



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

MARIANA LIMA FERNANDES

**INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA E POSSÍVEIS MECANISMOS
DE AÇÃO CENTRAL DO TIMOL EM CAMUNDONGOS: ESTUDOS
NEUROQUÍMICOS E PARTICIPAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO**

FORTALEZA

2017

MARIANA LIMA FERNANDES

**INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA E POSSÍVEIS MECANISMOS
DE AÇÃO CENTRAL DO TIMOL EM CAMUNDONGOS: ESTUDOS
NEUROQUÍMICOS E PARTICIPAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO**

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Farmacologia. Área de concentração: Ciências Biológicas II.

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

FORTALEZA

2017

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

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

- F41i Fernandes, Mariana Lima.
INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA E DOS POSSÍVEIS MECANISMOS DE
AÇÃO CENTRAL DO TIMOL EM CAMUNDONGOS: ESTUDOS NEUROQUÍMICOS E
PARTICIPAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO / Mariana Lima Fernandes. – 2017.
146 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2017.

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

1. Depressão. 2. Timol. 3. Toxicidade. 4. Monoaminas biogênicas. 5. Antioxidantes. I.
Título.

CDD 615.1

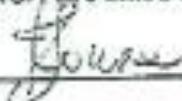
MARIANA LIMA FERNANDES

INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA E DOS POSSÍVEIS
MECANISMOS DE AÇÃO CENTRAL DO TIMOL EM CAMUNDONGOS: ESTUDOS
NEUROQUÍMICOS E PARTICIPAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

Tese apresentada à Coordenação do
Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial à obtenção
do grau de Doutor em Farmacologia. Área
de concentração: Ciências Biológicas II.

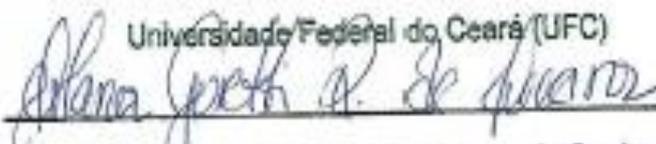
Aprovada em: 29/11/2024

BANCA EXAMINADORA



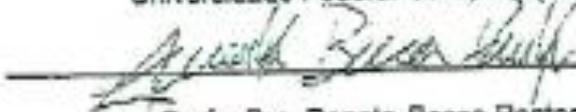
Prof. Dra. Francisca Clés Florenço de Sousa (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)



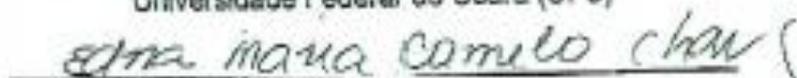
Profa. Dra. Maria Goretti Rodrigues de Queiroz

Universidade Federal do Ceará (UFC)



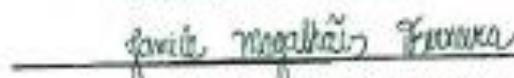
Profa. Dra. Renata Bessa Pontes

Universidade Federal do Ceará (UFC)



Profa. Dra. Edna Maria Camelo Chaves

Universidade Estadual do Ceará (UECE)



Profa. Dra. Jamile Magalhães Ferreira

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira

(UNILAB)

A minha mãe Francy

Pelo incentivo e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por ter me sustentado e me dado a força necessária para seguir em frente nos momentos difíceis.

À minha amada **família, minha mãe Franczy, minha sogra Vânia, meu esposo Armênio, meus filhos Eduardo e Iana e minha cunhada Karina**, pelo incentivo e apoio incondicional.

À minha orientadora, Profa. **Dra. Cléa** que me recebeu e me ajudou em todos os momentos, com muito carinho e extrema doçura, sempre sorridente, até mesmo nos momentos mais tensos, me proporcionando paz interior e confiança.

As minhas queridas amigas da pós-graduação para a vida: **Cacá, Charliane, Helvira e Luciana**. Me apoiaram em todos os momentos, fazendo toda a diferença, sem elas nada disso teria sido possível.

Aos demais amigos (as) da família LNF: **Alyne, Auriana, Daniel, Emiliano, Edith, Iardja, Íris, Joaquim, Leonardo, Mariana Albuquerque, Mariana Feitosa Marília, Nayrton, Natália, Priscila, Raquel, Roberta, Tiago e Vitor** que sempre estavam disponíveis colaborando nos experimentos, esclarecendo dúvidas e ajudando em tudo que fosse preciso.

Aos técnicos do Laboratório de Neurofarmacologia **Arnaldo, Lena, Vilani e Luciana** pela valiosa contribuição nos experimentos.

Às **secretárias, coordenação e a todos os professores** do programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFC pelos conhecimentos transmitidos e pela disponibilidade para ajudar sempre no que fosse preciso.

Aos **colaboradores do Biotério e a todos os funcionários** do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC e do NPDM que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

Aos meus queridos amigos (as) que me apoiaram e me incentivaram: **Adília, Aline, Carlos Henrique, Jaqueline, Karoline, Luís, Romina e Saulo**.

As **Profas. Dras. Alyne Mara, Edna, Jamile, Renata, Maria do Carmo e Maria Goretti** por terem gentilmente aceitado participar da minha banca examinadora.

Muito obrigada a todos que contribuíram nesta trajetória.

“Quanto maior a glória, mais se curve para agradecer a Deus”.

São Domingos de Gusmão

RESUMO

A depressão é a principal causa de problemas de saúde e incapacidade em todo o mundo, sendo caracterizada como doença não-transmissível. De acordo com as últimas estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 300 milhões de pessoas vivem com depressão. Nas Américas, o número de pessoas afetadas é de cerca de 50 milhões, destes estima-se que são 11 milhões de brasileiros com esse transtorno mental, no qual o indivíduo apresenta uma tristeza permanente, perda de interesse pelas atividades prazerosas por semanas ou mais. A depressão também pode provocar sentimentos de culpa, falta de autoestima, transtornos do sono e do apetite, sensação de cansaço e falta de concentração, nos casos mais graves pode levar ao suicídio. Em vista disto, muitos estudos tem sido desenvolvidos em busca de tratamentos alternativos ou complementares aos já existentes, entre eles os estudos com plantas medicinais. O Timol (2-isopropil-5-metil-fenol) é um monoterpeno extraído do óleo essencial de diversas plantas aromáticas como o alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*). Através de estudos experimentais prévios, o timol apresentou efeito antidepressivo no teste do nado forçado e da suspensão da cauda ao ser administrado por via oral, em camundongos machos, em doses únicas de 25mg/Kg e 50 mg/Kg. Em vista disto este estudo objetivou investigar os possíveis mecanismos de ação central do timol em camundongos com testes neuroquímicos e a participação do estresse oxidativo. Os resultados mostraram que na avaliação da toxicidade aguda o timol foi classificado por categoria 5 com baixo risco de toxicidade, não apresentou alterações histológicas na análise dos órgãos e na avaliação da toxicidade com doses repetidas não foram encontradas alterações significativas com relação aos parâmetros bioquímicos e hematológicos. No teste do nado forçado, o efeito sobre o tempo de imobilidade reduzido pelo timol foi revertido pelo pré-tratamento dos animais com antagonistas dos receptores serotoninérgicos como a Ritanserina e o Ondansetron, já este efeito não foi evidenciado na presença do NAN-190, um antagonista do receptor 5HT1A. Foi evidenciado um aumento nos níveis das monoaminas através do HPLC, noradrenalina, dopamina, e principalmente da serotonina e reduziu os seus respectivos metabólitos. Não alterou a quantidade de SOD, reduziu a atividade da catalase no corpo estriado, reduziu os níveis de MDA e Nitrito e aumentou os níveis de GSH nas áreas cerebrais estudadas e aumentou os níveis de BDNF no hipocampo. Estes resultados sugerem que o timol oferece baixos riscos de toxicidade, apresenta efeitos antidepressivos provavelmente relacionados aos sistemas: noradrenérgico, dopaminérgico e serotoninérgico sugerindo a participação dos receptores 5HT2A/2C e 5HT3, apresenta propriedades antioxidantes e um possível efeito neuroprotetor.

Palavras-chave: Depressão. Timol. Toxicidade. Monoaminas biogênicas. Antioxidantes.

**INVESTIGATION OF PRE-CLINICAL TOXICITY AND POSSIBLE MECHANISMS CENTRAL
ACTION OF THYMOL IN MICE: NEUROCHEMICAL STUDIES AND OXIDATIVE STRESS
PARTICIPATION**

ABSTRACT

Depression is the leading cause of health and disability problems throughout the world and is characterized as a non-communicable disease. According to the latest estimates by the World Health Organization (WHO), more than 300 million people live with depression. In the Americas, the number of people affected is about 50 millions of these are estimated to be 11 million Brazilians with this mental disorder, in which the individual presents a permanent sadness, loss of interest for pleasurable activities for weeks or more. Depression can also cause feelings of guilt, lack of self-esteem, sleep and appetite disorders, feeling tired and lack of concentration, in more severe cases can lead to suicide. In view of this, many studies have been developed in search of alternative or complementary treatments to the already existing ones, among them the studies with medicinal plants. Thymol (2-isopropyl-5-methyl-phenol) is a monoterpene extracted from the essential oil of various aromatic plants such as rosemary (*Lippia sidoides*). Through previous experimental studies, thymol showed an antidepressant effect in the forced swimming test and tail suspension when administered orally in male mice in single doses of 25 mg / kg and 50 mg / kg. In view of this, this study aimed to investigate the possible mechanisms of central thymol action in mice with neurochemical tests and the participation of oxidative stress. The results showed that in the evaluation of acute toxicity, thymol was classified as category 5 with low toxicity risk, did not present histological changes in organ analysis and in the evaluation of toxicity with repeated doses no significant alterations were found regarding the biochemical and hematological parameters. In the forced swim test, the effect on thymol-reduced immobility time was reversed by pre-treatment of animals with serotonergic receptor antagonists such as ritonavir and Ondansetron, since this effect was not evidenced in the presence of NAN-190, a 5HT_{1A} receptor antagonist. An increase in monoamine levels was evidenced by HPLC, noradrenaline, dopamine, and especially serotonin and reduced their respective metabolites. It did not alter the amount of SOD, reduced catalase activity in the striatum, reduced MDA and nitrite levels and increased GSH levels in the brain areas studied and increased BDNF levels in the hippocampus. These results suggest that thymol offers low risks of toxicity, has antidepressant effects probably related to the systems: noradrenergic, dopaminergic and serotonergic suggesting the participation of the receptors 5HT_{2A} / 2C and 5HT₃, presents antioxidant properties and a possible neuroprotective effect.

Keywords: Depression. Thymol. Toxicity. Biogenic monoamines. Antioxidants.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Setembro amarelo	21
Figura 2 -	Vias dopaminérgicas no encéfalo	24
Figura 3 -	Neurotransmissão dopaminérgica	25
Figura 4 -	Neurotransmissão noradrenérgica	26
Figura 5 -	Neurotransmissão serotoninérgica	27
Figura 6 -	Estresse oxidativo e o dano celular	31
Figura 7 -	Alteração na expressão de BDNF	36
Figura 8 -	Estrutura química do Timol e Carvacrol	46
Figura 9 -	Protocolo OECD 423/2001	56
Figura 10	Análise histológica dos seguintes órgãos respectivamente: cérebro, fígado e rim. Captados no 14 ^o . dia após o término da avaliação da toxicidade aguda.	69
Gráfico 1-	Média do ganho de peso dos animais no teste de toxicidade oral por 28 dias	71
Figura 11	Efeito do timol (50 mg/kg) e fluoxetina (35mg/kg) sozinho ou associado com NAN-190 (0,5 mg/kg) sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos.	75
Figura 12	Efeito do timol (50 mg/kg) e fluoxetina (35mg/kg) sozinho ou associado com Ritanserina (4 mg/kg) sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos.	77
Figura 13	Efeito do timol (50 mg/kg) e fluoxetina (35mg/kg) sozinho ou associado com Ondansetron (0,1 mg/kg) sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos.	79
Figura 14	Determinação dos níveis de Noradrenalina (NA) em corpo estriado de camundongos tratados com timol (25 e 50 mg/kg) ou veículo (controle).	81
Figura 15	Determinação dos níveis de Dopamina (DA) em corpo estriado de camundongos tratados com timol (25 e 50 mg/kg) ou veículo (controle).	83
Figura 16	Determinação dos níveis de Serotonina (5HT) em corpo estriado de camundongos tratados com timol (25 e 50 mg/kg) ou veículo (controle).	85

Figura 17	Determinação dos níveis do metabólito (DOPAC) em corpo estriado de camundongos tratados com timol (25 e 50 mg/kg) ou veículo (controle).	87
Figura 18	Determinação dos níveis de HVA em corpo estriado de camundongos tratados com timol (25 e 50 mg/kg) ou veículo (controle).	89
Figura 19	Determinação dos níveis de 5HIAA em corpo estriado de camundongos tratados com timol (25 e 50 mg/kg) ou veículo (controle).	91
Figura 20	Efeito do timol na quantidade de SOD no córtex pré-frontal (CPF) de animais submetidos ao teste do nado forçado.	93
Figura 21	Efeito do timol na quantidade de SOD no corpo estriado (CE) de animais submetidos ao teste do nado forçado.	94
Figura 22	Efeito do timol na quantidade de SOD no Hipocampo (HIP) de animais submetidos ao teste do nado forçado.	95
Figura 23	Efeito do timol na sobre a atividade da catalase no Córtex pré frontal (CPF) de animais submetidos ao teste do nado forçado.	97
Figura 24	Efeito do timol na sobre a atividade da catalase no Corpo estriado (CE) de animais submetidos ao teste do nado forçado.	98
Figura 25	Efeito do timol na sobre a atividade da catalase no Hipocampo (HIP) de animais submetidos ao teste do nado forçado.	99
Figura 26	Efeito do timol nos níveis de Malonildialdeído (MDA) do córtex pré-frontal (CPF) de animais submetidos ao estresse oxidativo através do teste do nado forçado.	101
Figura 27	Efeito do timol nos níveis de Malonildialdeído (MDA) do corpo estriado (CE) de animais submetidos ao estresse oxidativo através do teste do nado forçado.	102
Figura 28	Efeito do timol nos níveis de Malonildialdeído (MDA) no hipocampo (HIP) de animais submetidos ao estresse oxidativo através do teste do nado forçado.	103
Figura 29	Efeito do timol nos níveis de GSH em córtex pré-frontal (CPF) de animais submetidos ao estresse oxidativo através do teste do nado forçado.	105
Figura 30	Efeito do timol nos níveis de GSH em corpo estriado (CE) de animais submetidos ao estresse oxidativo através do teste do nado forçado.	106

Figura 31	Efeito do timol nos níveis de GSH no Hipocampo (HIP) de animais submetidos ao estresse oxidativo através do teste do nado forçado.	107
Figura 32	Efeito do timol nos níveis de Nitrito/Nitrato em córtex pré-frontal (CPF) de animais submetidos ao estresse oxidativo através do teste do nado forçado.	109
Figura 33	Efeito do timol nos níveis de Nitrito/Nitrato em corpo estriado (CE) de animais submetidos ao estresse oxidativo através do teste do nado forçado.	110
Figura 34	Efeito do timol nos níveis de Nitrito/Nitrato em Hipocampo (HIP) de animais submetidos ao estresse oxidativo através do teste do nado forçado.	111
Figura 35	Efeito do Timol e da Imipramina sobre o tempo de imobilidade de camundongos submetidos ao teste do nado forçado.	113
Figura 36	Efeito do Timol e da Imipramina sobre os níveis de BDNF no hipocampo (HIP) de camundongos submetidos ao teste do nado forçado.	114

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Principais drogas e reagentes utilizados no estudo	52
Quadro 2	Equipamentos	53
Quadro 3	Teste do nado forçado em camundongos	59
Quadro 4	Avaliação do envolvimento do sistema serotoninérgico	60
Quadro 5	Esquema da análise das monoaminas e seus metabólitos em corpo estriado dos animais submetidos ao teste do nado forçado.	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Pesos e observações quanto ao aparecimento dos sinais de toxicidade.	68
Tabela 2	Eritrograma, plaquetometria e leucograma dos camundongos no teste de toxicidade oral por 28 dias.	72
Tabela 3	Níveis plasmáticos de uréia, creatinina, AST e ALT dos camundongos após o tratamento diário consecutivo por 28 dias com Timol ou Controle (Veículo).	73
Tabela 4	Grupos, indução do estresse através do teste do nado forçado TNF, e análise dos níveis de BDNF.	115

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALT	Talanina aminotransferase
AST	aspartato aminotransferase
AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclico
α	Alfa
ANOVA	Análise de Variância
ALE	Atividade Locomotora Espontânea
β	Beta
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
COMT	Catecol-O-Metil-Transferase
cont.	Controle
CRF	Hormônio corticotrófico
DL50	Dose letal que mata 50% dos animais
DTNB	Solução de ácido 5:5 ditiobis-2-nitrobenzoato
EDTA	Solução de ácido etilenodiaminotetracético
EPM	Erro Padrão da Média
ERNS	Espécies reativas de nitrogênio
EROS	Espécies reativas de oxigênio
Et al.	E colaboradores
FLU	Fluoxetina
GABA	Ácido Gama Amino Butírico
GSH	Glutathiona reduzida
GSH-Px	Glutathiona peroxidase
GSSG	Glutathiona oxidada
g/Kg	Gramas/ Quilograma
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HClO ₄	Ácido perclórico
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HHA	Hipotálamo-hipófise-adrenal
HOCL	Ácido hipocloroso
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance

IMI	Imipramina
IP3	Trifosfato de inositol
i.p.	Intraperitoneal
μM	Micromolar
μg	Micrograma
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mg/Kg	Miligrama/Quilograma
mg/mL	Miligrama/Mililitro
mL/Kg	Mililitro/Quilograma
MS	Ministério da Saúde
MAO	Monoamino oxidase
MDA	Malonildialdeído
NO	Óxido nítrico
NTs	Neurotrofinas
$\text{O}_2\cdot^-$	Superóxido
$\text{OH}\cdot$	Radical hidroxila
OND	Ondasetron
$\text{ONOO}\cdot$	Peroxinitrito
RCS	Espécies reativas de cloro
RIT	Ritanserina
ROO	Radical peróxido
rpm	Rotação por minuto
5- HT	Serotonina
SCH23390	(Antagonista D1 dopaminérgico)
SNC	Sistema Nervoso Central
TBA	Solução de ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas tiobarbitúricas
TH	Tirosina Hidroxilase
TCA	Ácido tricloroacético
TNF	Teste do nado forçado
VCM	Volume corpuscular médio
v.o.	Via Oral
vs	Versus

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Aspectos gerais sobre a depressão	18
1.2	Fisiopatologia da depressão	22
1.3	A Depressão e o Estresse Oxidativo.	30
1.4	Depressão e o envolvimento do eixo (HHA)	33
1.5	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF)	35
1.6	Abordagens terapêuticas na depressão	36
1.7	Modelos Animais e a depressão	39
1.8	Plantas Medicinais e a depressão	40
1.8.1	Timol	43
1.8.2	Timol e suas ações no Sistema Nervoso Central	47
2	RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	49
3	OBJETIVOS	51
3.1	Geral	51
3.2	Específicos	51
4	MATERIAIS E MÉTODOS	52
4.1	Óleo Essencial	52
4.2	Drogas e Reagentes	52
4.3	Equipamentos	53
4.4	Animais	54
4.5	Preparo da drogas e vias de administração	54
4.6	Tratamento dos grupos experimentais	54
4.7	Protocolo Experimental	55
4.7.1	Ensaio de Toxicidade	55
4.7.1.1	Ensaio de Toxicidade Oral Aguda	55
4.7.2	Avaliação da toxicidade oral de doses repetidas por 28 dias	57
4.7.2.1	Procedimentos analíticos	57
4.7.2.2	Análise dos parâmetros hematológicos	57
4.7.2.3	Análise dos parâmetros bioquímicos	
4.8.1	Avaliação da Atividade Antidepressiva	
4.8.1.1	Teste do Nado Forçado	55
4.8.1.2	Avaliação da participação do sistema serotoninérgico	60

4.9	Determinação da Concentração das Monoaminas	61
4.10	Determinação da Atividade dos Sistemas Antioxidantes	63
4.10.1	Método da Determinação da Atividade da (SOD)	63
4.10.2	Método da Determinação da Atividade da Catalase (CAT)	63
4.10.3	Método da Determinação da Concentração da (GSH)	64
4.10.4	Método da Determinação da Peroxidação Lipídica (TBARS)	64
4.10.5	Método da Determinação do Conteúdo de Nitrito	65
4.11	Dosagem de BDNF	65
4.12	Análise Estatística	65
5	RESULTADOS	67
5.1	Ensaio de Toxicidade Aguda	67
5.1.1	Avaliação comportamental	67
5.1.2	Avaliação histológica	69
5.2	Toxicidade oral do Timol no protocolo de doses repetidas por 28 dias	70
5.2.1	Sobrevivência, massa corpórea, avaliação comportamental e análise macroscópica dos órgãos.	70
5.2.2	Análise dos parâmetros hematológicos	72
5.2.3	Análise dos parâmetros bioquímicos	73
5.3	Avaliação do envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito antidepressivo do timol no teste do nado forçado	74
5.3.1	Avaliação do envolvimento do receptor 5 HT1A	74
5.3.2	Avaliação do envolvimento do receptor 5 HT2A/2C.	76
5.3.3	Avaliação do envolvimento do receptor 5 HT3.	78
5.4	Determinação dos níveis de monoaminas em HPLC	80
5.4.1	Determinação dos níveis de Noradrenalina	80
5.4.2	Determinação dos níveis de Dopamina	82
5.4.3	Determinação dos níveis de Serotonina (5HT).	84
5.5	Determinação dos níveis dos metabólitos em HPLC	86
5.5.1	Determinação dos níveis do metabólito DOPAC	86
5.5.2	Determinação dos níveis dos metabólitos HVA.	88
5.5.3	Determinação dos níveis dos metabólitos 5HIAA.	90
5.6	Determinação de parâmetros de estresse oxidativo	92
5.6.1	Efeito do timol sobre a quantidade de SOD em homogenatos cerebrais de animais submetidos ao estresse oxidativo através do teste do nado forçado.	92

5.6.2	Efeito do timol sobre a atividade da catalase em homogenatos cerebrais de animais submetidos ao estresse oxidativo através do teste do nado forçado.	96
5.6.3	Efeito do timol nos níveis de Malonildialdeído MDA em animais submetidos ao estresse oxidativo através do teste do nado forçado.	100
5.6.4	Efeito do timol nos níveis de GSH em animais submetidos ao estresse oxidativo através do teste do nado forçado.	104
5.6.5	Efeito do timol nos níveis de Nitrito/Nitrato em animais submetidos ao estresse oxidativo através do teste do nado forçado.	108
5.7	Efeito da administração de Timol e Imipramina sobre os níveis de BDNF no hipocampo de camundongos submetidos ao teste do nado forçado.	112
6	DISCUSSÃO	116
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	131
8	CONCLUSÃO	132
	REFERÊNCIAS	133
	ANEXO Folha de aprovação do projeto pelo CEPA- UFC	146

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais sobre a depressão

A depressão é a principal causa de problemas de saúde e incapacidade em todo o mundo, sendo caracterizada como doença não-transmissível. De acordo com as últimas estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 300 milhões de pessoas vivem com depressão, um aumento de mais de 18% entre 2005 e 2015. Nas Américas, o número de pessoas afetadas é de cerca de 50 milhões, destes estima-se que são 11 milhões de brasileiros com esse transtorno mental (OPAS/OMS, 2017).

Cada vez mais tem se falado sobre este assunto, pois embora muitas pessoas com mais de 60 anos sofram de depressão, o transtorno mental pode ter início ainda na infância e adolescência. O problema com a depressão durante a adolescência é que muitas vezes ela desencadeia o consumo de álcool e outras drogas, e também a violência, nestes casos o desafio dos profissionais não é estar em buscar entender o alcoolismo e a adicção, mas sim compreender a depressão, que leva ao uso dessas substâncias (OPAS/OMS, 2017).

A relação entre a depressão e o uso de álcool e outras drogas foi o tema da apresentação de Flávia Fernando, psiquiatra e doutoranda em psicologia da Universidade Federal Fluminense (UFF). “Rejeitamos aquele que abusa do álcool, rejeitamos ainda mais os usuários de drogas ilícitas. Existe a produção do estigma, que é uma marca que atravessa nosso modo de ver e de diminuir o outro”, afirmou. Para a médica, é preciso enxergar a verdadeira dimensão do sofrimento daqueles que usam ou abusam de drogas lícitas e ilícitas (ONU BRASIL, 2017).

A relação entre depressão e raça/cor, está sendo abordada por pesquisadores do Instituto Federal do Rio de Janeiro (IFRJ), “Ser negra ou negro no Brasil, em função do racismo, significa ter problemas de saúde mental constantes”, assinalou a pesquisadora Jaqueline de Jesus. A depressão pode ser um dos principais efeitos patogênicos do racismo para a população negra do país, juntamente com distúrbios cardiovasculares, imunodeficiências, diabetes e outras enfermidades. Para Jaqueline, essa realidade mudará apenas quando ações

afirmativas eficazes forem elaboradas para combater o racismo e promover a saúde da população negra de forma equitativa.(ONU BRASIL, 2017).

Sobre a saúde mental em relação à população transexual,Lyah Côrrea, psicóloga e ativista falou “As depressões podem refletir os impactos e dinâmicas sobre o estigma social que as identidades “trans” causam. Falar sobre isso é visibilizar um grupo populacional que histórica e culturalmente não existia. Ou existia, mas na ordem patológica, da marginalidade, da criminalidade. Infelizmente, é assim que as transgeneridades são debatidas”, revelou. Ela também reforçou que o suicídio entre pessoas trans muitas vezes é uma forma de cessar o sofrimento do processo de negação existencial do ponto de vista do outro. “Reivindicamos a despatologização das identidades trans, queremos deixar de ser vistas e vistos como doentes” (ONU BRASIL, 2017).

A prevalência da depressão em comunidades indígenas também foi levantada no debate por Oraide Siqueira, psicóloga do Distrito Sanitário Especial Indígena (DSEI) de Manaus. Na área em que a profissional atende, o transtorno mental atinge pessoas com idade entre 20 e 71 anos, sendo as mulheres as mais acometidas. “O que vai ser da comunidade?”e “O que vai ser do futuro do indígena?” estão entre as principais queixas ouvidas por Oraide. “Muitas comunidades já não conseguem mais passar seus valores culturais. Há também a questão do álcool e outras drogas. Quanto mais próximos das cidades, mais problemas os indígenas acabam tendo” (OPAS/OMS, 2017).

A falta de apoio às pessoas com transtornos mentais, juntamente com o medo do estigma,impedem muitas pessoas de acessarem o tratamento de que necessitam para viver vidas saudáveis e produtivas.Afeta comunidades e sociedades e tem um alto custo social e econômico, neste contexto o aumento de investimentos é necessário. Em muitos países, não há ou há muito pouco apoio disponível para pessoas com transtornos de saúde mental. Mesmo em países de alta renda, quase 50% das pessoas com depressão não recebem tratamento. Em média, apenas 3% dos orçamentos de saúde de governo são investidos em saúde mental, variando de menos de 1% em países de baixa renda a 5% em países de alta renda. Nas Américas, quase sete em cada 10 pessoas com depressão não recebem o tratamento de que necessitam (ONU BRASIL, 2017).

A depressão é um transtorno mental comum, caracterizado por tristeza persistente e uma perda de interesse por atividades prazerosas por semanas ou

mais acompanhadas por uma incapacidade de realizar atividades diárias. Além disso, as pessoas com depressão normalmente apresentam vários dos seguintes sintomas: perda de energia; sensação de cansaço, falta de autoestima, transtornos do sono dormindo mais ou menos do que se está acostumado e do apetite, ansiedade, concentração reduzida, indecisão, inquietação, sentimentos de inutilidade, culpa ou desesperança; e pensamentos de autolesão ou suicídio nos casos mais graves. As mulheres são as mais afetadas pela depressão, essa prevalência pode ser explicada pela falta de diagnóstico na população masculina, pois os homens têm uma resistência maior na busca pelos serviços de saúde (OPAS/OMS, 2017).

No marco do Dia Mundial da Saúde, celebrado em 7 de abril de 2017 a Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS) no Brasil promoveu um amplo debate entre especialistas e convidados sobre depressão. O lema da campanha mundial é “Depressão: vamos conversar”.

Em relação ao Suicídio cuja principal causa é a depressão, a divulgação de uma campanha foi iniciada no Brasil pelo CVV (Centro de Valorização da Vida), CFM (Conselho Federal de Medicina) e ABP (Associação Brasileira de Psiquiatria), o Setembro Amarelo realizou as primeiras atividades em 2015 concentradas em Brasília. Mundialmente, o IASP – Associação Internacional para Prevenção do Suicídio estimula a divulgação da causa, vinculado ao dia 10 de Setembro no qual se comemora o Dia Mundial de Prevenção do Suicídio (OPAS/OMS, 2017).

O Centro de Valorização da Vida CVV, uma das principais mobilizadoras do Setembro Amarelo é uma entidade sem fins lucrativos que atua gratuitamente na prevenção do suicídio desde 1962, membro fundador do Befrienders Worldwide e ativo junto ao IASP – Associação Internacional para Prevenção do Suicídio), da ABPES (Associação Brasileira de Estudos e Prevenção do Suicídio) e de outros órgãos internacionais que atuam pela causa (OPAS/OMS, 2017).

Alguns destaques do Setembro Amarelo nesses anos foram a iluminação de monumentos como Cristo Redentor no Rio de Janeiro/RJ, o Congresso Nacional e a ponte Juscelino Kubitschek em Brasília/DF, o estádio Beira Rio em Porto Alegre/RS, a Catedral e o Paço Municipal de Fortaleza/CE, Ponte Anita Garibaldi em Laguna/SC, e o Palácio Campo das Princesas em Recife/PE. Também foram feitas ações de rua, como caminhadas, passeios ciclísticos, passeios de motos e

abordagens em locais públicos em várias cidade do Brasil (Figura 1) (OPAS/OMS, 2017).



Figura 1: Setembro amarelo. Iluminação dos monumentos históricos na campanha de prevenção ao suicídio em 2017.

Fonte: disponível em <http://www.setembroamarelo.org.br> Acesso em 31/10/2017.

1.2 Fisiopatologia da depressão

Os seres humanos se entristecem ou se alegram com facilidade em decorrência de acontecimentos da vida. A depressão maior se caracteriza pela ocorrência de episódios depressivos, com pelo menos duas semanas de humor deprimido ou perda de interesse na maior parte das atividades, acompanhados de ao menos quatro sintomas adicionais de depressão, que incluem sentimentos de desesperança, desvalia, culpa, desamparo, associados a alterações de apetite e sono, fadiga, retardo ou agitação psicomotora, diminuição do desempenho sexual, dificuldade de concentração e raciocínio e pensamentos recorrentes sobre a morte, com ou sem tentativas de suicídio (GUIMARÃES, 2012).

A depressão maior é uma das formas mais comuns da doença e pode levar à perda da independência funcional. Pessoas idosas com depressão tendem a apresentar maior comprometimento físico, social e funcional, afetando sua qualidade de vida. A idade pode ser um fator de risco para depressão, já que, com o avançar da idade, aumenta-se o risco de desenvolver doenças mentais, comprometendo também a capacidade funcional do indivíduo (STELLA, *et al.*, 2002).

Vários estudos apontam que a maior parte dos idosos que apresentam sintomatologia depressiva. Barrantes-Monge *et al.*, realizaram um estudo com 2.383 idosos e reportaram que a depressão está entre as mais frequentes comorbidades relacionadas com a dependência funcional. Outro estudo, realizado com 310 idosos residentes no nordeste do Brasil, ressalta a íntima dependência entre depressão e capacidade funcional, afirmando ser a limitação funcional um dos potenciais fatores associados ao aparecimento e ao agravamento dos quadros depressivos na população idosa (MACIEL, 2006).

A etiologia da depressão está relacionada a inúmeros fatores que podem abranger aspectos biológicos, socioeconômicos, mudanças ambientais, doença crônica, gravidez e após o parto onde episódios depressivos podem ocorrer após uma situação estressante ou de perda como em uma crise financeira, separação ou morte de um ente querido, após uma situação estressante como um assalto, estupro ou sequestro. E ainda estes fatores podem ser agravados caso haja predisposição genética para o desenvolvimento da doença (MACIEL, *et al.*, 2006; CHEN *et al.*,

2009).

A depressão pode ainda ser desencadeada por algumas doenças físicas como: esclerose múltipla, derrame, hepatite, hipotireoidismo, apneia do sono, hipertensão, insuficiência cardíaca e diabetes, além das doenças terminais como câncer e AIDS. Alguns medicamentos e drogas também levam á depressão como: cortisona, anfetaminas, pílulas anticoncepcionais, quimioterapia, álcool, *crack*, *ecstasy*, maconha entre outros.

Em um estudo realizado com mulheres após a gravidez, demonstrou que a prevalência de depressão pós-parto encontrada foi de 19,1%. Os achados sugerem que baixas condições socioeconômicas de vida da puérpera e a não aceitação da gravidez são elementos-chave no desenvolvimento da depressão pós-parto (MORAES, 2006).

A depressão e a ansiedade segundo vários estudos são mais prevalentes entre as mulheres. Estas são queixas comuns também entre os idosos e muitas vezes apresenta-se como um resultado de uma combinação de fatores, incluindo a debilitação física, restrições de mobilidade, perda da vida social e comprometimento cognitivo (CALDAS, 2006). Em um estudo realizado por Santos *et al.*, 2012 com um grupo de idosos com média de idade de 77,02 anos, a prevalência de sintomas depressivos e prejuízo funcional foi de 30,5% e 63,8%, respectivamente, sendo maior entre as mulheres.

