and motor systems. **Prog. Neurobiol.**, v. 14, p. 69- 97, 1980.

MOJŽIŠ, J.; HEGEDŮŠOVÁ, R.; MIROSSAY, L. Role of mucus in ischemia/reperfusion-induced gastric mucosal injury in rats. **Physiol, Res.**, v. 49, p. 441-446, 2000.

MOLINA, V.; CARBAJAL, D.; ARRUZAZABALA, L.; MÁZ, R. Therapeutic Effect of D-002 (Abexol) on Gastric Ulcer Induced Experimentally in Rats. **J. Med. Food**, v. 8, n. 1, p. 59-62, 2005.

MOLLIVER, M. E. Serotonergic neural systems: what their anatomic organization tells us about function. **J. Clin. Pharmacol.**, v. 7, p. 3-23, 1987.

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

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

MORIKAWA, T.; LI, N.; NAGATOMO, A.; MATSUDA, H.; LI, X.; YOSHIKAWA, M.. Triterpene saponins with gastroprotective effects from tea seed (the seeds of *Camellia sinensis*). **J. Nat. Prod.**, v. 69, p. 185-190, 2006.

MÓZSIK, G.; DÖMÖTÖR A, RUMI G, SZEKERES G. Gastrointestinal cytoprotection: from basic science to clinical perspectives. **Inflammopharmacology**, v. 15, n. 2, p. 49-60, 2007.

MUELLER, K.; KUNKO, P.M.; WHITESIDE, D.; HASKETT, C. Time course of amphetamine-induced locomotor stereotypy in an open field. **Psychopharmacology**, v. 99, n. 4, p. 501-507, 1989.

MURASHIMA, Y.L.; YOSHII, M.; SUZUKI, J. Ictogenesis and epileptogenesis in el mice. **Epilepsia**, v. 5, p. 130-135, 2002.

MUSCARA, M.N.; WALLACE, J.L. Nitric oxide. V. Therapeutic potential of nitric oxide donors and inhibitors. **Am. J. Physiol.**, v. 276, p. 1313-1316, 1999.

NAFFAH-MAZZACORATTI, M.G.; CAVALHEIRO, E.A.; FERREIRA, E.C.; ABDALLA, D.S.P.; AMADO, D.; BELLISIMO, M.I. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase activities and the hydroperoxide concentration are modified in the hippocampus of epileptic rats. **Epilepsy Res.**, v. 46, p. 121-128, 2001.

NAIR, A.; VAIDYA, V.A. Cyclic AMP response element binding protein and brain-derived neurotrophic factor: molecules that modulate our mood? **J. Biosci.**, v. 31, p. 423-434, 2006.

NAKAKI, T.; MISHIMA, A.; SUZUKI, E.; SHINTANI, F.; FUJII, T. Glufosinate ammonium stimulates nitric oxide production through *N*-methyl D-aspartate receptors in rat cerebellum. **Neurosci. Lett.**, v. 290, p. 209-212, 2000.

NARAYAN, S.; DEVI, R.S.; SRINIVASAN, P.; SHYAMALA DEVI, C.S. *Pterocarpus santalinus*: a traditional herbal drug as a protectant against ibuprofen induced gastric ulcers. **Phytother. Res.**, v. 19, n. 11, p. 958-962, 2005.

NARDI, A.E. Comentários do debatedor: escalas de avaliação de ansiedade. **Rev. Psiquiatr. Clin.**, v. 25, n. 6, p. 331-333, 1998.

NASSIRI-ASL, M.; SHARIATI-RAD, S.; ZAMANSOLTANI, F. Anticonvulsant effects of aerial parts of *Passiflora incarnata* extract in mice: involvement of benzodiazepine and opioid receptors. **BMC Compl. Altern. Med.**, v. 7, p. 26, 2007.

NATALE, G.; LAZZERI, G.; LUBRANO, V.; COLUCCI, R.; VASSALLE, C.; FORNAI, M.; BLANDIZZI, C.; DEL TACCA, M. Mechanisms of gastroprotection by lansoprazole pretreatment against experimentally induced injury in rats: role of mucosal oxidative damage and sulfhydryl compounds. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.195, p. 62- 72, 2004.

NELSON, M.T.; QUAYLE, J.M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **Am. J. Physiol.**, v. 268, n. 4, pt. 1, p. 799-822, 1995.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of newdrugs over the period 1981-2002. **J. Nat. Prod.**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

NEWTON, J. Effect of age related changes in gastric physiology on tolerability of medications for older people. **Drugs Aging**, v. 22, n. 8, p.655-661, 2005.

NISHIO, H.; HAYASHI, Y.; TERASHIMA, S.; TAKEUCHI, K. Role of endogenous nitric oxide in mucosal defense of inflamed rat stomach following iodoacetamide treatment. **Life Sci.**, v. 79, p. 1523–1530, 2006.

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

OATES, P.J.; HAKKINEN, J.P. Studies on the mechanism of ethanol-induced gastric damage in rats. **Gastroenterology**, v. 94, p.10-21, 1988.

OBAY, B.D.; EZEL TAS, D.; TÜMER, C.; BILGIN, H.M.; ATMACA, M. Dose dependent effects of ghrelin on pentylentetrazole induced oxidative stress in a rat seizure model. **Peptides**, v. 29, p. 448-455, 2008.

OHL, F.; TOSCHI, N.; WIGGER, A.; HENNIGER, M.S.H.; LANDGRAF, R. Dimensions of emotionality in an animal model of inborn hyperanxiety. **Behav. Neurosci.**, v. 115, p. 429-436, 2001.

OLINDA, T.M.; LEMOS, T.T.G.; MACHADO, L.L.; RAO, V.S.; SANTOS, F.A. Quebrachitol-induced gastroprotection against acute gastric lesions: Role of prostaglandins, nitric oxide and K⁺ ATP channels. **Phytomedicine**, v. 15, p. 327-333, 2008.

OLIVEIRA, A.A. **Efeitos do levetiracetam no modelo de convulsões induzidas por pilocarpina em camundongos.** Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

OLIVEIRA, A.A.; ALMEIDA, P.C.; FREITAS, R.M.; NASCIMENTO, V.S.; AGUIAR, L.M.V.; JÚNIOR, H.V.N.; FONSECA, F.N.; VIANA, G.S.B.; SOUSA, F.C.F.; FONTELES, M.M.F. Effects of Levetiracetam in Lipid Peroxidation Level, Nitrite–Nitrate Formation and Antioxidant Enzymatic Activity in Mice Brain After Pilocarpine-Induced Seizures. **Cell. Mol. Neurobiol.**, v. 27, n. 3, p. 395-406, 2006.

OLIVEIRA, F. A.; SILVA, D.A.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; GUTIERREZ, S.J.C. DE ALMEIDA, R.N.; BARBOSA-FILHO, J.M.; SOUZA, M.F.V. Synthesis and structural characterization of n-benzoyl-tryptamine and its new analogue n-salicyloyltryptamine, a potential anticonvulsant agent. **J. Chil. Chem. Soc.**, v. 51, n. 2, p. 919-922, 2006.

OLIVEIRA, F.A.; VIEIRA-JUNIOR, G.M.; CHAVES, M.H.; ALMEIDA, F.R.; SANTOS, K.A.; MARTINS, F.S.; SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S. *et al.* Gastroprotective effect of the mixture of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum*: role of capsaicin-sensitive primary afferent neurons. **Planta Med.**, v. 70, n. 8, p. 780-782, 2004.

OLIVEIRA, M.C.; FURIA, A.F.; ROYES, L.F.F.; FIGUEIRA, M.R.; MYSKIW, J.C.; FIORENZA, N.G.; MELLO, C.F. Ascorbate modulates pentylentetrazol-induced convulsions biphasically. **Neuroscience**, v. 128, p. 721-728, 2004.

OLIVEIRA, R.A.G. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Braz. J. Pharmacognosy**, v. 16, n. 1, p. 77-82, 2006.

OLSON, R. GABA. *In*: DAVIS, K. *et al.* (Ed.). **Neuropsychopharmacology**: The fifth generation of progress. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2002.

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

ONO, H.; SAKAMOTO, A.; SAKURA, N. Plasma total glutathione concentration in epileptic patients taking antikonvulsants. **Clin. Chem. Acta**, v. 298, p. 135-143, 2000.

OHTAU, Y.; KOBAYASHI, T.; ISHIGURO, I. Role of endogenous serotonin and histamine in the pathogenesis of gastric mucosal lesions in unanaesthetised rats with a single treatment of compound 48/80, a mast cell degranulator. **Pharmacol Res**, v. 39(4), p. 261-267, 1999.

OZTURK, Y.; AYDINI, S.; BEIS, R.; BASER, K.H.C.; BERBEROGLU, H. Effect of *Hypericum perforatum* L. and *Hypericum calximun* L. extract on the central nervous system in mice. **Phytomedicine**, v. 3, p. 139-146, 1996.

PACHALY, J. R.; WERNER, P. R.; SCHIMANSKI, J. C.; CIFFONI, E.M.G. Estresse por captura e contenção em animais selvagens. **A Hora Veterinária**, v. 74, p. 47-52, 1993.

PAIK, S.Y.; KOK, K.H.; BEAK, S.M.; PAEK, S.H.; KIM, J.A. The Essential Oils from *Zanthoxylum schinifolium* Pericarp Induce Apoptosis of HepG2 Human Hepatoma Cells through Increased Production of Reactive Oxygen Species. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 28, n. 5, p. 802-807, 2005.

PAIVA, L.A.F.; RAO, V.S.N.; GRAMOSA, N.V.; SILVEIRA, E.R. Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oleoresin on experimental gastric ulcer models in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 62, p. 73-78, 1998.

PARL, F.F.; LEV, R.; THOMAS, E.; PITCHUMONI, C.S. Histologic and morphometric study of chronic gastritis in alcoholic patients. **Hum. Pathol.**, v. 10, p. 45-56, 1979.

PATSOUKIS, N.; ZERVOUDAKIS, G.; PANAGOPOULOS, N.T.; GEORGIU, C.D.; ANGELATOU, F.; MATSOKIS, N.A. Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the

mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. **Neurosci. Lett.**, v. 357, p. 83-86, 2004.

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

PEREIRA, C.A.M.; MAIA, J.N. Estudo da atividade antioxidante do extrato e do óleo essencial obtidos das folhas de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 27, n. 3, p. 624-632, 2007.

PEREZ, R.M.G.; PEREZ, J.A.L.; GARCIA, L.D.M.; SOSSA, H.M. Neuropharmacological activity of *Solanum nigrum* fruit. **J. Ethnopharmacol.**, v. 62, p. 43-48, 1998.

PERINI, R.F.; MA, L.; WALLACE, J. L. Mucosal Repair and COX-2 Inhibition. **Curr. Pharm. Des.**, v. 9, n. 27, p. 2207-2211, 2003.

PERTINO, M.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; RODRÍGUEZ, J.A.; THEODULOZ, C. Gastroprotective effect and cytotoxicity of terpenes from the Paraguayan crude drug "yagua rova" (*Jatropha isabelli*). **J. Ethnopharmacol.**, v. 111, n. 3, p. 553-559, 2007.

PESKAR, B. M. Role of cyclooxygenase isoforms in gastric mucosal defence. **J. Physiol.**, v. 95, n. 1/6, p. 3-9, 2001.

PESKAR, B.M.; EHRLICH, K.; PESKAR, B.A. Role of ATP-sensitive potassium channels in prostaglandin-mediated gastroprotection in the rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 301, p. 969-974, 2002.

PETROVICK, P. R. New rules for phythopharmaceutical drug registration in Brazil. **J. Ethnopharmacol.**, v. 66, p.51-55, 1999.

PONGPIRIYADACHA, Y.; MATSUDA, H.; MORIKAWA, T.; ASAO, Y.; YOSHIKAWA, M. Protective Effects of Polygodial on Gastric Mucosal Lesions Induced by Necrotizing Agents in Rats and the Possible Mechanisms of Action. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 26, n. 5, p. 651-657, 2003.

PORSOLT, R.D.; ANTON, G.; BLAVET, N.; JAFRE, M. Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 47, p. 379-391, 1978.

PORSOLT, R.D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, v. 229, p. 327-336, 1977.

PRIESTLEY, C.M.; WILLIAMSON, E.M.; WAFFORD, K.; SATTELLE, D.B. Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human GABAA receptors and a homooligomeric GABA receptor from *Drosophila melanogaster*. **Br. J. Pharmacol.**, v. 140, p. 1363-1372, 2003.

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. 28,463, n. 1-3, p. 3-33, 2003.

PRZEGALINSKI, E.; TATARCZYŃSKA, E.; CHOJNACKA-WÓJCIK, E. Antidepressant-like activity of ipsapirone, buspirone and gepirone in the forced swimming test in rats pretreated with proadifen. **J. Psychopharmacol.**, v. 4, n. 4, p. 204-209, 1990.

QUEIROZ, D.M.; MENDES, E.N.; ROCHA, G.A.; MOURA, S.B.; RESENDE, L.M.; BARBOSA, A.J. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on antral gastrin- and somatostatin-immunoreactive cell density and gastrin- somatostatin concentrations. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 28, p. 658-664, 1993.

QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; DE ALMEIDA, R.N.; FALCÃO, A.C.G.M.; AGRA, M.F.; SOUSA, M.F.V.; BARBOSA-FILHO, J.M. Avaliação da Atividade Anticonvulsivante de Plantas do Nordeste Brasileiro. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 21, n. 3, p. 179-184, 2002.

QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; LIMA, J.T.; ALMEIDA, J.R.G.S.; BEDOR, C.N.G.; SILVA JÚNIOR, R.G.C. Modelos animais para avaliação de drogas anticonvulsivantes: uma revisão. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 88, n. 4, p. 163-166, 2007.

RABBANI, M.; SAJJADI, S.E.; MOHAMMADI, A. Evaluation of the anxiolytic effect of *Nepeta persica* Boiss. in mice. **Evid Based Complement Alternat. Med.**, v. 5, n. 2, p.181-186, 2008.

RADENOVIC, L.; VASILJEVIS, I.; SELAKOVIC, V.; JOVANOVIC, M. 7-Nitroindazole reduces nitrite concentration in rat brain after intrahippocampal kainate-induced seizure. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.**, v. 135, n. 4, p. 443-450, 2003.

RAHGOZAR, M.; TOROUDI, H. R. P.; BAKHTIARIAN, A.; DJAHANGUIRI, B. Diazoxide, a K_{ATP} channel opener, prevented ethanol-induced gastric ulceration in rats. **Iraniana J. Pharmacol. Therap.**, v. 1, n. 1, p. 5-7, 2002.

RAINSFORD, K.D. The effect of 5-lipoxygenase inhibitors and leukotriene antagonists on the development of gastric lesions induced by nonsteroidal antiinflammatory drugs in mice. **Agents Action**, v. 21, p.316-319, 1987.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

RAO, B. R. R.; KAUL, P. N.; SYAMASUNDAR, K. Y.; RAMESH, S. Comparative composition of decanted and recovered essential oils of *Eucalyptus citriodora* Hook. **Flavor Fragrance J.**, v. 18, n. 2, p.133-135, 2003.

RAO, V.S.N.; SANTOS, F.A.; SOBREIRA, T.T.; SOUZA, M.F.; MELO, C.L.; SILVEIRA, E.R. Investigations on the gastroprotective and antidiarrhoeal properties of ternatin, a tetramethoxyflavone from *Egletes viscosa*. **Planta Med.**, v. 63, p. 146-149, 1997.

RASTOGI, L.; PATNAIK, G.K.; DIKSHIT, M. Free radicals and antioxidant status following pylorus ligation induced gastric mucosal injury in rats. **Pharmacol. Res.**, v. 38, n. 2, p. 125-132, 1998.

RAVIZZA, R.; GARIBOLDI, M.B.; MOLteni, R.; MONTI, E. Linalool, a plant-derived monoterpene alcohol, reverses doxorubicin resistance in human breast adenocarcinoma cells. **Oncol. Rep.**, v. 20, n. 3, p. 625-630, 2008.

REHNI, A.K.; SINGH, T.G.; KALRA, R.; SINGH, N. Pharmacological inhibition of inducible nitric oxide synthase attenuates the development of seizures in mice. **Nitric Oxide**. 2009. [Epub ahead of print].

REITER, R.; TANG, L.; GARCIA, J.J.; MUNOZ-HOYOS, A. Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. **Life Sci.**, v. 60, p. 2255-2271, 1997.

REPETTO, M.G.; LLESUY, S. F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 35, p. 523-534, 2002.

REX, A.; MARSDEN, C.A.; FINK, H. Effect of diazepam on cortical 5-HT release and behaviour in the guinea-pig on exposure to the elevated plus maze. **Psychopharmacology**, v. 110, p. 490-496, 1993.

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

RIBEIRO, M.C.; ÁVILA, D.S.; SCHNEIDER, C.Y.M.; HERMES, F.S.; FURIAN, A.F.; OLIVEIRA, M.S.; RUBIN, M.A.; LEHMANN, M.; KRIEGLSTEIN, J.; MELLO, C.F. α -Tocopherol protects against pentylentetrazol and methylmalonate-induced convulsions. **Epilepsy Res.**, v. 66, p.185-194, 2005.

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. 835-53, 2001.

RILEY, H.; SPINKS, A. Biological assessment of tranquilizers. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 10, p. 657-671, 1958.

ROBBERS, J. E. **Farmacognosia e farmacobiotechnologia**. São Paulo: Editorial Premier, 1997.

ROBERT, A.; NEZAMIS, J.E., LANCASTER, C., HANCHAR. A.J. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. **Gastroenterology**, v. 77, n. 3, p. 433-443,1979.

RODGERS, R. J.; CAO, B. J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety on ethological perspective. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 30, p. 289-304, 1997.

RODRÍGUEZ, J.A.; THEODULOZ, C.; SÁNCHEZ, M.; YÁÑEZ, T.; RAZMILIC, I.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Gastroprotective activity of a new semisynthetic solidagenone derivative in mice. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 57, n. 2, p. 265-271, 2005.

RODRÍGUEZ-TÉLLEZ, M.; ARGÜELLES, F.; HERRERÍAS, J.M. Jr.; LEDRO, D.; ESTEBAN, J.; HERRERÍAS, J. M. Antiinflammatory agents less dangerous for gastrointestinal tract. **Curr. Pharm. Des.**, v. 7, p. 951-976, 2001.

ROLLAND, A.; FLEURENTIN, J.; LANHERS, M.C.; YOUNOS, C.; MISSLIN, R.; MORTIER, F. Behavioural effects of the American traditional plant *Eschscholzia californica*: sedative and anxiolytic properties. **Planta Med.**, v. 57, p. 212-216, 1991.

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

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.

RUSSEK, S.J. Evolution of GABA-A receptor diversity in the human genome. **Gene**, v. 227, p. 213-322, 1999.

RUZICKA, L. Isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. **Experientia**, v. 9, p. 357-367, 1953.

SAGRATELLA, S. Characterization of the in vitro antiepileptic activity of new and old anticonvulsant drugs. **Gen. Pharmacol.**, v. 30, n. 2, p.153-160, 1998.

SAIKA, M.; UEYAMA, T.; SENBA, E. Expression of immediate early genes HSP70, and COX-2 mRNAs in rat stomach following ethanol ingestion. **Dig. Dis. Sci.**, v. 45, p. 2455-2462, 2000.

SÁNCHEZ, M.; THEODULOZ, C.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; RAZMILIC, I.; YÁÑEZ, T., Gastroprotective and ulcer-healing activity of oleanolic acid derivatives: In vitro-in vivo relationships. **Life Sci.**, v. 79, p .1349-5136, 2006.

SANTOS, C.L.; SOUZA, M.H.; GOMES, A.S.; LEMOS, H.P.; SANTOS, A.A.; CUNHA, F.Q.; WALLACE, J.L. Sildenafil prevents indomethacin-induced gastropathy in rats: role of leukocyte adherence and gastric blood flow. **Br. J. Pharmacol.**, v. 146, n. 4, p. 481-486, 2005.

SANTOS, F. A. **Atividade antibacteriana, antinociceptiva e anticonvulsivante dos óleos essenciais de *Psidium guyanensis* PERS. e *Psidium pohlianum* BERG.** Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1997.

SANTOS, F.A.; RAO, V.S. 1,8-cineol, a food flavoring agent, prevents ethanol-induced gastric injury in rats. **Dig. Dis. Sci.**, v. 46, n. 2, p. 331-337, 2001.

SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. **Phytother. Res.**, v. 14, p. 240-244, 2000.

SCHEUER, M. L.; PEDLEY, T.A. The evaluation and treatment of seizures. **N. Engl. J. Med.**, v. 323, p.1468-1474, 1990.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; YESILADA, E. Traditional medicine and gastroprotective crude drugs. **J. Ethnopharmacol.**, v.100, p. 61-66, 2005.

SCHRADER, J.; BERGER, R.G. Biotechnological production of terpenoid flavor and fragrance compounds. *In*: REHM, H.J.; REED, G. **Biotechnology**. 2nd ed. Weinheim: Wiley-VHC, 2001. p 373-422.

SCORZA, F.A.; ARIDA, R.M.; CYSNEIROS, R.M.; SCORZA, C.A.; ALBUQUERQUE, M.; CAVALHEIRO, E.A. Estudo qualitativo da formação hipocampal de animais hipertensos com epilepsia. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 63, n. 2A, p. 283-288, 2005.

SCOTT, M.D.; LUBIN, B.H.; ZUO, L.; KUYPERS, F.A. Erythrocyte defence against hydrogen peroxide: prominent importance of catalase. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 118, p. 7-16, 1991.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H.. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal. Biochem.**, v. 24-25, n. 1, 192-205, 1968.

SERRA, S.; BRENNA, E.; FUGANTI, C.; MAGGIONI, F. Lipase-catalyzed resolution of *p*-menthan-3-ols monoterpenes: preparation of the enantiomer-enriched forms of menthol, isopulegol, *trans*- and *cis*-piperitol, and *cis*-isopiperitenol. **Tetrahedron. Asymmetry**, v. 14, p. 3313-3319, 2003.

SERRA, G.; COLLU, M.; D'AQUILA, P.S.; GESSA, G.L. Role of the mesolimbic dopamine system in the mechanism of action of antidepressants. *In*: Proceedings of XVIIIth CIPN Congress Satellite Symposium The Biology and Pharmacology of Maniac- Depressive Disorders: From molecular Theories to Clinical Practice. **Copenhagen. Pharmacol. Toxicol.**, v. 71, p. 72-85, 1992.

SHARMA, A.B.; SUN, J.; HOWARD, L.L.; WILLIAMS JR, A.G.; MALLETT, R.T. Oxidative stress reversibly inactivates myocardial enzymes during cardiac arrest. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 292, n. 1, p. 198-206, 2007.

SHIRIN, H.; PINTO, J.T.; LIU, L.U.; MERZIANU, M.; SORDILLO, E.M.; MOSS, S.F. *Helicobacter pylori* decreases gastric mucosal glutathione. **Cancer Lett.**, v. 26, n. 2, p. 127-133, 2001.

SHORROCK, C. J.; REES, W. D. Overview of gastroduodenal mucosal protection. **Am. J. Med.**, v. 84, n. 2A, p. 25-34, 1988.

SIEGMUND, S. Animal models in gastrointestinal alcohol research-a short appraisal of the different models and their results. **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v. 17, n. 4, p. 519-542, 2003.