A patogênese da depressão maior está relacionada a teoria bioquímica da hipótese das monoaminas no cérebro. Esta hipótese foi originada a partir de observações clínicas, onde foi observado que a imipramina e a iproniazida, dois compostos não relacionados estruturalmente e que não tinham uso psiquiátrico, tinham potentes efeitos antidepressivos em humanos. Posteriormente, descobriu-se que essas substâncias aumentavam a transmissão central de monoaminas que incluem as catecolaminas (dopamina e noradrenalina) e a 5-hidroxitriptamina (5-HT, serotonina). Outra evidência clínica foi o uso da reserpina, um antigo agente antihipertensivo que atua depletando os estoques de monoaminas e produz sintomas depressivos em humanos (KRISHNAN; NESTLER, 2008; KATSUNG, 2010).

Na depressão a dopamina, a serotonina e outras substâncias químicas como a noradrenalina, ácido gama-aminobutírico e acetilcolina ficam alterados, desorganizando o estado de humor, as emoções, capacidade mental e o bem estar

geral do organismo. Sobre as vias dopaminérgicas sabemos que via mesolímbica-mesocortical é a via mais relacionada ao comportamento e portanto importante na depressão (ZUARDI, 2001; KATZUNG, 2010) (Figura 2).

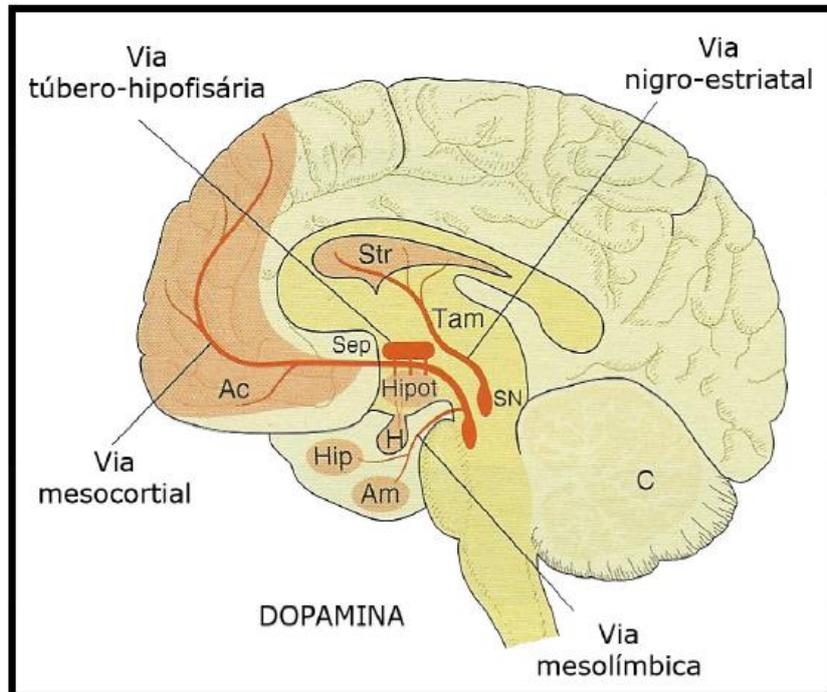


Figura 2. Vias dopaminérgicas no encéfalo.

Fonte: Rang, et al 2012.

A dopamina é uma catecolamina cuja síntese se inicia com a captação ativa do aminoácido L-tirosina. Esse aminoácido é transportado, pela ação da enzima tirosina hidroxilase, primeiro em L-DOPA e posteriormente, pela ação da L-DOPA descarboxilase, em dopamina (DA). A dopamina é armazenada pelas vesículas sinápticas, quando chega o impulso nervoso a DA é liberada por processo de exocitose. Pós-sinápticamente ela pode atuar em receptores das famílias D1 (D1 e D5) ou D2 (D2, D3 ou D4). Existem ainda receptores pré-sinápticos inibitórios, de tipo D2 que estão localizados tanto nos terminais como nos corpos celulares. Todos estes receptores são ligados a proteína G. O principal mecanismo de retirada da DA da fenda sináptica é a recaptação pelo terminal nervoso. Sua degradação intraneuronal ocorre pela enzima monoaminoxidase de tipo B (MAOB), sendo um de seus principais metabólitos o ácido homovalínico (HVA) (GUIMARÃES, 2012; GOLAN *et al.*, 2014; KATZUNG, 2010).

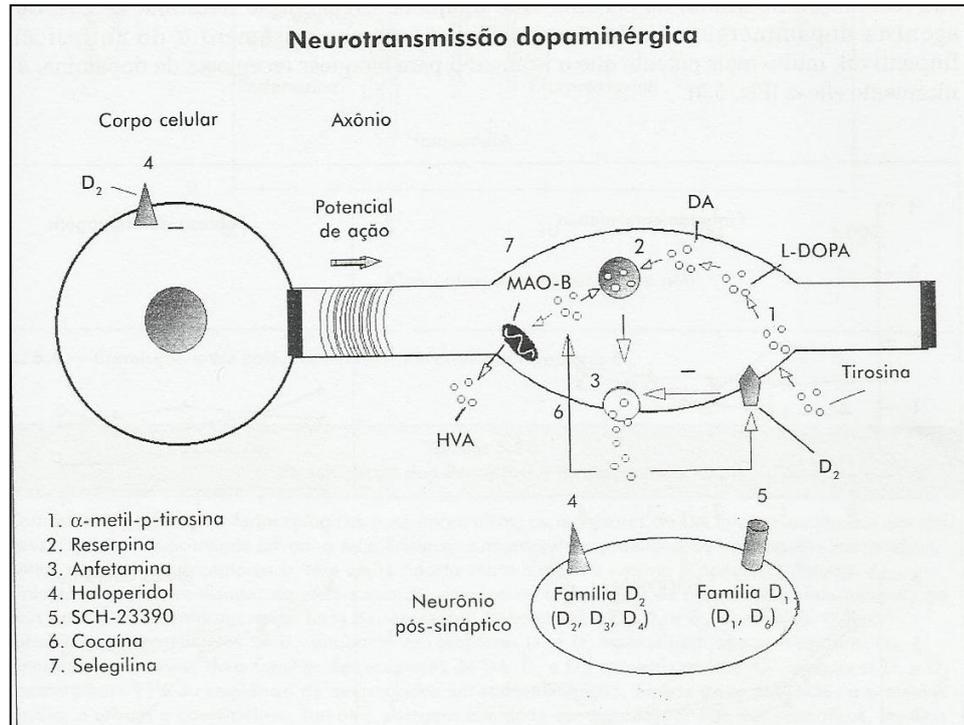


Figura 3: Neurotransmissão dopaminérgica.
 Fonte: Fundamentos de psicofarmacologia 2012.

A noradrenalina é uma catecolamina cuja síntese se inicia com a captação ativa do aminoácido L-tirosina. Esse aminoácido é transportado, pela ação da enzima tirosina hidroxilase, primeiro em L-DOPA e posteriormente, pela ação da L-DOPA descarboxilase, em dopamina (DA). A dopamina é captada pelas vesículas sinápticas e sob a ação da dopamina beta-descarboxilase é transformada em noradrenalina (NA). Quando se dá o impulso nervoso a NA é liberada por processo de exocitose. Pós-sinápticamente pode atuar em receptores chamados de alfa-1, alfa-2 e beta. Existem ainda receptores pré-sinápticos noradrenérgicos inibitórios de tipo alfa-2, que estão localizados tanto nos terminais como nos corpos celulares. Todos esses receptores são ligados a proteína G. O principal mecanismo de retirada da NA da fenda sináptica é a recaptação pelo terminal nervoso. Sua degradação intraneuronal ocorre pela enzima monoaminoxidase (MAO), sendo um de seus principais metabólitos o 3-metoxi-4-hidroxifeniletano glicol (MHPG) (GUIMARÃES, 2012; GOLAN *et al.*, 2014; KATZUNG, 2010).

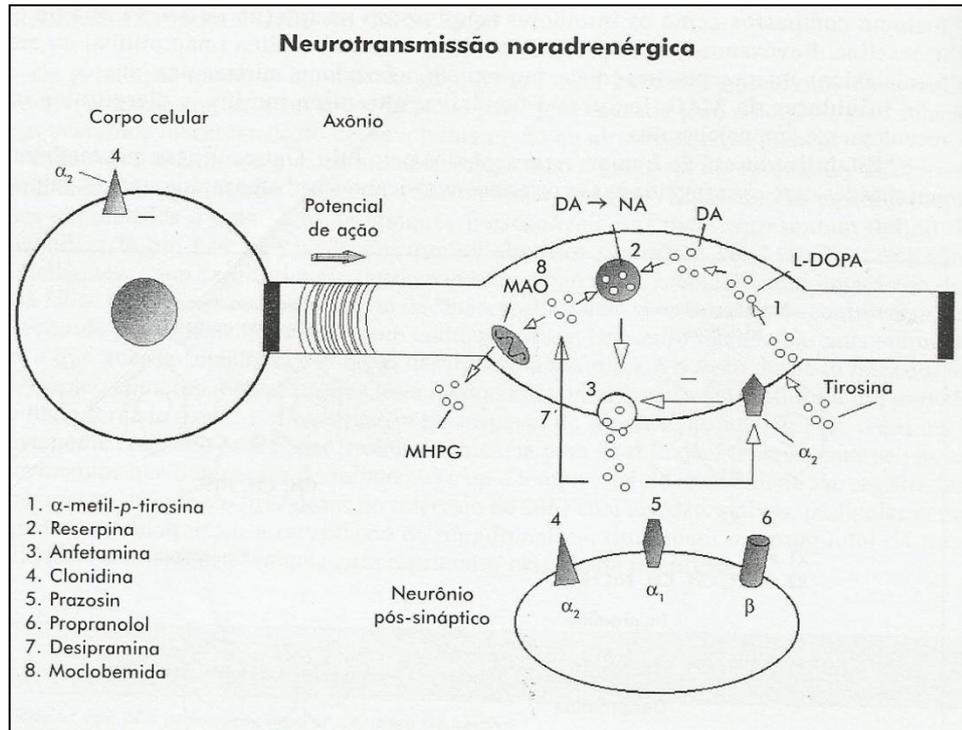


Figura 4: neurotransmissão noradrenérgica.

Fonte: Fundamentos de psicofarmacologia. 2012.

A serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) é uma indolaminacuja síntese se inicia pela captação ativa do aminoácido triptofano. Ao sofrer ação da enzima triptofano hidroxilase, é transformada em 5-hidroxitriptofano e quase imediatamente, transformada em 5-HT pela ação de uma descarboxilase de aminoácidos. A 5-HT é captada pelas vesículas sinápticas. Quando se dá o impulso nervoso é liberada por processo de exocitose. Pós-sinápticamente pode atuar em receptores chamados de 5-HT₁ (A,B,D ou E), 5-HT₂ (A,B ou C), 5-HT₃, 5-HT₄,5-HT₅ (A ou B),5-HT₆ ou 5-HT₇. Existem ainda receptores pré-sinápticos inibitórios localizados, os do tipo 5-HT_{1A} nos corpos celulares e os tipos 5-HT_{1B} ou 5-HT_{1D} (dependendo da espécie), nos terminais nervosos dos neurônios serotoninérgicos. Todos esses receptores, à exceção dos 5-HT₃, ligados a canais iônicos, estão relacionados a proteína G. .O principal mecanismo de retirada da 5-HT da fenda sináptica é a recaptação pelo terminal nervoso. Sua degradação intraneuronal ocorre pela enzima monoaminoxidase (MAO), sendo um de seus principais metabólitos o ácido 5-hidroxiindolacético (5HIAA) (GUIMARÃES, 2012; GOLAN *et al.*, 2014; KATZUNG, 2010).

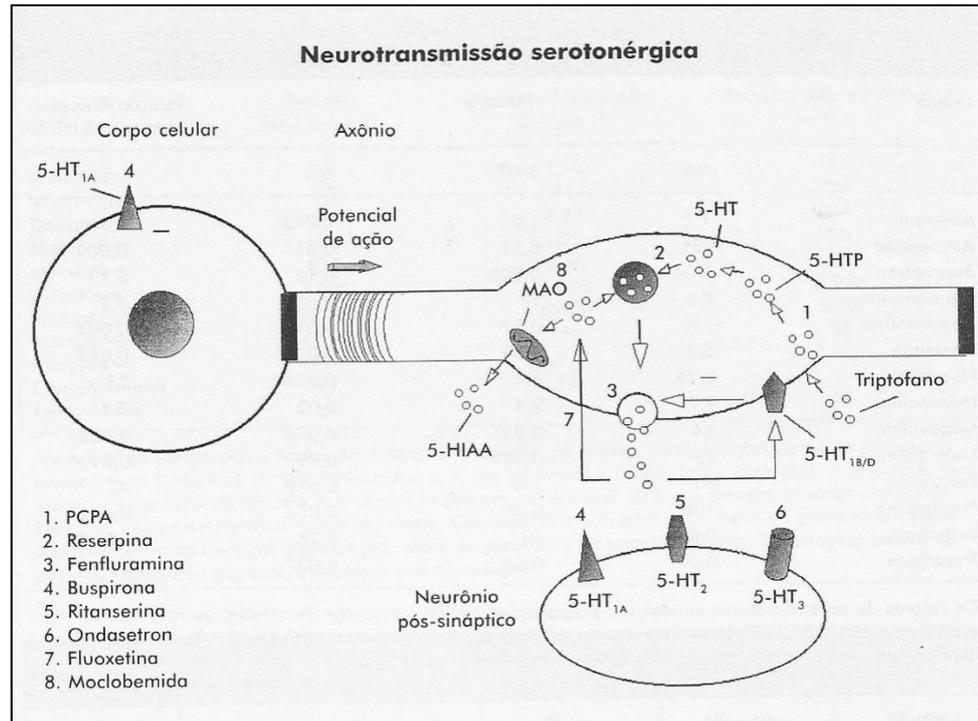


Figura 5: neurotransmissão serotoninérgica.

Fonte: Fundamentos de psicofarmacologia. 2012.

O mecanismo de ação dos principais fármacos antidepressivos está baseado no fato de serem capazes de aliviar os sintomas da depressão maior potencializando as ações dos neurotransmissores nas sinapses no sistema nervoso central (PANUS, 2011; GOLAN *et al.*, 2014; KATZUNG 2010; STAHL, 2013).

O efeito agudo dos antidepressivos tricíclicos é inibir os mecanismos de recaptação do NET (transportador da Noradrenalina) e SERT (transportador da Serotonina), responsáveis pelo término das ações sinápticas da NE e 5-HT no cérebro, sendo provável que tal ação resulte na potencialização das ações do neurotransmissor nos receptores pós-sinápticos. Os antidepressivos heterocíclicos são alguns fármacos que têm efeito sobre a recaptação de noradrenalina e outros que tem mais efeito sobre a recaptação de 5-HT, serotonina (PANUS, 2011; STAHL, 2013; KRISHNAN; NESTLER, 2008)

Os inibidores da monoaminoxidase aumentam os níveis de amina no cérebro, inibem a MAOA que metaboliza a noradrenalina e 5-HT, bem como a MAOB que metaboliza a dopamina. São indicados para pacientes com ansiedade significativa, fobias e hipocondria (PANUS, 2011).

A serotonina está ligada a sentimentos de bem estar ou mal estar. Ela regula o humor, o sono, a atividade sexual, o apetite, o ritmo cardíaco, as funções

neuroendócrinas, temperatura corporal, sensibilidade à dor, atividade motora e funções cognitivas. Os Inibidores Seletivos da Recaptação da Serotonina - ISRS, produzem um efeito agudo com uma ação altamente seletiva nos transportadores da 5-HT, pois bloqueiam a recaptação sem afetar a recaptação de outras aminas neurotransmissoras e por causa de sua seletividade produzem menos efeitos adversos desagradáveis do que os fármacos antidepressivos não seletivos (PANUS, 2011; STAHL, 2013).

Segundo Mulder *et al.*, (2009) a resposta ao uso de antidepressivos é variável, podendo ser mais rápida ou mais demorada, dependendo do paciente, no entanto sabemos que no tratamento com ISRS e IMAO a transmissão monoaminérgica é aumentada de maneira imediata embora seus efeitos antidepressivos demorem semanas para se desenvolver devido a uma infra regulação (redução) inicial na atividade de alguns neurotransmissores e podem ser necessárias semanas para que alcancem os efeitos clínicos desejáveis.

Os efeitos indesejáveis mais comuns entre os fármacos antidepressivos são pouco expressivos, porém podem comprometer seriamente a adesão do paciente ao tratamento, como: sonolência ou insônia, tremores, prisão de ventre, visão borrada, ganho de peso, distúrbios sexuais, vertigem, dentre outros (ALLEN, 2004).

As bases biológicas dos transtornos depressivos têm sido explicadas, nas últimas três décadas, através da hipótese monoaminérgica. Tal hipótese propõe que a depressão é causada por uma redução da disponibilidade de aminas biogênicas cerebrais, principalmente a noradrenalina (NA), serotonina (5-HT), e/ou dopamina (DA) (SCHILDKRAUT, 1965; COPPEN, 1967).

Entretanto, a hipótese das monoaminas por si só não é suficiente para explicar a demora do surgimento dos efeitos terapêuticos dos antidepressivos atuais, bem como, suas limitadas taxas de remissão. Isso mostra que a hipofunção desses neurotransmissores ou a diminuição de seus níveis no cérebro não é a causa exclusiva da depressão. Outros fatores biológicos além dos relacionados com as monoaminas estão associados ao desenvolvimento da depressão, como por exemplo, os fatores do desenvolvimento neurológico, da modulação epigenética, da neuroendocrinologia, imunologia, e da exposição a toxinas e espécies reativas de oxigênio (PAE, FORBES PATKAR. 2001)

Uma vertente forte para a possível causa da depressão é o papel das citocinas como agentes que contribuem para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas (MAES, 2011; CHOPRA; KUMAR, 2011).

Existe também evidência de que não só o stress, mas também a eficácia do tratamento com antidepressivos está associada a efeitos imunomoduladores, incluindo um aumento da interleucina anti-inflamatória 10 (IL-10) e inibição das sínteses de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, TNF- α , IFN- γ) em resposta ao LPS (MOORE et al, 2001;. KENIS E MAES, 2002).

A interação entre o estresse crônico e as mudanças celulares e moleculares que influenciam no desenvolvimento da depressão tem se tornado cada vez mais clara (PITTENGER; DUMAN, 2008). Por exemplo, tanto a administração de CORT quanto a depressão em humanos estão associadas com reduções na transcrição do fator de proteína de ligação ao elemento de resposta do AMPc (CREB) (GOURLEY et al., 2008a). Alguns trabalhos mostram que a ativação do CREB promove a neurogênese (NAKAGAWA et al., 2002b) enquanto que o bloqueio, diminui (NAKAGAWA et al., 2002), tornando este fator de transcrição um provável contribuinte para as alterações na estabilidade neuronal associado com o estresse e a depressão.

1.3 A Depressão e o Estresse Oxidativo.

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 reativa, que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. É este não-emparelhamento de elétrons da última camada que confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas (NG et al., 2008).

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo. Nos processos naturais são produzidos os radicais livres e outros fatores reativos, que podem interagir com diversos substratos, desempenhando funções como sinalização celular, respostas imunológicas e mitose. O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) no organismo (NG et al., 2008; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Os radicais livres consistem em estruturas químicas que contém um ou mais elétrons desemparelhados nos átomos de oxigênio ou nitrogênio, o que confere à molécula um estado altamente reativo. As EROs são encontradas em todos os sistemas biológicos (HALLIWELL; 2012)

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^{--}), hidroperoxila (H_2O^+) e hidroxila (OH^+) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). O organismo dispõe de um sistema antioxidante que consegue neutralizar as EROs e ERNs, constituído por agentes de ação não enzimática e enzimática (HALLIWELL; GUTTERIDGE 2007; BARREIROS et al, 2006). O sistema de defesa não enzimático é composto por reagentes exógenos, sais minerais e vitaminas como o ácido ascórbico e α -tocoferol (vitamina E), que são normalmente obtidos na alimentação (MAES et al., 2011) e outros antioxidantes como a albumina que normalmente contribuem para manter essas espécies sob controle.

O sistema de defesa enzimático inclui as enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GSH-Px). Esta reduz o H_2O_2 à água, mas para isso precisa da conversão da glutathione reduzida (GSH) em oxidada

(GSSG). Para completar o ciclo, a enzima Glutathiona Redutase (GR) reduz a molécula de GSSG à sua forma reduzida em uma reação de oxidação de NADPH (KULAK et al.,2013)(Figura 6).

Em condições fisiológicas, as vias de defesa compensam a produção de EROs e ERNs, entretanto, em condições de produção excessiva ou comprometimento das defesas do organismo, as EROs e ERNs poderão reagir com ácidos graxos, proteínas e DNA, causando dano a esses substratos. As espécies químicas reativas podem também ser produzidas como um subproduto de outras vias bioquímicas, incluindo a síntese de óxido nítrico (NO) e o metabolismo do ácido araquidônico (que estão implicados na excitotoxicidade), assim como o sistema de oxidase de função mista. Não controladas, as EROs atacam muitas moléculas importantes, incluindo enzimas, lipídios de membrana e como já relatado anteriormente ao DNA. A susceptibilidade do cérebro decorre do alto teor de ácidos graxos insaturados, alto consumo de oxigênio e escassez dos sistemas de defesa antioxidantes (NG et al., 2008;MAES et al., 2011a).

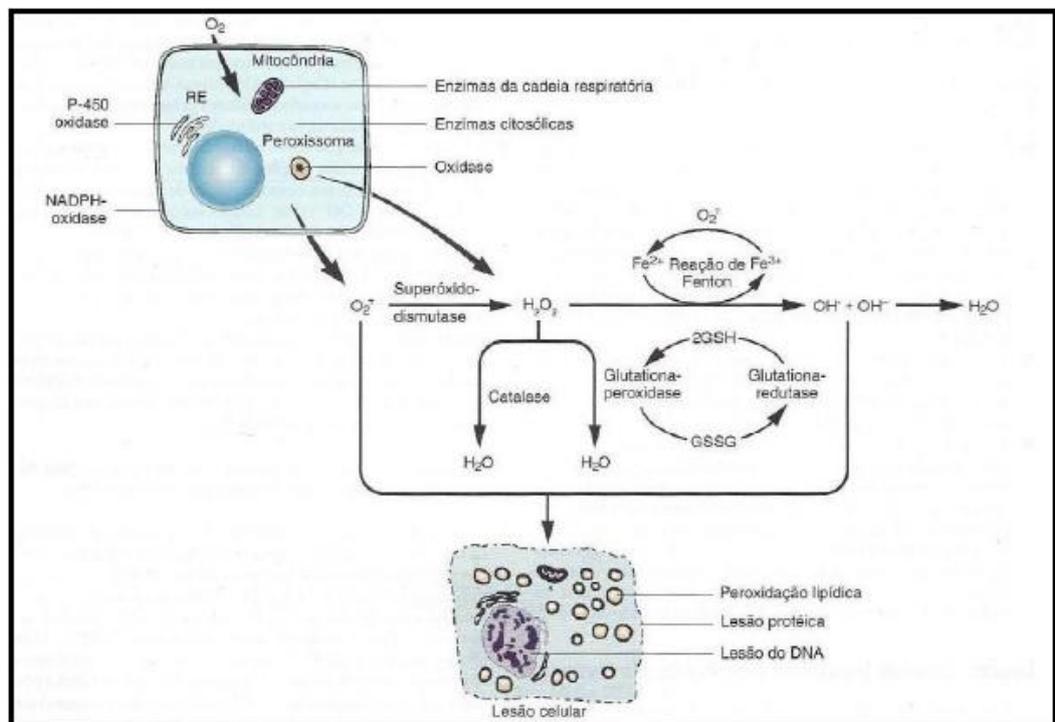


Figura 6: Estresse oxidativo e o dano celular

Fonte: Robbis e Cotran, 2005.

Diversos estudos indicam que os radicais livres estão envolvidos nos mecanismos bioquímicos enfatizando as desordens neuropsiquiátricas em humanos, e também enfatizando o estresse em modelos crônicos de depressão. Os resultados desses estudos sugerem que apenas uma pequena defesa antioxidante contra a peroxidação lipídica existe em pacientes com depressão, principalmente em pacientes maníaco-depressivos instáveis (KHANZODE et al., 2003; LI et al., 2003; NEU et al., 2004).

O estresse oxidativo pode causar lesão tecidual relacionado com muitas desordens fisiopatológicas como a hipóxia, a inflamação e a isquemia tecidual e de reperfusão. Este desequilíbrio tem sido relacionado com a fisiopatologia de uma série de doenças neuropsiquiátricas e neurodegenerativas, como depressão, esquizofrenia, doença de Alzheimer e Doença de Parkinson, visto que o cérebro é particularmente susceptível aos danos decorrentes do estresse oxidativo (JUNG et al., 2007; BILICE et al., 2001; MAGALHÃES et al., 2011).

De acordo com tais considerações, tornou-se importante estudar o envolvimento do sistema do óxido nítrico juntamente com o estresse oxidativo no mecanismo de ação do Timol, a fim de assegurar a elucidação dos mecanismos envolvidos nas ações dessa substância, tentando cercar todas ou as principais vias neuronais que participam direta ou indiretamente da patologia da depressão e tendo em vista que, de acordo com alguns autores, esta substância tem apresentado caráter antioxidante.

1.4 Depressão e o envolvimento do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HHA)

A literatura sugere que a exposição ao estresse pode ser um fator de precipitação no desenvolvimento da depressão. De fato, alguns estudos mostram que até 85% dos pacientes experienciam significantes eventos estressantes antes do início dos sintomas depressivos (SAVEANU; NEMEROFF, 2012).

As respostas fisiológicas e neurobiológicas normais estão bem caracterizadas. A exposição a um fator estressante agudo, ativa o sistema hipotalâmico-hipofisário-adrenal, resultando em uma cascata de eventos endócrinos. Essa cascata inclui a liberação e transporte do fator de liberação da corticotropina (CRF) de neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo para a pituitária anterior, onde o hormônio estimula a liberação do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) para a circulação sistêmica (HERMAN; CULLINAN, 1997).

O ACTH atua então sobre a glândula adrenal, onde ele estimula a produção e liberação de glicocorticóides (cortisol no ser humano e corticosterona em roedores) do córtex da adrenal para a circulação sistêmica. Uma vez liberado, os glicocorticóides agem nos tecido corporais para limitar as funções não essenciais e mobilizar energia para lidar com o fator estressante. Os glicocorticóides também atuam em nível cerebral, onde exercem influência inibitória no núcleo paraventricular para inibir as atividades do eixo HHA (retroalimentação negativa) (HERMAN; CULLINAN, 1997).

O processo de retroalimentação negativa do eixo HHA parece ser fortemente dependente da integridade do hipocampo. O hipocampo expressa tanto receptores de mineralocorticóides quanto de glicocorticóides, que são os principais sítios de ação dos glicocorticóides. Os receptores de mineralocorticóides apresentam uma alta afinidade pelo cortisol e, portanto, são ativados mesmo quando os níveis deste hormônio estão baixos. Em contrapartida, os receptores de glicocorticóides apresentam uma baixa afinidade e são ativados somente quando os níveis de cortisol estão relativamente elevados (DE KLOET et al., 1998).

Os receptores de glicocorticóides estão intimamente envolvidos no processo de retroalimentação negativa do eixo HHA. Quando estes receptores estão disponíveis em nível alto, a inibição por retroalimentação do núcleo paraventricular é

aumentada, a atividade no eixo HHA é fortemente controlada. Contudo, quando estes receptores estão em nível baixo, a inibição por retroalimentação é ineficiente e o estímulo que provoca a resposta no eixo HHA permite um aumento, maior que o normal, nos níveis de cortisol (DE KLOET, 1998).

O hipocampo é particularmente susceptível aos efeitos danosos do estresse prolongado, evidenciado pela diminuição da ramificação dendrítica, diminuição da neurogênese e diminuição da expressão de RNAm do receptor de glicocorticóides no hipocampo (FUCHS, 2007; PHAM et al., 2003). As implicações funcionais deste dano não estão claras, mas presume-se que ele reduz o controle de retroalimentação exercida pelo hipocampo sobre o eixo HHA, causando mais aumento nos níveis de cortisol e, assim, danificando ainda mais o hipocampo (DE KLOET et al., 1998).

Fundamentalmente, a ativação do eixo HHA em resposta a um fator de estresse agudo é essencial para a sobrevivência. Sua intenção primária é preparar o organismo para combater este fator de estresse e então restaurar a homeostase corporal uma vez que o fator foi diminuído (DE KLOET et al., 1998). Contudo, a ativação prolongada do eixo HHA, pode apresentar um sério risco à saúde, podendo levar a imunossupressão, inibição do crescimento, distúrbios do sono, impedimento da memória, diminuição do comportamento sexual e disforia crônica (D'AMATO et al., 2001; CONRAD et al., 1996; MCEWEN, 1998). Portanto, o mesmo hormônio do estresse que é vital para a sobrevivência do organismo durante o estresse agudo pode também predispor o organismo a doença se o período de estresse for prolongado.

Inúmeras linhas de pesquisa revelam uma estreita conexão entre a excessiva ativação do eixo HHA e a depressão. Por exemplo, cerca de metade dos pacientes deprimidos apresentam hipercortisolemia e ritmicidade do cortisol interrompida, que pode ser revertida pelo tratamento com antidepressivos (HOLSBOER, 2001). Além disso, existem evidências do aumento dos níveis de CRF no fluido cerebrospinal, do aumento do cortisol livre na urina e da diminuição da supressão do cortisol plasmático após a administração de dexametasona em pacientes deprimidos (NESTLER et al., 2002).

Em pessoas saudáveis a administração de dexametasona suprime o ACTH e a liberação de cortisol pela ligação aos receptores de glicocorticóides por retroalimentação negativa. Em pacientes deprimidos, se a supressão do ACTH pela

dexametasona está diminuída, a normalização ocorre durante um tratamento eficaz com antidepressivos (HOLSBOER, 2001). Estudos mostraram que em pacientes com a síndrome de Cushing, desordem marcada cronicamente pelos altos índices de cortisol no plasma, frequentemente apresentam altos índices de depressão (FAVA; FABBRI; SONINO, 2002) criando um forte argumento para a influência da desregulação do sistema de estresse e o desenvolvimento do estado depressivo. Portanto, se várias classes de drogas antidepressivas são capazes de agir em vias neuroendócrinas para regular a secreção de cortisol (PARIANTE et al., 2003; PARIANTE; MILLER, 2001), então novas terapias antidepressivas que inibam a secreção de cortisol podem ser promissoras em ensaios clínicos (LAAKMANN et al., 2004; SCHULE et al., 2009).

1.5 Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF)

A partir da observação da diminuição do volume do hipocampo e de outras áreas cerebrais de indivíduos depressivos, foi postulada uma hipótese para a patogênese da depressão envolvendo as neurotrofinas, que são fatores de crescimento que também regulam a plasticidade no cérebro (KRISHNAN; NESTLER, 2008).

As neurotrofinas, ou fatores neurotróficos, são proteínas homodiméricas reguladoras da neurogênese, crescimento, diferenciação e plasticidade neuronal, morte celular e migração, estando relacionadas ainda à inflamação (DWIVEDI, 2009; PALLAVI et al., 2013).

O BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro) é a neurotrofina mais amplamente investigada e considerada a de maior importância. É encontrado amplamente no hipocampo, amígdala, neocórtex e cerebelo e exerce suas funções ligando-se principalmente ao receptor Trk (receptor cinase relacionado à tropomiosina) do subtipo TrkB, ligando-se também, em menor proporção, ao receptor p75 (LEVENTHAL et al., 1999; NUMAKAWA et al., 2010).

As neurotrofinas, em especial o BDNF, estão relacionadas aos importantes fenômenos de neurogênese e sinaptogênese, e a alteração na sua expressão e atividade (que pode ser decorrente de estresse, isquemia, convulsões, etc.) tem sido relacionada à patogênese de doenças psiquiátricas e neurodegenerativas, como depressão, doença de Alzheimer e doença de Parkinson

(CUNHA; BRAMBILLA; THOMAS, 2010; SHELINE, 2011; DESHMUKH; KNIERIM, 2012; BAI et al., 2014).

A hipótese neurotrófica da depressão postula que a exposição crônica ao estresse resulta em diminuição da expressão e atividade de BDNF, levando ao prejuízo das funções de regiões límbicas, como emoção e aprendizado (DUMAN; MONTEGGIA, 2006). Estudos com modelos animais mostram que os antidepressivos são capazes de reverter esse quadro, aumentando os níveis de BDNF (SIUCIAK et al., 1997; SOUSA et al., 2015; VASCONCELOS et al., 2015; GAWALI et al., 2016).

A farmacoterapia com antidepressivos nem sempre é eficaz e apresenta altos índices de resistência. Estudos têm demonstrado que a resistência ao tratamento com os antidepressivos está relacionada a um polimorfismo no gene BDNF. Esse polimorfismo, que pode ser induzido pelo estresse, consiste na substituição do aminoácido valina por metionina no códon 66 do BDNF e mostrou alterar a expressão e o processamento de BDNF, como representado na Figura 7 (EGAN et al., 2003; IBARGUEN-VARGAS et al., 2009; SANCHEZ et al., 2011; HOSANG et al., 2014; EL-HAGE et al., 2015; JIANG et al., 2017).

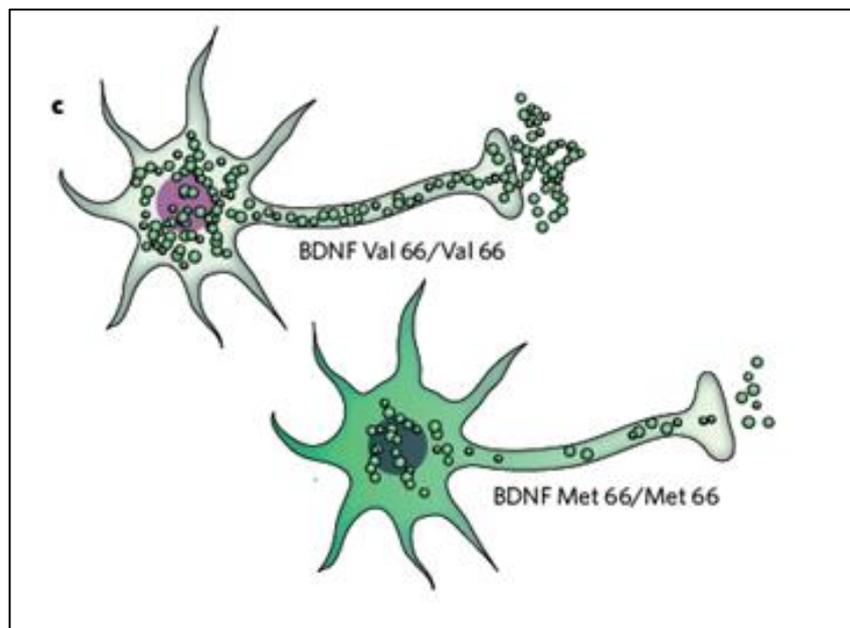


Figura 7 Alteração na expressão de BDNF.