SIES, H. Oxidative stress: introduction. *In: _____*. **Oxidative stress: oxidants and antioxidants**. New York: Academic Press, p. 15-22, 1991.

SILVA, M.I.G.; GONDIM, A.P.S.NUNES, I.F.S.; SOUSA, F.C.F. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 16, n. 4, p. 455-462, 2006.

SIMÕES, C.M.O. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2001.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: UFSC, 1999.

SIMONIC, A.; LAGINJA, J.; VARLJEN, J.; ZUPAN, G.; ERAKOVIC, V. Lithium plus pilocarpine induced status epilepticus – biochemical changes. **Neurosci. Res.**, v. 36, p. 157-166, 2000.

SINGH, S.; KHAJURIA, A.; TANEJA, S.C.; KHAJURIA, R.K.; SINGH, S.; QAZI, G.N. The gastric ulcer protective effect of boswellic acids, a leukotriene inhibitor from *Boswellia serrata*, in rats. **Phytomedicine**, v. 15, n. 6-7, p. 408-415, 2008.

SIRVEN, J. I. Antiepileptic drug therapy for adults: when to initiate and how to choose. **Mayo Clin. Proc.**, v. 77, n. 12, p.1367-65, 2002.

SIRVEN, J. I. Antiepileptic drug therapy for adults: When to initiate and how to choose. **Mayo Clin.Proc**, v. 77, n. 12, p.1367-65, 2002.

SIVRI, B. Trends in peptic ulcer pharmacotherapy. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v. 18, p. 23-31, 2004.

SIWKO, M.E.; MARRINK, S.J.; DE VRIES, A.H.; KOZUBEK A.; UITERKAMP, A.J.M.S.; MARK, A.E. Does isoprene protect plant membranes from thermal shock? A molecular dynamics study. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1768, p. 198-206, 2007.

SMITH, M.; WILCOX, K.S.; WHITE, H.S. Discovery of antiepileptic drugs. **Neurotherapeutics**, v. 4, n. 1, p. 12-17, 2007.

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

SOARES, A.C. Se bem não fizer, mal também não fará. **Rev. Eletr. Ciênc.**, n. 12, 2002. Disponível em: <http://www.cdcc.sc.usp.br/ciencia/artigos/art_12/medicamento.html>. Acesso em: 6 set. 2005.

SOGHOMONIAN, J. J.; CHESSELET, M. F. GABA in the basal ganglia. *In: MARTIN, D.L.; OLSEN, R.W. GABA in the nervous system: the view at fifty years*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 265-292.

SOUSA, F.C.F.; MELO, C.T.V.; MONTEIRO, A.P.; LIMA, V.T.M.; GUTIERREZ, S.J.C.; PEREIRA, B.A.; BARBOSA-FILHO, J.M.; VASCONCELOS, S.M.M., FONTELES, M.F.;

VIANA, G.S.B. Antianxiety and antidepressant effects of riparin III from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 78, p. 27-33, 2004.

SOUSA, F.C.F.; MONTEIRO, A.P.; MELO, C.T.V.; OLIVEIRA, G.R.; VASCONCELOS, S.M.M.; FONTELES, M.M.F.; GUTIERREZ, S.J.C.; BARBOSA-FILHO, J.M.; VIANA, G.S.B. Antianxiety Effects of Riparin I from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Phytother. Res.**, v. 19, p.1005-1008, 2005a .

SOUSA, F.C.F.; PEREIRA, B.A.; LIMA, V.T.; LACERDA, C.D.G.; MELO, C.T.V.; BARBOSA-FILHO, J.M.; VASCONCELOS, S.M.M.; VIANA, G.S.B. Central Nervous System Activity of Yangambin from *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae) in mice. **Phytother. Res.**, v. 19, p. 282-286, 2005b.

SOUTHWICK, S.M.; PAIGE, S.; MORGAN, C.A.; BREMNER, J.D.; KRYSTAL, J.H.; CHARNEY, D.S. Neurotransmitter alterations in PTSD: catecholamines and serotonin. **Semin. Clin. Neuropsychiatry**, v. 4, n. 4, p. 242-248, 1999.

SPEISKY, H.; MACDONALD, A.; GILES, G.; ORREGO, H.; ISRAEL, Y. Increased loss and decreased synthesis of hepatic glutathione after acute ethanol administration. Turnover studies. **Biochem. J.**, v.1, n .3, p. 565-572, 1985.

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.

STOUT, J.C.; WEISS, J.M. An animal model for measuring behavioral responses to anxiogenic and ansiolytic manipulation. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 47, p. 459-465, 1994.

SUGAI, Y.; ANDO, T.; NISHIMURA, G. Sulfhydryl group (total SH) and glutathione contents in digestive organs. **J. Gastroenterol.**, v. 3, n. 4, p. 280-281, 1968.

SUN, J. D-Limonene: Safety and Clinical Applications. **Altern. Med. Rev.**, v. 12, n. 3, p. 259-263, 2007.

SUZUKI, T.; INAYAMA, M.; MISAWA, M. The effect of diazepam on exploratory behavior and its strain differences in inbred rats. **Jpn. J. Psychopharmacol.**, v. 10, p. 307-314, 1990.

SWIADER, M.J.; PORÊBIAK, J.; SWIADER, K.; WIELOSZ, M.; CZUCZWAR, S.J. Influence of cimetidine on the anticonvulsant activity of conventional antiepileptic drugs against pentilenetetrazole-induced seizures in mice. **Pharmacol. Rep.**, v. 58, p. 131-144, 2006.

SWINYARD, E.A.; BROWN, W. C.; GOODMAN, L.S. Comparative assay of antiepileptic drugs in mice and rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 106, p. 319-330, 1952.

SZABO, S. Mechanisms of gastric mucosal injury and protection. **J. Clin. Gastroenterol.**, v. 13, p. 21S-34S, 1991.

SZABO, S.; TRIER, J.S.; BROWN, A.; SCHNOOR, J.; HOMAN, H.D.; BRADFORD, J.C. A quantitative method for assessing the extent of experimental gastric erosions and ulcers. **J. Pharmacol. Methods**, v. 13, n. 1, p. 59-66, 1985.

SZABO, S.; TRIER, J.S.; FRANKEL, P.W. Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection. **Science**, v. 214, p. 200-222, 1981.

SZABO, S.; VINCZE, Á. Growth factors in ulcer healing: lessons from recent studies. **J. Physiol.**, v. 94, p. 77-81, 2000.

TAKASE, H.; YAMAMOTO, K.; HIRANO, H.; SAITO, Y.; YAMASHITA, A. Pharmacological profile of gastric mucosal protection by marmim and nobiletin from a traditional herbal medicine, *Aurantii freuctus immaratus*. **Jpn. J. Pharmacol.**, v. 66, n. 1, p.139-147, 1994.

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.

TAKEUCHI, K.; OHUCHI, T.; MIYAKE, H.; NIKI, S.; OKABE, S. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on duodenal alkaline secretion in anesthetized rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 231, p. 135-138, 1993.

TAN, P.V.; NYASSE, B.; DIMO, T.; MEZUI, C. Gastric cytoprotective anti-ulcer effects of the leaf methanol extract of *Ocimum suave* (Lamiaceae) in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 82, 69-74, 2002.

TARNAWSHI, A. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. **Dig. Dis. Sci.**, v.50, n.1, S24-S33, 2005.

TARNAWSKI, A.; STACHURA, J.; HOLLANDER, D.; SARFEH, I.J.; BOGDAL, J. Cellular aspects of alcohol-induced injury and prostaglandin protection of the human gastric mucosa. Focus on the mucosal microvessels. **J. Clin. Gastroenterol.**, v. 10, p. 35-45, 1988.

TAYLOR, D.P.; RIBLET, L.A.; STANTON, H.C.; EISON, A.S.; EISON, M.S.; TEMPLE JR, D.L. Dopamine and antianxiety activity. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.17 suppl 1, p. 25-35, 1982.

THOMET, U.; BAUR, R.; RAZET, R.; DODD, R.H.; FURTMÜLLER, R.; SIEGHART, W.; SIGEL, E. A novel positive allosteric modulator of the GABA(A) receptor: the action of (+)-ROD188. **Br. J. Pharmacol.**, v. 131, p. 843-850, 2000.

THOMOPOULOS, K.C.; VAGENAS, K.A.; VAGIANOS, C.E.; MARGARITIS, V.G.; BLIKAS, A.P.; KATSAKOULIS, E.C.; NIKOLOPOULOU, V.N. Changes in aetiology and clinical outcome of acute upper gastrointestinal bleeding during the last 15 years. **Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 16, n. 2, p. 177-182, 2004.

TIERNEY, J.G. Treatment-resistant depression: managed care considerations. **J. Manag. Care Pharm.**, v. 13, p. S2-7, 2007.

TISSERAND, R.; BALACS, T. **Essential Oil Safety: A Guide for Health Care Professionals**. London: Churchill Livingstone, 1999.

TRASARTI, A.F.; MARCHI, A.J.; APESTEGUÍA, C.R. Highly selective synthesis of menthols from citral in a one-step process. **J. Catalysis**, v. 224, p. 484-488, 2004.

TRIER, J.S.; SZABO, S.; ALLAN, C.H. Ethanol-induced damage to mucosal capillaries of rat stomach. Ultrastructural features and effects of prostaglandin E2 and cysteamine. **Gastroenterology**, v. 92, p.13-22,1987.

UCHIDA, M.; MATSUEDA, K.; SHODA, R.; MURAOKA, A.; YAMATO, S. Nitric oxide donating compounds inhibit HCl-induced gastric mucosal lesions mainly via prostaglandin. **Jpn. J. Pharmacol.**, v. 85, p. 133-138, 2001.

UEDA, Y.; YOKAYAMA, H.; NIWA, R.; KONAKA, R.; OHYA-NISHIGUCHI, H.; KAMADA, H. Generation of lipid radicals in hippocampal extracellular space during kainic acid-induced seizures in rats. **Epilepsy Res.**, v. 26, p. 329-333, 1997.

UMEZU, T.; MORITA, M. Evidence for the involvement of dopamine in ambulation promoted by menthol in mice. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 91, n. 2, p.125-135, 2003.

UMEZU, T.; SAKATA, A.; ITO, H. Ambulation-promoting effect of peppermint oil and identification of its active constituents. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 69, p. 383 -390, 2001.

UNESCO. **Culture and Health, Orientation Texts: World Decade for Cultural Development 1988 – 1997**. Paris, 1996. (Document CLT/DEC/PRO).

UZÜM, G.; AKGÜN-DAR, K.; BAHÇEKAPILI, N.; DILER, A.S.; ZIYLAN, Y.Z. Nitric oxide involvement in seizures elicited by pentylentetrazol and sex dependence. **Int. J. Neurosci.**, v. 115, n. 11, p. 1503-1514, 2005.

VAN ASBECK, B. S.; HOIDAL, J.; VERCELLOTTI, G. M. Protection against lethal hyperoxia by tracheal insufflation of erythrocytes: role of red cell glutathione. **Science**, v. 277, p. 756-759, 1985.

VAN DER KRAAIJ, A.M.M.; MOSTERT, L.J.; VAN EIJK, H.G.; KOSTER, J.F. Ironload increases the susceptibility of rat hearts to oxygen reperfusion damage. **Circulation**, v. 78, p. 442-449, 1988.

VERNIN, G.A.; PARKANYI, C.; COZZOLINO, F.; FELLOUS, R. GC/MS analysis of the volatile constituents of *Corymbia citriodora* Hook. from Réunion Island. **J. Eessential Oil Res.**, v. 16, p.560-565, 2004.

VYVYAN, J. R. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. **Tetrahedron**, v. 58, p. 1631-1646, 2002.

WALKER, L. G. The measurement of anxiety. **Postgrad. Med. J.**, v. 66, n. 2, p. 11-17, 1990.

WALLACE, J. L.; GRANGER, D. N. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. **FASEB J.**, v. 10, p. 731-740 1996.

WALLACE, J.L. Mechanisms of protection and healing: current knowledge and future research. **Am. J. Med.**, v. 110, p.19S-23S, 2001a.

WALLACE, J. L. Pathogenesis of NSAID-induced gastroduodenal mucosal injury. **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v. 15, n. 5, p. 691-703, 2001b.

WALLACE, J. L.; MCKNIGHT, W.; REUTER, B.K.; VERGNOLLE, N. NSAID-induced gastric damage in rats: requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2. **Gastroenterology**, v. 119, n. 3, p.706-714, 2000.

WALLACE, J. L.; MILLER, M.J. Nitric Oxide in mucosal defense: a little goes a long way. **Gastroenterology**, v. 119, p. 512-520, 2000.

WAMBEBE, C. Influence of some agents that affect 5-hydroxy-tryptamine metabolism and receptors on nitrazepam-induced sleep in mice. **Braz. J. Pharmacol.**, v. 84, p. 185-91, 1985.

WANG, H.; CHENG, E.; BROOKE, S.; CHANG, P.; SALPOSKY, R. Overexpression of antioxidant enzymes protects cultured hippocampal and cortical neurons from necrotic insults, **J. Neurochem.**, v. 3, p. 1527–1534, 2003.

WATKINS, J. C.; OLVERMAN, H. J. Agonists and antagonists for excitatory amino acid receptors. **Trends Neurosci.**, v. 10, p. 265-272, 1987.

WATT, E. E.; BETTS, B.A.; KOTEY, F.O.; HUMBERT, D.J.; GRIFFITH, T.N.; KELLY, E.W.; VENESKEY, K.C.; GILL, N.; ROWAN, N.K.; JENKINS, A.; HALL, A.C. Menthol shares general anesthetic activity and sites of action on the GABAA receptor with the intravenous agent, propofol. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 590, p. 120-126, 2008.

WESTBROOK, G. L. Seizures and Epilepsy. *In*: KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M. (Ed.). **Principles of neural science**. 4th ed. [S.l]: McGraw Hill, 2000. p. 911.

WHITTLE, B.J.R. Mechanisms underlying intestinal injury induced by anti-inflammatory COX inhibitors. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 500, p. 427-439, 2004.

WILLIANS, E.; OKPAKO, D.; EVANS, F.J. **Selection, preparation and pharmacological evaluation of plant material**. Chichester: J. Wiley, 1996.

WOLFFGRAMM, J.; MIKOLAICZY, K.C.; COPER, H. Acute and sub-chronic benzodiazepine-barbiturate-interactions on behavioral and physiological response of the mouse. **Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol**, v. 349, p. 279-286, 1994.

WRIGHT, I. K.; UPTON, N.; MARSDEN, C. A. Effect of established and putative anxiolytics on extracellular 5-HT and 5-HIAA in the ventral hippocampus of rats during behaviour on the elevated X-maze. **Psychopharmacol. Berl.**, v. 109, p. 338-346, 1992.

YANG, Y.X.; LEWIS, J.D.; EPSTEIN, S.; METZ, D.C. Long-term proton pump inhibitor therapy and risk of hip fracture. **JAMA**, v. 296, p. 2947-2953, 2006.

YANISHLIEVA, N.V.; MARINOVA, E. M.; GORDON, M. H.; RANEVA, V.G. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. **Food Chem.**, v. 64, p. 59-66, 1999.

YEO, M.; KIM, D.K.; CHO, S.W.; HONG, H.D. Ginseng, the root of *Panax ginseng* C.A. Meyer, protects ethanol-induced gastric damages in rat through the induction of cytoprotective heat-shock protein 27. **Dig. Dis. Sci.**, v. 53, p.3, p. 606-613, 2008.

YOUNG, R.; JOHNSON, D.N. A fully automated light/dark apparatus useful for comparing anxiolytic agents. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 40, n. 4, p. 739-743, 1991.

ZETTERSTROM, Q. P. T.; FILLENZ, M. Both systemic and local administration of benzodiazepine agonists inhibit the in vivo release of 5-HT from ventral hippocampus. **Neuropharmacology**, v. 28, p. 1061-1066, 1989.

ZHAO, W.; ZHU, F.; SHEN, W.; FU, A.; ZHENG, L.; YAN, Z.; ZHAO, L.; FU, G. Protective effects of DIDS against ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. **Acta Biochim. Biophys. Sin** (Shanghai), v. 41, n. 4, p. 301-308, 2009.

ZHU, A.; KAUNITZ, J. Gastroduodenal mucosal defense. **Curr. Gastroenterol. Rep.**, v. 10, n. 6, p. 548-554, 2008.

ZIMMERMAN, M. Ethical guidelines for investigations of 868 experimental pain in conscious animals. **Pain** 16:109–110, 1983.

ZYGADLO, J. A.; JULIANI JR, H. R. Study of essential oil composition of aromatic plants from Argentina. *In*: MAJUMDAR, D. K.; GOVIL, J. N.; SINGH, V.K. (Ed.). **Phytochemistry & Pharmacology II**. [S.l]: Studium Press LLC, 2003. P. 273 – 293. (Series Recent Progress in Medicinal Plants, v. 8).

APÊNDICES



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com



Pharmacology, Biochemistry and Behavior xx (2007) xxx–xxx

**PHARMACOLOGY
BIOCHEMISTRY
AND
BEHAVIOR**

www.elsevier.com/locate/pharmbiochembeh

Central nervous system activity of acute administration of isopulegol in mice

Maria Izabel Gomes Silva^a, Manuel Rufino de Aquino Neto^a, Paulo Florentino Teixeira Neto^a,
Brinell Arcanjo Moura^a, Jeferson Falcão do Amaral^a, Damião Pergentino de Sousa^b,
Silvânia Maria Mendes Vasconcelos^a, Francisca Cléa Florenço de Sousa^{a,*}

^a Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará. Address: Rua Cel. Nunes de Melo 1127, CEP: 60431-270, Fortaleza, Brazil

^b Department of Physiology, Federal University of Sergipe. Address: CEP 49100-000 São Cristóvão, Sergipe, Brazil

Received 22 November 2006; received in revised form 7 July 2007; accepted 17 July 2007

Abstract

Isopulegol is a monoterpene alcohol intermediate in the preparation of (–)-menthol and it is present in the essential oils of various plants. This work presents behavioral effects of isopulegol in animal models of open field, elevated plus maze (EPM), rota rod, hole board, barbiturate-induced sleeping time, tail suspension and forced swimming tests in mice. Isopulegol was administered intraperitoneally to male mice at single doses of 25 and 50 mg/kg, while diazepam 1 or 2 mg/kg and imipramine 10 or 30 mg/kg were used as standard drugs. The results showed that, similar to diazepam (1 mg/kg), both doses of isopulegol significantly modified all the observed parameters in the EPM test, without alter the general motor activity in the open field test. In the same way, both doses of isopulegol increased the number of head dips in the hole-board test. Forced swimming and tail suspension tests showed that isopulegol (25 and 50 mg/kg) was able to induce a significant increase in the immobility time, in opposite to imipramine, a recognized antidepressant drug. There was a decrease in the sleep latency time and prolongation of the pentobarbital-induced sleeping time with both doses of Isopulegol. Different from diazepam (2 mg/kg), isopulegol (25 e 50 mg/kg) had no effect on the motor coordination of animals in the rota rod test. These results showed that isopulegol presented depressant- and anxiolytic-like effects.
© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Isopulegol; Anxiolytic and depressant effects; Essential oils; Monoterpene

1. Introduction

Data from the World Health report (WHO, 2001) have demonstrated that approximately 450 million people suffer from a mental or behavioral disorder. The prevalence of anxiety mental condition has risen in recent years (Andrews et al., 2000) and depressive disorders are common and often disabling (Pan et al., 2005). Therefore, the search for new compounds as therapeutic alternatives for such disorders has progressed constantly (Irie et al., 2004; Klodzinska et al., 2004), including the studies realized by our group (Melo et al., 2006; Sousa et al., 2005a; Sousa et al., 2005b; Sousa et al., 2004).

An increasing number of studies have demonstrated that plant derived essential oils exhibit a variety of biological properties,

such as anticonvulsant (De Sousa et al., 2006), analgesic (Almeida et al., 2001) and central activities (Gurgel do Vale et al., 2002). Several of these described effects are frequently attributed to monoterpenes, which are the major chemical components of those essential oils. Isopulegol (p-menth-8-en-3-ol) (Fig. 1), the substance used in this work, is a monoterpene alcohol, which is present in the essential oils of various plants, such as *Corymbia citriodora* Hook (Vemin et al., 2004), *Eucalyptus citriodora* Hook (Rao et al., 2003), *Zanthoxylum schinifolium* (Paik et al., 2005) and in other aromatic plant species (Mastelic et al., 1998). It is a 3-oxygenated monoterpene of *p*-menthane family, intermediate in the preparation of (–)-menthol (Serra et al., 2003), and have been used in the manufacture of fragrances with blossom compositions (Chuah et al., 2001). Recently, it was described that essential oils from *Zanthoxylum schinifolium* pericarp, which contained isopulegol, were able to induce apoptosis of HepG2 Human Hepatoma Cells, suggesting a plausible utilization of those oils as an anti-tumor agent in Hepatocellular carcinoma

* Corresponding author. Tel.: +55 85 3366 8337; fax: +55 85 3366 8333.

E-mail addresses: clea@ufc.br, cleaforenco@yahoo.com.br (F.C.F. de Sousa).

ARTICLE IN PRESS

2

M.I.G. Silva et al. / Pharmacology, Biochemistry and Behavior xx (2007) xxx–xxx

therapy (Paik et al., 2005). However, as far as we know, reports with reference to the therapeutic effects from isolated isopulegol, as we used in the present work, are scarce in literature.

As referred previously, isopulegol is an intermediate in the synthesis of (–)-menthol and therefore both compounds present similar structures (Serra et al., 2003). Previous studies in the literature demonstrated that menthol was able to promote ambulation in mice (Umezu and Morita, 2003; Umezu et al., 2001), an effect similar to that presented by psychostimulants. Such considerations led us to investigate whether isopulegol would be able to present comparable actions to that presented by menthol. For that, in this study we evaluated the behavior effects of isopulegol on animal models of central nervous system actions.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male Swiss mice (30 g) were used in each experiment and maintained at a controlled temperature (23 ± 1 °C) with a 12 h dark/light cycle and free access to water and food. Animals were treated in accordance with the current law and the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals.

2.2. Drugs

Isopulegol was emulsified with 0.2% Tween 80 (Sigma-USA) and dissolved in distilled water. Animals were treated with the substance at doses of 25 and 50 mg/kg, intraperitoneally, 30 min before the experiments. Controls received vehicle at the same volume (10 ml/kg) and were administered in the same route as the treated groups. Diazepam (DZP) 1 or 2 mg/kg (União Química/Brazil), Flumazenil (FLU) 2.5 mg/kg (União Química/Brazil) and Imipramine (IMP) 10 or 30 mg/kg (Geigy), used as standards, were intraperitoneally injected after dissolved in distilled water. Isopulegol was separated and obtained by column chromatography of the technical grade isopulegol (Dierberger — Brazil).

2.3. Experimental protocol

The animals were tested during the light period and observed in a closed room with constant temperature (23 ± 1 °C) and poorly illuminated with a 15-V red light, except in the forced swimming test which was illuminated with normal light. All tests were performed in different days with distinct groups of animals.

2.4. Elevated plus maze test (EPM)

The elevated plus maze for mice (Lister, 1987) consisted of two perpendicular open arms (30×5 cm) and two closed arms ($30 \times 5 \times 25$ cm) also in perpendicular position. The open and closed arms were connected by a central platform (5×5 cm).

The platform and the lateral walls of the closed arms were made of transparent acrylic and the floor of black acrylic. The

maze was 45 cm above the floor. After treatment, the animal was placed at the center of the plus maze with its nose in the direction of one of the closed arms, and observed for 5 min, according to the following parameters: number of entries in the open and closed arms, and time of permanence in each of them. The time of permanence measures the time spent by the animal in the open and closed arms. Anxiolytic compounds reduce the animal's aversion to the open arms and promotes the exploration thereof. The animals were divided into four groups with 10–15 per group.

2.5. Open-field test

The open-field area was made of acrylic (transparent walls and black floor, $30 \times 30 \times 15$ cm) divided into nine squares of equal area. This apparatus was used to evaluate the exploratory activity of the animal (Archer, 1973). The observed parameters were as follows: number of squares crossed (with the four paws) and number of grooming and rearing. The animals were divided into four groups with 8–15 animals per group.

2.6. Hole-board test

The hole-board test for exploratory behavior in mice was used as described previously by Clark et al. (1971). The apparatus used was an Ugo Basile of 60×30 cm with 16 evenly spaced holes with built-in infrared sensors. In brief, adult male mice were randomly divided into four groups with 8–15 mice per group. Two groups received graded doses of isopulegol (25 and 50 mg/kg ip). One group received DZP (1 mg/kg ip) as standard and the remaining group named control received vehicle. Thirty minutes after the administration of respective drugs, the number of head dips into the holes was counted for each animal for 5 min.

2.7. Forced swimming test

The Porsolt et al. (1978) swimming test includes two exposures to a water tank, spaced 1 day apart. For these experiments the tank size was 22 cm in diameter and 40 cm in height. The tank had a rounded lid and contained 20 cm high fresh water at 25 °C. During the first exposure, mice were placed in the tank and left there for 15 min. During the second exposure (test session), mice were placed in the tank and left

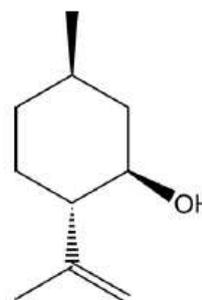


Fig. 1. Structure of isopulegol.

ARTICLE IN PRESS

M.I.G. Silva et al. / Pharmacology, Biochemistry and Behavior xx (2007) xxx–xxx

3

there for 5 min during which immobility time was registered. A mouse was considered immobile when it remained floating in the water, without struggling, making only very slight movements necessary to keep its head above water. The animals were divided into four groups with 10–13 animals per group. Each animal was used only once.

2.8. Tail suspension test.

The tail suspension test has been described by Steru et al. (1985). Male Swiss mice were housed in plastic cages in a 12 h light cycle with food and water freely available. Animals were transported from the housing room to the testing area in their own cages and allowed to adapt to the new environment for 1 h before testing. For the test, the animals were divided into four groups with 8–15 animals per group. They were suspended on the edge of a shelf 58 cm above a table top by adhesive tape placed approximately 1 cm from the tip of the tail. The duration of immobility is recorded for a period of 6 min.

2.9. Pentobarbital sleeping time

Thirty minutes after intraperitoneal administration of isopulegol at both doses or vehicle, all groups received sodium pentobarbital (40 mg/kg, intraperitoneally, i.p.). The time

elapsed between the administration of pentobarbital until the loss of the righting reflex was recorded as the sleep latency. The time since the injection up to the loss of the righting reflex is recorded as sleep latency and the time elapsed between the loss and voluntary recovery of the righting reflex is recorded as sleeping time. (Wambebe, 1985; Rolland et al., 1991). For the test, the animals were divided into four groups with 8–15 animals per group.

2.10. Rota rod

Motor coordination was measured using the rota-rod test, adapted from Egashira et al. (2004). Animals were trained to the rota-rod test before the pharmacological test. Mice, divided into 12 groups, with 8 per group, were placed with the four paws on a 2.5 cm diameter bar, 25 cm above the floor and the time of permanence on the bar was measured for 2 min, for each animal. The rotating speeds were of 5, 15 or 40 rpm and different groups were used at all rotating speeds.

2.11. Statistical analyses

All results are presented as mean±S.E.M. Data were analyzed by ANOVA followed by Student–Newman–Keuls's *post hoc* test. Results were considered significant at $P < 0.05$.

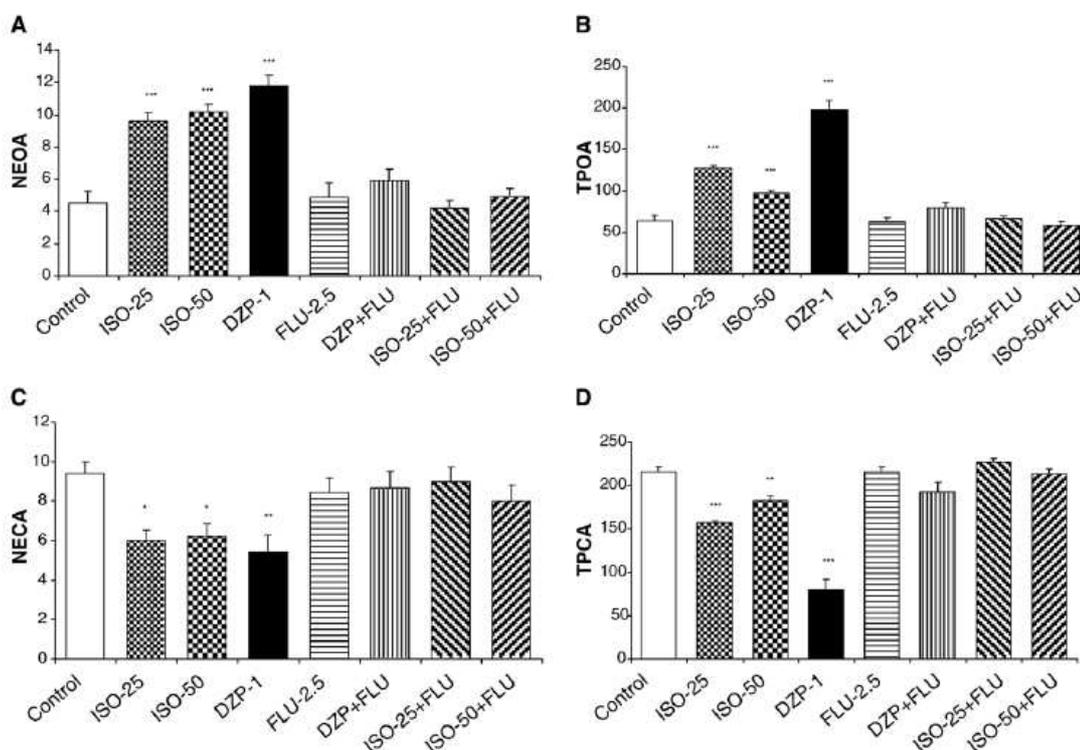


Fig. 2. Plus-maze test of groups of mice which received vehicle, isopulegol (25 and 50 mg/kg), DZP (1 mg/kg) or FLU (2.5 mg/kg). (A) NEOA: number of entries in the open arms; (B) TPOA (s): time of permanence in the open arms; (C) NECA: number of entries in the closed arms; (D) TPCA (s): time of permanence in the closed arms. The results are presented as mean±S.E.M. Significant difference compared with control (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). ANOVA and Student–Newman–Keuls's as the *post hoc* test.

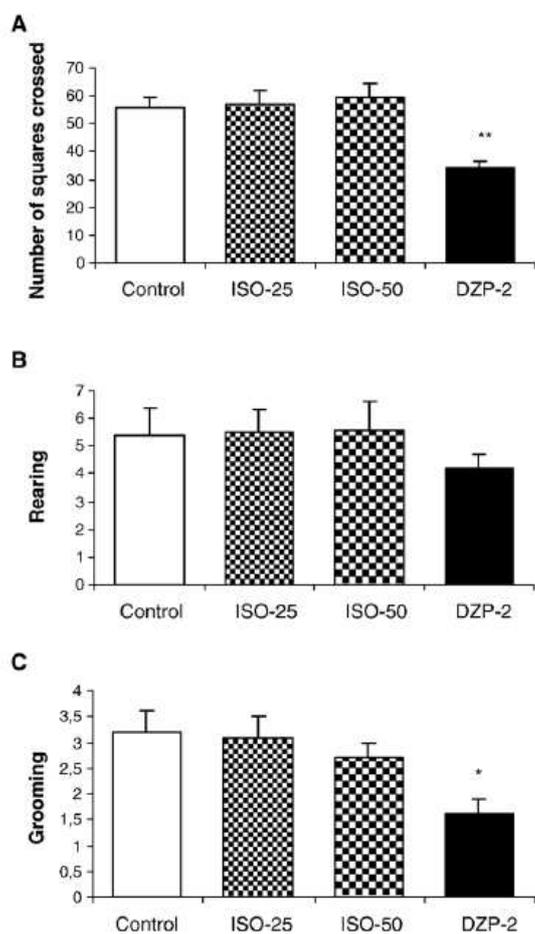


Fig. 3. Open-field test of groups of mice which received vehicle, isopulegol (25 and 50 mg/kg) and DZP (2 mg/kg). (A) Number of squares crossed. (B) Rearing. (C) Grooming. The results are presented as mean \pm S.E.M. Significant difference compared with control (* P <.05; ** P <.01). ANOVA and Student–Newman–Keuls's as the *post hoc* test.

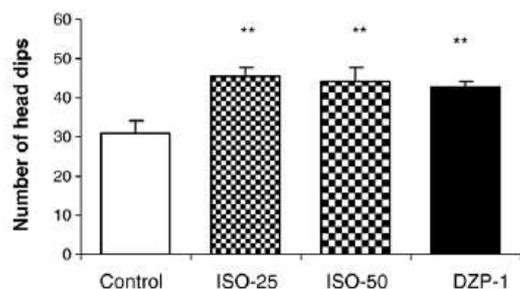


Fig. 4. Hole-board test of groups of mice which received vehicle, isopulegol (25 and 50 mg/kg), and DZP (1 mg/kg). The figure shows the number of head dips. The results are presented as mean \pm S.E.M. Significant difference compared with control (** P <.01). ANOVA and Student–Newman–Keuls's as the *post hoc* test.

3. Results

3.1. Elevated plus maze test (EPM)

Effects of isopulegol (25 and 50 mg/kg) or diazepam (1 mg/kg) in the elevated plus maze test are presented in Fig. 2. In this test, the groups treated with isopulegol at both doses and diazepam significantly modified all the observed parameters: the number of entries in the open arms (NEOA) [ISO-25, ISO-50, DZP-1: $F(7,89)=25.37$, P <.05] and time of permanence in the open arms (TPOA/s) [ISO-25, ISO-50, DZP-1: $F(7,86)=73.62$, P <.05], as well as the number of entries in the closed arms (NECA) [ISO-25, ISO-50, DZP-1: $F(7,87)=4.37$, P <.05] and time of permanence in the closed arms (TPCA/s) [ISO-25, ISO-50, DZP-1: $F(7,89)=43.63$, P <.05]. The results are presented as mean \pm S.E.M.

3.2. Open-field test

Fig. 3 shows that isopulegol (25 and 50 mg/kg) did not alter the number of crossings, rearing, and grooming, as compared to controls. The animals treated with diazepam (2 mg/kg) decreased the number of crossings [DZP-2: $F(3,57)=6.26$, P <.05] and grooming [DZP-2: $F(3,57)=3.29$, P <.05] but did not alter the number of rearing, as compared to the control group.

3.3. Hole-board test

Similar to DZP (1 mg/kg), isopulegol at both doses (Fig. 4) increased the number of head dips [ISO-25, ISO-50, DZP-1: $F(3,36)=6.13$, P <.05] as compared to controls.

3.4. Forced swimming test

In this test, isopulegol at both doses (25 and 50 mg/kg i.p.) induced a significant increase in the immobility time in mice, as compared to control. On the other hand, the animals treated with imipramine 10 mg/kg, as expected of an antidepressive drug, was able to decrease that parameter [ISO-25, ISO-50, IMP: $F(3,57)=35.87$, P <.05] (Fig. 5).

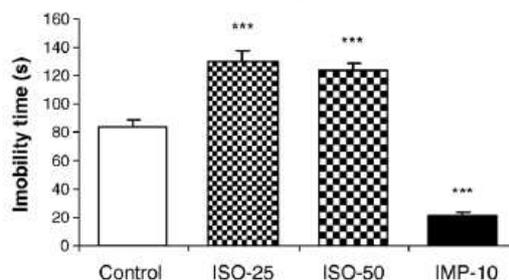


Fig. 5. Forced swimming of groups of mice which received vehicle, isopulegol (25 and 50 mg/kg) and imipramine (10 mg/kg). The figure shows immobility time (s). The results are presented as mean \pm S.E.M. Significant difference compared with control (***) P <.001). ANOVA and Student–Newman–Keuls's as the *post hoc* test.

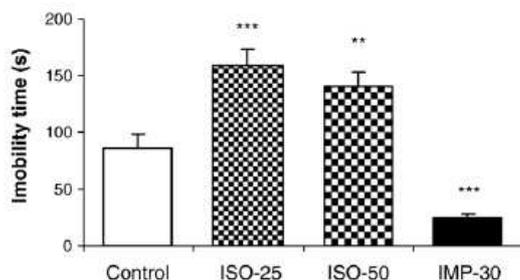


Fig. 6. Tail suspension test of groups of mice which received vehicle, isopulegol (25 and 50 mg/kg) and imipramine (30 mg/kg). The figure shows immobility time (s). The results are presented as mean \pm S.E.M. Significant difference compared with control (** $P < .01$; *** $P < .001$). Student–Newman–Keuls's as the *post hoc* test.

3.5. Tail suspension test

Similar to those results observed in forced swimming test, Fig. 6 shows that isopulegol (25 and 50 mg/kg) significantly increased the immobility time in animals, while imipramine 30 mg/kg produced opposite effect [ISO-25, ISO-50, IMP: $F(3,38) = 28.45$, $P < .05$] as compared to the control group.

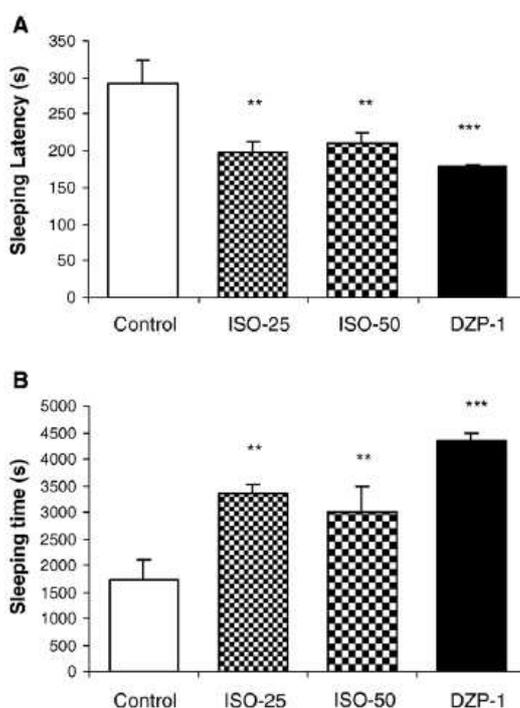


Fig. 7. Effects of mice treatment with isopulegol (25 and 50 mg/kg ip) and diazepam (1 mg/kg) on sleep latency time (A) and sleeping time (B) caused by pentobarbital (40 mg/kg). The results are presented as mean \pm S.E.M. Significant difference compared with control (** $P < .01$; *** $P < .001$). Student–Newman–Keuls's as the *post hoc* test.

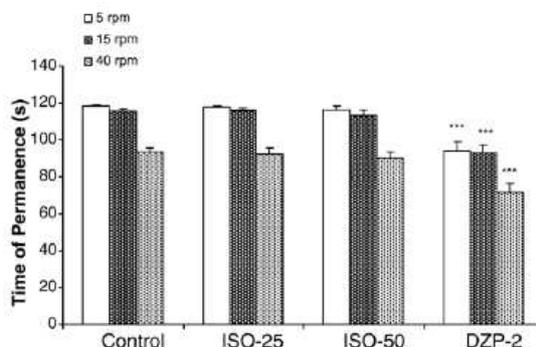


Fig. 8. Rota rod test of groups of mice which received vehicle, isopulegol (25 and 50 mg/kg) and DZP (2 mg/kg). The figure shows time of permanence (s). The results are presented as mean \pm S.E.M. Significant difference compared with control (*** $P < .001$). ANOVA followed by Student–Newman–Keuls's as the *post hoc* test.

3.6. Pentobarbital sleeping time.

The absolute values of sleep latency and sleeping time showed in Fig. 7 demonstrate that animals treated with isopulegol (25 and 50 mg/kg) or diazepam (1 mg/kg), 30 min before injection of pentobarbital, presented a decrease in the sleep latency [ISO-25, ISO-50, DZP-1: $F(3,38) = 7.54$, $P < .05$] and prolongation of pentobarbital-induced sleeping time [ISO-25, ISO-50, DZP-1: $F(3,38) = 13.92$, $P < .05$].

3.7. Rota rod

No alteration was observed on the rota rod test (Fig. 8) at 5, 15 and 40 rpm after treatment with isopulegol (25 and 50 mg/kg) as compared to control, while diazepam (2 mg/kg) in a relaxant muscular dose, as expected, decreased this parameter [5 rpm: DZP-1: $F(3,31) = 19.02$, $P < .05$; 15 rpm: DZP-1: $F(3,31) = 19.70$, $P < .05$; 40 rpm: DZP-1: $F(3,31) = 8.48$, $P < .05$].

4. Discussion

Isopulegol is a monoterpene alcohol intermediate in the preparation of (–)-menthol and it is present in the essential oils of various plants. Previous studies have demonstrated that menthol administered intraperitoneal or subcutaneously promotes effect similar to that of psychostimulants (Umezumi and Morita, 2003; Umezumi et al., 2001). Based in these considerations, we assumed to investigate whether the isopulegol would be also involved in the ability to act on the central nervous system, since, as far as we know, there are no studies in the literature on the central actions of this substance.

In the present work, the effects of isopulegol were studied in several behavior animal models, such as EPM, open-field, hole board, forced swimming, tail suspension, barbiturate-induced sleeping time and rota rod tests, to investigate its possible central activity. These tests are classical models for screening central nervous system actions providing information about

ARTICLE IN PRESS

psychomotor performance, anxiety, myorelaxant activity and depression. It is well known that benzodiazepines act as anxiolytics (at low doses), anticonvulsants, and also produce sedation and a myorelaxant effect at higher doses (Melo et al., 2006). Thereby, our group has used diazepam at 1 mg/kg in EPM and hole board tests and 2 mg/kg in open field and rota rod tests, as standard drug.

The present study showed that administration of different doses of isopulegol in mice was able to induce anxiolytic-like effects in the EPM and hole board tests. The EPM test is considered one of the most widely validated tests for assaying new benzodiazepine-like anxiolytic agents (Pellow et al., 1985; Rodgers et al., 1997). The benzodiazepines are the most widely prescribed central nervous system depressants, with selective activity at the inhibitory GABA_A receptor complex. By enhancing the frequency of Cl⁻ channel opening and thus Cl⁻ flux through the GABA_A receptor, benzodiazepines potentiate the inhibitory effect of GABA (Lilly and Tietz, 2000). At both doses and similar to DZP, in the EPM test isopulegol significantly reduced the animal's aversion to the open arms and promoted the exploration thereof, indicating anxiolytic effect. Flumazenil is a recognized competitive antagonist at the central benzodiazepine receptor and was used to elucidate the possible mechanism by which isopulegol is acting in this model. The results showed that flumazenil reversed not only the diazepam effect but also the isopulegol effect, indicating that both drugs might present a similar mechanism of action.

In further to corroborate the anxiolytic activity observed in the EPM test, we decided to use the hole board model, in which it is also observed that the exploration is gradually inhibited by anxiety (Crawley, 1985). In this way, similar to EMP, this test is also useful for modeling anxiety and anxiolytics agents have been shown to increase the number of head dips (Takeda et al., 1998). Our results showed that isopulegol at both doses increased the number of head dips, indicating anxiolytic-like effect.

Drugs that increase general motor activity may provide false-positive results in the number of entries into the open arms and number of head dips in the EPM and hole board tests, respectively. In this way, we decided to study the effects of isopulegol in the open-field test, a classical animal model used to evaluate autonomic effects of drugs and general activity of animals (Novas et al., 1988). In this test, the groups treated intraperitoneally with isopulegol (25 and 50 mg/kg), at doses which produced anxiolytic-like effects, did not significantly change motor activity in mice, differently from DZP (2 mg/kg), which decreased this parameter. Therefore, it is unlikely that the effects produced by isopulegol observed in the plus-maze and hole board tests are based on the stimulation of general motor activity.

Taking into consideration the anxiolytic-like effects of isopulegol observed in the above cited tests, we decided, in addition, to investigate the role of isopulegol in depressant animal models. For this, we realized the forced swimming and tail suspension tests, which have been useful experimental models for screening antidepressant activity. Drugs with established antidepressant activity, as imipramine, reduce the time during which the animals remain immobile (Porsolt et al.,

1977; Willner, 1990). Our results showed that isopulegol, at both doses, was able to increase the total time spent in immobility of mice exposed to those tests, indicating depressant activity, in opposite to the psychostimulants effects presented by menthol in previous studies (Umezu and Morita, 2003; Umezu et al., 2001).

A deficit in motor coordination would very likely affect performance in the forced swimming and tail suspension tests. In this way, we aimed to investigate the effects of isopulegol in the rota rod test, a classical animal model used to evaluate peripheral neuromuscular blockage. Our findings showed that isopulegol (25 to 50 mg/kg), different from diazepam (2 mg/kg), had no significant effect on the motor coordination of the animals on rota rod test. Thus, the observed increase in the immobility time probably is not related to peripheral neuromuscular blockage, but may involve neurons that control central depressant activity (Adzu et al., 2002).

Pentobarbital sleeping time test was also used to confirm or not the possible depressive-like effects observed with isopulegol in the previous tests of this study. Decrease in sleep latency and increase in sleeping time are classically related to central nervous system (CNS) depressant drugs (Williamson et al., 1996). Earlier studies have related prolongation of barbital hypnosis to pentobarbital metabolic inhibition or action on the CNS involved in the regulation of sleep (Kaul and Kulkarni, 1978). Ours findings showed that isopulegol, at both doses, decreased the sleep latency time and increased the duration of sleeping, which possibly confirm the depressant activity of CNS detected before. These results corroborate those of Fujimori and Cobb (1995), who proposed that the enhancement of barbital hypnosis is a good index of CNS depressant activity.

In summary, taken together the results in plus maze and hole board tests suggest antianxiety effects of isopulegol. Parameters observed in the forced swimming, tail suspension and pentobarbital sleeping time tests support the idea that isopulegol possibly presents depressor activity on the central nervous system, in opposite to the previous psychostimulants effects presented by menthol. These results are similar to that found by Aguirre-Hernández et al. (2007), who demonstrated that hexane and methanol extracts of *Tilia americana* var. *mexicana* inflorescences exert both depressant and anxiolytic profiles on the CNS. An explanation for the inconsistency between the present anxiolytic and depressant effects of isopulegol and the previously reported psychostimulant actions of menthol is difficult to be formulated, once reports with reference to the behavioral or pharmacological effects from isopulegol are scarce in literature. However, it is possible to speculate that such discrepant finds could be related to the tenuous structural differences among both compounds. Therefore, further studies need to be performed in order to elucidate the antianxiety and depression mechanisms of isopulegol.