Fonte: Krishnan e Nestler (2008).

1.6 Abordagens terapêuticas na depressão

Atualmente os antidepressivos disponíveis apesar de largamente prescritos para depressão e doenças relacionadas ao humor e ansiedade apresentam significantes limitações incluindo um intervalo de tempo longo para início da resposta terapêutica (semanas a meses) e baixos índices de resposta (apenas um terço respondem ao primeiro medicamento e até dois terços respondem a vários fármacos) (TRIVEDI *et al.*, 2006). Isto é particularmente problemático para uma doença associada a altos índices de suicídio, acometendo, aproximadamente, 15% dos pacientes, especialmente os homens (FOUNTOULAKIS, 2010).

Esforços significantes têm sido direcionados para a caracterização da neurobiologia da depressão com a promessa de identificar novos alvos terapêuticos. Os estudos sugerem novos possíveis alvos para a farmacoterapia da depressão como fatores neurotróficos, seus receptores e cascatas afins de sinalização intracelular; agentes que podem neutralizar os efeitos do estresse sobre a neurogênese no hipocampo (incluindo antagonistas de corticosteróides, citocinas inflamatórias e seus receptores) e agentes que facilitam a ativação da expressão do gene e aumentam a transcrição de neurotrofinas no cérebro (SULLIVAN, NEALE; KENDLER, 2000; DRZYZGA; MARCINOWSKA, OBUCHOWICZ, 2009).

Todos os fármacos utilizados atualmente para o tratamento da depressão estão relacionados de algum modo com o aumento da transmissão monoaminérgica em regiões cerebrais. Os diferentes antidepressivos como os inibidores seletivos da recaptação de serotonina, inibidores da MAO, tricíclicos e atípicos têm eficácia semelhante para a maioria dos pacientes deprimidos, variando em relação ao seu perfil de efeitos colaterais e potencial de interação com outros medicamentos (ANDERSON, 2000; SONG *et al.*, 1993).

A resposta ao tratamento com antidepressivos ocorre entre 2 a 4 semanas após o início do uso, embora alguns pacientes respondam apenas em 6 semanas. As estratégias utilizadas quando um paciente não responde ao tratamento com medicamento antidepressivo consiste em aumento de dose, potencialização, associação de antidepressivos, troca de antidepressivo, eletroconvulsoterapia e associação com psicoterapia. Existem evidências limitadas sobre qual estratégia seria a melhor alternativa quando não há resposta a um tratamento inicial proposto (FLECK *et al.*, 2001). A eletroconvulsoterapia (ECT) é um dos tratamentos

antidepressivos disponíveis mais eficazes. No entanto, ele não é utilizado como tratamento inicial para depressão em função de seus efeitos colaterais, necessidade de anestesia geral e a estigma social (WEINER, 1995). Ainda segundo Moser, Lobato e Abreu, 2005, A ECT é um método terapêutico eficaz e seguro, entretanto, ainda não totalmente reconhecido, descrito e aceito de forma uniforme em nosso país. No presente momento, registra-se renovado interesse por esse tratamento por parte de muitos pesquisadores, constatado mediante consulta de recentes periódicos psiquiátricos. Observa-se também interesse por um novo método de tratamento convulsivante, a estimulação magnética transcraniana, cuja eficácia ainda não foi plenamente confirmada.

Sobre a Estimulação magnética transcraniana (EMT) Araújo et al, 2011 afirmaram que é uma técnica conhecida desde o começo dos anos 90 e que tem ganhado destaque devido a sua segurança e possível aplicabilidade para tratar diversas patologias neuropsiquiátricas refratárias, tem sido largamente utilizada em AVC, Dor, Doença de Parkinson e Depressão.

Muitos tratamentos alternativos e coadjuvantes vem sendo implementados como o tratamento de hipnoterapia que “modifica o padrão de consciência, focando sua atenção por meio de uma indução ou de uma autoindução concentrando a mente e direcionando seus pensamentos e, com isso, intensificando a atividade cerebral”. A Psicologia e a Acupuntura tem sido amplamente indicada para os pacientes depressivos em conjunto com a terapia medicamentosa (LIPP, 2016; SILVA e SALES, 2016).

Abordando o tratamento medicamentoso é importante salientar que o planejamento de um tratamento antidepressivo envolve a fase aguda, de continuação e de manutenção, cada uma com objetivos específicos. O tratamento da fase aguda inclui os 2 a 3 primeiros meses de tratamento e tem como objetivo a diminuição dos sintomas depressivos (resposta) ou idealmente sua remissão completa (remissão). A continuação do tratamento corresponde aos 4 a 6 meses que seguem ao tratamento da fase aguda e tem como objetivo manter a melhora obtida evitando recaídas dentro de um mesmo episódio depressivo. Ao final dessa fase, se o paciente permanece com a melhora obtida após o tratamento da fase aguda, é considerado recuperado do episódio índice. Já a fase de manutenção tem por objetivo evitar que novos episódios ocorram (recorrência) e é em geral por longo

prazo. A terapia de manutenção, portanto, é recomendada para aqueles pacientes com probabilidade de recorrência (FLECK et al., 2003).

Um terço dos pacientes com episódio depressivo com remissão inicial recai no primeiro ano. Os índices de recaída são estimados em 20% a 24% nos primeiros 2 meses, 28% a 44% aos 4 meses, 27% a 50% aos 6 meses e 37% a 54% aos 12 meses (FLECK et al., 2001).

Sendo assim, o entendimento da etiologia da depressão e a busca de novos fármacos eficazes no tratamento desta doença que diminua o tempo de latência para o início do efeito terapêutico e que diminua os índices de recaída expressos acima é de suma importância para conseguirmos controlar esta doença heterogênea, crônica e incapacitante.

O tratamento geralmente através de medicamentos antidepressivos, tem mostrado maiores benefícios quando associado com atividades físicas e tratamentos alternativos em casos de depressão associada ao estresse. Sobre a prática regular de atividades físicas, já se sabe a importância que a mesma possui para a saúde, agora também a temos como aliada para qualidade de vida física e mental. Segundo Dr. Drauzio Varella citado por Silva e Salles (2016) “O exercício físico diário feito por pelo menos trinta minutos, ajuda o corpo na produção de ‘beta endorfina’, liberando uma sensação de tranquilidade e bem estar.

1.7 Modelos Animais e a depressão

A viabilidade dos estudos que investigam processos comportamentais ou psicológicos alterados pela administração de drogas tornou-se possível com a utilização de percursos metodológicos baseados em modelos animais. Entre estes estão os estudos que determinam quais drogas e que doses alteram a atividade locomotora, o comportamento alimentar, sexual e a agressão por exemplo. Outros estudos dizem respeito ao entendimento dos substratos neurobiológicos que medeiam efeitos comportamentais específicos como no medo e na dor (LAPA et al., 2008).

A interação das abordagens comportamentais ou psicológicas com a investigação neurobiológica provê a base para o estudo sistemático das ações de drogas pertinentes aos seus efeitos clínicos em humanos. Neste estudo utilizamos testes comportamentais em animais que predizem um possível efeito das drogas

relacionados a depressão que é uma condição patológica típica dos seres humanos.

Modelos experimentais em roedores mostraram que o estresse oxidativo parece contribuir para a morte de células neuronais e gliais, elevação de oxidação proteica e lipídica no hipocampo. Geralmente existe um balanço entre a produção de radicais livres e a atividade de defesa dos sistemas antioxidantes, quando este balanço está alterado em favor da produção de radicais livres, devido a depleção dos componentes do sistema de defesa antioxidante ou devido ao aumento da geração de radicais livres o estresse oxidativo ocorre e pode gerar reações em cadeias, causando danos em em lipídeos polinsaturados de membrana, proteínas e DNA causando injúria neuronal (HALLIWELL, 2012; ZHAO et al., 2008).

As alterações biológicas oxidativas estão sendo reconhecidas como uma rota crítica para danos observados na depressão induzida pelo estresse e que o aumento do estresse oxidativo ocorre na depressão maior, evidenciado pela diminuição das defesas antioxidantes plasmáticas em conjunto com o aumento de peroxidação lipídica (OZCAN et al., 2004. BERK, 2007).

Em animais não há condição conhecida que corresponda à condição inata da depressão em seres humanos, mas vários procedimentos foram descritos que produzem em animais estados comportamentais típicos da depressão humana como a retirada da interação social, perda do apetite, atividade motora reduzida, estresse, situações inescapáveis como relatado no trabalho original de Porsolt *et al.*, 1987. Neste estudo os autores relatam que o teste do nado forçado é um modelo animal pré-clínico bem estabelecido e representa um evento de estresse agudo.

Desta forma esses achados incentivaram o estudo do potencial efeito antioxidante do timol através da dosagem da atividade da enzima superóxido dismutase, da atividade da catalase, dos níveis da glutathione reduzida, do conteúdo de nitrito, do índice de peroxidação lipídica nas áreas cerebrais relacionadas a depressão como o córtex pré-frontal, o corpo estriado e o hipocampo e os níveis de BDNF no hipocampo de animais submetidos ao estresse no teste do nado forçado.

1.8 Plantas medicinais e a depressão

O tratamento de diversas enfermidades tem sido realizado por meio do uso de plantas e vem sido explorado nos últimos anos. Segundo Vasconcelos 2004, a

população usa as plantas medicinais de forma empírica através da sabedoria popular, em contrapartida algumas formas de utilização podem ser indevidas e o tratamento correto acaba sendo prejudicado.

As duas principais vias de identificação de produtos naturais são o conhecimento das práticas tradicionais (ou etnofarmacologia), e a triagem aleatória de plantas, sendo a primeira mais vantajosa por permitir o planejamento da pesquisa de novos fármacos a partir do conhecimento empírico já existente (YUNES; CALIXTO, 2001).

A literatura mostra que medicamentos provenientes de substâncias naturais são capazes de tratar cerca de 80% das enfermidades humanas, possuindo efeitos antibacterianos, anticoagulantes, antiparasitárias, imunossupressores dentre outras (NEWMAN et al., 2003). Isso torna-se possível graças a presença dos metabólitos secundários, que possuem diversas funções nos vegetais, como defesa contra predadores, proteção contra raios ultravioleta, atração de polinizadores, entre outros (PERES, 2003; SAKLANI; KUTTI, 2008). Essas substâncias produzidas possuem estruturas com a facilidade de ligar-se a enzimas e receptores em outros organismos e interferir direta ou indiretamente com mecanismos inflamatórios, sendo capaz de gerar efeitos farmacológicos (LI; VEDERAS, 2009).

Desta forma, tem-se evidenciado um crescente aumento no estudo de plantas preconizadas pela medicina popular para validar a sua utilização como fitoterápico seguro e eficaz. O emprego de técnicas modernas de farmacologia, biologia molecular, modelagem molecular, química farmacêutica e toxicologia renovaram o interesse na procura de novos medicamentos ou de protótipos de novos fármacos a partir de produtos naturais (CALIXTO et al, 2000).

Dentre as técnicas utilizadas, destaca-se o método de Lipinski (ou regra dos cinco) que pontua as principais propriedades físicos-químicas e estruturais para um fármaco, avaliando a probabilidade de uma substância ser um bom candidato a fármaco por via oral; onde o autor correlaciona a baixa atividade farmacológica e a baixa absorção quando: (i) há mais de 5 centros doadores de ligação de hidrogênio; (ii) há mais de 10 aceptores de hidrogênio, (iii) o peso molecular é maior que 500 unidades e o (iv) o Log de P é maior que 5 (LIPINSKI et al., 2001).

As plantas medicinais são utilizadas como base para o desenvolvimento e aprimoramento da terapêutica por fornecerem várias substâncias químicas que compõem os medicamentos alopáticos (LEDA, 2011). A grande maioria dos

medicamentos hoje disponíveis no mundo é ou foi originado de estudos desenvolvidos a partir da cultura popular que fazem da rica biodiversidade brasileira um vasto campo da pesquisa científica (ANVISA, 2011).

Historicamente as plantas medicinais estão associadas a sabedoria popular e a cultura de povos antepassados que se utilizavam de uma medicina caseira e empírica como forma curativa para quase todos os problemas de saúde. Ao longo dos anos as plantas medicinais tem se tornado um grande alvo para a indústria farmacêutica e institutos de pesquisa que desenvolvem estudos com diversos fármacos. Isto é devido as plantas serem fontes importantes de produtos naturais biologicamente ativos com diversas estruturas e propriedades físico-químicas, onde muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos.

O uso de algumas substâncias naturais demonstraram efeitos farmacológicos que foram posteriormente estudados e deram origem a importantes fármacos que atualmente são utilizados amplamente com indicações precisas, pois passou-se a isolar as moléculas ativas e reproduzi-las em escala industrial.

O objetivo primordial na indicação do uso de fitoterápicos na medicina humana não é substituir medicamentos registrados e já comercializados, mas sim aumentar a opção terapêutica dos profissionais da saúde ofertando medicamentos equivalentes, também registrados, talvez mais baratos, com menos efeitos colaterais e espectro de ação mais adequados e com indicações terapêuticas complementares às medicações existentes (MELO, 2006).

Neste contexto podemos relatar que a fitoterapia é a área do conhecimento que busca a cura das doenças através das plantas medicinais e apesar de seu uso ter uma propagação associada ao conhecimento popular empírico, paulatinamente vem sendo reconhecido e incorporado ao saber científico (DANTAS, 2006).

A Organização Mundial da Saúde reconheceu oficialmente o uso de fitoterápicos em 1978. No Brasil, a política de plantas medicinais e fitoterápicos remonta de 1981 por meio da Portaria n.º 212, de 11 de setembro, do Ministério da Saúde que define o estudo das plantas medicinais como uma das prioridades de investigação clínica e foi em 1982 que o Ministério da Saúde lançou o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais para obter o desenvolvimento de uma terapêutica alternativa e complementar, com embasamento científico, pelo estabelecimento de

medicamentos fitoterápicos, com base no real valor farmacológico de preparações de uso popular, à base de plantas medicinais (ANVISA, 2011).

As plantas medicinais constituem uma fonte renovável de onde podem ser obtidos novos e eficazes medicamentos. A indicação de plantas medicinais aumenta a opção terapêutica, ofertando medicamentos equivalentes, e talvez com indicações terapêuticas complementares as medicações existentes sem substituir os medicamentos já comercializados e registrados (SIMÕES et al, 1999; MAIOLI-AZEVEDO; FONSECA-KRUEL, 2007).

O desenvolvimento de novos medicamentos pode se apoiar no uso tradicional de alguma espécie medicinal, sendo hoje reconhecida como uma importante área de pesquisa: a etnofarmacologia (LEDA, 2011). Cujos trabalhos mostram que um número muito maior de espécies vegetais vem sendo utilizado e que muitos estudos devem ser feitos no sentido de validar o uso dessas espécies, identificando seus componentes ativos e seus mecanismos de ação.

Em nosso laboratório diversos estudos vem sendo desenvolvidos com produtos naturais e a investigação das suas ações no SNC. Podemos citar os estudos com a Riparina I que apresentou efeitos Anticonvulsivante (MONTEIRO et al., 2005), Antidepressiva, Ansiolítica (SOUSA et al., 2005), a Riparina II apresentou efeitos Anticonvulsivante (LEITE et al., 2006), Antidepressivo (TEIXEIRA et al., 2013), Ansiolítico (SOUSA et al., 2007), Antidepressivo e o aumento dos níveis de BDNF (VASCONCELOS, 2015), com a Riparina III que mostrou efeitos: Antidepressivo (SOUSA et al., 2004; MELO et al., 2013; VASCONCELOS et al., 2015), Ansiolítico (MELO et al., 2006; SOUSA et al., 2004). Acetato de citronelila apresentou atividade antidepressiva (SANTOS, 2014), Carvacrol apresentou atividade ansiolítica (2009) e antidepressiva (2010); Timol apresentou nos testes comportamentais atividade ansiolítica e antidepressiva (FERNANDES 2012).

1.8.1 Timol

Várias substâncias extraídas de produtos naturais possuem atividades farmacológicas. Os monoterpenos, presentes nos óleos essenciais, são em parte responsáveis por essas atividades, podendo as mesmas serem analgésicas (AMARAL *et al.*, 2007), anticonvulsivantes (ALMEIDA *et al.*, 2003), ansiolíticas (SILVA *et al.*, 2007), entre outras.

A *Lippia sidoides* é uma planta da família *Verbenaceae* que pode ser encontrada do Nordeste do Brasil, principalmente nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte, popularmente conhecida como alecrim pimenta que contém em sua composição um óleo essencial rico em Timol e Carvacrol (NUNES, 2005). Os resultados de sua análise fitoquímica registram elevado teor de óleo essencial cujo componente ativo principal é o timol, substância de alto poder antiséptico contra fungos e bactérias com forte ação moluscicida e larvicida, útil no combate ao caramujo vetor de esquistossomose e do mosquito da dengue, *Aedes aegypti*.

Dentre seus componentes químicos fixos foram identificados também flavonoides que certamente contribuem para a sua atividade biológica, inclusive contra células leucêmicas de origem humana *in vitro* (MATOS, 2007).

É uma planta muito usada pela medicina popular devido ação anti-séptica, antimicrobiana e antifúngica (RADÜNZ, 2001). Os resultados obtidos no estudo de Silva *et al.* (2010) mostram que o extrato da *Lippia sidoides* possui potencial antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus*, possuindo também atividade citotóxica (COSTA *et al.*, 2001). Segundo Matos, 2007, o Timol possui atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos e é capaz de inibir a peroxidação dos lipossomos fosfolipídicos, sendo um potente antioxidante.

O timol é um monoterpene extraído do óleo essencial de diversas plantas aromáticas como *Satureja montana*, *Satureja parvifolia* (MASTELIC *et al.*, 2008), sendo o componente principal do óleo essencial do alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*), constituindo aproximadamente 48% da sua composição (SOUSA *et al.*, 2002).

Pesquisas experimentais demonstraram que diversos monoterpenos extraídos de óleos essenciais possuem atividade no Sistema Nervoso Central (SILVA *et al.*, 2007). O isopulegol, por exemplo é um monoterpene intermediário na preparação de (-)-mentol e que está presente em óleos essenciais de várias plantas, que demonstrou efeitos antidepressivos e ansiolíticos em modelos animais de depressão e ansiedade (SILVA *et al.*, 2007). Carvacrol é outro exemplo de monoterpene que é isômero do Timol (Figura 8) que apresentou efeito ansiolítico (MELO *et al.*, 2009), antidepressivo (MELO *et al.*, 2010) e ainda antinociceptivo em modelos animais através de vários testes entre eles o da nocicepção (MELO *et al.*, 2012).

O timol é uma substância cristalina e acredita-se que foi descoberto por Caspar Neumann em 1719. O produto químico foi sintetizado na forma pura em

1842 por M. Von Lallemand, que usou a análise química elementar para caracterizá-lo, determinando a proporção correta de carbono, hidrogênio e oxigênio que compõem a molécula de timol. Friedlieb Ferdinand Runge também estudou a química da substância. Alain Thozet e M. Perrin publicaram pela primeira vez a análise da estrutura de cristal com a determinação exata dos átomos estruturais (DORMAN; DEANS, 2000).

Devido a sua estrutura fenólica, Timol demonstrou atividade antibacteriana contra cepas de bactérias, incluindo *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* (DORMAN; DEANS, 2000). Esta atividade antibacteriana é causada por inibir o crescimento da produção de lactato, e diminuindo a absorção de glicose celular (EVANS, 2000).

O timol tem sido utilizado em soluções de álcool e em pó para o tratamento de infecções micóticas, e foi usado nos Estados Unidos para o tratamento de infecções por parasitas é também utilizado como um conservante em halotano, um anestésico, e como um antisséptico em bochechos. Quando utilizado para reduzir a placa e gengivite, timol apresentou mais eficácia quando usado em combinação com clorexidina do que quando usado puramente por si só. timol é também o ingrediente ativo anti-séptico, em alguns cremes dentais, tais como Euthymol (FILOCHE; SOMA; SISSONS, 2005).

A atividade antifúngica justifica-se e é evidenciada pelo fato de que o timol é lipofílico, permitindo-lhe interagir com a membrana celular de células de fungos, alterando a permeabilidade da membrana da célula permitindo a perda de macromoléculas (KLARIC *et al.*, 2007).

O Timol (Ac. Tímico, isopropilmetacresol), um isômero do Carvacrol, possui características similares a um fenol, com odor aromático e gosto picante. Ambos, apresentam-se como cristais incolores grandes ou pó cristalino branco com aroma irritante. Também chamado de 2-isopropil-5-metil-fenol, o timol é um terpeno de fórmula química $C_{10}H_{14}O$ (GUILLEN *et al.*, 2007; KHANNA *et al.*, 1988)

Trata-se de uma substância encontrada no orégano e no tomilho. Amplamente usado como controlador de larvas e fungos, assim como flavorizante em cigarros e em pequena escala, em alguns alimentos. Os compostos com estruturas fenólicas tais como timol, possuem alta atividade *in vitro* contra bactérias Gram negativas e Gram positivas (DORMAN; DEANS, 2000).

Os estudos de Botelho *et al.*, (2007) demonstraram que o timol inibiu crescimento de patógenos orais como *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*. Timol e carvacrol, seu isômero, inibiram o crescimento de biofilmes pré-formados de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (NOSTRO *et al.*, 2007), apresentaram efeito antioxidante sobre hexanos (LEE *et al.*, 2005) e efeito relaxante sobre o músculo liso da aorta (PEIXOTO- NEVES *et al.*, 2010).

Carvacrol e Timol inibem a peroxidação de lipossomos fosfolipídicos. Os fenólicos voláteis são eficazes na atividade antimicrobiana (bactérias e fungos) e antimicótica, são conservantes naturais de alimentos e possuem alta atividade antioxidante que foi comprovada mais eficaz do que vários antioxidantes sintéticos como BHA e BHT (MILOS *et al.*, 2000; TEISSEDE; WATERHOUSE, 2000; MASTELIĆ *et al.*, 2008).

O timol é o segundo constituinte mais abundante (25,16%) no óleo essencial de *Satureja thymbra* o qual apresentou atividades, bactericida, fungicida, bacteriostática e fungistática (GIWELI *et al.*, 2012). Verificou-se a atividade repelente do timol, mentol, ácido salicílico e salicilato de metila sobre larvas de *Boophilus microplus* (NOVELINO *et al.*, 2007).

Begrow *et al.*, (2010) relataram que o timol e carvacrol são responsáveis pelo efeito antiespasmódico do extrato da planta *Thymus vulgaris* em íleo e traqueia. Enquanto Jukic *et al.*, (2007) relataram atividade inibitória do timol e derivados, timoquinona e timohidroquinona, sobre a atividade da acetilcolinesterase.

Timol e carvacrol aliviaram os danos cognitivos causados por níveis aumentados de beta-amilóide ou hipofunção colinérgica em ratos. Atividades anticolinesterase, antioxidante, e anti-inflamatória podem ser os mecanismos que contribuem para tais efeitos benéficos (AZIZI *et al.*, 2012).

Segundo Veras *et al.*, (2012), o óleo essencial e seu constituinte majoritário, timol, influenciam a atividade de aminoglicósdeos e podem ser utilizados como adjuvantes na terapia antibiótica contra bactérias patogênicas do trato respiratório. Timol apresentou efeito antiinflamatório tópico em edema de orelha de rato.

Diversos monoterpenos extraídos de óleos essenciais possuem atividade no sistema nervoso central (SILVA *et al.*, 2007). Sabe-se também que o carvacrol e o timol são isômeros estruturais, diferenciando-se apenas na posição do grupo hidroxila no anel aromático. Carvacrol e Timol demonstraram resultados satisfatórios

em modelos experimentais de ansiedade e depressão (MELO, 2009; MELO, 2010; FERNANDES 2012).

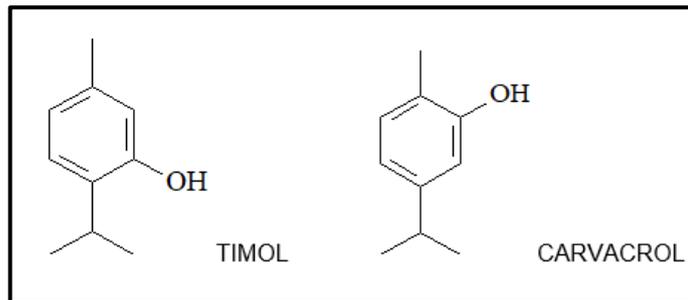


Figura 8: Estrutura química do Timol e Carvacrol

Fonte: <http://www.scielo.br/scielo.php>

1.8.2 Timol e suas ações no Sistema Nervoso Central

O estudo dos efeitos da administração aguda de timol nas doses de 25 e 50 mg/Kg em modelos comportamentais de ansiedade, depressão, atividade locomotora, sedação e convulsão levou a várias considerações frutos da dissertação de mestrado de Fernandes, 2012, cujos outros experimentos mais aprofundados foram realizados sequencialmente e os seus resultados serão descritos nesta tese nos próximos capítulos.

Em resumo estes foram os experimentos realizados e os seus respectivos resultados:

No teste do campo aberto, timol nas doses de 25 e 50 mg/Kg não alterou a atividade locomotora espontânea dos animais. As doses de 25 e 50 mg/Kg diminuíram o número do grooming. O comportamento de grooming pode estar associado com a estimulação de receptores dopaminérgicos, o que sugere que o Timol possa agir nestes receptores, entretanto, estudos de binding devem ser posteriormente executados para confirmar esta hipótese

No teste do Labirinto em Cruz Elevado, Timol nas duas doses estudadas aumentou todos os parâmetros analisados, sugerindo uma possível ação ansiolítica.

O mecanismo de ação ansiolítico do timol parece estar relacionado com o receptor GABA A benzodiazepínico pois no teste do LCE a ação ansiolítica do timol foi revertida pelo flumazenil um já conhecido antagonista deste receptor. Este resultado sugere que o efeito ansiolítico provavelmente está relacionado com o sistema GABAérgico.

No teste do rota rod, a coordenação motora dos animais não foi alterada, sugerindo que o timol nas doses estudadas não apresenta efeito miorelaxante.

No teste do tempo de sono induzido por pentobarbital, timol nas duas doses estudadas não alterou a latência do sono, porém aumentou o tempo de sono somente na dose de 50mg/Kg, indicando um efeito parcial que deve ser posteriormente esclarecido, visto a não especificidade deste teste.

No teste de convulsão induzida por pentilenotetrazol o timol aumentou a latência da convulsão mas não alterou a latência de morte, nem protegeu da morte.

Nos testes do nado forçado e suspensão da cauda, timol em ambas as doses apresentaram um efeito antidepressivo. Esse efeito foi confirmado pelo resultado do teste do campo aberto, descartando-se hiperatividade.

Os mecanismos envolvidos no efeito antidepressivo do timol foi analisado no teste do nado forçado através da administração dos antagonistas específicos. Seu efeito foi revertido pelo pré-tratamento dos animais com PCPA (um inibidor da síntese de serotonina).

Prazosina e loimbina (antagonistas dos receptores adrenérgicos), SCH23390 e Sulpirida (antagonistas dos receptores dopaminérgicos). Estes resultados sugerem que timol apresenta efeito antidepressivo associado aos sistemas serotoninérgico, noradrenérgico e dopaminérgico.

Através dos testes realizados, pode-se sugerir que o timol possui atividade ansiolítica, relacionado com o sistema gabaérgico. E apresentou efeitos antidepressivos relacionado com os sistemas noradrenérgico, dopaminérgico e serotoninérgico.

A administração de Timol em camundongos parece desencadear efeitos centrais, do tipo ansiolítico e antidepressivo, em animais expostos a modelos de estresse agudo. O potencial efeito ansiolítico foi observado em modelos animais de ansiedade como o labirinto em cruz elevado e a ação antidepressiva foi verificada nos testes de nado forçado e de suspensão da cauda em modelos agudos de depressão. Além dessas ações, no mesmo estudo observou-se um possível efeito sedativo-hipnótico com aumento da latência do sono.

Dentre as ações observados, o efeito antidepressivo do timol foi melhor analisado. Com o intuito de se delinear o mecanismo de ação da substância, utilizou-se antagonistas farmacológicos específicos, e foi observado que o efeito antidepressivo da timol no teste do nado forçado parece ser mediado, pelo menos

em parte, por alguns receptores dos sistemas noradrenérgico, serotonérgico e dopaminérgico indicando, junto com os demais resultados, que os estudos com o Timol podem ser bastante promissores. Vale ressaltar que, os efeitos comportamentais observados são desprovidos de qualquer alteração motora, o que eliminou fortemente os vieses.

2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A depressão é uma séria condição médica que apresenta uma profunda preocupação para a saúde pública uma vez que é uma doença crônica e incapacitante e afeta cerca de 17% da população mundial, 11,5 milhões de casos foram registrados no Brasil (OMS, 2017).

O desenvolvimento da depressão pode estar relacionado a uma combinação de diversos fatores, entender os efeitos, os possíveis engatilhadores e os tratamentos da doença é essencial para promover o bem estar dos indivíduos afetados. É neste sentido que diversos estudos estão sendo realizados para uma melhor elucidada etiologia da depressão e do desenvolvimento de fármacos mais eficazes, com diminuição da latência do efeito terapêutico e das recaídas, menos efeitos indesejáveis, mais baratos e mais seguros.

O uso de produtos provenientes da natureza como matéria-prima para síntese de substâncias bioativas, especialmente fármacos, vem sendo citados ao longo do tempo. É de interesse dos pesquisadores, estudarem substâncias isoladas de plantas, por apresentarem grande potencial no mercado. A obtenção de novos fármacos, adjuvantes ou medicamentos fitoterápicos, mais eficazes e seguros são de fundamental importância e para isto é relevante que haja estudos pré-clínicos de *screening* de novas drogas com potencial terapêutico.

O Timol é um monoterpene isolado do óleo essencial de muitas plantas e tem o seu efeito descrito por exemplo como agente antimicrobiano e anti-inflamatório, porém seus efeitos no SNC ainda não foram completamente elucidados. Considerando a importância de estudos pré-clínicos em busca de novas terapias

para os transtornos mentais, foi proposto no presente trabalho, investigar as possíveis mecanismos de ação central do Timol em camundongos considerando que os estudos prévios revelaram propriedades centrais em modelos experimentais relacionados a depressão, ansiedade e convulsão.

Ressaltando que a avaliação da toxicidade de uma substância também torna-se relevante para darmos continuidade as pesquisas, propomos também avaliar a segurança pré clínica do timol.

Resultados positivos da ação central do timol poderão posteriormente serem a base para a realização de estudos clínicos em seres humanos e quem sabe futuramente a implementação deste fármaco de origem natural para tratamento de desordens neurocomportamentais.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar a toxicidade pré-clínica e os possíveis mecanismos de ação central do timol em camundongos enfatizando a avaliação neuroquímica e a participação do estresse oxidativo.

3.2 Específicos

- Avaliar a toxicidade pré-clínica do Timol com a administração aguda e subcrônica através de doses repetidas em camundongos.
- Análise da atividade antidepressiva através do teste do nado forçado, o envolvimento com o sistema serotoninérgico e seus receptores 5HT1, 5HT2A/2C, 5HT3.
- Determinar os níveis de monoaminas (dopamina, noradrenalina, serotonina e seus respectivos metabólitos) em córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado de camundongos através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC);
- Avaliar as alterações nos sistemas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase em córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado dos animais submetidos ao estresse induzido pelo nado forçado e os efeitos do timol sobre estes sistemas;
- Determinar o índice de peroxidação lipídica MDA, a concentração de glutathione reduzida (GSH) e a produção de nitrito e nitrato no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado; nos animais submetidos ao estresse induzido pelo nado forçado e os efeitos do timol sobre estes sistemas;
- Investigar o efeito do timol sobre os níveis de BDNF no hipocampo camundongos submetidos ao estresse pelo teste do nado forçado.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Óleo Essencial

O óleo essencial de timol (*5-methyl-2-isopropylphenol*) fórmula química: C₁₀H₁₄O, foi utilizado nos experimentos deste estudo com, em forma de pó cristalizado produzido pela empresa Sigma-Aldrich.

4.2 Drogas e Reagentes

Quadro 1- Principais drogas e reagentes utilizados no estudo.

Drogas/ Reagentes	Origem
Água Destilada	Deionizador
Álcool Etílico P. A.	Quimex, Brasil
Imipramina	Geigy
Fluoxetina	Geigy
Ondansetron	Sigma-Aldrich.
Ritanserina	Sigma-Aldrich.
NAN-190	Sigma-Aldrich.
Timol	Sigma-Aldrich.
Tween 80	Sigma-Aldrich.

4.3 Equipamentos

Quadro 2- Equipamentos

Equipamentos	Modelo/Origem
Agitador de tubos	Modelo 251, FANEN. SP-Brasil
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 (eppendorf)	Marathon 26 KMR, Fisher Scientific
Cronômetro	Incoterm, Brasil
Cubetas	Sarstedt, Alemanha
Degaseificador	DGU-2 Shimadzu Corp, Japan
Detector eletroquímico	L-ECD-6 Shimadzu Corp, Japan
Equipamento de Milipore (filtração)	Milipore Apparatus, Bedford, MA USA
Espectrofotômetro	Beckman DU 640B, Fullerton, CA USA
Estufa de secagem e esterilização	Modelo 315 SE FANEN, Brasil
Filtros de fibra de vidro	GF/B Whatman, Maidstone, England
Freezer a -70%	ULT 2586-3D14, Revco
Homogeneizador	Asheville, NC USA
Recipiente do Nado Forçado	Fabricado pelo laboratório
Sonicador	PT 10-35 Brinkmann
Pipetas automáticas	H. E., Dinamarca
Vidrarias	Pirex, Brasil

4.4 Animais

Os animais utilizados nos experimentos foram Camundongos albinos da espécie *Mus musculus* e da variedade Swiss, adultos, do sexo masculino, pesando aproximadamente 25 a 30g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, onde os mesmos foram mantidos em caixas plásticas, com

controle de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), com ciclo claro/escuro de 12h e livre acesso a comida e água.

Este estudo foi previamente submetido ao Comitê de Ética em Pesquisas Animais (CEPA) da Universidade Federal do Ceará (UFC) e aprovado com protocolo de número 59/2014.

4.5 Preparo da droga e vias de administração

O Timol foi dissolvido em 2% de Tween 80 e diluído em água destilada, obtendo a concentração final de 2,5 mg/mL e 5,0 mg/mL, que correspondem as doses de 25mg/kg e 50mg/Kg respectivamente. Ambas as doses foram administradas por via oral (v.o.). Os grupos controle receberam veículo (água destilada emulsificada com 2% de Tween 80).

As demais drogas utilizadas nos experimentos tais como Imipramina (10 mg/Kg), Fluoxetina (35 mg/Kg), NAN-190 (0,5 mg/Kg), Ondansetron (0,1 mg/Kg) foram dissolvidas e diluídas diretamente em água destilada, com exceção da Ritanserina (4 mg/Kg) que foi dissolvida em DMSO, foram administradas por via intraperitoneal. O volume total de solução administrada nos animais foi de 10mL/Kg.

4.6 Tratamento dos grupos experimentais

Os animais foram tratados com Timol, de forma aguda, nas doses de 25mg/kg e 50mg/Kg. Os testes foram realizados após 30 minutos dos tratamentos administrados por via intraperitoneal ou 60 minutos após o tratamento por via oral. As alterações comportamentais com relação ao tempo de imobilidade, foram avaliadas utilizando o teste do “nado forçado”, para a investigação do envolvimento do sistema serotoninérgico e para indução do estresse agudo através do desespero comportamental induzido por este teste para a investigação neuroquímica e participação do estresse oxidativo.

4.7 Protocolo Experimental

Os experimentos foram realizados durante o dia em dias distintos, onde diferentes grupos de animais foram observados em um ambiente fechado, silencioso e à temperatura constante de aproximadamente ($24 \pm 1^\circ\text{C}$).

4.7.1 Ensaio de Toxicidade

4.7.1.1 Ensaio de Toxicidade Oral Aguda

A toxicidade oral aguda foi realizada pela inexistência prévia destes dados na literatura através de um protocolo. Foi seguido as recomendações estabelecidas no guia OECD 423/2001. As doses recomendadas pelo protocolo são de 5mg, 50mg, 300mg e 2000mg (**Figura 9**). Foi elegida a dose de 2000 mg/kg pois as demais doses já tinham sido estudadas com diferentes finalidades e não foram relatados sinais de toxicidade.

A avaliação da toxicidade aguda do timol foi iniciada com a formação de 2 grupos experimentais contendo 3 animais cada ($n=3$), sendo camundongos swiss adultos, machos (20-30g). No primeiro grupo foi administrado oralmente água destilada e tween 80 (grupo controle/veículo), o outro grupo foi tratado com a dose oral de timol 2000mg/kg.

A observação dos animais após a administração da dose foi realizada por 6 horas no primeiro dia e 30 minutos por dia até 14 dias após a administração. O protocolo também recomenda de no caso de algum animal em estado moribundo e apresentando sinais permanentes de angústia devem ser sacrificados sem dor. Na ocasião de morte de 1 ou mais animais o experimento deverá ser repetido.

Após a administração oral das doses os animais permaneceram 2 horas em jejum. As observações recomendadas são com relação a alterações na pele e pelos, olhos e mucosas, aparelho respiratório, circulatório, autônomo e SNC, tremores, convulsões, aspecto e frequência das fezes, salivação, letargia e sonolência. O peso dos animais foi medido antes do início das administrações e no 14º dia da observação dos animais.

No 14º. dia todos os animais foram sacrificados, os órgãos foram removidos por técnicas cirúrgicas adequadas, sendo estes o cérebro, o fígado e os rins para análise macroscópica, preparo das lâminas e posteriormente a análise microscópica. Os órgãos inteiros forma analisados com relação ao tamanho, coloração e aspecto e após isso foram mergulhados no formol por 24horas, lavados com soro fisiológico e mergulhados em álcool 70% por mais 24horas, para então serem realizados os cortes.

Os fragmentos foram colocados em recipientes do tipo K7, identificados e armazenados em frascos contendo álcool a 70%. As lâminas foram confeccionadas em cortes de parafina pelo método Hematoxilina-eosina (HE).

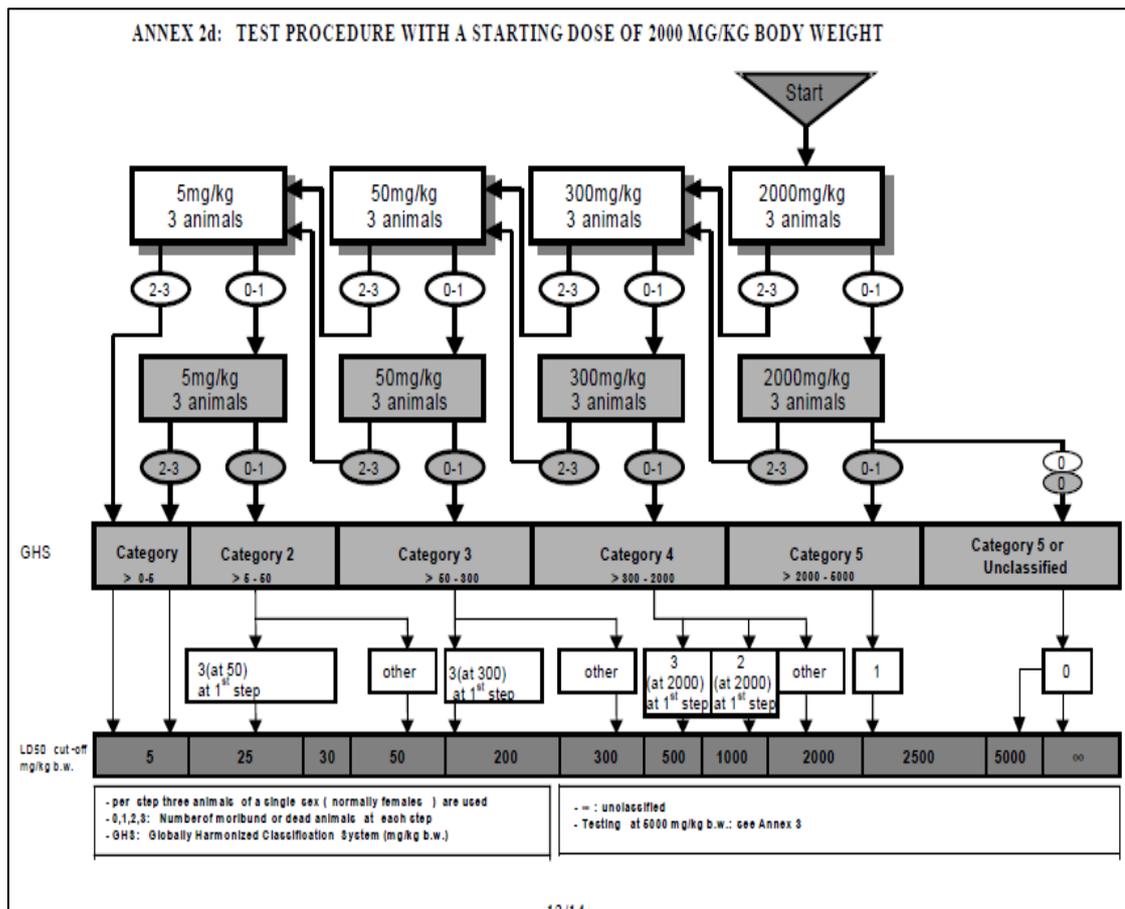


Figura 9: Protocolo OECD 423/2001.

4.7.2 Avaliação da toxicidade oral de doses repetidas por 28 dias

Para a avaliação da toxicidade oral de doses repetidas foram utilizados 20 camundongos Swiss (20-30g), distribuídos em 2 grupos de 10 animais cada: controle (tratado com veículo) e Timol. Os grupos receberam diariamente durante 28 por via oral, veículo e Timol (500 mg/kg; v.o.). Os pesos dos animais foram medidos semanalmente bem como observados quanto ao aparecimento de sinais tóxicos e letais. Os procedimentos foram baseados no guia OECD 407/2008 para Estudo de Toxicidade Oral com Dose repetida de 28 dias em roedores.

Ao final dos 28 dias de tratamento, os animais foram submetidos a uma coleta de sangue pelo plexo orbital. Em seguida, foram sacrificados e alguns órgãos retirados (cérebro, rim, coração e fígado) e fixados em formol a 10% para serem analisados.

Com a amostra de sangue retirada foram avaliados parâmetros hematológicos como: número de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular médio (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), número de plaquetas, número de leucócitos e número de linfócitos. Também foi determinado alguns parâmetros bioquímicos como ureia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT).

4.7.2.1 Procedimentos analíticos

Todas as análises hematológicas e bioquímicas foram realizadas no laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da UFC, com a parceria da Profa. Dra. Maria Goretti Rodrigues de Queiroz.

4.7.2.2 Análise dos parâmetros hematológicos

Para a determinação dos parâmetros hematológicos número de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM),

hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), número de plaquetas, número de leucócitos e número de linfócitos utilizou-se sangue total coletado em tubos contendo EDTA como anticoagulante.

Os valores absolutos das variáveis acima mencionadas foram obtidos através do aparelho semi-automático Symex KX-21N Roche®, cuja metodologia baseia-se no princípio da impedância e espectrofotometria. Previamente a inserção da amostra no analisador, o sangue era cuidadosamente homogeneizado.

4.7.2.3 Análise dos parâmetros bioquímicos

Para a determinação da ureia, creatinina, AST e ALT, a coleta de sangue foi realizada em tubos contendo heparina sódica. Após meia hora da coleta, as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm durante 15 minutos e o plasma retirado. As quantificações foram realizadas através de kit's colorimétricos da Labtest® e Bioclin®.

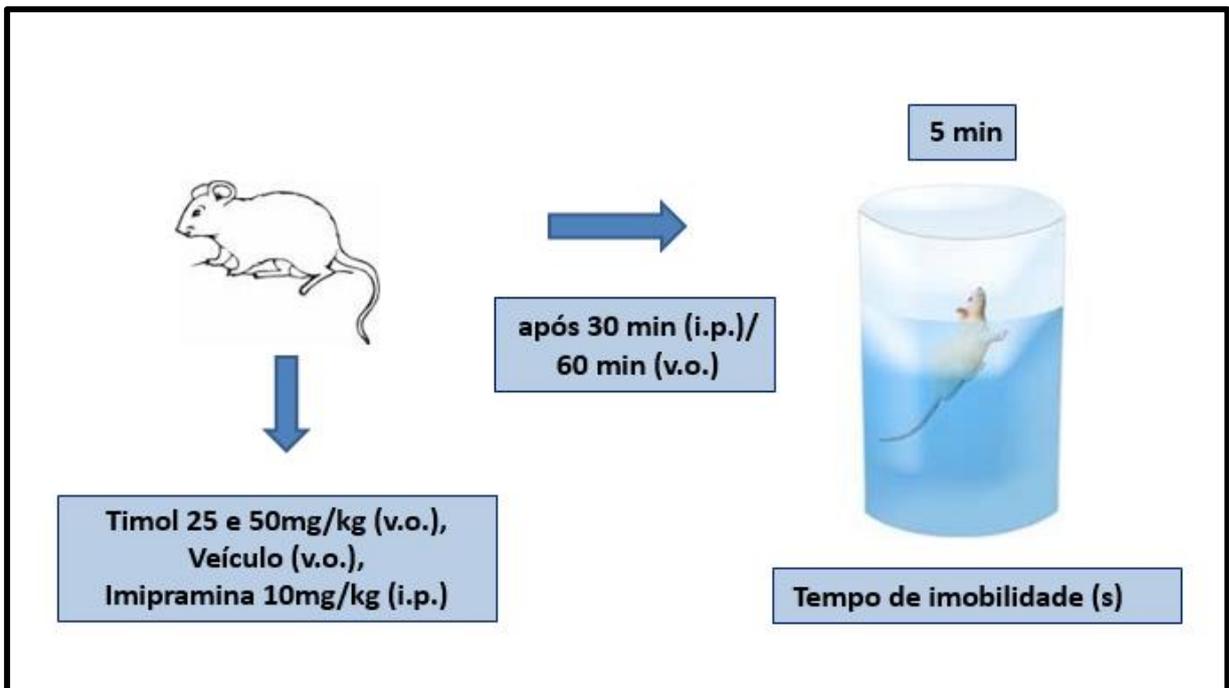
4.8 Testes comportamentais

4.8.1 Avaliação da Atividade Antidepressiva

4.8.1.1 Teste do Nado Forçado

O experimento consiste numa exposição a um tanque de água (22 cm de diâmetro e 40 cm de altura) por 5 minutos. Deve-se colocar água fresca a 25°C até a metade do tanque, cerca de 20cm. Seguindo a metodologia original descrita em 1978 por Porsolt *et al.* Imipramina 10 mg/kg (i.p.) foi utilizada como droga-padrão, a fim de verificar a confiabilidade do teste. Este teste também foi utilizado para investigar os efeitos do Timol sobre o sistema serotoninérgico e envolvimento de seus receptores na depressão.

Quadro 3. Teste do nado forçado em camundongos

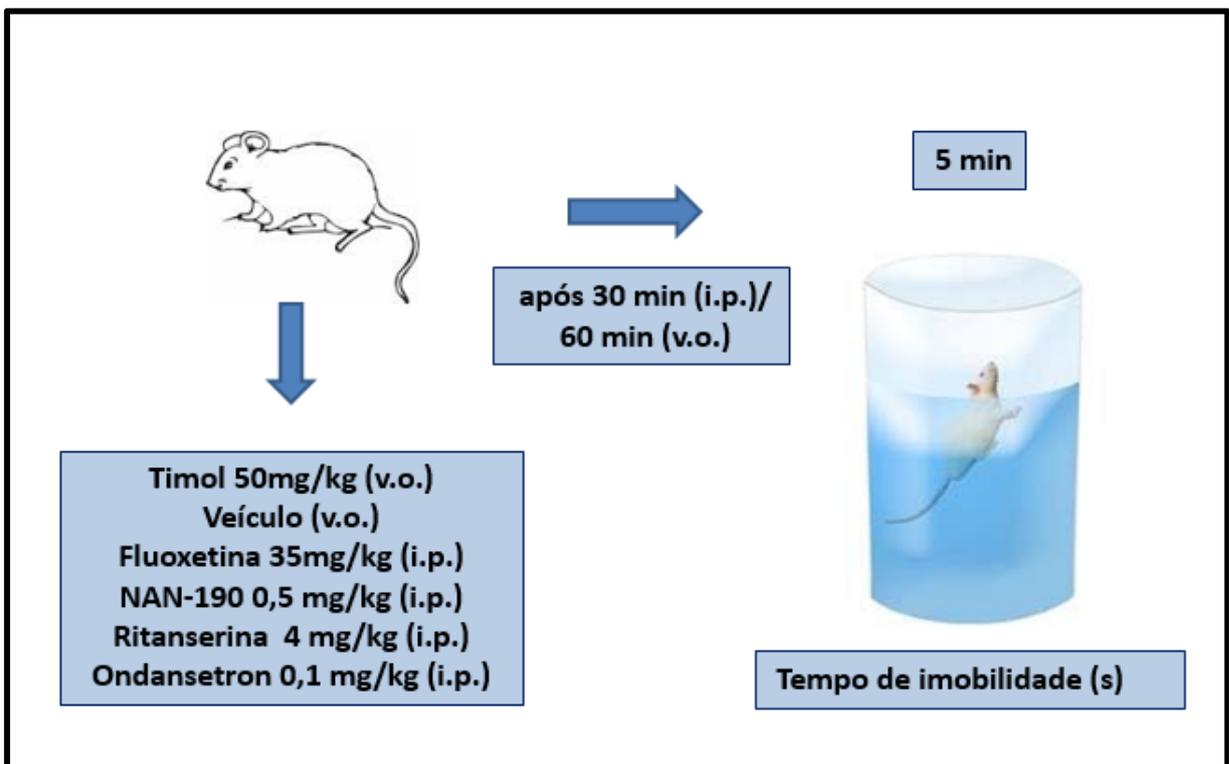


Fonte: Elaborado pela autora da pesquisa.

4.8.1.2 Avaliação da participação do sistema serotoninérgico

Foram formados grupos distintos para a avaliação do envolvimento dos receptores serotoninérgicos. Os animais foram pré-tratados com NAN-190 (0,5 mg/kg i.p.) um antagonista do receptor 5HT1A, Ritanserina (4mg/kg i.p.) um antagonista do receptor 5HT2A2C, ou Ondansetron (0,1 mg/kg i.p.) um antagonista do receptor 5HT3, 30 minutos antes da administração do Timol (50 mg/kg v.o.) ou Fluoxetina (35 mg/kg i.p.). Após 60 minutos administração do Timol, veículo ou Fluoxetina, os animais foram submetidos ao nado forçado onde o tempo de imobilidade foi avaliado durante 5 minutos.

Quadro 4: Avaliação do envolvimento do sistema serotoninérgico.



Fonte: Elaborado pela autora da pesquisa.

Protocolo dos Experimentos Neuroquímicos

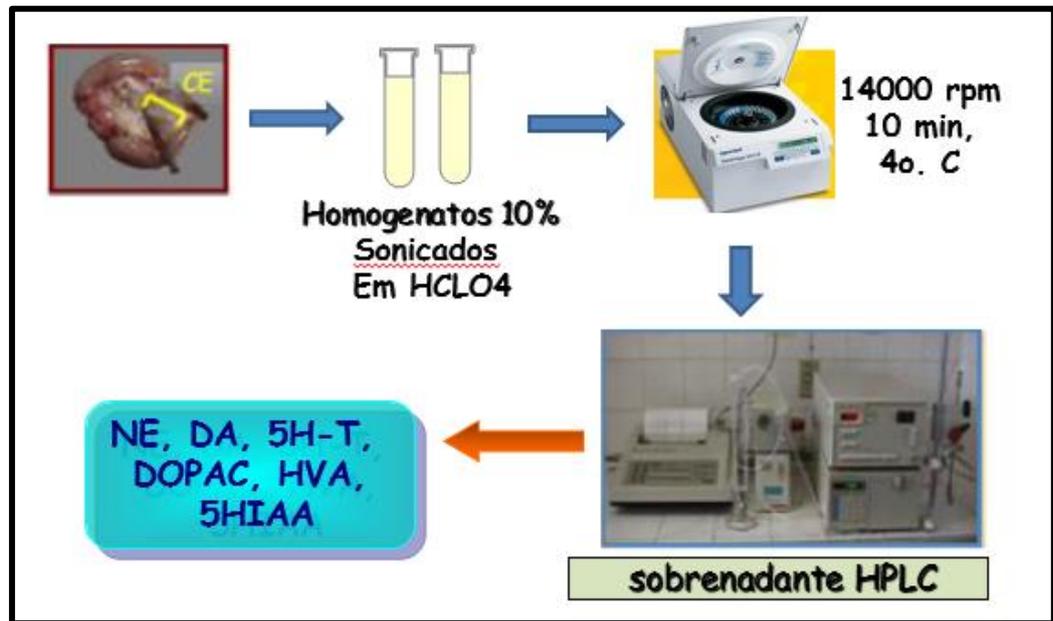
Após a indução do estresse através do teste do nado forçado, os animais foram sacrificados por decapitação, dissecados imediatamente após a morte, e os cérebros rapidamente removidos, colocados sobre papel alumínio em uma placa de Petri com gelo. O hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal foram retirados e armazenados em eppendorfs devidamente identificados, pesados e conservados no freezer a -70°C para uso posterior no preparo de homogenatos cerebrais, conforme a análise determinada.

4.9 Determinação da Concentração das Monoaminas

As monoaminas, compostos que possuem apenas um grupamento amina, compreendem a noradrenalina (NA), dopamina (DA) e a serotonina (5-HT). Os ácido diidrofenil acético (DOPAC) e ácido homovalínico (HVA) são metabólitos da dopamina, já o ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) é derivado da serotonina.

A análise de monoaminas e seus metabólitos no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado foi realizada através da utilização de HPLC (High Performance Liquid Chromatograph) com detecção eletroquímica. O equipamento consiste em um detector eletroquímico com eletrodo de carbono vitreado, bomba e injetor. Para a análise de monoaminas, foi utilizada uma coluna Shimadzu CLC-ODS (M). A fase móvel foi preparada com ácido cítrico (0.163 M), em um pH 3.0 contendo 0.02 mM EDTA, com 0.69 mM de ácido octanesulfônico sódio (SOS), como parte de reagentes iônicos, 4 % v/v acetonitrila e 1,7% v/v tetrahidrofurane. NE, DA, DOPAC, 5-HT, 5-HIAA e HVA foram eletronicamente detectados usando um detector amperométrico (Modelo L-ECD-6A; Shimadzu Corp., Japan) por oxidação do eletrodo de vidro de carbono de 0.85 V relativo para um eletrodo de referências Ag-AgCl. Os cromatogramas foram registrados e quantificados por um integrador. A quantidade dos neurotransmissores e seus metabólitos foram calculados por comparação da altura dos picos com a média dos padrões.

Quadro 5: Esquema da análise das monoaminas e seus metabólitos em corpo estriado dos animais submetidos ao teste do nado forçado.



Fonte: Elaborado pela autora da pesquisa.

Avaliação do estresse oxidativo

4.10 Determinação da Atividade dos Sistemas Antioxidantes

4.10.1 Método da Determinação da Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi medida de acordo com o estudo original de Sun, Larry e Ying (1988). A quantidade da enzima foi avaliada medindo-se sua capacidade de inibir a redução fotoquímica do azul de nitro-tetrazolio (NBT). Nesse método a riboflavina reduzida fotoquimicamente gera O_2^- o qual reduz o NBT produzindo Formazan que absorve no comprimento de onda de 560nm. Na presença de SOD a redução do NBT é inibida.

Os resultados foram expressos em unidades da enzima por grama de proteína, que é a quantidade de SOD necessária para inibir a taxa de redução do NBT em 50%. O homogenato das áreas cerebrais (10% em tampão fosfato) foi centrifugado (10 minutos, 3600 rpm a 4°C).

O sobrenadante retirado foi centrifugado novamente (20 min, 12000 rpm, 4°C). Para o ensaio foi utilizado o sobrenadante. Numa câmara escura foram misturados 1mL do meio de reação (tampão fosfato 50mM, EDTA 100nM e L-metionina 13mM pH 7,8) 30 μ L da amostra, 150 μ L do NBT 75 μ M e 300 μ L riboflavina 2 μ M. Os tubos contendo a solução obtida serão expostos a lâmpadas fluorescentes (15W) por 15 minutos. Ao término do tempo o material foi lido em espectrofotômetro 560nm. A concentração de proteínas foi medida utilizando o método de Lowry (1951).

4.10.2 Método da Determinação da Atividade da Catalase (CAT)

A atividade da catalase tem como princípio a medida da velocidade de produção de O_2 e H_2O à proporção que a H_2O_2 , utilizado como substrato é hidrolisado. Foi preparado o meio de reação contendo (H_2O_2 , Tampão Tris HCl 1M EDTA 5mM pH = 8,0, H_2O Mimmi-Q). Foi adicionado 15 μ L da amostra (sobrenadante do homogenato tecidual a 10% com tampão fosfato) + 985 μ L do meio de reação preparada anteriormente. A atividade da enzima foi medida em 230nm, através de um espectrofotômetro Beckman DU, acoplado a um sistema de modernização da Gilford, USA, permitiu leituras automáticas em sistema digital e

forneceu maior sensibilidade. A atividade enzimática foi medida através da leitura da variação da absorvância por minuto, durante 6 minutos.

4.10.3 Método da Determinação da Concentração da Glutathiona Reduzida (GSH)

Os níveis de GSH foram avaliados para estimar defesas endógenas contra o estresse oxidativo. O método é baseado na reação de reagente de Ellman (DTNB), com grupos tiol livres. Foram retirados 400µL do homogenato e adicionados a 320µL de água destilada e mais 80µL de ácido tricloroacético a 50%. O material foi centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos. Em seguida, foram recolhidos 400µL do sobrenadante e acrescidos 800µL de tampão Tris-HCl 0,4M, pH 8,9 e mais 20µL de DTNB 0,01M aos poços da placa de ELISA e após 1 minuto da reação foi feita a leitura da coloração a 412nm (SEDLAK et al., 1968). A concentração de glutathiona reduzida foi expressa em µg de GSH/g de tecido, tendo por base uma curva padrão.

- Curva padrão de Glutathiona Reduzida (GSH)

A partir da solução padrão de GSH (1mg/mL), foi preparado 4mL (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 tudo das soluções de GSH será acrescentado de 4 mL de tampão Tris HCl 0,4M (pH 8,9). Foi adicionado ainda a cada tubo 0,1 mL de DTNB (0,01M) e feita a leitura da absorvância a 412 nm após 1 min da adição do DTNB, foi determinada a equação da curva padrão de GSH.

4.10.4 Método da Determinação da Peroxidação Lipídica (TBARS)

O grau de lipoperoxidação nas áreas cerebrais foi medido através da determinação dos níveis de malonildialdeído (MDA), conforme o método de Huong *et al.* (1998), seguindo o protocolo a seguir.

Foram preparados os homogenatos das áreas cerebrais a 10% em tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM, pH 7,4 e 63µL destes foram adicionados a 100 µL de ácido perclórico 35% em tubos *ependorf*, que foram centrifugados a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C. Em seguida 150 µL do sobrenadante foram adicionados a 50 µL de ácido tiobarbitúrico 1,2%, que ficaram

em banho-maria a 95°C por 30 minutos. Por fim, 150 µL da mistura foram adicionados aos poços da placa de ELISA e, posteriormente, foi feita a leitura a 535nm. Os resultados foram expressos em µg de MDA/g de tecido.

4.10.5 Método da Determinação do Conteúdo de Nitrito

Para avaliar os efeitos do tratamento com as respectivas drogas na produção de NO, foram determinados os níveis de nitrito nos homogenatos, pelo método de Green et al. (1981). Para esse experimento 100 µL do Reagente de Griess (ácido fosfórico 5%, sulfonilamida 1% em ácido fosfórico 5%, NEED 0,1% e água destilada) foram adicionados a 100 µL do sobrenadante do homogenato e incubados a temperatura ambiente por 10 min.

A curva padrão foi elaborada com várias concentrações de NaNO₂ (variando de 0,75 a 100 mM) sob as mesmas condições. Os brancos foram preparados pela adição de 100 µL do Reagente de Griess a 100 µL do tampão usado para o homogenato (fosfato de potássio monobásico 50 mM, pH 7,4). A absorbância foi medida em leitor de microplacas em 540 nm, e o resultado expresso em µM de nitrito/g de tecido.

4.11 Dosagem de BDNF

Os níveis de BDNF foram quantificados no hipocampo, homogeneizado a 20 volumes de tampão PBS pH 7,4 com adição de inibidor de protease (Sigma-Aldrich). A dosagem de BDNF em cada amostra foi feita por ensaio imunoenzimático (ELISA; R&D Systems, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

Resumidamente, as placas para ELISA de 96 poços foram incubadas com o anticorpo de captura para BDNF por 18h em temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com 200µL de tampão de lavagem (R&D Systems, EUA) e bloqueadas com 200µL de BSA 1% (R&D Systems, EUA) por 1 h. Após o bloqueio, 100µL das amostras ou da curva padrão foram adicionadas em cada poço e incubadas por 2 h em temperatura ambiente. As placas foram então lavadas três vezes com 200µl de tampão de lavagem e depois incubadas com anticorpo de detecção em temperatura ambiente por 2 horas. Na etapa seguinte, as placas foram

lavadas novamente por três vezes com 200µL de tampão de lavagem e incubadas com 100 µL de estreptavidina em temperatura ambiente por 20 minutos. Novamente, as placas foram lavadas três vezes com 200µL de tampão de lavagem. Na etapa seguinte, 100 µL da solução substrato para revelação (R&D Systems, EUA) foram adicionadas em cada poço e incubadas por 20 min à temperatura ambiente protegidos da luz. A reação enzimática foi cessada, adicionando 50 µL solução de parada (H₂SO₄). Enfim, a absorbância foi medida à 450nm. O resultado dos níveis de BDNF foram expressos em pg/g de tecido.

Na realização da investigação dos níveis de BDNF, foi realizado previamente o teste do nado forçado, o controle positivo do grupo imipramina em relação ao controle recebeu apenas veículo (água destilada + tween 80) a este grupo denominamos grupo desafiado devido a situação adversa do desespero comportamental na tentativa das escapadas no teste do nado forçado. Para viabilizar a análise dos níveis de BDNF, formamos outro grupo com animais controle que receberam apenas a administração oral do veículo (água destilada + tween 80) e não foram submetidos ao nado forçado.

4.12 Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada pelo programa *Graph Pad Prism* 6.0 (USA). Para os testes com mais de três grupos foi feita a análise estatística empregando o teste de análise de variância (ANOVA). Para verificar se houve diferença significativa entre os grupos, foi realizado o teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls. Para a análise dos testes com apenas dois grupos, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney (t-test). Os resultados foram expressos como média ± E.P.M (variáveis com distribuição normal) ou mediana com máximo e mínimo, sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Ensaio de Toxicidade Aguda

5.1.1 Avaliação comportamental

A avaliação da toxicidade aguda do timol foi iniciada com a formação de 2 grupos experimentais contendo 3 animais cada (n=3). No primeiro grupo foi administrado por gavagem água destilada e tween 80 (grupo controle/veículo), o outro grupo foi tratado com a dose oral de timol 2000mg/kg.

A partir da 1ª. hora e até 6 horas seguidas após a administração oral dos grupos, os animais foram observados com relação a presença de sinais sugestivos de toxicidade, entre eles: piloereção, agitação ou letargia, alterações respiratórias, sonolência, alterações e frequência das evacuações, taquicardia, tremores, dentre outras. Todo o procedimento foi realizado seguindo as recomendações do guia para avaliação da toxicidade oral aguda (OECD 423/2001).

A observação dos animais demonstrou que o grupo controle não apresentou alterações, no entanto os que receberam a dose de 2000mg/kg apresentaram: letargia, taquicardia, tremores e piloereção, o animal 6 foi a óbito em menos de 24 após a administração oral desta dose.

Como ocorreu a morte de 1 animal do grupo 2000mg/kg, o experimento foi repetido com um grupo experimental (n=3) seguindo os mesmos padrões de observação, dissecação e retirada dos órgãos do experimento anterior.

No 1º. dia da administração os animais apresentaram apenas letargia e piloereção e nenhuma alteração nos dias subsequentes até o 14º. dia, nem perda de peso e todos sobreviveram (Tabela 1).

Tabela 1. Pesos e observações quanto ao aparecimento dos sinais de toxicidade

	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6
Dose (mg/Kg)	veículo	veículo	veículo	2000	2000	2000
Peso inicial(g)	32	31	30	29	30	28
Peso final (g)	37	36	34	32	36	--
Observações 1º. Dia	SST	SST	SST	Letargia Piloereção	Letargia Piloereção	Piloereção Tremores Taquicardia
Observações 14º. Dia	SST	SST	SST	SST	SST	-----
Mortalidade	-	-	-	-	-	Em menos de 24h

SST: Sem Sinais de Toxicidade.

No 14º. dia todos os animais foram sacrificados, alguns órgãos foram removidos (cérebro, fígado e rins) para análise macroscópica, preparo das lâminas e análise microscópica. Os órgãos inteiros não apresentaram alterações com relação ao tamanho, coloração e aspecto. Os fragmentos dos órgãos foram colocados em recipientes do tipo K7, identificados e armazenados em frascos contendo álcool a 70%. As lâminas foram confeccionadas em cortes de parafina pelo método Hematoxilina-eosina (HE).

5.1.2 Avaliação histológica

No último dia de observações todos os animais foram sacrificados e seus órgãos (cérebro, fígado e rins) foram retirados para averiguar possíveis danos, através de análise histológica.

A análise das lâminas não demonstrou alterações em nenhum dos órgãos, seja na sua ultraestrutura ou sinais de processo inflamatório quando analisados microscopicamente (Figura 10).