Acknowledgments

The authors are thankful to the CNPq and CAPES for financial support.

ARTICLE IN PRESS

M.I.G. Silva et al. / Pharmacology, Biochemistry and Behavior xx (2007) xxx–xxx

7

References

- Aguirre-Hernández E, Martínez AL, González-Trujano ME, Morenoa J, Vibrans H, Soto-Hernández M. Pharmacological evaluation of the anxiolytic and sedative effects of *Tilia americana* L. var. *mexicana* in mice. *J Ethnopharmacol* 2007;109:140–5.
- Adzu B, Amos S, Muazzam I, Inyang US, Gamaniel KS. Neuropharmacological screening of *Diospyros mespiliformis* in mice. *J Ethnopharmacol* 2002;83:139–43.
- Almeida RN, Navarro DS, Barbosa-Filho JM. Plants with central analgesic activity. *Phytomedicine* 2001;8:310–22.
- 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* 2000;78:446–54.
- Archer J. Tests for emotionality in rats and mice. A review. *Anim Behav* 1973;21:205–35.
- Chuah GK, Liu SH, Jaenicke S, Harrison LJ. Cyclisation of citronellal to isopulegol catalysed by hydrous zirconia and other solid acids. *J Catal* 2001;200:352–9.
- Clark G, Koster AG, Person DW. Psychopharmacology 1971;20:169–71.
- Crawley JN. Exploratory behaviour models of anxiety in mice. *Neurosci Behav Rev* 1985;9:37–44.
- De Sousa DP, Gonçalves JCR, Quintans-Júnior L, Cruz JS, Araújo DAM, Almeida RN. Study of anticonvulsant effect of citronellol, a monoterpene alcohol, in rodents. *Neurosci Lett* 2006;401:231–5.
- Egashira N, Tanoue A, Higashihara F, Mishima K, Fukue Y, Takano Y, et al. V1a receptor knockout mice exhibit impairment of spatial memory in an eight-arm radial maze. *Neurosci Lett* 2004;356:195–8.
- Fujimori H, Cobb D. Potentiation of barbital hypnosis as an evaluation method for central nervous system depressant. *Psychopharmacology* 1995;7:374–7.
- Gurgel do Vale T, Couto Furtado E, Santos Júnior JG, Viana GSB. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. *Phytomedicine* 2002;9:709–14.
- Irie Y, Itokazu N, Anjiki N, Ishige A, Watanabe K, Keung WM. Eugenol exhibits antidepressant-like activity in mice and induces expression of ealothionein-III in the hippocampus. *Brain Res* 2004;1011:243–6.
- Kaul PN, Kulkarni SK. New drug metabolism inhibitor of marine origin. *J Pharm Sci* 1978;67:1293–6.
- Klodzinska A, Tatarczynska E, Chojnacka-Wójcik E, Nowaka G, Cosford NDP, Pilc A. Anxiolytic-like effects of MTEP, a potent and selective mGlu5 receptor agonist does not involve GABAA signaling. *Neuropharmacology* 2004;47:342–50.
- Lilly SM, Tietz EI. Chronic cocaine differentially affects diazepam's anxiolytic and anticonvulsant actions. Relationship to GABA receptor subunit expression. *Brain Res* 2000;882:139–48.
- Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 1987;92:180–5.
- Mastelic J, Milos M, Kustrak D, Radonic A. The essential oil and glycosidically bound volatile compounds of *Calamintha nepeta* (L.) Savi. *Croat Chem Acta* 1998;71:147–54.
- Melo CTV, Monteiro AP, Leite CP, Araújo FLO, Lima VT, Barbosa-Filho JM, et al. Anxiolytic-Like Effects of (*O*-Methyl)-*N*-2,6-dihydroxybenzoyl-tyramine (Riparin III) from *Aniba riparia* (NEES) MEZ (Lauraceae) in Mice. *Biol Pharm Bull* 2006;29(3):451–4.
- Novas ML, Wolfman C, Medina JH, De Robertis E. Proconvulsant and anxiogenic effects of *n*-butyl-*h*-carboline-3-carboxylate, an endogenous benzodiazepine binding inhibitor from brain. *Pharmacol Biochem Behav* 1988;30:331–6.
- Paik SY, Kok KH, Beak SM, Paek SH, Kim JA. The essential oils from *Zanthoxylum schinifolium* pericarp induce apoptosis of HepG2 human hepatoma cells through increased production of reactive oxygen species. *Biol Pharm Bull* 2005;28(5):802–7.
- 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* 2005;82:686–94.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open/closed arm entries in an elevated plus maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 1985;14:149–67.
- Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1977;229:327–36.
- Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jafre M. Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol* 1978;47:339–79.
- Rao BRR, Kaul PN, Syamasundar KY, Ramesh S. Comparative composition of decanted and recovered essential oils of *Eucalyptus citriodora* Hook. *Flavor Fragrance J* 2003;18:133–5.
- Rodgers RJ, Cao BJ, Dalvi A, Holmes A. Animal models of anxiety on ethological perspective. *Braz J Med Biol Res* 1997;30:289–304.
- Rolland A, Fleurentin J, Lanhers MC, Younos C, Misslin R, Mortier F, et al. Behavioural effects of the American traditional plant *Eschscholzia californica*: sedative and anxiolytic properties. *Planta Med* 1991;57:212–6.
- Serra S, Brenna E, Fuganti C, Maggioni F. Lipase-catalyzed resolution of *p*-menthan-3-ols monoterpenes: preparation of the enantiomer-enriched forms of menthol, isopulegol, *trans*- and *cis*-piperitol, and *cis*-isopiperitenol. *Tetrahedron Asymmetry* 2003;14:3313–9.
- Sousa FCF, Melo CTV, Monteiro AP, Lima VT, Gutierrez SJC, Pereira BA, et al. Antianxiety and antidepressant effects of riparin III from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2004;78:27–33.
- Sousa FCF, Monteiro AP, Melo CTV, Oliveira GR, Vasconcelos SMM, Fonteles MMF, et al. Antianxiety Effects of Riparin I from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. *Phytother Res* 2005a;19:1005–8.
- Sousa FCF, Pereira BA, Lima VT, Lacerda CDG, Melo CTV, Barbosa-Filho JM, et al. Central Nervous System Activity of Yangambin from *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae) in mice. *Phytother Res* 2005b;19:282–6.
- Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. Tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology* 1985;85:367–70.
- Takeda H, Tsuji M, Matsumiya T. Changes in head-dipping behaviour in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. *Eur J Pharmacol* 1998;350:21–9.
- The World Health Report. Mental health: new understanding new hope. Geneva: WHO; 2001.
- Umezumi T, Morita M. Evidence for the involvement of dopamine in ambulation promoted by menthol in mice. *J Pharmacol Sci* 2003;91(2):125–35.
- Umezumi T, Sakata A, Ito H. Ambulation-promoting effect of peppermint oil and identification of its active constituents. *Pharmacol Biochem Behav* 2001;69:383–90.
- Vernin GA, Parkanyi C, Cozzolino F, Fellous R. GC/MS analysis of the volatile constituents of *Corymbia citriodora* Hook. from Réunion Island. *J Essent Oil Res* 2004;16:560–5.
- Wambebe C. Influence of some agents that affect 5-hydroxy-tryptamine metabolism and receptors on nitrazepam-induced sleep in mice. *Braz J Pharmacol* 1985;84:185–91.
- Williamson E, Okpako D, Evans FJ. Selection, preparation and pharmacological evaluation of plant material. Chichester: Wiley; 1996.
- Willner P. Animals model of depression: an overview. *Pharmacol Ther* 1990;45:425–55.

Gastroprotective activity of isopulegol on experimentally induced gastric lesions in mice: investigation of possible mechanisms of action

Maria Izabel Gomes Silva · Brinell Arcanjo Moura · Manuel Rufino de Aquino Neto ·
Adriana da Rocha Tomé · Nayrton Flávio Moura Rocha ·
Alyne Mara Rodrigues de Carvalho · Danielle Silveira Macêdo ·
Silvânia Maria Mendes Vasconcelos · Damião Pergentino de Sousa ·
Glauce Socorro de Barros Viana · Francisca Cléa Florenço de Sousa

Received: 16 December 2008 / Accepted: 12 May 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract The present study investigated whether isopulegol, a monoterpene present in essential oils of several aromatic plants, would be able to promote some gastroprotective effect and also verified the possible mechanisms involved in this action. For this study, ethanol- and indomethacin-induced gastric ulcer models in mice and histopathological assessment were used. The roles of NO, sulfhydryls (glutathione, GSH), ATP-sensitive K⁺ channels (K_{ATP} channels), and prostaglandins were also investigated. Isopulegol exhibited a dose-related gastroprotective effect against ethanol-induced lesions, while the pretreatment with glibenclamide and indomethacin [but not with *N*(G)-nitro-L-arginine methyl ester] were able to reverse this action. The pretreatment with isopulegol also restored GSH levels to normal levels and exhibited dose-related gastroprotective effect against indomethacin-induced ulcer. The results suggested that

isopulegol presents significant gastroprotective effects in both ethanol- and indomethacin-induced ulcer models, which appear to be mediated, at least in part, by endogenous prostaglandins, K_{ATP} channel opening, and antioxidant properties.

Keywords Antiulcerogenic activity · Isopulegol · Monoterpene · Action mechanisms

Introduction

Folk medicine, especially in developing countries, is widely used since the availability of modern public health services is still very limited. In Brazil, information from ethnic groups on indigenous traditional medicine has played a vital role in the discovery of novel products from plants as chemotherapeutic agents, which have resulted in a significant body of publications in this area (Amaral et al. 2007; Silva et al. 2007; De Sousa et al. 2005, 2006; Paula et al. 2006; Sousa et al. 2004; Almeida et al. 2001, among others).

In the last years, an increasing number of studies have demonstrated that several Brazilian plant-derived essential oils exhibit a variety of biological properties, such as analgesic (Amaral et al. 2007; Almeida et al. 2001), anticonvulsant (De Sousa et al. 2006), central effects (Silva et al. 2007), and gastroprotective activities (Paula et al. 2006). Several of the anterior described effects are frequently attributed to monoterpenes, which are the major chemical components of those essential oils.

Isopulegol (p-menth-8-en-3-ol) (Fig. 1), the substance used in this work, is a monoterpene alcohol present in the

M. I. G. Silva · B. A. Moura · M. R. de Aquino Neto ·
N. F. M. Rocha · A. M. R. de Carvalho · D. S. Macêdo ·
S. M. M. Vasconcelos · G. S. de Barros Viana ·
F. C. F. de Sousa (✉)

Department of Physiology and Pharmacology,
Faculty of Medicine, Federal University of Ceará,
Rua Cel. Nunes de Melo 1127,
CEP: 60431-270 Fortaleza, Brazil
e-mail: cleaflorenco@yahoo.com.br

A. da Rocha Tomé
Faculty of Veterinary Medicine, State University of Ceará,
Av. Paranjana 1700, Itaperi,
CEP 60740-903 Fortaleza, Brazil

D. P. de Sousa
Department of Physiology, Federal University of Sergipe,
Rua São Cristóvão,
CEP 49100-000 Sergipe, Brazil

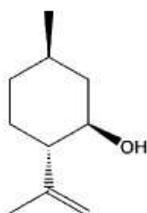


Fig. 1 Structure of isopulegol

essential oils of various plants, such as *Eucalyptus citriodora* Hook (Rao et al. 2003), *Corymbia citriodora* Hook (Vermin et al. 2004), and *Zanthoxylum schinifolium* (Paik et al. 2005), as well as in other aromatic plant species. It is a 3-oxygenated monoterpene of the *p*-menthane family, intermediate in the preparation of (–)-menthol (Serra et al. 2003) and has been used in the manufacture of fragrances with blossom compositions (Chuah et al. 2001). A previous study, described by Paik et al. (2005), demonstrated that the essential oil from *Z. schinifolium* pericarp, which contains isopulegol, was able to induce apoptosis of HepG2 human hepatoma cells, suggesting a plausible utilization of this oil as an anti-tumor agent in hepatocellular carcinoma therapy. However, reports with reference to the therapeutic effects of isolated isopulegol, as far as we know, are scarce in literature. Only recently, two studies accomplished by our group (Silva et al. 2007) and collaborators (De Sousa et al. 2007b) demonstrated that isolated isopulegol presented depressant- and anxiolytic-like effects as well as sedative activity in mice.

Peptic ulcer is a benign lesion of the gastric or duodenal mucosa, which occurs at a site where the mucosal epithelium is exposed to acid and pepsin (Andrade et al. 2007). The relationship between gastroprotection and products from natural sources is widespread (Takase et al. 1994). Such natural-derived products have been the object of studies in the incessant search for a substance with ideal gastroprotector therapeutic effect and lower costs. Recent researches have shown the gastroprotective effects of various medicinal plants and substances isolated from them (Brzozowski et al. 2005; Da Rocha Lapa et al. 2007), including terpenes (Yoshikawa et al. 2007; Guedes et al. 2008).

Some terpenes present in essential oils have been shown to have inhibitory activity on ulceration induced by different agents, for example, the monoterpene terpinen-4-ol and sesquiterpene elemol, isolated from the essential oil of *Cryptomeria japonica* (Matsunaga et al. 2000). Other terpenes such as β -eudesmol and hinesol also were effective inhibitors of gastric secretion (Nogami et al. 1986). These data lead us to test the possible activity of isopulegol against gastric damage induced by ethanol and indomethacin in mice and further assess the antiulcer mechanism. Moreover, as far as we know, there are no

reports regarding the antiulcer activity of isopulegol in the literature. Therefore, this study will contribute to increase our knowledge on herbal-derived substances, which can offer huge possibilities for medication.

Materials and methods

Animals

Male Swiss mice (weighing 20–30g) were provided by the Central Animal House of Federal University of Ceará. Animals were maintained in standard cages, at a controlled temperature ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) with a 12-h dark/light cycle and food and water ad libitum. Fifteen hours prior to the experiments, mice were transferred to the laboratory and given only water ad libitum. Studies were carried out in accordance with guidelines for the care of laboratory animals and ethical guidelines for the investigation of experimental pain in conscious animals (Zimmerman 1983) and were performed under the consent and surveillance of the Committee of Ethics in Animal Research, Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Ceará, Brazil.

Drugs and dosage

Isopulegol was separated and obtained by column chromatography of the technical grade isopulegol/Dierberger, Brazil. It was emulsified with 0.3% Tween 80 (Sigma, USA) in distilled water before use. Previously, animals were orally treated with the test substance at the doses of 25, 50, 100, and 200 mg/kg to investigate a possible dose–response relationship against ethanol- and indomethacin-induced gastric lesions. Subsequently, doses of isopulegol 100 and 200 mg/kg (which presented significant antiulcer activity) were used to investigate the possible mechanisms of action involved in gastroprotective effect. For ulcer induction, 0.2 mL of absolute ethanol (CPQ-Brazil, p.o.) and indomethacin (Sigma-USA) at the dose of 20 mg/kg (suspended in 0.5% carboxymethylcellulose in distilled water, p.o.), were administered. For the investigation of prostaglandins participation in the ethanol-induced ulcer, indomethacin at dose of 10 mg/kg, p.o., was used. Controls received vehicle (3% Tween 80 in 0.9% saline in a volume of 10 ml/kg, p.o.) and were administered by the same route as the treated groups. *N*(*G*)-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, Sigma-USA), cyproheptadine (Sigma, Brazil) and glybenclamide (Sigma, USA) (prepared with 4% glucose), all at the dose of 10 mg/kg, were dissolved in distilled water and administered intraperitoneally. Ranitidine (União Química, Brazil) and *N*-acetyl cysteine (NAC, União Química, Brazil) were both dissolved in distilled

water and administered intraperitoneally at the doses of 20 and 750 mg/kg, respectively. All drug doses and timing of dosing were chosen essentially as described previously and specified in each section below.

Evaluation of the antiulcerogenic activity of isopulegol in ethanol-induced gastric ulcer model

The acute gastric lesions were induced by the intragastric administration of 0.2 mL of absolute ethanol, dose that induces significant gastric ulceration, in accordance to the method described by Robert et al. (1979), with slight modifications. After 15-h food deprivation, groups of animals ($n=8$ /group) received different doses of isopulegol (25, 50, 100, and 200 mg/kg, p.o.) or vehicle (3% Tween 80 in 0.9% saline in a volume of 10 ml/kg, p.o.). One hour after, the animals were given orally 0.2 mL of absolute ethanol, while positive control animals received cyproheptadine 10 mg/kg, i.p. (Ohtau et al. 1999). In order to investigate whether isopulegol would be able to cause injury by itself, groups of animals were also treated with isopulegol (25, 50, 100, and 200 mg/kg, p.o.) or vehicle (3% Tween 80 in 0.9% saline, p.o.) and were not exposed to ethanol. Thirty minutes after the administration of the necrotizing agent, animals were killed by cervical dislocation and their stomach removed. Subsequently, each stomach was incised along the greater curvature, rinsed with saline (0.9%) solution, and compressed between two clock glasses. The outline of the gastric corpus lesions was traced onto transparent film using a felt tip marker, as previously described by Iwata et al. (1997). The total and injured stomach areas (glandular face) were measured using a computer planimetry program (Image J) and expressed in terms of percent of ulcerate gastric area. A sample of the corpus region of stomachs was fixed in 10% formalin for subsequent histopathological assessment. The lesion area was measured by a single observer who was blinded to the treatment strategy.

Histopathological assessment

Histological evaluation was performed on the glandular stomach of animals. The tissue samples were preserved in 10% buffered formalin and processed for routine paraffin block preparation. Sections of thickness about 4 mm were cut and stained with haematoxylin and eosin. The mucosal injury evaluation was performed under light microscopy by an experienced histologist blinded to the treatment regimen. The histopathological alterations were assessed according to the criteria previously described by Laine and Weinstein (1988): (1) edema (score 0–4), (2) hemorrhagic damage (score 0–4), (3) inflammatory infiltration (score 0–3), and (4) epithelial cell loss (score 0–3).

Evaluation of the role of NO metabolic pathway on the gastroprotective effect of isopulegol in the ethanol-induced ulcer model

In order to investigate the involvement of endogenous nitric oxide (NO) in the protective effects of isopulegol, L-NAME (an inhibitor of the NO synthetase activity, 10 mg/kg) was intraperitoneally injected 15 min before the oral administration of isopulegol 100 and 200 mg/kg or vehicle (3% Tween 80 in 0.9% saline, 10 ml/kg, p.o.). The L-NAME dose and timing of dosing were used in accordance to previous reports (Gürbüz et al. 1999; Chandranath et al. 2002). Two further groups were treated only with vehicle, and one of them was not exposed to ethanol. In other groups, saline was also injected, followed by isopulegol 100 and 200 mg/kg alone before absolute ethanol administration. Subsequently, 60 min after the treatments, the gastric mucosal lesions were induced with ethanol. Thirty minutes after, lesions were measured and expressed as described before. For this experiment, the mice were divided into groups of eight animals each.

Quantification of stomach and hepatic GSH levels in mice pretreated with isopulegol and exposed to ethanol-induced ulcer model

Quantification of glutathione (GSH, a non-protein SHs) levels was conducted in the stomach of mice. In order to investigate a possible systemic effect from isopulegol, GSH levels were also measured in liver tissues. The GSH levels in tissues were measured according to the methods described by Sedlak and Lindsay (1968), with slight modifications. Briefly, isopulegol (100 and 200 mg/kg, p.o.) was administered to mice 1 h before administration of vehicle (3% Tween 80 in 0.9% saline, 10 ml/kg, p.o.) or absolute ethanol (0.2 mL, p.o.). Positive control received NAC, an amino acid essential in the formation of GSH, at the dose of 750 mg/kg, i.p., before the ethanol administration. Two additional groups were treated only with vehicle, and one of them was not exposed to ethanol. Thirty minutes after, the animals were killed by cervical dislocation, and their stomach and liver were removed. For the assay of GSH, the glandular segments from each stomach, as well as the whole liver tissue, were individually homogenized in ice-cold 0.02 M EDTA solution (at 10%). Aliquots (400 μ l) of tissues homogenate were mixed with 320 μ l of distilled water and 80 μ l of 50% (w/v) trichloroacetic acid (50%) in glass tubes and centrifuged at 3,000 rpm for 15 min (stomach) and at 6000 rpm for 30 min (liver). Subsequently, supernatants (400 μ l) were mixed with 800 μ l Tris buffer (0.4 M, pH 8.9) and 5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB; 0.01 M) was added. After shaking the reaction mixture for 3 min, its

absorbance was measured at 412 nm within 5 min of the addition of DTNB against blank with no homogenate. The supernatant was separated, and its protein concentration was measured by the Lowry et al. (1951) method using purified bovine serum albumin as a standard. The absorbance values were extrapolated from a glutathione standard curve and expressed in microgram GSH per milligram of protein. For the present experiment, the animals were divided into groups of eight to 12 mice each.

Evaluation of participation of prostaglandins on ethanol-induced gastric mucosal lesions in indomethacin-pretreated mice

In order to investigate the involvement of endogenous prostaglandins in the protective effects of isopulegol in ethanol-induced gastric lesions, indomethacin was used at a dose that inhibits prostaglandin synthesis but does not induce gastric ulceration (10 mg/kg, dissolved in 0.5% carboxymethylcellulose and diluted in distilled water, p.o.; Adeyemi et al. 2005). Groups of animals ($n=8-10$ /group) were pretreated with indomethacin before the administration of isopulegol (100 and 200 mg/kg, p.o.) or vehicle (3% Tween 80 in 0.9% saline, 10 ml/kg, p.o.). Further groups received vehicle alone or vehicle followed by isopulegol 100 and 200 mg/kg. Subsequently, mice were exposed to absolute ethanol. One additional group was injected with vehicle and was not administered ethanol. Indomethacin and isopulegol were administered 2 h and 30 min, respectively, prior to ethanol, in accordance with Olinda et al. (2008). Thirty minutes after ethanol administration, lesions were measured and expressed as described before.

Role of K_{ATP} channels on ethanol-induced gastric mucosal lesions in glibenclamide-pretreated mice

To evaluate the possible involvement of ATP-sensitive K^+ channels (K_{ATP} channels), glibenclamide (a potent antagonist of K_{ATP} channels, prepared with 4% glucose to minimize hypoglycemia), at the dose of 10 mg/kg, was intraperitoneally injected 30 min before the administration of isopulegol (100 and 200 mg/kg, p.o.) or vehicle (3% Tween 80 in 0.9% saline, 10 ml/kg, p.o.). Glibenclamide preparation, dose, and timing of dosing were used in accordance with Peskar et al. (2002). In additional groups, vehicle was also injected followed by isopulegol 100 and 200 mg/kg before absolute ethanol administration. Controls received vehicle alone. Subsequently, mice were exposed to absolute ethanol. One further group received vehicle alone and was not administered ethanol. Sixty minutes after, the gastric mucosal lesions were induced with ethanol in all groups, measured and expressed as described before. For

this test, the animals were divided into groups of eight animals each.