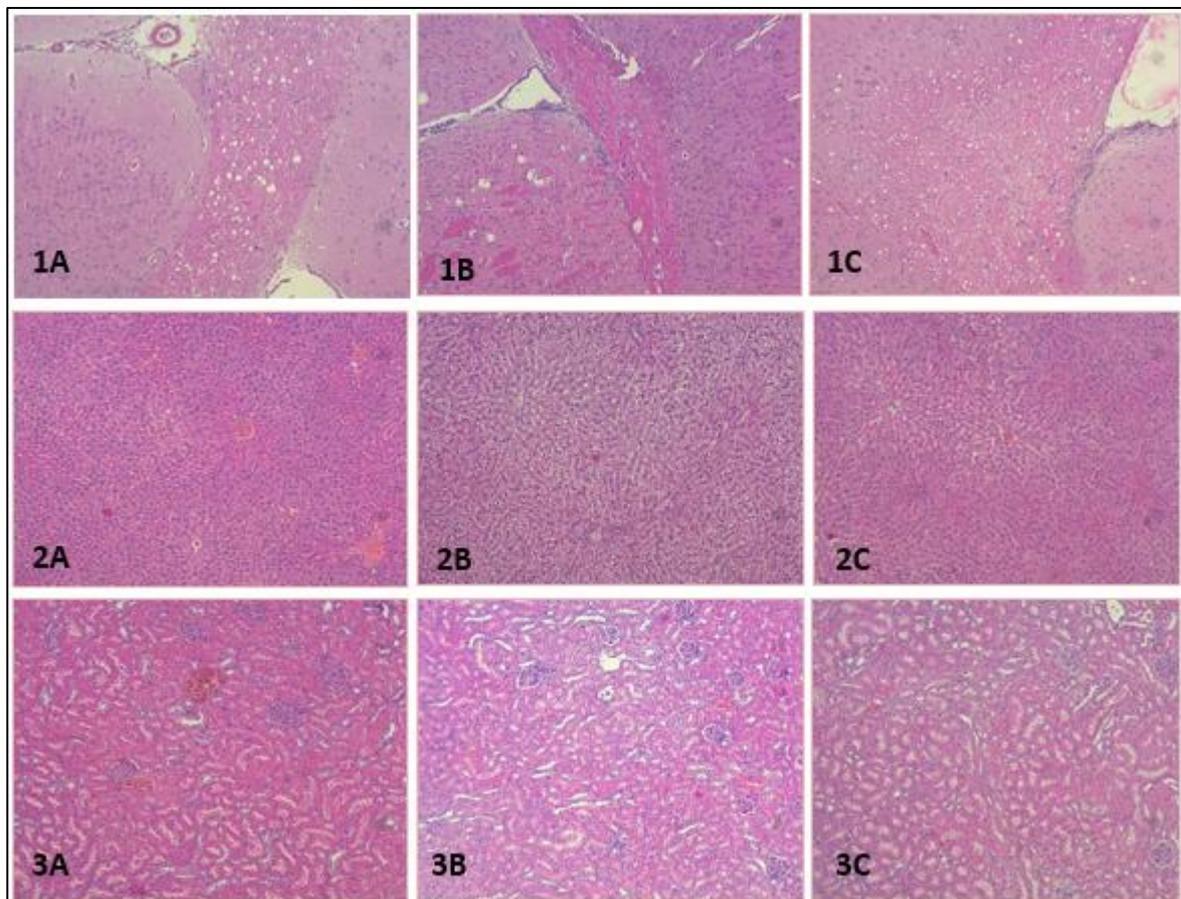


Figura 10: Análise histológica dos seguintes órgãos respectivamente: cérebro, fígado e rim. Captados no 14º dia após o término da avaliação da toxicidade aguda. (Aumento de 10x) Legenda: 1A, 2A, 3A (Controle/veículo); 1B, 2B, 3B (Timol 2000mg/kg) Teste 1; 1C, 2C, 3C (Timol 2000mg/kg) Teste 2.

A classificação de segurança do timol com relação a toxicidade aguda é sugerida como de categoria 5 (OECD 423/2001), com uma estimativa de uma DL50 acima 5000mg/kg.

Embora estes resultados não tenham apontado danos nos órgãos internos, resolvemos realizar um outro experimento seguindo um protocolo de doses repetidas, com o objetivo de investigar se o uso crônico do timol poderia acarretar efeitos nocivos.

5.2 Toxicidade oral do Timol no protocolo de doses repetidas por 28 dias

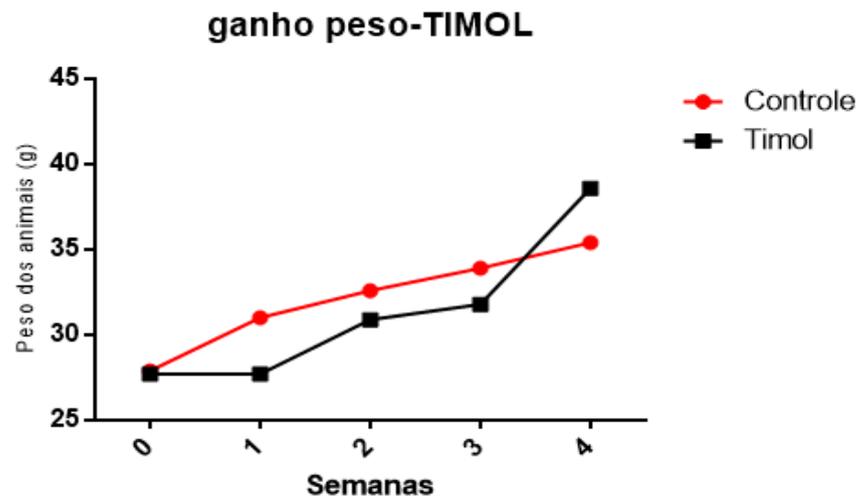
5.2.1 Sobrevivência, massa corpórea, avaliação comportamental e análise macroscópica dos órgãos.

A sobrevivência ao tratamento durante 28 dias com veículo e Timol 500 mg/kg administradas diariamente em doses repetidas, não ocasionou a morte de nenhum animal. A massa corpórea não sofreu alterações significativas, observamos um ganho de peso natural em todos os grupos experimentais (Gráfico 1).

Após a administração da dose diariamente os animais eram observados em caixas de polietileno por até 2 horas após a administração. Não apresentaram alterações comportamentais nem sinais de toxicidade como mudanças no aspecto dos pelos, tremores, convulsão, aumento da salivação, letargia e coma.

Não foram verificadas alterações macroscópicas nos órgãos retirados (Cérebro, coração, fígado, estômago e rins) após o tratamento de doses repetidas com o Timol 500mg/kg. Os procedimentos foram baseados no protocolo (OECD 407/2008).

Gráfico 1: Média do ganho de peso dos animais no teste de toxicidade oral por 28 dias



Animais tratados com veículo (controle) e Timol-500 mg/Kg durante 28 dias. Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram expressos como média.

5.2.2 Análise dos parâmetros hematológicos

Os animais foram tratados com Timol-500 mg/kg por 28 dias, dose 10x superior a dose preconizada para os experimentos. O sangue foi retirado da artéria orbital.

Os resultados mostraram que o leucograma apresentou uma pequena redução nos linfócitos e nos leucócitos, já o eritrograma e a plaquetometria não apresentaram nenhuma diferença significativa em relação aos animais do grupo controle (Tabela 2).

Tabela 2: Eritrograma, plaquetograma e leucograma dos camundongos no teste de toxicidade oral por 28 dias.

PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS	GRUPOS EXPERIMENTAIS	
	Controle	Timol
	Média ± E.P.M	Média ± E.P.M
Hemácias ($10^6/\mu\text{L}$)	8.627±0.1202	8.702±0.1969
Hemoglobina (g/dL)	13.93±0.2761	13.22±0,2118
Hematócrito (%)	46.62±0.85715	45.23±0.8087
VCM (fL)	54.03±0.6518	52.05±0,5879
HCM (pg)	16.15±0.2045	16.22±0.1692
CHCM (g/dL)	29.89±0.1991	29.23±0.1904
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	14.04±48.74	13.84±43.58
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	4.163±0.2847	3.413±0.1846*
Linfócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	3.600±0.2322	2.788±0.1977*

VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média. Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram expressos como média ± EPM. Para a análise estatística foi utilizado *t-test* com Mann-Whitney *post test*. Valores significativos* $p < 0,05$.

5.2.3 Análise dos parâmetros bioquímicos

As determinações bioquímicas de marcadores de função renal e hepática não apresentaram diferença significativa entre os grupos experimentais (Tabela 3).

Tabela 3: Níveis plasmáticos de uréia, creatinina, AST e ALT dos camundongos após o tratamento diário consecutivo por 28 dias com Timol ou Controle (Veículo).

PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	GRUPOS EXPERIMENTAIS	
	Controle	Timol
	Média ± E.P.M	Média ± E.P.M
Ureia (mg/dL)	58.67±2.512	54.40±2.845
Creatinina (mg/dL)	0.4440±0.0918	0.4360±0.03370
AST (U/L)	88.00±7.358	83.33±8.543
ALT (U/L)	43.33±3.127	38.00±5.416

Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram expressos como média ± EPM. Para a análise estatística foi utilizado *t-test* com Mann-Whitney *post test*.

Testes Comportamentais

5.3 Avaliação do envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito antidepressivo do timol no teste do nado forçado

5.3.1 Avaliação do envolvimento do receptor 5 HT1A

O pré-tratamento com NAN-190, antagonista do receptor 5 HT1A, seguido do tratamento com timol na dose de 50 mg/kg [$50,20 \pm 7,08$ (10)] não reverteu o efeito de redução do tempo de imobilidade demonstrado pelo timol sozinho, porém quando administrado juntamente com a Fluoxetina reverteu o seu efeito no redução do tempo de imobilidade, apresentando valores significativos [$121,0 \pm 4,89$ (10)] (Figura 11).

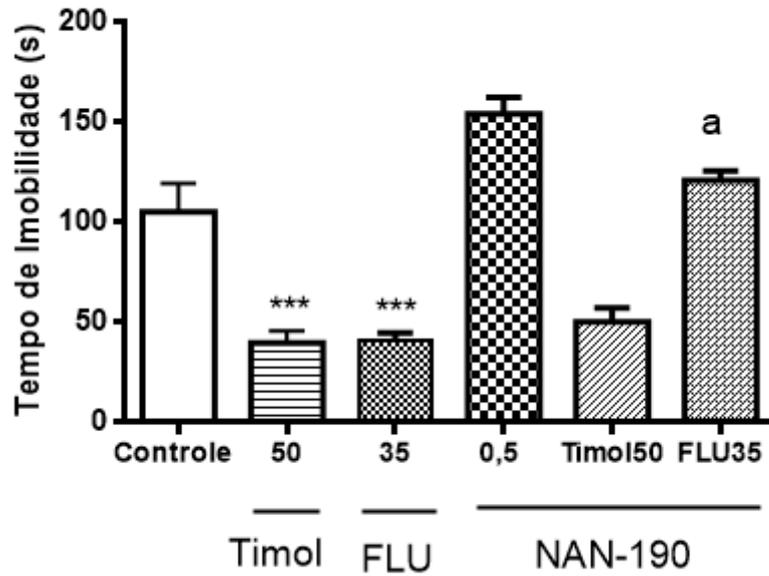


Figura 11: Efeito do timol (50 mg/kg) e fluoxetina (35mg/kg) sozinho ou associado com NAN-190 (0,5 mg/kg) sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos.

Controle (veículo), Timol (50 mg/kg v.o.), Fluoxetina (FLU 35mg/Kg i.p.) foram administrados 60 minutos (v.o.) ou 30 minutos (i.p.) antes do experimento. Quando associados foram administrados 30 minutos após a administração de NAN-190 (0,5 mg/Kg i.p.) e 60 minutos depois foi realizado o experimento. Os valores expressam a média \pm EPM do tempo de imobilidade durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos *** $p < 0,001$ vs controle, a $p < 0,001$ vs FLU 35.

5.3.2 Avaliação do envolvimento do receptor 5 HT2A/2C.

O envolvimento do receptor 5 HT2A/2C foi avaliado através do antagonista Ritanserina no teste do nado forçado em camundongos. O grupo pré-tratado com a ritanserina foi posteriormente tratado com timol 50mg/kg [142,0 ± 8,78 (8)] e fluoxetina FLU-35 [120,4 ± 7,39 (8)] como controle positivo. Ambos tiveram uma reversão do seu efeito na redução do tempo de imobilidade revertidos na presença deste antagonista serotoninérgico (Figura 12).

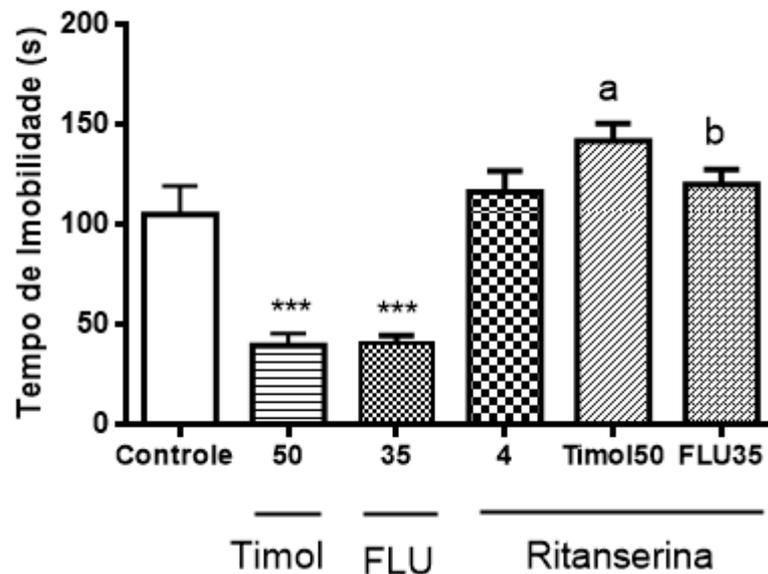


Figura 12: Efeito do timol (50 mg/kg) e fluoxetina (35mg/kg) sozinho ou associado com Ritanserina (4 mg/kg) sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos.

Controle (veículo), Timol (50 mg/kg v.o.), Fluoxetina (FLU 35mg/Kg i.p.) foram administrados 60 minutos (v.o.) ou 30 minutos (i.p.) antes do experimento. Quando associados foram administrados 30 minutos após a administração de ritanserina (4 mg/Kg i.p.) e 60 minutos depois foi realizado o experimento. Os valores expressam a média \pm EPM do tempo de imobilidade durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos *** $p < 0,001$ vs controle, a $p < 0,001$ vs Timol 50; b $p < 0,001$ vs FLU 35.

5.3.3 Avaliação do envolvimento do receptor 5 HT3

O envolvimento do receptor 5 HT3 foi avaliado através da administração do antagonista Ondansetron no teste do nado forçado em camundongos. O grupo pré-tratado com a Ondansetron foi posteriormente tratado com timol 50mg/kg [$136,4 \pm 11,17$ (8)] e fluoxetina FLU-35 [$121,3 \pm 6,16$ (8)] como controle positivo. Ambos tiveram uma reversão do seu efeito na redução do tempo de imobilidade revertidos na presença deste antagonista serotoninérgico (Figura 13).

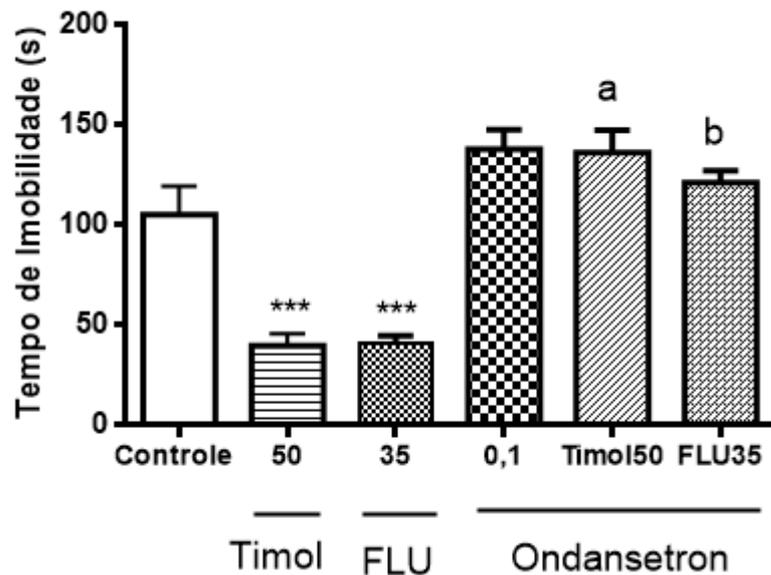


Figura 13: Efeito do timol (50 mg/kg) e fluoxetina (35mg/kg) sozinho ou associado com Ondansetron (0,1 mg/kg) sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos.

Controle (veículo), Timol (50 mg/kg v.o.), Fluoxetina (FLU 35mg/Kg i.p.) foram administrados 60 minutos (v.o.) ou 30 minutos (i.p.) antes do experimento. Quando associados foram administrados 30 minutos após a administração de Ondansetron (0,1mg/Kg i.p.) e 60 minutos depois foi realizado o experimento. Os valores expressam a média \pm EPM do tempo de imobilidade durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos *** $p < 0,001$ vs controle, a $p < 0,001$ vs Timol 50; b $p < 0,001$ vs FLU 35.

Avaliação Neuroquímica

5.4 Determinação dos níveis de monoaminas por HPLC

5.4.1 Determinação dos níveis de Noradrenalina

Os efeitos do timol nas doses de 25mg/kg e 50mg/kg sobre os níveis de noradrenalina em corpo estriado de camundongos estão demonstrados na figura 14. Ocorreu um aumento significativo nos níveis de noradrenalina comparados ao controle [controle: $67,020 \pm 32,282$ (7)], onde encontramos significância na dose de 25mg/kg [timol 25: $222,184 \pm 61,391$ (8)], e maior na dose de 50mg/kg [timol 50: $444,598 \pm 100,893$ (8)].

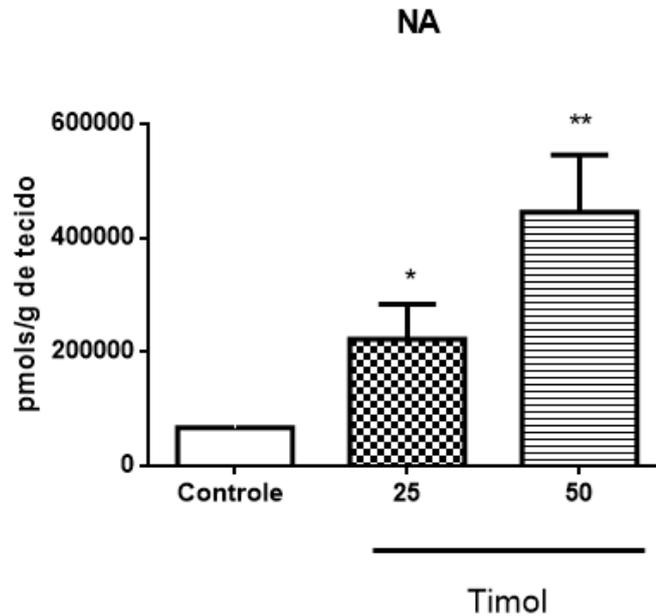


Figura 14. Determinação dos níveis de Noradrenalina (NA) em corpo estriado de camundongos tratados com timol (25 e 50 mg/kg) ou veículo (controle).

Os animais receberam veículo (controle) e timol (25 e 50 mg/kg, v.o.) e após 60 minutos, foram submetidos ao teste do nado forçado. Em seguida foram sacrificados e dissecados para a retirada das áreas. A determinação das monoaminas foi feita pela técnica de HPLC com detecção eletroquímica. Os valores apresentam a média \pm EPM. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido de Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: * $p < 0,05$ vs controle, ** $p < 0,01$ vs controle.

5.4.2 Determinação dos níveis de Dopamina

Os efeitos do timol nas doses de 25mg/kg e 50mg/kg sobre os níveis de dopamina em corpo estriado de camundongos estão demonstrados na figura 15. Ocorreu um aumento significativo nos níveis de dopamina comparados ao controle [controle: $178,752 \pm 59,903$ (8)], onde encontramos significância na dose de 25mg/kg [timol 25: $349,339 \pm 70,191$ (8)], e maior na dose de 50mg/kg [timol 50: $656,107 \pm 82,990$ (8)].

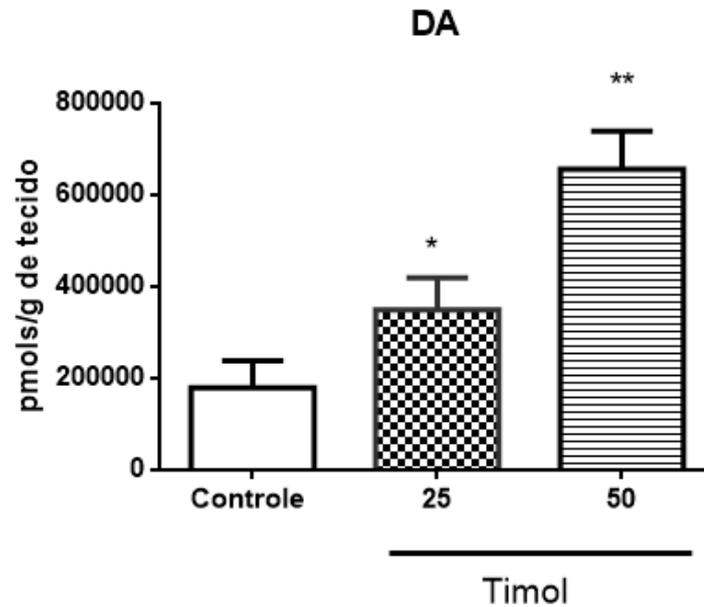


Figura 15. Determinação dos níveis de Dopamina (DA) em corpo estriado de camundongos tratados com timol (25 e 50 mg/kg) ou veículo (controle).

Os animais receberam veículo (controle) e timol (25 e 50 mg/kg, v.o.) e após 60 minutos, foram submetidos ao teste do nado forçado. Em seguida foram sacrificados e dissecados para a retirada das áreas. A determinação das monoaminas foi feita pela técnica de HPLC com detecção eletroquímica. Os valores apresentam a média \pm EPM. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido de Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: * $p < 0,05$ vs controle, ** $p < 0,01$ vs controle.

5.4.3 Determinação dos níveis de Serotonina (5HT).

Os efeitos do timol nas doses de 25mg/kg e 50mg/kg sobre os níveis de serotonina em corpo estriado de camundongos estão demonstrados na figura 16. Ocorreu um aumento significativo nos níveis de serotonina comparados ao controle [controle: $146,256 \pm 13,559$ (6)], onde encontramos significância tanto na dose de 25mg/kg [timol 25: $408,932 \pm 67,900$ (7)], quanto na dose de 50mg/kg [timol 50: $447,157 \pm 79,94$ (8)].

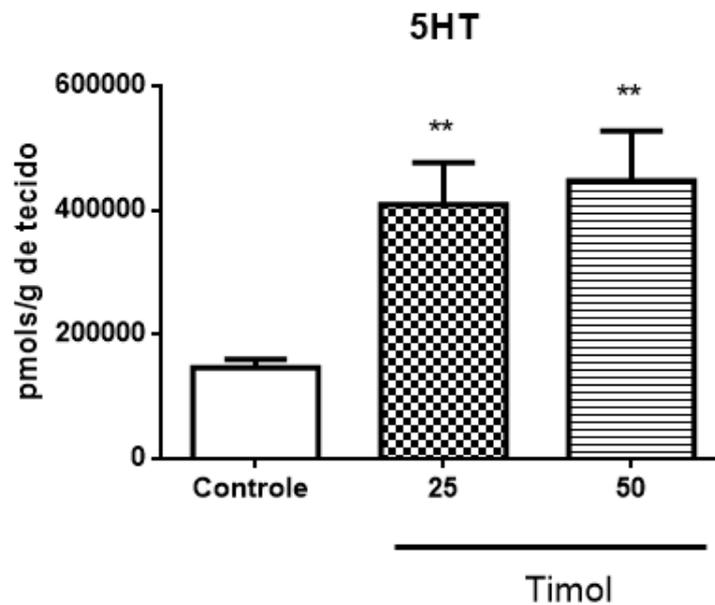


Figura 16. Determinação dos níveis de Serotonina (5HT) em corpo estriado de camundongos tratados com timol (25 e 50 mg/kg) ou veículo (controle).

Os animais receberam veículo (controle) e timol (25 e 50 mg/kg, v.o.) e após 60 minutos, foram submetidos ao teste do nado forçado. Em seguida foram sacrificados e dissecados para a retirada das áreas. A determinação das monoaminas foi feita pela técnica de HPLC com detecção eletroquímica. Os valores apresentam a média \pm EPM. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido de Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: ** $p < 0,01$ vs controle.

5.5 Determinação dos níveis dos metabólitos por HPLC

5.5.1 Determinação dos níveis do metabólito DOPAC

Os níveis de DOPAC se mantiveram sem reduções significantes em corpo estriado de camundongos e estão demonstrados na figura 17. [controle: $191,557 \pm 19,337$ (7)], dose de 25mg/kg [timol 25: $164,59 \pm 11,623$ (8)], dose de 50mg/kg [timol 50: $157,592 \pm 15,653$ (7)].

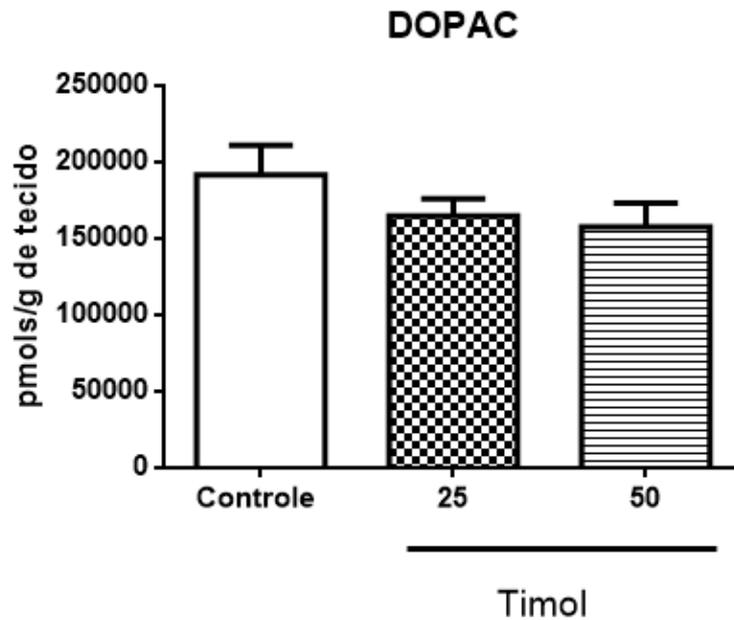


Figura 17. Determinação dos níveis do metabólito (DOPAC) em corpo estriado de camundongos tratados com timol (25 e 50 mg/kg) ou veículo (controle).

Os animais receberam veículo (controle) e timol (25 e 50 mg/kg, v.o.) e após 60 minutos foram submetidos ao teste do nado forçado. Em seguida foram sacrificados e dissecados para a retirada das áreas. A determinação das metabólitos foi feita pela técnica de HPLC com detecção eletroquímica. Os valores apresentam a média \pm EPM. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido de Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

5.5.2 Determinação dos níveis do metabólito HVA.

Os níveis de HVA apresentaram reduções significantivas em corpo estriado de camundongos e estão demonstrados na figura 18. Identificamos reduções significantivas tanto na dose de 25mg/kg [timol 25: $219,326 \pm 48,90$ (7)], como na dose de 50mg/kg [timol 50: $162,691 \pm 45,568$ (7)], quando comparados ao controle [controle: $440,573 \pm 32,085$ (8)].

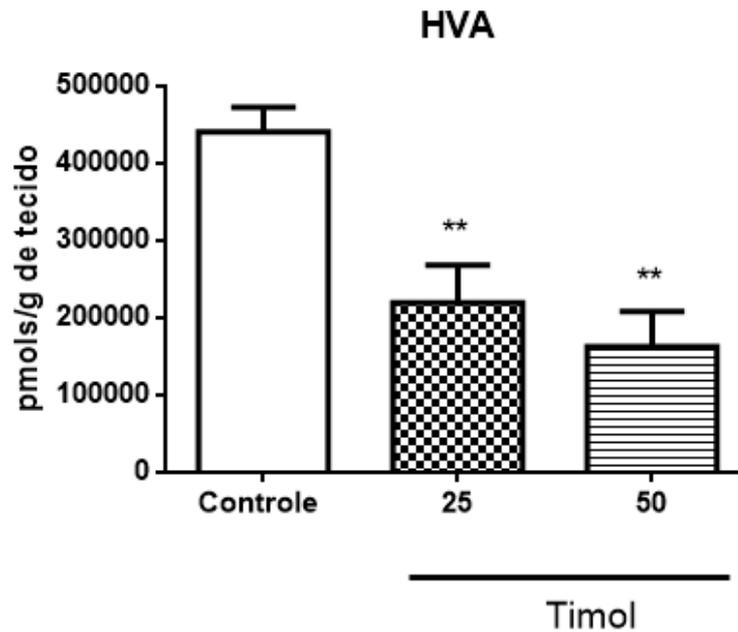


Figura 18. Determinação dos níveis de HVA em corpo estriado de camundongos tratados com timol (25 e 50 mg/kg) ou veículo (controle).

Os animais receberam veículo (controle) e timol (25 e 50 mg/kg, v.o.) e após 60 minutos, foram submetidos ao teste do nado forçado. Em seguida foram sacrificados e dissecados para a retirada das áreas. A determinação das metabólitos foi feita pela técnica de HPLC com detecção eletroquímica. Os valores apresentam a média \pm EPM. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido de Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: ** $p < 0,01$ vs controle.

5.5.3 Determinação dos níveis do metabólito 5HIAA.

Os níveis de 5HIAA apresentaram reduções significativas em corpo estriado de camundongos e estão demonstrados na figura 19. Ocorreu uma redução significativa nos níveis de 5HIAA tanto na dose de 25mg/kg [timol 25: $129,421 \pm 195,05(7)$], como na dose de 50mg/kg [timol 50: $164,931 \pm 336,89 (7)$], quando comparados ao controle [controle: $317,751 \pm 64,417 (8)$].

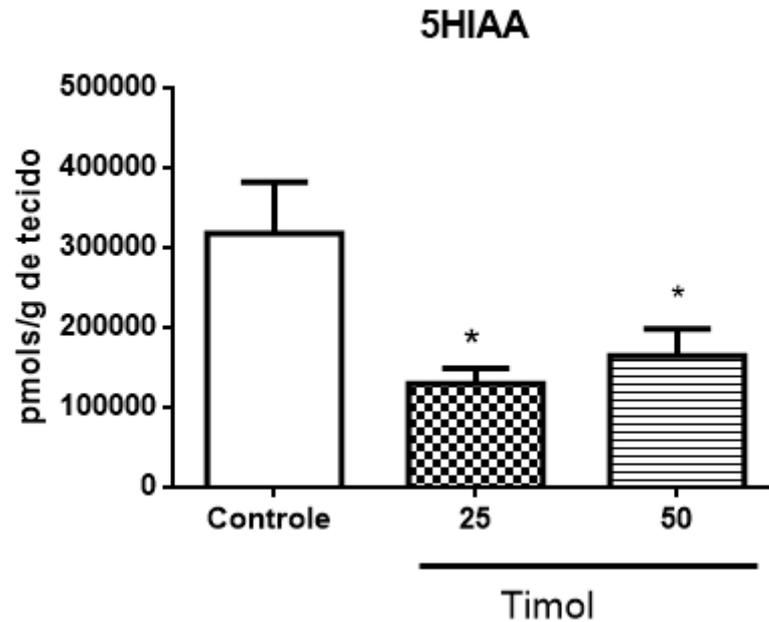


Figura 19. Determinação dos níveis de 5HIAA em corpo estriado de camundongos tratados com timol (25 e 50 mg/kg) ou veículo (controle).

Os animais receberam veículo (controle) e timol (25 e 50 mg/kg, v.o.) e após 60 minutos, foram submetidos ao teste do nado forçado. Em seguida foram sacrificados e dissecados para a retirada das áreas. A determinação dos metabólitos foi feita pela técnica de HPLC com detecção eletroquímica. Os valores apresentam a média \pm EPM. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA seguido de Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: * $p < 0,05$ vs controle.

5.6 Determinação de parâmetros de estresse oxidativo

5.6.1 Efeito do timol sobre a quantidade de SOD em homogenatos cerebrais de animais submetidos ao estresse oxidativo através do teste do nado forçado.

Os grupos experimentais foram submetidos ao estresse agudo através do teste do nado forçado antes da realização do experimento para a dosagem da quantidade da enzima Superóxido dismutase SOD. Os resultados demonstraram que o pré tratamento com o Timol nas doses 25mg/kg e 50mg/kg não alterou significativamente a quantidade de SOD nas áreas cerebrais analisadas em relação aos seus respectivos controles.

Córtex pré-frontal - CPF: [Controle $48,50 \pm 1,70$ (9)], [Timol 25mg/kg $52,38 \pm 2,44$ (8)]; [Timol 50mg/kg $48,50 \pm 3,20$ (8)].(Figuras 20). Corpo estriado - CE [Controle $42,13 \pm 1,84$ (9)]; [Timol 25mg/kg CE: $48,63 \pm 3,45$ (8)]; [Timol 50mg/kg $46,38 \pm 3,76$ (8)].(Figuras 21). Hipocampo - HIP [Controle $46,88 \pm 2,27$ (9)]; [Timol 25mg/kg $47,25 \pm 2,11$ (8)]; [Timol 50mg/kg $54,75 \pm 2,20$ (8)]. (Figuras 22).

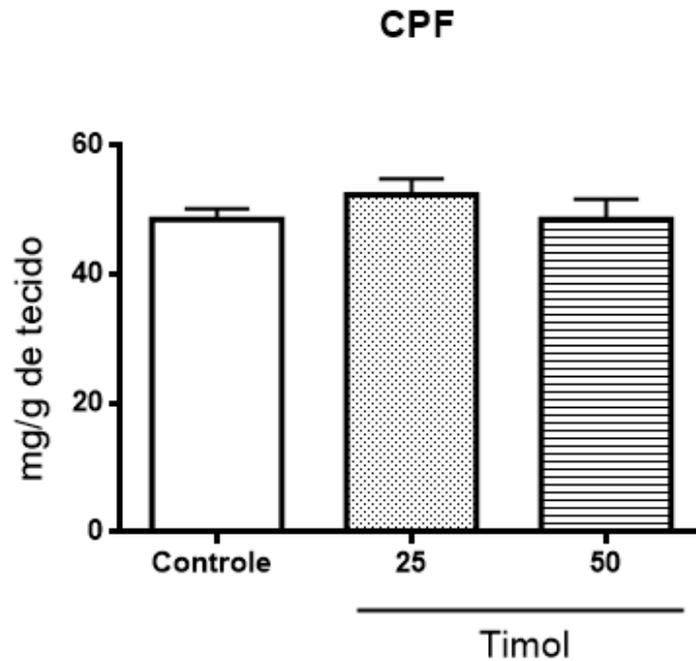


Figura 20: Efeito do timol na quantidade de SOD no córtex pré-frontal (CPF) de animais submetidos ao teste do nado forçado.