Indomethacin-induced gastric mucosal lesions

Gastric lesions were induced by indomethacin (20 mg/kg, suspended in 0.5% carboxymethylcellulose in distilled water, p.o.) as described in previous studies (Molina et al. 2005; Santos et al. 2005). The animals ($n=8$ /group) fasting for 15 h received isopulegol (25, 50, 100, and 200 mg/kg, p.o.), vehicle (3% Tween 80 in 0.9% saline, 10 ml/kg, p.o.), or ranitidine (20 mg/kg, p.o., as positive standard drug) 60 min before the administration of indomethacin, while control group received vehicle alone. According to Bhargava et al. (1973), 8 h after ulcer induction, animals were killed by cervical dislocation and their stomach removed. Subsequently, each stomach was incised along the greater curvature and examined for lesions. The degree of ulceration was graded according to an arbitrary scale by attribution of scores as presented in Table 1 (Szabo et al. 1985). The lesion area was measured by a single observer who was blinded to the treatment strategy.

Statistical analysis

Values were expressed as mean \pm SEM (for parametric data). For statistical analysis, one-way analysis of variance followed by Student–Newman–Keuls as post hoc test were used. For histological assessment and indomethacin-induced gastric ulcer model, the Kruskal–Wallis nonparametric test was used, followed by Dunn's test for multiple comparisons. Values were expressed as median + maximum and minimum values. Probability (P) values less than 0.05 were considered significant.

Table 1 Determination of scores in indomethacin-induced gastric lesions (SZABO et al. 1985)

Injury	Scores
Discoloration of mucosa	1
Edema	1
Hemorrhages	1
Number of petechia	
Until 10	2
More than 10	3
Intensity of ulceration	
Ulcers or erosion up to 1 mm	$N \times 2$
Ulcers or erosion larger than 1 mm	$N \times 3$
Perforated ulcers	$N \times 4$

N number of stomach lesions.

Results

Effect of isopulegol on gastric damage induced by ethanol

The effects of isopulegol on gastric damage induced by absolute ethanol are shown in Fig. 2. Absolute ethanol (0.2 ml/animal, p.o.) induced severe gastric mucosal damage. Isopulegol decreased the ethanol-induced damage at all doses tested but only at higher doses (100 and 200 mg/kg, p.o.); the results were statistically significant and dose-related as compared to the control group pretreated with vehicle (saline). Cyproheptadine (10 mg/kg, i.p.), used as positive control, as expected, exhibited significant gastroprotective effect [control (saline), ISO-25, ISO-50, ISO-100, ISO-200, ISO-25+ethanol, ISO-50+ethanol, ISO-100+ethanol, ISO-200+ethanol, CYP+ethanol: $F(10,87)=97.42$; $P<0.05$]. Isopulegol alone in all doses used in this work presented similar results to those obtained by the administration of the vehicle alone.

Histopathological assessment

Histological data are reported in Fig. 3 and Table 2. Mice treated only with isopulegol (100 and 200 mg/kg, p.o.; Table 2, Fig. 3c, d) displayed the same results when compared to those treated only with vehicle (saline, p.o.; Table 2, Fig. 3a). Severe lesions were observed after ethanol administration characterized by edema, hemorrhagic damage, inflammatory infiltration, and epithelial

cell loss (Table 2 and Fig. 3b). Pretreatment with isopulegol inhibited the ethanol-induced damage, with the higher dose showing the best result (Table 2 and Fig. 3e, f).

Effects of L-NAME on gastroprotection offered by isopulegol

Figure 4 represents the results obtained with L-NAME pretreatment on the gastroprotective effect of isopulegol. In the control group pretreated with saline, absolute ethanol produced gastric lesions in the stomach, which were increased by administration of L-NAME (10 mg/kg, i.p.). Isopulegol at both tested doses (100 and 200 mg/kg, p.o.) was able to significantly reduce the lesions, while pretreatment of animals with L-NAME was unable to revert the gastroprotection promoted by isopulegol [Control (saline), L-NAME+saline, saline+ISO-100; saline+ISO-200, L-NAME+ISO-100, L-NAME+ISO-200: $F(6,55)=107.3$; $P<0.05$].

Effect of isopulegol on GSH content of stomach and liver tissues

The influence of the treatment with isopulegol and NAC on GSH content of stomach (a) and liver (b) tissues is shown in Fig. 5. When compared to the normal controls (without stressor agent), ethanol controls showed significantly lower levels of GSH in their stomachs. Pretreatment

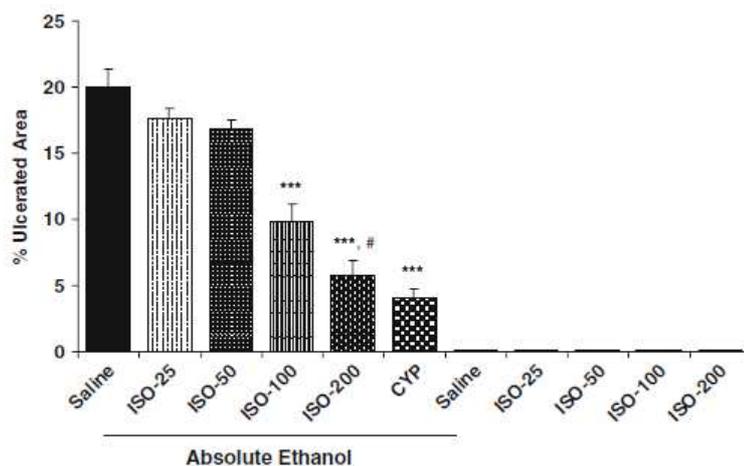


Fig. 2 Effect of treatment with isopulegol and cyproheptadine in mice ($n=8$ /group) subjected or not to ethanol-induced gastric ulceration. Absolute ethanol (0.2 ml) was orally administered to 15 h fasted mice. Isopulegol (ISO-25, 50, 100, and 200 mg/kg, p.o.), cyproheptadine (CYP, 10 mg/kg, i.p.), or vehicle (0.9% saline, p.o.) were administered to mice 60 min before the administration of ethanol. Further groups

were given different doses of isopulegol or vehicle and were not exposed to ethanol. The results are presented as mean \pm SEM. *** $p<0.001$, statistically significant differences as compared with saline+ethanol group, # $p<0.001$, significant differences vs ISO-100 group. Analysis of variance followed by Student–Newman–Keuls as the post hoc test was used

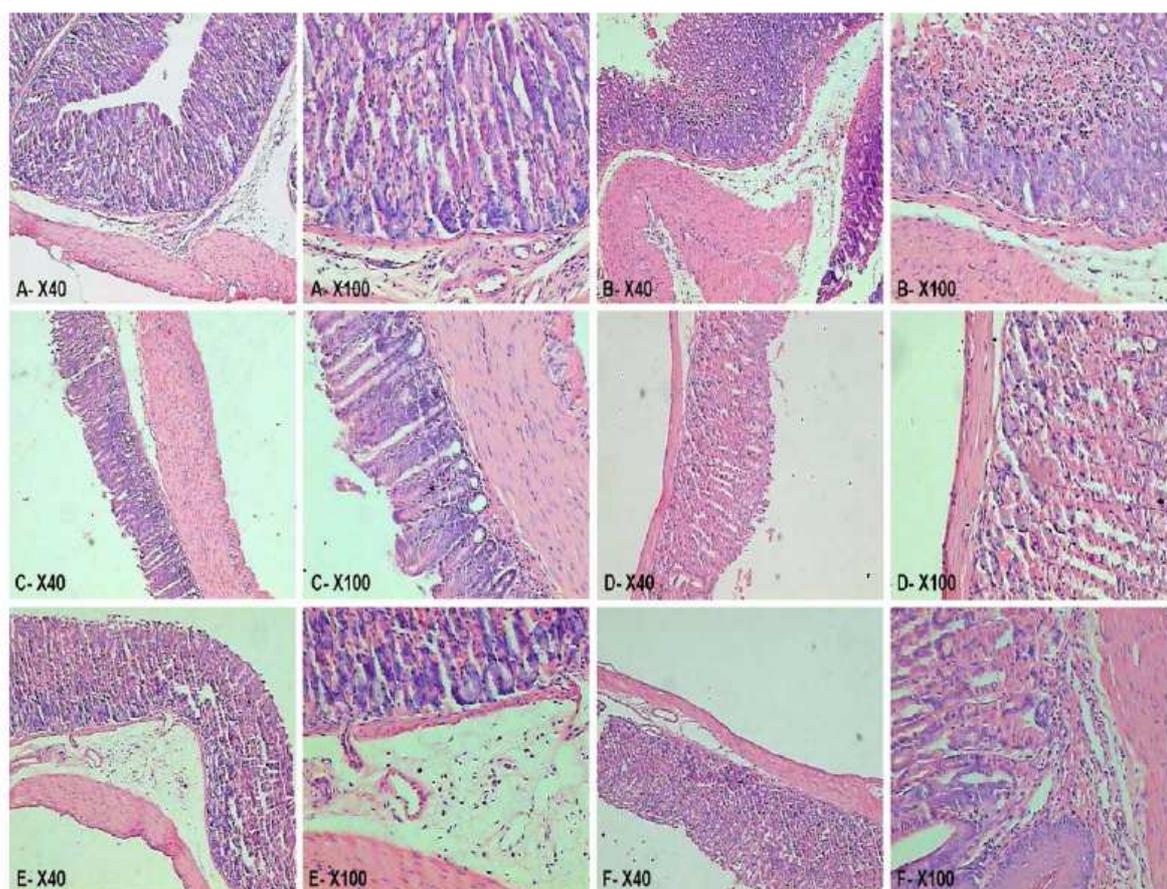


Fig. 3 Photomicrographs of gastric mucosa (magnification $\times 40$ and $\times 100$ for each group) of mice treated with vehicle (0.9% saline, p.o.) (a) or isopulegol (c, d) alone, showing normal histological aspects. b animals treated with ethanol, showing intense inflammatory infiltration, edema, and moderate hemorrhage and epithelial cell loss. e, f

Pretreatment with isopulegol (100 and 200 mg/kg, p.o., respectively) before the administration of ethanol, showing preservation of gastric mucosa, although edema areas are still observed in mice pretreated with isopulegol 100 mg/kg (e). Quantitative results from these assessments are shown in Table 1

with isopulegol (100 and 200 mg/kg, p.o.) and NAC (750 mg/kg, i.p.) significantly restored the GSH content to the levels seen in normal controls. When administered alone, isopulegol raised the levels of GSH when compared to the normal controls [saline+ethanol, ISO-100+ethanol, ISO-200+ethanol, NAC+ethanol, ISO-100+saline, ISO-200+saline, $F(6,68)=20.89$, $P<0.05$] (Fig. 5a). Liver GSH content was also decreased by ethanol administration, and the pretreatment with isopulegol at both doses tested (100 and 200 mg/kg, p.o.) reversed this alteration. Isopulegol when administered alone (100 and 200 mg/kg, p.o.) induced a significant increase on GSH content of liver tissues, as compared to the controls without stress [saline+ethanol, ISO-100+ethanol, ISO-200+ethanol, NAC+ethanol, ISO-100+saline, ISO-200+saline, $F(6,60)=10.08$, $P<0.05$].

Effects of isopulegol on gastric lesions induced by ethanol in indomethacin pretreated mice

Figure 6 shows the results obtained with indomethacin pretreatment on the gastroprotective effect of isopulegol. Ethanol-induced mucosal lesions were significantly attenuated by isopulegol (100 and 200 mg/kg, p.o.). Pretreatment with indomethacin (10 mg/kg, p.o.) reduced the gastric mucosal protective effect promoted by isopulegol only at the dose of 100 mg/kg. While in the group pretreated with indomethacin alone, prior ulcer induction showed an injury superior to that obtained by ethanol control, although it was not statistically significant [Control (Saline), Saline+ISO-100, Saline+ISO-200, Indo+ISO-100, Indo+ISO-200, Indo+Saline: $F(6,59)=28.33$; $P<0.05$].

Table 2 Effect of isopulegol against ethanol-induced microscopic damage in gastric mucosa

Treatment	Microscopical score			
	Edema (score 0–4)	Hemorrhagic damage (score 0–4)	Inflammatory infiltration (score 0–3)	Epithelial cell loss (score 0–3)
Vehicle (saline, 10 mL/kg)	0	0	0	0
ISO (100 mg/kg)+vehicle	0	0	0	0
ISO (200 mg/kg)+vehicle	0	0	0	0
Vehicle+ethanol (0.2 mL)	3 (2–4)	3 (1–4)	3 (2–3)	2 (1–2)
ISO (100 mg/kg)+ethanol (0.2 mL)	2 (1–2)	0 (0–1)*	1 (0–1)*	0 (0–1)
ISO (200 mg/kg)+Ethanol (0.2 mL)	1 (0–1)*	0 (0–1)**	0 (0–1)**	0 (0–1)

Animals received orally vehicle (3% Tween 80 in 0.9% saline, 10 mL/kg, p.o.) or isopulegol (ISO-100 and 200 mg/kg, p.o.) 60 min prior to absolute ethanol (0.2 mL, p.o.) administration. Groups were also treated with isopulegol (100 and 200 mg/kg, p.o.) followed by saline, p.o. The histopathological alterations from glandular stomach were assessed according to the criteria previously described by Laine and Weinstein (1988): 1 Oedema (score 0–4), 2 hemorrhagic damage (score 0–4), 3 inflammatory infiltration (score 0–3), and 4 Epithelial cell loss (score 0–3). The results are presented as medians, with minimum and maximal scores values shown in brackets. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, significant differences compared with vehicle+ethanol group. Kruskal–Wallis nonparametric test, followed by Dunn's multiple-comparison post hoc analysis was used

Effects of isopulegol on ethanol-induced gastric mucosal lesions in glibenclamide-pretreated mice

The effects of isopulegol on ethanol-induced lesions in glibenclamide pretreated mice are shown in Fig. 7. Pretreatment with K_{ATP} channel blocker, glibenclamide (10 mg/kg, i.p.), significantly reduced the gastroprotection produced by isopulegol at 100 mg/kg, p.o., but not at 200 mg/kg dose. Mice pretreated with glibenclamide alone showed gastric damage similar to that presented by the ethanol control animals [control (saline), saline+ISO-100, saline+ISO-200, Glib+ISO-100, Glib+ISO-200, Glib+saline: $F(6,59)=84.16$; $P < 0.05$].

Indomethacin-induced gastric mucosal lesions

In this model, indomethacin (20 mg/kg, p.o.) pretreatment was able to induce severe gastric mucosal damage (Table 3). Isopulegol decreased the indomethacin-induced damage at all doses tested, but only at the higher doses (100 and 200 mg/kg, p.o.) results were statistically significant, as compared to the control group pretreated with vehicle (saline). Ranitidine (20 mg/kg, i.p.), included in the present study as a positive control drug, as expected, protected against gastric lesions [saline+Indo, ISO-25+Indo, ISO-50+Indo, ISO-100+Indo, ISO-200+Indo, ranitidine+Indo: Kruskal–Wallis (6.55)=44.38; $P < 0.05$].

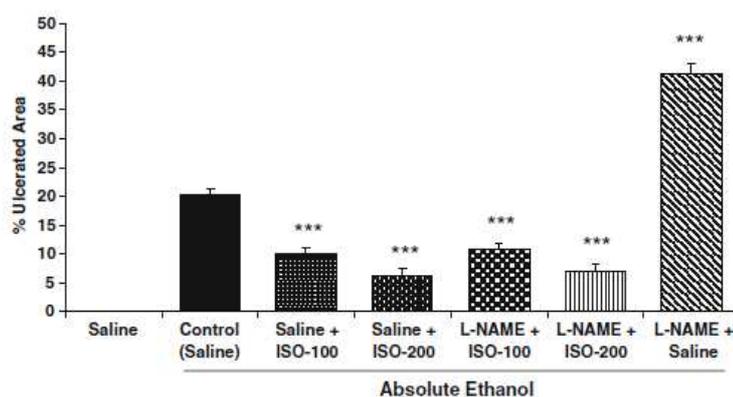


Fig. 4 Effect of nitric oxide synthase inhibition by L-NAME on the gastroprotection of isopulegol in mice ($n=8$ /group) subjected to ethanol-induced gastric ulceration. L-NAME (10 mg/kg, i.p.) or vehicle (0.9% saline, p.o.) were i.p. injected 15 min before the administration of isopulegol (ISO-100 and 200 mg/kg, p.o.) or vehicle in each group. Sixty minutes after, the gastric mucosal lesions were

induced with ethanol (0.2 mL, p.o.). One further group received vehicle and was not exposed to ethanol. The results are presented as mean \pm SEM. *** $p < 0.001$, statistically significant differences as compared with saline+ethanol group. ANOVA followed by Student–Newman–Keuls as the post hoc test was used

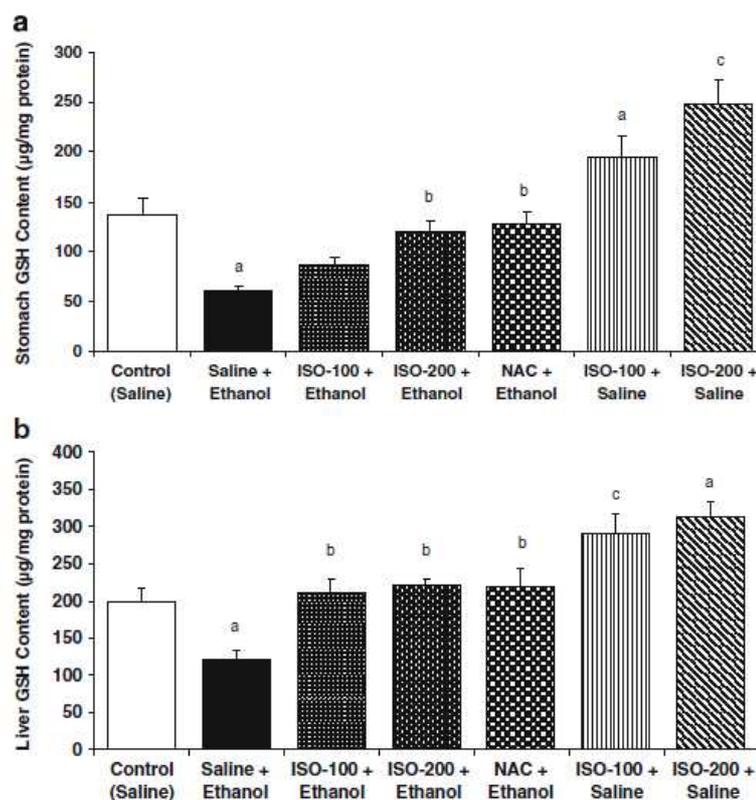


Fig. 5 Effect of isopulegol and *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) on non-protein sulphhydryl (GSH) content of gastric (a) and liver (b) tissues in mice ($n=8-12/\text{group}$). Isopulegol (ISO-100 and 200 mg/kg, p.o.) or vehicle vehicle (0.9% saline, p.o.) were administered to mice 1 h before administration of vehicle or absolute ethanol (0.2 mL, p.o.) in each group. Positive control received NAC (750 mg/kg, i.p.) before the ethanol. Sixty minutes after, the gastric mucosal lesions were induced with ethanol (0.2 mL, p.o.). One additional group received

vehicle and was not exposed to stressor agent. The results are presented as mean \pm SEM. **a** ^a $p<0.01$, significant difference related to control (saline) group, ^b $p<0.01$, significant difference vs ethanol group and ^c $p<0.001$ vs control (saline). **b** ^a $p<0.01$, significant difference vs control (saline), ^b $p<0.01$, significant difference vs ethanol group and ^c $p<0.05$ significant difference vs control (saline). ANOVA followed by Student-Newman-Keuls as the post hoc test was used

Discussion

Some terpenes present in plant-derived essential oils have been shown to have inhibitory activity on ulceration induced by different agents. In this way, the present study aimed to investigate whether isopulegol, a monoterpene present in essential oils of several aromatic plants, would be able to promote any gastroprotective effect and verify the possible mechanisms involved in this action. The present study demonstrates for the first time the antiulcer activity of isopulegol in mice.

Several mechanisms have been thought to be involved in the gastric ulcer production; hence, it is not possible to propose a single mechanism for antiulcer effects of a particular drug. Thus, in order to assess the gastroprotective activity of compounds and the mechanisms of action involved in such action, different assays using laboratory animals have been reported (Robert et al. 1979; Bhargava et

al. 1973; Szabo et al. 1985; Sedlak and Lindsay 1968). Ethanol-induced gastric ulceration (EIGU) in rats and mice is considered to be a reliable tool to study the pathogenesis of acute gastric mucosal ulceration (Robert et al. 1979). In this work, different doses of isopulegol (25, 50, 100, and 200 mg/kg) were tested in EIGU model for determining possible effective doses required for causing antiulcer effects. Our results showed that the animal's pretreatment with isopulegol decreased the gastric damage induced by ethanol at all doses tested, but only at the higher doses (100 and 200 mg/kg) that this parameter was significant and dose-dependent. The present findings suggest that isopulegol probably acts as a direct cytoprotective agent.

The results obtained in histopathological analysis showed that ethanol administration caused gastric mucosal injuries characterized by hemorrhage, mucosal edema, epithelial cell loss, and inflammatory cell infiltration, in accordance with several studies previously described (Yu et al. 2004; Yeo et al.

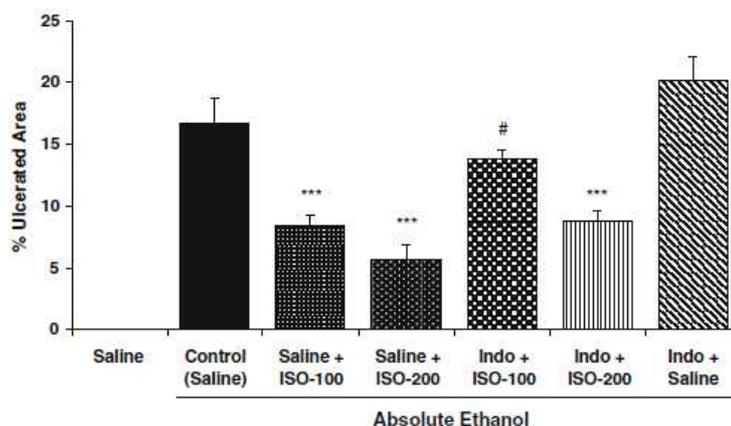


Fig. 6 Effects of pre-treatment with indomethacin on the gastro-protection of isopulegol in mice ($n=8$ /group) subjected to ethanol-induced gastric ulceration. Mice were pretreated with indomethacin (10 mg/kg, p.o.) or vehicle (0.9% saline, p.o.) 2 h before the oral administration of isopulegol (ISO-100 and 200 mg/kg, p.o.) or vehicle in each group. Sixty minutes after, the gastric lesions were induced

with absolute ethanol (0.2 mL, p.o.). One further group received vehicle and was not exposed to ethanol. The results are presented as mean \pm SEM. *** $p < 0.001$, significant difference compared with saline + ethanol group; # $p < 0.05$ vs ISO-100 group. ANOVA followed by Student–Newman–Keuls as the post hoc test was used

2008; Zhao et al. 2009). The pretreatment with isopulegol was able to inhibit such alterations (Fig. 3 and Table 2). Thus, statistical analysis performed on macro- and microscopic scores revealed an excellent correlation, confirming the effectiveness of the macroscopic evaluation. Taking together, these results indicate a significant protective effect from isopulegol against EIGU.