Controle (veículo) e Timol (25 mg/kg e 50 mg/kg v.o.), foram administrados 60 minutos (v.o.) antes do experimento. Os animais foram submetidos ao teste do nado forçado e em seguida sacrificados e dissecados. Os valores expressam a média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

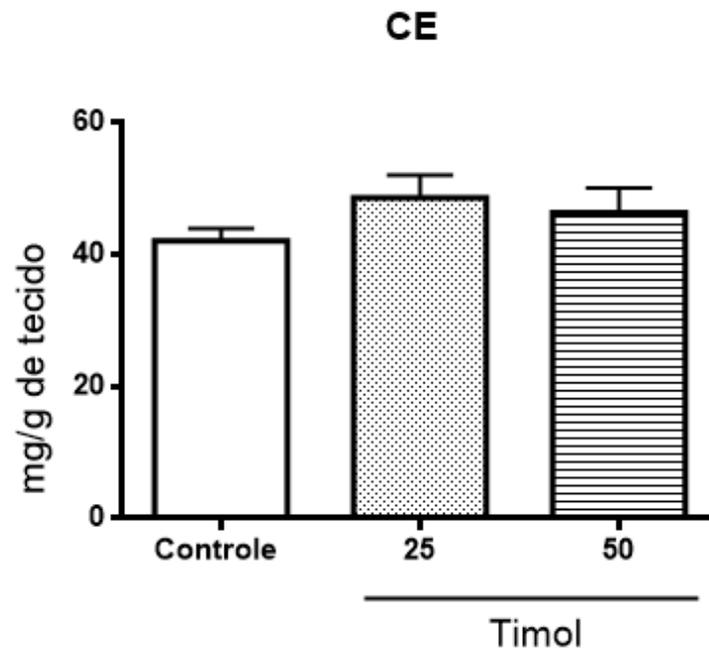


Figura 21: Efeito do timol na quantidade de SOD no corpo estriado (CE) de animais submetidos ao teste do nado forçado.

Controle (veículo) e Timol (25 mg/kg e 50 mg/kg v.o.), foram administrados 60 minutos (v.o.) antes do experimento. Os animais foram submetidos ao teste do nado forçado e em seguida sacrificados e dissecados. Os valores expressam a média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

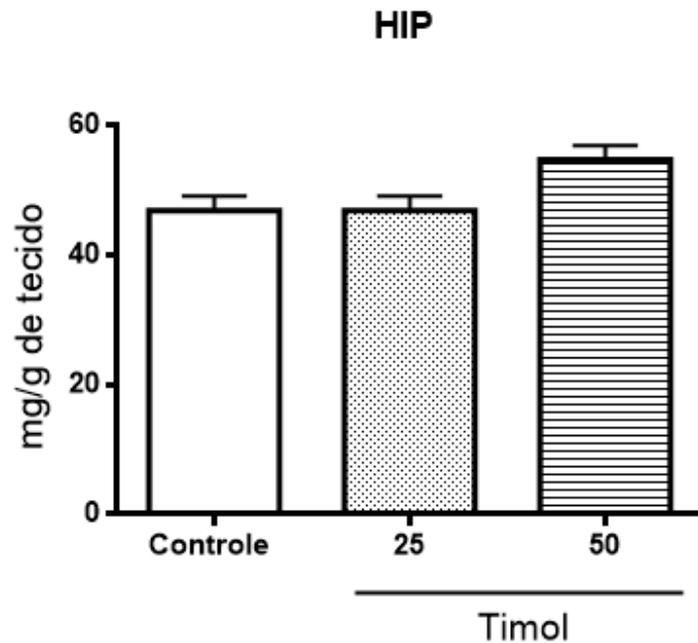


Figura 22: Efeito do timol na quantidade de SOD no Hipocampo (HIP) de animais submetidos ao teste do nado forçado.

Controle (veículo) e Timol (25 mg/kg e 50 mg/kg v.o.), foram administrados 60 minutos (v.o.) antes do experimento. Os animais foram submetidos ao teste do nado forçado e em seguida sacrificados e dissecados. Os valores expressam a média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

5.6.2 Efeito do timol sobre a atividade da catalase em homogenatos cerebrais de animais submetidos ao estresse oxidativo através do teste do nado forçado.

Para análise da produção de catalase, os grupos experimentais previamente submetidos ao estresse agudo através do teste do nado forçado apresentaram os seguintes resultados: os animais pré tratados com o Timol nas doses de 50mg/kg tiveram uma redução significativa na produção de catalase no corpo estriado. Nos demais grupos experimentais não identificamos alterações significativas nas outras áreas cerebrais analisadas em relação aos seus respectivos controles.

Córtex pré-frontal - CPF: [Controle $1934 \pm 95,36$ (10)], [Timol 25mg/kg $1712 \pm 111,1$ (8)]; [Timol 50mg/kg $1696 \pm 150,1$ (8)]. (Figura 23). Corpo estriado - CE [Controle $1982 \pm 106,8$ (10)]; [Timol 25mg/kg $1719 \pm 70,34$ (8)]; [Timol 50mg/kg $1468 \pm 121,9$ (8)] (Figura 24). Hipocampo - HIP [Controle $1945 \pm 99,63$ (10)]; [Timol 25mg/kg $1782 \pm 122,3$ (8)]; [Timol 50mg/kg $1706 \pm 102,7$ (8)] (Figura 25).

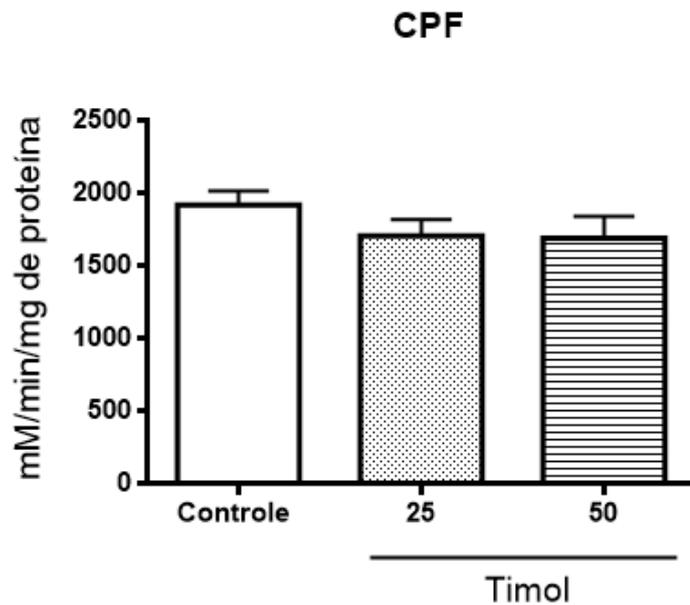


Figura 23: Efeito do timol na sobre a atividade da catalase no Córtex pré frontal (CPF) de animais submetidos ao teste do nado forçado.

Controle (veículo) e Timol (25 mg/kg e 50 mg/kg v.o.), foram administrados 60 minutos antes do experimento. Os animais foram submetidos ao teste do nado forçado e em seguida sacrificados e dissecados. Os valores expressam a média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

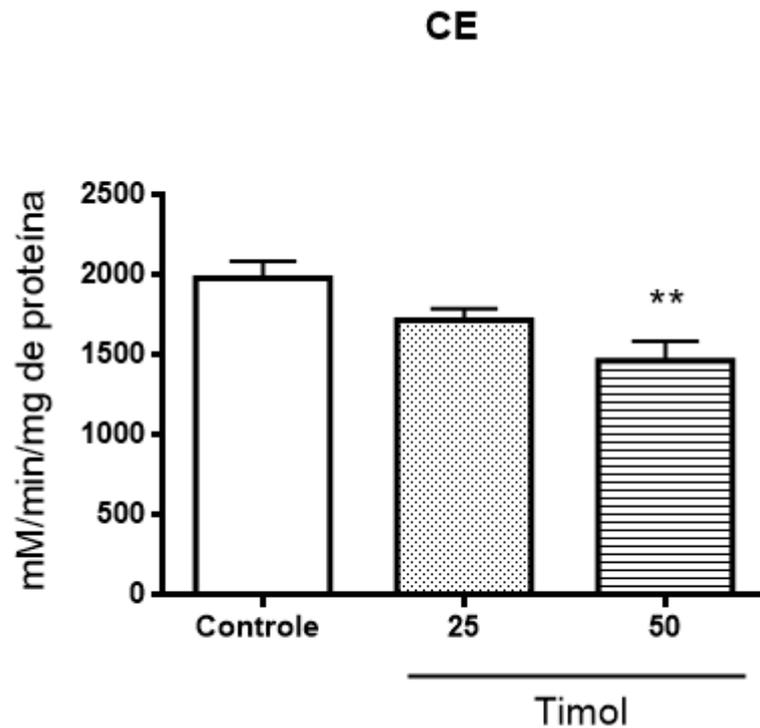


Figura 24: Efeito do timol na sobre a atividade da catalase no Corpo estriado (CE) de animais submetidos ao teste do nado forçado.

Controle (veículo) e Timol (25 mg/kg e 50 mg/kg v.o.), foram administrados 60 minutos antes do experimento. Os animais foram submetidos ao teste do nado forçado e em seguida sacrificados e dissecados. Os valores expressam a média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: ** $p < 0,01$ vs controle.

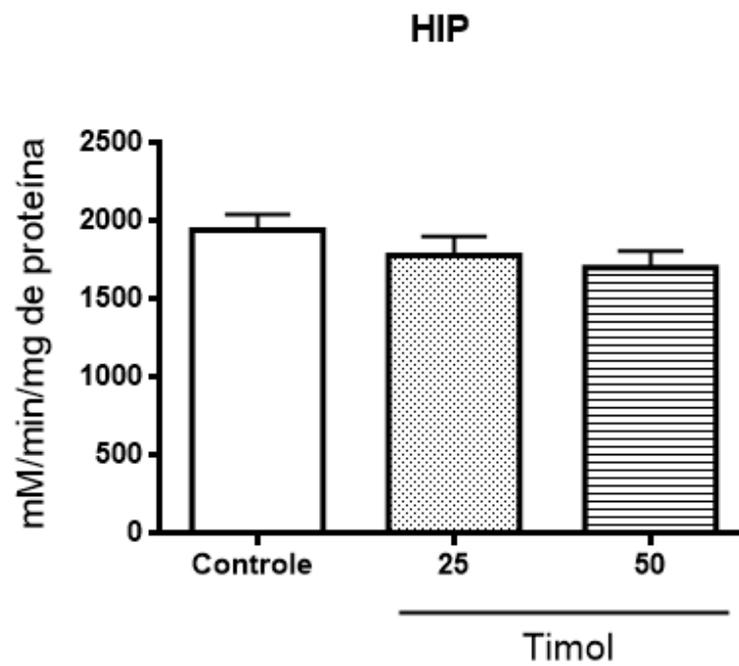


Figura 25: Efeito do timol na sobre a atividade da catalase no Hipocampo (HIP) de animais submetidos ao teste do nado forçado.

Controle (veículo) e Timol (25 mg/kg e 50 mg/kg v.o.), foram administrados 60 minutos antes do experimento. Os animais foram submetidos ao teste do nado forçado e em seguida sacrificados e dissecados. Os valores expressam a média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

5.6.3 Efeito do timol nos níveis de Malonildialdeído MDA em animais submetidos ao estresse oxidativo através do teste do nado forçado.

Os animais de todos os grupos foram submetidos ao estresse agudo através do teste do nado forçado antes da realização das dosagens de MDA. Os resultados demonstraram que o pré tratamento com o Timol nas doses 25mg/kg e 50mg/kg foi capaz de diminuir significativamente os níveis de MDA em todas as áreas cerebrais analisadas em relação aos controles.

Córtex pré-frontal - CPF: [Controle $49,13 \pm 3,14$ (8)], [Timol 25mg/kg $17,07 \pm 1,53$ (8)]; [Timol 50mg/kg $17,97 \pm 1,41$ (8)] (Figura 26). Corpo estriado - CE [Controle $39,85 \pm 8,14$ (8)]; [Timol 25mg/kg $14,32 \pm 0,83$ (8)]; [Timol 50mg/kg $16,13 \pm 1,20$ (8)] (Figura 27). Hipocampo - HIP [Controle $46,64 \pm 4,29$ (8)]; [Timol 25mg/kg $15,42 \pm 1,23$ (8)]; [Timol 50mg/kg $18,86 \pm 1,20$ (8)] (Figura 28).

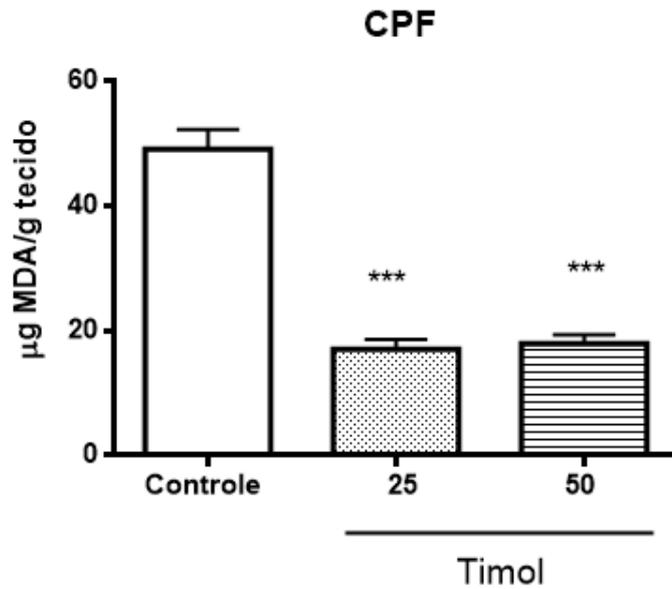


Figura 26: Efeito do timol nos níveis de Malonildialdeído (MDA) do córtex pré-frontal (CPF) de animais submetidos ao estresse oxidativo através do teste do nado forçado.

Controle (veículo) e Timol (25 mg/kg e 50 mg/kg v.o.), foram administrados 60 minutos (v.o.) antes do experimento. Os animais foram submetidos ao teste do nado forçado e em seguida sacrificados e dissecados. Os valores expressam a média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos *** $p < 0,001$ vs controle.

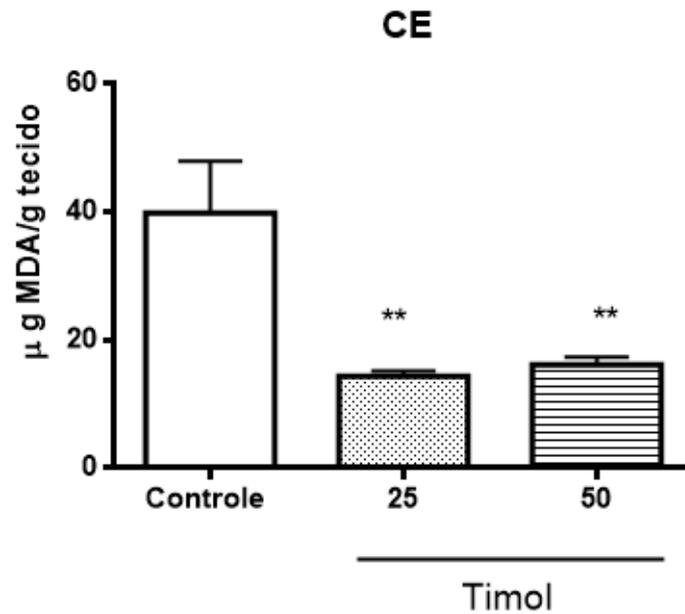


Figura 27: Efeito do timol nos níveis de Malonildialdeído (MDA) do corpo estriado(CE) de animais submetidos ao estresse oxidativo através do teste do nado forçado.

Controle (veículo) e Timol (25 mg/kg e 50 mg/kg v.o.), foram administrados 60 minutos (v.o.) antes do experimento. Os animais foram submetidos ao teste do nado forçado e em seguida sacrificados e dissecados. Os valores expressam a média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos ** $p < 0,01$ vs controle.

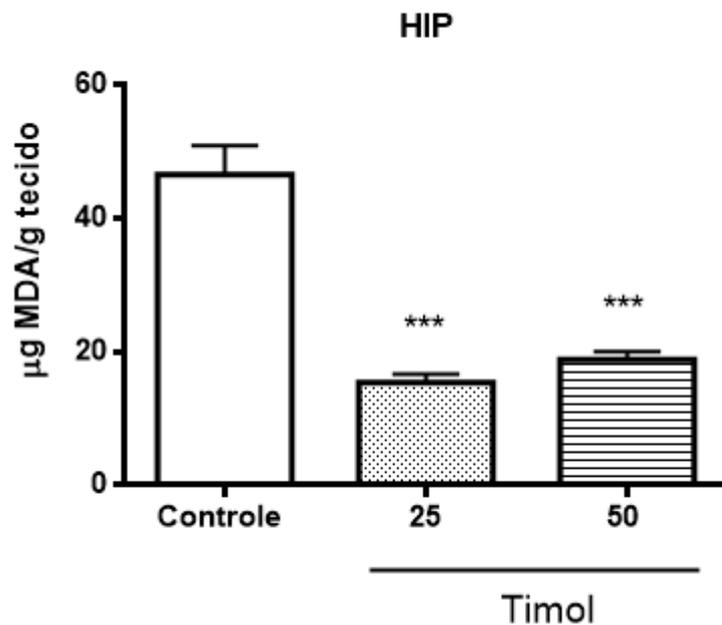


Figura 28: Efeito do timol nos níveis de Malonildialdeído (MDA) nohipocampo (HIP) de animais submetidos ao estresse oxidativo através do teste do nado forçado.

Controle (veículo) e Timol (25 mg/kg e 50 mg/kg v.o.), foram administrados 60 minutos (v.o.) antes do experimento. Os animais foram submetidos ao teste do nado forçado e em seguida sacrificados e dissecados. Os valores expressam a média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos *** $p < 0,001$ vs controle.

5.6.4 Efeito do timol nos níveis de GSH em animais submetidos ao estresse oxidativo através do teste do nado forçado.

As figuras 29, 30 e 31 mostram que houve um aumento nos níveis do GSH nas áreas cerebrais dos animais previamente tratados com o timol 25mg/kg e 50mg/kg e posteriormente submetidos ao teste do nado forçado, em comparação com seus respectivos controles.

Córtex pré-frontal - CPF: [Controle $478,1 \pm 22,76$ (7)], [Timol 25mg/kg $582,6 \pm 37,02$ (8)]; [Timol 50mg/kg $692,0 \pm 24,23$ (8)] (Figura 29). Corpo estriado - CE [Controle $428,0 \pm 25,64$ (7)]; [Timol 25mg/kg $876,0 \pm 57,12$ (8)]; [Timol 50mg/kg $1139,0 \pm 79,93$ (8)] (Figura 30). Hipocampo - HIP [Controle $448,4 \pm 30,26$ (7)]; [Timol 25mg/kg $1028,0 \pm 36,60$ (8)]; [Timol 50mg/kg $1060,0 \pm 53,77$ (8)] (Figura 31).

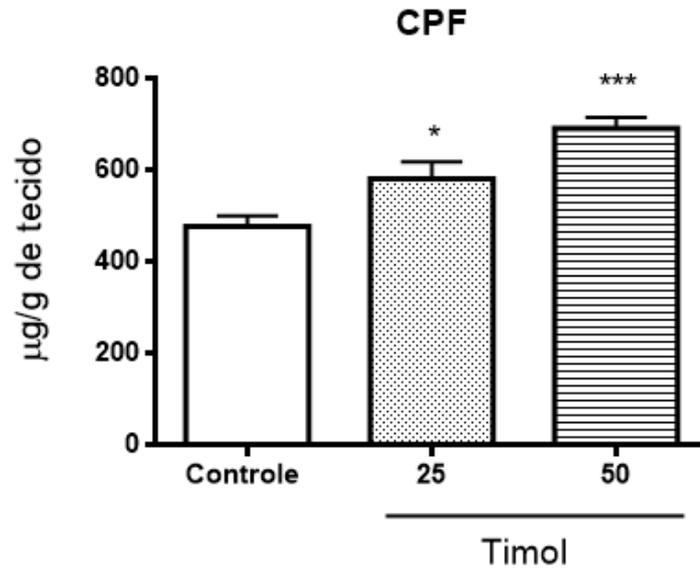


Figura 29: Efeito do timol nos níveis de GSH em córtex pré-frontal (CPF) de animais submetidos ao estresse oxidativo através do teste do nado forçado.

Controle (veículo) e Timol (25 mg/kg e 50 mg/kg v.o.), foram administrados 60 minutos (v.o.) antes do experimento. Os animais foram submetidos ao teste do nado forçado e em seguida sacrificados e dissecados. Os valores expressam a média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos * $p < 0,05$ vs controle; *** $p < 0,001$ vs controle.

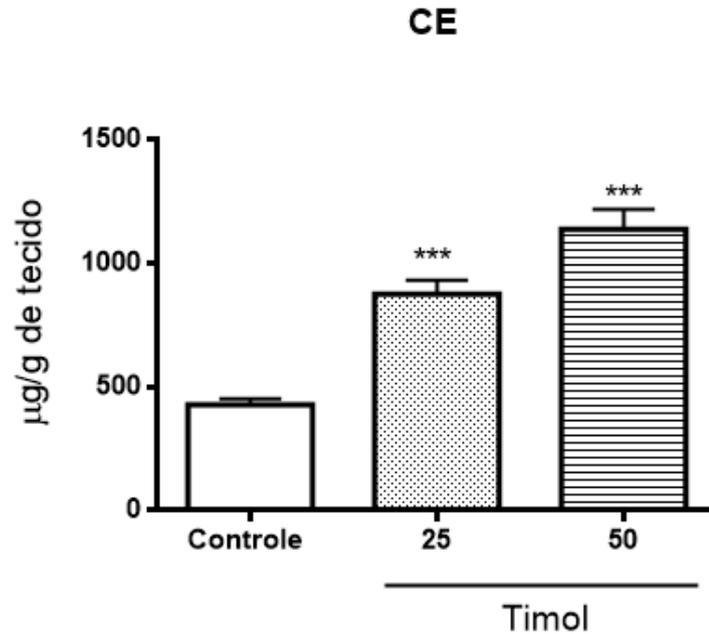


Figura 30: Efeito do timol nos níveis de GSH em corpo estriado (CE) de animais submetidos ao estresse oxidativo através do teste do nado forçado.

Controle (veículo) e Timol (25 mg/kg e 50 mg/kg v.o.), foram administrados 60 minutos (v.o.) antes do experimento. Os animais foram submetidos ao teste do nado forçado e em seguida sacrificados e dissecados. Os valores expressam a média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos *** $p < 0,001$ vs controle.

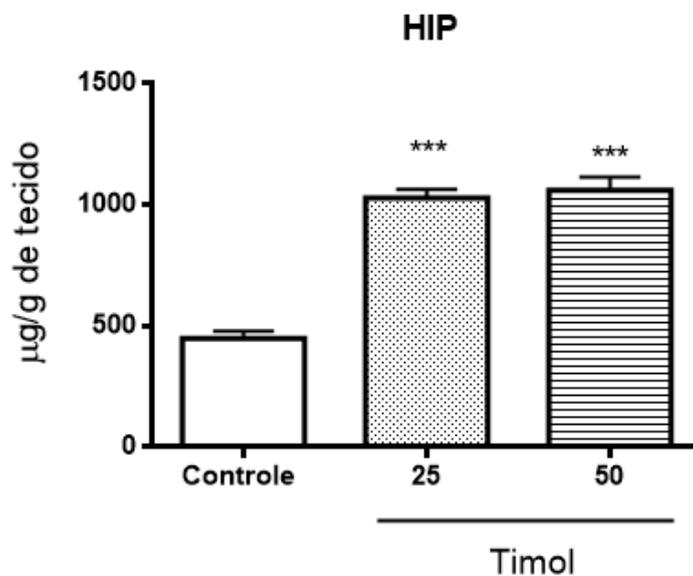


Figura 31: Efeito do timol nos níveis de GSH no Hipocampo (HIP) de animais submetidos ao estresse oxidativo através do teste do nado forçado.

Controle (veículo) e Timol (25 mg/kg e 50 mg/kg v.o.), foram administrados 60 minutos (v.o.) antes do experimento. Os animais foram submetidos ao teste do nado forçado e em seguida sacrificados e dissecados. Os valores expressam a média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos *** $p < 0,001$ vs controle.

5.6.5 Efeito do timol nos níveis de Nitrito/Nitrato em animais submetidos ao estresse oxidativo através do teste do nado forçado.

Todos os animais foram submetidos ao estresse agudo através do teste do nado forçado antes da realização das dosagens de Nitrito/Nitrato. Os resultados demonstraram que o Timol foi capaz de diminuir significativamente os níveis Nitrito/Nitrato em todas as áreas cerebrais analisadas em relação aos respectivos controles.

Córtex pré-frontal - CPF: [Controle $4,72 \pm 0,30$ (8)], [Timol 25mg/kg $3,81 \pm 0,34$ (8)]; [Timol 50mg/kg $3,68 \pm 0,19$ (8)] (Figura 32). Corpo estriado - CE [Controle $5,26 \pm 0,21$ (8)]; [Timol 25mg/kg $4,28 \pm 0,27$ (8)]; [Timol 50mg/kg $3,09 \pm 0,18$ (8)] (Figura 33). Hipocampo - HIP [Controle $4,44 \pm 0,29$ (8)]; [Timol 25mg/kg $2,94 \pm 0,15$ (8)]; [Timol 50mg/kg $3,03 \pm 0,20$ (8)] (Figura 34).

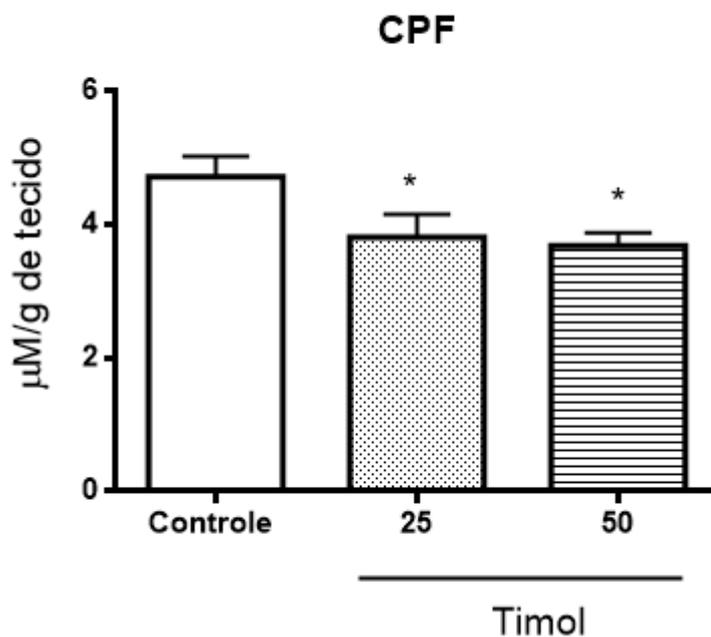


Figura 32: Efeito do timol nos níveis de Nitrito/Nitrato em córtex pré-frontal (CPF) de animais submetidos ao estresse oxidativo através do teste do nado forçado.

Controle (veículo) e Timol (25 mg/kg e 50 mg/kg v.o.), foram administrados 60 minutos (v.o.) antes do experimento. Os animais foram submetidos ao teste do nado forçado e em seguida sacrificados e dissecados. Os valores expressam a média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos * $p < 0,05$ vs controle.

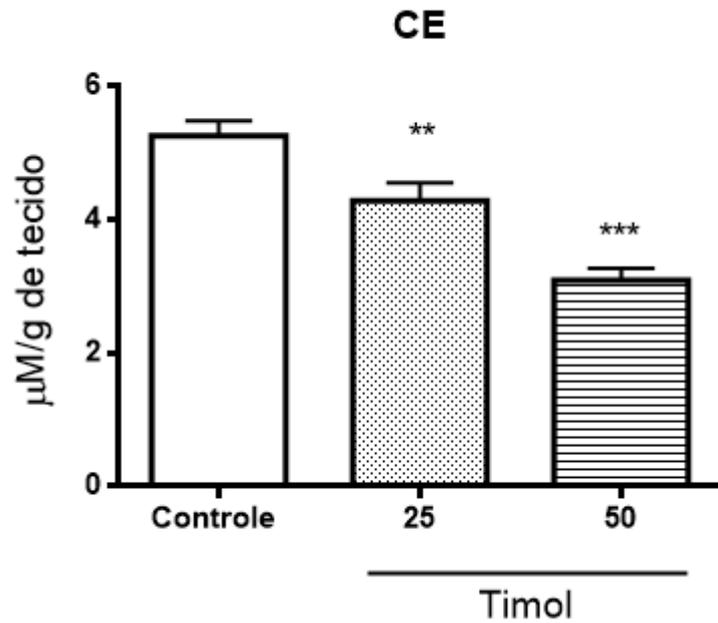


Figura 33: Efeito do timol nos níveis de Nitrito/Nitrato em corpo estriado (CE) de animais submetidos ao estresse oxidativo através do teste do nado forçado.

Controle (veículo) e Timol (25 mg/kg e 50 mg/kg v.o.), foram administrados 60 minutos (v.o.) antes do experimento. Os animais foram submetidos ao teste do nado forçado e em seguida sacrificados e dissecados. Os valores expressam a média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos ** $p < 0,01$ vs controle, *** $p < 0,001$ vs controle

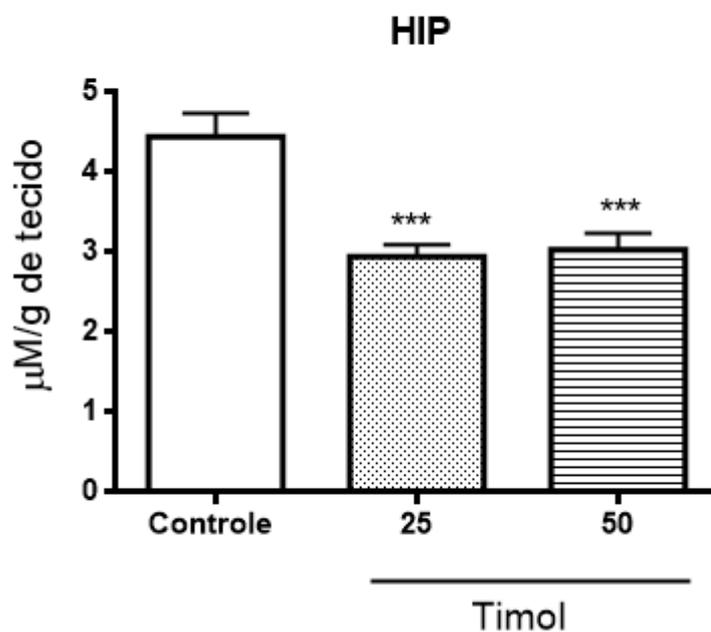


Figura 34: Efeito do timol nos níveis de Nitrito/Nitrato em Hipocampo (HIP) de animais submetidos ao estresse oxidativo através do teste do nado forçado.

Controle (veículo) e Timol (25 mg/kg e 50 mg/kg v.o.), foram administrados 60 minutos (v.o.) antes do experimento. Os animais foram submetidos ao teste do nado forçado e em seguida sacrificados e dissecados. Os valores expressam a média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos *** $p < 0,001$ vs controle.

5.7 Efeito da administração de Timol e Imipramina sobre os níveis de BDNF no hipocampo de camundongos submetidos ao teste do nado forçado.

Na realização da investigação dos níveis de BDNF, foi realizado previamente o teste do nado forçado, onde os resultados demonstraram um efeito semelhante na redução do tempo de imobilidade nas doses do Timol de 25 e 50 mg/kg e o controle positivo do grupo imipramina em relação ao controle que recebeu apenas veículo(água destilada + tween 80) a este grupo denominamos grupo estressado devido a situação adversa do desespero comportamental na tentativa das escapadas no teste do nado forçado (Figura 35).

Para viabilidade da análise dos níveis de BDNF, formamos outro grupo com animais controle que receberam apenas a administração oral do veículo (água destilada + tween 80) e não foram submetidos ao nado forçado, já os animais dos grupos: estressado (veículo v.o.), Timol (25mg/kg v.o.) e Imipramina (10mg/kg i.p.) antes do sacrifício e dissecação do Hipocampo, foram previamente submetidos ao teste do nado forçado.

Foi evidenciado uma redução nos níveis do BDNF no grupo estressado com relação ao controle, já o Timol 25mg/kg e a Imipramina 10mg/kg aumentaram os níveis de BDNF em relação ao grupo estressado (Figura 36 e tabela 4).

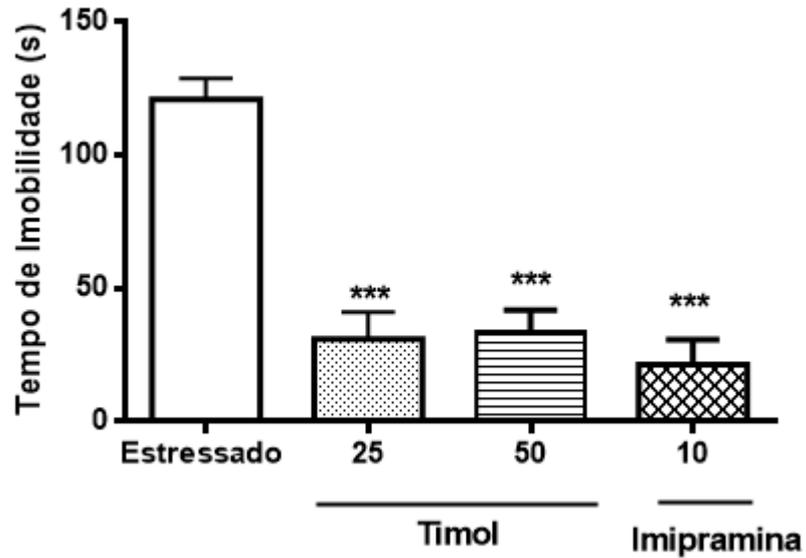


Figura 35: Efeito do Timol e da Imipramina sobre o tempo de imobilidade de camundongos submetidos ao teste do nado forçado.