Although the mechanism(s) of EIGU is not fully understood, it is well documented in the literature that the pathogenesis of ethanol-induced lesions in animals is multifactorial, involving superficial aggressive cellular necrosis as

well as the release of tissue-derived mediators, acting on gastric microvasculature, triggering a series of events that lead to mucosal and possibly submucosal tissue damage (Szabo et al. 1985; Trier et al. 1987). Several studies have suggested that vasodilatation is important in the maintenance of gastric integrity because of the blood flow enhancement, also preventing the activation of inflammatory factors and removing irritants (Wallace and Granger 1996). In this way, NO, a potent vasodilator agent produced via activity of NO synthase (NOS), is thought to be a regulator of gastric mucosal haemodynamic in the resting condition and also

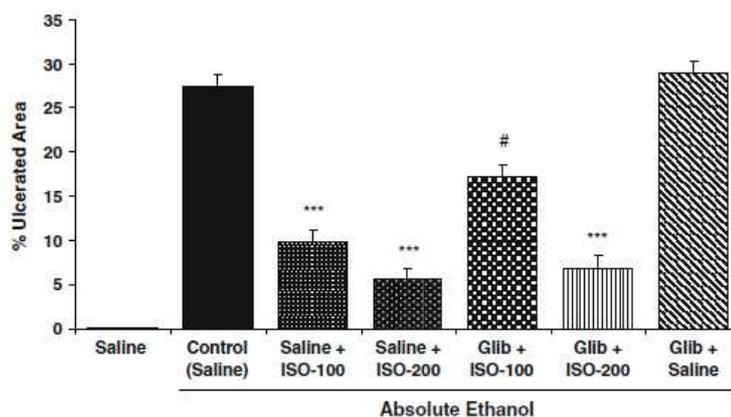


Fig. 7 Effects of pre-treatment with glibenclamide on the gastro-protection of isopulegol in mice ($n=8$ /group) subjected to ethanol-induced gastric ulceration. Glibenclamide (GLIB, 10mg/kg, i.p.) or vehicle (0.9% saline, p.o.) were injected 15 min before the oral administration of isopulegol (ISO-100 and 200 mg/kg, p.o.) or vehicle in each group. One group received vehicle and was not exposed to

stressor agent. Sixty minutes after, the gastric mucosal lesions were induced with absolute ethanol (0.2 mL, p.o.). The results are presented as mean \pm SEM. *** $p < 0.001$, significant difference compared with saline + ethanol group; # $p < 0.001$ as compared to saline + ISO-100 group. ANOVA followed by Student–Newman–Keuls as the post hoc test was used

Table 3 Effect of treatment with isopulegol and ranitidine in mice subjected to indomethacin-induced gastric ulceration

Groups and doses (n=8/group)	Gastric lesion scores
Vehicle (saline, 10 ml/kg)	0
Vehicle (saline, 10 ml/kg)+indomethacin (20 mg/kg)	12 (9–13)
ISO (25 mg/kg)+indomethacin (20 mg/kg)	9 (6–13)
ISO (50 mg/kg)+Indomethacin (20 mg/kg)	8 (6–12)
ISO (100 mg/kg)+indomethacin (20 mg/kg)	5 (4–7)*
ISO (200 mg/kg)+indomethacin (20 mg/kg)	3 (1–7)**
Ranitidine (20 mg/kg)+indomethacin (20 mg/kg)	3 (2–7)**

Animals received orally vehicle (3% Tween 80 in 0.9% saline, 10 ml/kg, p.o.), isopulegol (ISO, 25, 50, 100, and 200 mg/kg, p.o.), or ranitidine (20 mg/kg, p.o.) 60 min prior to indomethacin (20 mg/kg, p.o.), while controls received vehicle alone. The degree of ulceration was graded according to an arbitrary scale described by Szabo et al. (1985) (Table 2). The results are presented as medians, with minimum and maximal scores values shown in brackets. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, significant differences compared with vehicle+indomethacin group. Kruskal–Wallis nonparametric test, followed by Dunn's multiple-comparison post hoc analysis was used

after ethanol use (Masuda et al. 1995), presenting thus a significant role in the gastroprotection mechanism (Olinda et al. 2008). NO appears to accelerate the gastric ulcer healing maintaining the integrity of the gastric epithelium, regulating the gastric mucosal blood flow, and stimulating the secretion and synthesis of mucus (Li et al. 2000). However, in the present study, the pretreatment with L-NAME, a non-specific inhibitor of NOS activity, was not able to abolish the gastroprotection promoted by isopulegol against EIGU, suggesting that its ant ulcer effect is probably not mediated by the NO pathway.

Several authors have pointed out that the mechanisms underlying the gastroprotective activity of terpenes may include the reinforcement of different defensive factors of the gastric mucosa, besides the inhibition of the aggressive factors such as gastric acid or pepsin secretion (Sánchez et al. 2006; Rodríguez et al. 2005). It has been established that oxidative stress is considered to be a common factor in the pathogenesis of ulcers by different experimental and clinical models (Mutoh et al. 1990; Demir et al. 2003). In the EIGU animal model, some studies suggest that oxygen-derived reactive species are associated with gastrointestinal damage, and antioxidants agents prevent the lesions by various agents. Ethanol appears to deplete the level of non-protein SHs content, such as GSH, in stomach tissues (Demir et al. 2003; Pongpiriyadacha et al. 2003). GSH is a tripeptide, which acts as antioxidant and seems to be important for the maintenance of the mucosal integrity in the stomach (Pongpiriyadacha et al. 2003; Oliveira et al. 2004). Its biologic role is believed to be a defense against dietary xenobiotics and lipid peroxidation, scavenging reactive oxygen species either directly or enzymatically via glutathione peroxidase. Therefore, depletion of gastric mucosal GSH may result in the accumulation of free radicals that can initiate membrane damage by lipid peroxidation (Demir et al. 2003).

In agreement with previous studies (Maity et al. 1998; Oliveira et al. 2004), our results demonstrated that the concentration of GSH in gastric mucosa was significantly decreased after the administration of ethanol. Isopulegol pretreatment reversed the decrease in GSH levels, similarly to NAC, an amino acid essential in the formation of GSH, suggesting an antioxidant property of isopulegol. In addition, the antioxidant activity presented by isopulegol is in accordance with previous results obtained by our group (data not yet published), where isopulegol significantly prevented PTZ-induced increase in lipid peroxidation, maintained catalase activity in normal levels, and prevented the PTZ-induced loss of GSH in the hippocampus of mice. Interestingly, in the present work, when isopulegol was administered alone, the GSH concentration was significantly higher than that presented by animals without stress. These results suggest that isopulegol prevented the ethanol-induced decrease of GSH possibly by inducing an increase in gastric GSH levels. In fact, it is known that the main protection of the cells against oxidative stress is related to the high intracellular levels of GSH (Meister 1991), which corroborates our hypothesis.

It is also well documented that a large amount of GSH is found in various normal digestive organs, especially in liver and spleen (Sugai et al. 1968), and acute exposure to ethanol also promotes a significant decrease in GSH levels in these tissues (Kim et al. 2008). In order to investigate whether isopulegol would be acting locally in the stomach or systemically, we decided to quantify the hepatic GSH content in mice pretreated with isopulegol and exposed or not to ethanol. As expected, the treatment with absolute ethanol resulted in a marked decrease of GSH in liver homogenates, and pretreatment with isopulegol or NAC was able to reverse this alteration. Our findings are in accordance with Speisky et al. (1985), which reported that a significant decreased in the hepatic synthesis of GSH is an important

mechanism for the decrease in GSH content induced by ethanol. Interestingly, in a similar way as observed in gastric mucosa, the liver GSH concentration was significantly increased in mice treated only with isopulegol as compared to normal animals not exposed to stressor agent. These results corroborate our hypothesis that isopulegol itself could be inducing an increase of GSH levels in the studied tissues. Thus, the results of GSH dosage in the liver and stomach tissues suggest that the antioxidant properties of isopulegol are probably systemic. Nevertheless, whether isopulegol increases GSH levels preventing its depletion or inducing its synthesis requires further investigation.

Previous studies also reported that endogenous prostaglandins are involved in the protective effect of different natural or semi-synthetic terpenes (Matsuda et al. 2002; Sánchez et al. 2006). The gastric prostaglandins cytoprotective effect has been well established, since exogenous prostaglandins have been found to be capable to protect gastric mucosa against different necrotizing agents (Robert et al. 1979; Kunikata et al. 2001). In the stomach mucosa, the prostaglandins seem to stimulate the secretion of bicarbonate and mucus, maintain the mucosal blood flow, inhibit the acid secretion, as well as regulate the mucosal cell turnover and repair (Rainsford 1978). In this way, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, such as aspirin and indomethacin, are known to induce ulcers during the course of anti-inflammatory therapy (Jaszewski et al. 1992). The ulceration induced by both drugs is attributed mainly to the inhibition of prostaglandin synthesis in the cyclooxygenase pathway (Rainsford 1987). In order to investigate the role of prostaglandins in the gastroprotection offered by isopulegol, mice were pretreated with indomethacin, a non-selective cyclooxygenase inhibitor, before they were submitted to EIGU. Our results showed that pretreatment with indomethacin attenuated the protection afforded by isopulegol 100 mg/kg against EIGU. The absence of effects seen with the 200 mg/kg dose of isopulegol is probably related to the dose of indomethacin used, which was not sufficient to overcome the effect of isopulegol 200 mg/kg. The results obtained in this experiment suggest that prostaglandins possibly participate, at least in part, in the gastroprotective effect of isopulegol.

In addition, it has been shown that prostaglandin-mediated gastroprotection involves the opening of K_{ATP} channels, which are a class of ligand-gated proteins that seems to be involved with a variety of physiologic functions of the stomach, such as gastric blood flow regulation, acid secretion, and stomach contractility (Garcia et al. 1997). In fact, Peskar et al. (2002) demonstrated that endogenous prostaglandins act as activators of K_{ATP} channels, and this mechanism, at least in part, mediates gastroprotection. Recent studies have also suggested the participation of K_{ATP} channels in indomethacin- (Gomes et

al. 2006) and ethanol-induced (Medeiros et al. 2008) ulcer models, in which prostaglandins were shown as probable activators of these channels. In this way, our results showed that the gastroprotection mechanism of isopulegol was K_{ATP} -channel-dependent, since its gastroprotective effects were reverted by pretreatment with glibenclamide, a potent antagonist of these channels. We can then suggest the participation of K_{ATP} channels in the gastroprotective effects of isopulegol, in which prostaglandins could be involved in the activation of these channels.

In the indomethacin-induced ulcer model, pretreatment with isopulegol at higher doses also promoted a dose-dependent protection against gastric damage, similarly to ranitidine. Considering that indomethacin-induced ulcerations are attributed mainly to the inhibition of prostaglandin synthesis, these results corroborate the findings above mentioned and strongly suggest the involvement of prostaglandins in the gastroprotection offered by isopulegol.

In a previous study conducted by our group (Silva et al. 2007), we have reported anxiolytic- and depressant-like pharmacological activities from isopulegol at doses of 25 and 50 mg/kg. In the present study, higher doses of isopulegol were needed to significantly protect the gastric mucosa against ethanol- and indomethacin-induced damage. The acute oral toxicity of isopulegol was already evaluated in rats (revised in Bhatia et al. 2008). The results obtained and the LD_{50} value ($\sim 1,030 \pm 100$ mg/kg) represent a relative low toxicity for isopulegol, which was particularly related to the possible central nervous system depressor properties of this substance. Despite that the monoterpenes are often considered to have low toxicity (De Sousa et al. 2007a; Sun 2007), we assume that additional studies are recommended to further determine the safety of isopulegol.

In summary, the results of the present study demonstrate that isopulegol presented significant gastroprotective effects in both ethanol- and indomethacin-induced gastric ulcer models, which appear to be mediated, at least in part, by endogenous prostaglandins, K_{ATP} channel opening, and antioxidant properties. These findings indicate that isopulegol could be a new useful natural gastroprotective tool. However, further studies are required in order to evaluate the exact mechanism involved in such action as well as to better investigate the safety profile of isopulegol use.

Acknowledgments The authors are thankful to the CNPq and CAPES for financial support.

References

- Adeyemi EO, Bastaki SA, Chandranath IS et al (2005) Mechanisms of action of leptin in preventing gastric ulcer. *World J Gastroenterol* 11(27):4154–4160

- Almeida RN, Navarro DS, Barbosa-Filho JM et al (2001) Plants with central analgesic activity. *Phytomedicine* 8:310–322
- Amaral JF, Silva MIG, Aquino Neto MR et al (2007) Antinociceptive effect of the monoterpene R-(+)-limonene in mice. *Biol Pharm Bull* 30(7):1217–1220
- Andrade SF, Lemos M, Comunello E et al (2007) Evaluation of the antiulcerogenic activity of *Maytenus robusta* (Celastraceae) in different experimental ulcer models. *J Ethnopharmacol* 113:252–257
- Bhargava KP, Gupta MB, Tangri KK (1973) Mechanism of ulcerogenic activity of indomethacin and oxyphenbutazone. *Eur J Pharmacol* 22(2):191–195
- Bhatia SP, McGinty D, Letizia CS et al (2008) Fragrance material review on isopulegol. *Food Chem Toxicol* 46:S185–S189
- Brzozowski T, Konturek PC, Drozdowicz D et al (2005) Grapefruit-seed extract attenuates ethanol- and stress-induced gastric lesions via activation of prostaglandin, nitric oxide and sensory nerve pathways. *World J Gastroenterol* 11:6450–6458
- Chandranath SI, Bastaki SMA, Singh JA (2002) Comparative study on the activity of lansoprazole, omeprazole and PD-136450 on acidified ethanol- and indomethacin-induced gastric lesions in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29(3):173–180
- Chuah GK, Liu SH, Jaenicke S, Harrison LJ (2001) Cyclisation of citronellal to isopulegol catalysed by hydrous zirconia and other solid acids. *J Catal* 200:352–359
- Da Rocha Lapa F, Freitas CS, Baggio CH et al (2007) Gastroprotective activity of the hydroalcoholic extract obtained from *Polygala paniculata* L. in rats. *J Pharm Pharmacol* 59(10):1413–1419
- De Sousa FC, Monteiro AP, de Melo CT et al (2005) Antianxiety effects of riparin I from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. *Phytother Res* 19(12):1005–1008
- De Sousa DP, Gonçalves JCR, Quintans-Júnior L et al (2006) Study of anticonvulsant effect of citronellol, a monoterpene alcohol, in rodents. *Neurosci Lett* 401:231–235
- De Sousa DP, Nóbrega FFF, Claudino FS et al (2007a) Pharmacological effects of the monoterpene a, b-epoxy-carvone in mice. *Rev Bras Farmacogn* 17(2):170–175
- De Sousa DP, Raphael E, Brocksom U et al (2007b) Sedative effect of monoterpene alcohols in mice: a preliminary screening. *Z Naturforsch C* 62(7–8):563–566
- Demir S, Yilmaz M, Köseoğlu M et al (2003) Role of free radicals in peptic ulcer and gastritis. *Turk J Gastroenterol* 14(1):39–43
- García ML, Hanner M, Knaus HG et al (1997) Pharmacology of potassium channels. *Adv Pharmacol* 39:425–471
- Gomes AS, Lima LMF, Santos CL et al (2006) LPS from *E. coli* protects indomethacin-induced gastropathy in rats—role of ATP-sensitive K channels. *Eur J Pharmacol* 547(1–3):136–142
- Guedes MM, Carvalho AC, Lima AF et al (2008) Gastroprotective mechanisms of centipedic acid, a natural diterpene from *Egletes viscosa* LESS. *Biol Pharm Bull* 31(7):1351–5
- Gürbüz V, Alican I, Berrak et al (1999) Role of nitric oxide in indomethacin-induced gastric mucosal dysfunction in the rat. *Exp Physiol* 84(2):319–332
- Iwata F, Koo A, Itoh M et al (1997) Functional evidence linking potassium channels and afferent nerve-mediated mucosal protection in rat stomach. *Life Sci* 61(17):1713–1720
- Jaszewski R, Graham DY, Stromatt SC (1992) Treatment of nonsteroidal antiinflammatory drug-induced gastric ulcers with misoprostol. *Dig Dis Sci* 37(12):1820–1824
- Kim SJ, Jung YS, Kwon DY et al (2008) Alleviation of acute ethanol-induced liver injury and impaired metabolomics of S-containing substances by betaine supplementation. *Biochem Biophys Res Commun* 368(4):893–898
- Kumikata T, Araki H, Takeeda M et al (2001) Prostaglandin E prevents indomethacin-induced gastric and intestinal damage through different EP receptor subtypes. *J Physiol Paris* 95(1–6):157–163
- Laine L, Weinstein WM (1988) Histology of alcoholic hemorrhagic gastritis: a prospective evaluation. *Gastroenterology* 94:1254–1262
- Li Y, Wang WP, Wang HY et al (2000) Intragastric administration of heparin enhances gastric ulcer healing through a nitric oxide dependent mechanism in rats. *Eur J Pharmacol* 399:205–214
- Lowry H, Rosebrough NJ, Farr AL et al (1951) Protein measurements with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275
- Maity S, Vedasiromoni JR, Ganguly DK (1998) Role of glutathione in the antiulcer effect of hot water extract of black tea (*Camellia sinensis*). *Jpn J Pharmacol* 78(3):285–292
- Masuda E, Kawano S, Nagano K et al (1995) Endogenous nitric oxide modulates ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. *Gastroenterology* 108(1):58–64
- Matsuda H, Pongpiriyadacha Y, Morikawa T et al (2002) Protective effects of polygodial and related compounds on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats: structural requirements and mode of action. *Bioorg Med Chem Lett* 12(3):477–482
- Matsunaga T, Hasegawa C, Kawasuji T et al (2000) Isolation of the antiulcer compound in essential oil from the leaves of *Cryptomeria japonica*. *Biol Pharm Bull* 23:595–598
- Medeiros JV, Gadelha GG, Lima SJ et al (2008) Role of the NO/cGMP/K(ATP) pathway in the protective effects of sildenafil against ethanol-induced gastric damage in rats. *Br J Pharmacol* 153(4):623–624
- Meister A (1991) Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal: applications in research and therapy. *Pharmacol Ther* 51:155–194
- Molina V, Carbajal D, Arruzazabala L et al (2005) Therapeutic effect of D-002 (Abexol) on gastric ulcer induced experimentally in rats. *J Med Food* 8(1):59–62
- Mutoh H, Hiraishi H, Ota S et al (1990) Role of oxygen radicals in ethanol-induced damage to cultured gastric mucosal cells. *Am J Physiol* 258:603–609
- Nogami M, Moriura T, Kubo M et al (1986) Studies on the origin, processing and quality of crude drugs. II: Pharmacological evaluation of the Chinese crude drug “Zhu” in experimental stomach ulcer. (2). Inhibitory effect of extract of *Atractylodes lancea* on gastric secretion. *Chem Pharm Bull* 34:3854–3860
- Ohtau Y, Kobayashi T, Ishiguro I (1999) Role of endogenous serotonin and histamine in the pathogenesis of gastric mucosal lesions in unanaesthetised rats with a single treatment of compound 48/80, a mast cell degranulator. *Pharmacol Res* 39(4):261–267
- Olinda TM, Lemos TLG, Machado LL et al (2008) Quebrachitol-induced gastroprotection against acute gastric lesions: role of prostaglandins, nitric oxide and K⁺ ATP channels. *Phytomedicine* 15:327–333
- Oliveira FA, Vieira-Júnior GM, Chaves MH et al (2004) Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. *Pharmacol Res* 49:105–111
- Paik SY, Kok KH, Beak SM et al (2005) The essential oils from *Zanthoxylum schinifolium* pericarp induce apoptosis of HepG2 human hepatoma cells through increased production of reactive oxygen species. *Biol Pharm Bull* 28(5):802–807
- Paula AC, Toma W, Gracioso JS et al (2006) The gastroprotective effect of the essential oil of Croton cajucara is different in normal rats than in malnourished rats. *Br J Nutr* 96(2):310–315
- Peskar BM, Ehrlich K, Peskar BA (2002) Role of ATP-sensitive potassium channels in prostaglandin-mediated gastroprotection in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 301:969–974
- Pongpiriyadacha Y, Matsuda H, Morikawa T et al (2003) Protective effects of polygodial on gastric mucosal lesions induced by necrotizing agents in rats and the possible mechanisms of action. *Biol Pharm Bull* 26(5):651–657
- Rainsford KD (1978) Structure-activity relationships of non-steroid anti-inflammatory drug gastric ulcerogenic activity. *Agents Actions* 8(6):587–605

- Rainsford KD (1987) The effect of 5-lipoxygenase inhibitors and leukotriene antagonists on the development of gastric lesions induced by nonsteroidal antiinflammatory drugs in mice. *Agents Action* 21:316–319
- Rao BRR, Kaul PN, Syamasundar KY et al (2003) Comparative composition of decanted and recovered essential oils of *Eucalyptus citriodora* Hook. *Flav Frag J* 18:133–135
- Robert A, Nezamis JE, Lancaster C et al (1979) Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. *Gastroenterology* 77(3):433–443
- Rodríguez JA, Theoduloz C, Sánchez M et al (2005) Gastroprotective activity of a new semisynthetic solidagenone derivative in mice. *J Pharm Pharmacol* 57(2):265–271
- Sánchez M, Theoduloz C, Schmeda-Hirschmann G et al (2006) Gastroprotective and ulcer-healing activity of oleanolic acid derivatives: in vitro–in vivo relationships. *Life Sci* 79:1349–1356
- Santos CL, Souza MH, Gomes AS et al (2005) Sildenafil prevents indomethacin-induced gastropathy in rats: role of leukocyte adherence and gastric blood flow. *Br J Pharmacol* 146(4):481–486
- Sedlak J, Lindsay RH (1968) Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 25(1):192–205
- Serra S, Brenna E, Fuganti C et al (2003) Lipase-catalyzed resolution of *p*-menthan-3-ols monoterpenes: preparation of the enantiomer-enriched forms of menthol, isopulegol, *trans*- and *cis*-piperitol, and *cis*-isopiperitenol. *Tetrahedron: Asymmetry* 14:3313–3319
- Silva MIG, de Aquino Neto MR, Teixeira Neto PF et al (2007) Central nervous system activity of acute administration of isopulegol in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 88(2):141–147
- Sousa FC, Melo CT, Monteiro AP et al (2004) Antianxiety and antidepressant effects of riparin III from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 78(1):27–33
- Speisky H, MacDonald A, Giles G et al (1985) Increased loss and decreased synthesis of hepatic glutathione after acute ethanol administration. Turnover studies. *Biochem J* 225(3):565–572
- Sugai Y, Ando T, Nishimura I G et al (1968) Sulfhydryl group (total SH) and glutathione contents in digestive organs. *J Gastroenterol* 3(4):280–281
- Sun J (2007) D-Limonene: safety and clinical applications. *Altern Med Rev* 2(3):259–263
- Szabo S, Trier JS, Brown A et al (1985) A quantitative method for assessing the extent of experimental gastric erosions and ulcers. *J Pharmacol Methods* 13(1):59–66
- Takase H, Yamamoto K, Hirano H et al (1994) Pharmacological profile of gastric mucosal protection by marmim and nobiletim from traditional herbal medicine, *Aurantii fructus* immaturus. *Jpn J Pharmacol* 66:139–147
- Trier JS, Szabo S, Allan CH et al (1987) Ethanol-induced damage to mucosal capillaries of rat stomach. Ultrastructural features and effects of prostaglandin E2 and cysteamine. *Gastroenterology* 92:13–22
- Vemin GA, Parkanyi C, Cozzolino F et al (2004) GC/MS analysis of the volatile constituents of *Corymbia citriodora* Hook. from Réunion Island. *J Essent Oil Res* 16:560–565
- Wallace JL, Granger DN (1996) The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. *FASEB J* 10:731–740
- Yeo M, Kim DK, Cho SW et al (2008) Ginseng, the root of *Panax ginseng* C.A. Meyer, protects ethanol-induced gastric damages in rat through the induction of cytoprotective heat-shock protein 27. *Dig Dis Sci* 53:606–613
- Yoshikawa M, Sugimoto S, Nakamura S et al (2007) Medicinal flowers. XVI. New dammarane-type triterpene tetraglycosides and gastroprotective principles from flower buds of *Panax ginseng*. *Chem Pharm Bull* 55(7):1034–1038
- Yu K, Jiang SF, Lin MF et al (2004) Extraction and purification of biologically active intestinal trefoil factor from human meconium. *Lab Invest* 84:390–392
- Zhao W, Zhu F, Shen W et al (2009) Protective effects of DIDS against ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. *Acta Biochim Biophys Sin* 41(4):301–308
- Zimmerman M (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16:109–110