Desafiado (veículo), Timol 25mg/kg (v.o.), Timol 50mg/kg (v.o.) e Imipramina 10mg/kg (i.p.) foram administrados 60 min (v.o.) e 30 min (i.p.) antes do experimento, os valores expressam a média \pm EPM do tempo de imobilidade durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos*** $p < 0,001$ vs estressado.

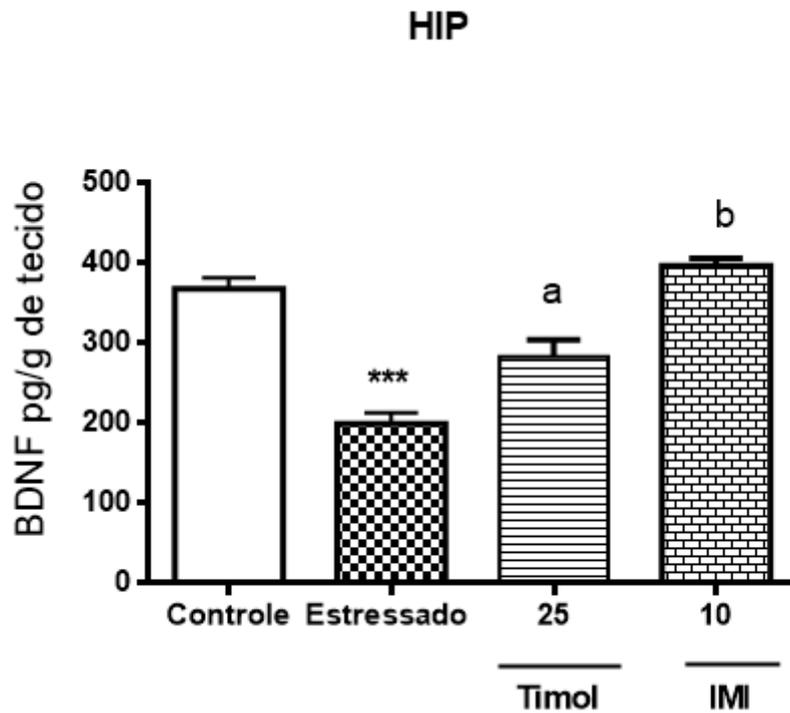


Figura 36: Efeito do Timol e da Imipramina sobre os níveis de BDNF no hipocampo (HIP) de camundongos submetidos ao teste do nado forçado.

Controle (veículo), Desafiado (veículo), Timol 25mg/kg (v.o.) e Imipramina 10mg/kg (i.p.) foram administrados 60 min (v.o.) e 30 min (i.p.) antes do experimento. Os valores expressam a média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos*** $p < 0,001$ vs controle; a $p < 0,01$ vs estressado; b $p < 0,001$ vs estressado.

Tabela 4: Grupos, indução do estresse através do teste do nado forçado TNF, e análise dos níveis de BDNF.

Grupos	TNF	BDNF
Controle (veículo v.o.)	Não	368,5 ± 13,78 (10)***
Estressado (Veículo v.o.)	Sim	199,3 ± 14,15 (10)
Timol (25mg/kg v.o.)	Sim	283,6 ± 21,36 (10) a
Imipramina (10 mg/kg)	Sim	397,0 ± 9,33 (10) b

Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos*** $p < 0,001$ vs controle; a $p < 0,01$ vs estressado; b $p < 0,001$ vs estressado.

6 DISCUSSÃO

Os efeitos do Timol já estudados e descritos na literatura científica disponível incluem sua ação anti-séptica, como por exemplo em alguns cremes dentais e antimicrobiana (MATOS, 2000; FILOCHE; SOMA; SISSONS, 2005). Carvacrol e Timol inibem a peroxidação de lipossomos fosfolipídicos e portanto exibem atividade antimicrobiana e antimicótica. São conservantes naturais de alimentos e possuem alta atividade antioxidante (MILOS *et al.*, 2000; TEISSEGRE; WATERHOUSE, 2000; MASTELIĆ *et al.*, 2008).

Trabalhos do nosso laboratório demonstraram que carvacrol seu isômero estrutural, apresentou resultados satisfatórios em modelos experimentais de ansiedade (MELO, 2009) e depressão (MELO, 2010). O acetato de citronelila estudado por Santos, 2014 também demonstrou atividade antidepressiva e ansiolítica em modelos comportamentais.

Sabe-se que é de fundamental importância a realização de estudos pré-clínicos como por exemplo *screening* de novas drogas, procurando investigar seu potencial farmacológico e conseqüentemente ações terapêuticas. Este trabalho apresenta uma investigação das possíveis ações centrais do Timol e seus mecanismos de ação farmacológica. Para tanto foram utilizados testes clássicos padronizados na farmacologia comportamental.

Historicamente a farmacologia comportamental surgiu durante a década de 50 da necessidade de estudar drogas com efeitos comportamentais específicos que pudessem tratar com sucesso certos transtornos psiquiátricos. Atualmente, as áreas de investigações comportamentais mais intensas incluem as dos transtornos psiquiátricos (esquizofrenia, depressão, ansiedade, entre outros), doenças com manifestações neurológicas (Parkinson, doença de Alzheimer), controle da dor (crônica e pós-operatória) e abuso de drogas (alcoolismo, dependência, dentre outros). Em cada um destes exemplos, a principal queixa do paciente envolve uma disfunção psicológica e/ou comportamental que altera o funcionamento normal do indivíduo na sua vida diária (LAPA *et al.*, 2008).

O timol demonstrou ser uma substância farmacologicamente ativa nos testes comportamentais previamente realizados na investigação do efeito ansiolítico, anticonvulsivante e antidepressivo (FERNANDES, 2012). Em que os efeitos centrais do Timol foram estudados através de modelos clássicos para

screening de atividades no sistema nervoso central tais como o campo aberto, labirinto em cruz elevado (LCE), *rota rod*, tempo de sono induzido por pentobarbital, nado forçado, suspensão da cauda e convulsão induzida por pentilenotetrazol. Estes testes fornecem informações sobre desempenho psicomotor, efeitos ansiolítico e antidepressivo, atividade miorelaxante, sedativo/hipnótica e anticonvulsivante (SOUSA *et al.*, 2004).

Com o objetivo de esclarecer os mecanismos envolvidos no efeito antidepressivo do Timol, realizamos o teste do nado forçado com grupos experimentais avaliando os antagonistas serotoninérgicos e os testes neuroquímicos e do estresse oxidativo, como também os de neuroproteção. Até o início destes experimentos ainda não estava descrito na literatura doses de segurança para o estudo deste fármaco em estudos clínicos.

Os estudos mostram que mesmo as substâncias provenientes de plantas não são desprovidas de toxicidade ou efeitos adversos, o que mostra a importância de se conhecer bem as condições do seu uso seguro. Realizar uma avaliação de segurança torna-se importante, pois, se pode caracterizar os efeitos tóxicos considerando o órgão alvo, tempo de exposição, reversibilidade dos efeitos e tempo em que os sinais de toxicidade aparecem e desaparecem. É um parâmetro necessário para qualquer estudo *in vivo* e *in vitro* (FDA, 2002).

Os estudos de toxicidade são utilizados para classificar as substâncias quanto a sua capacidade de causar agravos ao organismo vivo. Existem dois ensaios que são mais utilizados, pois diferenciam-se de acordo com a manifestação dos efeitos em relação ao tempo de exposição, que são os testes agudos e crônicos. Tais estudos são obtidos por meio da realização de testes, que envolvem a aplicação de protocolos pré-estabelecidos, principalmente por órgãos regulatórios conhecidos mundialmente, como a Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (Organization for Economic Cooperation and Development – OECD). (SPINDLER; SJOBERG; KNUDSEN, 2000; MONTEIRO, 2010). Os protocolos preconizados pela OECD são de grande aceitação pela comunidade científica na avaliação da toxicidade aguda para qualquer tipo de substância.

Com a finalidade de se avaliar a toxicidade aguda do timol, foi realizado o protocolo OECD 423. Fármacos extraídos de plantas tem bastante aceitação entre a população, no entanto existem poucos registros sobre a toxicidade e seu uso com segurança.

A toxicidade oral aguda de uma substância, refere-se aos efeitos adversos que podem ocorrer após a administração oral de uma dose única de uma substância ou de várias doses num prazo de 24 horas. OECD 423/2001.

A toxicidade sistêmica pode se manifestar por meio da redução no consumo de água e ração, além das alterações comportamentais, apatia e má distribuição dos pêlos dos animais (GONZALEZ & SILVA, 2003). No estudo da toxicologia aguda do Timol não foram observados perda de peso, pelo contrário, houve um ganho natural do grupo tratado assim como o do grupo controle.

Dando sequência a avaliação da toxicidade do Timol, foi realizado o tratamento oral de doses repetidas durante 28 dias (toxicidade subcrônica). Esse ensaio fornece resultados acerca da exposição contínua de um composto, bem como os níveis de exposição com segurança.

No presente estudo, a administração por 28 dias de Timol 500mg/kg apresentou um padrão semelhante quanto ao ganho de peso. Tal parâmetro é utilizado para indicar o aparecimento dos efeitos tóxicos de uma substância no animal (PITA, 2011). Sinais de toxicidade, como alterações na pele, olhos, mucosas, diarreia, letargia e aumento na salivação também não foram observados nos animais tratados.

A toxicidade de uma substância pode comprometer alguns órgãos, e dentre eles, o fígado e os rins são os mais susceptíveis. Por isso, torna-se importante a análise de parâmetros que avaliem as funções hepáticas e renais (MOTTA, 2003).

As substâncias quando aplicadas por via oral, são absorvidas no trato gastrointestinal e em seguida transportadas para o fígado para ser metabolizada ou não, para então serem distribuídas pela corrente sanguínea. Então, a avaliação de parâmetros de função hepática torna-se essencial para a análise toxicológica (BRUNTON et al., 2012).

A atividade das aminotransferases (alanina aminotransferase-ALT e aspartato aminotransferase-AST) são utilizadas como indicativo de dano hepático. A ALT é uma enzima encontrada no citosol dos hepatócitos que catalisa a transferência do grupo amino da alanina, permanecendo o ácido pirúvico e é considerado um marcador sensível de dano hepatocelular, podendo inclusive fornecer uma avaliação do grau de dano sofrido pelo fígado.

A AST catalisa a transaminação de L-aspartato e alfa-cetoglutarato em oxalacetato e glutamato e é localizada nas mitocôndrias e aparece em altas

concentrações em vários tecidos (fígado, rins, coração e pâncreas) (MABEKU et al., 2007). Ambas aparecem elevadas mediante um dano irreversível a membrana celular com o conseqüente extravasamento das enzimas. (HENRY, 2008). No presente estudo, não foi observado alteração dessas duas enzimas nos grupos tratados com Timol por 28 dias, bem como não houve alteração macroscópica no fígado dos animais, sugerindo uma ausência de toxicidade nesse órgão. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo da toxicidade da Riparina II (CARVALHO, 2016).

Os rins possuem como uma de suas funções a excreção de metabólitos, sendo também necessário à sua análise em protocolos de toxicidade. Ureia e creatinina são parâmetros úteis na avaliação da função renal (LI et al., 2011). A creatinina é um composto nitrogenado formado pela hidrólise não enzimática da creatina liberada durante a defosforilação da creatina fosfato. Uma vez gerada, ela entra na circulação por difusão e é filtrada pelos rins, sendo excretada somente pela urina. Então, a creatinina indica o ritmo da filtração glomerular onde níveis elevados indicam uma deficiência na funcionalidade renal (HEYMSFIELD et al., 2005).

A ureia consiste no maior produto final do catabolismo de aminoácidos e proteínas e é gerada no fígado pelo ciclo da ureia, onde é distribuída e excretada pelos rins. O seu aumento pode ser devido a uma elevação do metabolismo dos aminoácidos e incremento da reabsorção tubular, sendo um índice preditivo da insuficiência renal sintomática e de desordens hepáticas (OSTERMANN et al., 2012).

No presente estudo, não foi observado alteração nos níveis de ureia e creatinina nos grupos tratados com Timol por 28 dias, bem como não houve alteração macroscópica nos rins dos animais, indicativo de ausência de toxicidade renal.

O tecido hematológico é um dos alvos mais sensíveis dos efeitos adversos de compostos tóxicos, pois possui um alto índice mitótico. É considerado um importante indicador do estado fisiológico ou patológico onde sinais de toxicidade da medula óssea são avaliadas através da análise de alterações do sangue periférico (EVAN, 2008).

Quanto aos parâmetros hematológicos não houve nenhuma diferença significativa em relação ao grupo controle indicando que o Timol parece não interferir na produção de glóbulos vermelhos, entretanto o leucograma mostrou uma redução

dos linfócitos e leucócitos, indicando uma possível redução da imunidade dos animais, o que pode favorecer o aparecimento de infecções.

Após a classificação do Timol como uma substância que possui uma baixa toxicidade, foram realizados os testes comportamentais para esclarecer o possível mecanismo envolvido no efeito antidepressivo.

O estresse crônico, não controlável, vem sendo relacionado com a etiologia de diversas doenças, incluindo a depressão. Em animais de laboratório a exposição a eventos estressantes não controláveis de elevada intensidade produz alterações comportamentais e fisiológicas muitas vezes encontradas na depressão clínica (GRAEFF; GUIMARÃES, 2012).

Podem ocorrer como déficits na atividade motora, ganho de peso e sono, bem como diminuição de comportamento competitivo, diminuição na capacidade de sentir prazer que possa ser expressa através de uma redução nas respostas que levam a estimulação de regiões cerebrais de recompensa, ou em um menor consumo de soluções adocicadas e aumento de erros em tarefas de escolha e discriminação. Estas alterações são revertidas por tratamento com drogas antidepressivas ou por eletrochoque. Em virtude disso, inúmeros modelos animais de depressão são baseados nas modificações comportamentais induzidas por exposição a diferentes estressores (GRAEFF; GUIMARÃES, 2012).

Os dois modelos animais mais amplamente utilizados para *screening* de novas drogas antidepressivas são o teste do nado forçado e da suspensão da cauda. Estes testes são bastante sensíveis e relativamente específicos para a maioria das classes de drogas antidepressivas incluindo os antidepressivos tricíclicos, os inibidores da recaptção de serotonina, os inibidores da MAO (monoamina oxidase) e os atípicos (BASSO *et al.*, 2009; FRANKOWSKA *et al.*, 2007; DUARTE *et al.*, 2007).

Para fundamentação da realização destes experimentos, Mao *et al.*, 2008 afirma ainda que em ambos os testes os animais são submetidos a um estresse, o qual não é possível escapar e após um período de luta inicial, os animais se tornam imóveis, assemelhando-se a um estado de desespero e depressão comportamental.

Os antidepressivos em geral aumentam a latência para a imobilidade e reduzem o tempo de imobilidade apresentado pelos animais (CRYAN *et al.*, 2002). Vários estudos recentes utilizando-se substâncias de origem natural com o objetivo de investigar possíveis efeitos antidepressivos são encontrados (TEIXEIRA *et al.*,

2011, SOUSA *et al.*, 2012, AMARAL *et al.*, 2012), onde os resultados mostraram uma redução no tempo de imobilidade nos testes da suspensão da cauda e do nado forçado, caracterizando um aumento do comportamento de luta dos animais, o que sugere um efeito antidepressivo destes fármacos.

No nosso estudo prévio (FERNANDES, 2012) no teste de suspensão da cauda o Timol foi administrado por via oral, e evidenciou-se que ambas as doses estudadas diminuíram significativamente o tempo de imobilidade com relação ao grupo controle, como descrito nos resultados, também foi obtido com o grupo tratado com a Imipramina, indicativo de um efeito antidepressivo.

O teste do nado forçado também denominado “desespero comportamental”, pois os animais são forçados a nadar em um espaço confinado, cuja fundamentação de eficácia do teste é baseada na utilização de drogas antidepressivas, com efeito, já comprovado que diminuem o tempo de imobilidade, aumentando o tempo de nado e o comportamento de luta perante o estresse agudo. (SAKI *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2009).

Ainda segundo Fernandes, 2013 o Timol diminuiu significativamente o tempo de imobilidade no nado forçado com relação ao grupo controle em ambas as doses analisadas, semelhante a Imipramina, um antidepressivo tricíclico utilizada como droga padrão positivo. Este resultado sugere que o timol apresenta atividade antidepressiva.

Desta forma o efeito antidepressivo de vários fármacos é avaliado através destes testes porém o teste do nado forçado parece ser mais sensível que o teste da suspensão da cauda, pois segundo Cryan *et al.*, 2005 é observado que doses menores de drogas antidepressivas, como a imipramina, são suficientes para demonstrar uma ação antidepressiva.

A fisiopatologia da depressão através da hipótese das monoaminas, se fundamentou inicialmente na deficiência de noradrenalina e serotonina, e posteriormente a dopamina foi considerada (MACHADO *et al.*, 2009). Muitos antidepressivos utilizados na prática clínica atuam através da regulação das concentrações sinápticas destes neurotransmissores como é o caso dos antidepressivos tricíclicos (ex. Amitriptilina e Imipramina), antidepressivos heterocíclicos de segunda e terceira gerações (ex. Amoxapina e Venlaxatina respectivamente) e Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina (Fluoxetina e Paroxetina).

O envolvimento monoaminérgico no efeito antidepressivo das Riparinas I, II e III foram avaliados por diferentes pesquisadores e foi demonstrado por Sousa *et al.*, 2012, Teixeira, *et al.*, 2011 e Melo *et al.*, 2011 respectivamente que as Riparinas (isoladas da planta *Aniba Riparia*) apresentaram um efeito antidepressivo relacionado com os sistemas noradrenérgico, dopaminérgico e serotoninérgico, assim como neste estudo foi demonstrado o envolvimento destes sistemas através do teste do nado forçado com o efeito antidepressivo do timol.

O sistema serotoninérgico tem sido implicado fortemente na etiologia da depressão e no mecanismo de ação de drogas antidepressivas. As principais evidências relacionadas com o alívio da depressão envolvem os fármacos inibidores da recaptção de serotonina (IRSR). Corroborando com essas evidências, a depleção do triptofano, aminoácido precursor da serotonina, confirma a relação entre a diminuição da monoamina e os distúrbios depressivos (TAYLOR *et al.*, 2005). Além disso os principais fármacos antidepressivos afetam a renovação de serotonina, inibem a sua recaptção e também interagem com os receptores 5HT1A, 5HT2 e 5HT3 (CRYAN *et al.*, 2005).

Estudos anteriores do nosso grupo mostrou que o timol quando associado ao PCPA teve o seu efeito antidepressivo revertido no teste do nado forçado em camundongos (FERNANDES, 2012), sugerindo uma ação serotoninérgica, portanto, decidimos por realizar o protocolo de testes comportamentais com os antagonistas serotoninérgicos: dos receptores 5HT1 (NAN-190), 5HT2 Ritanserina e o 5HT3 Ondazetron respectivamente.

Em nosso estudo observamos que o efeito anti-imobilidade do Timol não foi revertido pelo pré-tratamento com o NAN-190 um antagonista do receptor 5HT1. Este resultado sugere que o efeito antidepressivo do timol através do sistema serotoninérgico, não depende da participação deste receptor.

Em continuidade ao envolvimento do sistema serotoninérgico realizamos o teste do nado forçado com grupos experimentais tratados com previamente com Ritanserina e Ondansetron e observamos que o efeito anti-imobilidade do Timol foi revertido pelo pré-tratamento destes antagonistas. Estes resultados sugerem que o efeito antidepressivo do timol através do sistema serotoninérgico, pode estar relacionado a participação destes receptores.

Segundo os estudos de Boothman *et al.*, 2006 e Wang *et al.*, 2008, os receptores 5HT2 estão envolvidos na fisiopatologia da depressão bem como a ação

de muitos antidepressivos. Celada et al., 2004, relatou que a ativação dos receptores 5HT₂ está amplamente implicada com a regulação das desordens de humor. Corroborando com estes achados os estudos com a mianserina um antidepressivo atípico, apresentou alta afinidade por estes subtipos de receptor. O efeito de redução da imobilidade do WAY um agonista do receptor 5HT_{2C}, foi completamente bloqueado pelo antagonista seletivo SB206533 e pela mianserina (CRYAN & LUCHI, 2000), e ainda que o DOI um agonista seletivo do receptor 5HT_{2A}, aumenta o efeito antidepressivo de alguns compostos (ZOMKOWSKI et al., 2004).

No estudo de Eisensamer et al, 2003, foi sugerido que dentre os diferentes subtipos de receptores 5HT₃ localizados pré e pós sinápticos, foi demonstrado que a supressão da atividade deste receptor pode contribuir na ação de alguns antidepressivos. No estudo de Bravo e Maswood, 2006 o tempo de imobilidade dos camundongos no teste do nado forçado foi reduzido com a administração aguda de antagonistas dos receptores 5HT₃.

Com o objetivo de esclarecer os achados nos testes comportamentais acerca do envolvimento dos receptores dopaminérgicos, noradrenérgicos e serotoninérgicos realizamos a dissecação das áreas cerebrais após o teste do nado forçado e analisamos as monoaminas e seus metabólitos através do HPLC.

O resultado da análise das monoaminas e de seus metabólitos demonstraram que ocorreu um aumento significativo nos níveis de noradrenalina e de dopamina comparados ao controle em corpo estriado de camundongos.

Analisando os resultados das monoaminas constatamos o que já vinha sendo sugerido pelos experimentos comportamentais prévios do timol, onde através do teste do nado forçado o timol foi capaz de reverter o efeito dos antagonistas dopaminérgicos e noradrenérgicos (FERNANDES, 2012).

Encontramos também uma significância maior na dose de 50mg/kg em relação a dose de 25mg/kg. Este fato sugere que o aumento destas monoaminas parece estar sendo dose dependente.

Com relação aos efeitos do timol sobre os níveis de serotonina em corpo estriado de camundongos ocorreu um aumento significativo nos níveis de serotonina comparados ao controle em ambas as doses testadas.

O estudo de Elhwuegi, 2004 o autor afirma que ocorre uma diminuição dos níveis das monoaminas no cérebro de pacientes com depressão. O aumento nos

níveis de monoaminas, ocasionado pelo tratamento com antidepressivos melhora os sintomas dos transtornos de humor, mais especificamente da depressão. Fármacos do grupo dos antidepressivos tricíclicos, inibidores seletivos da recaptação de serotonina e inibidores da monoaminoxidase (MAO), exercem seus efeitos antidepressivos aumentando os níveis de monoaminas (PAEZ-PEREDA, 2005; CHEN & SKOLNICK, 2007).

Com relação a análise dos metabolitos em nosso estudo foi encontrado uma redução dos níveis de HVA e 5HAA um metabolito da serotonina, em ambas as doses do timol.

No estudo de Wang et al., 2008, os níveis de serotonina e noradrenalina se encontraram aumentados no cérebro de camundongos submetidos ao nado forçado e que receberam tratamento com fármacos antidepressivos como a fluoxetina. Corroborando com o nosso estudo também foi relatado que o 5HIAA e o DOPAC ambos metabolitos da serotonina e da dopamina respectivamente, apresentaram redução no cérebro de animais tratados com substâncias antidepressivas, quando comparados ao grupo controle (SHEN et al., 2009).

Em suma o aumento dos níveis das monoaminas, associado a redução de seus respectivos metabolitos em nosso estudo encontram evidências relacionados a este tema, sugere um aumento das monoaminas livres na fenda sináptica nos animais pré tratados com o timol, semelhante ao ocorrido com os estudos realizados com a Venlafaxina e com outros antidepressivos num estudo de Gex-Fabry et al., 2002, através da análise do fluido cerebrospinal de pacientes com depressão unipolar. Outro estudo também com a Venlafaxina e a fluoxetina apresentou um aumento nos níveis das monoaminas e uma redução de seus metabolitos indicando como os antidepressivos exercem os seus efeitos (FENLI et al., 2013).

Atualmente, sabe-se que a depressão configura-se como um conjunto complexo de alterações que não podem ser discutidas unicamente em termos de diminuição nos níveis de monoaminas. Uma série de mecanismos têm sido relacionados à patogênese da depressão. O estresse oxidativo, bem como os fatores neurotróficos, sendo o BDNF o mais importante entre eles, têm recebido atenção especial (NG et al., 2008; KRISHNAN; NESTLER, 2008; CHUNG et al., 2013). Por isso, fez-se relevante, além da avaliação comportamental, avaliar também, no presente estudo, as alterações neuroquímicas presentes nos animais expostos ao estresse.

As espécies reativas de oxigênio (EROs) conhecidas como radicais livre estão envolvidas com o surgimento de várias doenças, principalmente no sistema nervoso central devido a vulnerabilidade destes tecidos a ação do estresse oxidativo. O envolvimento do estresse oxidativo com os transtornos psiquiátricos como a depressão tem sido abordado em estudos com drogas antidepressivas capazes de regular a atividade antioxidante (HERKEN et al., 2007; LI et al., 2003).

Pacientes deprimidos apresentam distúrbios oxidativos, incluindo dano oxidativo, com aumento de EROs e ERNs, e função enzimática dos sistemas antioxidantes diminuída (OCZAN et al., 2004; NG et al., 2008; MAES et al., 2011b). O estresse oxidativo causa danos às proteínas e ao DNA no cérebro, levando à lesão e apoptose de neurônios. Além da peroxidação lipídica e da redução da atividade das enzimas antioxidantes, o estresse oxidativo também leva ao aumento do catabolismo dos neurotransmissores monoaminérgicos, mecanismos estes relacionados à fisiopatologia da depressão (BILICI et al., 2001).

A inibição das isoformas neuronal e induzível da NOS foi demonstrada que previne o aparecimento de sintomas da depressão em roedores e o desenvolvimento do modelo de depressão induzida por estresse (DHIR; KULKARNI, 2007; WANG; AN; ZHANG, 2008).

Ozcan et al., 2004 e Kuloglu, 2002 afirmaram que os radicais livres são espécies químicas reativas produzidas durante o estresse oxidativo como a peroxidação lipídica da membrana celular, em excesso e não controlados pelos sistemas de defesa enzimático ocorre dano na membrana celular, ao DNA, podendo levar a morte neuronal. Os radicais livres podem ser controlados pela ação de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase – SOD, catalase e glutathione peroxidase e através do controle dos níveis de peroxidação lipídica.

A superóxido dismutase (SOD) corresponde a uma família de enzimas com diferentes grupos proteicos em sua composição. Nos sistemas eucariontes existem duas formas de SOD. Algumas drogas antidepressivas têm mostrado um aumento na expressão de genes de importantes enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase. Já foi observado que a Fluoxetina pode reverter e prevenir o dano oxidativo observado no estresse psicológico induzido como evidenciado pela elevação não só da atividade da SOD, mas também pela ativação de uma série de componentes-chave do sistema antioxidante endógeno (KOLLA et al, 2005; ZAFIR & BANU, 2007).

O ânion superóxido (O_2^-) é um radical livre extremamente tóxico, produto da interação entre as moléculas de oxigênio e elétrons provenientes da cadeia transportadora nas mitocôndrias, é convertido por ação da SOD a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) um radical menos tóxico, que por sua vez é detoxicado pela glutathione peroxidase (GSH-Px) que necessita da glutathione reduzida (GSH) servindo como fator desta enzima. Essas enzimas constituem um sistema antioxidante endógeno, que atua prevenindo o dano neuronal induzido pela EROs. A glutathione é uma enzima especializada na remoção de peróxidos do mesmo modo que a catalase, mas estas tem localizações distintas no SNC. Os componentes da glutathione peroxidase, GSH, glutathione reductase e NADPH estão presentes na mitocôndria e no citoplasma dos neurônios (REMMEN et al., 2004).

Além de mensurar a formação de produtos citotóxicos decorrentes da liberação de EROs, para determinar-se a ocorrência de desequilíbrio oxidativo, pode-se verificar a concentração de componentes antioxidantes. Dessa forma, foram determinados os níveis de GSH, a principal defesa antioxidante da célula, que é usada como substrato para que a enzima glutathione peroxidase converta o peróxido de hidrogênio (uma ERO) em água (KULAK et al., 2013).

Os grupos experimentais foram submetidos ao estresse agudo através do teste do nado forçado antes da realização do experimento para a dosagem da quantidade da enzima Superóxido dismutase SOD. Os resultados demonstraram que o pré tratamento com o Timol em ambas as doses não alterou significativamente a quantidade de SOD nas áreas cerebrais analisadas em relação aos controles. No entanto uma elevação nos níveis de GSH em todas as áreas cerebrais analisadas. Sendo a GSH um cofator enzimático esses resultados sugerem que o peróxido de hidrogênio produzido pela SOD poderia ter sido detoxicado pela GSH e que o Timol apresenta um efeito antioxidante por aumentar os níveis de GSH nas três áreas estudadas.

Este fato também pode ser devido à ação do Timol sobre outros sistemas antioxidantes nessas áreas, como a catalase, uma enzima que pode, assim como a glutathione peroxidase, promover a detoxificação do peróxido de hidrogênio (GUPTA et al., 2015; NUNES et al., 2015).

A catalase é uma enzima antioxidante encontrada no sistema nervoso central, ela é responsável por converter o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água. O peróxido de hidrogênio pode se difundir facilmente pelas membranas celulares e

reagir com metais de transição, gerando o radical hidroxila, este pode causar danos ao DNA, RNA, às proteínas, lipídios e membranas celulares do núcleo (BARREIROS et al., 2006). O estudo de Ferreira & Matsubara, 1997 reforça que a catalase sendo uma hemoproteína citoplasmática encontrada no sangue, medula óssea, mucosas, rim e fígado tem sua atividade dependente de NADPH e a suplementação de catalase endógena previne a oxidação de GSH mediada pelo H₂O₂ em eritrócitos humanos normais.

A análise da produção de catalase foi avaliada em nosso estudo e os animais pré tratados com o Timol nas dose na 50mg/kg tiveram uma redução significativa na produção de catalase no corpo estriado. Estes resultados sugerem uma ação antioxidante do timol especialmente na região do corpo estriado. Corroborando com estes achados mais especificamente com relação a produção de catalase em áreas cerebrais de animais pré tratados foi demonstrado no teste do nado forçado que a Riparina III não alterou a atividade da catalase nos animais que não foram submetidos ao teste do nado forçado, resultado semelhante ocorrido com o grupo controle, já os animais desafiados com o nado forçado houve aumento da produção de catalase no grupo controle e uma redução em corpo estriado, córtex pré-frontal e hipocampo dos animais pré-tratados com a Riparina III, sugerindo a reversão da atividade da enzima (MELO, 2012).

A administração de drogas antidepressivas, dentre elas a imipramina, reduziu a atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase no tecido cerebral de animais submetidos ao estresse (ZAFIR et al., 2009). Corroborando com esses achados o estudo dos mecanismos envolvidos no efeito antidepressivo do Carvacrol, os animais submetidos ao estresse agudo através de convulsões induzidas pela pilocarpina, sugeriu um efeito antioxidante do Carvacrol com a redução significativa dos níveis de catalase no hipocampo (MELO, 2014).

A produção de radicais livres pode levar a peroxidação lipídica pode gerar o rompimento da membrana celular através de alterações na sua estrutura, o que ocasiona a formação de produtos que são tóxicos para a célula como o Malonildialdeído- MDA. Os estudos desenvolvidos em nosso laboratório por Silva et al., 2007; Melo 2012; Teixeira, 2013; Santos 2014; Melo 2014 para a avaliação da peroxidação lipídica foi utilizada a mensuração das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), através da análise dos níveis de malonildialdeído (MDA). O pré tratamento dos animais com o acetato de citronelila diminuiu os níveis de MDA

no hipocampo dos animais submetidos ao teste do nado forçado (SANTOS, 2014), já o pré tratamento dos animais com Carvacrol reduziu os níveis de MDA em todas as áreas estudadas de camundongos submetidos ao teste de convulsão induzida por pilocarpina (MELO, 2014).

No nosso estudo os animais foram submetidos ao estresse agudo através do teste do nado forçado antes da realização das dosagens de MDA. Os resultados demonstraram que o Timol foi capaz de diminuir significativamente os níveis de MDA em todas as áreas cerebrais analisadas, portanto a peroxidação lipídica induzida pelo estresse agudo promovido através do desespero comportamental, foi revertida pelo Timol, sugerindo em efeito neuroprotetor semelhante ao Carvacrol e o acetato de citroleila.

Segundo o estudo de Leal, et al., 2005, os altos níveis de peroxidação lipídica e um simultâneo declínio de mecanismos antioxidantes podem levar ao dano celular e conseqüente estresse oxidativo. A peroxidação lipídica ocorre devido a interações entre radicais livres de diversas origens e ácidos graxos insaturados e lipídicos. Este fenômeno envolve um amplo espectro de alterações e a conseqüente degeneração da membrana celular pode contribuir para o desenvolvimento de transtornos de desordens no metabolismo lipoproteico, o autor relata ainda que a peroxidação lipídica de estruturas celulares é uma conseqüência da atividade dos radicais livres.

A excessiva produção de espécies reativas derivada do oxigênio (EROs), decorrente de excitotoxicidade, induz morte neuronal e diversas alterações neurológicas, que participam na etiologia de várias patologias, incluindo a depressão. O nitrito é um metabólito estável do NO, pode estar associado com a fisiopatologia da depressão, uma vez que elevados níveis de peroxinitrito e seu precursor o óxido nítrico, tem sido bem documentado na fisiopatologia da depressão induzida pelo estresse (WEGENER et al., 2010; RICHARD et al. 2007; OZCAN et al., 2004).

Os resultados do nosso estudo demonstraram que o Timol foi capaz de diminuir significativamente os níveis Nitrito/Nitrato em todas as áreas cerebrais analisadas em relação aos controles. Resultados semelhantes foram evidenciados com o pré tratamento dos animais com a Riparina III no estudo de Melo, 2012.