Contents lists available at ScienceDirect

Fitoterapia

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fitote

Effects of isopulegol on pentylenetetrazol-induced convulsions in mice: Possible involvement of GABAergic system and antioxidant activity

Maria Izabel Gomes Silva^a, Maria Angélica Gomes Silva^a, Manuel Rufino de Aquino Neto^a, Brinell Arcanjo Moura^a, Helenira Lourenço de Sousa^a, Everton Paulo Homem de Lavor^a, Patrícia Freire de Vasconcelos^a, Danielle Silveira Macêdo^a, Damião Pergentino de Sousa^b, Silvânia Maria Mendes Vasconcelos^a, Francisca Cléa Florenço de Sousa^{a,*}

^a Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Rua Cel. Nunes de Melo 1127, CEP: 60430-270, Fortaleza, Brazil

^b Department of Physiology, Federal University of Sergipe, CEP 49100-000 São Cristóvão, Sergipe, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 February 2009

Accepted in revised form 11 June 2009

Available online xxxx

Keywords:

Monoterpenes
Anticonvulsant activity
Pentylenetetrazol model
Antioxidant effects
Essential oils

ABSTRACT

The present study investigated the effects of isopulegol, a monoterpene alcohol, in PTZ-induced convulsions and verified possible involved mechanisms. Saline, isopulegol or diazepam were intraperitoneally injected 30min before PTZ. The latency for development of convulsions and mortality, as well as the mortality protection percentage was recorded. For investigating the involvement of GABAergic system, flumazenil was utilized. The activity of antioxidant enzyme catalase as well as the levels of reduced glutathione and lipid peroxidation were measured in brain hippocampus. Similarly to diazepam, isopulegol significantly prolonged the latency for convulsions and mortality of mice. All animals were protected against mortality at higher dose of isopulegol. Flumazenil pretreatment decreased the prolongation of seizure latency induced by both diazepam and isopulegol, although it was not able to reverse the latency and protection percent for mortality. Isopulegol also significantly prevented PTZ-induced increase in lipid peroxidation, preserved catalase activity in normal levels, and prevented the PTZ-induced loss of GSH in hippocampus of mice. These results suggest that the anticonvulsant and bioprotective effects of isopulegol against PTZ-induced convulsions are possibly related to positive modulation of benzodiazepine-sensitive GABA_A receptors and to antioxidant properties.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In the last years, an increasing number of studies have demonstrated that natural products from folk remedies have contributed significantly in the discovery of modern drugs worldwide. In Brazil, information from ethnic groups on indigenous traditional medicine has played a vital role in the discovery of novel products from plants as chemotherapeutic agents, which have resulted in a significant body of publications in this area [1–5].

Essential oils are concentrated volatile aromatic compounds produced by aromatic plants that have been found to

exhibit a variety of biological properties, such as analgesic [4], spasmolytic [6] and anticonvulsant [3] activities. Monoterpenes are the primary components of these essential oils and the effects of many medicinal herbs have been attributed to them [7–10]. Isopulegol (*p*-menth-8-en-3-ol) (Fig. 1A) is a monoterpene alcohol of *p*-menthane family, intermediate in the preparation of (–)-menthol [11] (Fig. 1B), and it is present in the essential oils of various plants species, such as *Eucalyptus citriodora* Hook [12] and *Zanthoxylum schinifolium* [13]. Isopulegol has been used in the manufacture of fragrances with blossom compositions [14], however, reports with reference to its therapeutic effects, as described in the present work, are scarce in literature.

Epilepsy is one of the most common serious neurological conditions, affecting more than 50 million people worldwide

* Corresponding author. Tel.: +55 85 3366 8337; fax: +55 85 3366 8333.
E-mail address: cleaflorenco@yahoo.com.br (F.C.F. de Sousa).

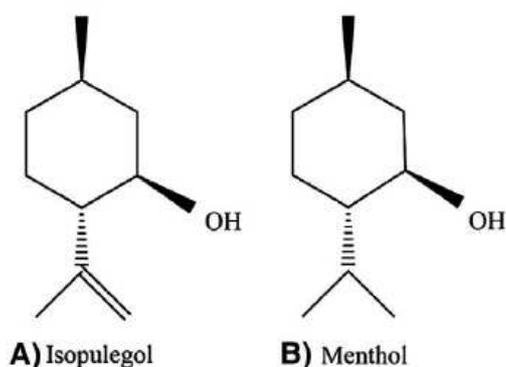


Fig. 1. Structures of isopulegol (A) and menthol (B).

[15]. The current clinically available antiepileptic drugs are associated with a variety of side-effects and chronic toxicity [16]. In this regard, great efforts have been made in search of new antiepileptic drugs with enhanced efficacy and minimal side-effects, including studies of active constituents obtained from medicinal plants [15,17].

Disturbances of the naturally existing balance between the concentrations of inhibitory and excitatory neurotransmitters in the central nervous system (CNS) are assumed to be the main cause of convulsive episodes. Thus, a deficiency in the γ -aminobutyric acid (GABA) concentration may result in many pathological changes in the CNS that can be further implicated in epilepsy. In this context, pentylenetetrazole (PTZ), a selective blocker of GABA transmission, is the most commonly used convulsant chemical agent in animal models to screen drugs for their potential anticonvulsant properties [18–20].

Currently, several monoterpenes, in general, volatile terpenoids, have been reported to have neuroactive properties. Their actions in experimental animal models have been mainly linked to protection against anxiety [21], insomnia [8] and seizures [5,17]. Such disorders are considered likely to involve GABA_A receptors [22], which are the predominant ionotropic receptors for fast inhibitory neurotransmission in the mammalian central nervous system (CNS) [23]. Therefore, stimulation of GABA_A receptors by GABA or added positive modulators (such as benzodiazepines and barbiturates) produces anxiolysis, sedation, anaesthesia, myorelaxation and anticonvulsant actions [24], effects similar to that evoked by several monoterpenes [7,25].

Thus, the blockade of the convulsions chemically induced by PTZ, in rodents, is a characteristic of drugs with depressant effects on the CNS [17], presumably by increasing the inhibitory effects of GABA. Currently, a considerable number of monoterpenoids are of interest for their actions as positive modulators of GABA_A receptors. For instance, menthol and structural analogs, including isopulegol and isomenthol, were described as potent positive modulators of these receptors [26]. Corroborating these data, in recent works, our group [21] and collaborators [27] showed that isopulegol presented anxiolytic- and depressant-like pharmacological actions on the CNS in mice. Such effects were reversed by Flumazenil, a recognized competitive antagonist at the central benzodia-

zepine receptors, suggesting a benzodiazepine-like modulation from isopulegol. These data led us to verify in the present study whether isopulegol would be able to exert any protector effect in PTZ-induced convulsions in mice.

A growing body of evidence has also suggested that reactive oxygen species (ROS) generation may underlie the convulsant and neurotoxic effects of PTZ [28,29]. In fact, several studies have demonstrated an increase in reactive species formation in CNS of animals exposed to PTZ-induced convulsions model, and the treatment with antioxidants seems to attenuate convulsions and/or ROS-induced damage [18,19]. In a recent study conducted by our group [30], we detected an antioxidant action from isopulegol in ethanol-induced ulcer model in mice. Taking these data in account, in the present study, we aimed also to evaluate whether the antioxidant properties from isopulegol would be related to its possible anticonvulsant effect. For that, the activity of antioxidant enzyme catalase, as well as the levels of reduced glutathione (GSH) and lipid peroxidation were measured in brain hippocampus of mice.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male Swiss mice (20–30 g) were maintained in standard cages, at a controlled temperature (23 ± 1 °C) with a 12 h dark/light cycle, and food and water *ad libitum*. All animals were treated in accordance with the current law and the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals. The studies were performed under the consent and surveillance of the Committee of Ethics in Animal Research, Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará.

2.2. Drugs and dosage

Isopulegol was isolated of the technical grade isopulegol (Dierberger-Brazil) by column chromatography. It was emulsified with 0.2% Tween 80 (Sigma-USA), dissolved in distilled water and intraperitoneally administered at doses of 100 (64.88 mM/kg) and 200 mg/kg (129.64 mM/kg). Flumazenil 2.0 mg/kg (0.54 mM/kg) (União Química/Brazil) and Diazepam (DZP) 1 mg/kg (0.35 mM/kg) (Geigy), were intraperitoneally injected after being dissolved in distilled water. Pentylenetetrazole (PTZ) 99 mg/kg (71.65 mM/kg) (União Química/Brazil) was dissolved in distilled water and subcutaneously administered. Controls received vehicle at the same volume (10 ml/kg) and through the same route as the other treated groups.

2.3. Pentylenetetrazole-induced convulsions

Mice were divided into four groups of 8–10 animals each and treated as follows. The control group received vehicle (saline 0.9% in 3% of Tween 80, i.p.) and the second group was treated with DZP 1 mg/kg (0.35 mM/kg), i.p.. After a pilot test, we identified the more effective doses of isopulegol in this model. So, the two remaining groups were injected with isopulegol at doses of 100 (64.88 mM/kg) or 200 mg/kg (129.64 mM/kg), i.p.. After 30 min, convulsions were induced in all groups by PTZ at 99 mg/kg (71.65 mM/kg), s.c., being its CD97 value, i.e. the dose of PTZ necessary to evoke clonic

seizures in 97% of animals tested [20]. Mice were further observed during 20 min. The latencies to the first clonic seizures, as well as to lethality were recorded. The protection percentage against mortality was also calculated.

2.4. Effects of flumazenil on the anticonvulsant activity of isopulegol

For this assay, six groups of 8–10 mice each were selected. In the first group, mice were given flumazenil 2 mg/kg (0.54 mM/kg), i.p., 15 min before the administration of isopulegol 200 mg/kg (129.64 mM/kg), i.p.. Thirty minutes after treatment with isopulegol, this group received PTZ 99 mg/kg (71.65 mM/kg), s.c.. In the second group, the animals received flumazenil 2 mg/kg (0.54 mM/kg), i.p., 15 min before the administration of diazepam 1 mg/kg (0.35 mM/kg), i.p., and 30 min later they received PTZ 99 mg/kg (71.65 mM/kg), s.c.. Three groups were injected diazepam 1 mg/kg (0.35 mM/kg, i.p.), flumazenil 2 mg/kg (0.54 mM/kg, i.p.), and vehicle (10 ml/kg, i.p.) 30 min before the administration of PTZ 99 mg/kg (71.65 mM/kg, s.c.). The anticonvulsant activity of isopulegol and diazepam in mice pretreated or not with flumazenil was assessed and compared with the control (vehicle) group [31,32].

2.5. Biochemical evaluation (enzymatic assays)

After PTZ-induced convulsions experiment, animals were sacrificed by cervical dislocation, their brains were quickly removed and the hippocampus was dissected for preparation of homogenates 10% (w/v) in 0.05 M phosphate buffer, pH 7.4 or EDTA 0.02 M (GSH measurements) for the enzymatic assays. The protein concentration was measured according to the method described by Lowry et al. [33].

2.5.1. Lipid peroxidation assay

Lipid peroxides formation was analyzed by measuring the thiobarbituric-acidreacting substances (TBARS) in the homogenates, as previously described by Huong et al. [34]. Lipid peroxidation was determined by the absorbance at 532 nm and was expressed as μmol of malondialdehyde (MDA)/mg of protein.

2.5.2. Catalase activity determination

Catalase activity was measured by the method that employs hydrogen peroxide to generate H_2O and O_2 as described by Maehly and Chance [35]. The activity was measured by the degree of this reaction. The reaction was followed at 230 nm. Standard curve was established using purified catalase (Sigma, MO, USA) under identical conditions. All samples were diluted with 0.1 mmol/L phosphate buffer (pH 7.0) to provoke an inhibition of 50% diluent rate (i.e., the uninhibited reaction) and results were expressed as $\mu\text{M}/\text{min}/\mu\text{g}$ protein.

2.5.3. Measurements of glutathione (GSH) levels

GSH levels were evaluated to estimate endogenous defenses against oxidative stress. The method was based on Ellman's reagent (DTNB) reaction with free thiol groups. Production levels of GSH were determined in hippocampus homogenates as described by Sedlak and Lindsay [36]. GSH

level was determined by the absorbance at 412 nm and was expressed as ng of GSH/g wet tissue.

2.6. Statistical analyses

Results are presented as mean \pm S.E.M. Data were analyzed by ANOVA followed by Student–Newman–Keuls's *post hoc* test or by Fisher's exact test. Results were considered significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Effects of isopulegol on pentylenetetrazole-induced convulsions

As illustrated in Fig. 2A, similar to diazepam, isopulegol 200 mg/kg (129.64 mM/kg) caused a significant increase of latency (s) for development of PTZ-induced convulsions, as

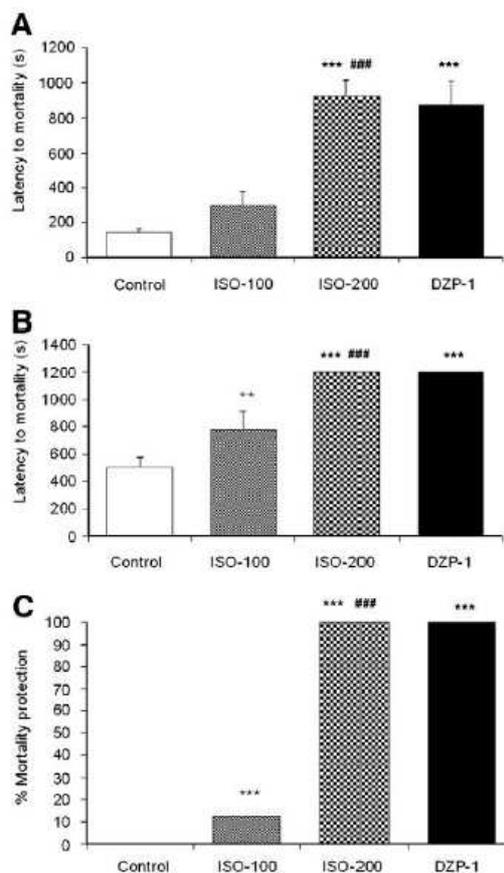


Fig. 2. Effects of isopulegol 100 (64.88 mM/kg, i.p.) and 200 mg/kg, (129.64 mM/kg, i.p.) and diazepam 1 mg/kg (0.35 mM/kg, i.p.) on PTZ-induced seizure in mice. All groups received PTZ 99 mg/kg (71.65 mM/kg, s.c.) 30 min after the treatments. The latency for development of convulsions is shown in A and for mortality in B. The percentage of protection against mortality is shown in C. Values represent the mean \pm S.E.M. One-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls's as the *post hoc* and Fisher's exact test were used. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, as compared with control values; ## $p < 0.001$, as compared with ISO-100 group.

compared with control group treated only with vehicle (control: 144.2 ± 20.1 s; ISO-200: 919.3 ± 90.7 s; DZP-1: 869.9 ± 121.2 s, $p < 0.05$). The increase of latency detected with minor dose (100 mg/kg/64.88 mM/kg) was not statistically significant. Fig. 2B shows that isopulegol caused a dose-dependent increase of latency for mortality (control: 500.6 ± 69.6 s; ISO-100: 782.0 ± 128.8 s; ISO-200: 1200.0 ± 0.0 s; DZP-1: 1200.0 ± 0.0 s; $p < 0.05$). Interestingly, at the dose of 200 mg/kg (129.64 mM/kg), similar to diazepam, isopulegol gave 100% protection against mortality, while at the dose of 100 mg/kg (64.88 mM/kg) there was a 12.5% protection (Fig. 2C).

3.2. Effects of flumazenil on the anticonvulsant activity of isopulegol

The flumazenil 2 mg/kg (0.54 mM/kg) pretreatment reversed the effects of both diazepam and isopulegol in prolonging convulsion latency, as compared to the control (vehicle) group (control: 139.1 ± 18.1 s; ISO-200: 959.4 ± 86.5 ; FLU-2 + ISO-200: 318.7 ± 75.9 ; DZP-1: 911.6 ± 66.61 ; FLU-2 + DZP-1: 186.3 ± 44.5 ; $p < 0.05$), as shown in Fig. 3A. However, flumazenil was not able to reverse the latency and protection percent for mortality in both isopulegol and diazepam groups (Fig. 3B and C). Animals treated only with flumazenil had shown no alteration on observed parameters, as compared to control groups.

3.3. Lipid peroxidation assay

TBARS levels, the indicator of lipid peroxidation, were significantly increased in the hippocampus of mice treated only with PTZ 99 mg/kg (71.65 mM/kg), when compared with the control group (vehicle) that had not received the stressor agent (saline: 8.2 ± 0.3 ; PTZ: 9.9 ± 0.3 ; $p < 0.05$). However, the pretreatment with 100 (64.88 mM/kg) and 200 mg/kg (129.64 mM/kg) doses of isopulegol significantly prevented the PTZ-induced increased TBARS levels (ISO-100 + PTZ: 8.0 ± 0.4 ; ISO-200 + PTZ: 8.1 ± 0.3 ; $p < 0.05$). Animals treated only with isopulegol, at both doses, presented no alteration in TBARS levels (Fig. 4A).

3.4. Catalase activity determination

In the PTZ group, a significant decrease of the catalase activity in hippocampus was observed as compared to the control group (vehicle) (saline: 40.8 ± 3.2 ; PTZ: 26.4 ± 3.0 ; $p < 0.05$). Pretreatment with isopulegol 100 (64.88 mM/kg) and 200 mg/kg (129.64 mM/kg) was able to keep catalase activity to normal levels, similar to that observed in control group (ISO-100 + PTZ: 41.1 ± 2.8 ; ISO-200 + PTZ: 35.4 ± 2.8 ; $p < 0.05$). The catalase activity on mice treated only with isopulegol (at both doses) was not significantly different in control values (Fig. 4B).

3.5. Measurements of glutathione (GSH) levels

Fig. 4C shows that the treatment of the mice with PTZ resulted in decreased levels of GSH in hippocampus when compared to the control group (saline: 390.0 ± 18.1 ; PTZ: 264.2 ± 23.3 ; $p < 0.05$). Interestingly, isopulegol pretreatment not only significantly restored the GSH levels (at 100 mg/kg/

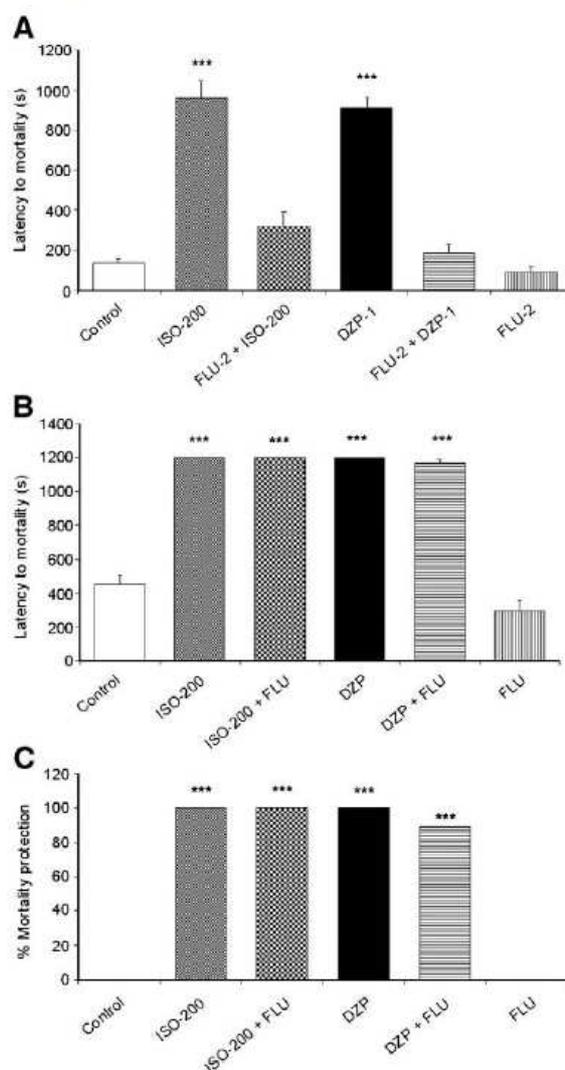


Fig. 3. Effects of flumazenil 2 mg/kg (0.54 mM/kg, i.p.) on the anticonvulsant activity of isopulegol 200 mg/kg (129.64 mM/kg, i.p.) and diazepam 1 mg/kg (0.35 mM/kg, i.p.). All groups received PTZ 99 mg/kg (71.65 mM/kg), s.c. Latency for development of convulsions is shown in A and for mortality in B. The percentage of protection against mortality is shown in C. Values represent the mean \pm S.E.M. One-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls's as the *post hoc* and Fisher's exact test were used. *** $p < 0.001$, as compared with control values.

64.88 mM/kg dose) (ISO-100 + PTZ: 359.6 ± 14.7 ; $p < 0.05$) but also promoted a significant increase of GSH in mice pretreated with the higher dose of isopulegol (ISO-200 + PTZ: 537.2 ± 57.5 ; $p < 0.05$), as compared to control. GSH levels were also increased in groups treated with isopulegol and not exposed to stressor agent (ISO-100: 469.1 ± 46.7 ; ISO-200: 535.2 ± 35.1 ; $p < 0.05$), as compared to the saline group.

4. Discussion

Currently, several monoterpenoids have been shown as positive modulators of GABA_A receptors, including menthol

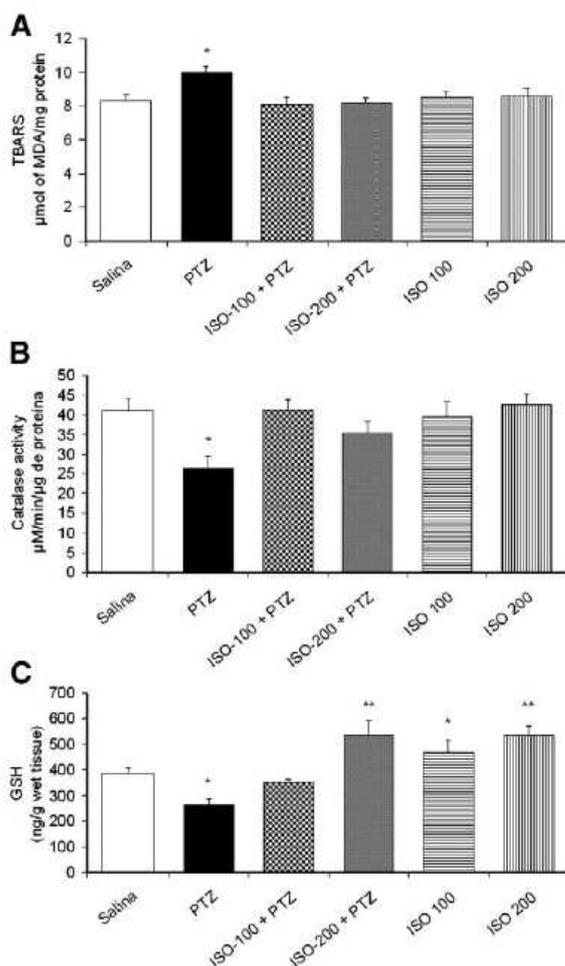


Fig. 4. Effects of isopulegol in lipid peroxidation level (A), activity of antioxidant enzyme catalase (B) and levels of GSH (C) in brain hippocampus of mice. Animals were treated or not with isopulegol 100 (64.88 mM/kg, i.p.) and 200 mg/kg, (129.64 mM/kg, i.p.) and administered or not with PTZ 99 mg/kg (71.65 mM/kg, s.c., s.c.). Values represent the mean \pm SEM. One-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls's as the *post hoc* was used. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ as compared to the control group (saline 0.9%). TBARS: tiobarbituric-acid-reacting substances; MDA: malondialdehyde; GSH: glutathione.

and related compounds such as isopulegol, isomenthol, borneol and others [7,22,25,26]. Corroborating these data, in recent works, our group [21] and collaborators [27] showed that isopulegol presented anxiolytic- and depressant-like pharmacological actions on CNS in mice. Considering that the blockade of the PTZ-induced convulsions, in rodents, is a characteristic frequently found in drugs with depressant effects on CNS [37], the present study verified whether isopulegol would be able to protect PTZ-induced convulsions in mice, as well as investigated possible mechanisms involved in this action.

Our present results showed that isopulegol significantly prolonged the latency for development of PTZ-induced convulsions (at higher dose) and death (at both doses) of animals. Pretreatment with isopulegol promoted a dose

related protection against mortality and, interestingly, all animals survived at the higher dose of isopulegol tested. Similarly, in the group that received DZP the latencies significantly were prolonged and absence of mortality was also observed. These findings suggest that isopulegol presents a possible anticonvulsant and bioprotective profile similar to that seen with diazepam and several other monoterpenoids [17,31,38].

The GABA_A receptor mediates the majority of inhibitory neurotransmission in the mammalian CNS and therefore it is a major focus in epilepsy research [39]. It is widely recognized that PTZ leads to tonic clonic seizures by suppressing the inhibitory effects of GABAergic transmission [40,41]. Similar to several monoterpenes such as menthol, isomenthol [26], borneol [7,22] and thymol [42], isopulegol was recently described as a positive allosteric modulator of GABA_A receptors [26]. Thus, in order to investigate whether the anticonvulsant actions of isopulegol would be GABA-dependent, especially on the classical benzodiazepine sites, flumazenil, a benzodiazepine receptor (GABA_A) antagonist, was used. Our results showed that flumazenil pretreatment decreased the prolongation of convulsant latency induced by both diazepam and isopulegol, suggesting a possible involvement of direct activation of benzodiazepine site of GABA_A receptor. These results are in agreement with the previous study conducted by our group [21], in which we also found that the anxiolytic- and depressor-like effects of isopulegol were possibly related to benzodiazepine receptors activation.

An increasing number of natural agents have been found to modulate ionotropic GABA receptors independently of benzodiazepine sites, including the monoterpenes (+)- and (–)-borneol [7], thymol [43] and α,β -epoxy-carvone [17]. As mentioned before in the present study, isopulegol (Fig. 1A) is a structural analog of menthol (Fig. 1B) and both monoterpenes act as positive allosteric modulator of GABA_A receptors. In competition studies, the benzodiazepine antagonist flumazenil had no effect on menthol actions, suggesting that the effects from this terpenoid do not involve classical flumazenil-sensitive benzodiazepine sites. By contrast, the possible depressant effects on CNS exhibited by isopulegol in our previous [21] and in the present study seem to be related to flumazenil-sensitive benzodiazepine sites. In the similar way, the depressant and anticonvulsant effects of other monoterpenes were also reversed by flumazenil, such as Epinepetalactone [38] and thymoquinone [31], suggesting a possible common binding site or interaction between these monoterpenoids and benzodiazepines on the receptor.

Previous studies showed a structure–activity relationship for GABA receptor modulation by several monoterpenoids [44]. By comparing the structures, menthol and isopulegol are cyclohexanol-based analogs and differ only in a double bond in aliphatic chain of isopulegol (Fig. 1A and B), however, studies have evidenced different pharmacological effects from these monoterpenes. When administered to rodents by injection, menthol promoted ambulation [45], while its (–)-enantiomer is endowed with analgesic properties [46]. In our previous work [21] isopulegol exhibited a depressant effect in the pentobarbital-induced sleep test, while our collaborators [27] showed that (–)-menthol was ineffective in this test. Thus, variation in activities observed for both (–)-menthol

and isopulegol analogs suggests that structural differences between these monoterpenoids may also be taking place at the binding site on GABA_A receptors. In fact, the therapeutically useful properties of different benzodiazepines may result from actions on different GABA_A receptor subtypes. For instance, the $\alpha 1$ -GABA_A subunit has been related to sedative properties of benzodiazepines, while the $\alpha 2$ -GABA_A subunit is responsible for the anxiolytic properties [47]. In this context, we will intend continue to investigate the precise nature of the isopulegol-GABA_A receptor interaction as an avenue of future research.

On the other hand, our results in the present work showed that flumazenil was not able to reverse the increased latency for mortality and consequent death protection percent induced by diazepam and isopulegol. These results agree with those reported by Nassiri-Asl et al. [15]. The authors found that the mortality protection offered by diazepam was poorly reversed by flumazenil pretreatment, suggesting that other mechanisms may be involved specifically in bioprotective action from both diazepam and isopulegol.

A growing body of evidence has suggested that ROS generation may underlie the convulsant and neurotoxic effects of PTZ [29,48]. Several plant derived products that exhibit direct antioxidant activity are also being shown to have anticonvulsant activity [49]. Recently, our group detected antioxidant properties from isopulegol in ethanol-induced gastric ulcer model in mice [30]. In the light of these data, in the present study, we also investigated whether the isopulegol antioxidant actions would be involved in its anticonvulsant effect in PTZ model. For that, the activity of antioxidant enzyme catalase, as well as the levels of GSH and lipid peroxidation were measured in brain hippocampus of mice.

PTZ has been found to trigger the activation of membrane phospholipases, proteases and nucleases, which cause degradation of membrane phospholipids, proteolysis of cytoskeleton proteins, and protein phosphorylation [29,48]. In fact, in accordance to these studies, the present work showed that acute PTZ-induced seizures lead to an increase in lipid peroxidation in hippocampus of mice. Pretreatment of animals with both doses of isopulegol significantly prevented PTZ-induced elevations in lipid peroxidation. It is also known that convulsions followed by an increase in lipid peroxidation in brain tissue might be diminished by substances with antioxidant properties [28]. Thus, our results suggest that, at least in part, the isopulegol anticonvulsant and bioprotective activities are probably also related to its antioxidant effects against PTZ-induced lipid peroxidation in hippocampus of mice.

Reactive oxygen species, such as superoxide, hydroxyl radical, and hydrogen peroxide (H₂O₂), are normally produced in the brain. The conversion of H₂O₂ to H₂O can be made by catalase and glutathione peroxidase (that involves the reduced glutathione, a cofactor of this enzyme). When produced in excess, ROS can also cause enzyme inactivation [50]. In fact, the current study showed that catalase activity in the PTZ group was significantly lower than in the control group, demonstrating an alteration in antioxidative brain defenses after stressor agent administration. Isopulegol pretreatment preserved catalase activity in normal levels. These findings suggest that isopulegol could help the brain cells to counteract the PTZ-induced ROS overproduction and the oxidative damage.

GSH is an essential tripeptide and endogenous antioxidant found in all animal cells. It reacts with the free radicals and can protect from singlet oxygen, hydroxide radicals, and superoxide radical damage [28]. Our results showed that the treatment of the mice with PTZ resulted in decreased levels of GSH in hippocampus. Interestingly, isopulegol not only prevented the loss of PTZ-induced GSH, but also promoted increased levels in groups without stress, suggesting that isopulegol could be possibly inducing an increase in GSH levels in hippocampus of mice. In a similar way, in previous studies conducted by our group [30], we found that isopulegol in itself was able to induce an increased GSH level also in hepatic and gastric tissues. Nevertheless, whether isopulegol increases GSH levels preventing depletion or inducing its synthesis requires further investigation.

Thus, our results are in agreement with previous studies that indicate increased oxidative stress during epileptic seizures [29], but they contrast with assays that show increased oxidative stress and decreased antioxidant defense during anticonvulsant therapy [51,52].

In a previous study conducted by our group (Silva et al. [21]), we have reported pharmacological activity from isopulegol at doses of 25 (16.20 mM/kg) and 50 mg/kg (32.41 mM/kg). In the present study, higher doses of isopulegol were needed for effective anticonvulsant and bioprotective effects against PTZ-induced convulsions. The acute oral toxicity of isopulegol was already evaluated in rats [53]. The results obtained and the LD₅₀ ($\sim 1030 \pm 100$ mg/kg) value represent a relative low toxicity from isopulegol, which was particularly related to their possible central nervous system depressor properties. Despite the knowledge that monoterpenes are often considered to have low toxicity [5,54], we assume that additional studies are recommended to further ascertain the safety of isopulegol use.

In summary, the results of the present study demonstrate that isopulegol presents anticonvulsant and bioprotective effects against PTZ-induced convulsions. Such actions are possibly related to positive modulation of GABA_A receptors and to antioxidant properties. These findings indicate that isopulegol could be a new useful natural neuroprotection and anticonvulsant tool. However, further studies are required in order to evaluate the exact mechanism involved in such action, as well as to better investigate the safety profile from isopulegol use.

Acknowledgments

This work was supported by the CNPq and CAPES.

References

- [1] Sousa FCF, Melo CT, Monteiro AP, Lima VT, Gutierrez SJ, Pereira BA, Barbosa-Filho JM, Vasconcelos SM, Fonteles MF, Viana GS. Antianxiety and antidepressant effects of riparin III from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2004;78(1):27–33.
- [2] Sousa FCF, Monteiro AP, Melo CT, Oliveira GR, Vasconcelos SMM, França Fonteles MM, Gutierrez SMM, Barbosa-Filho JM, Viana GSB. Antianxiety effects of riparin I from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. *Phytother Res* 2005;19(12):1005–8.

- [3] Sousa DP, Gonçalves JCR, Quintans-Júnior L, Cruz JS, Araújo DAM, Almeida RN. Study of anticonvulsant effect of citronellol, a monoterpene alcohol, in rodents. *Neurosci Lett* 2006;401:231-5.
- [4] Amaral JF, Silva MIG, Aquino Neto MR, Teixeira Neto PF, Moura BA, Melo CTM, Araújo FLO, Sousa DP, Vasconcelos PF, Vasconcelos SMM, Sousa FCF. Antinociceptive effect of the monoterpene R-(+)-limonene in mice. *Biol Pharm Bull* 2007;30(7):1217-20.
- [5] De Sousa DP, Quintans JL, Almeida RN. Evaluation of the anticonvulsant activity of alfa-terpineol. *Pharm Biol* 2007;45:69-70.
- [6] Lis-Balchin M, Hart S. Studies on the mode of action of the essential oil of lavender (*Lavandula angustifolia* P. Miller). *Phytother Res* 1999;13:540-2.
- [7] Granger RE, Campbell EL, Johnston GAR. (+)- and (-)-borneol: efficacious positive modulators of GABA action at human recombinant $\alpha\beta\gamma_2$ GABA(A) receptors. *Biochem Pharmacol* 2005;69:1101-11.
- [8] Buchbauer G, Jäger W, Jirovetz L, Meyer F, Dietrich H. Effects of valerian root oil, borneol, isoborneol, bornyl acetate and isobornyl acetate on the motility of laboratory animals (mice) after inhalation. *Pharmazie* 1992;47(8):620-2.
- [9] Santos FA, Rao VSN. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1, 8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. *Phytother Res* 2000;14:240-4.
- [10] Gherardini C, Galeotti N, Mazzanti G. Local anaesthetic activity of monoterpenes and phenylpropanes of essential oils. *Planta Med* 2001;67:564-6.
- [11] Serra S, Brenna E, Fuganti C, Maggioni F. Lipase-catalyzed resolution of p-menthan-3-ols monoterpenes: preparation of the enantiomer-enriched forms of menthol, isopulegol, trans- and cis-piperitol, and cis-isopiperitenol. *Tetrahedron: Asymmetry* 2004;14:3313-9.
- [12] Rao BRR, Kaul PN, Syamasundar KY, Ramesh S. Comparative composition of decanted and recovered essential oils of *Eucalyptus citriodora* Hook. *Flavor Frag J* 2003;18:133-5.
- [13] Paik SY, Kok KH, Beak SM, Paek SH, Kim JA. The essential oils from *Zanthoxylum schinifolium* Pericarp induce apoptosis of HepG2 human hepatoma cells through increased production of reactive oxygen species. *Biol Pharm Bull* 2005;28(5):802-7.
- [14] Chuah GK, Liu SH, Jaenicke S, Harrison LJ. Cyclisation of citronellal to isopulegol catalysed by hydrous zirconia and other solid acids. *J Catalysis* 2001;200:352-9.
- [15] Nassiri-Asl M, Shariati-Rad S, Zamansoltani F. Anticonvulsant effects of aerial parts of *Passiflora incarnata* extract in mice: involvement of benzodiazepine and opioid receptors. *BMC Compl Alternative Med* 2007;7:26.
- [16] Samren EB, Van Duijn CM, Koch S, Hiilesma VK, Klepel H, Bardy AH, Mannagetta GB, Deichl AW, Gaily E, Granstrom ML, Meinardi H, Grobbee DE, Hofman A, Janz D, Lindhout D. Maternal use of antiepileptic drugs and the risk of major congenital malformations: a joint European prospective study of human teratogenesis associated with maternal epilepsy. *Epilepsia* 1997;38(9):981-90.
- [17] De Almeida RN, De Sousa DP, Nóbrega FFF, Claudino FS, Araújo DAM, Leite JR, Matte R. Anticonvulsant effect of a natural compound α , β -epoxy-carvone and its action on the nerve excitability. *Neurosci Lett* 2008;443:51-5.
- [18] Patsoukis N, Zervoudakis G, Panagopoulos NT, Georgou CD, Angelatou F, Matsokis NA. Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. *Neurosci Lett* 2004;357:83-6.
- [19] Oliveira MC, Fúria AF, Royes LFF, Figueira MR, Myskiw JC, Fiorenza NG, Mello CF. Ascorbate modulates pentylenetetrazol-induced convulsions biphasically. *Neuroscience* 2004;128:721-8.
- [20] Swiader MJ, Porębiak J, Swiader K, Wielosz M, Czuczwar SJ. Influence of cimetidine on the anticonvulsant activity of conventional antiepileptic drugs against pentylenetetrazole-induced seizures in mice. *Pharmacol Rep* 2006;58:131-4.
- [21] Silva MIG, Aquino Neto MR, Teixeira Neto PF, Moura BA, Amaral JF, De Sousa DP, Vasconcelos SMM, Sousa FCF. Central nervous system activity of acute administration of isopulegol in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2007;88(2):141-7.
- [22] Johnston GAR, Chebib M, Duke RK, Fernandez SP, Hanrahan JR, Hinton T, Mewett KN. Herbal Products and GABA Receptors. *Encycl Neurosci* 2009;4:1095-101.
- [23] Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson AN, Langer SZ. Subtypes of γ -aminobutyric acid A receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev* 1998;50:291-313.
- [24] Chebib M, Johnston GAR. GABA-activated ligand gated ion channels: medicinal chemistry and molecular biology. *J Med Chem* 2000;43:1427-47.
- [25] Johnston GAR, Hanrahan JR, Chebib M, Duke RK, Mewett KN. Modulation of ionotropic GABA receptors by natural products of plant origin. *Adv Pharmacol* 2006;54:285-316.
- [26] Watt EE, Betts BA, Kotey FO, Humbert DJ, Griffith TN, Kelly EW, Venesky KC, Gill N, Rowan KC, Jenkins A, Hall AC. Menthol shares general anesthetic activity and sites of action on the GABAA receptor with the intravenous agent, propofol. *Eur J Pharmacol* 2008;590:120-6.
- [27] De Sousa DP, Raphael E, Brocksom U, Brocksom TJ. Sedative effect of monoterpene alcohols in mice, a preliminary screening. *Z Naturforsch [C]* 2007;62(7-8):563-6.
- [28] Oliveira AA, Almeida JPC, Freitas RM, Nascimento VS, Aguiar LMV, Júnior HVN, Fonseca FN, Viana GSB, Sousa FCF, Fonteles MMF. Effects of levetiracetam in lipid peroxidation level, nitrite-nitrate formation and antioxidant enzymatic activity in mice brain after pilocarpine-induced seizures. *Cell Mol Neurobiol* 2006;27(3):395-406.
- [29] Obay BD, Ezel Tas D, Tümer C, Bilgin HM, Atmaca M. Dose dependent effects of ghrelin on pentylenetetrazole induced oxidative stress in a rat seizure model. *Peptides* 2008;29:448-55.
- [30] M.I.G. Silva, B.A. Moura, M.R. Aquino Neto, A.R. Tomé, N.F.M. Rocha, A.M.R. Carvalho, D.S. Macedo, S.M.M. Vasconcelos, D.P. de Sousa, G.S.B. Viana, F.C.F. Sousa. Gastroprotective activity of isopulegol on experimentally induced gastric lesions in mice: investigation of possible mechanisms of action. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* doi:10.1007/s00210-009-0429-5.
- [31] Hosseinzadeh H, Parvardeh S, Nassiri-Asl M, Mansouri MT. Intracerebroventricular administration of thymoquinone, the major constituent of *Nigella sativa* seeds, suppress epileptic seizures in rats. *Med Sci Monit* 2005;11(4):106-10.
- [32] Nassiri-Asl M, Zamansoltani F, Shariati-Rad S. Possible role of GABAA-benzodiazepine receptor in anticonvulsant effects of Pasipay in rats. *JCIM* 2008;6(11):1170-3.
- [33] Lowry H, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurements with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
- [34] Huong NT, Matsumoto K, Kasai R, Yamasaki K, Watanabe H. In vitro antioxidant activity of Vietnamese ginseng saponin and its components. *Biol Pharm Bull* 1998;21:978-81.
- [35] Maehly AC, Chance B. The assay catalases and peroxidases. *Methods Biochem Anal* 1954;1:357-9.
- [36] Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissues with Ellman reagents. *Anal Biochem* 1998;25:192-205.
- [37] Anca JM, Lamela M, Calleja JM. Activity on the central nervous system of *Himantalia elongata*. *Planta Med* 1993;59:218-20.
- [38] Galati EM, Miceli N, Galluzzo M, Taviano MF, Tzakou O. Neuropharmacological effects of epinepatalactone from *Nepeta sibthorpii*. Behavioral and anticonvulsant activity. *Pharm Biol* 2004;42(6):391-5.
- [39] Groves JO, Guscott MR, Hallett DJ, Rosahl TW, Pike A, Davies A, Wafford KA, Reynolds DS. The role of GABAA b2 subunit-containing receptors in mediating the anticonvulsant and sedative effects of loreclezole. *Eur J Neurosci* 2006;24:167-74.
- [40] Fradley RL, Guscott MR, Bull S, Hallett DJ, Goodacre SC, Wafford KA, Garrett EM, Newman RJ, O'Meara GF, Whiting PJ, Rosahl TW, Dawson GR, Reynolds DS, Atack JR. Differential contribution of GABAA receptor subtypes to the anticonvulsant efficacy of benzodiazepine site ligands. *J Psychopharm* 2007;21(4):384-91.
- [41] Crestani F, Assandri R, Tauber M, Martin JR, Rudolph U. Contribution of the α -1-GABAA receptor subtype to the pharmacological actions of benzodiazepine site inverse agonists. *Neuropharmacology* 1993;43:679-84.
- [42] Priestley CM, Williamson EM, Wafford K, Sattelle DB. Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human GABAA receptors and a homooligomeric GABA receptor from *Drosophila melanogaster*. *Br J Pharmacol* 2003;140:1363-72.
- [43] Johnston GA. GABA(A) receptor channel pharmacology. *Curr Pharm Des* 2005;11(15):1867-85.
- [44] Hall AC, Turcotte CM, Betts BA, Yeunga WY, Agyemana AS, Burkb LA. Modulation of human GABAA and glycine receptor currents by menthol and related monoterpenoids. *Eur J Pharmacol* 2004;506:9-16.
- [45] Umezu T, Sakata A, Ito H. Ambulation-promoting effect of peppermint oil and identification of its active constituents. *Pharmacol Biochem Behav* 2001;69:383-90.
- [46] Galeotti N, Mannelli LDC, Mazzanti G, Bartolini A, Gherardini C. Menthol: a natural analgesic compound. *Neurosci Lett* 2002;322:145-8.
- [47] McKernan RM, Rosahl TW, Reynolds DS, Sur C, Wafford KA, Atack JR, Farrar S, Myers J, Cook G, Ferris P, Garrett L, Bristow L. Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABAA receptor α (1) subtype. *Nat Neurosci* 2000;3:587-92.
- [48] Akbasa SH, Yeginb A, Ozbenc T. Effect of pentylenetetrazol-induced epileptic seizure on the antioxidant enzyme activities, glutathione and lipid peroxidation levels in rat erythrocytes and liver tissues. *Clin Biochem* 2005;38:1009-14.
- [49] Hsieh CL, Tang NY, Chiang SY, Hsieh CT, Lin JG. Anticonvulsive and free radical scavenging actions of two herbs, *Uncaria rhynchophylla* (MIQ) Jack and *Gastrodia elata* BL, in kainic acid-treated rats. *Life Sci* 1999;65:2071-82.

ARTICLE IN PRESS

8

M.I.G. Silva et al. / Fitoterapia xxx (2009) xxx–xxx

- [50] Sharma AB, Sun J, Howard LL, Williams Jr AG, Mallet RT. Oxidative stress reversibly inactivates myocardial enzymes during cardiac arrest. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;292(1):198–206.
- [51] Bhattacharya SK, Ghosh P, Bose R. Pentylentetrazol induced clonic convulsions in rat. Role of brain monoamines. *Mater Med Pol* 1978;10(3):184–7.
- [52] Ono H, Sakamoto A, Sakura N. Plasma total glutathione concentration in epileptic patients taking anticonvulsants. *Clin Chim Acta* 2000;298:135–43.
- [53] Bhatia SP, McGinty D, Letizia CS, Api AM. Fragrance material review on isopulegol. *Food Chem Toxicol* 2008;46:185–9.
- [54] Sun J. *D*-limonene: safety and clinical applications. *Altern Med Rev* 2007;12(3):259–63.