No nosso estudo, o timol foi capaz de reduzir o dano oxidativo causado pelo estresse do nado forçado, como demonstrado na diminuição dos níveis de nitrito e MDA no córtex pré-frontal, corpo estriado e hipocampo dos animais. Esse

resultado está de acordo com estudos anteriores, em que diversos antidepressivos são capazes de diminuir o dano oxidativo, sendo este, portanto, um possível mecanismo da atividade antidepressiva do Timol (NG et al., 2008; GUPTA et al., 2015).

Além do estresse oxidativo, os fatores neurotróficos têm sido relacionados à patogênese da depressão, dentre eles, o BDNF tem recebido atenção especial. De acordo com a Hipótese Neurotrófica, a exposição ao estresse reduz a expressão de BDNF, principalmente em regiões límbicas, envolvidas na cognição e emoção, conseqüentemente diminuindo essas funções (DUMAN, MONTEGGIA, 2006). Estudos mostram que os antidepressivos são capazes de reverter esse quadro, aumentando os níveis de BDNF (SIUCIAK et al., 1997; SOUSA et al., 2015; VASCONCELOS et al., 2015; GAWALI et al., 2016).

De fato, o BDNF exerce seus efeitos, em parte, ao se ligar aos receptores TrkB, aumentando a fosforilação do CREB (cAMP response element binding protein) (LIU et al., 2016), que está envolvido com os déficits emocionais induzidos pelo estresse (LI et al., 2015). A sinalização de BDNF- TrkB exerce um papel importante na modulação de diversas funções, como a liberação de neurotransmissores e a resposta pós sináptica aos neurotransmissores, possuindo relação direta com a terapia antidepressiva (KOZISEK; MIDDLEMAS; BYLUND, 2008; YI et al., 2014; YAN et al., 2016).

O tratamento com antidepressivos, apesar de fornecer uma boa resposta, sabe-se que nem sempre é eficaz, e está relacionado a altos índices de resistência (AMSTERDAM, HORNIG-ROHAN, 1996; MCINTYRE et al., 2014). Segundo diversos autores, a resistência ao tratamento com os antidepressivos pode estar relacionada a um polimorfismo no gene BDNF, que pode ser induzido pelo estresse (EGAN et al., 2003; HOSANG et al., 2014; EL-HAGE et al., 2015; JIANG et al., 2017). Esse polimorfismo (Val66Met), que consiste na substituição do aminoácido valina por metionina no códon 66 do BDNF, mostrou alterar a expressão e o processamento de BDNF, bem como a sinalização BDNF-TrkB. Isso pode afetar a função do eixo HHA e os níveis de cortisol após exposição ao estresse (EGAN et al., 2003; IBARGUEN-VARGAS et al., 2009; SANCHEZ et al., 2011; HOSANG et al., 2014; EL-HAGE et al., 2015; JIANG et al., 2017).

Essas alterações nos níveis de BDNF são importantes principalmente a nível hipocampal, visto que essa é uma área cerebral relacionada não apenas ao

aprendizado e memória, mas também extensivamente estudada no contexto da depressão (SHELIN, 2011; DESHMUKH, KNIERIM, 2012; BAI et al., 2014).

Reduções no volume hipocampal tem sido encontrados nos pacientes que apresentaram diversos episódios depressivos quando comparados aqueles que estavam em remissão ou que estavam em seu primeiro episódio, sugerindo uma relação com a severidade da doença (MC QUEEN et al., 2003.)

No estudo de Fortunato, (2009) os animais foram tratados agudamente com harmina e imipramina e o seu comportamento foi avaliado através do teste do nado forçado e do campo aberto. Observou-se que a harmina em doses de 10 e 15 mg / kg, e imipramina 20 e 30 mg /kg reduziram o tempo de imobilidade sem afetar a atividade locomotora. Em seguida, após a dissecação do hipocampo os níveis de BDNF foram analisados, foi evidenciado um aumento dos níveis de BDNF no hipocampo dos animais que receberam a maior dose de harmina.

O tratamento com Timol bem como o antidepressivo padrão, imipramina, foi capaz de reverter o dano causado pelo estresse agudo no teste do nado forçado de maneira significativa, elevando os níveis de BDNF. Esse dado sugere que a atividade antidepressiva do Timol pode ser decorrente de estimulação à produção de fatores neurotróficos, indicando uma potencial atividade neuroprotetora.

Considerando as hipóteses que explicam a depressão o presente estudo confirmou o efeito antidepressivo do timol e a relação deste efeito com os mecanismos monoaminérgicos, antioxidantes e neuroprotetores. Este estudo ainda pode ser ampliado no sentido de buscar seus possíveis efeitos sobre o mecanismo inflamatório envolvidos na depressão. Além disso estudos de *biding* podem ser executados para confirmar suas ações nos receptores monoaminérgicos, fornecendo dados para a continuação da busca da comprovação da eficácia terapêutica do timol não somente através de outros testes experimentais como também um potencial translacional do timol através testes clínicos, que possam no futuro viabilizar seu uso sozinho ou associado a outros medicamentos já existentes no tratamento de transtornos psiquiátricos como a depressão.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo da toxicologia e dos efeitos da administração aguda de timol nas doses de 25 e 50 mg/Kg levou a várias considerações:

- A avaliação da toxicidade aguda do timol classificado por categoria 5 com baixo risco de toxicidade, não apresentou alterações histológicas na análise dos órgãos.

- Na avaliação da toxicidade com doses repetidas não foram encontradas alterações significativas com relação aos parâmetros bioquímicos e hematológicos.

- Com relação aos mecanismos envolvidos no efeito antidepressivo do timol foram analisados no teste do nado forçado através da administração dos antagonistas específicos. Seu efeito foi revertido pelo pré-tratamento dos animais com antagonistas serotoninérgicos como a Ritanserina e o Ondansetron, já este efeito não foi evidenciado na presença do NAN-190, um antagonista do receptor 5HT1A.

- Foi evidenciado um aumento nos níveis das monoaminas através do HPLC, noradrenalina, dopamina, e principalmente da serotonina e reduziu os seus respectivos metabólitos.

- Seguindo a investigação dos mecanismos de ação foi realizada investigação do estresse oxidativo através da indução de estresse nos animais pelo teste do nado forçado, onde os resultados demonstraram que:

- A quantidade de SOD não foi alterada;
- O timol reduziu a atividade da catalase no corpo estriado;
- Reduziu os níveis de MDA e Nitrito em todas as áreas cerebrais estudadas;
- Aumentou os níveis de GSH em todas as áreas cerebrais estudadas;
- Aumentou os níveis de BDNF no hipocampo.

8 CONCLUSÃO

Estes resultados sugerem que o timol oferece baixos riscos de toxicidade, apresenta efeitos antidepressivos provavelmente relacionados aos sistemas: noradrenérgico, dopaminérgico e serotoninérgico sugerindo a participação dos receptores 5HT_{2A/2C} e 5HT₃, apresenta propriedades antioxidantes e um possível efeito neuroprotetor.

REFERÊNCIAS

- AESCHBACH R. *et al.* Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 32, p. 31-36, 1994
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos**, Farmacopéia Brasileira. 2011
- ARCHER J. Tests for emotionality in rats and mice. A review. **Anim Behav**, v. 21, p. 205–235, 1973
- AZAMBUJA, W. O que são óleos essenciais. **Óleosessenciais.org**(março/2011). em: www.oleosessenciais.org.br. Acesso em 10/2012
- BACKONJA, M.M.: Use of anticonvulsants for treatment of neuropathic pain. **Neurology**. V.14, p-59, 2002.
- BAI, M. Anhedonia was associated with the dysregulation of hippocampal HTR4 and microRNA Let-7a in rats. **Physiology and Behavior**, v. 129, p. 135–141, 2014.
- BASSO, A.M. *et al.* Antidepressant-like effect of D(2/3) receptor-, but not D(4) receptor-activation in the rat forced swim test. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, p. 1257-1268, 2005.
- BARRANTES-MONGE, M. *et al.*, Dependencia funcional y enfermedades crônicas en ancianos mexicanos. **Salud Publica Mex.**;v.49, p.459-466. 2007.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim Nova.**, v.29, p.113-23, 2006.
- BENEDETTI, C.; PREMUDA, L.: The history of opium and its derivatives. In **Advances in Pain Research and Therapy**.v 14, 2011.
- BERK, B.C. Novel approaches to treat oxidative stress and cardiovascular diseases. **Tras Am Clin Climatol Assoc.**, v.118, p.209-14, 2007.
- BILICI, M.; EFE, H.; KOROGLU, A.; UYDU, H. A.; BEKAROGLU, M.; DEGER, O. Antioxidative enzymes activity and lipid peroxidation in major depression: alteration by antidepressant treatments. **Journal of Affective Disorders**, v. 64, p. 43-51, 2001.
- BIZZO, H R.; HOVELL, A M. C.; REZENDE, C M..Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 32, n.3, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Envelhecimento e saúde da pessoa idosa. Brasília: **Ministério da**

Saúde; 2006. p. 192 (Série A. Normas e Manuais Técnicos) (Cadernos de Atenção Básica nº 19).

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. 12 ed. Rio de Janeiro: Mcgraw Hill, 2012.

CARVALHO, A. M. R. **Estudo do mecanismo de ação da atividade nociceptiva da riparina II de Aniba riparia em camundongos**. 2016. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2016.

CALIXTO, J.B Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. **J. Ethnofarmacology**, v.100, p. 131-134, 2005

CANBEK M *et al.* Effects of carvacrol on defects of ischemia-reperfusion in the rat liver, **Phytomedicine**. v11. p. 22-26. 2007.

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

CRYAN, J.F. *et al.* Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends Pharmacol. Sci.** v23, p-238-245, 2002.

CRYAN, J.F. *et al.* Differential behavioral effects of the antidepressants reboxetine, fluoxetine, and moclobemide in a modified forced swim test following chronic treatment. **Psychopharmacology**, v. 182, p-335-344, 2005.

CONRAD, C. D. *et al.* Chronic Stress Impairs Rat Spatial Memory on the Y Maze , and This Effect Is Blocked by Tianeptine Pretreatment. **Behav Neurosci**. v. 110, n. 6, p. 1321–1334, 1996.

CUNHA, C.; BRAMBILLA, R.; THOMAS, K. L. A simple role for BDNF in learning and memory ? **Front Mol Neurosci**.v. 3, n. February, p. 1–14, 2010.

DANTAS, I. C. **Plantas medicinais comercializadas no município de Campina Grande**. Paraíba: 2006.

DESHMUKH, S. S.; KNIERIM, J. J. Hippocampus. Wiley Interdisciplinary Reviews: **Cognitive Science**, v. 3, n. 2, p. 231–251, 2012.

DISTASI, L.C **Plantas Mediciniais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Ed. UNESP, 1996.

DHIR, A.; KULKARNI, S. K. Involvement of nitric oxide (NO) signaling pathway in the antidepressant action of bupropion, a dopamine reuptake inhibitor. **European Journal of Pharmacology**, v. 568, n. 1, p. 177-185, 2007.

DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. "Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils". **J. Appl. Microbiol** 88: 308–316. 2000.

DUARTE, F.S. *et al.* Evidence for the involvement of the monoaminergic system in the antidepressant-like action of two 4-amine derivatives of 10, 11-dihydro-5H-dibenzo cycloheptane in mice evaluated in the tail suspension test. **Progress in Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v.32, p. 368-374, 2008.

DUMAN, R. S.; MONTEGGIA, L. M. A Neurotrophic Model for Stress-Related Mood Disorders. **Biological Psychiatry**, v. 59, n. 12, p. 1116–1127, 2006.

DUNHAM N.W., MIYA T.S. A note on simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **J Am Pharm**, v.46, p. 208-209, 1957.

DWIVEDI, Y. Brain-derived neurotrophic factor: role in depression and suicide. **Neuropsychiatric disease and treatment**, v. 5, p. 433–49, 2009.

EL-HAGE, W. *et al.* The BDNF Val66Met polymorphism is associated with escitalopram response in depressed patients. **Psychopharmacology**, v. 232, n. 3, p. 575–81, 2014.

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

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

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for industry: Immunotoxicology evaluation of investigational new drugs**. Center for Drug Evaluation and Research, 2002. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm079239.pdf>. Acesso em: Agosto/2016.

EVANS, J. D. "Effects of thymol on ruminal microorganisms". **Curr. Microbiol.** V. 41: p: 336- 342. 2000.

EVAN, G. O. Animal hematotoxicology: a practical guide for toxicologists and biomedical researchers. **Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis Group**, 2008.

EGAN, M. F. *et al.* The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. **Cell**, v. 112, p. 257–269, 2003.

FERNANDES, M.L. **Investigação da ação central do timol em modelos comportamentais de ansiedade, depressão e convulsão em camundongos**. Dissertação de Mestrado. 2012. 108f. Programa de Pós-graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará. 2012.

FERNANDES M. L.; FERNANDES C.E.L.; SOUSA F.C.F. Avaliação da toxicologia aguda do timol (2-Isopropil-5-metil-fenol). **Anais do VII Encontro de Pesquisa e Pós graduação da UFC**. 22 a 24 out. 2014.

FILOCHE, S.K.; SOMA, K.; SISSONS, C.H. "Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate". **Oral Microbiol Immunol** v.20: p. 221–225. 2005

FRANKOWSKA, M. *et al.* Effects of GABAB receptor ligands in animal tests of depression and anxiety. **Pharmacol. Rep.**, v.59, p. 645-655, 2007.

FEREN, S. *et al.*, Efficacy of hypnotic medications and other medications used for insomnia. **Sleep Med. Clin.**, v.1, p.387-397, 2006.

FORTUNATO J.J., RÉUS G.Z., KIRSCH T.R., STRINGARI R.B., STERTZ L., KAPCZINSKI F., PINTO J.P., HALLAK J.E., ZUARDI A.W., CRIPPA J.A., QUEVEDO J. Acute harmine administration induces antidepressive-like effects and increases BDNF levels in the rat hippocampus. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. V.33(8), p.1425-30, 2009.

FRICCHIONE, G. Generalized anxiety disorder. **N. Engl J. Med.** v.351, p.675-682, 2004.

GAWALI, N. B. *et al.* Agmatine ameliorates lipopolysaccharide induced depressive-like behaviour in mice by targeting the underlying inflammatory and oxido-nitrosative mediators. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 149, p. 1–8, 2016.

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

GOLAN, D. E. *et al.* **Princípios de Farmacologia: A Base Fisiopatológica da Farmacologia**. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2014.

GOMES, P.B.B. *et al.* Central effects of isolated fractions from the root of *Petiveria alliacea* L. (tipe) in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v.120,p.209-214, 2008.

GOMES, P.B. *et al.* Anxiolytic-like effect of the monoterpene 1,4-cineole in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. V.96, p.287-293, 2010.

GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F.S. **Fundamentos de Psicofarmacologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 2012.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **J Neurochem.**, v.120 (5), p.850, 2012.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4 ed. Oxford: Oxford University Press, 2007.

HENRY, J. B. **Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais**. 20 ed. São Paulo: Manole, 2008.

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

HEYMSFIELD, S. B.; LOHMAN, T. G.; WANG, Z.; GOING, S. B. **Human Body Composition**. 2 ed: Human Kinetics, 2005. 206-208p.

HOLSBOER, F. Stress, hypercortisolism and corticosteroid receptors in depression: implications for therapy. **J Psychiatry Neurosci**. v. 62, p. 77–91, 2001.

HOSANG, G. M. et al. Interaction between stress and the BDNF Val66Met polymorphism in depression: a systematic review and meta-analysis. **BMC medicine**, v. 12, p. 7, 2014.

IBARGUEN-VARGAS, Y. et al. Deficit in BDNF does not increase vulnerability to stress but dampens antidepressant-like effects in the unpredictable chronic mild stress. **Behavioural Brain Research**, v. 202, n. 2, p. 245–251, 14 set. 2009.

INNECCO R; MATTOS S.H; CRUZ G.F. Determinação da altura de corte do alecrim-pimenta. **Horticultura Brasileira**. v. 18, p. 992-993, 2000.

JIANG, R. et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) Val66Met polymorphism interacts with gender to influence cortisol responses to mental stress. **Psychoneuroendocrinology**, v. 79, p. 13–19, 2017.

JULIANO, C. *et al*, Composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus herba-barona* Loisel growing wild in Sardinia. **Journal of Essential Oil Research**. v. 12, p: 516–522, 2000.

JUNG, K. H. et al. Blockade of AT1 receptor reduces apoptosis, inflammation, and oxidative stress in normotensive rats with intracerebral hemorrhage. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 322, n. 3, p. 1051-1058, 2007.

KEELEY, M.L.; STORCH, E.A. Anxiety disorders in youth. **J. Pediatr. Nurs.**, v.24, p.26-40, 2009.

KINRYS, G.; WYGANT, L.E. Transtorno de ansiedade em mulheres: gênero influencia o tratamento? **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v.27, p.43-50, 2005.

KLARIC, S. *et al*. Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. **Lett. Appl. Microbiol**. 2007, 44, 36-42.

KOLLA, N.; WEI, Z.; RICHARDSON, J.S.; LI, X.M. Amitriptyline and fluoxetine protect PC12 cells from death induced by hydrogen peroxide. **J Psychiatry Neurosciences**, v.30(3), p.196-201, 2005.

KULAK, A. et al. Redox dysregulation in the pathophysiology of schizophrenia and bipolar disorder: insights from animal models. **Antioxid Redox Signal.**, v. 18, n. 12, p. 1428-1443, 2013.

LAPA, A. J. *et al* Métodos de avaliação da atividade farmacológica de planta medicinais. **Sociedade Brasileira de Plantas Mediciniais - SBPM**, São Paulo. 2008.

LEITE, C. P.; MELO, C. T. V.; ARAÚJO, F. L. O.; FONSECA, F. N.; PEREIRA, F. A.; VASCONCELOS, S. M. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; SOUSA, F. C. F. Efeito de N-(hidroxibenzoil)-tiramina (riparina II) de Aniba riparia (Nees) Mez (Lauraceae) nos modelos comportamentais de convulsão induzida por pentilenotetrazol e estricnina em camundongos. In: XXI Reunião da Federação das Sociedades de Biologia Experimental, 2006, Águas de Lindóia. Anais. Águas de Lindóia, 2006.

LÉDA, P.H. de O.Portal de tecnologías para la inclusión social. Pesquisa com plantas medicinais no Brasil, uma história antiga. 2011. Acesso em AGOSTO/2017 disponível em:<http://tecnologiasociales.blogspot.com.br>.

LEVY, R.H., *et al.*: Antiepileptic Drugs, 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002.

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

LI, X.; WANG, L.; LI, Y.; BAI, L.; XUE, M.. Acute and subacute toxicological evaluation of scutellarin in rodents. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 60, p.106-111, 2011.

LOPES, A. **Dicionário Ilustrado de Fisioterapia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

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

MAES, M. et al. Depression's multiple comorbidities explained by (neuro) inflammatory and oxidative & nitrosative stress pathways. **Neuro Endocrinol Lett.**, v.32, n.1, p. 7-24, 2011a.

MAES, M. et al. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry.**, v. 35, n.3, p. 676-692, 2011b.

- MABEKU, L. B. K.; BENG, V. P.; KOUAM, J.; ESSAME, O.; ETOA, F. X. Toxicological evaluation of ethyl acetate extract of *Cylicodiscus gabunensis* stem bark (Mimosaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 3, p. 598-606, 2007.
- MACHADO, D.G. *et al.* Antidepressant-like effect of the extract of the extract of *Rosmarinus officinales* in mice: Involvement of the monoaminergic system. **Progr. Neuro-Psycopharmacol. Biol. Psychiatry**, v.33, p. 642-650, 2009.
- MACIEL, A.C.C; GUERRA, R.O. Prevalência e fatores associados à sintomatologia depressiva em idosos residentes no nordeste do Brasil. **J Bras Psiquiatr.**;v. 55(1) p.26-33. 2006
- MAGALHÃES, P. V. *et al.* N-acetyl cysteine add-on treatment for bipolar II disorder: a subgroup analysis of a randomized placebo-controlled trial. **J. Affect. Disord.**, v. 129, n. 1–3, p. 317–320, 2011.
- MARKS, W. A, *et al.* Epilepsy: Habilitation and rehabilitation. **Seminars PediatrNeuol.** V.10,p :151-154, 2003.
- MATOS, F.J.A. *et al.* Medicinal plants of Northeast Brazil containing thymol and carvacrol- *Lippia sidoides* Cham.and *L.gracillis* H.B.K. (Verbenaceae). **J. Essent. OilRes.**, v.11, p.666-668, 2000.
- MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais: guia de seleção e emprego das plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil.** 3. Ed. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2007.
- MASTELIĆ J. *et al.* **Comparative study on the antioxidant and biological activities of carvacrol, thymol, and eugenol derivatives.** **J. Agric andFood Chem.** V. 56, p. 3989-,96, 2008
- MCEWEN, B. S. Protective and damaging effects of stress mediators. **The NewEngland Journal of Medicine**, v. 338, n. 3, p. 171-179, 1998.
- MCEWEN, B. S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: Central role of the brain. **Physiological Reviews**, v. 87, p. 873–904, 2007.
- MELO, C. T. V. **Estudo dos efeitos farmacológicos de (O-Metil)-N-2,6-Dihidroxi-Benzoil Tiramina (Riparina III) de Aniba Riparia (NESS) MEZ (Lauraceae) em modelos comportamentais de ansiedade e depressão em camundongos.** Dissertação de Mestrado. 2006. 156f. Programa de Pós-graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará. 2006.
- MELO, C. T. V.; MONTEIRO, A. P.; LEITE, C. P.; ARAÚJO, F. L. O; LIMA, V. T. M.; 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-(dihidroxibenzoil) tiramine (riparin III) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 3, p. 451-454, 2006.

MELO, C.T.V. Investigação do efeito **antidepressivo da Riparina III: alterações neuroquímicas e avaliação do estresse oxidativo**. Tese de doutorado. 2012.228f. Programa de Pós-graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará. 2012.

MELO, C. T. V.; CARVALHO, A. M. R.; MOURA, B. A. et al. Evidence for the involvement of the serotonergic, noradrenergic, and dopaminergic systems in the antidepressant-like action of riparin III obtained from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 27, p. 104-112. 2013.

MELO FHC *et al.* Antidepressant-like effect of carvacrol (5-Isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement of dopaminergic system. **Fundamental and Clinical Pharmacology**. 2010

MELO FHC *et al.* Anxiolytic-like effect of Carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement with GABAergic transmission. **Fundamental and Clinical Pharmacology**. V. 24, p. 437-433, 2009.

MELO, F.H.C. **Investigação da ação central do Carvacrol em modelos de ansiedade, depressão e convulsão em camundongos e possíveis mecanismos farmacológicos envolvidos**. Dissertação de mestrado. 2010.133f. - Programa de Pós-graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará. 2010.

MELO, F.H.C. *et al.* Antinociceptive activity of carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) in mice. **Journal of Pharmacy**. p1-8 2012.

MELO, F.H.C. **Investigação de possíveis mecanismos de ação ansiolítico, antidepressivo e antinociceptivo do Carvacrol em camundongos: estudos comportamentais, neuroquímicos e participação do estresse oxidativo**. Tese de doutorado. 2014.183f. - Programa de Pós-graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará. 2014.

MILOS M, MASTELIC J AND JERKOVIC I. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare L. ssp hirtum*) **Food Chem**. V.7, p. 79, 2000

MORAES, I.G.S. *et al.*, Prevalência da depressão pós-parto e fatores associados. **Revista Saúde Pública**, v.40, p.65-70, 2006.

MOTTA, V. T. **Bioquímica Clínica: Princípios e Interpretações**. 4 ed. Porto Alegre: Médica Missau, 2003.

NESTLER, E. J. et al. Neurobiology of Depression Review. **Elsevier** v. 34, p. 13–25, 2002.

NG, F.; BERK, M.; DEAN, O.; BUSH, A. I. Oxidative stress in psychiatric disorders: Evidence base and therapeutic implications. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v.11, n. 6, p. 851 - 876, 2008.

NUNES, RS. Caracterização da *Lippia sidoides Cham.* (Verbanaceae) como matéria prima vegetal para uso em produtos farmacêuticos. **Scientia Plena**.1.n07 182. 2005

OECD (Organization for economic co-operation and development) 2001. **Guideline for Testing of Chemicals: Acute oral toxic class method. Guideline: 423.** http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECD_GL423.pdf. Acesso em agosto de 2017.

OECD (Organization for economic co-operation and development) 2008. **Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents. Guideline: 407.** <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9740701e.pdf>. Acesso em Setembro de 2017.

OLSON, R. GABA. In: DAVIS, K. CHARNEY, D. COYLE, J. NEMEROFF, C.; editors. **Neuropsychopharmacology: The fifty generation of progress.** Philadelphia: Lippincott, Williams e& Willikns, 2002.

ONU BRASIL. Disponível em: <https://nacoesunidas.org/preconceito-contra-minorias-aumenta-chances-de-ter-depressao-dizem-especialistas/> Acesso em: Setembro/2017.

OPAS/OMS Brasil. Disponível em: http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5391:tema-do-dia-mundial-da-saude-de-2017-depressao-e-debatida-por-especialistas-em-evento-na-opas-oms&Itemid=839. Acesso em: Outubro/2017.

OSTERMANN, M.; DICKIE, H.; BARRETT, N. A. Renal replacement therapy in critically ill patients with acute kidney injury—when to start. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 27, p. 2242-2248, 2012.

OZCAN, M.E.; GULEC, M.; OZEROL, E.; POLAT, R; AKYOL,O. Antioxidant enzyme activities and oxidative stress in affective disorders. **Int Clin Psychopharmacol.**, v.19(2), p.89-95, 2004.

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

PANUS, C.P. *et al*, **Farmacologia para Fisioterapeutas.** Artmed, Porto Alegre, 2011.

PELLOW, S., CHOPIN, P., FILE, S.E. Are the anxiogenic effects of yohimbine mediated by its action at benzodiazepine receptors? **Neuroscience Letters**, v. 55, p. 5-9, 1985

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.

- RADÜNZ LL. **Secagem em camada delgada de folhas de Lippia sidoides Cham.**In: Anais do XXX Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola. Paraná: 2001.
- RANG, HP; DALE, M.M. RITTER, J.M., MOORE, P.K. **Farmacologia**. 7 ed, Rio de Janeiro, Elsevier, 2012.
- REMMER, H.V.; SABIA, W.Q.M.; FREEMAN, G.; ESTLACK, L.; YANG, H.; GUO, Z.M.; HUANG, T.T.; STRONG, S.; LEE, S.; EPSTEIN, C.J.; RICHARDSON, A. Multiple deficiencies in antioxidant enzymes in mice result in a compound increase in sensitivity to oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v.36, p.1625-1634, 2004.
- REARDON, L.E. *et al.* A critical review of the empirical literature on the relation between anxiety and puberty. **Clin. Psychol.Rev.**, v.29, p.1-23, 2009.
- RICHARD, R.S.; WANG, L.; JELINEK, H. Erythrocyte oxidative damage in chronic fatigue syndrome. **Arch. Med. Res.**, v.38, p.94-98, 2007.
- SANTOS *et al.* Sintomas depressivos e prejuízo funcional de idosos de um Centro-Dia Geriátrico. **J. Bras. Psiquiatr.** v.61 no.2, Rio de Janeiro 2012
- SANTOS, L.K. X. **Estudo dos efeitos comportamentais e neuroquímicos do monoterpeno acetato de citronelila em camundongos.** Tese de doutorado. 2014.181f. - Programa de Pós-graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará. 2014.
- SERAFIM, A.P.; FELÍCIO, L.F. Dopaminergic modulation of grooming behavior in virgin and pregnant rats. **Braz.J.Med.Biol.Res.**, v.34, p.1465, 2001.
- SHELIN, Y. I. Depression and the hippocampus: Cause or effect? **Biological Psychiatry**, v. 70, n. 4, p. 308–309, 2011.
- SILVA M.I.G., Aquino M.R. Nt, Teixeira P.F. Nt *et al.* Central nervous system activity of acute administration of isopulegol in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.** V. 88 p. 141–147, 2007
- SILVA, M.I.G. **Investigação dos efeitos centrais e gastroprotetores do isopulegol em camundongos.** 2009, 243f. Tese de doutorado- Programa de Pós-graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará. 2009.
- SILVA, V.A. *et al.* Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana do extrato da Lippia sidoides Cham. sobre isolados biológicos de Staphylococcus aureus. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, Botucatu, v. 12, n. 4, dez. 2010 .
- SILVA, L.C. & SALLES, T.L.A. **O estresse ocupacional e as formas alternativas de tratamento. Recape** – Revista de Carreira e pessoas. Volume VI – Número 02, 2016.

SOERJATO, D.D Biodiversity prospecting and benefit sharing: perspectives from the field. **J. Pharmacol Exp Ther.**

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

SUN Y, LARRY WO, YING LI. Simple method for clinical assay of superoxide dismutase. **Clinical Chemistry.** V. 34(3), p. 497-500. 1988.

STAHL, S. M. **Psicofarmacologia: Bases neurocientíficas e aplicações práticas.** 4ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2014. 713p.

STELLA, F. *et al.* Depressão no idoso: diagnóstico, tratamento e benefícios da atividade física. **Motriz.** v.8, p.91-98. 2002.

STERU L *et al.* Tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v.85, p. 367–70, 1985.

SOUSA, F.C.F.; OLIVEIRA, I.C.M.; FERNANDES, M.L. Advances in the research of essential oils: Anxiolytic and sedative activity in Medicinal essential oils, editor: SOUSA, D.P. Chapter 7, p123-135 Nova Biomedical, 2012.

SOUSA, F.C.F. *et al.* Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Braz. J. Pharmacogn.**, v.18, p.642-654, 2008.

SOUSA, C. N. S. DE *et al.* Reversal of corticosterone-induced BDNF alterations by the natural antioxidant alpha-lipoic acid alone and combined with desvenlafaxine: Emphasis on the neurotrophic hypothesis of depression. **Psychiatry Research**, v. 230, n. 2, p. 211–219, 2015.

SOUSA, F. C. F.; MONTEIRO, A. P.; METO, C. T. V.; OLIVEIRA, G. R.; VASCONCELOS, S. M. M; FONTELES, M. M. F; GUTIERREZ, S. J. C.; PEREIRA, B. A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; VIANA, G. S. B. Antianxiety and antidepressant effects of Riparin III from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 78, p. 22-33, 2004.

SOUSA, F. C. F.; MONTEIRO, A. P.; METO, 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. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 12, p. 1005-1008, 2005.

SOUSA, F. C. F. DE *et al.* 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.

SIUCIAK, J. A. et al. Antidepressant-like effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 56, n. 1, p. 131–7, 1997.

SWINYARD E.A., BROWN W.C., GOODMAN L.S. Comparative assay of antiepileptic drugs in mice and rats. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 116, p. 319-330, 1952.

TEIXEIRA, C.P.L. **Estudo antidepressivo da Riparina II: investigação do mecanismo de ação através das alterações comportamentais, neuroquímicas e do estresse oxidativo**. Tese de doutorado. 2013.173f. Programa de Pós-graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará. 2013.

TEIXEIRA, C. P. L. et al. Antidepressant-like effect of riparin II from *Aniba riparia* in mice: Evidence for the involvement of the monoaminergic system. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 27, n. 2, p. 129–137, 2013.

TERBLANCHÉ FC, KORNELIUS G. Essential oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae) - A literature review. **Journal of Essential Oil Research**, v.8, p. 471- 485,1996.

TEISSEDE PL & WATERHOUSE AL. Inhibition of oxidation of human low-density lipoproteins by phenolic substances in different essential oils varieties. **J. Agric. Food Chem.** V. 48, p. 3801- 3804, 2000.

TORRES, C.; ESCARABAJAL, M.D. Validation of a behavioral recording automated system in the elevated plus-maze test. **Life Sci.**, v.70, p. 1751-1762, 2002.

VASCONCELOS, M.C. **Estudo da toxicologia clínica e gentoxicidade do fitoterápico Tamaril capsula, em voluntários sadios**. 162f. 2004. Dissertação de mestrado. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

VASCONCELOS, A. S. et al. Subchronic administration of riparin III induces antidepressive-like effects and increases BDNF levels in the mouse hippocampus. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 29, n. 4, p. 394–403, 2015

VOKOU D.; KOKKINI, S. & BESSIERE, J. M. Geographic variation of greek oregano (*Origanum vulgare ssp. hirtum*) essential oils. **Biochem. Syst. Ecol.** V. 21, p. 287-291, 1993.

WALL, M.E; WANI, M.C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **J. Ethnofarmacology**, v.51, p.239-254, 1996.

WEGENER, G.; HARVEY, B.H.; BONEFELD, B.; MULLER, H.K.; VOLKE, V; OVERSTREEET, D.H.; ELFVING, B. Increased stress-evoked nitric oxide signaling in the Flindres sensitive line (FSL) rat: a genetic animal model of depression. **Int J Neuropsychopharmacol.**, v.13(4), p.461-473, 2010.

WANG, R. *et al.* The antidepressant effects of curcumin in the forced swimming test involve 5-HT₁ and 5-HT₂ receptors. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 578, p.43-50, 2008.

World Health Organization (WHO), 2017. Disponível em:
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/>> Acesso em: Setembro/ 2017.

ZAFIR, A.; ARA, A.; BANU, N. In vivo antioxidant status: a putative target of antidepressant action. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v.33 (2), p.220-228, 2009.

ZHAO, Z.; WANG, W.; GUO, H.; ZHOU, D. Antidepressant-like effect of liquiritin from *Glycyrrhiza uralensis* in chronic variable stress induced depression model rats. **Behav Brain Res.**, v.194 (1), p.108-113, 2008.

ANEXO- Folha de aprovação do projeto pelo CEPA- UFC

Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza – CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 59/2014, sobre o projeto intitulado: **“INVESTIGAÇÃO DOS POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO CENTRAL DO TIMOL EM CAMUNDONGOS: ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS, ESTUDOS NEUROQUÍMICOS E PARTICIPAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO”**, de responsabilidade da Prof. Dr. Francisca Cléa Florenço de Sousa, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA - em reunião realizada em 30 de outubro de 2014.

Fortaleza, 05 de novembro de 2014

Prof. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

Prof. Dra. Nylane M. Nunes de Alencar
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA