

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

**CARLA THICIANE VASCONCELOS DE MELO**

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO ANTIDEPRESSIVO DA RIPARINA III:  
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS, NEUROQUÍMICAS E AVALIAÇÃO DO  
ESTRESSE OXIDATIVO**

**FORTALEZA-CE**

**2012**

**CARLA THICIANE VASCONCELOS DE MELO**

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO ANTIDEPRESSIVO DA RIPARINA III:  
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS, NEUROQUÍMICAS E AVALIAÇÃO DO  
ESTRESSE OXIDATIVO**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Farmacologia. Área de Concentração: Neurofarmacologia

Orientador (a):

Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa

**FORTALEZA-CE**

**2012**

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

- 
- M485i Melo, Carla Thiciane Vasconcelos de.  
Investigação do efeito antidepressivo da riparia III: alterações comportamentais, neuroquímicas e avaliação do estresse oxidativo. / Carla Thiciane Vasconcelos de Melo. – 2012. 228f.: il. color., enc. ; 30 cm.
- Tese (doutorado). – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Doutorado em Farmacologia, Fortaleza, 2012.  
Área de Concentração: Neurofarmacologia.  
Orientação: Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa.
1. Etnofarmacologia. 2. Depressão. 3. Antidepressivo. 4. Monoaminas Biogênicas. 5. Antioxidantes. I. Título.

---

CDD 615.78

**CARLA THICIANE VASCONCELOS DE MELO**

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO ANTIDEPRESSIVO DA RIPARINA III:  
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS, NEUROQUÍMICAS E AVALIAÇÃO DO  
ESTRESSE OXIDATIVO.**

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

**Aprovada em:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Profa. Dra. Silvânia Maria Mendes de Vasconcelos  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Profa. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar  
Universidade Federal do Ceará – UFC (Sobral)

---

Profa. Dra. Adriana Rolim Campos Barros  
Universidade de Fortaleza – UNIFOR

---

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

#### *Dedicatória*

*Ao Senhor meu Deus, por esse momento de glória; pois eu sei como não foi fácil, mas o Senhor estava lá, o tempo todo ao meu lado, me dando força e não me deixando esmorecer. Aqui registro a minha gratidão e alegria, pela Tua graça a mim dispensada.*

*Aos meus pais, José de Maria e Maria de Fátima, pela dedicação e esforço incondicionais aos meus estudos, e, por me ensinarem o verdadeiro significado do amor e da integridade.*

*Ao meu esposo, Fernando Luiz, meu companheiro de todos os momentos, pelo compartilhamento das dificuldades e satisfação nas alegrias, além do seu suporte, amor e carinho a mim dedicados.*

*Aos meus irmãos, Carla Cristhiane e José de Maria Júnior, por fazerem parte da minha vida e por estarem presentes nos momentos difíceis.*

*Agradeço a Deus, razão da minha vida, que me deu força e iluminação para a realização deste trabalho, sem as quais eu não teria conseguido.*

## AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa**, amiga e orientadora, que me recebeu no laboratório de Neurofarmacologia com imenso carinho desde a Iniciação Científica, há dez anos. Agradeço a você por ter despertado em mim a vontade de ser pesquisadora, por me incentivar a não esmorecer e acima de tudo por acreditar e confiar em mim. Agradeço pelo tempo e orientação dedicados, pela sua enorme paciência, por ser uma pedra firme que serviu de base para o meu crescimento profissional. Dedico a você todo o meu carinho e gratidão, que servirão para engrandecer ainda mais a nossa amizade.

Às **professoras doutoras do laboratório de Neurofarmacologia, Glauce Socorro de Barros Viana, Silvânia Maria Mendes de Vasconcelos e Danielle Silveira Macêdo**, pessoas a quem tenho admiração e respeito, agradeço pelas colaborações e pela disponibilidade dando apoio à pesquisa e à realização dos trabalhos.

Ao Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, nas pessoas do **Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho** e do **prof. Dr. Stanley Juan Chávez Gutierrez**, que gentilmente nos cederam a substância isolada e que muito colaboraram para a realização deste estudo.

Aos professores doutores, **Cícero Francisco Bezerra Felipe, Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar, Silvânia Maria Mendes de Vasconcelos e Adriana Rolin Campos Barros**, por terem gentilmente aceito o convite para participar da Banca Examinadora desta Tese.

A todos os professores do curso de pós-graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, em especial pelos conhecimentos transmitidos e dedicação permanente aos alunos e ao programa de pós-graduação.

Ao meu esposo, **Fernando Luiz Oliveira de Araújo**, meu fiel e sincero companheiro e amigo, presente em todos os momentos, por entender a minha ausência pelo tempo dedicado a este trabalho, por me fazer ter paciência nas horas de aflição e, principalmente, por me fazer ver a vida de um modo diferente, e me fazer ser uma pessoa melhor!!!

À minha amiga, **Caroline Porto Leite**, que caminhou junto comigo em praticamente todos os experimentos, que sempre tem uma palavra de conforto e de otimismo me fazendo acreditar que no final tudo dá certo!!!

Às minhas queridas amigas **Aline Albuquerque, Patrícia Gomes, Emmanuelle Coelho e Izabel Gomes** por quem minha estima é imensurável, pela imprescindível presença constante em minha vida desde o início da minha jornada na Neurofarmacologia.

Às amigas **Marina Lima, Edith Teles e Isabel Linhares**, pelos momentos bons que passamos durante essa trajetória e que me fizeram rir até mesmo das coisas que me afligiam!!

Aos colegas do laboratório de Neurofarmacologia, **Alyne Mara, Brinell Arcanjo e Leonardo Freire** que sempre me ajudaram na realização dos experimentos, principalmente no início do doutorado e ao **Arnaldo** que me ajudou nos experimentos neuroquímicos, ao passar as minhas amostras no HPLC.

Aos demais amigos do laboratório de Neurofarmacologia **Fernando Luiz (de novo), Emiliano Rios, Nayrton Flávio, Camila Nayane, Rafaelly Siqueira, Maria do Carmo, Luciana e Helvira** pela amizade, cooperação e apoio recebido.

A todos os estudantes de iniciação científica do LNF, pela dedicação e seriedade na execução dos experimentos.

Às técnicas do Laboratório de Neurofarmacologia, **Vilani e Lena**, pela companhia constante, alegre e animadora no laboratório.

À todos os funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, especialmente a **Aura** (que teve muita paciência comigo), **Márcia Borges, Alana, Ana Paula e Haroldo**, pela dedicação ao trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

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

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



## RESUMO

**Investigação do Efeito Antidepressivo da Riparina III: Alterações Comportamentais, Neuroquímicas e Avaliação do Estresse Oxidativo. CARLA THICIANE VASCONCELOS DE MELO. Orientador (a): Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC, 2012.**

A depressão é uma doença recorrente e incapacitante cujo tratamento está relacionado com modulações nos sistemas monoaminérgicos em diversas áreas cerebrais. A riparina III (ripIII), isolada do fruto verde de *Aniba riparia*, apresentou, em estudos prévios, efeito antidepressivo. Dessa forma, objetivando investigar o potencial antidepressivo da ripIII, foram realizados testes comportamentais como o nado forçado (TNF), suspensão da cauda (TSC), hipotermia induzida por apomorfina e campo aberto. Para avaliar o envolvimento das monoaminas, os animais foram pré-tratados com antagonistas específicos para receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A/2C</sub> e 5-HT<sub>3</sub> de serotonina (5-HT), D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> de dopamina (DA) e  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  de noradrenalina (NA) no TNF. Além disso, os animais pré-tratados com ripIII e submetidos ou não ao TNF tiveram as áreas cerebrais hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal retiradas para detecção dos níveis de monoaminas ou para realização dos experimentos de estresse oxidativo, investigando a atividade enzimática da catalase e superóxido dismutase, quantificando os níveis de glutathiona reduzida (GSH) e nitrito/nitrato, além do grau de lipoperoxidação. A ripIII foi administrada agudamente, por via oral, na dose de 50 mg/kg, em todos os testes. Os resultados mostraram que a ripIII apresentou efeito antidepressivo nos modelos TNF e TSC sugerindo ser específico, uma vez que os animais não apresentaram alterações na atividade locomotora no campo aberto. Além disso, no TNF, os antagonistas sulpirida (D<sub>2</sub>), prazosina ( $\alpha_1$ ), ioimbina ( $\alpha_2$ ), NAN-190 (5-HT<sub>1A</sub>) e ondansetron (5-HT<sub>3</sub>) reverteram o tempo de imobilidade da ripIII sugerindo a participação desses receptores para o efeito da substância, enquanto não houve alteração deste efeito na presença dos antagonistas SCH23390 (D<sub>1</sub>) e ritanserina (5-HT<sub>2A/2C</sub>) mostrando o não envolvimento desses receptores no efeito da droga. A ripIII não foi capaz de reverter a hipotermia induzida por apomorfina, que na dose utilizada, induz hipotermia por modular receptores  $\beta$ -adrenérgicos, sugerindo que o efeito da ripIII não está relacionado com esses receptores. A ripIII após o TNF, em corpo estriado e córtex pré-frontal, aumentou os níveis de DA, 5-HT e NA, diminuiu os metabólitos DOPAC, HVA, 5-HIAA e as taxas metabólicas e, no hipocampo, aumentou 5-HT e NA além do metabólito 5-HIAA, mas manteve as taxas metabólicas. A administração de ripIII, antes do TNF, reverteu o aumento nos níveis de peroxidação lipídica e nitrito-nitrato, reduziu a atividade da catalase mas aumentou os níveis de GSH em hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal. Esses parâmetros não foram alterados nos animais não submetidos ao estresse. Em conclusão, o estudo sugere uma ação moduladora, exercida por ripIII, sobre o funcionamento dos sistemas noradrenérgico, dopaminérgico e serotoninérgico, em nível central, como mecanismo para o efeito antidepressivo no TNF, bem como a participação de propriedades antioxidantes diretas ou indiretas dessa droga, através da capacidade de modificar a resposta ao estresse oxidativo neuronal.

**Palavras-chave:** Etnofarmacologia. Depressão. Antidepressivos. Monoaminas Biogênicas. Antioxidantes.

## ABSTRACT

**Investigation of Antidepressant Effect of Riparin III: Behavioral and Neurochemical Alterations and Evaluation of Oxidative Stress. CARLA THICIANE VASCONCELOS DE MELO. Supervisor: Prof. Dr. Francisca Cléa Florenço de Sousa. Doctorate's thesis. Post-graduation Program in Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology, UFC, 2012.**

Depression is a disabling and recurrent disease whose treatment is related to modulations in monoaminergic systems in several brain areas. Riparin III (ripIII), isolated from unripe fruit of *Aniba riparia*, has shown previously antidepressant-like effects. Thus, in order to investigate the antidepressant effect of ripIII, behavioral experiments were performed, as the forced swim (FST), tail suspension (TST), apomorphine-induced hypothermia and open field tests. To assess the involvement of monoaminergic system, animals were pretreated with specific antagonists to 5-HT<sub>1A</sub>-, 5-HT<sub>2A/2C</sub>-, and 5-HT<sub>3</sub>-serotonin (5-HT) receptors, to D<sub>1</sub>- and D<sub>2</sub>-dopamine (DA) receptors and to  $\alpha_1$ - and  $\alpha_2$ -noradrenaline (NA) receptors in FST. Further, animals pretreated with ripIII and submitted or not to the FST had their brain areas such as hippocampus, striatum and prefrontal cortex removed for detection of monoamine levels or to carry out the experiments of oxidative stress, in which, it was investigated enzymatic activities of catalase and superoxide dismutase, measured the levels of reduced glutathione (GSH) and nitrite/nitrate, and lipid peroxidation degree. RipIII was acutely administered orally at a dose of 50 mg/kg in all tests. The results showed that ripIII presented antidepressant effect on the FST and TST suggesting that this effect is specific, since the animals showed no changes in locomotor activity in open field test. In the evaluation of monoaminergic systems, the results showed that the antagonists sulpiride (D<sub>2</sub>), prazosin ( $\alpha_1$ ), yohimbine ( $\alpha_2$ ), NAN-190 (5-HT<sub>1A</sub>) and ondansetron (5-HT<sub>3</sub>) reversed the immobility time of ripIII on the FST suggesting the involvement of these receptors, while no change of this effect in the presence of the antagonists SCH23390 (D<sub>1</sub>) and ritanserin (5-HT<sub>2A/2C</sub>) was observed, suggesting non-participation of these receptors in the drug effect. RipIII was unable to reverse the hypothermia induced by apomorphine that at the dose used, modulates  $\beta$ -adrenergic receptors inducing hypothermia, suggesting that the effect of ripIII is not related to these receptors. RipIII, after FST, in the striatum and prefrontal cortex, increased levels of DA, 5-HT and NA, decreased DOPAC, HVA, 5-HIAA metabolites and decreased metabolic rates, and in the hippocampus, increased 5-HT and NA and 5-HIAA metabolite, but maintained metabolic rates. The prior administration of ripIII before the forced swimming, reversed the increased levels of lipid peroxidation and nitrite-nitrate, reduced the activity of catalase but increased levels of GSH in hippocampus, striatum and prefrontal cortex. These parameters were not altered in animals not exposed to stress. In conclusion, the study suggests a modulating action exerted by ripIII on the functioning of the noradrenergic, dopaminergic and serotonergic levels in the brain, as a mechanism for the antidepressant effect in the FST, as well as the participation of direct or indirect antioxidant properties of this drug through the ability to modify the neuronal response to oxidative stress.

**Key-words:** Ethnopharmacology. Depression. Antidepressive agents. Biogenic monoamines. Antioxidants.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Síntese das catecolaminas .....	25
Figura 2 - Metabolização de dopamina no cérebro .....	26
Figura 3 - Síntese e degradação da 5-HT .....	27
Figura 4 - Principais vias dopaminérgicas no SNC .....	29
Figura 5 - Vias serotoninérgicas no cérebro .....	33
Figura 6 - Vias noradrenérgicas no cérebro.....	36
Figura 7 – Integração dos sistemas de defesa enzimáticos.....	42
Figura 8 - Aniba riparia (Nees) Mez. ....	53
Figura 9 - Estrutura química da riparina III.....	55
Figura 10 - Retirada do encéfalo. ....	76
Figura 11 - Representação da região anatômica no camundongo referente ao córtex pré-frontal .....	76
Figura 12 - Retirada do hipocampo. ....	77
Figura 13 - Retirada do corpo estriado .....	77
Figura 14 - Efeito da riparina III, via oral, sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos.....	91
Figura 15 - Efeito da riparina III, imipramina, fluoxetina e bupropiona, via oral, sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos.....	93
Figura 16 - Efeito da riparina III, imipramina, bupropiona e fluoxetina, via oral, sobre o tempo de imobilidade, em segundos, no teste do nado forçado em camundongos. ....	95
Figura 17 - Efeito da riparina III (50 mg/kg) e bupropiona (30 mg/kg), via oral, sozinhos ou associados com SCH23390 (15 $\mu$ g/kg), antagonista dos receptores dopaminérgicos D1, sobre o tempo de imobilidade (s) no teste do nado forçado em camundongos.....	97
Figura 18 - Efeito da riparina III (50 mg/kg) e bupropiona (30 mg/kg), via oral, sozinhos ou associados com sulpirida (50 mg/kg), antagonista dos receptores dopaminérgicos D2, sobre o tempo de imobilidade (s) no teste do nado forçado em camundongos.....	98
Figura 19 - Efeito da riparina III (50 mg/kg) e imipramina (10 mg/kg), via oral, sozinhos ou associados com prazosina (1 mg/kg), antagonista dos receptores adrenérgicos $\alpha_1$ , sobre o tempo de imobilidade (s) no teste do nado forçado em camundongos.....	100

Figura 20 - Efeito da riparina III (50 mg/kg) e imipramina (10 mg/kg), via oral, sozinhos ou associados com ioimbina (1 mg/kg), antagonista dos receptores adrenérgicos $\alpha_2$ , sobre o tempo de imobilidade (s) no teste do nado forçado em camundongos.....	101
Figura 21 - Efeito da riparina III (50 mg/kg) e fluoxetina (35 mg/kg), via oral, sozinhos ou associados com PCPA (100 mg/kg), inibidor da síntese de serotonina, sobre o tempo de imobilidade (s) no teste do nado forçado em camundongos. ....	103
Figura 22 - Efeito da riparina III (50 mg/kg) e fluoxetina (35 mg/kg), via oral, sozinhos ou associados com NAN-190 (0,5 mg/kg), antagonista dos receptores serotoninérgicos 5-HT <sub>1A</sub> , sobre o tempo de imobilidade (s) no teste do nado forçado em camundongos. ....	104
Figura 23 - Efeito da riparina III (50 mg/kg) e fluoxetina (35 mg/kg), via oral, sozinhos ou associados com ritanserina (4 mg/kg), antagonista dos receptores serotoninérgicos 5-HT <sub>2A/2C</sub> , sobre o tempo de imobilidade (s) no teste do nado forçado em camundongos.	105
Figura 24 - Efeito da riparina III (50 mg/kg) e fluoxetina (35 mg/kg), via oral, sozinhos ou associados com ondansetron (0,1 mg/kg), antagonista dos receptores serotoninérgicos 5-HT <sub>3</sub> , sobre o tempo de imobilidade (s) no teste do nado forçado em camundongos.....	106
Figura 25 - Efeito da riparina III e imipramina, via oral, sobre a variação de temperatura corporal no teste da hipotermia induzida por apomorfina em camundongos.....	108
Figura 26 - Efeito da riparina III, imipramina, fluoxetina e bupropiona, via oral, sobre a atividade locomotora espontânea no teste do campo aberto em camundongos. ....	110
Figura 27 - Determinação dos níveis de DA, DOPAC e HVA em corpo estriado de camundongos normais e em tratados com riparina III ou veículo e submetidos ao teste do nado forçado. ....	114
Figura 28 - Determinação dos níveis de 5-HT, 5-HIAA e NA em corpo estriado de camundongos normais e em tratados com riparina III ou veículo e submetidos ao teste do nado forçado. ....	116
Figura 29 - Determinação das taxas de metabolização dos neurotransmissores em corpo estriado de camundongos.....	118
Figura 30 - Determinação dos níveis de DA e DOPAC em córtex pré-frontal de camundongos normais e em tratados com riparina III ou veículo e submetidos ao teste do nado forçado. ....	122

Figura 31 - Determinação dos níveis de 5-HT, 5-HIAA e NA em córtex pré-frontal de camundongos normais e em tratados com riparina III ou veículo e submetidos ao teste do nado forçado. ....	124
Figura 32 - Determinação das taxas de metabolização dos neurotransmissores em córtex pré-frontal de camundongos. ....	126
Figura 33 - Determinação dos níveis de DA e DOPAC em hipocampo de camundongos normais e em tratados com riparina III ou veículo e submetidos ao teste do nado forçado. ....	129
Figura 34 - Determinação dos níveis de 5-HT, 5-HIAA e NA em hipocampo de camundongos normais e em tratados com riparina III ou veículo e submetidos ao teste do nado forçado. ....	131
Figura 35 - Determinação das taxas de metabolização dos neurotransmissores em córtex pré-frontal de camundongos. ....	133
Figura 36 - Efeitos da riparina III sobre a atividade da catalase em hipocampo de animais submetidos (Controle-Nado; RipIII-Nado) ou não (Controle; RipIII-50) ao estresse do nado forçado. ....	136
Figura 37 - Efeitos da riparina III sobre a atividade da catalase em corpo estriado de animais submetidos (Controle-Nado; RipIII-Nado) ou não (Controle; RipIII-50) ao estresse do nado forçado. ....	137
Figura 38 - Efeitos da riparina III sobre a atividade da catalase em córtex pré-frontal de animais submetidos (Controle-Nado; RipIII-Nado) ou não (Controle; RipIII-50) ao estresse do nado forçado. ....	138
Figura 39 - Efeitos da riparina III sobre os níveis de GSH em córtex pré-frontal de animais submetidos (Controle-Nado; RipIII-Nado) ou não (Controle; RipIII-50) ao estresse do nado forçado. ....	141
Figura 40 - Efeitos da riparina III sobre os níveis de GSH em corpo estriado de animais submetidos (Controle-Nado; RipIII-Nado) ou não (Controle; RipIII-50) ao estresse do nado forçado. ....	142
Figura 41 - Efeitos da riparina III sobre os níveis de GSH em córtex pré-frontal de animais submetidos (Controle-Nado; RipIII-Nado) ou não (Controle; RipIII-50) ao estresse do nado forçado. ....	143

Figura 42 - Efeitos da riparina III sobre a quantidade de SOD em hipocampo de animais submetidos (Controle-Nado; RipIII-Nado) ou não (Controle; RipIII-50) ao estresse do nado forçado. ....	146
Figura 43 - Efeitos da riparina III sobre a quantidade de SOD em corpo estriado de animais submetidos (Controle-Nado; RipIII-Nado) ou não (Controle; RipIII-50) ao estresse do nado forçado. ....	147
Figura 44 - Efeitos da riparina III sobre a quantidade de SOD em córtex pré-frontal de animais submetidos (Controle-Nado; RipIII-Nado) ou não (Controle; RipIII-50) ao estresse do nado forçado. ....	148
Figura 45 - Efeitos da riparina III sobre os níveis de MDA (malonildialdeído) em hipocampo de animais submetidos (Controle-Nado; RipIII-Nado) ou não (Controle; RipIII-50) ao estresse do nado forçado. ....	151
Figura 46 - Efeitos da riparina III sobre os níveis de MDA (malonildialdeído) em corpo estriado de animais submetidos (Controle-Nado; RipIII-Nado) ou não (Controle; RipIII-50) ao estresse do nado forçado. ....	152
Figura 47 - Efeitos da riparina III sobre os níveis de MDA (malonildialdeído) em córtex pré-frontal de animais submetidos (Controle-Nado; RipIII-Nado) ou não (Controle; RipIII-50) ao estresse do nado forçado. ....	153
Figura 48- Efeitos da riparina III sobre a produção de nitrito/nitrato em hipocampo de animais submetidos (Controle-Nado; RipIII-Nado) ou não (Controle; RipIII-50) ao estresse do nado forçado. ....	156
Figura 49 - Efeitos da riparina III sobre a produção de nitrito/nitrato em corpo estriado de animais submetidos (Controle-Nado; RipIII-Nado) ou não (Controle; RipIII-50) ao estresse do nado forçado. ....	157
Figura 50 - Efeitos da riparina III sobre a produção de nitrito/nitrato em córtex pré-frontal de animais submetidos (Controle-Nado; RipIII-Nado) ou não (Controle; RipIII-50) ao estresse do nado forçado. ....	158

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 - Propriedades e localizações dos subtipos de receptores dopaminérgicos .....	31
Quadro 2 - Esquema do Teste do Campo Aberto.....	69
Quadro 3 - Esquema do Teste da Hipotermia Induzida por Apomorfina.....	70
Quadro 4 - Esquema do Teste da Suspensão da Cauda.....	71
Quadro 5 - Esquema do Teste do Nado Forçado.....	73

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Curva de dose-resposta da riparina III no teste do nado forçado em camundongos.....	90
Tabela 2 - Níveis de DA, DOPAC e HVA em corpo estriado de camundongos normais e em tratados com ripIII ou veículo e submetidos ao teste do nado forçado. ....	113
Tabela 3- Níveis de 5-HT, 5-HIAA e NA em corpo estriado de camundongos normais e em tratados com riparina III ou veículo e submetidos ao teste do nado forçado. ....	115
Tabela 4 - Tabela 3. Taxas de metabolização DOPAC/DA, HVA/DA e 5-HIAA/5-HT em corpo estriado de camundongos normais e em tratados com riparina III ou veículo e submetidos ao teste do nado forçado.....	117
Tabela 5 – Níveis de DA e DOPAC em córtex pré-frontal de camundongos normais e em tratados com ripIII ou veículo e submetidos ao teste do nado forçado. ....	121
Tabela 6 - Níveis de 5-HT, 5-HIAA e NA em córtex pré-frontal de camundongos normais e em tratados com riparina III ou veículo e submetidos ao teste do nado forçado. ....	123
Tabela 7 - Taxas de metabolização DOPAC/DA, 5-HIAA/5-HT em córtex pré-frontal de camundongos normais e em tratados com riparina III ou veículo e submetidos ao teste do nado forçado. ....	125
Tabela 8 - Níveis de DA e DOPAC em hipocampo de camundongos normais e em tratados com ripIII ou veículo e submetidos ao teste do nado forçado. ....	128
Tabela 9 - Níveis de 5-HT, 5-HIAA e NA em hipocampo de camundongos normais e em tratados com riparina III ou veículo e submetidos ao teste do nado forçado. ....	130
Tabela 10 - Taxas de metabolização DOPAC/DA, 5-HIAA/5-HT em hipocampo de camundongos normais e em tratados com riparina III ou veículo e submetidos ao teste do nado forçado. ....	132
Tabela 11- Atividade da catalase em hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal de camundongos tratados com riparina III ou veículo, submetidos ou não, ao teste do nado forçado. ....	135



Tabela 12 - Níveis de GSH em hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal de camundongos tratados com riparina III ou veículo, submetidos ou não, ao teste do nado forçado. ....	140
Tabela 13 - Quantidade de SOD em hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal de camundongos tratados com riparina III ou veículo, submetidos ou não, ao teste do nado forçado. ....	145
Tabela 14 - Níveis de MDA (malonildialdeído) em hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal de camundongos tratados com riparina III ou veículo, submetidos ou não, ao teste do nado forçado. ....	150
Tabela 15 - Produção de nitrito/nitrato em hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal de camundongos tratados com riparina III ou veículo, submetidos ou não, ao teste do nado forçado. ....	155

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>5-HT</b>	Serotonina
<b>5HIAA</b>	Ácido 5 hidroxindolacético
<b>ATV</b>	Área tegmentar ventral
<b>AAS</b>	Ácido acetil salicílico
<b>AMPc</b>	Adenosina monofosfato cíclico
<b>ALE</b>	Atividade Locomotora Espontânea
<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>BSA</b>	Albumina sérica bovina
<b>BUP</b>	Bupropiona
<b>CEPA</b>	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
<b>CE</b>	Corpo estriado
<b>CNS</b>	Conselho Nacional de Saúde
<b>COMT</b>	Catecol-O-metil-transferase
<b>C<sub>6</sub>H<sub>6</sub></b>	Benzeno
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	Clorofórmio
<b>cont.</b>	Controle
<b>D<sub>1</sub></b>	Receptores dopaminérgicos do tipo 1
<b>D<sub>2</sub></b>	Receptores dopaminérgicos do tipo 2
<b>DA</b>	Dopamina
<b>DL50</b>	Dose letal que mata 50% dos animais
<b>DZP</b>	Diazepam
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DOPAC</b>	Ácido dihidroxifenilacético
<b>DTNB</b>	Ácido ditiobisnitrobenzóico
<b>EPM</b>	Erro padrão da média
<b>et al.</b>	E colaboradores
<b>EUA</b>	Estados Unidos
<b>EO</b>	Estresse oxidativo
<b>ERO</b>	Espécies reativas do oxigênio

<b>FLU</b>	Flumazenil
<b>GABA</b>	Ácido gama amino butírico
<b>GSH</b>	Glutathiona reduzida
<b>GSH-Px</b>	Glutathiona peroxidase
<b>GSH-Rd</b>	Glutathiona reduzida
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida de alta performance
<b>HVA</b>	Ácido homovanílico
<b>IMI</b>	Imipramina
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>IP<sub>3</sub></b>	Trifosfato de Inositol
<b>LC</b>	Locus coeruleus
<b>L-DOPA</b>	L-3,4-dihidroxifenilalanina
<b>MAO</b>	Monoamino oxidase
<b>MDA</b>	Malonildialdeído ou malondialdeído
<b>NA</b>	Noradrenalina
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NOS</b>	Óxido nítrico sintase
<b>NOS<sub>e</sub></b>	Óxido nítrico sintase endotelial
<b>NOS<sub>i</sub></b>	Óxido nítrico sintase induzível
<b>NOS<sub>n</sub></b>	Óxido nítrico sintase neuronal
<b>PI</b>	Fosfatidilinositol
<b>PKC</b>	Proteína quinase C
<b>SCH</b>	SCH23390
<b>SOD</b>	Superóxido dismutase
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>SUL</b>	Sulpirida
<b>TH</b>	Tirosina hidroxilase
<b>TBA</b>	Ácido tiobarbitúrico
<b>CPF</b>	Córtex pré-frontal
<b>MS</b>	Ministério da Saúde
<b>P</b>	Nível de Significância

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Considerações gerais sobre a depressão .....	21
1.2 Neurotransmissão monoaminérgica e seu envolvimento na depressão.....	23
1.2.1 Síntese das monoaminas.....	25
1.2.2 Sistema dopaminérgico e depressão .....	29
1.2.3. Sistema serotoninérgico e depressão .....	32
1.2.4. Sistema noradrenérgico e depressão.....	35
1.3 Estresse e depressão.....	38
1.3.1 Espécies reativas derivadas do oxigênio (ERO) e a depressão .....	40
1.3.1.2 Estresse oxidativo e depressão .....	47
1.4 Áreas cerebrais envolvidas na depressão.....	48
1.5 Plantas medicinais e ação sobre o SNC.....	50
1.6 A Família Lauraceae.....	51
1.6.1 Aniba riparia (Nees) Mez .....	52
1.6.2 Alcamidas .....	54
1.6.3 Riparina III (O-metil-N-2,6-dihidroxibenzoil-tiramina) .....	55
1.6.4 Propriedades Farmacológicas das Alcamidas Naturais de <i>Aniba riparia</i> .....	55
2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....	59
3. OBJETIVOS.....	62
3.1. Objetivo Geral .....	62
3.2. Objetivos Específicos .....	62
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	65
4.1. Material Botânico .....	65
4.2. Extração e Isolamento .....	65
4.3. Principais equipamentos utilizados .....	66
4.4. Drogas e Reagentes .....	67
4.5. Animais.....	67
4.6. Preparo das drogas.....	68
4.7. Tratamento dos grupos experimentais.....	68
4.8. Curva dose-resposta para riparina III no teste do nado forçado. ....	69

4.9. Testes Comportamentais. ....	69
4.9.1. Teste do Campo Aberto.....	69
4.9.2. Teste da Hipotermia Induzida por Apomorfina.....	70
4.9.3. Teste da Suspensão da Cauda.....	71
4.9.4. Teste do Nado Forçado.....	72
4.10. Testes Neuroquímicos. ....	74
4.10.1. Dissecção das áreas cerebrais em estudo.....	74
4.10.2 Determinação de monoaminas e metabólitos com HPLC.....	78
4.10.3. Estresse oxidativo.....	80
4.11. Análise Estatística.....	87
5. RESULTADOS.....	89
5.1. Estudos Comportamentais.....	89
5.1.1. Curva dose-resposta.....	89
5.1.2. Teste da Suspensão da Cauda.....	92
5.1.3. Teste do Nado Forçado.....	94
5.1.4. Teste da hipotermia induzida por apomorfina.....	107
5.1.5. Teste do Campo Aberto.....	109
5.2. Testes Neuroquímicos:.....	111
5.2.1. Determinação dos níveis de monoaminas em HPLC eletroquímico.....	111
5.2.2. Avaliação do efeito da riparina III sobre o estresse oxidativo.....	134
6 DISCUSSÃO.....	160
7 CONCLUSÕES.....	186
8 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	189
9 REFERÊNCIAS.....	190
10 ANEXOS.....	219
ANEXO 1 – Parecer do Comitê de Ética.....	219
ANEXO 2 – Trabalho publicado.....	220

## ***INTRODUÇÃO***

---

---

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Considerações gerais sobre a depressão

A depressão maior é uma condição clínica comum, crônica e recorrente. Está frequentemente associada a incapacitação funcional e comprometimento da saúde física. Os pacientes deprimidos apresentam limitação da sua atividade e bem-estar além de necessitarem de maior utilização dos serviços de saúde (FLECK *et al.*, 2003). Apresenta como características, além do humor deprimido, sintomas como redução da energia, insônia, diminuição da autoconfiança, choro, diminuição do interesse sexual e de outras atividades prazerosas, sentimento de desesperança e desamparo, inabilidades de lidar com responsabilidades do dia-a-dia, pessimismo em relação ao futuro, retraimento social e diminuição do discurso (FLECK *et al.*, 2003) além de apresentarem alteração do peso e do apetite, nervosismo, irritabilidade, distúrbios do sono e deficiências cognitivas incluindo o impedimento da habilidade de pensamento, concentração e tomada de decisões (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2001).

A complexidade desta doença é ainda maior pelo fato de que ela coexiste com outras condições psiquiátricas, como a ansiedade, o que pode levar ao paciente também apresentar sintomas autonômicos (tremor, palpitação, boca seca, dor no estômago), apresentando grande impacto no curso da doença depressiva levando a recuperação tardia, aumentando risco de recaída, incapacidade e tentativas de suicídio (HIRSCHFELD, 2001).

Essa doença atinge aproximadamente 17% da população mundial resultando em enorme sofrimento pessoal, assim também como uma sobrecarga econômica e social (KESSLER *et al.*, 2003). No Brasil, cerca de 12% da população apresentará depressão no seu curso de vida (VALENTINI *et al.*, 2004) e esses índices são mais elevados entre os pacientes dos serviços de atenção primária. Um estudo da Organização Mundial da Saúde (OMS) conduzido no Rio de Janeiro em 15 centros de atenção primária à saúde mostrou uma prevalência de 29,5% para os transtornos depressivos (USTUN; SARTORIUS, 1995). A maioria dos indivíduos com depressão é atendida pelos serviços de atenção primária,

enquanto apenas uma minoria recebe atendimento de especialistas em saúde mental (HANS-ULRICH *et al.*, 2001). Apesar de a depressão apresentar uma prevalência relativamente alta nos serviços de atenção primária, seus diagnóstico e tratamento são insuficientes. Há falha na detecção do transtorno em até 50% dos casos e provém tratamento em apenas um terço deles. Nos pacientes em que o transtorno não é diagnosticado ou é subtratado, observa-se a pior evolução (VALENTINI *et al.*, 2004). Esses achados contribuem para a conclusão de que a depressão é uma doença de alta complexidade e heterogeneidade o que tem tornado difícil definir, diagnosticar e tratar.

A etiologia da depressão ainda não tem sido completamente identificada, mas acredita-se que é resultante de anormalidades celulares e moleculares que interagem com fatores genéticos e ambientais (KRISHNAN; NESTLER, 2008). O estresse parece ser um dos principais fatores ambientais que predis põem um indivíduo a depressão (ANDREWS *et al.*, 2011). Em cerca de 60% dos casos, os episódios depressivos são precedidos pela ocorrência de fatores estressantes, principalmente de origem psicossocial. Além disso, a conhecida influência de fatores genéticos no desenvolvimento da depressão poderia ser decorrente de um aumento da sensibilidade a eventos estressantes (JOCA *et al.*, 2003). Corroborando com essas informações, um estudo longitudinal com ampla amostra comunitária mostrou que 88,1% dos casos de depressão diagnosticados estavam relacionados com algum evento estressante e que apenas 11,9% pareceram ter etiologia endógena, ou seja, o episódio depressivo surgiu sem nenhum engatilhador ambiental (KELLER *et al.*, 2007).

De alguma forma, a relação entre o estresse e a depressão deve ser mediada no cérebro, mas as causas neurobiológicas da depressão são notoriamente desconhecidas (BERTON; NESTLER, 2006). No entanto, sabe-se que os neurotransmissores monoaminérgicos, noradrenalina, serotonina e dopamina, estão envolvidos diretamente ou indiretamente nos caminhos bioquímicos da depressão (KRISHNAN; NESTLER, 2008) uma vez que todos os antidepressivos utilizados clinicamente agem sobre as monoaminas através de diversos mecanismos (MAYORGA *et al.*, 2001; Cryan *et al.*, 2004; DZIEDZICKA-WAZYLEWSKA *et al.*, 2006). As principais argumentações sugerem que



os níveis de noradrenalina, serotonina e dopamina estão diminuídos no cérebro de pacientes deprimidos (SAPOLSKY, 2004), então, uma vez que os níveis dessas monoaminas são regulados por controle homeostático (BEST *et al.*, 2010), o estresse de alguma forma perturba esse controle e altera a quantidade dessas aminas causando a depressão (ANDREWS *et al.*, 2011).

Projeções do impacto da depressão para o ano de 2020 colocam-na em segundo lugar no “ranking” das doenças incapacitantes, superada apenas pelas doenças cardíacas. Neste contexto, a descoberta de novos fármacos, eficazes, isentos de efeitos colaterais e com reduzida toxicidade, isto é, com menor risco em situações de “overdose”, representa significativo investimento em saúde pública, correspondendo, no início desse milênio, o mercado da ordem de 10-20 bilhões de dólares (ROMEIRO *et al.*, 2003).

Sendo assim, conforme essas informações, apesar de não ser conhecido completamente a etiologia da depressão, acredita-se que o estresse possa ser um dos principais fatores desencadeantes e que o tratamento com antidepressivos envolve a modulação dos sistemas monoaminérgicos, o que dá suporte para a investigação desses processos no presente trabalho.

## **1.2 Neurotransmissão monoaminérgica e seu envolvimento na depressão**

Nos últimos 30 anos, a neuroquímica é a área que vem recebendo maior destaque nas pesquisas sobre a fisiopatologia da depressão. Isto teve início a partir do descobrimento do mecanismo de ação de alguns fármacos. Por exemplo, o uso crônico da reserpina no tratamento de pacientes com hipertensão ou esquizofrenia apresentava um risco de desenvolvimento da depressão em 25% dos casos (ROMEIRO *et al.*, 2003). Essa evidência clínica, associada com o mecanismo de ação deste fármaco, que consiste na inibição do armazenamento de 5-HT e NA nas vesículas das terminações nervosas, suportou a hipótese que afirma que a depressão é causada por uma depleção dos níveis das monoaminas transmissoras, particularmente a serotonina (5-HT), noradrenalina (NA) e, em menor extensão, a dopamina (DA), em certos locais no cérebro, enquanto a mania resulta de um

excesso funcional (MANJI et al., 2001). Este mecanismo foi estudado inicialmente em relação as alterações agudas sobre os níveis sinápticos dos neurotransmissores na tentativa de estabelecer hipóteses sobre a fisiopatologia dos transtornos do humor. A partir da observação de que essas hipóteses eram muito limitadas na sua capacidade de explicar a fisiopatologia, foram propostas hipóteses mais complexas, focalizando as alterações em múltiplos sistemas de neurotransmissão e as adaptações celulares e moleculares aos medicamentos antidepressivos (LAFER; VALLADA FILHO, 1999).

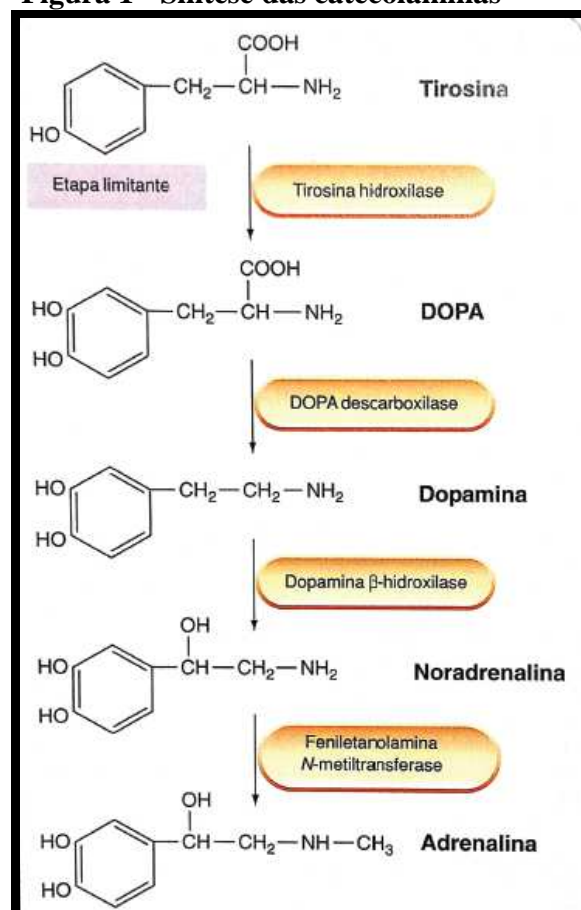
Os sistemas monoaminérgicos se originam em pequenos núcleos no tronco cerebral e mesencefálico e projetam-se difusamente pelo córtex e sistema límbico. Esses sistemas são compostos por neurônios que contém NA, 5-HT e DA. Esses neurotransmissores exercem efeitos de modulação e integração sobre outras atividades corticais e subcorticais e estão envolvidos na regulação da atividade psicomotora, apetite, sono e humor (LAFER; VALLADA FILHO, 1999).

Pelo fato de os antidepressivos aumentarem os níveis das monoaminas algumas horas após a administração, mas demorarem cerca de 2 a 3 semanas para exercer seu efeito terapêutico, foi necessário o estabelecimento de hipóteses que explicassem esta latência na resposta e que levassem em conta os efeitos adaptativos dos receptores na administração de antidepressivos (TRIVEDI *et al.*, 2006). Sendo assim, foi postulado que alterações da função dos sistemas de neurotransmissores podem ocorrer através da mudança na sensibilidade de receptores pré- e pós-sinápticos, sem alteração da quantidade do próprio receptor. Essa observação permitiu que a hipótese de deficiência de neurotransmissores fosse modificada, e, em seu lugar, proposta a hipótese de dessensibilização dos receptores. Tal hipótese propunha que o atraso no aparecimento do efeito terapêutico dos antidepressivos estava relacionado a alterações no número e sensibilidade dos receptores monoaminérgicos (LAFER; VALLADA FILHO, 1999) restabelecendo o controle homeostático das monoaminas transmissoras nas diversas regiões cerebrais (BEST *et al.*, 2010).

### 1.2.1 Síntese das monoaminas

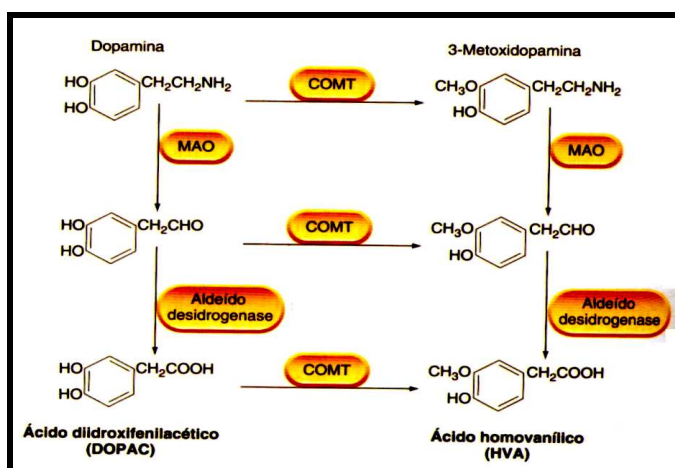
Dentre as monoaminas, as catecolaminas, substâncias que possuem um núcleo catecol (anel benzeno com dois grupamentos hidroxil adjacentes) e uma cadeia lateral de etilamina ou um de seus derivados (FELDMAN *et al.*, 1997), como noradrenalina (NA) e dopamina (DA), são sintetizadas a partir do aminoácido aromático L-tirosina. Duas reações transformam tirosina em DA: a primeira é catalisada pela enzima tirosina hidroxilase (TH) a qual converte tirosina em L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). A TH é considerada a enzima limitante nesta síntese (FELDMAN *et al.*, 1997). O segundo passo é a descarboxilação da DOPA, catalisada pela enzima DOPA descarboxilase, a qual produz DA que sofre ação da dopamina β-hidroxilase para tornar-se NA (**Figura 1**).

**Figura 1 - Síntese das catecolaminas**



Após serem sintetizadas as catecolaminas se difundem pela fenda sináptica e podem ser catabolizadas pelas enzimas monoamina oxidase (MAO) e catecol o-metil transferase (COMT) que estão amplamente distribuídas no corpo e SNC. A MAO está localizada na parte externa da membrana mitocondrial (COSTA; SANDLER, 1972) e pela sua localização intracelular, tem um papel estratégico na inativação das catecolaminas que estão livres na fenda sináptica. A COMT age nas catecolaminas extraneuronais. Os metabólitos produzidos pela ação destas enzimas são: o ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA) (**Figura 2**).

**Figura 2 - Metabolização de dopamina no cérebro**

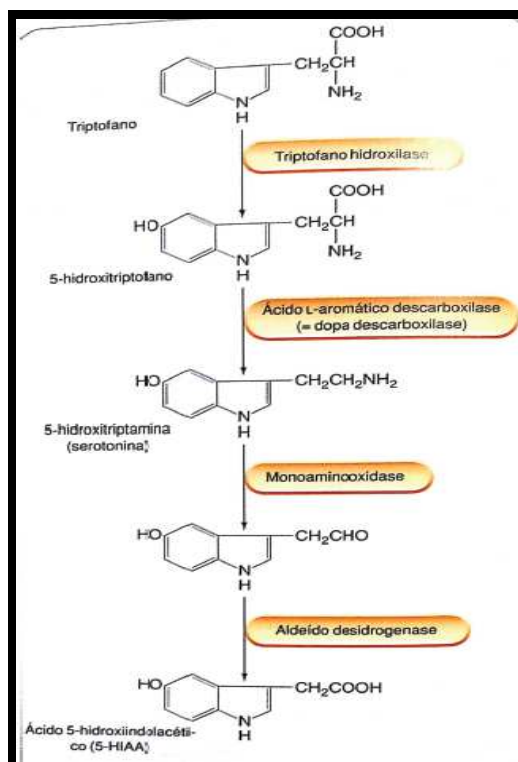


Fonte: RANG et al., 2007

O processo de captação das monoaminas foi originalmente descrito por AXELROD (1971) e é de suma importância para a finalização da ação do neurotransmissor na fenda sináptica. A captação é mediada por um carreador ou transportador localizado no lado externo do neurônio catecolaminérgico, e é saturável, obedecendo a cinética de Michaelis-Menten. Um processo de transporte seletivo para NA é encontrado apenas nos neurônios noradrenérgicos, enquanto um transportador com especificidade diferente é encontrado nos neurônios dopaminérgicos. Estes transportadores fazem parte de uma grande família de neurotransportadores (AMARA; KUHAR, 1993). O processo de captação é dependente de energia, desde que ele pode ser inibido pela incubação a baixas temperaturas ou por inibidores metabólicos. O processo depende do gradiente de  $\text{Na}^+$  e de  $\text{Cl}^-$ . Este transporte pode ser inibido por drogas como os antidepressivos.

O neurotransmissor serotonina é sintetizado a partir do aminoácido triptofano nos neurônios do núcleo da rafe mediana mesencefálica. Por suas características hidrofílicas a serotonina não é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), e é sintetizada no SNC. Sua síntese ocorre através da captação ativa do triptofano plasmático por carreadores de aminoácidos neutros na BHE, por esta razão a variação do triptofano plasmático influencia profundamente a produção de serotonina nos núcleos da rafe (BLUNDELL, 1992). A enzima *triptofano hidroxilase*, presente nos neurônios serotoninérgicos dos núcleos da rafe, converte o aminoácido triptofano em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) a partir de uma hidroxilação na posição cinco do anel aromático do aminoácido. A seguir, o 5-HTP é descarboxilado pela enzima ácidoamino-aromático descarboxilase (AADC), formando então a 5- hidroxitriptamina ou serotonina (EATON *et al.*, 1993; AZMITIA, 2001). O AADC também é encontrado em neurônios catecolaminérgicos onde é responsável pela conversão da 3,4-dihidroxiifenilamina (DOPA) em dopamina (SIEGEL, 1999) (**Figura 3**).

**Figura 3 - Síntese e degradação da 5-HT**



Fonte: RANG *et al.*, 2007

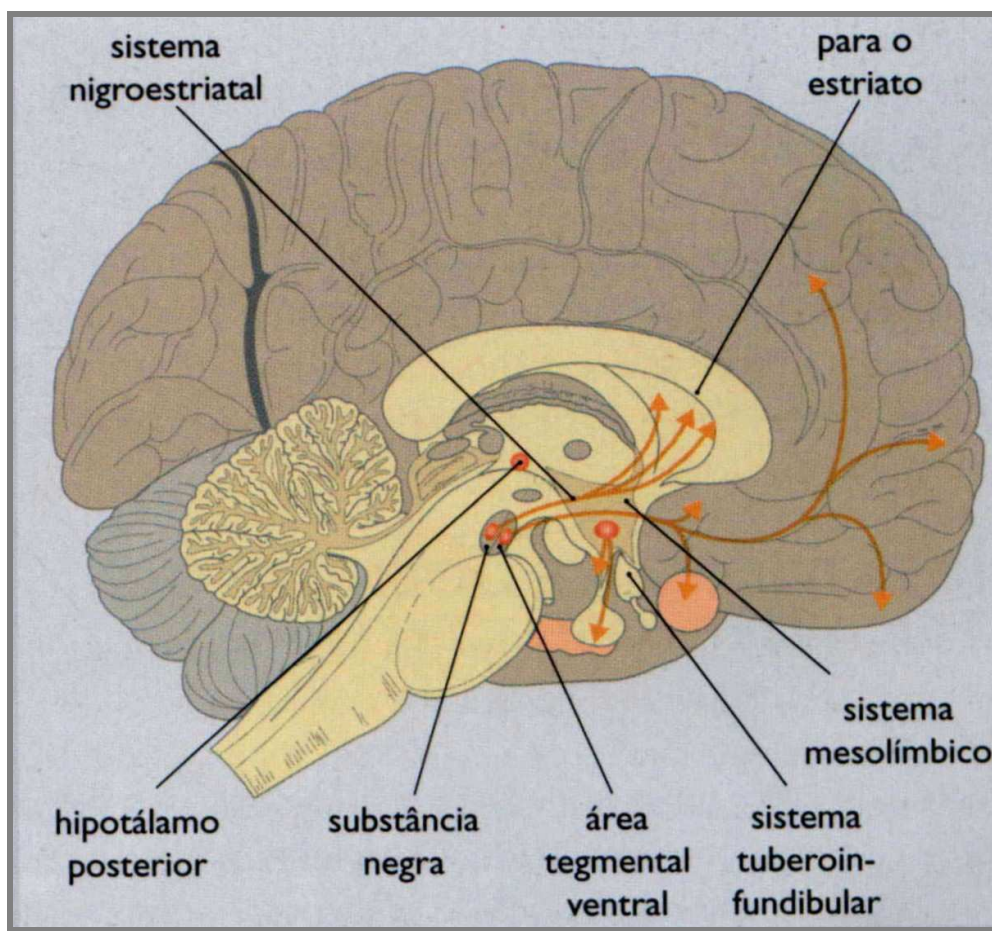
A hidroxilação inicial do triptofano em 5-HTP pela enzima triptofano hidroxilase é alvo de estratégias para bloquear a síntese de serotonina. O inibidor enzimático mais utilizado em trabalhos experimentais é o paraclorofenilalanina (PCPA). *In vivo*, o PCPA inibe irreversivelmente a enzima triptofano hidroxilase, incorporando-se à enzima para produzir uma proteína inativa. Esta inativação produz marcante depleção de estoques de serotonina no cérebro, tecidos periféricos e sangue de ratos e cães (KOE; WEISSMAN, 1966). Seu pico de ação é alcançado rapidamente, 2-3 dias após a administração, podendo diminuir até 90% os níveis de serotonina. Ao contrário das outras drogas utilizadas para depletar a serotonina, como anfetaminas, diidroxitriptamina que são neurotoxinas, o PCPA não produz dano à inervação serotoninérgica. Mesmo com a acentuada diminuição dos níveis de serotonina, os níveis de outras catecolaminas sofrem pouca ação desta droga, deixando evidente a especificidade do PCPA (KOE, 1971). Após a síntese, a serotonina é armazenada em vesículas através de um mecanismo mediado por bomba de prótons. A despolarização do neurônio serotoninérgico induz a liberação vesicular deste neurotransmissor na fenda sináptica, através de um processo dependente de  $Ca^{++}$ . Esta liberação é controlada por autoreceptores pré-sinápticos.

Uma vez liberada na fenda sináptica, a serotonina tem sua ação encerrada pelo transportador SERT, localizado nos neurônios serotoninérgicos. Trata-se de uma proteína transmembrana pertencente à família de transportadores de neurotransmissores dependentes de  $Na^+/Cl^-$ , que capta a serotonina, regulando seus níveis na sinapse. Drogas psicoativas, como a fluoxetina, a paroxetina, a fluvoxamina, o citalopram, utilizadas no tratamento da depressão, transtornos de ansiedade e outras desordens psiquiátricas, se ligam seletivamente à SERT inibindo a recaptção de serotonina (LESCH, 2005). Um outro processo para terminar a ação da serotonina é a degradação enzimática pela enzima monoamina oxidase (MAO) localizada no terminal pré-sináptico e na membrana mitocondrial. A MAO tipo A ou tipo B converte a serotonina em 5-hidroxiindolacetaldeído (5-HIAA) e este produto é oxidado por um  $NAD^+$ -desidrogenase aldeído-dependente, formando ácido 5-hidroxiindoacético (5-HIAA) (ZIGMOND *et al.*, 1999).

### 1.2.2 Sistema dopaminérgico e depressão

A DA constitui cerca de 80% do conteúdo de catecolaminas no cérebro. Projeções originárias de áreas cerebrais que sintetizam este neurotransmissor originam quatro vias axonais: (1) Nigro-estriatal; (2) mesolímbica; (3) mesocortical e (4) tuberoinfundibular (Figura 4).

Figura 4 - Principais vias dopaminérgicas no SNC



Fonte: MACEDO, 2005.

As projeções que constituem a via nigroestriatal originam-se de neurônios sintetizadores de DA do mesencéfalo e substância negra pars compacta (SNpc) que inervam o estriado dorsal (caudado-putamen). A via nigroestriatal está envolvida no controle dos movimentos e sua degeneração leva a doenças como a doença de Parkinson

(GERFEN, 1992; LANG; LOZANO, 1998a, b). A via mesocortical origina-se na área tegmentar ventral (ATV) e inerva diferentes regiões do córtex frontal. Esta via parece estar envolvida em alguns aspectos do aprendizado e memória (LE MOAL; SIMON, 1991; FELDMAN *et al.*, 1997). A via mesolímbica origina-se na ATV e inerva o estriado ventral (núcleo accumbens), o tubérculo olfatório e partes do sistema límbico (FELDMAN *et al.*, 1997). Esta via foi implicada no comportamento motivacional e emoções (KOOB; BLOOM, 1988; KOOB, 1992). A via tuberoinfundibular inicia a partir de células dos núcleos arqueado e periventricular do hipotálamo (FELDMAN *et al.*, 1997). As projeções desta via alcançam a eminência média do hipotálamo onde ocorre liberação de DA nos espaços perivasculares do plexo capilar do sistema hipotalâmico-hipofisário. Por esta via a DA é transportada para a hipófise anterior onde atua inibindo a liberação de prolactina.

Os receptores dopaminérgicos dividem-se em duas famílias: a família D<sub>1</sub>-símile, a qual inclui os subtipos D<sub>1</sub> e D<sub>5</sub> e a família D<sub>2</sub>-símile, que inclui os subtipos D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> e D<sub>4</sub>. Esses receptores realizam suas ações por se acoplarem e ativarem diferentes complexos de proteínas G. Os receptores D<sub>1</sub>-símile interagem com o complexo de proteínas G<sub>s</sub>, resultando em ativação da adenilil ciclase e aumento nos níveis de AMPc intracelular. Esses receptores estão localizados principalmente no neurônio pós-sináptico. Os receptores D<sub>2</sub>-símile interagem com um complexo de proteínas G<sub>i</sub> com consequente inibição da produção de AMPc (CIVELLI *et al.*, 1993; COOPER *et al.*, 1991; DE KEYSER, 1993). Além disso, a família de receptores D<sub>2</sub>-símile bloqueia os canais de cálcio e abrem os canais de potássio, através do mecanismo da hidrólise do fosfolipídio, aumentando assim o trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>) (**Quadro 1**).



**Quadro 1 - Propriedades e localizações dos subtipos de receptores dopaminérgicos**

Distribuição	Papel Funcional	Tipo D <sub>1</sub>		Tipo D <sub>2</sub>		
		D <sub>1</sub>	D <sub>5</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	D <sub>4</sub>
Córtex	Reatividade, Humor	+++	-	++	-	+
Sistema límbico	Emoção, Comportamento Estereotipado	+++	+	++	+	
Estriado	Controle motor	+++	+	++	+	+
Hipotálamo ventral e adeno-hipófise	Secreção de prolactina	-	-	++	+	-
Vias efetoras		↑AMPc	↑AMPc	↓AMPc e/ou ↑IP <sub>3</sub>	↓AMPc e/ou ↑IP <sub>3</sub>	↓AMPc e/ou ↑IP <sub>3</sub>
Ação		Inibição pós-sináptica	Inibição pós-sináptica	Inibição pré- e pós-sináptica	Inibição pré- e pós-sináptica	Inibição pré- e pós-sináptica

Fonte: RANG *et al.*, 2007

Estudos têm demonstrado que a dopamina apresenta importante papel nas desordens afetivas através da regulação do humor (DAILLY *et al.*, 2004; MILLAN, 2004). De fato, alguns estudos mostram que os metabólitos da dopamina estão reduzidos no fluido cerebrospinal e no plasma de pacientes deprimidos (SEE *et al.*, 1992; MITANI *et al.*, 2006; SHER *et al.*, 2006) e a administração de agonistas dopaminérgicos melhora o humor em pacientes bipolar (JIMERSON, 1987). Além disso, está bem aceito que a eficácia clínica de neurolépticos na mania está relacionado com o bloqueio dos receptores dopaminérgicos e que os estados depressivos tem sido reportados dentre os efeitos colaterais de neurolépticos (JIMERSON, 1987). Outra evidência importante é o fato de que a administração de antidepressivos aumenta o nível de dopamina no córtex frontal (WILLIAN, 2004).

Alguns estudos mostraram que o tratamento de pacientes com baixas doses de sulpirida, um antagonista dos receptores dopaminérgicos tipo D<sub>2</sub>, proporcionou um leve

aumento na sensação de bem-estar. Esta observação pode ser relevante para a eficácia da baixa dose de sulpirida como antidepressivo (DEL ZOMPO *et al.*, 1990; RUTHER *et al.*, 1999) e que, provavelmente, sua ação se deve ao bloqueio nos receptores pré-sinápticos dopaminérgicos do tipo D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub>. (DRAGO *et al.*, 2000; PAPP; WIERONSKA, 2000). No entanto, em doses mais altas, a sulpirida perde a especificidade para os receptores pré-sinápticos e passa a bloquear também os receptores D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> pós-sinápticos, causando assim depressão (WILLNER, 2002).

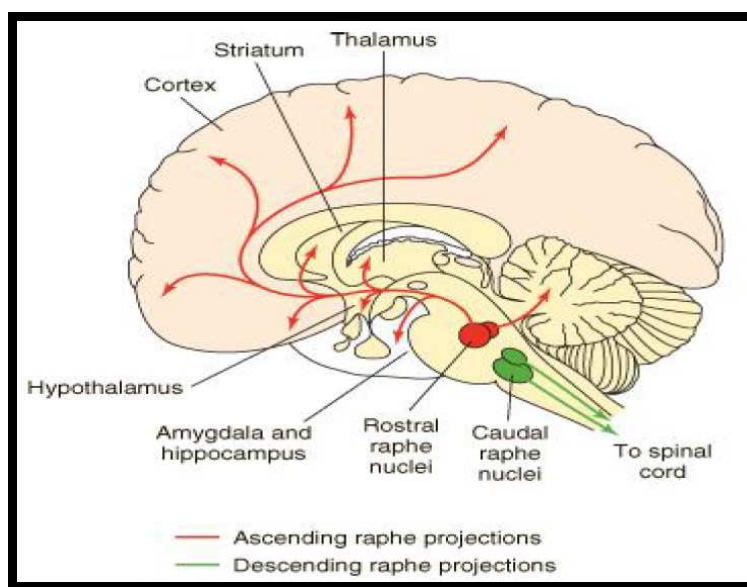
Dessa forma, a sulpirida está sendo usada em modelos animais de depressão para analisar o mecanismo de ação de drogas antidepressivas (WILLNER, 2002). Isso se deve ao fato de que essa droga antagonizou os efeitos da bupropiona, agonista dopaminérgico indireto, nos modelos do nado forçado e suspensão da cauda em camundongos (YAMADA *et al.*, 2004). Apesar da maioria dos estudos mostrarem o envolvimento apenas do receptor dopaminérgico D<sub>2</sub> nos distúrbios afetivos, alguns autores acreditam que o receptor D<sub>1</sub> também possua alguma participação. De fato, o antagonista dos receptores D<sub>1</sub>, SCH23390, bloqueou o efeito antidepressivo da bupropiona no teste do nado forçado em camundongos (YAMADA *et al.*, 2004), sugerindo assim, também a participação do receptor D<sub>1</sub> no efeito antidepressivo de drogas.

### **1.2.3. Sistema serotoninérgico e depressão**

A serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) tem sido descrito como um neurotransmissor modulatório amplamente distribuído no sistema nervoso central. Os neurônios serotoninérgicos estão localizados nos núcleos da rafe e consistem em numerosos e distintos grupos de neurônios do tronco cerebral que estão organizados ao longo da linha média originando projeções ascendentes e descendentes. (ZIGMOND *et al.*, 1999). Estes núcleos recebem aferentes de várias regiões do SNC incluindo o córtex, hipotálamo, núcleo reticular, tronco cerebral e medula espinhal (ADELL *et al.*, 2002). Além da serotonina foram também identificados nos núcleos da rafe terminais contendo outros neurotransmissores incluindo norepinefrina, dopamina, acetilcolina, ácido gama-amino-

butírico (GABA) e substância P. Os neurônios da rafe por sua vez, inervam praticamente todas as regiões do encéfalo, enviando axônios colaterais a áreas do cérebro com funções relacionadas (AZMITIA, 2001) (**Figura 5**).

**Figura 5 - Vias serotoninérgicas no cérebro**



**Fonte:** Minneman; Wecker, 2005

A serotonina possui diversos receptores amplamente distribuídos no organismo. Esses receptores foram divididos em 7 famílias, entre eles: 5-HT<sub>1</sub>; 5-HT<sub>2</sub>; 5-HT<sub>3</sub>; 5-HT<sub>4</sub>; 5-HT<sub>5</sub>; 5-HT<sub>6</sub>; 5-HT<sub>7</sub>. Com exceção do receptor 5-HT<sub>3</sub>, pertencente à família de receptores acoplados a canais iônicos seletivamente permeáveis a sódio (Na<sup>+</sup>), potássio (K<sup>+</sup>) e cálcio (Ca<sup>++</sup>), os demais receptores estão incluídos na superfamília de receptores acoplados a proteína G (metabotrópicos). Sua estimulação afeta várias enzimas efetoras incluindo adenilil ciclase, fosfolipase A e C e canais de cátions, especialmente canais de K<sup>+</sup> e Ca<sup>++</sup>, através da ativação de proteínas G específicas. Existem no mínimo 14 subtipos diferentes de receptores serotoninérgicos que foram clonados de tecidos de mamíferos (BARNES; SHARP, 1999; RAYMOND *et al.*, 2001). Alguns estudos mostram que alguns receptores serotoninérgicos estão envolvidos na depressão, como, por exemplo, o receptor 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A/2C</sub> e 5-HT<sub>3</sub> (CRYAN *et al.*, 2005).

A família 5-HT<sub>1</sub> contém receptores que são acoplados negativamente a adenilil ciclase e inclui os receptores 5-HT 1A, 1B, 1D, 1E e 1F. O receptor 5-HT<sub>1A</sub> foi o primeiro a ser clonado e além de inibir a síntese de AMPc também leva a hiperpolarização da célula através da ativação de canais de potássio. Este receptor, nos núcleos da rafe localiza-se em terminais pré-sinápticos e atua como autoreceptor somato-dendrítico enquanto nas áreas alvo dos neurônios serotoninérgicos, como o hipocampo, septo, amígdala, hipotálamo e neocórtex ele corresponde a heteroreceptores localizados em terminais pós-sinápticos (LANFUMEY, 2000). O receptor 5-HT<sub>1B</sub> é expresso tanto em neurônios serotoninérgicos como não-serotoninérgicos, atuando como auto- e hetero-receptores, respectivamente. Este receptor está distribuído em diferentes regiões do SNC, como no globo pálido e na substância negra, onde encontra-se predominantemente ao nível pré-sináptico (SARI, 2004). O receptor 5-HT<sub>1D</sub> é conhecido por suas funções inibitórias atuando como autoreceptor nos terminais serotoninérgicos (DEL ANGEL-MEZA *et al.*, 2002) inibindo a liberação de serotonina na rafe mesencefálica, hipocampo e córtex frontal (RAYMOND *et al.*, 2001).

A família 5-HT<sub>2</sub> possui três subtipos de receptores sendo eles classificados como 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> e 5-HT<sub>2C</sub>. Eles atuam ativando a fosfolipase C aumentando os níveis de Ca<sup>++</sup> intracelular. Os receptores 5HT<sub>2A</sub> estão localizados em áreas corticais, particularmente no córtex frontal, também estão localizados no claustrum, núcleos da base e núcleo olfatório (BARNES; SHARP, 1999).

O receptor 5-HT<sub>3</sub>, como mencionado anteriormente, é um canal iônico seletivamente permeável a íons Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Ca<sup>++</sup>, sendo distribuído tanto centralmente em grande concentração no corpo estriado, substância negra e tubérculo olfatório e hipocampo e indiretamente promovem o aumento da liberação de DA estriatal (WALSTAB *et al.*, 2010).

Os receptores 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>6</sub> e 5-HT<sub>7</sub> estão acoplados a proteína Gs a qual ativa a adenilil ciclase. A família do receptor 5-HT<sub>5</sub> contém dois subtipos 5-HT<sub>5A</sub> e 5-HT<sub>5B</sub>. Acredita-se que o tipo 5-HT<sub>5A</sub> esteja acoplado negativamente a adenilil ciclase enquanto

que o 5-HT<sub>5B</sub> está ligado a outro sistema efetor ainda não muito bem caracterizado (BARNES; SHARP, 1999).

A serotonina tem sido implicada na regulação de atividades que regem o comportamento (JACOBS; FORNAL, 1999; WOODS *et al.*, 2012), apetite (TRIFUNOVIC; REILLY, 2006; BELLO; LIANG, 2011), ritmo circadiano (JIANG *et al.*, 2000), sono/vigília (THASE, 2000) e fenômenos cognitivos como aprendizado e memória e processos autonômicos (McNAMARA; SKELTON, 1993), além da regulação do estresse e depressão (STARR *et al.*, 2012). A serotonina é um dos muitos neurotransmissores que participam do controle hipotalâmico sobre a secreção da hipófise, participando da regulação da secreção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), prolactina e hormônio de crescimento (SIEGEL, 1999). No hipocampo, a 5-HT aumenta os receptores para hormônios glicocorticóides os quais diminuem a síntese de hormônio liberador de corticotrofina (CRH) no hipotálamo inibindo então o estímulo do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) da hipófise anterior sobre as glândulas adrenais regulando dessa forma a influência do estresse sobre o hipocampo (SOUTHWICK *et al.*, 2005).

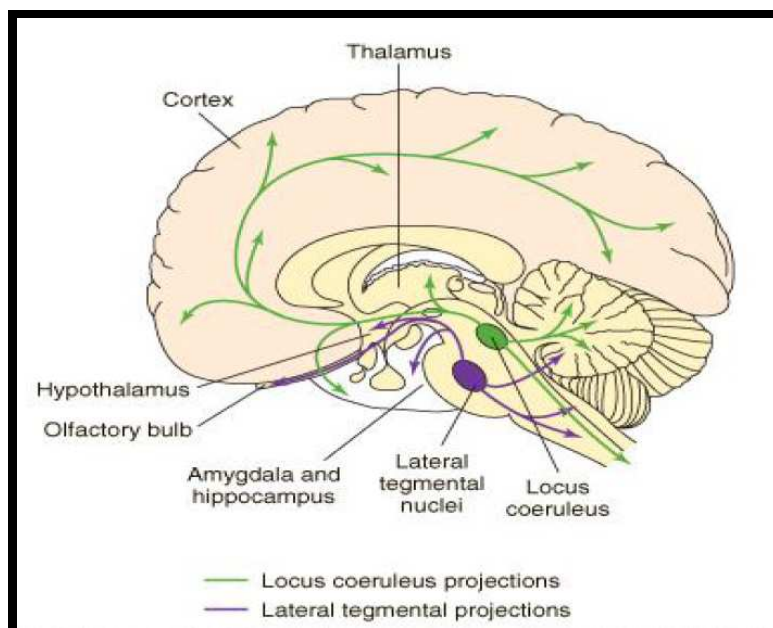
Por suas ações, os neurônios serotoninérgicos e receptores são alvos para uma ampla variedade de drogas, como antipsicóticos, ansiolíticos, antieméticos e antidepressivos. Por exemplo, a buspirona, um agonista parcial dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>, mas que também apresenta baixa afinidade pelos receptores 5-HT<sub>2</sub>, foi inicialmente utilizada para o tratamento da ansiedade, mas atualmente tem sido verificada sua importância para a melhoria de diversas patologias como alívio dos sintomas da depressão, ataxia e fobia social (LOANE; POLITIS, 2012). Além disso, os fármacos mais utilizados para o tratamento da depressão são inibidores da receptação de serotonina, como a fluoxetina e paroxetina (AGUIAR *et al.*, 2011)

#### **1.2.4. Sistema noradrenérgico e depressão**

O *locus ceruleus* (LC), localizado na ponte, é um sistema de projeção generalizado que libera noradrenalina para todo o sistema nervoso central. Os axônios deixam o LC em

diversos tratos, mas logo depois espalham-se para inervar praticamente todas as partes do encéfalo: todo o córtex cerebral, o tálamo, o hipotálamo, o bulbo olfatório, o cerebelo, o mesencéfalo e a medula espinhal (SALGADO *et al.*, 2012) (Figura 6).

Figura 6 - Vias noradrenérgicas no cérebro



Fonte: Minneman; Wecker, 2005

A manipulação do sistema noradrenérgico foi uma das primeiras ferramentas relevantes adaptadas para a compreensão dos eventos moleculares para a regulação do humor, desde a primeira observação empírica da administração da reserpina, apresentando efeitos depressivos (BAUMEISTER *et al.*, 2003). Acredita-se que a noradrenalina modula o humor particularmente através da atividade dos receptores inibitórios  $\alpha_2$ -pré-sinápticos. Uma vez ativados eles causam *downregulation* do tônus noradrenérgico no SNC causando depressão. Estudos *in vitro* mostram que a NA modula a transmissão sináptica e a excitabilidade celular no córtex. Contudo, a NA exerce efeitos inibitórios e excitatórios e essas ações distintas podem ser atribuídas a diferentes concentrações de NA liberadas levando a ativação de diferentes subtipos de receptores adrenérgicos específicos nos circuitos-alvo (SALGADO *et al.*, 2012). A NA liga-se a receptores adrenérgicos

localizados pós-sinapticamente aos  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\beta$  ou pré-sinapticamente aos  $\alpha_2$  e  $\beta_2$ . Todos os receptores adrenérgicos trabalham através da interação com proteínas G. Os receptores  $\beta$  estimulam a adenilato ciclase e aumentam os níveis intracelulares de AMPc, o receptor  $\alpha_1$  causa liberação de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular, via fosfolipase C e a ativação dos receptores  $\alpha_2$  diminui a atividade da adenilato ciclase (LIUKAITIS, 2005; SVOBODA *et al.*, 2004)

Os receptores adrenérgicos que medeiam ações da adrenalina e noradrenalina podem ser encontrados periféricamente e centralmente. No SNC humano e de camundongos, são encontrados no hipocampo (SZOT *et al.*, 2004; 2005). O receptor  $\alpha_2$ , em camundongos, é encontrado em regiões cerebrais envolvidas no processo de informações sensoriais e no controle de atividades motoras e emocionais relacionadas, com os núcleos acumbens, caudado e putamen, tubérculo olfatório, septo lateral, hipocampo, amígdala e córtex frontal (HOLMBERG *et al.*, 2003).

A noradrenalina tem sido relacionada ao controle do desenvolvimento da plasticidade, ao estado de despertar e ao ciclo sono-vigília. O funcionamento noradrenérgico alterado tem sido implicado em distúrbios como o transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), depressão, ansiedade e recuperação após lesão cerebral traumática (TIMMONS *et al.*, 2004). Certos componentes do sistema noradrenérgico parecem estar envolvidos com excitação e medo, enquanto outros, em conjunto com componentes mesolímbicos dopaminérgicos, com motivação e prazer. Assim, a ansiedade e a perda de prazer características da melancolia e da depressão atípica podem estar relacionadas à desregulação do sistema noradrenérgico (SCHILDKRAUT, 1965; KANDEL *et al.*, 2000; KALIA, 2005; YUDOFKY; HALES, 2006).

O receptor  $\alpha_2$  está desregulado na depressão maior, onde os pacientes têm maior densidade deste receptor que os controles normais (GURGUIS *et al.*, 1999). Achados obtidos com uma substância ligante agonista seletiva a proteínas G em cérebros de pessoas com depressão que cometeram suicídio comparados com controles sem depressão sugerem o envolvimento desses receptores na patogênese do distúrbio do humor (GONZALEZ-MAESO *et al.*, 2002).

Estudos com psicofármacos têm possibilitado, também, alguns achados relevantes a cerca do funcionamento dos receptores de neurotransmissores cerebrais. O lento início do efeito das drogas antidepressivas parece refletir o tempo requerido para o desenvolvimento de mudanças adaptativas com a dessensibilização dos autorreceptores pré-sinápticos controlando a liberação de neurotransmissores. Pesquisa com o antidepressivo reboxetina, inibidor seletivo da receptação de noradrenalina, por exemplo, indicou que o tratamento crônico aumenta marcadamente o efeito da reboxetina na noradrenalina extracelular no hipocampo dorsal de ratos e que este efeito pode ser secundário a dessensibilização dos  $\alpha_2$ -adrenérgicos hipocampais (PARINI *et al.*, 2005).

### **1.3 Estresse e depressão.**

A depressão é uma doença complexa cuja etiologia não está totalmente esclarecida, uma vez que a hipótese monoaminérgica não explica totalmente a patogênese dos distúrbios do humor, mas acredita-se que pode estar relacionada com fatores endógenos, como alterações genéticas ou, na maioria dos casos, relacionadas com fatores ambientais, sendo um dos mais importantes, o estresse (PAULINO *et al.*, 2009).

O termo estresse foi empregado pela primeira vez por Hans Selye (1936) para descrever uma ameaça real ou potencial à homeostasia. Atualmente, além dos fatores físicos, os fatores psicológicos, como novidade ou problemas sociais, também são aceitos como agentes estressores capazes de induzir alterações comportamentais e fisiológicas significativas (JOCA *et al.*, 2003; PAULINO *et al.*, 2009).

O estresse é capaz de estimular a liberação do hormônio cortisol pela glândula suprarrenal através da estimulação do eixo-hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HHA). O cortisol permite a preparação do organismo para desafios fisiológicos ou ambientais e é importante para a consolidação da resposta ao estresse. No entanto, a persistência e/ou a intensidade exagerada do estresse, bem como a incapacidade do organismo em atenuar a sua exacerbação, podem tornar o eixo HHA hiperreativo, com prejuízos potenciais ao organismo (KRISHNAN; NESTLER, 2008; SAVITZ; DREVETZ, 2009).



A ativação do eixo HHA pelo estresse gera um aumento na liberação de cortisol que, em altas concentrações, atua em áreas cerebrais envolvidas com a depressão, como o hipocampo, que tem como função exercer uma ação de retroalimentação negativa sobre o eixo. No entanto, como o nível de cortisol está elevado ocorre uma dessensibilização dos receptores de glicocorticóides no hipocampo impedindo o controle. Assim, a influência do cortisol sobre esta área cerebral específica leva a eventos neurotóxicos nesta região, com a produção de radicais livres levando ao dano cerebral, evidenciado pela diminuição da neurogênese e diminuição da ramificação dendrítica, predispondo ao desenvolvimento da depressão (NESTLER *et al.*, 2002a; FUCHS, 2007).

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 (SACHAR; BARON, 1979) que pode ser revertida pelo tratamento com antidepressivos (HOLSBOER, 2001). Além disso, existem evidências do aumento dos níveis de fator de liberação de corticotripina (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.*, 2002a; SOUTHWICK *et al.*, 2005). Em pessoas saudáveis a administração de dexametasona suprime o hormônio adrenocorticotrópico (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 (GREDEN *et al.*, 1983; HOLSBOER *et al.*, 1982). 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 (SONINO; FAVA, 2002) criando um forte argumento para a influência da desregulação do sistema de estresse e o desenvolvimento do estado depressivo. Além desses relatos existem outros inúmeros trabalhos que reportam que os sintomas depressivos devem estar relacionados a mecanismos adaptativos em resposta a ameaças e fatores estressantes (PRICE *et al.*, 1994; NESSE, 2000, 2004; WATSON; ANDREWS, 2002; ALLEN; BADCOCK, 2003, 2006; HAGEN, 2003; GILBERT, 2006; HORWITZ;

WAKEFIELD, 2007; ANDREWS; THOMSON JR., 2009; NESSE; ELLSWORTH, 2009, PRICE, 2009).

É baseado nessas informações que pesquisadores têm utilizado modelos animais, tais como o nado forçado ou suspensão da cauda, como ferramentas farmacológicas, através da pré-exposição a evento altamente estressante e inescapável, na avaliação do desenvolvimento de alterações comportamentais, fisiológicas, neuroquímicas e antioxidantes (JOCA *et al.*, 2003), uma vez que o nado forçado também é capaz de gerar estresse oxidativo ao aumentar a produção de radicais livres, podendo contribuir também para gerar danos neuronais e induzir depressão. Dessa forma, é necessário também investigar se esses modelos são capazes de induzir estresse oxidativo e, dessa forma, identificar novos alvos terapêuticos para o tratamento da depressão.

### **1.3.1 Espécies reativas derivadas do oxigênio (ERO) e a depressão**

#### **1.3.1.1 Radicais livres e mecanismos de defesa antioxidante**

Os radicais livres têm sido implicados na toxicidade de numerosos agentes químicos e na patogênese de muitas doenças, tais como doenças inflamatórias, doença de Parkinson, de Alzheimer e epilepsia, dentre outras. A lista dessas doenças é cada vez maior e isso se deve, pelo menos em parte, ao fato de que essas moléculas reativas podem produzir a maior parte das alterações teciduais identificadas em uma grande variedade de processos danosos. Muitas dessas alterações, porém, podem ser consequência e não causa do dano (KEHRER, 1993).

Radical livres são moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados. Em geral, são instáveis e têm vida muito curta, devido à natureza livre de seus elétrons, que os tornam hábeis a reagir com diversos compostos ou alvos celulares, de modo a obter uma maior estabilidade química conferida pelo emparelhamento de elétrons. Essas moléculas

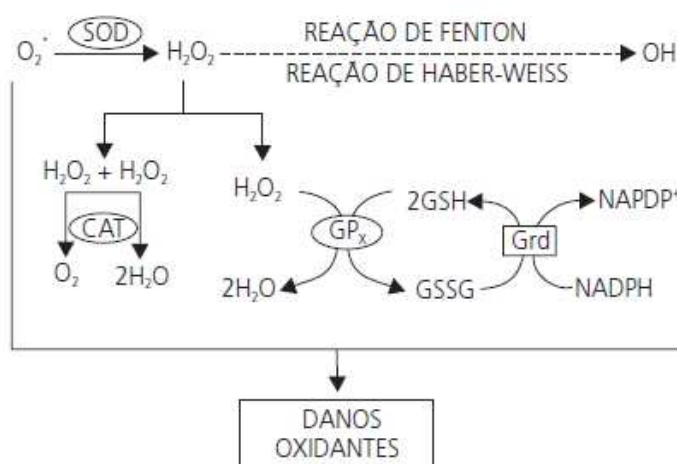
causam danos teciduais por interagirem com carboidratos, ácidos nucleicos (DNA), lipídios e proteínas (HALLIWELL, 1994).

Por sua elevada reatividade, os radicais livres, formados a partir de transferências de elétrons, podem reagir e formar uma série de espécies reativas, como as espécies reativas do oxigênio (ROS) e, quando não neutralizadas, podem levar ao estresse oxidativo, exacerbar a inflamação e promover dano tecidual. Dentre esses radicais estão as espécies reativas do oxigênio (ROS), como o superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ); radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ); radical peróxido ( $ROO^{\cdot}$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ); bem como as espécies reativas do nitrogênio (RNS), como o óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ) e espécies reativas do cloro (RCS) como o ácido hipocloroso (HOCl) (MOSLEY *et al.*, 2006).

Essas espécies químicas são abundantes na natureza, produzidas normalmente no metabolismo celular e encontradas no meio ambiente. São facilmente formadas com exposição excessiva a luz solar, poluição, álcool, inseticidas, radiação, exercício intenso, etc. No entanto, existem sistemas enzimáticos antioxidantes protetores, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase, a glutatona reduzida, glutatona peroxidase e redutase, e sistemas não-enzimáticos, que neutralizam os radicais livres, como a vitamina E, a vitamina C, dentre outras substâncias capazes de inativar ou reduzir a formação dos radicais livres (MOSLEY *et al.*, 2006).

A catalase é uma hemoproteína citoplasmática que catalisa a redução de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (SCOTT *et al.*, 1991). Pode ser encontrada no cérebro, no sangue, medula óssea, mucosas, rim e fígado. Sua atividade é dependente de NADPH (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). As glutatona peroxidases (GSH-Px) são as principais enzimas responsáveis pela remoção de peróxido de hidrogênio gerado pelas SOD no citosol e mitocôndria e peróxidos orgânicos para seus correspondentes alcoóis, à custa da conversão da glutatona reduzida (GSH) a glutatona oxidada (GSSG) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Elas promovem a redução de  $H_2O_2$ , à custa de GSH, para formar GSSG e água (**FIGURA 7**).

**Figura 7 – Integração dos sistemas de defesa enzimáticos**



**Fonte:** BARBOSA *et al.*, 2010

A glutatona (GSH, L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteinil-glicina), um tripeptídeo formado por resíduos de glicina, cisteína e ácido glutâmico, existe em concentrações milimolares em todas as células humanas e desempenha outros papéis igualmente importantes no metabolismo de xenobióticos e na síntese de leucotrienos (HALLIWELL, 1994). A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes como íons ferro, oxigênio hiperbárico, radiações ionizantes e luz ultravioleta (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Além disto, diminui a suscetibilidade à lesão renal decorrente da isquemia e reperfusão; atua como transportadora e reservatório da cisteína e participa da detoxificação de agentes químicos e da eliminação de produtos da lipoperoxidação. Pode ser requerida, ainda, para a síntese de DNA, de proteína e de algumas prostaglandinas (SHAN *et al.*, 1990).

O dano oxidativo ocorre nos organismos celulares devido ao desequilíbrio entre a produção dos radicais livres e as defesas antioxidantes celulares. Através da respiração celular normal ou da respiração mitocondrial desregulada, grandes quantidades de ROS podem ser produzidos e desencadearem efeitos deletérios no delicado equilíbrio neuronal do SNC. O estresse oxidativo está realmente implicado como sendo a principal causa da

injúria neuronal em várias doenças neurológicas, incluindo a depressão (MUSTAK *et al.*, 2010).

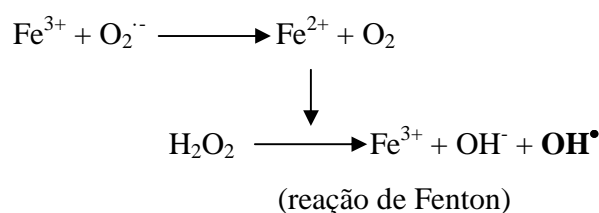
Alguns dos mais destrutivos radicais livres gerados no organismo derivam do oxigênio ( $O_2$ ). Então, a molécula mais importante para a manutenção da vida pode também provocar danos celulares, podendo levar a destruição de órgãos e do próprio organismo. O acúmulo dos danos ao longo da vida causados por moléculas vitais em órgãos está relacionado ao envelhecimento e ao desenvolvimento de doenças relacionadas com a idade (NICHOLLS, 2008).

O radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) é o produto da adição de um elétron a molécula de oxigênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). Muitas moléculas biológicas como, por exemplo, a hemoglobina, mioglobina, catecolaminas e alguns constituintes dos sistemas de transporte de elétrons mitocondriais (TURRENS *et al.*, 1985) e microssômicos (JAKOBY; ZIEGLER, 1990) reagem com o  $O_2$  convertendo-o em  $O_2^{\bullet-}$ . Adicionalmente, fagócitos ativados (neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos) geram o  $O_2^{\bullet-}$  em grande quantidade, com a finalidade de destruir microorganismos estranhos ao organismo. Esse mecanismo de proteção natural pode tornar-se nocivo nos processos de inflamação crônica (MOSLEY *et al.*, 2006).

O radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) é a espécie de oxigênio mais reativa em sistemas biológicos; age rapidamente no local em que é produzido, sendo potencialmente capaz de causar alterações nas bases purínicas e pirimidínicas, levando a inativação ou a mutação do DNA, inibir diversas proteínas (constituintes das membranas celulares e enzimas) através da oxidação dos seus grupamentos sulfidríla (-SH) a pontes dissulfeto (-SS) e iniciar a peroxidação de lipídeos, especialmente ácidos graxos poliinsaturados de membranas e lipoproteínas (MOSLEY *et al.*, 2006).

Radicais do tipo hidroxila são gerados nos sistemas biológicos principalmente por radiações ionizantes e através da reação que envolve um metal de transição, o radical

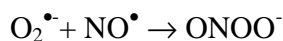
superóxido e o peróxido de hidrogênio. Devido ao alto teor de água das células, sua exposição às radiações ionizantes (raios X e gama), pode resultar na formação do radical hidroxila, através do processo de radiólise da água (HALLIWELL, 1994). Os íons metálicos (de ferro ou cobre) possuem a habilidade de mover elétrons, o que constitui a base para a iniciação e propagação de muitas das reações de radicais livres mais nocivas. Assim, o  $\text{OH}^\bullet$  é formado pela interação entre um íon metálico ( $\text{Fe}^{3+}$ ), o  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , de acordo com a seguinte equação:



O  $\text{H}_2\text{O}_2$  não é especialmente tóxico, a menos que esteja em altas concentrações nas células. Outra característica dessa molécula é que ela possui a capacidade de se difundir rapidamente através das membranas celulares podendo então se distribuir por sítios distantes dos quais ela foi gerada. Além disso, na presença de metais de transição, mais comumente o  $\text{Fe}^{2+}$ , mas também o  $\text{Cu}^{1+}$ , o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é reduzido à radical hidroxil ( $\text{OH}^\bullet$ ) via reações de Haber-Weiss ou Fenton (NICHOLLS, 2008).

Essa via de produção do  $\text{OH}^\bullet$  tem sido bastante estudada, embora o seu papel patológico não esteja bem definido, a existência de proteínas de transporte para o ferro e o cobre, utilizadas pelas células para minimizar a presença de íons metálicos livres, indicam que tais reações podem ser prejudiciais para os sistemas biológicos (MOSLEY *et al.*, 2006).

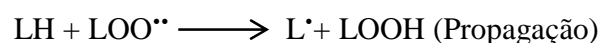
O óxido nítrico (NO) funciona como um mensageiro intracelular de produção endógena que desempenha um importante papel em praticamente todos os sistemas do organismo (EISERICH *et al.*, 1998), embora exerça diversas funções fisiológicas úteis, em excesso pode ser nocivo. Em determinadas condições o NO e o  $\text{O}_2^{\bullet-}$  podem interagir, resultando em um produto muito tóxico, o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ):



O peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) é capaz de reagir prontamente com diversas moléculas: proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos, danificando-as. Além disso, seus prováveis produtos de decomposição,  $\text{OH}^\bullet$ , dióxido de nitrogênio e outros, possuem semelhante potencial deletério, conseqüentemente, a toxicidade do NO pode ser explicada, pelo menos em parte, por sua reação com o  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . O aumento da produção de  $\text{ONOO}^-$  tem sido associado a diversos processos patológicos (WANG *et al.*, 2002).

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das ROS, porém a membrana é um dos mais atingidos, em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares. Conseqüentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos (como o malonildialdeído - MDA), culminando com a morte celular. A peroxidação lipídica também pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, de câncer e de doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson. Assim como na formação das ROS, nem sempre os processos de peroxidação lipídica são prejudiciais, pois seus produtos são importantes na reação em cascata a partir do ácido aracdônico (formação de prostaglandinas) e, portanto, na resposta inflamatória. Todavia, o excesso de tais produtos pode ser lesivo (NAKAMURA; LIPTON, 2009).

Um dos processos oxidativos mais amplamente estudados é aquele onde ocorre a quebra dos lipídios das membranas celulares e a formação do radical peroxil ( $\text{LOO}^\bullet$ ). Este processo, chamado de peroxidação lipídica, é extremamente complexo e lesivo. Uma vez iniciado, pode ser propagado, já que o radical peroxil formado pode reiniciar o processo, e este pode ocorrer indefinidamente. A lipoperoxidação é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. Estas etapas estão apresentadas nas reações seguintes, onde L representa o lipídio:





A reação inicia-se com o sequestro do hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado (LH) da membrana celular. Tal sequestro pode ser realizado pelo  $\text{OH}^\bullet$  ou pelo  $\text{LO}^\bullet$  (radical alcóxila), com conseqüente formação do  $\text{L}^\bullet$  (radical lipídico). Na primeira equação de propagação, o  $\text{L}^\bullet$  reage rapidamente com o  $\text{O}_2$ , resultando em  $\text{LOO}^\bullet$  (radical peróxila), que, por sua vez, sequestra novo hidrogênio do ácido graxo polinsaturado, formando novamente o  $\text{L}^\bullet$  na segunda equação de propagação. O término da lipoperoxidação ocorre quando os radicais ( $\text{L}^\bullet$  e  $\text{LOO}^\bullet$ ) produzidos nas etapas anteriores propagam-se até formarem complexos mais estáveis (NAKAMURA; LIPTON, 2009).

Vários estudos já comprovaram que os ROS podem ser causa ou conseqüência de doenças humanas associadas ao estresse oxidativo. Por isso, antioxidantes naturais e sintéticos têm sido recomendados para o alívio dos sinais e sintomas destas doenças e até mesmo, para bloquear sua evolução (NAKAMURA; LIPTON, 2009).

Os antioxidantes podem atuar em diferentes aspectos na proteção dos organismos contra os radicais livres. O primeiro mecanismo de defesa contra os radicais livres é impedir a sua geração, principalmente através da inibição das reações em cadeia com os íons metálicos (ferro e cobre). Os antioxidantes devem ser substâncias capazes de inativar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o dano aos lipídeos, às proteínas, aos ácidos graxos e ao DNA, evitando assim as lesões aos constituintes celulares e a conseqüente morte celular (NAKAMURA; LIPTON, 2009).

Os compostos antioxidantes podem ter origem endógena, como as enzimas catalase, superóxido dismutase e a glutatona, ou serem exógenos, provenientes, por exemplo, da dieta. Muitos estudos destacam os tocoferóis (vitamina E), o ácido ascórbico (vitamina C), o selênio, os carotenóides e principalmente os polifenóis, que têm sido amplamente estudados nos últimos anos, principalmente por inibirem a peroxidação lipídica e a lipoxigenase (EL-AGAMEY *et al.*, 2004; OMONI; ALUKO, 2005).



### 1.3.1.2 Estresse oxidativo e depressão

A exposição ao estresse pode induzir diversas patologias psiquiátricas, incluindo a depressão (de KLOET *et al.*, 2005). Alterações na biologia oxidativa estão sendo reconhecidas amplamente como rota crítica do dano que envolve a fisiopatologia das doenças psiquiátricas induzidas pelo estresse (BERK, 2007). O aumento do estresse oxidativo ocorre na depressão maior como evidenciado pela deficiência de defesas antioxidantes no plasma em associação com o aumento da peroxidação lipídica nesses pacientes (OZCAN *et al.*, 2004).

A depressão é considerada um problema médico uma vez que os pacientes que apresentam esse distúrbio estão em risco aumentado de adquirir doenças graves. Recentemente, estudos mostraram o estreito relacionamento entre a depressão e o dano oxidativo do DNA (MUSTAK *et al.*, 2010). A depressão é caracterizada pela ativação da resposta inflamatória com o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias. Essas citocinas e as substâncias reativas de nitrogênio e oxigênio induzidas por citocinas aumentam a injúria do tecido e a peroxidação lipídica (DANTZER *et al.*, 2011). As espécies reativas de nitrogênio e oxigênio contribuem para o dano no tecido e lesão do DNA ao reagir com biomoléculas como os lipídios (GEHRMANN *et al.*, 2010) proteínas e ácidos nucleicos (van BERLO *et al.*, 2010). Além disso, o estresse psicológico, que acompanha a depressão severa, é capaz de aumentar a peroxidação lipídica (YAGER *et al.*, 2010).

Além disso, nas desordens do humor, o estresse oxidativo engatilha ou exacerba inúmeras rotas de danos como a disfunção mitocondrial, desregulação da homeostase do cálcio (AMOROSO *et al.*, 2000), interrupção dos caminhos energéticos (PAPADOPOULOS *et al.*, 1997), danos nos precursores neuronais, impedimento da neurogênese (KROEMER, 1997) e indução de eventos de sinalização na morte celular apoptótica (CREAGAN *et al.*, 2002). Esses eventos contribuem significativamente na fisiopatologia das desordens depressivas, como evidenciado pelas alterações morfológicas (atrofia) no cérebro características da depressão induzida pelo estresse (COTTER *et al.*, 2002).

Para contrabalancear esses danos, existem vários mecanismos de defesa antioxidantes no cérebro que neutralizam os efeitos danosos das espécies reativas de nitrogênio e oxigênio. Contudo, com a depressão, a perda da eficiência dos mecanismos de defesa antioxidantes e as alterações do sistema de citocinas pró-inflamatórias resultam no aumento da formação de radicais livres devido a ativação de células fagocíticas (KIM; KIM, 2010). Além disso, as espécies reativas podem induzir dano neuronal via depleção do sistema antioxidante não-enzimático no cérebro (LESGARDS *et al.*, 2011) e diminuição da atividade das enzimas antioxidantes como a glutathione S-transferase, glutathione peroxidase, catalase e superóxido dismutase (LESGARDS *et al.*, 2011).

Sabe-se que drogas antidepressivas têm apresentado supra regulação da expressão gênica e aumento da atividade de uma importante enzima neuroprotetora antioxidante como a superóxido dismutase (KOLLA *et al.*, 2005). Baseado nesses achados, deve-se esperar que drogas antidepressivas possam atuar também em outros defensores antioxidantes, devido aos inúmeros mecanismos antioxidantes existentes, além da SOD, podendo ser úteis em contrabalancear os efeitos deletérios produzidos por substâncias reativas do oxigênio.

#### **1.4 Áreas cerebrais envolvidas na depressão.**

Por muitos anos os distúrbios depressivos têm sido relacionados diretamente a anormalidades nos sistemas de neurotransmissão monoaminérgica. Atualmente, é aceito que esta condição patológica é caracterizada por profundas alterações na estrutura, função e responsividade cerebral (BERTON; NESTLER, 2006; PITTENGER; DUMAN, 2008). Consequentemente, pacientes deprimidos apresentam uma incapacidade em se adaptar ao ambiente e podem estar mais vulneráveis a desafios ou experiências estressantes. Geralmente, os padrões de mudanças metabólicas durante os episódios de depressão maior sugerem que determinadas estruturas que apresentam um papel fundamental nas respostas de estresse (hipocampo) e áreas que modulam ou inibem a expressão emocional são atingidas (cortex pré-frontal subgenual) (DREVETS, 2001). A ativação patológica de determinadas áreas cerebrais é acompanhada de anormalidades estruturais. Dessa forma, análises de neuroimagem e *post-mortem* de pacientes com depressão revelam mudanças

estruturais na região límbica e frontal, incluindo o hipocampo, estriado, amígdala e córtex pré-frontal (DREVETS, 2000; 2001; JARACZ, 2008).

O hipocampo é a região mais extensivamente estudada no contexto da depressão e os resultados encontrados sugerem que reduções no volume hipocampal estão associadas com o distúrbio depressivo. De modo interessante, pequenos volumes hipocampais têm sido mais comumente encontrados em pacientes que apresentaram diversos episódios de depressão quando comparados com aqueles em remissão ou que estavam em seu primeiro episódio (CAETANO *et al.*, 2004; FRODL *et al.*, 2004, 2006; JARACZ, 2008; LORENZETTI *et al.*, 2009). Isto sugere que a redução do volume hipocampal está relacionada com a severidade da doença (McQUEEN *et al.*, 2003).

De modo semelhante, existem relatos consistentes de que há redução no volume do córtex pré-frontal em pacientes com depressão, especificamente no córtex pré-frontal dorsolateral, orbitofrontal e subgenuar (KONARSKI *et al.*, 2008). Além dessas duas regiões, estudos mostram que a exposição ao estresse intenso pode levar a morte de células neuronais no corpo estriado, incluindo o caudado e putamen. Além disso, a redução do volume estriatal tem sido relatada em estudos de pacientes com depressão maior e dentre esses cerca de 72% não responderam ao teste de supressão com dexametasona (HAYNES *et al.*, 2004).

Essas regiões são parte do circuito límbico-córtico-talâmico que apresenta um papel integral no processo cognitivo e emocional (SOARES; MANN, 1997). O fato de todas essas regiões, em algum grau, funcionarem patologicamente na depressão dá suporte a um modelo neural de depressão no qual as disfunções em determinadas áreas que modulam ou inibem o comportamento emocional pode resultar em manifestações emocionais, motivacionais, cognitivas e comportamentais da depressão.

O estresse tem sido implicado em algumas mudanças volumétricas no cérebro de pacientes deprimidos. Mais especificamente, tem sido reportado que a desregulação do eixo HHA e as mudanças subsequentes na secreção de glicocorticóides podem resultar em

ambas, remodelação reversível e morte celular irreversível, em regiões límbicas e frontais, que pode resultar em mudanças volumétricas e subsequente funcionamento patológico visto em pacientes com depressão (DREVETS, 2001; McEWEN, 2007; SAPOLSKY, 2000). De modo relevante, o hipocampo, o córtex pré-frontal e o corpo estriado expressam ambos receptores de mineralocorticóides e glicocorticóides, tornando-se alvos da ação do cortisol e, portanto, particularmente susceptíveis a atrofia neuronal induzida pelo estresse (HERMAN *et al.*, 2003, 2005; MITRA; SAPOLSKY, 2008).

### 1.5 Plantas medicinais e ação sobre o SNC

Os produtos naturais, notavelmente os originados de plantas, têm sido uma importante fonte de agentes terapêuticos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos (CALIXTO, 2005). Dessa forma, as plantas medicinais tornaram-se o grande alvo das indústrias farmacêuticas e institutos de pesquisa na busca de novas drogas e compostos com atividade terapêutica (EVANS, 1996).

Assim, a procura por novos compostos isolados de plantas com ação no SNC tem aumentado muito nas últimas décadas. Várias formulações com extratos de plantas usados como ansiolíticos, antidepressivos ou na melhora da cognição, como erva de São João (*Hypericum perforatum*), ginseng (*Panax ginseng*), kava (*Piper methysticum*), ginkgo (*Gingo biloba*), valeriana (*Valeriana officinalis*) foram introduzidas na prática médica, depois de estudos comprovando sua eficácia e segurança e para os quais já existem numerosos ensaios clínicos randomizados e controlados (LINDE *et al.*, 2011). Mas pouco se estudou no tocante a plantas da flora brasileira, como por exemplo, *Matricaria chamomilla*, *Passiflora incarnata*, *Erythrina velutina*, *Protium heptaphyllum*, *Aniba riparia*, entre outras. Os compostos ativos isolados dessas plantas, muitas vezes se mostram bastante similares com o de drogas alopáticas usadas clinicamente, necessitando de mais estudos para avaliação da segurança e assim incentivar mais pesquisadores e investidores a alavancar a pesquisa clínica desses compostos com o objetivo de fortalecer o uso de fitoterápicos e aumentar o número de fármacos disponíveis.

A idéia 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 de saúde ofertando medicamentos equivalentes, também registrados, talvez mais baratos, com espectro de ação mais adequados e, com indicações terapêuticas complementares às medicações existentes, mas sempre em estrita obediência aos preceitos éticos que regem o emprego de xenobióticos (produto estranho ao organismo humano, nele introduzido com finalidades terapêuticas) na espécie humana.

Para contribuir com a pesquisa de substâncias isoladas de plantas com ação no sistema nervoso central, este estudo visa investigar o efeito antidepressivo de riparina III (ripIII), isolada da planta *Aniba riparia* (Nees) Mez, da família *Lauraceae*.

## 1.6 A Família Lauraceae

As plantas da família Lauraceae têm distribuição pantropical, sendo bem representadas na América, Ásia tropical, Austrália e Madagascar, e pouco expressivas no sul da África, possuindo 2.500 espécies subordinadas a 50 gêneros (ROHWER, 1986; WERFF & RICHTER, 1996). No Brasil, ocorrem 19 gêneros e cerca de 390 espécies que habitam, em sua maior parte, as florestas pluviais e também as restingas e os cerrados (BARROSO, 1978). São árvores e arbustos encontrados nas florestas tropicais e subtropicais com casca, folhas verdes e frutos.

Os principais gêneros incluem *Aniba* (40 spp.), *Ocotea* (300-400 spp.), *Persea* (150 spp.), *Cinnamomum* (250 spp.), *Litsea* (400 spp.), *Neolitsea* (80 spp.), *Lindera* (100 spp.), *Laurus* (2 spp.) e *Cryptocarya* (200-250 spp.) (EVANS, 1996). Algumas espécies têm sido utilizadas pelas indústrias para a fabricação de diversos produtos, porém, a maioria das espécies tem seu uso restrito às comunidades tradicionais que detêm o conhecimento empírico da utilização dessas plantas.

As Lauraceae destacam-se entre as demais famílias pela sua importância econômica que é conhecida desde os tempos remotos, através de documentos da China de 2800 a.C., onde já era empregado o óleo de *Cinnamomum camphora* e de outras espécies do gênero na medicina (SANGIRARDI JR., 1984). As folhas de *Laurus nobilis*, o loureiro, eram utilizadas pelos antigos gregos e romanos para confeccionar coroas, com as quais se homenageavam guerreiros e atletas vitoriosos, e estão entre os condimentos conhecidos da culinária de todo o mundo. O produto alimentício mais comercializado em quase toda a América é o fruto de *Persea americana*, o abacateiro, do qual também se extrai, do mesocarpo e da semente, o óleo para a fabricação de cosméticos.

Atualmente, o potencial econômico das espécies dessa família é usado na culinária (*Persea americana*, *P. gratissima*, *Laurus nobilis*), em marcenaria (*O. organensis*, *Aniba firmula*, *A. terminalis*) e construção civil (*Ocotea acutifolia*, *O. acyphylla*, *O. catharinensis*), na fabricação de papel (*Ocotea puberula*, *O. elegans*), na indústria de perfumaria e na indústria química (*A. roseadora*, *A. carnellita*, *A. parviflora*) e, ainda, na medicina popular (*Ocotea aciphylla*, *O. spectabilis*, *O. pulchella*, *O. teleiandra*, *Laurus nobilis* e *Aniba riparia*) (MARQUES, 2001). Essa importância econômica que as Lauraceae apresentam e a inexistência de programas efetivos de manejo florestal são alguns dos fatores que colocam sob perigo de extinção da maior parte de suas espécies (ARAÚJO, 1994).

### **1.6.1 Aniba riparia (Nees) Mez**

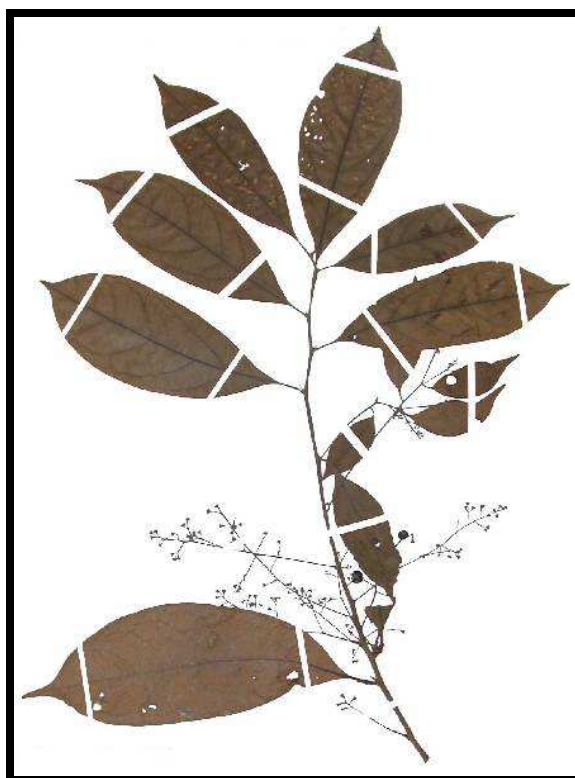
*Aniba* é um gênero que compreende cerca de 40 espécies de arbustos e árvores de planície, com o centro da sua diversidade na Amazônia e nas Guianas, podendo estender-se para os Andes, as montanhas do norte da Venezuela e leste e sul do Brasil (CASTELO-BRANCO et al., 2000).

Uma de suas espécies, a *Aniba riparia* (Nees) Mez é conhecida popularmente como “louro”, “louro-faia” ou “pau-rosa” (MARQUES, 2001). Essa planta apresenta folhas cartáceas, foscas em ambas as faces, reticulação aureolada, ramos de 3 mm de espessura,

marrons e lenticelados, pecíolo canaliculado, engrossado na base e gema terminal menor que 4 mm (VICENTINI et al., 1999) (**FIGURA 8**).

O estudo químico das cascas do caule de *Aniba riparia* revelaram a presença de alguns flavonóides, benzilbenzoatos e benzaldeídos (FERNANDES et al., 1978; FRANÇA et al., 1976). Além disso, o estudo realizado por Barbosa-Filho e colaboradores (1987), com o fruto verde da planta, mostrou a presença de uma grande variedade de substâncias, cujas principais são neoglicanas, benzilbenzoatos, feniletilaminas (O-metil-tiramina) e alguns alcalóides, mais especificamente alcanoides (feniletilamidas de ácido benzóico).

**Figura 8 - *Aniba riparia* (Nees) Mez.**



**Fonte:** <http://www.bio.uu.nl/~herba/Guyana/VTGG/Lauraceae/Aniba/slides/Aniba%20riparia%201.html>. **Último acesso:** Abril, 2012.

### 1.6.2 Alcamidas

As alcamidas naturais constituem uma classe especial de alcalóides contendo uma função amida restrita a poucos representantes na natureza (CATÃO et al., 2005). Do ponto de vista biogênico, as alcamidas representam uma classe distinta de produtos naturais que se forma ao serem conjugadas nas diferentes rotas metabólicas, sendo, portanto, metabólitos secundários, cuja estrutura geral se origina da condensação de um ácido graxo insaturado e uma amina, formando assim, uma amida (alcamida) (HOFER et al., 1986).

O grupo funcional amida é ubíquo; encontra-se em todos os organismos vivos constituindo as uniões peptídicas, isto é, uma união entre os aminoácidos para a formação da estrutura primária de uma proteína, base funcional da vida. As amidas como produtos naturais, por outro lado, não são tão abundantes. No entanto, as alcamidas são consideradas compostos bioativos, isto é, uma pequena quantidade desses compostos apresenta uma resposta notável nas células receptoras (TORRES & CHAVEZ, 2001).

As alcamidas podem ser formadas a partir de feniletilaminas naturais, como a tiramina e a dopamina, com ácidos orgânicos. A tiramina tem sido frequentemente encontrada em conjugados formando alcamidas em algumas plantas, como por exemplo, na forma de N-trans-coumaroil-tiramina na espécie *Piper sanctum* (MATA et al., 2004), na forma de N-feruloil-tiramina na *Piper argyrophyllum* (SINGH et al., 1996) e na forma de N-benzoil-tiramina na *Aniba riparia* (BARBOSA-FILHO et al., 1987), além de seus análogos.

Do fruto não maduro da planta *Aniba riparia* foram isoladas algumas alcamidas, como por exemplo, o éter metílico de N-benzoil-tiramina (riparina I), assim como alguns de seus análogos substituídos, (O-metil)-N-2-hidroxibenzoil-tiramina (riparina II) e (O-metil)-N-2,6-dihidroxibenzoil-tiramina (riparina III), sendo que o principal composto isolado do fruto verde de *Aniba riparia* foi a alcamida riparina III, que representou 34% de todos os componentes extraídos (BARBOSA-FILHO et al., 1987). Essas amidas ou alcamidas foram denominadas riparinas em homenagem a planta (BARBOSA-FILHO et al., 1997).

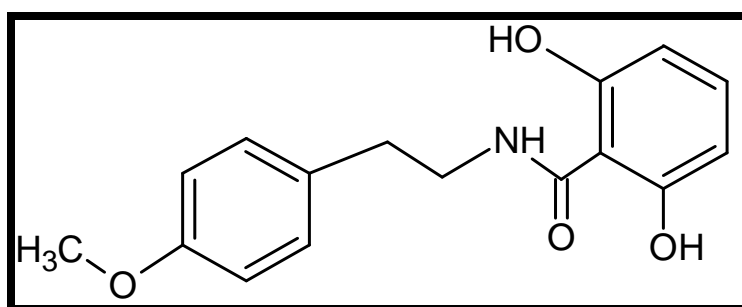


Posteriormente, essas alcaloides naturais encontradas na planta *Aniba riparia* foram sintetizadas por Barbosa-Filho et al., (1990).

### 1.6.3 Riparina III (O-metil-N-2,6-dihidroxibenzoil-tiramina)

Isolada do fruto verde de *Aniba riparia*, a riparina III é um alcalóide do ciclo não heterocíclico, mais especificamente, uma alcaloide natural, caracterizada como uma feniletilamida de ácido benzóico, é o componente majoritário isolado do fruto não maduro. É formada da união da tiramina, uma feniletilamina, e o ácido benzóico. Apresenta duas substituições no anel do ácido benzóico, acrescentando duas hidroxilas. Além disso, o anel da tiramina apresenta um metil ligado ao oxigênio formando uma função éter (FIGURA 8).

Figura 9 - Estrutura química da riparina III.



### 1.6.4 Propriedades Farmacológicas das Alcaloides Naturais de *Aniba riparia*

O uso tradicional desta planta não é registrado na literatura, no entanto, estudos farmacológicos com os constituintes maiores isolados, as riparinas I, II e III, mostram alguns efeitos biológicos.

Algumas evidências mostram que o extrato dos frutos e dos cálices persistentes de *Aniba riparia* apresentam efeitos antimicrobianos contra *Candida albicans*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* (MARQUES, 2001). A partir daí,

surgiram interesses por parte de alguns pesquisadores em verificar a potencialidade farmacológica das amidas naturais isoladas do fruto verde de *Aniba riparia*, riparina I e III, além de uma análoga sintetizada, riparina XIII, sobre cepas de microorganismos multirresistentes de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. As amidas mostraram-se eficazes frente às cepas de ambos microorganismos, no entanto, o maior percentual de atividade foi contra as cepas de *S. aureus*. Além disso, foram testadas drogas usadas rotineiramente na clínica médica como, por exemplo, penicilina, ampicilina e lincomicina contra *S. aureus* e, tetraciclina, ampicilina, sulfametoxazol-trimetropina e cloranfenicol contra *E. coli* e, observou-se que a sensibilidade destas cepas frente a esses antimicrobianos foi menor que a das riparinas, mesmo tratando-se de cepas multirresistentes (CATÃO et al., 2005).

Alguns estudos foram feitos com relação a toxicidade aguda das amidas de *Aniba riparia* e os resultados obtidos mostraram que as três substâncias (riparina I, II e III) quando administradas por via oral (v.o.) em doses de até 1 g/kg não causaram mortes de camundongos em até 48h. A toxicidade, por via intraperitoneal (i.p.), em doses semelhantes de riparina I e II também não foram letais. Contudo, a riparina III causou mortes de forma dose dependente e o valor da DL50 obtida graficamente a partir do gráfico de probitos log-dose foi de 104,2 mg/kg (CASTELO-BRANCO et al., 2000). Além disso, foram realizados testes hipocráticos para verificar se essas amidas, nas doses de 500 mg/kg, v.o. e i.p., para riparina I e II, e 500 mg/kg v.o. e 35 mg/kg i.p. para riparina III, provocariam alterações centrais, autonômicas ou musculares. Os resultados obtidos mostraram que as três amidas não causaram mudanças significantes nas funções descritas acima nas doses analisadas (CASTELO-BRANCO et al., 2000).

Em outras ações farmacológicas estudadas, foi demonstrado que a riparina III apresentou potente atividade relaxante no músculo liso. Em concentrações de 8 a 30  $\mu\text{M}$  essa amida antagonizou as contrações induzidas por acetilcolina e histamina em íleo de cobaia, além de inibir as contrações induzidas por ocitocina e bradicinina em útero de ratas virgens. Além disso, em traquéia de cobaia, inibiu o tônus espontâneo ( $\text{IC}_{50}$  7,7  $\mu\text{M}$ ) e as

contrações induzidas por carbacol (IC50 10  $\mu$ M) (CASTELO-BRANCO et al., 1991; CASTELO-BRANCO, 1992).

O efeito espasmolítico da riparina III foi investigado levando em consideração o envolvimento do composto com o metabolismo do  $Ca^{2+}$ . Foi demonstrado que a riparina III é capaz de induzir um efeito espasmolítico, principalmente, devido à inibição de influxo de  $Ca^{2+}$  para o meio intracelular e da inibição da liberação dos estoques intracelulares de  $Ca^{2+}$ , não envolvendo a participação da geração de AMPc (THOMAS et al., 1994).

Além disso, as riparina I, II e III apresentam efeito hipotensor e bradicárdico transitório, devido a uma ação que parece envolver, principalmente, um componente de origem parassimpática a nível cardíaco (SEIXAS, 1996).

Além desses efeitos investigados por diversos pesquisadores, estudos realizados no laboratório de Neurofarmacologia da UFC, por nossa equipe, mostraram que as três riparinas apresentam efeitos sobre o sistema nervoso central, além de efeitos analgésicos, dados que foram publicados em diversos trabalhos. As investigações sobre o SNC mostraram que as três substâncias apresentam efeitos ansiolíticos em modelos animais de labirinto em cruz elevado e placa perfurada, com o possível envolvimento do sistema gabaérgico (SOUSA et al., 2004; SOUSA et al., 2005; SOUSA et al., 2007; MELO et al., 2006). A ripIII também apresentou efeito anticonvulsivante em modelo de convulsão induzido por pentilenotetrazol e efeito antidepressivo em modelos animais de nado forçado e suspensão da cauda, em testes de *screening* de ações centrais, que geraram uma dissertação de mestrado e dois trabalhos publicados (SOUSA et al., 2004; MELO et al., 2006). Mais recentemente, a ripI apresentou efeito analgésico no teste de contorções abdominais e formalina (ARAÚJO et al., 2009), e a ripII, também apresentou efeito antidepressivo, com a participação dos sistemas monoaminérgicos em seu efeito (TEIXEIRA et al., 2011).

***RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA***

---

---

## 2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

O uso de produtos naturais como matéria-prima para síntese de substâncias bioativas, especialmente fármacos, tem sido amplamente relatado ao longo do tempo. É de interesse da medicina o estudo de substâncias isoladas de plantas, uma vez que o efeito obtido nos experimentos pode ser atribuído a somente uma substância enquanto extratos contêm diversos componentes bioativos, podendo gerar dúvida em qual componente apresenta os efeitos observados. Com esse pensamento, a ripIII, uma substância pura, extraída do fruto maduro da planta *Aniba riparia*, apresentou algumas propriedades farmacológicas mostrando ser uma substância biologicamente ativa. Uma dessas propriedades é o seu efeito antidepressivo observado previamente em estudos realizados em nosso laboratório (SOUSA et al., 2004).

A depressão é uma doença que apresenta grande impacto para sociedade e para os sistemas públicos, já que é uma doença crônica e recorrente e, que em 2020, acredita-se que será a segunda maior causa de incapacidade, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares. Além disso, sua etiologia não está totalmente esclarecida e este fato reflete diretamente na falta de medicamentos ideais para o tratamento desta doença, uma vez que os fármacos utilizados atualmente apresentam grande latência para o início dos seus efeitos terapêuticos. No entanto, acredita-se que o estresse é um fator que pode alterar a homeostasia dos sistemas monoaminérgicos e causar produção radicais livres, danosos às células neuronais, promovendo alterações em regiões cerebrais como o hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado, levando ao desenvolvimento da depressão, o que liga diretamente o estresse a etiologia desta doença.

Portanto, a busca de novos fármacos mais eficazes para o tratamento da depressão vinculada ao melhor esclarecimento da sua etiologia nos estimulou a investigar o potencial terapêutico da ripIII, através da investigação do seu mecanismo de ação pelo envolvimento do sistema monoaminérgico, assim também como a análise de um possível efeito antioxidante como parte do efeito antidepressivo, baseado na observação de que há produção de radicais livres durante um episódio estressante e que estes contribuem para o

desenvolvimento da depressão. Dessa forma, este trabalho torna-se relevante, pois trará informações adicionais à literatura de um possível agente para o tratamento da depressão cujo mecanismo de ação pode ser semelhante aos antidepressivos convencionais e aumentar os níveis de monoaminas, mas também pode esclarecer se há um componente a mais em sua ação antidepressiva como a interferência sobre os sistemas antioxidantes promovendo conhecimento adicional e contribuindo inclusive para o melhor entendimento da etiologia da depressão.

Para se estudar o efeito e, conseqüentemente, monitorar o desenvolvimento de novas drogas com atividade no SNC, têm sido utilizados diversos modelos experimentais, que utilizam comportamentos adaptados a cada espécie animal. Sendo assim, como forma de justificativa, fizemos uso de um modelo clássico para investigação de drogas antidepressivas, o modelo do nado forçado, que conhecidamente induz estresse aos animais ao impor a natação forçada sem a possibilidade de escape, fazendo analogia a uma situação de estresse intenso que induz ao quadro depressivo. Assim, neste modelo, foram utilizados antagonistas monoaminérgicos específicos para cada subtipo de receptor para investigar a qual deles o efeito da ripIII estava vinculado. Além disso, foram feitas medições dos níveis dessas monoaminas em áreas cerebrais relacionadas à depressão para verificar se havia aumento desses níveis, condição primária de melhoria no quadro depressivo. Por fim, ainda neste modelo experimental, nas mesmas áreas cerebrais, foi avaliada a indução do estresse oxidativo pelo nado e a investigação do possível efeito antioxidante da substância, que poderia sugerir um mecanismo a mais para a melhora da depressão.

***OBJETIVOS***

---

---

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Investigar os possíveis mecanismos de ação antidepressivo da ripIII de *Aniba riparia* (Nees) Mez através da análise das alterações comportamentais e neuroquímicas em modelos preditivos de depressão, além da investigação dos efeitos da substância sobre o estresse oxidativo neuronal nas áreas cerebrais de corpo estriado, hipocampo e córtex pré-frontal induzido pelo teste do nado forçado em camundongos.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do pré-tratamento com ripIII no modelo preditivo de depressão (teste do nado forçado) para realização da curva dose-resposta;
- Observar o efeito do pré-tratamento com ripIII nos modelos animais de suspensão da cauda, campo aberto e hipotermia induzida por apomorfina;
- Investigar a participação dos sistemas dopaminérgico, noradrenérgico e serotoninérgico no mecanismo de ação antidepressivo da ripIII no teste do nado forçado, através do:
  - Pré-tratamento com antagonistas dos receptores D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>-dopaminérgicos;
  - Pré-tratamento com antagonistas dos receptores  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\beta$ -adrenérgicos;
  - Pré-tratamento com o inibidor da síntese de serotonina;
  - Pré-tratamento com antagonistas dos receptores 5HT<sub>1A</sub>, 5HT<sub>2A/2C</sub>, 5HT<sub>3</sub>-serotoninérgicos;
- Estudar as alterações neuroquímicas produzidas em corpo estriado, hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos através da:



- Determinação dos níveis de monoaminas NA, DA e 5-HT e seus metabólitos DOPAC, HVA e 5-HIAA
- Analisar o efeito do pré-tratamento com ripIII sobre o estresse oxidativo neuronal induzido pelo teste do nado forçado nas áreas cerebrais, corpo estriado, hipocampo e córtex pré-frontal, através da:
  - Determinação da taxa de peroxidação lipídica (malonildialdeído – MDA) e produção de nitrito-nitrato;
  - Verificação da atividade das enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase (SOD) e dos níveis de glutatona reduzida (GSH);

***MATERIAIS E MÉTODOS***

---

---

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Material Botânico

A planta *Aniba riparia* (Nees) Mez foi identificada pelo botânico Klaus Kubitzki da Universidade de Hamburgo/Alemanha (BARBOSA-FILHO et al., 1987). As frutas verdes de *Aniba riparia* (material botânico) foram coletadas por Dr. Hipólito F. Paulino-Filho (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”) na região de Humaitá, estado do Amazonas, Brasil (BARBOSA-FILHO et al. 1987). O material (frutas verdes) foi cedido ao Prof. Dr. José Maria Barbosa-Filho do grupo de pesquisa do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba.

A extração e isolamento foram feitos pelo doutorando Stanley Juan Chavez Gutierrez conforme descrito abaixo sob a orientação e supervisão do Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho que gentilmente nos cedeu a substância isolada e que muito colaborou para realização deste estudo.

### 4.2. Extração e Isolamento

As frutas verdes (5 kg) foram moídas e extraídas em etanol (temperatura ambiente). A solução foi então filtrada e o filtrado foi evaporado. O resíduo (380 g) foi redissolvido numa solução aquosa de etanol 60%. A solução foi extraída primeiro com hexano e depois com clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ). Os solventes foram evaporados e o extrato hexânico (88 g) foi cristalizado com metanol dando triglicerídeos (79 g). A água mãe foi evaporada e o resíduo foi submetido a cromatografia (sílica gel). A eluição com solvente de polaridade crescente deu na ordem benzilbenzoatos (1 g) e sitosterol (75 mg). O extrato de  $\text{CHCl}_3$  (59 g) foi cristalizado com benzeno ( $\text{C}_6\text{H}_6$ ) dando riparina III (17 g). A água mãe foi evaporada e o resíduo tratado da mesma maneira deu na ordem riparina III (3 g), riparina I (305 mg) e riparina II (427 mg), entre outros compostos (BARBOSA-FILHO et al., 1987).

### 4.3. Principais equipamentos utilizados

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

#### 4.4. Drogas e Reagentes

Drogas/Reagentes	Origem
Água Destilada	Deionizador
Álcool etílico P.A.	Quimex, Brasil
Bupropiona	Zyban®, Glaxo-Wellcome
Apomorfina	Sigma
Imipramina	Imipra®, Cristália
Fluoxetina	Fluxene®, Eurofarma
p-clorofenilalanina (PCPA)	Sigma-Aldrich, U.S.A
NAN-190	Sigma-Aldrich, U.S.A
Ritanserina	Sigma-Aldrich, U.S.A
Ondansetron	Sigma-Aldrich, U.S.A
Prazosina	Sigma-Aldrich, U.S.A
Ioimbina	Sigma-Aldrich, U.S.A
SCH 23390	Sigma-Aldrich, U.S.A
Sulpirida	Sigma-Aldrich, U.S.A
Tween 80 – Polyoxyethylene Sorbitan Mono-oleate	Sigma-Aldrich, U.S.A

#### 4.5. Animais

Neste trabalho foram utilizados camundongos albinos da espécie *Mus musculus* da variedade *Swiss*, machos, com peso variando de 20 - 25 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará.

Durante todos os experimentos, os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com no máximo 30 animais, em condições ambientais semelhantes (sala com a temperatura

de  $25 \pm 1$  °C), com ciclo claro/escuro alternado de 12 horas, com luzes acesas às 06:00h, recebendo ração padrão tipo Purina e água *ad libitum*.

O projeto com as metodologias utilizadas na elaboração da presente tese foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA), do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará cujo número do protocolo de aprovação é 15/08 (ANEXO 1).

#### **4.6. Preparo das drogas.**

A ripIII foi dissolvida com Tween 80 a 2% e diluída em água destilada, obtendo-se a concentração final de 2,5 e 5,0 mg/mL para ser administrada nas doses 25 e 50 mg/kg, respectivamente. Os grupos controles receberam veículo (água destilada emulsificada a 2% com Tween 80). O volume total de solução administrada foi de 0,1 mL/10g de peso do animal.

As demais drogas utilizadas neste trabalho foram dissolvidas em água destilada momentos antes da administração também em um volume final de 0,1 mL para cada 10 g de peso do animal.

#### **4.7. Tratamento dos grupos experimentais**

As doses da ripIII foram determinadas por experimentos de curva dose-resposta e, as doses das demais drogas, a partir de dados da literatura pertinente. Os animais foram tratados com ripIII, de forma aguda, nas doses de 25 e 50 mg/kg através da via oral (v.o.). Como referência de drogas antidepressivas, foram utilizados imipramina 10 e 30 mg/kg, via intraperitoneal (i.p.), bupropiona 30 mg/kg (i.p.) e fluoxetina 35 mg/kg (i.p.), nos testes do nado forçado, suspensão da cauda e campo aberto. Os animais foram submetidos aos testes 30 ou 60 minutos (min) após o tratamento intraperitoneal ou oral, respectivamente. Todos os testes foram realizados no período entre 07:00 e 13:00h.

#### 4.8. Curva dose-resposta para riparina III no teste do nado forçado.

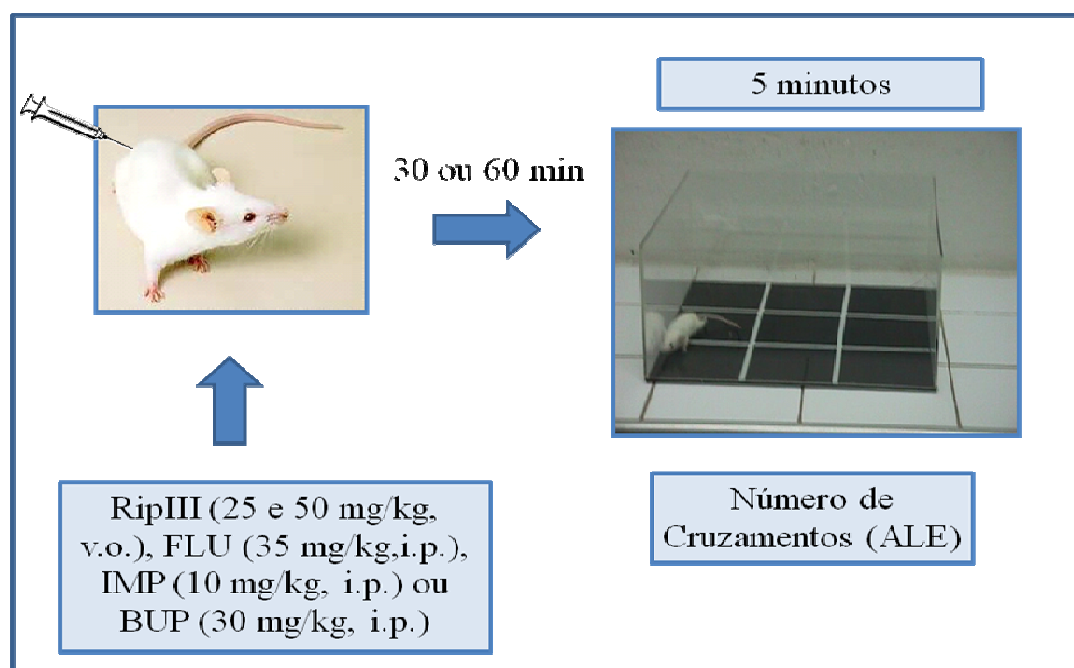
Os animais receberam ripIII, por via oral, nas doses de 5, 10, 12,5, 25, 50 e 100 mg/kg ou veículo (água destilada emulsificada com 2% tween 80). Após 60 minutos do tratamento, os animais foram submetidos ao nado por 5 minutos, onde foi analisado o tempo de imobilidade do animal para a escolha da melhor dose para os testes subsequentes.

#### 4.9. Testes Comportamentais.

##### 4.9.1. Teste do Campo Aberto

Este teste foi realizado para testar a atividade exploratória do animal (ARCHER, 1973). O aparato para camundongos é feito de acrílico (paredes transparentes e piso preto, 30 x 30 x 15 cm) e dividido em 9 quadrantes iguais. Após 30 ou 60 minutos dos tratamentos i.p. ou v.o., respectivamente, os animais, um por vez, foram colocados no centro do campo aberto onde o número de cruzamentos com as quatro patas (atividade locomotora espontânea; ALE) foi registrado durante um tempo de 5 minutos (**Quadro 2**).

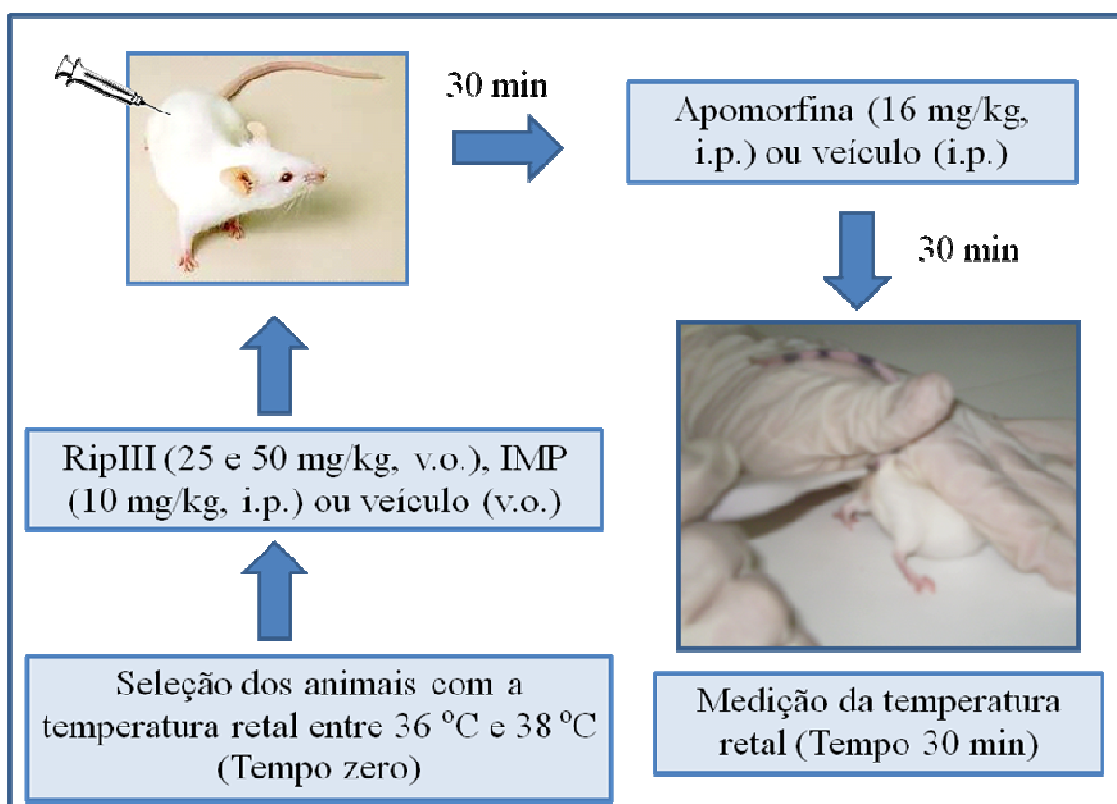
**Quadro 2 - Esquema do Teste do Campo Aberto**



#### 4.9.2. Teste da Hipotermia Induzida por Apomorfina

A medição da temperatura dos animais foi realizada numa sala ( $24 \pm 1$  °C) no período da manhã entre 9:30 e 11:30h. A temperatura colônica foi mensurada com um termômetro digital introduzido no reto com vaselina sólida até 1 cm. Para o experimento (PUECH et al., 1981) foram selecionados os animais que apresentaram temperatura entre 36 °C e 38 °C (tempo zero; T0). Em seguida, os animais foram tratados com ripIII (25 e 50 mg/kg; v.o.), veículo (v.o.) ou imipramina (10 mg/kg; i.p.), e, 30 minutos depois receberam apomorfina (16 mg/kg, i.p.) ou veículo (i.p.). Após 30 min (T30) do último tratamento foi realizada uma nova medição da temperatura colônica para avaliar a hipotermia dos animais. As mudanças na temperatura retal ( $\Delta T$ ) foram obtidas pela diferença entre as duas medidas realizadas (T30 – T0). A variação da temperatura entre os grupos foi analisada para expressar o antagonismo da hipotermia induzida pela alta dose de apomorfina (**Quadro 3**).

**Quadro 3 - Esquema do Teste da Hipotermia Induzida por Apomorfina.**

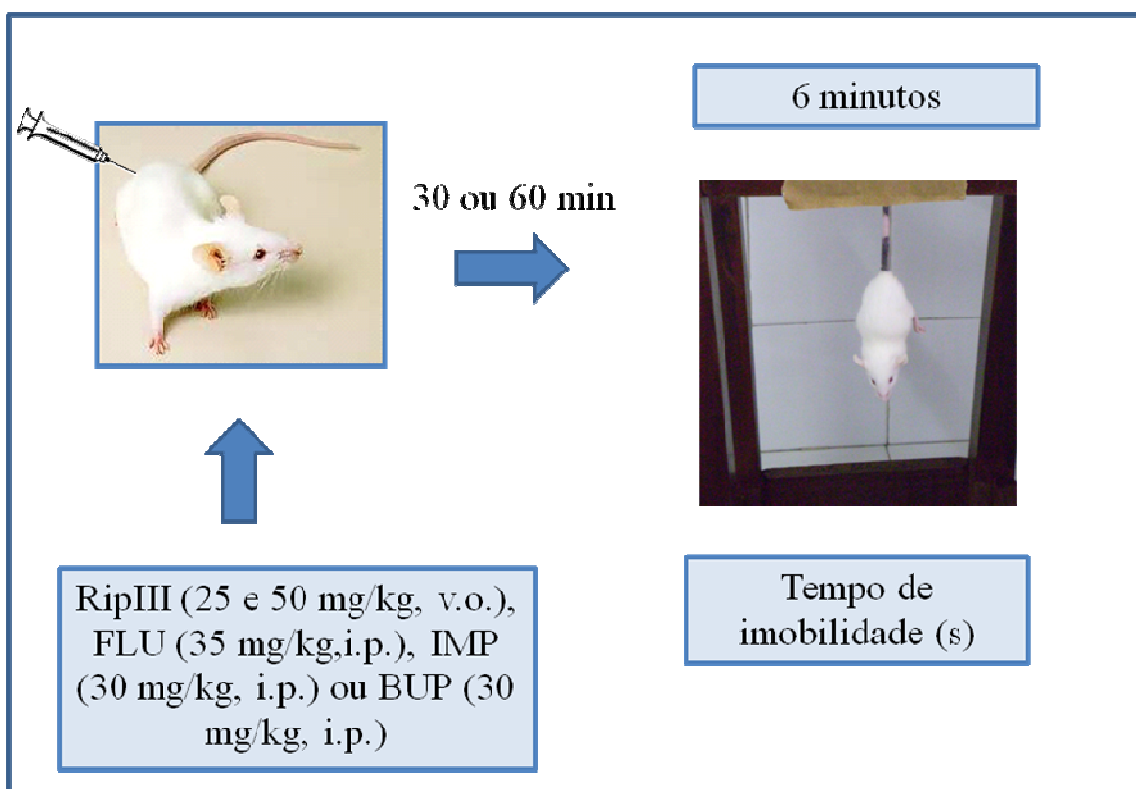




#### 4.9.3. Teste da Suspensão da Cauda

Para este experimento foram utilizados os seguintes grupos: imipramina (30 mg/kg, i.p.), bupropiona (30 mg/kg, i.p.), fluoxetina (35 mg/kg, i.p.), veículo (v.o.) ou riparina III (25 e 50 mg/kg; v.o.). Após 30 min do tratamento i.p., ou 60 min do tratamento v.o., os animais, um por vez, foram suspensos, presos com uma fita adesiva a cerca de 1 cm da ponta da cauda, numa plataforma 58 cm acima da bancada, durante 6 minutos (STERU et al., 1985). O parâmetro observado foi o tempo de imobilidade do animal, em segundos (Quadro 4).

Quadro 4 - Esquema do Teste da Suspensão da Cauda.



#### 4.9.4. Teste do Nado Forçado

Para o experimento (PORSOLT et al., 1977) foram utilizados tanques de 22 cm de diâmetro e 40 cm de altura contendo água fresca a  $24 \pm 1^\circ \text{C}$  até a metade do tanque, cerca de 20 cm. Após 30 ou 60 minutos dos tratamentos i.p. ou v.o., respectivamente, os animais foram colocados, um por vez, no tanque onde o tempo de imobilidade, em segundos, foi contado durante cinco minutos. O animal foi considerado imóvel quando permaneceu flutuando na água, fazendo apenas movimentos suaves necessários para manter a cabeça acima da água.

Para avaliar a participação do sistema monoaminérgico no mecanismo de ação antidepressivo da riparina III, foram utilizados antagonistas específicos, em diferentes grupos, como descrito a seguir:

##### 4.9.4.1 Avaliação do sistema dopaminérgico:

Diferentes grupos foram pré-tratados com SCH23390 (SCH; 15  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , i.p.), antagonista dopaminérgico  $D_1$  ou sulpirida (SPD; 50  $\text{mg}/\text{kg}$ , i.p.), antagonista dopaminérgico  $D_2$ , 30 minutos antes da administração de riparina III (50  $\text{mg}/\text{kg}$ , v.o.), veículo (água destilada + 2% Tween 80, v.o.) ou bupropiona (30  $\text{mg}/\text{kg}$ , i.p.). Depois de 60 minutos da administração da ripIII-50, veículo ou bupropiona, os animais foram colocados no cilindro com água onde o tempo de imobilidade por 5 minutos foi avaliado (**Quadro 5**).

##### 4.9.4.2 Avaliação do sistema noradrenérgico:

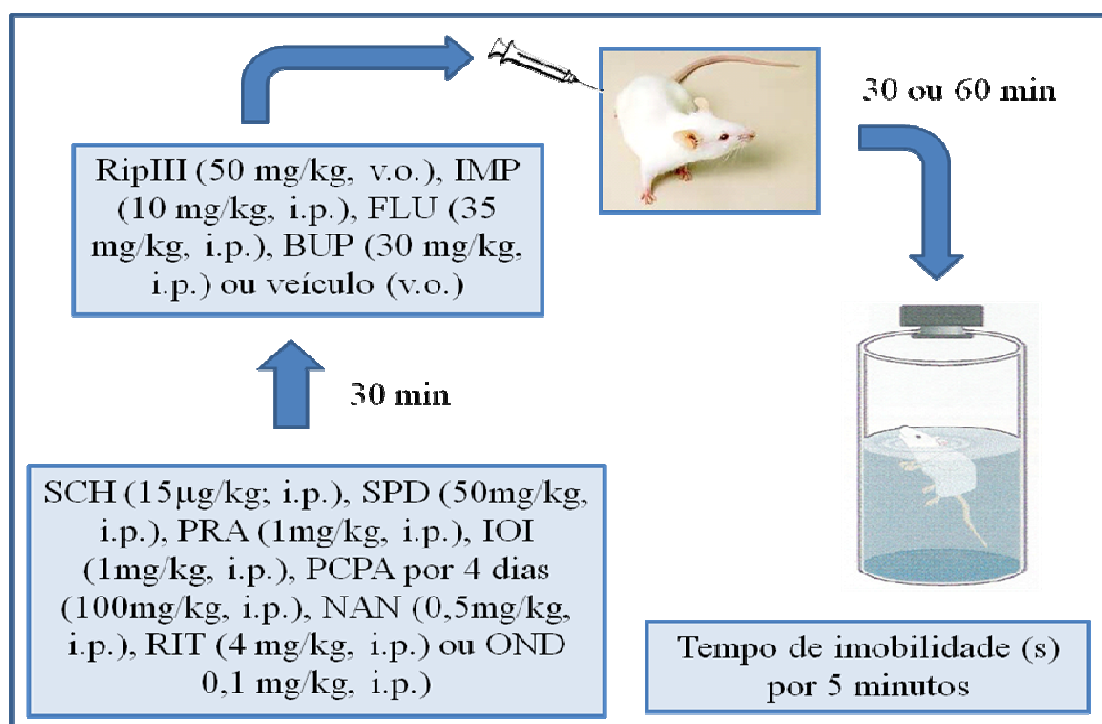
Diferentes grupos foram pré-tratados com prazosina (PRA; 1  $\text{mg}/\text{kg}$ , i.p.), antagonista noradrenérgico  $\alpha_1$ , ou ioimbina (IOI; 1  $\text{mg}/\text{kg}$ , i.p.), antagonista noradrenérgico  $\alpha_2$ , 30 minutos antes da administração de riparina III (50  $\text{mg}/\text{kg}$ , v.o.), veículo (água destilada + 2% Tween 80, v.o.) ou imipramina (10  $\text{mg}/\text{kg}$ , i.p.). Depois de 60 minutos da administração da ripIII-50, veículo ou imipramina, os animais foram colocados no cilindro com água onde o tempo de imobilidade por 5 minutos foi avaliado (**Quadro 5**).

#### 4.9.4.3 Avaliação do sistema serotoninérgico:

Durante quatro dias consecutivos, sempre pela manhã, os animais foram pré-tratados com p-clorofenilalanina (PCPA, 100 mg/kg, i.p.), um inibidor da síntese de serotonina. No quarto dia de tratamento, os animais receberam riparina III (50 mg/kg; v.o.), fluoxetina (35 mg/kg; i.p.) ou veículo, 30 minutos após a última administração de PCPA. Em seguida, esperou-se mais 30 minutos para que os animais fossem colocados no cilindro com água onde o tempo de imobilidade por 5 minutos foi avaliado (**Quadro 5**).

Ainda para avaliação do sistema serotoninérgico, diferentes grupos foram pré-tratados com NAN-190 (NAN; 0,5 mg/kg, i.p.), antagonista do receptor 5-HT<sub>1A</sub>, ritanserina (RIT; 4 mg/kg, i.p.), antagonista do receptor 5-HT<sub>2A/2C</sub> ou ondansetron (OND; 0,1 mg/kg, i.p.), antagonista do receptor 5-HT<sub>3</sub>, 30 minutos antes da administração de riparina III (50 mg/kg, v.o.), veículo (água destilada + 2% Tween 80, v.o.) ou fluoxetina (35 mg/kg, i.p.). Depois de 60 minutos da administração da ripIII-50, veículo ou fluoxetina, os animais foram colocados no cilindro com água onde o tempo de imobilidade por 5 minutos foi avaliado (**Quadro 5**).

**Quadro 5 - Esquema do Teste do Nado Forçado.**



#### 4.10. Testes Neuroquímicos.

Os testes neuroquímicos consistiram em dois tipos de experimentos:

1) Os camundongos normais receberam veículo (2% Tween 80 em água destilada) e 2 horas depois foram sacrificados e dissecados. Os animais tratados com ripIII (25 ou 50 mg/kg; v.o.) ou veículo foram submetidos ao teste do nado forçado 60 minutos após a administração da droga e, 60 minutos depois do teste foram sacrificados por deslocamento cervical para dissecação das áreas corpo estriado, hipocampo e córtex pré-frontal para detecção dos níveis de monoaminas no HPLC;

2) Os animais que não foram submetidos ao nado forçado, foram tratados com ripIII-50 ou veículo (2% Tween80 em água destilada) e depois de 2h foram sacrificados e tiveram seus cérebros dissecados para a remoção das áreas. Os animais que foram submetidos ao estresse foram tratados com ripIII-50 ou veículo, via oral, e depois de 60 minutos foram submetidos ao nado forçado e 60 min depois foram sacrificados por deslocamento cervical para dissecação das áreas corpo estriado, hipocampo e córtex pré-frontal para análise do efeito da ripIII sobre o estresse oxidativo neuronal.

##### 4.10.1. Dissecação das áreas cerebrais em estudo

Após o sacrifício por deslocamento cervical, os animais foram decapitados e tiveram os encéfalos rapidamente removidos e colocados sobre papel alumínio numa placa de Petri com gelo para dissecação das áreas cerebrais a serem estudadas, e, para posterior preparo dos homogenatos cerebrais, para detecção dos níveis de monoaminas no HPLC ou para técnica de estresse oxidativo (**Figura 10**).

Para a retirada do córtex pré-frontal (**CPF**), a porção anterior dos lobos frontais (em torno de 1,5 mm a partir do bulbo olfatório) foi removida e feita uma secção bilateral com o auxílio de uma tesoura de microdissecação (MACHADO, 1985) (**Figura 11**).

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

Após a retirada do córtex pré-frontal acompanhando a fissura sagital mediana, a camada cortical cerebral foi retirada das leptomeninges com o auxílio de uma pinça reta de microdissecação, a qual, progredindo delicadamente e tangencialmente aos ventrículos laterais, divulsionou o córtex em toda a sua extensão fronto-occipital. O córtex já divulsionado foi rebatido para os lados, expondo parte do hipocampo (**Figura 12**) que, com divulsionamento, foi descolado e retirado.

O corpo estriado foi isolado das estruturas circunjacentes por divulsionamento com uma tesoura de microdissecação, sendo a sua retirada orientada pelo diâmetro da porção tuberosa visível desses núcleos, após o rebatimento lateral do córtex (**Figura 13**).

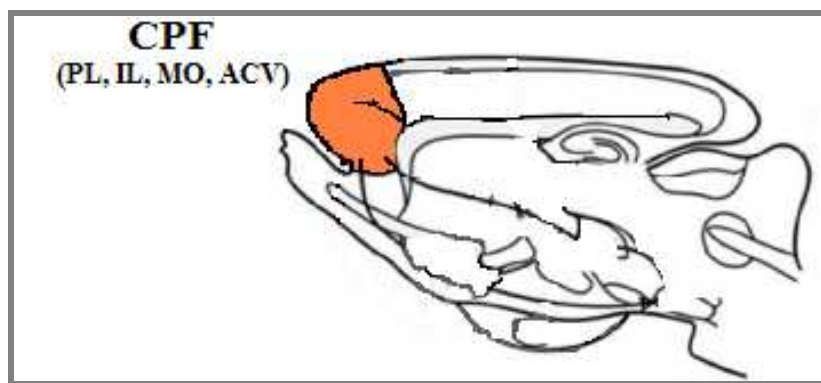
Após o término da dissecação, córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado foram colocados em *ependorffs* devidamente identificados, pesados e conservados a  $-70^{\circ}\text{C}$  para uso posterior. As áreas foram estocadas durante um período de tempo de no máximo 2 meses, e, quando utilizados, os tecidos foram considerados como tendo a mesma viabilidade para experimentação daqueles que foram ensaiados imediatamente ou 24 h após a dissecação (BURKE; GREENBAUN, 1987; FIELDER *et al.*, 1987).

**Figura 10 - Retirada do encéfalo.**



**FONTE:** OLIVEIRA, 2009.

**Figura 11 - Representação da região anatômica no camundongo referente ao córtex pré-frontal**



**Fonte:** UYLINGS et al., 2003

Nos roedores as áreas do cíngulo anterior, pré-límbica e infralímbica formam o córtex pré-frontal. PL-área cortical pré-límbica; IL- área infralímbica cortical; MO – áreas cortical orbital medial; ACV- área anterior do cíngulo ventral.

**Figura 12 - Retirada do hipocampo.**



**Figura 13 - Retirada do corpo estriado**



#### **4.10.2 Determinação de monoaminas e metabólitos com HPLC**

Para a determinação dos níveis de monoaminas foi utilizado o equipamento de HPLC (High Performance Liquid Chromatograph). Na cromatografia líquida clássica, um adsorvente (alumina ou sílica) é empacotado em uma coluna e é eluído por um líquido ideal (fase móvel). Uma mistura para ser separada é introduzida na coluna e é carregada através da mesma por um líquido eluente. Se um composto da mistura (soluto) é adsorvido fracamente pela superfície da fase sólida estacionária, ele atravessará a coluna mais rapidamente que um outro soluto que seja mais rapidamente adsorvido. Então, a separação dos solutos é possível se existem diferenças na adsorção pelo sólido. Os detectores eletroquímicos medem a condutância do eluente, ou a corrente associada com a oxidação ou redução dos solutos. Para ser capaz de detectar, no primeiro caso os solutos devem ser iônicos e no segundo caso, os solutos devem ter a característica de serem relativamente fáceis de se oxidarem ou reduzirem.

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

##### **4.10.2.1 Procedimento experimental**

Após a dissecação das áreas corpo estriado, hipocampo e córtex pré-frontal foram feitos homogenatos a 10% com ácido perclórico 0,1M (HClO<sub>4</sub>) por 30 s e, centrifugados por 15 minutos em centrífuga refrigerada a 15.000 rpm. Uma alíquota de 20 µL do sobrenadante foi, então, injetada no equipamento de HPLC, para a análise química.



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

#### **4.10.2.2 Soluções reagentes**

##### **- Fase móvel**

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

##### **- Ácido perclórico 0,1 M**

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

##### **- Padrões**

Os padrões foram preparados em uma concentração final de 4 ng/20  $\mu\text{l}$  de solução de NA, DA, 5HT, DOPAC, HVA e 5HIAA (Sigma, MO, EUA). A partir da área dos

picos desses padrões, as concentrações das amostras foram calculadas utilizando o programa *Microsoft Excel*® e os resultados expressos em ng/mg de tecido.

### **4.10.3. Estresse oxidativo**

#### **4.10.3.1. Determinação da produção de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS).**

##### **- Método**

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

Foram preparados homogenatos da área cerebral a 10% em solução de cloreto de potássio (KCl) 1,15 %. Um volume de 0,25 mL do homogeneizado foi misturado a 1 mL de solução de ácido tricloroacético a 10% e acrescido de 1 mL de solução de ácido tiobarbitúrico 0,6%. Após a agitação, essa mistura foi mantida em um banho de água fervente (95-100°C) por 15 min., adicionado o n-butanol (2:1 v/v), a seguir resfriada em banho de gelo por alguns minutos e posteriormente centrifugada (800xg, 5 min). O conteúdo de TBARS foi determinado em espectrofotômetro a 535 nm. Os resultados foram expressos em micromol de malonildialdeído (MDA) por mg de proteína.

##### **- Curva-padrão de malonildialdeído (MDA)**

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

**- Soluções reagentes:**

Foram utilizadas as seguintes soluções reagentes:

**- Solução de Cloreto de potássio**

2,3g de cloreto de potássio (Reagen, RJ, Brasil) foram diluídos para um volume final de 200mL de água destilada destilada

**- Tampão Fosfato**

$\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$  (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil) 50mM em água bidestilada, pH 7,4.

**- Solução de ácido tricloroacético**

TCA (Sigma, St. Louis, MO, EUA) 10 mL mais 90mL de água bidestilada.

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

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

**4.10.3.2. Determinação da produção de nitrito.****- Método da Preparação da Curva-Padrão**

Foram pesados 7mg de  $\text{NaNO}_2$  e dissolvidos em 10 mL de água bidestilada (estoque-10mM) foram feitas as diluições em série (10 e 20x), ficando 1mM, 100 $\mu\text{M}$ , 10 $\mu\text{M}$ , 5 $\mu\text{M}$ , 2,5 $\mu\text{M}$ , 1,25 $\mu\text{M}$ , 0,625 $\mu\text{M}$ , 0,312 $\mu\text{M}$ . Foi feita uma equação da reta para o cálculo das concentrações do teste (GREEN *et al.*, 1981).

**- Procedimento Experimental**

Foram preparados homogenatos da área cerebral a 10% (p/v) em solução de cloreto de potássio (KCl) 1,15 %. Após a centrifugação (800xg, 10 min), os sobrenadantes foram coletados e a produção de NO determinada através da reação de Griess. Uma alíquota de 100  $\mu\text{l}$  do sobrenadante foi incubada com 100  $\mu\text{l}$  do reagente de Griess [sulfanilamida 1 % em  $\text{H}_3\text{PO}_4$  1 %/*N*-(-1-naphthyl)-ethylenediamine 0,1 %/  $\text{H}_3\text{PO}_4$  1 % /diluído em água

(1:1:1:1)] a temperatura ambiente por 10 minutos. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 550nm. A concentração de nitrito ( $\mu\text{M}$ ) foi determinada a partir de uma curva padrão de  $\text{NaNO}_2$ .

#### **- Solução reagente**

A seguinte solução reagente foi empregada nessa técnica:

##### **- Solução de $\text{NaNO}_2$ (10mM)**

$\text{NaNO}_2$  (Sigma, St. Louis, MO, EUA) 7mg em 10mL de água bidestilada.

Em seguida, foi procedida a filtração e degaseificação, e posteriormente adição de 20 mL de acetonitrila (Carlo Erba Reagenti, MI, Itália) e 10 mL de tetrahydrofurano (Sigma, St. Louis, MO, EUA) para um volume final de 500 mL.

#### **4.10.3.3. Determinação da atividade enzimática da catalase (CAT)**

##### **- Método**

A atividade da catalase tem como princípio a medida da velocidade de produção de  $\text{O}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  à proporção que a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , utilizado como substrato é hidrolisado, de acordo com Maehly e Chance (1954) e Chance e Maehly (1955).

A atividade da enzima é medida em 230 nm, através de um espectrofotômetro Beckman DU, acoplado a um sistema de modernização da Gilford, USA, o que permitiu leituras automáticas em sistema digital e forneceu maior sensibilidade. A atividade enzimática é medida através da leitura da variação da absorbância por minuto, durante 6 minutos e os resultados expressos em  $\mu\text{M}/\text{min}/\mu\text{g}$  de proteína.

### **- Procedimento Experimental**

Foi preparado o meio da reação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (18 mL) mais tampão Tris HCl 1M, EDTA 5 mM pH 8,0 (1,0 mL) e H<sub>2</sub>O Milli Q (0,8 mL). Em seguida foi colocado na cubeta de quartzo 980 µL do meio de reação mais 20 µL do homogenato a 10%. E feita à leitura durante 6 min a temperatura de 37°C em espectrofotômetro a 230nm. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry *et al* (1951).

### **- Soluções reagentes**

As seguintes soluções reagentes foram empregadas nessa técnica:

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

12,11 g de Trisma Base (1 M) e 0,19 g de EDTA (5 mM) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e diluídos em 100 mL de água Mill-Q. O pH foi acertado com HCl 1 M.

#### **- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para meio de reação**

10 µL de peridol 30% (Sigma, St. Louis, MO, EUA) diluídos em 10 mL de água Mill-Q (qsp).

#### **4.10.3.4. Determinação da concentração da glutathiona reduzida (GSH)**

### **- Método**

A determinação da concentração da GSH baseia-se na reação do reagente de Ellman, o 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) com o tiol livre originando um dissulfeto misto mais ácido 2-nitro-5-tiobenzóico. A medida do produto de reação formado é feita por leitura da absorbância a 412 nm, conforme descrito anteriormente por Sedlak e Lindsay (1988).

### **- Procedimento Experimental**

Preparou-se o homogenato a 10% das áreas cerebrais a serem estudadas, em EDTA 0,02 M, em seguida foi retirado 400  $\mu$ L desse homogenato e adicionado 320  $\mu$ L de água destilada e mais 80  $\mu$ L de ácido tricloroacético a 50%.

O material foi agitado e centrifugado a 3000 rpm por 15 min. Em seguida foi recolhido 400  $\mu$ L do sobrenadante e acrescido 800  $\mu$ L de tampão Tris-HCl 0,4 M, pH 8,9 e mais 20  $\mu$ L de DTNB 0,01 M e após 1 minuto da reação foi feita a leitura da coloração em 412 nm, através de um espectrofotômetro Beckman DU, acoplado a um sistema de modernização da Gilford, USA, o que permitiu leitura automáticas em sistema digital e forneceu maior sensibilidade. A concentração da glutatona reduzida foi expressa em nanograma de GSH por grama de tecido.

### **- Curva-padrão de Glutaciona (GSH)**

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

### **- Soluções reagentes**

Foram utilizadas as seguintes soluções reagentes:

#### **- Solução de ácido etilenodiaminotetracético**

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

**- Tampão Tris-HCl**

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

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

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

**- Solução de ácido tricloroacético**

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

**- Solução de Glutathiona**

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

**4.10.3.5. Dosagem de proteína****- Método**

A quantidade de proteína em homogenatos de cérebro foi determinada a 25°C utilizando albumina sérica bovina com padrão, de acordo com o método previamente descrito (LOWRY *et al.*, 1951), que emprega duas reações de formação de cor para analisar a concentração protéica fotometricamente. Inicialmente é feita uma reação de biureto de baixa eficiência na qual os íons de cobre alcalino produzem uma cor azulada na presença de ligações peptídicas. Esta cor biureto é característica de todas as proteínas e fornece uma cor básica de fundo para a próxima etapa de ensaio.

Depois o método emprega uma mistura complexa de sais inorgânicos, o reagente Folin-Ciocalteu, que produz uma cor verde azulada intensa na presença de tirosina ou triptofano livres ou ligados às proteínas. Como as quantidades desses dois aminoácidos são geralmente constantes nas proteínas solúveis, com poucas exceções, a cor das reações (verde-azulada) é indicativa da presença de proteína e a intensidade da cor proporcional à

concentração. Esta coloração é medida em 750 nm, através de um espectrofotômetro Beckman DU, acoplado a um sistema de modernização da Gilford, USA.

#### **- Soluções reagentes**

As seguintes soluções reagentes foram empregadas nessa técnica:

##### **- Reagente A**

$\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) a 2% em NaOH (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) 0,1 N.

##### **- Reagente B**

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

##### **- Reagente C**

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

##### **- Reagente de Folin**

Ciocalteau - Fenol (Labordin, Piraquara, PR, Brasil) 1:1 em água bidestilada.

##### **- Solução de albumina sérica bovina (Sigma, St Louis, MO, USA)**

1 mg/mL em água bidestilada.



#### 4.11. Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada através do software GraphPad Prism versão 4.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego California EUA. Copyright (c) 1994-1999 por GraphPad Software.

Os resultados que obedeciam a uma distribuição paramétrica foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) seguido pelo teste de Student Newman Keuls (*post hoc*). Os dados não-paramétricos foram analisados pelo mesmo programa utilizando o teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunns (*post hoc*). Para os resultados que apresentaram mais de uma variável analisada ao mesmo tempo (temperatura e tempo) foram utilizados Two-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni (*post hoc*).

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

***RESULTADOS***

---

---

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Estudos Comportamentais.

#### 5.1.1. Curva dose-resposta.

A curva de dose-resposta foi realizada no modelo do nado forçado, utilizado como teste de escolha para investigação dos mecanismos de ação antidepressiva da riparina III. O parâmetro avaliado foi o tempo de imobilidade do animal durante 5 minutos. De acordo com a **tabela 1** e **figura 14**, as doses 12,5, 25, 50 e 100 mg/kg diminuíram o tempo de imobilidade (ripIII-12,5:  $81,71 \pm 4,79$  (7)  $p < 0,05$ ; ripIII-25:  $55,07 \pm 11,11$  (15)  $p < 0,001$ ; ripIII-50:  $47,54 \pm 5,33$  (13)  $p < 0,001$  e ripIII-100:  $44,70 \pm 4,66$  (10)  $p < 0,001$ ) comparando com o controle ( $118,9 \pm 5,34$  (14)) enquanto as doses de 5 e 10 mg/kg (ripIII-5:  $109,3 \pm 10,13$  (9)  $p > 0,05$ ; ripIII-10:  $105,6 \pm 11,28$  (8)  $p > 0,05$ ) não modificaram o tempo de imobilidade do animal.

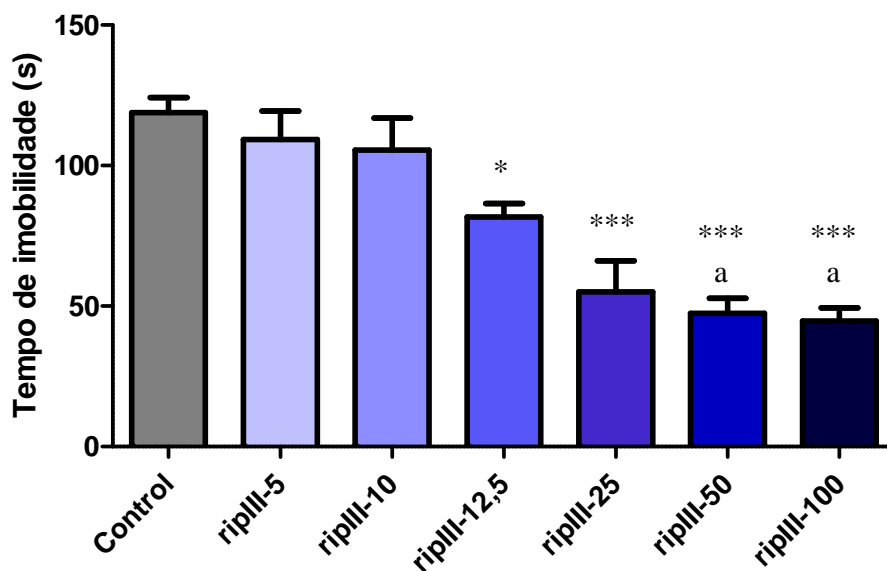
Entre as doses analisadas, houve uma diferença dose-dependente no tempo de imobilidade quando comparado 12,5 e 50 mg/kg ( $p < 0,05$ ) e 12,5 e 100 mg/kg ( $p < 0,05$ ). A dose selecionada para investigação do mecanismo de ação da riparina III foi a de 50 mg/kg por ser a menor dose que apresentou o melhor efeito levando em consideração o erro padrão da média e o efeito dose-dependente com relação a dose de 12,5 mg/kg.

**Tabela 1 - Curva de dose-resposta da riparina III no teste do nado forçado em camundongos.**

<b>Dose (mg/kg)</b>	<b>Tempo de Imobilidade (s)</b>
Veículo	118,9 ± 5,34 (14)
RipIII-5	109,3 ± 10,13 (9)
RipIII-10	105,6 ± 11,28 (8)
RipIII-12,5	81,71 ± 4,79 (7)*
RipIII-25	55,07 ± 11,11 (15)***
RipIII-50	47,54 ± 5,33 (13)*** <sup>a</sup>
RipIII-100	44,70 ± 4,66 (10)*** <sup>a</sup>

Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média (EPM) com o número de animais entre parênteses. Foi utilizado One-way ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como test *post hoc*. \*p<0,05 vs controle; \*\*\*p<0,001 vs controle; <sup>a</sup>p<0,05 vs ripIII-12,5.

Figura 14 - Efeito da riparina III, via oral, sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos

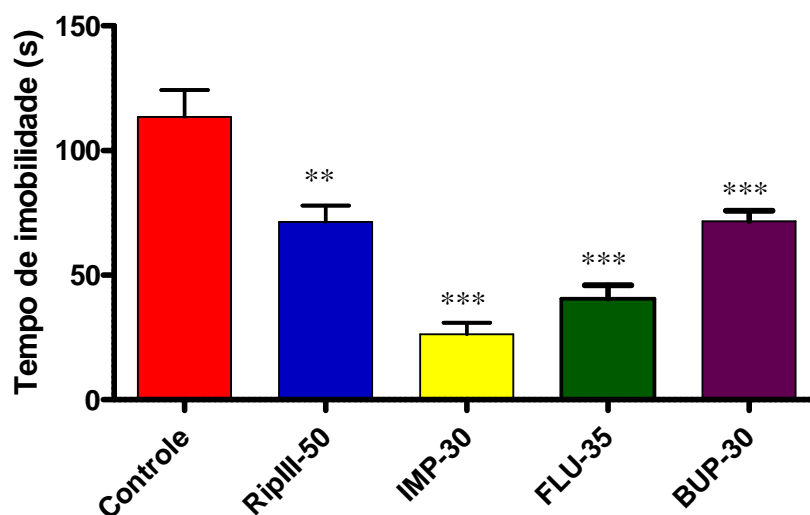


Controle (veículo) e ripIII (5, 10, 12,5, 25, 50 e 100 mg/kg), mg/kg) foram administrados 60 min antes do experimento. Os valores apresentam a média  $\pm$  EPM do tempo de imobilidade durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: \* $p < 0,05$  vs controle, \*\*\* $p < 0,001$  vs controle; <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs ripIII 12,5 mg/kg.

### 5.1.2. Teste da Suspensão da Cauda.

Os animais tratados por via oral com riparina III na dose de 50 mg/kg apresentaram diminuição do tempo de imobilidade (ripIII-50:  $71,29 \pm 6,68$  (7)  $p < 0,01$ ), do mesmo modo que os animais tratados com imipramina (IMP-30:  $26,20 \pm 4,55$  (10)  $p < 0,001$ ), fluoxetina (FLU-35:  $40,50 \pm 5,42$  (8)  $p < 0,001$ ) e bupropiona (BUP-30:  $71,50 \pm 4,30$  (8)  $p < 0,001$ ) quando comparados ao grupo controle ( $113,4 \pm 10,90$  (8)) (**Figura 15**).

**Figura 15 - Efeito da riparina III, imipramina, fluoxetina e bupropiona, via oral, sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos**



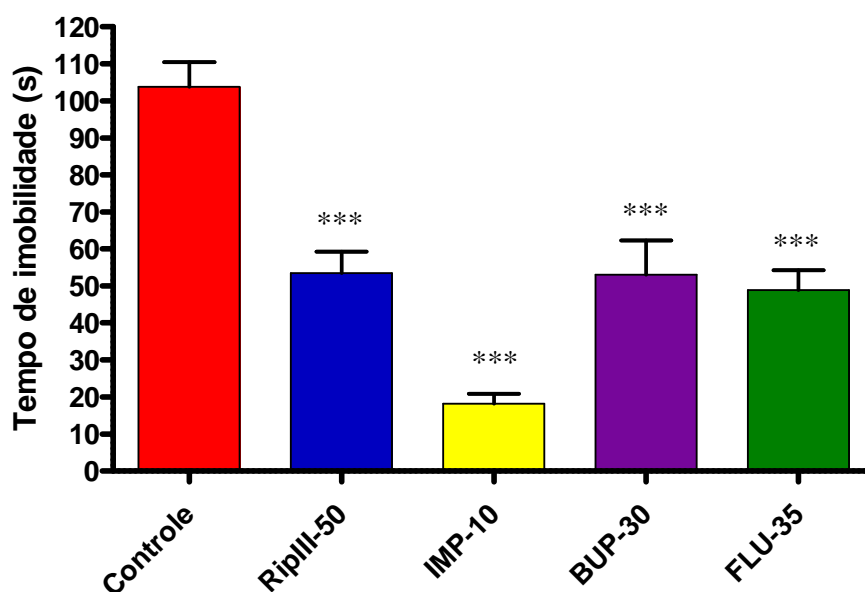
Controle (veículo), ripIII (50 mg/kg), IMP (30 mg/kg), FLU (35 mg/kg) e BUP (30 mg/kg) foram administrados 60 min antes do experimento. Os valores apresentam a média  $\pm$  EPM do tempo de imobilidade durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: \*\* $p < 0,01$  vs controle; \*\*\* $p < 0,001$  vs controle.

### 5.1.3. Teste do Nado Forçado.

Os animais tratados com riparina III, por via oral, apresentaram uma diminuição do tempo de imobilidade em 48,49% na dose de 50 mg/kg ( $53,47 \pm 5,79$  (15)  $p < 0,001$ ) assim como também houve uma diminuição do tempo de imobilidade em 52,89% da fluoxetina ( $48,91 \pm 5,38$  (11)  $p < 0,001$ ), em 48,95% da bupropiona ( $53,00 \pm 9,25$  (8)  $p < 0,001$ ) e em 82,54% da imipramina ( $18,13 \pm 2,74$  (8)  $p < 0,001$ ) quando comparado com o controle ( $103,8 \pm 6,66$  (20)) (**Figura 16**).



Figura 16 - Efeito da riparina III, imipramina, bupropiona e fluoxetina, via oral, sobre o tempo de imobilidade, em segundos, no teste do nado forçado em camundongos.



Controle (veículo), riparina III (50 mg/kg), imipramina (IMI; 10 mg/kg), bupropiona (BUP; 30 mg/kg) e fluoxetina (35 mg/kg) foram administrados 60 min antes do experimento. Os valores representam a média  $\pm$  EPM do tempo de imobilidade (s) 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.

### 5.1.3.1 Envolvimento do sistema dopaminérgico.

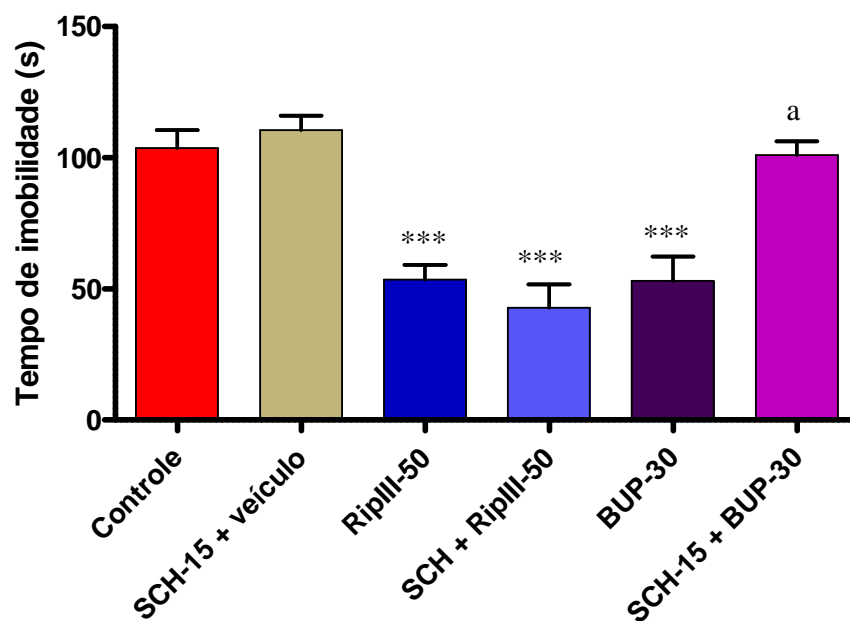
Os grupos pré-tratados com SCH23390 (**figura 17**) ou sulpirida (**figura 18**) e tratados com veículo não diminuíram o tempo de imobilidade (HAL-0,1 + veículo:  $103,26 \pm 6,26$  (10), SCH-15 + veículo:  $104,0 \pm 5,57$  (12); SUL-50 + veículo:  $127,80 \pm 9,42$  (12)) em relação ao controle ( $106,3 \pm 6,51$ (19)).

O grupo pré-tratado com SCH23390 e tratado com ripIII-50 apresentou uma diminuição do tempo de imobilidade (SCH-15 + ripIII-50:  $42,80 \pm 8,91$  (10)  $p < 0,001$ ) em relação ao controle, portanto, não reverteu o efeito antidepressivo da riparina III.

O grupo pré-tratado com sulpirida e tratado com ripIII-50 reverteu o efeito antidepressivo da riparina III (SUL-50 + ripIII-50:  $130,2 \pm 13,09$  (10)  $p < 0,05$ ), pois apresentou diferença significativa em relação ao grupo ripIII-50 ( $56,25 \pm 6,09$  (16)).

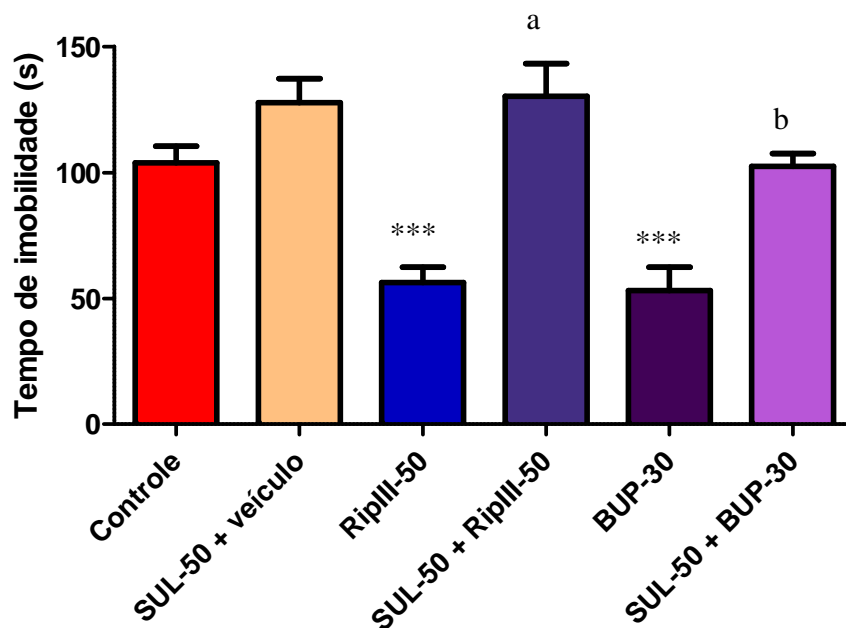
O SCH23390 e sulpirida reverteram o efeito antidepressivo da bupropiona (SCH-15 + BUP-30:  $101,00 \pm 5,22$  (8)  $p < 0,01$ ; SUL-50 + BUP-30:  $102,4 \pm 5,13$  (8)  $p < 0,01$ ) quando comparados com o grupo BUP-30 ( $53,00 \pm 9,25$  (8)).

Figura 17 - Efeito da riparina III (50 mg/kg) e bupropiona (30 mg/kg), via oral, sozinhos ou associados com SCH23390 (15  $\mu$ g/kg), antagonista dos receptores dopaminérgicos D1, sobre o tempo de imobilidade (s) no teste do nado forçado em camundongos.



Controle (veículo), riparina III (RipIII; 50 mg/kg) e bupropiona (BUP; 30 mg/kg), quando sozinhos, foram administrados 60 min antes do experimento; quando associados, foram administrados 30 min após a administração de SCH23390 (SCH; 15  $\mu$ g/kg) e, então, 60 min depois, foram submetidos ao experimento. Os valores representam a média  $\pm$  EPM do tempo de imobilidade (s) 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; <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs BUP-30.

Figura 18 - Efeito da riparina III (50 mg/kg) e bupropiona (30 mg/kg), via oral, sozinhos ou associados com sulpirida (50 mg/kg), antagonista dos receptores dopaminérgicos D2, sobre o tempo de imobilidade (s) no teste do nado forçado em camundongos.



Controle (veículo), riparina III (RipIII; 50 mg/kg) e bupropiona (BUP; 30 mg/kg), quando sozinhos, foram administrados 60 min antes do experimento; quando associados, foram administrados 30 min após a administração de sulpirida (SUL; 50 mg/kg) e, então, 60 min depois, foram submetidos ao experimento. Os valores representam a média  $\pm$  EPM do tempo de imobilidade (s) 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; <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs ripIII-50; <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs BUP-30.

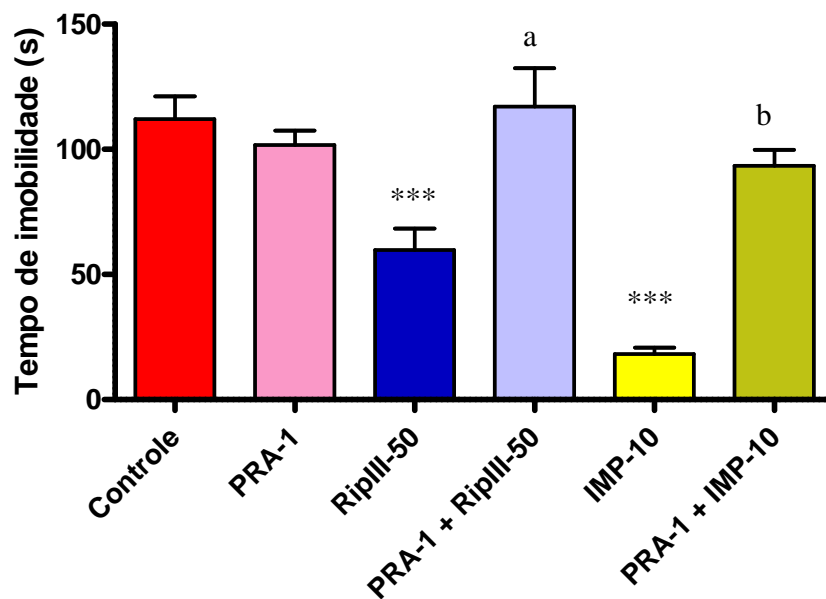
### 5.1.3.2. Envolvimento do sistema noradrenérgico.

Os grupos pré-tratados com prazosina (**figura 19**) ou ioimbina (**figura 20**) e tratados com veículo não diminuíram o tempo de imobilidade (PRA-1 + veículo:  $101,7 \pm 5,81(9)$ ; IOIM-1 + veículo:  $102,7 \pm 10,82(10)$ ) em relação ao controle ( $112,1 \pm 9,09(10)$ ).

A **figura 19** mostra que o pré-tratamento com prazosina, antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico, e tratamento com ripIII-50 reverteu o efeito antidepressivo da riparina III (PRA-1 + ripIII-50:  $117,00 \pm 15,39(9)$   $p < 0,001$ ), pois apresentou diferença significativa em relação a ripIII-50 ( $59,83 \pm 8,53(12)$ ). De modo semelhante, quando os animais foram pré-tratados com ioimbina, antagonista  $\alpha_2$ -adrenérgico, e tratados com ripIII-50, não houve diminuição do tempo de imobilidade (IOIM-1 + ripIII-50:  $114,7 \pm 14,49(14)$   $p < 0,001$ ) mostrando a reversão do efeito antidepressivo da riparina III ( $59,83 \pm 8,53(12)$ ) (**figura 20**).

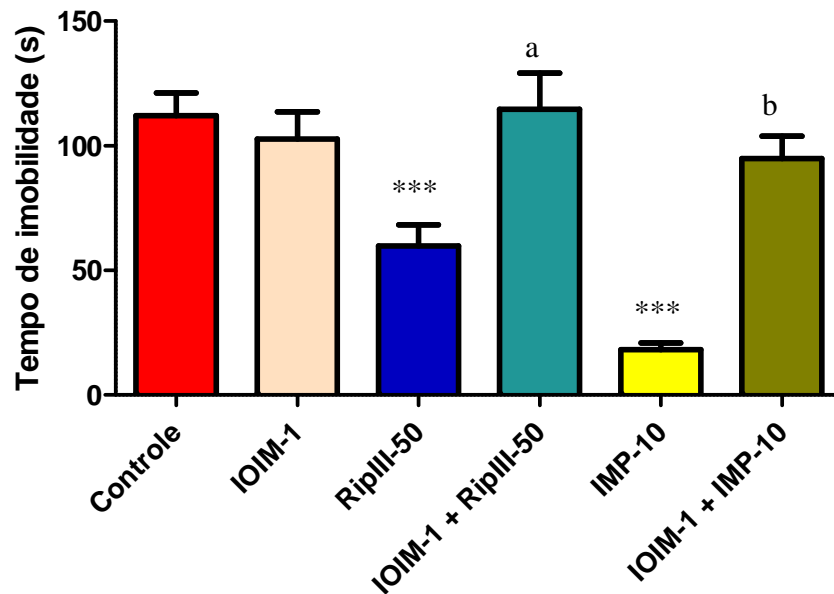
A prazosina (**figura 19**) e ioimbina (**figura 20**) reverteram o efeito antidepressivo da imipramina (PRA-1 + IMP-10:  $93,38 \pm 6,47(8)$   $p < 0,001$ ; IOIM-1 + IMP-10:  $94,75 \pm 9,06(8)$   $p < 0,001$ ) quando comparados com o grupo IMP-10 ( $18,13 \pm 2,74(8)$ ).

Figura 19 - Efeito da riparina III (50 mg/kg) e imipramina (10 mg/kg), via oral, sozinhos ou associados com prazosina (1 mg/kg), antagonista dos receptores adrenérgicos  $\alpha_1$ , sobre o tempo de imobilidade (s) no teste do nado forçado em camundongos.



Controle (veículo), riparina III (RipIII; 50 mg/kg) e imipramina (IMP; 10 mg/kg), quando sozinhos, foram administrados 60 min antes do experimento; quando associados, foram administrados 30 min após a administração de prazosina (PRA; 1 mg/kg) e, então, 60 min depois, foram submetidos ao experimento. Os valores representam a média  $\pm$  EPM do tempo de imobilidade (s) 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; <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs ripIII-50; <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs IMP-10.

**Figura 20 - Efeito da riparina III (50 mg/kg) e imipramina (10 mg/kg), via oral, sozinhos ou associados com ioimbina (1 mg/kg), antagonista dos receptores adrenérgicos  $\alpha_2$ , sobre o tempo de imobilidade (s) no teste do nado forçado em camundongos.**



Controle (veículo), riparina III (RipIII; 50 mg/kg) e imipramina (IMP; 10 mg/kg), quando sozinhos, foram administrados 60 min antes do experimento; quando associados, foram administrados 30 min após a administração de ioimbina (IOIM; 1 mg/kg) e, então, 60 min depois, foram submetidos ao experimento. Os valores representam a média  $\pm$  EPM do tempo de imobilidade (s) 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; <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs ripIII-50; <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs IMP-10.

### 5.1.3.3. Envolvimento do sistema serotoninérgico.

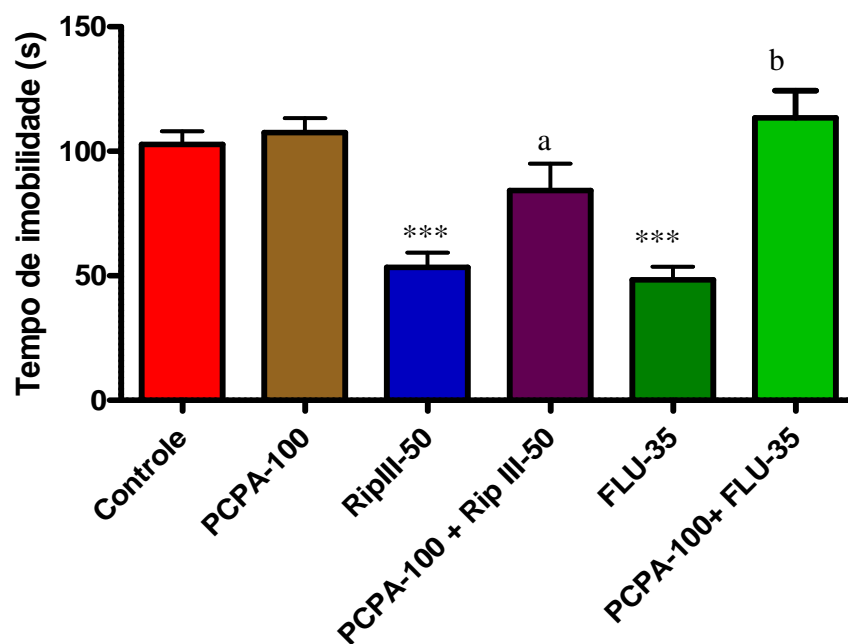
Os animais pré-tratados por quatro dias com PCPA (inibidor da síntese de serotonina) e tratados com veículo não diminuíram o tempo de imobilidade (PCPA + veículo:  $107,6 \pm 5,72(7)$ ) em relação ao controle ( $102,9 \pm 5,18(20)$ ). Os animais que foram pré-tratados com PCPA e tratados com ripIII-50 (PCPA+ ripIII-50:  $84,13 \pm 10,99(8)$   $p < 0,01$ ) apresentaram uma reversão no efeito antidepressivo da ripIII-50 ( $53,47 \pm 5,79(15)$ ) (**figura 21**).

A **figura 22** mostra que o pré-tratamento com NAN-190, antagonista 5-HT<sub>1A</sub>, e tratamento com ripIII-50 reverteu o efeito antidepressivo da riparina III (NAN-190 + ripIII-50:  $137, \pm 13,07(9)$   $p < 0,001$ ), pois apresentou diferença significativa em relação a ripIII-50 ( $51,50 \pm 7,01(10)$ ). De modo semelhante, quando os animais foram pré-tratados com ondansentron, antagonista 5HT<sub>3</sub>, e tratados com ripIII-50 (OND-0,1 + ripIII-50:  $112,7 \pm 12,51(9)$   $p < 0,001$ ) houve reversão do efeito antidepressivo da ripIII-50 ( $45,63 \pm 5,13(16)$ ) (**figura 24**). Por outro lado, o grupo pré-tratado com ritanserina, antagonista 5-HT<sub>2A/2C</sub>, e tratado com ripIII-50 (RIT-4 + ripIII-50:  $41,33 \pm 7,74(6)$   $p > 0,05$ ) não reverteu o efeito antidepressivo da ripIII-50 ( $45,63 \pm 5,13(16)$ ) (**figura 23**).

O PCPA (**figura 21**), NAN-190 (**figura 22**), ritanserina (**figura 23**) e ondansentron (**figura 24**) revertem o efeito antidepressivo da fluoxetina (PCPA + FLU-35:  $113,4 \pm 10,93(8)$   $p < 0,001$ ; NAN-190 + FLU-35:  $133,0 \pm 14,93(10)$   $p < 0,001$ ; RIT-4 + FLU-35:  $77,70 \pm 5,58(10)$   $p < 0,01$ ; OND-0,1 + FLU-35:  $78,00 \pm 14,11$   $p < 0,05$ ) quando comparados com o grupo FLU-35 ( $40,33 \pm 3,68(12)$ ).

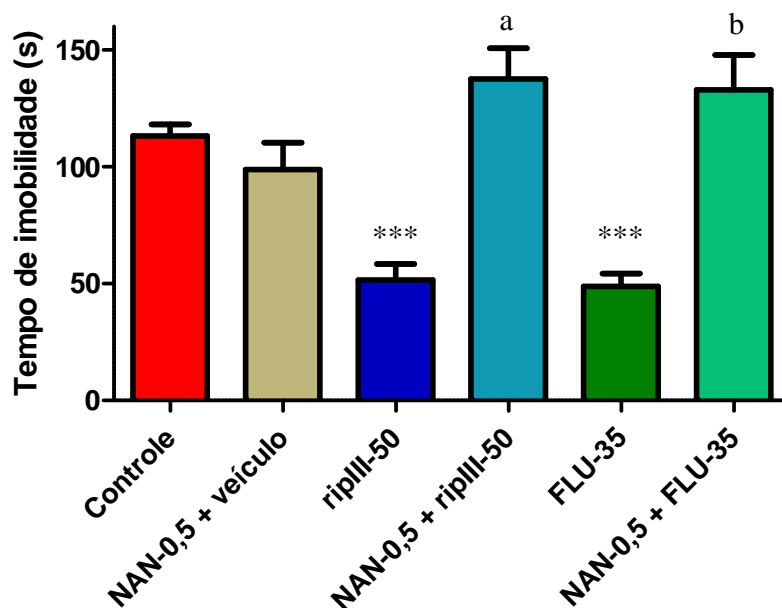


**Figura 21 - Efeito da riparina III (50 mg/kg) e fluoxetina (35 mg/kg), via oral, sozinhos ou associados com PCPA (100 mg/kg), inibidor da síntese de serotonina, sobre o tempo de imobilidade (s) no teste do nado forçado em camundongos.**



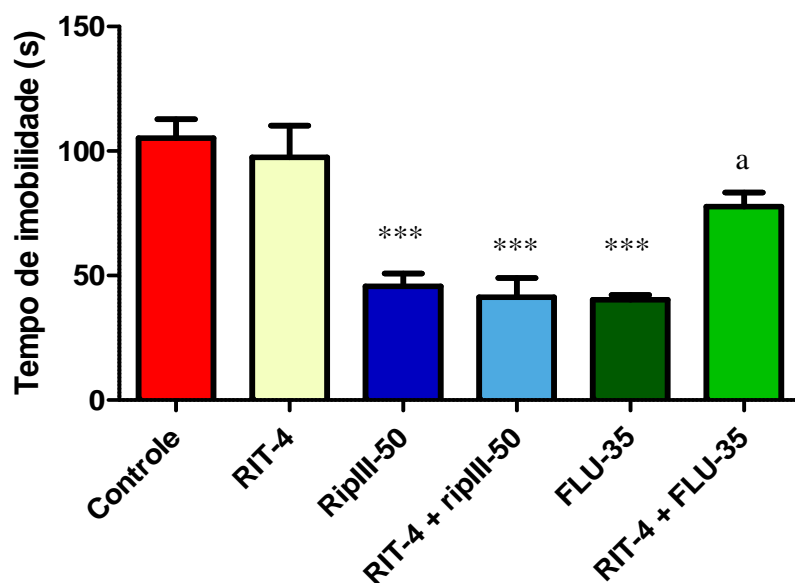
Controle (veículo), riparina III (RipIII; 50 mg/kg) e fluoxetina (FLU; 35 mg/kg), quando sozinhos, foram administrados 60 min antes do experimento; quando associados, foram administrados 30 min após a última administração de PCPA (administrado por 4 dias) (PCPA; 100 mg/kg) e, então, 60 min depois, foram submetidos ao experimento. Os valores representam a média  $\pm$  EPM do tempo de imobilidade (s) 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; <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs ripIII-50; <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs FLU-35.

Figura 22 - Efeito da riparina III (50 mg/kg) e fluoxetina (35 mg/kg), via oral, sozinhos ou associados com NAN-190 (0,5 mg/kg), antagonista dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub>, sobre o tempo de imobilidade (s) no teste do nado forçado em camundongos.



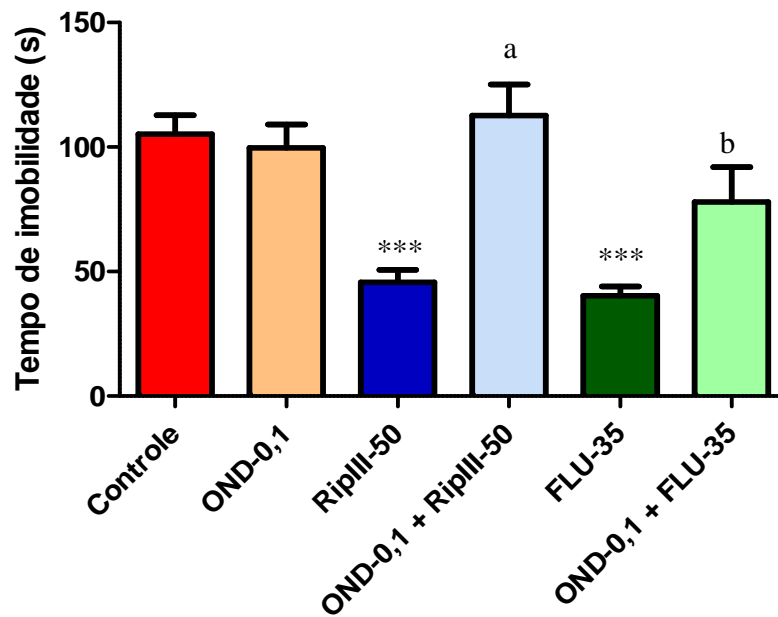
Controle (veículo), riparina III (RipIII; 50 mg/kg) e fluoxetina (FLU; 35 mg/kg), quando sozinhos, foram administrados 60 min antes do experimento; quando associados, foram administrados 30 min após a administração de NAN-190 (NAN; 0,5 mg/kg) e, então, 60 min depois, foram submetidos ao experimento. Os valores representam a média ± EPM do tempo de imobilidade (s) 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; <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs ripIII-50; <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs FLU-35.

**Figura 23 - Efeito da riparina III (50 mg/kg) e fluoxetina (35 mg/kg), via oral, sozinhos ou associados com ritanserina (4 mg/kg), antagonista dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2A/2C</sub>, sobre o tempo de imobilidade (s) no teste do nado forçado em camundongos.**



Controle (veículo), riparina III (RipIII; 50 mg/kg) e fluoxetina (FLU; 35 mg/kg), quando sozinhos, foram administrados 60 min antes do experimento; quando associados, foram administrados 30 min após a administração de ritanserina (RIT; 4 mg/kg) e, então, 60 min depois, foram submetidos ao experimento. Os valores representam a média  $\pm$  EPM do tempo de imobilidade (s) 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; <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs FLU-35.

**Figura 24 - Efeito da riparina III (50 mg/kg) e fluoxetina (35 mg/kg), via oral, sozinhos ou associados com ondansetron (0,1 mg/kg), antagonista dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>3</sub>, sobre o tempo de imobilidade (s) no teste do nado forçado em camundongos.**



Controle (veículo), riparina III (RipIII; 50 mg/kg) e fluoxetina (FLU; 35 mg/kg), quando sozinhos, foram administrados 60 min antes do experimento; quando associados, foram administrados 30 min após a administração de ondansetron (OND; 0,1 mg/kg) e, então, 60 min depois, foram submetidos ao experimento. Os valores representam a média ± EPM do tempo de imobilidade (s) 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; <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs ripIII-50; <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs FLU-35.

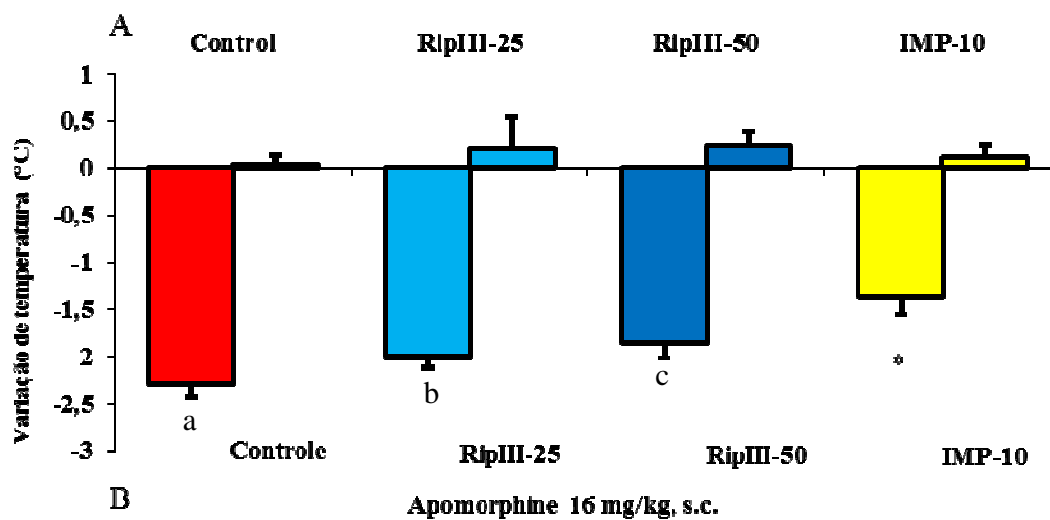
#### 5.1.4. Teste da hipotermia induzida por apomorfina

Os animais que receberam riparina III nas doses 25 e 50 mg/kg e em seguida veículo não tiveram alterações significativas na temperatura corporal (ripIII-25:  $0,2 \pm 0,34$  (16)  $p > 0,05$ ; ripIII-50:  $0,23 \pm 0,16$  (16)  $p > 0,05$ ) comparado com os animais que receberam somente veículo ( $0,03 \pm 0,11$  (16)).

Os animais pré-tratados com riparina III ou veículo e que receberam apomorfina tiveram redução da temperatura corporal comparados com seus respectivos grupos sem a apomorfina, veículo + APO:  $-2,29 \pm 0,14$  (16)  $p < 0,05$  comparando com veículo ( $0,03 \pm 0,11$  (16)), ripIII-25 + APO:  $-2,01 \pm 0,11$  (16)  $p < 0,05$ ) comparando com ripIII-25:  $0,2 \pm 0,34$  (16), ripIII-50 + APO:  $-1,86 \pm 0,16$  (16)  $p < 0,05$ ) comparando com ripIII-50:  $0,23 \pm 0,16$  (16) (**Figura 25**).

Os animais pré-tratados com imipramina e que receberam apomorfina apresentaram menor redução na temperatura corporal (IMP-10 + APO:  $-1,37 \pm 0,19$  (16)  $p < 0,05$ ) quando comparados com veículo + APO:  $-2,29 \pm 0,14$  (16).

Figura 25 - Efeito da riparina III e imipramina, via oral, sobre a variação de temperatura corporal no teste da hipotermia induzida por apomorfina em camundongos.

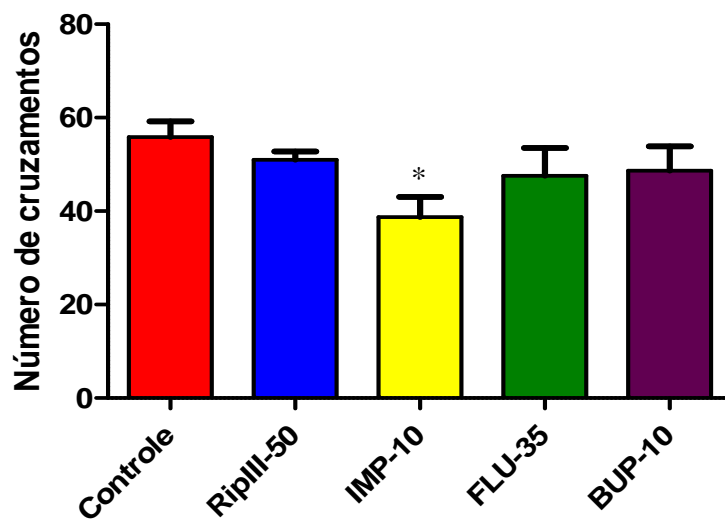


Os valores apresentam a média  $\pm$  EPM da variação de temperatura 30 minutos após a administração de apomorfina ou veículo. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: \* $p < 0,05$  vs controle + APO; <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs controle; <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs ripIII-25; <sup>c</sup> $p < 0,05$  vs ripIII-50.

### 5.1.5. Teste do Campo Aberto

A atividade locomotora espontânea (ALE) foi o parâmetro analisado e expresso como o número de cruzamentos. A riparina III não alterou a atividade locomotora (**Figura 26**) na dose testada (ripIII-50:  $51,0 \pm 1,75$  (19)) do mesmo modo que a fluoxetina (FLU-35:  $47,60 \pm 5,99$  (10) e a bupropiona (BUP-30:  $48,70 \pm 5,19$  (10)) quando comparado com o grupo controle ( $55,38 \pm 3,37$  (17)]. No entanto, a imipramina reduziu a atividade locomotora (IMP-10:  $38,80 \pm 4,25$ (10)  $p < 0,05$ ) comparando com o controle.

Figura 26 - Efeito da riparina III, imipramina, fluoxetina e bupropiona, via oral, sobre a atividade locomotora espontânea no teste do campo aberto em camundongos.



Controle (veículo), ripIII (50 mg/kg), IMP (10 mg/kg), FLU (35 mg/kg) e BUP (30 mg/kg) foram administrados 60 min antes do experimento. Os valores apresentam a média  $\pm$  EPM do número de cruzamentos durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: \* $p < 0,05$  vs controle.



## 5.2. Testes Neuroquímicos:

### 5.2.1. Determinação dos níveis de monoaminas em HPLC eletroquímico.

#### 5.2.1.1. Determinação dos níveis de dopamina (DA) e seus metabólitos (DOPAC e HVA), serotonina (5-HT) e seu metabólito (5-HIAA) e noradrenalina (NA) em corpo estriado de camundongos após o teste do nado forçado.

A **Figura 27** mostra os efeitos da ripIII após o teste do nado forçado sobre os níveis de DA, DOPAC e HVA em corpo estriado de camundongos. Os animais controle submetidos ao nado forçado não tiveram alteração nos níveis de DA e DOPAC ( $p > 0,05$ ), mas aumentaram os níveis de HVA ( $p < 0,05$ ) quando comparados aos animais normais. Nos animais tratados com ripIII-50 ocorreu um aumento de 68,24% nos níveis de DA comparando com o grupo controle ( $p < 0,01$ ) e este aumento foi dose-dependente pois aumentou em 29% em relação a ripIII-25. Uma redução de 72% nos níveis de DOPAC ocorreu tanto nos animais tratados com ripIII-25 ( $p < 0,001$ ) quanto com ripIII-50 ( $p < 0,001$ ). De modo semelhante, os níveis de HVA também diminuíram com a ripIII-25 (80%;  $p < 0,001$ ) e com ripIII-50 (76%;  $p < 0,001$ ) como mostra a **tabela 2**.

Os níveis de 5-HT aumentaram 163% com a ripIII-25 ( $p < 0,001$ ) e 216% com a ripIII-50 ( $p < 0,001$ ) comparando ao grupo controle. Este aumento foi dose-dependente, uma vez que os níveis de 5-HT dos animais tratados com ripIII-50 aumentou em 19% comparando com a ripIII-25 ( $p < 0,05$ ). Uma redução de 83% e de 85% foi encontrada nos níveis de 5-HIAA quando os animais foram tratados com ripIII-25 ( $p < 0,001$ ) e ripIII-50 ( $p < 0,001$ ), respectivamente e, um aumento de 77 % ocorreu nos níveis de NA apenas com a ripIII-25 ( $p < 0,05$ ) (**Figura 28; tabela 3**).

A **Figura 29** apresenta o efeito da ripIII (25 e 50 mg/kg, v.o.), administrada de forma aguda, 2 horas após o tratamento sobre as taxas de metabolização DOPAC/DA, HVA/DA e 5-HIAA/5-HT em corpo estriado. Houve uma redução significativa de 80 e 83% nas taxas de DOPAC/DA com as doses de 25 ( $p < 0,01$ ) e 50 ( $p < 0,01$ ) respectivamente

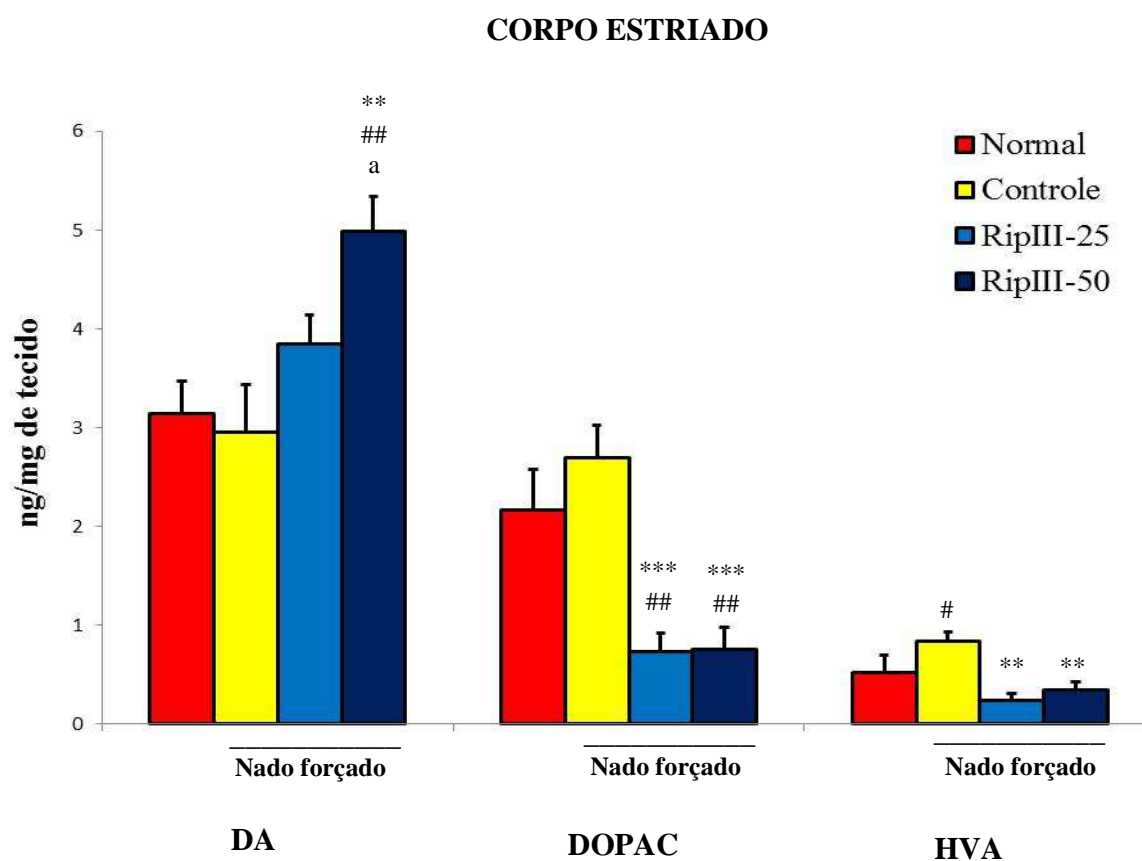
quando comparado ao controle. Foi observado também, nas doses estudadas, 25 e 50, uma redução significativa de 80% ( $p<0,01$ ) e 78% ( $p<0,001$ ) nas taxas de HVA/DA, respectivamente. Do mesmo modo, houve uma redução significativa de 91% ( $p<0,01$ ) e 94% ( $p<0,01$ ) nas taxas de 5-HIAA/5-HT para as doses de 25 e 50, respectivamente, quando comparado ao controle (**Tabela 4**).

**Tabela 2 - Níveis de DA, DOPAC e HVA em corpo estriado de camundongos normais e em tratados com ripIII ou veículo e submetidos ao teste do nado forçado.**

Grupo	DA	DOPAC	HVA
Normal	3,14 ± 0,33 (8)	2,17 ± 0,40 (7)	0,51 ± 0,18 (8)
Controle	2,96 ± 0,47 (9)	2,69 ± 0,33 (7)	0,84 ± 0,096 (10)#
RipIII-25	3,84 ± 0,29 (8)**#	0,73 ± 0,18 (10)***##	0,24 ± 0,07 (10)**
RipIII-50	4,98 ± 0,35 (10)**# <sup>a</sup>	0,75 ± 0,23 (10)***##	0,35 ± 0,07 (10)**

Médias (ng/mg de tecido) ± EPM; (n) número de animais entre parênteses; ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 vs controle; #p<0,05 vs Normal; <sup>a</sup>p<0,05 vs RipIII-25

**Figura 27 - Determinação dos níveis de DA, DOPAC e HVA em corpo estriado de camundongos normais e em tratados com riparina III ou veículo e submetidos ao teste do nado forçado.**



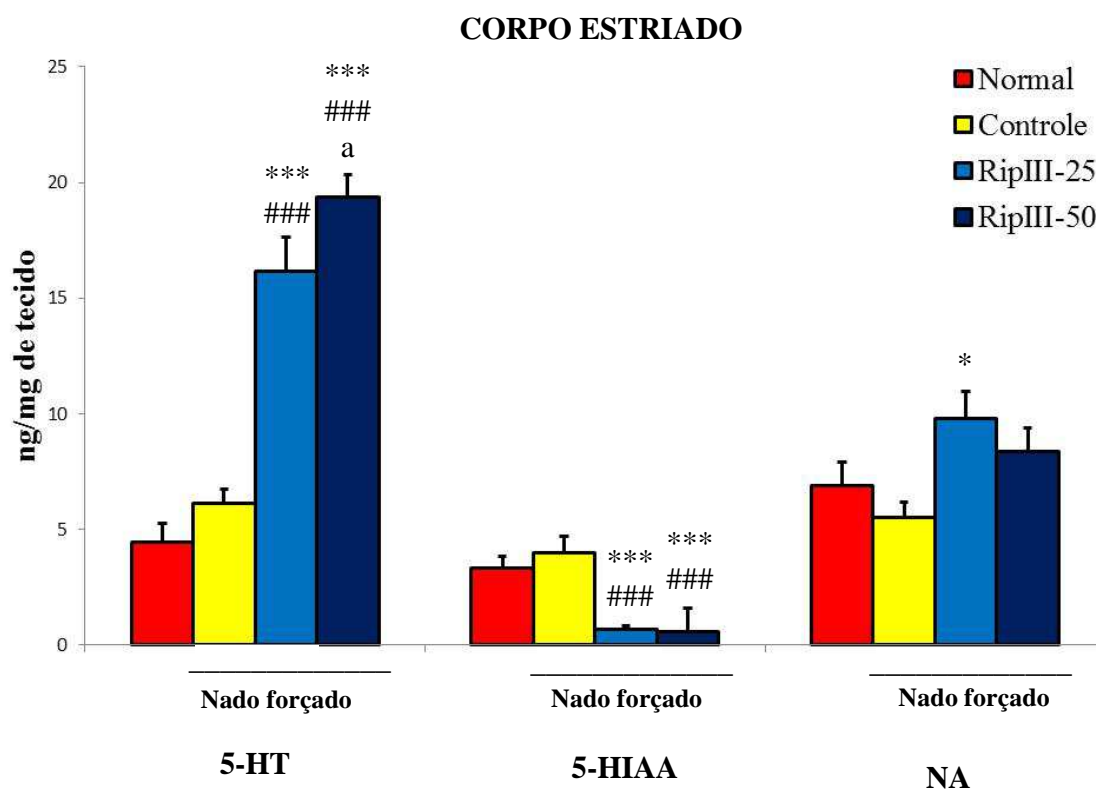
Os camundongos normais receberam veículo (2% Tween 80 em água destilada) e 2 horas depois foram sacrificados e dissecados. Os animais tratados com riparina III (25 ou 50 mg/kg; v.o.) ou veículo foram submetidos ao teste do nado forçado 60 minutos após a administração da droga e, 60 minutos depois do teste foram sacrificados e dissecados para a retirada das áreas. A determinação das monoaminas foi feita pela técnica de HPLC com detecção eletroquímica. DA= dopamina, DOPAC= ácido dihidroxifenilacético, HVA=ácido homovanílico. As barras representam média  $\pm$  EPM (6-10 animais por grupo) \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs controle; ## $p < 0,01$  vs normal; <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs ripIII-25. ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

**Tabela 3- Níveis de 5-HT, 5-HIAA e NA em corpo estriado de camundongos normais e em tratados com riparina III ou veículo e submetidos ao teste do nado forçado.**

Grupo	5-HT	5-HIAA	NA
Normal	4,42 ± 0,81 (8)	3,31 ± 0,52 (6)	6,90 ± 0,98 (8)
Controle	6,11 ± 0,64 (10)	3,98 ± 0,72 (7)	5,51 ± 0,64 (9)#
RipIII-25	16,14 ± 1,48 (8)**###	0,66 ± 0,16 (9)***###	9,78 ± 1,17 (8)*
RipIII-50	19,34 ± 0,97 (10)**### <sup>a</sup>	0,58 ± 0,18 (10)***###	8,37 ± 1,54 (8)

Médias (ng/mg de tecido) ± EPM; (n) número de animais entre parênteses; ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 vs controle; ###p<0,001 vs Normal; <sup>a</sup>p<0,05 vs RipIII-25.

**Figura 28 - Determinação dos níveis de 5-HT, 5-HIAA e NA em corpo estriado de camundongos normais e em tratados com riparina III ou veículo e submetidos ao teste do nado forçado.**



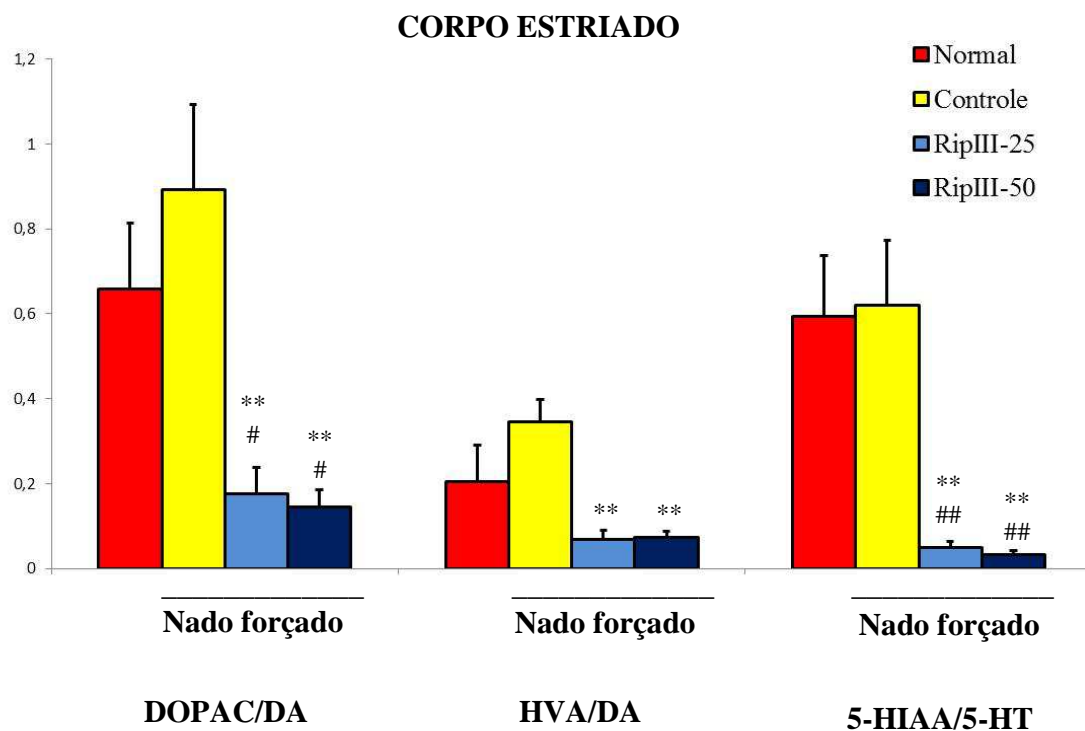
Os camundongos normais receberam veículo (2% Tween 80 em água destilada) e 2 horas depois foram sacrificados e dissecados. Os animais tratados com riparina III (25 ou 50 mg/kg; v.o.) ou veículo foram submetidos ao teste do nado forçado 60 minutos após a administração da droga e, 60 minutos depois do teste foram sacrificados e dissecados para a retirada das áreas. A determinação das monoaminas foi feita pela técnica de HPLC com detecção eletroquímica. 5-HT= serotonina, 5-HIAA=ácido 5-hidroxiindolacético, NA=noradrenalina. As barras representam média  $\pm$  EPM (6-10 animais por grupo) \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 vs controle; ##p<0,01 vs normal; <sup>a</sup>p<0,05 vs ripIII-25. ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

**Tabela 4 - Tabela 3. Taxas de metabolização DOPAC/DA, HVA/DA e 5-HIAA/5-HT em corpo estriado de camundongos normais e em tratados com riparina III ou veículo e submetidos ao teste do nado forçado.**

Grupo	DOPAC/DA	HVA/DA	5-HIAA/5-HT
Normal	0,65 ± 0,15 (8)	0,20 ± 0,08 (8)	0,59 ± 0,14 (8)
Controle	0,89 ± 0,20 (9)	0,34 ± 0,05 (10)	0,61 ± 0,15 (8)
RipIII-25	0,17 ± 0,06 (8)**#	0,06 ± 0,02 (9)**	0,049 ± 0,013 (9)**###
RipIII-50	0,14 ± 0,04 (10)**#	0,07 ± 0,01 (10)***	0,031 ± 0,010 (7)**###

Médias (ng/mg de tecido) ± EPM; (n) número de animais entre parênteses; ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 vs controle; #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 vs Normal.

**Figura 29 - Determinação das taxas de metabolização dos neurotransmissores em corpo estriado de camundongos.**



Os camundongos normais receberam veículo (2% Tween 80 em água destilada) e 2 horas depois foram sacrificados e dissecados. Os animais tratados com riparina III (25 ou 50 mg/kg; v.o.) ou veículo foram submetidos ao teste do nado forçado 60 minutos após a administração da droga e, 60 minutos depois do teste foram sacrificados e dissecados para a retirada das áreas. A determinação das monoaminas foi feita pela técnica de HPLC com detecção eletroquímica. As taxas de metabolização foram calculadas pela divisão de cada resultado referente ao metabólito (ng/g de tecido) e o neurotransmissor (ng/g de tecido) do mesmo animal, depois sendo feita a média dos resultados e análise estatística. DA= dopamina, DOPAC= ácido dihidroxifenilacético, HVA= ácido homovanílico, 5HT= serotonina, 5HIAA= ácido 5-hidroxiindolacético. 5-HT= serotonina, 5-HIAA=ácido 5-hidroxiindolacético, NA=noradrenalina. As barras representam média  $\pm$  EPM (6-10 animais por grupo) \*\*p< 0,01 vs controle; ##p<0,01 vs normal. ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*



### 5.2.1.2. Determinação dos níveis de dopamina (DA) e seu metabólito (DOPAC) em córtex pré-frontal de camundongos após o teste do nado forçado.

A **Figura 30** mostra os efeitos da ripIII após o teste do nado forçado sobre os níveis de DA e DOPAC em corpo estriado de camundongos. Os animais controle submetidos ao nado forçado não tiveram alteração nos níveis de DA ( $p > 0,05$ ) mas aumentaram os níveis de DOPAC em 90% ( $p < 0,05$ ) quando comparados aos animais normais. Nos animais tratados com ripIII-25 ocorreu um aumento de 129% nos níveis de DA ( $p < 0,01$ ) e uma redução de 65% nos níveis de DOPAC ( $p < 0,01$ ) comparando com o grupo controle. Com os animais tratados com ripIII-50, houve um aumento de 209% nos níveis de DA ( $p < 0,001$ ) e uma redução de 55% nos níveis de DOPAC ( $p < 0,01$ ) comparando com o grupo controle. Do mesmo modo, o grupo tratado com ripIII-50 também foi capaz de aumentar os níveis de DA em 89% ( $p < 0,01$ ) quando comparado ao grupo normal como mostra a **tabela 5**.

O nível de 5-HT aumentou 150% com a ripIII-50 ( $p < 0,001$ ) comparando ao grupo controle, aumentou 171% comparando ao grupo normal ( $p < 0,001$ ) e aumentou 77% comparando com ripIII-25 ( $p < 0,001$ ). Uma redução de 87%, 85% e 84% foi observada nos níveis de 5-HIAA quando os animais foram tratados com ripIII-50 comparando com o grupo controle ( $p < 0,01$ ), com a ripIII-25 ( $p < 0,05$ ) e com os animais normais ( $p < 0,05$ ), respectivamente. Os animais tratados com ripIII-25 não obtiveram alterações nos níveis de 5-HT e 5-HIAA. Contudo, houve um aumento de 84% nos níveis de NA apenas com a ripIII-25 ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo controle. (**Figura 31; tabela 6**).

A **Figura 32** apresenta o efeito da ripIII (25 e 50 mg/kg, v.o.), administrada de forma aguda, 2 horas após o tratamento sobre as taxas de metabolização DOPAC/DA e 5-HIAA/5-HT em córtex pré-frontal. Os animais controle (submetidos ao nado forçado) apresentaram um aumento significativo nas taxas de metabolização DOPAC/DA de 248% quando comparados aos animais normais (que não foram submetidos ao estresse do nado forçado). Neste contexto, a riparina III foi capaz de reduzir significativamente em 70% e 81% nas taxas de DOPAC/DA com as doses de 25 ( $p < 0,001$ ) e 50 ( $p < 0,001$ )

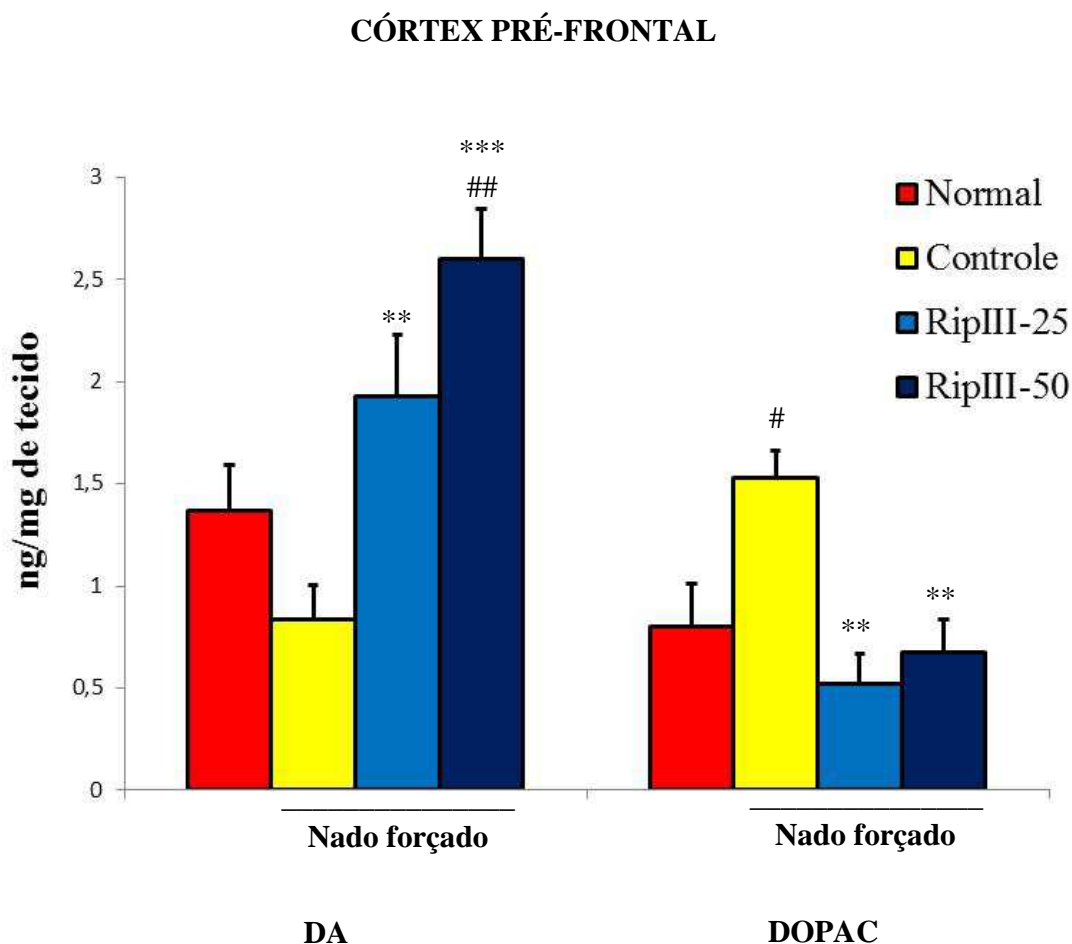
respectivamente quando comparado ao controle. Com relação a taxa de metabolização de 5-HIAA/5-HT, ripIII, apenas na dose de 50 mg/kg foi capaz de reduzir significativamente em 81% quando comparado ao controle ( $p < 0,05$ ) e ao grupo não submetido ao estresse (normal) ( $p < 0,05$ ) (**Tabela 7**).

**Tabela 5 – Níveis de DA e DOPAC em córtex pré-frontal de camundongos normais e em tratados com ripIII ou veículo e submetidos ao teste do nado forçado.**

Grupo	DA	DOPAC
Normal	1,372 ± 0,22 (8)	0,80 ± 0,21 (8)
Controle	0,83 ± 0,16 (8)	1,52 ± 0,13 (6)##
RipIII-25	1,92 ± 0,29 (7)**	0,52 ± 0,14 (6)**
RipIII-50	2,59 ± 0,24 (8)***##	0,67 ± 0,16 (6)**

Médias (ng/mg de tecido) ± EPM; (n) número de animais entre parênteses; ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 vs controle; ##p<0,01 vs Normal;

**Figura 30 - Determinação dos níveis de DA e DOPAC em córtex pré-frontal de camundongos normais e em tratados com riparina III ou veículo e submetidos ao teste do nado forçado.**



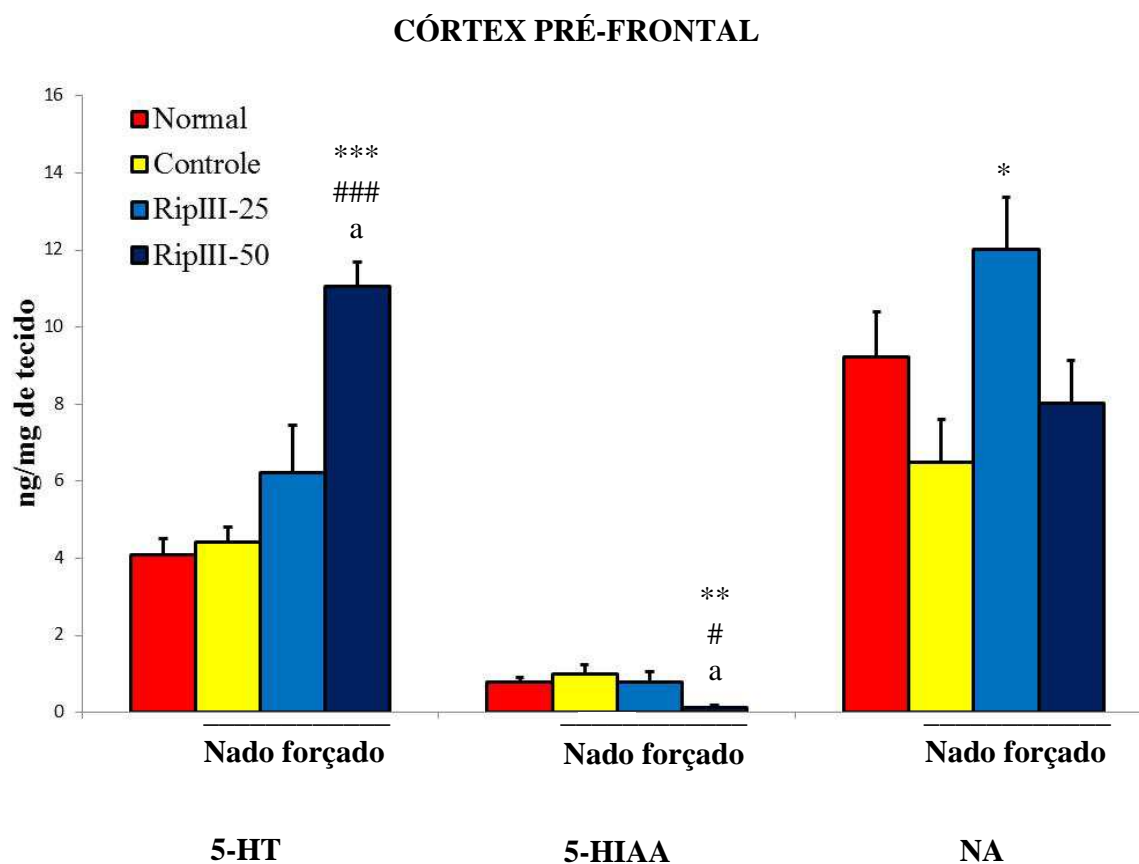
Os camundongos normais receberam veículo (2% Tween 80 em água destilada) e 2 horas depois foram sacrificados e dissecados. Os animais tratados com riparina III (25 ou 50 mg/kg; v.o.) ou veículo foram submetidos ao teste do nado forçado 60 minutos após a administração da droga e, 60 minutos depois do teste foram sacrificados e dissecados para a retirada das áreas. A determinação das monoaminas foi feita pela técnica de HPLC com detecção eletroquímica. DA= dopamina, DOPAC= ácido dihidroxifenilacético. As barras representam média  $\pm$  EPM (6-8 animais por grupo) \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs controle; ## $p < 0,01$  vs normal; <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs ripIII-25. ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

**Tabela 6 - Níveis de 5-HT, 5-HIAA e NA em córtex pré-frontal de camundongos normais e em tratados com riparina III ou veículo e submetidos ao teste do nado forçado.**

Grupo	5-HT	5-HIAA	NA
Normal	4,07 ± 0,44 (8)	0,77 ± 0,12 (8)	9,22 ± 1,17 (8)
Controle	4,41 ± 0,39 (7)	0,99 ± 0,23 (8)	6,50 ± 1,09 (7)
RipIII-25	6,21 ± 1,22 (7)	0,79 ± 0,25 (6)	12,01 ± 1,36 (7)*
RipIII-50	11,5 ± 0,63 (6)***### <sup>a</sup>	0,12 ± 0,07 (8)**# <sup>a</sup>	8,00 ± 1,13 (7)

Médias (ng/mg de tecido) ± EPM; (n) número de animais entre parênteses; ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 vs controle; #p<0,05; ###p<0,001 vs Normal; <sup>a</sup>p<0,05 vs RipIII-25.

**Figura 31 - Determinação dos níveis de 5-HT, 5-HIAA e NA em córtex pré-frontal de camundongos normais e em tratados com riparina III ou veículo e submetidos ao teste do nado forçado.**



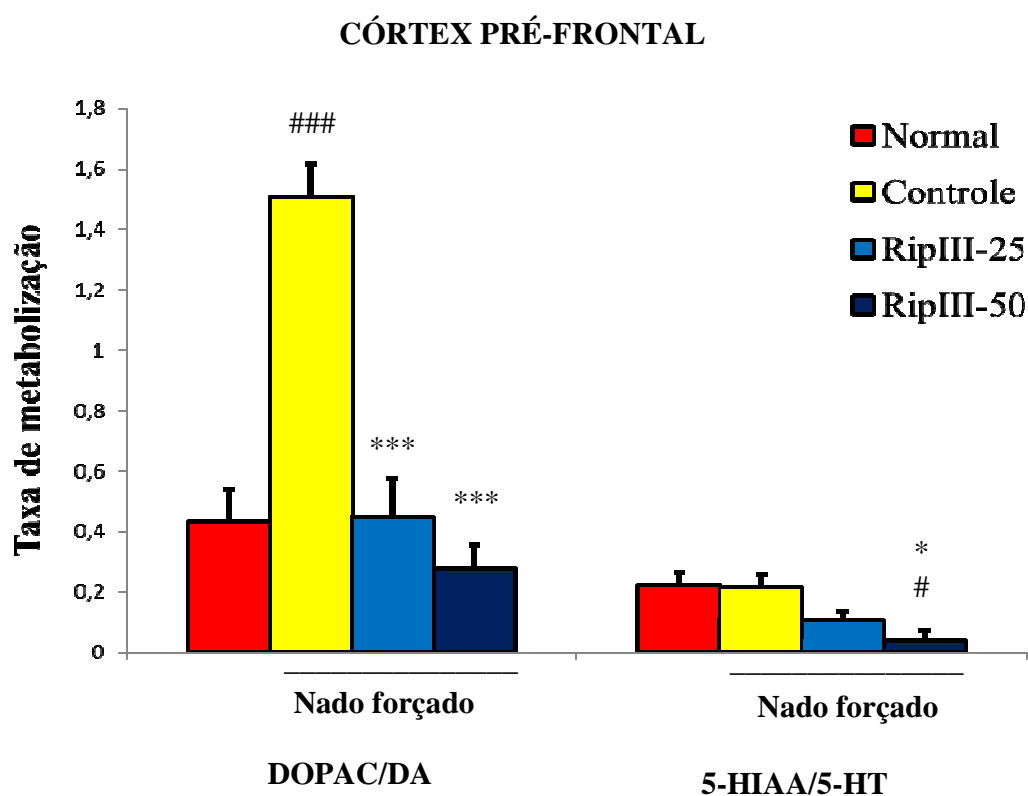
Os camundongos normais receberam veículo (2% Tween 80 em água destilada) e 2 horas depois foram sacrificados e dissecados. Os animais tratados com riparina III (25 ou 50 mg/kg; v.o.) ou veículo foram submetidos ao teste do nado forçado 60 minutos após a administração da droga e, 60 minutos depois do teste foram sacrificados e dissecados para a retirada das áreas. A determinação das monoaminas foi feita pela técnica de HPLC com detecção eletroquímica. 5-HT= serotonina, 5-HIAA=ácido 5-hidroxiindolacético, NA=noradrenalina. As barras representam média  $\pm$  EPM (6-8 animais por grupo) \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs controle; # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$  vs normal; <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs ripIII-25. ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

**Tabela 7 - Taxas de metabolização DOPAC/DA, 5-HIAA/5-HT em córtex pré-frontal de camundongos normais e em tratados com riparina III ou veículo e submetidos ao teste do nado forçado.**

Grupo	DOPAC/DA	5-HIAA/5-HT
Normal	0,43 ± 0,10 (8)	0,22 ± 0,04 (8)
Controle	1,50 ± 0,15 (6)###	0,21 ± 0,05 (8)
RipIII-25	0,44 ± 0,13 (7)***	0,10 ± 0,02 (8)
RipIII-50	0,27 ± 0,07 (6)***	0,039 ± 0,034 (8)*#

Médias (ng/mg de tecido) ± EPM; (n) número de animais entre parênteses; ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls; \*p<0,05; \*\*\*p<0,001 vs controle; #p<0,05; ###p<0,001 vs Normal.

Figura 32 - Determinação das taxas de metabolização dos neurotransmissores em córtex pré-frontal de camundongos.



Os camundongos normais receberam veículo (2% Tween 80 em água destilada) e 2 horas depois foram sacrificados e dissecados. Os animais tratados com riparina III (25 ou 50 mg/kg; v.o.) ou veículo foram submetidos ao teste do nado forçado 60 minutos após a administração da droga e, 60 minutos depois do teste foram sacrificados e dissecados para a retirada das áreas. A determinação das monoaminas foi feita pela técnica de HPLC com detecção eletroquímica. As taxas de metabolização foram calculadas pela divisão de cada resultado referente ao metabólito (ng/g de tecido) e o neurotransmissor (ng/g de tecido) do mesmo animal, depois sendo feita a média dos resultados e análise estatística. DA= dopamina, DOPAC= ácido dihidroxifenilacético, 5HT= serotonina, 5HIAA= ácido 5-hidroxiindolacético. 5-HT= serotonina. As barras representam média  $\pm$  EPM (6-8 animais por grupo) \*\*p< 0,01 vs controle; ###p<0,01 vs normal. ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.



### 5.2.1.3. Determinação dos níveis de dopamina (DA) e seu metabólito (DOPAC) em hipocampo de camundongos após o teste do nado forçado.

A **Figura 33** mostra os efeitos da ripIII após o teste do nado forçado sobre os níveis de DA e DOPAC em hipocampo de camundongos. Os animais controle submetidos ao nado forçado não tiveram alteração nos níveis de DA e DOPAC ( $p>0,05$ ) quando comparados aos animais normais. Do mesmo modo, nos animais tratados com ripIII-25 e ripIII-50 não ocorreu alteração nos níveis de DA e DOPAC ( $p>0,05$ ) comparando com os grupos controle e normal como mostra a **tabela 8**.

O nível de 5-HT aumentou 275% e 227% com a ripIII-50 ( $p<0,01$ ) comparando ao grupo controle e ao grupo normal respectivamente, e aumentou 192% e 154% com a ripIII-25 comparando ao grupo controle ( $p<0,001$ ) e normal ( $p<0,01$ ), respectivamente. O nível de 5-HIAA aumentou somente na dose de 50 mg/kg em 113% ( $p<0,05$ ) e 82% ( $p<0,05$ ) comparando com o grupo controle e normal, respectivamente. Houve um aumento de 34% ( $p<0,05$ ) e 61% ( $p<0,05$ ) nos níveis de NA com a ripIII-25 quando comparado com o grupo controle e normal, respectivamente e também aumentou com a ripIII-50 em 63% ( $p<0,01$ ) e 96% ( $p<0,001$ ) quando comparado com os grupos controle e normal, respectivamente. Não houve alteração nos níveis de 5-HT, 5-HIAA e NA entre os animais do grupo controle e normal. (**Figura 34; tabela 9**).

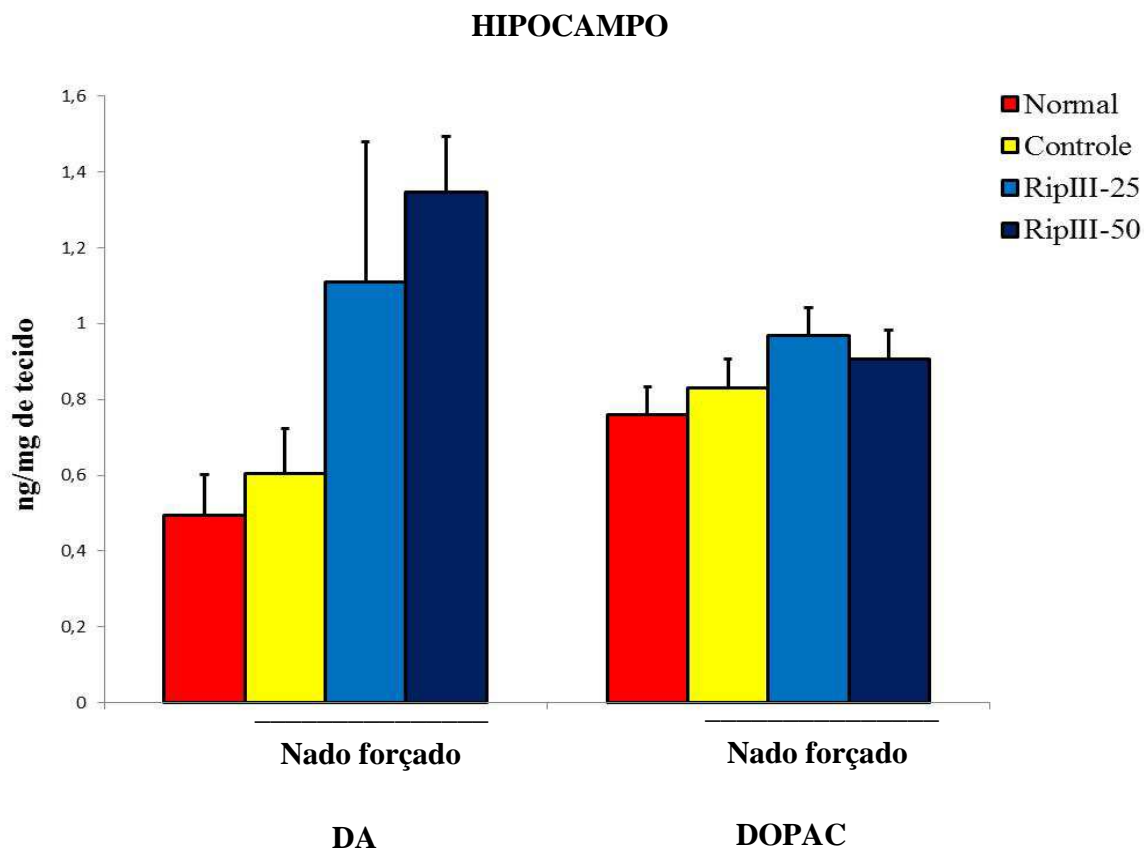
A **Figura 35 e a tabela 10** mostram que não há alteração sobre as taxas de metabolização DOPAC/DA e 5-HIAA/5-HT quando os animais foram tratados com ripIII (25 e 50 mg/kg, v.o.) no hipocampo, mesmo apresentando aumento nos níveis de 5-HT e NA como mostrado na **tabela 10**.

**Tabela 8 - Níveis de DA e DOPAC em hipocampo de camundongos normais e em tratados com ripIII ou veículo e submetidos ao teste do nado forçado.**

Grupo	DA	DOPAC
Normal	0,49 ± 0,10 (8)	0,75 ± 0,074 (7)
Controle	0,60 ± 0,11 (7)	0,83 ± 0,075 (7)
RipIII-25	1,10 ± 0,36 (8)	0,96 ± 0,072 (8)
RipIII-50	1,34 ± 0,14 (6)	0,90 ± 0,076 (7)

Médias (ng/mg de tecido) ± EPM; (n) número de animais entre parênteses; ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls;

**Figura 33 - Determinação dos níveis de DA e DOPAC em hipocampo de camundongos normais e em tratados com riparina III ou veículo e submetidos ao teste do nado forçado.**



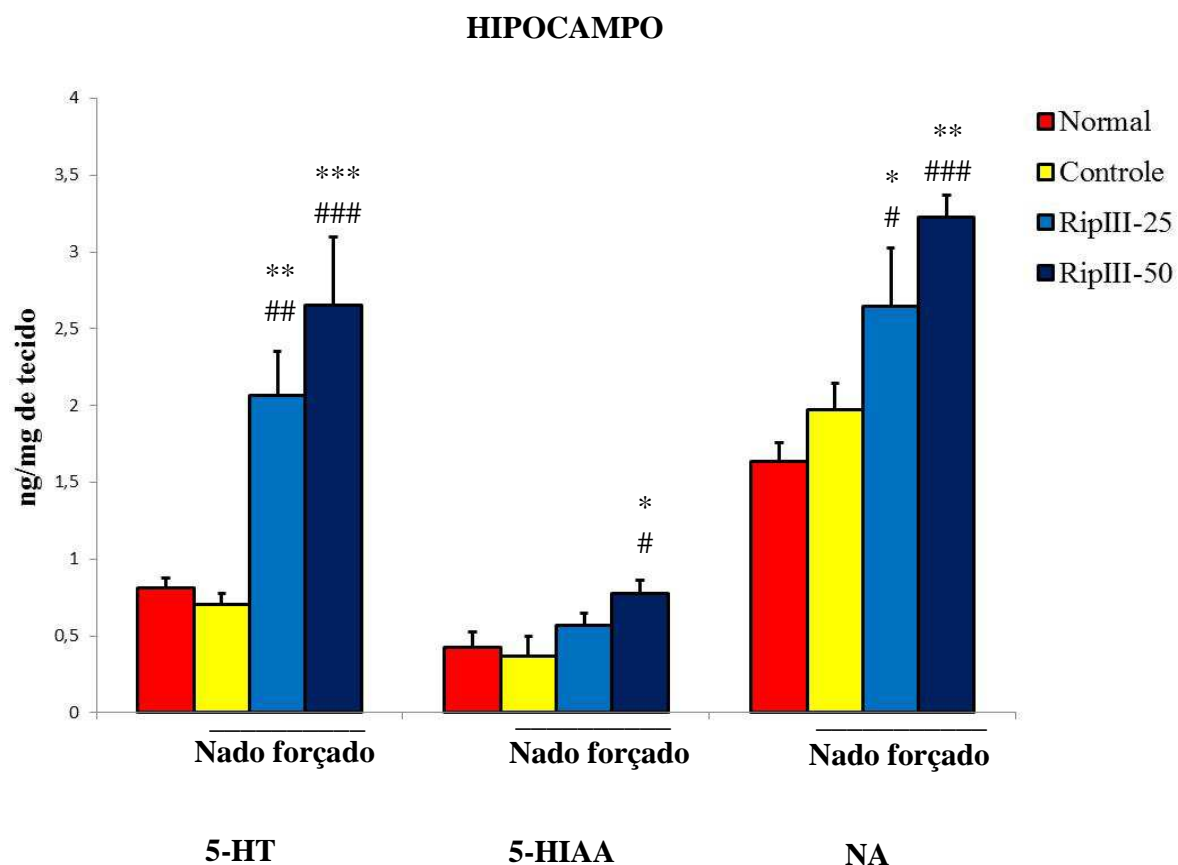
Os camundongos normais receberam veículo (2% Tween 80 em água destilada) e 2 horas depois foram sacrificados e dissecados. Os animais tratados com riparina III (25 ou 50 mg/kg; v.o.) ou veículo foram submetidos ao teste do nado forçado 60 minutos após a administração da droga e, 60 minutos depois do teste foram sacrificados e dissecados para a retirada das áreas. A determinação das monoaminas foi feita pela técnica de HPLC com detecção eletroquímica. DA= dopamina, DOPAC= ácido dihidroxifenilacético. As barras representam média  $\pm$  EPM (6-8 animais por grupo). ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

**Tabela 9 - Níveis de 5-HT, 5-HIAA e NA em hipocampo de camundongos normais e em tratados com riparina III ou veículo e submetidos ao teste do nado forçado.**

Grupo	5-HT	5-HIAA	NA
Normal	0,81 ± 0,06 (7)	0,42 ± 0,09 (8)	1,63 ± 0,12 (8)
Controle	0,70 ± 0,07 (8)	0,36 ± 0,12 (8)	1,97 ± 0,17 (8)
RipIII-25	2,06 ± 0,28 (7)***###	0,56 ± 0,08 (8)	2,64 ± 0,37 (8)*#
RipIII-50	2,65 ± 0,44 (7)***##	0,77 ± 0,08 (8)*#	3,22 ± 0,14 (8)***###

Médias (ng/mg de tecido) ± EPM; (n) número de animais entre parênteses; ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 vs controle; #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 vs Normal.

**Figura 34 - Determinação dos níveis de 5-HT, 5-HIAA e NA em hipocampo de camundongos normais e em tratados com riparina III ou veículo e submetidos ao teste do nado forçado.**



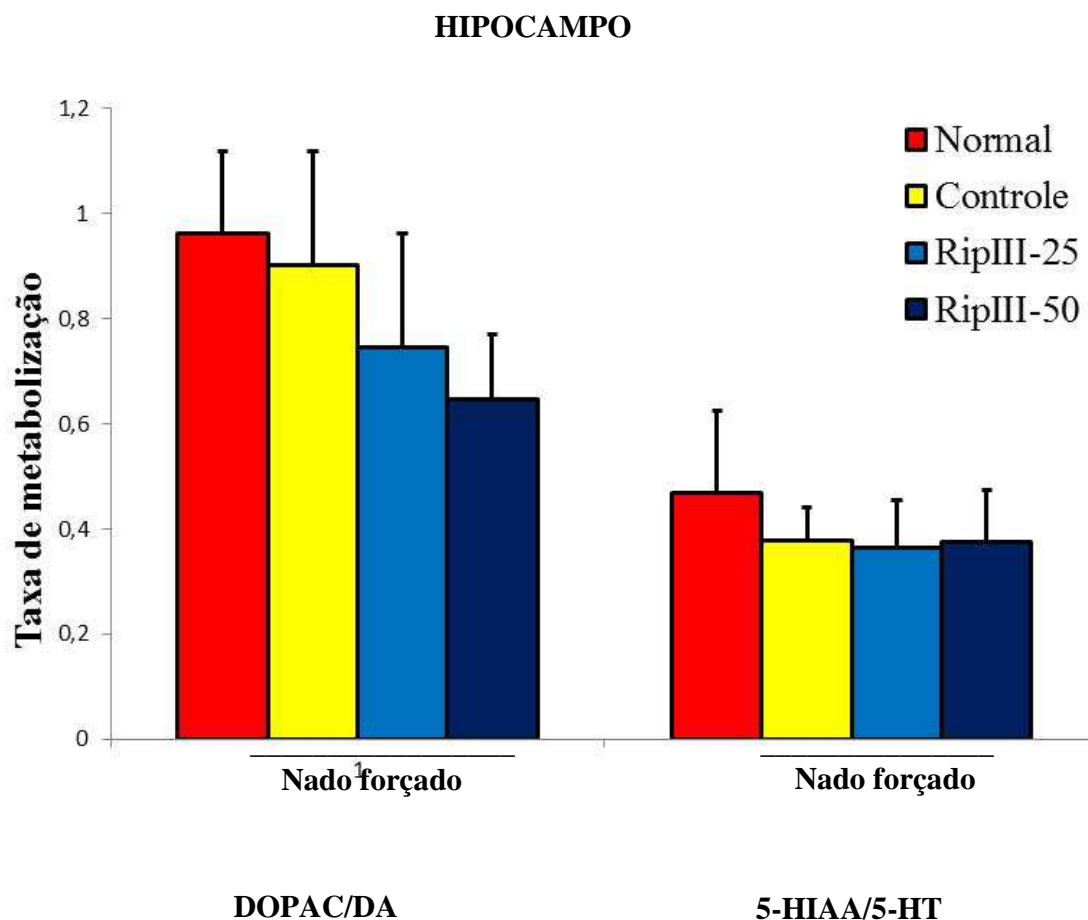
Os camundongos normais receberam veículo (2% Tween 80 em água destilada) e 2 horas depois foram sacrificados e dissecados. Os animais tratados com riparina III (25 ou 50 mg/kg; v.o.) ou veículo foram submetidos ao teste do nado forçado 60 minutos após a administração da droga e, 60 minutos depois do teste foram sacrificados e dissecados para a retirada das áreas. A determinação das monoaminas foi feita pela técnica de HPLC com detecção eletroquímica. 5-HT= serotonina, 5-HIAA=ácido 5-hidroxiindolacético, NA=noradrenalina. As barras representam média  $\pm$  EPM (6-8 animais por grupo) \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs controle; # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$ ; ### $p < 0,001$  vs normal. ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

**Tabela 10 - Taxas de metabolização DOPAC/DA, 5-HIAA/5-HT em hipocampo de camundongos normais e em tratados com riparina III ou veículo e submetidos ao teste do nado forçado.**

Grupo	DOPAC/DA	5-HIAA/5-HT
Normal	0,96 ± 0,15 (7)	0,46 ± 0,15 (5)
Controle	0,90 ± 0,21 (7)	0,37 ± 0,06 (7)
RipIII-25	0,74 ± 0,21 (5)	0,36 ± 0,08 (8)
RipIII-50	0,64 ± 0,12 (8)	0,37 ± 0,09 (7)

Médias (ng/mg de tecido) ± EPM; (n) número de animais entre parênteses; ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls;

**Figura 35 - Determinação das taxas de metabolização dos neurotransmissores em córtex pré-frontal de camundongos.**



Os camundongos normais receberam veículo (2% Tween 80 em água destilada) e 2 horas depois foram sacrificados e dissecados. Os animais tratados com riparina III (25 ou 50 mg/kg; v.o.) ou veículo foram submetidos ao teste do nado forçado 60 minutos após a administração da droga e, 60 minutos depois do teste foram sacrificados e dissecados para a retirada das áreas. A determinação das monoaminas foi feita pela técnica de HPLC com detecção eletroquímica. As taxas de metabolização foram calculadas pela divisão de cada resultado referente ao metabólito (ng/g de tecido) e o neurotransmissor (ng/g de tecido) do mesmo animal, depois sendo feita a média dos resultados e análise estatística. DA= dopamina, DOPAC= ácido dihidroxifenilacético, 5HT= serotonina, 5HIAA= ácido 5-hidroxiindolacético. As barras representam média  $\pm$  EPM (6-8 animais por grupo). ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

## **5.2.2. Avaliação do efeito da riparina III sobre o estresse oxidativo.**

As análises para investigação da atividade antioxidante da ripIII em estudo foram realizadas em homogenatos hipocampais, estriatais e pré-corticais em grupos pré-tratados com controle (2% tween 80 em água destilada) ou RipIII, 50mg/Kg, v.o., submetidos ou não ao teste do nado forçado.

### **5.2.2.1. Efeitos da ripIII sobre a atividade da catalase em homogenatos cerebrais submetidos a estresse oxidativo pelo teste do nado forçado.**

A **figuras 36, 37, 38** mostram que o tratamento com a ripIII-50 não altera a atividade da catalase quando os animais não são submetidos ao nado forçado ( $p > 0,05$ ). No entanto, quando os animais receberam veículo e foram submetidos ao nado, houve um aumento na atividade da enzima em 76% no hipocampo ( $p < 0,05$ ), 54% no corpo estriado ( $p < 0,05$ ) e 96% no córtex pré-frontal ( $p < 0,01$ ) (**tabela 11**). No grupo pré-tratado com ripIII-50 e submetido ao nado houve a reversão da atividade da enzima como evidenciado pela redução em 67% no hipocampo ( $p < 0,01$ ), 45% no corpo estriado ( $p < 0,01$ ) e 73% no córtex pré-frontal ( $p < 0,001$ ) comparando com o grupo controle submetido ao nado.

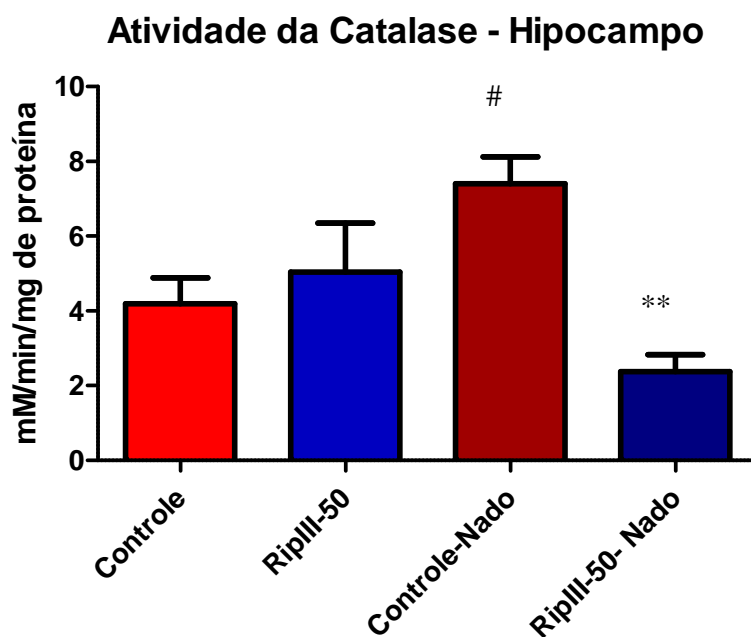


**Tabela 11- Atividade da catalase em hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal de camundongos tratados com riparina III ou veículo, submetidos ou não, ao teste do nado forçado.**

Grupo	Hipocampo	Corpo estriado	Córtex pré-frontal
Controle	4,19 ± 5,03 (5)	4,69 ± 0,58 (6)	4,80 ± 0,36 (5)
RipIII-50	5,03 ± 1,30 (5)	2,68 ± 0,67 (5)	4,39 ± 1,27 (6)
Controle-Nado	7,40 ± 0,71 (6)#	7,24 ± 0,65 (5)#	9,41 ± 1,24 (5)##
RipIII-50-Nado	2,38 ± 0,44 (6)**	3,92 ± 0,76 (5)**	2,50 ± 0,76 (6)***

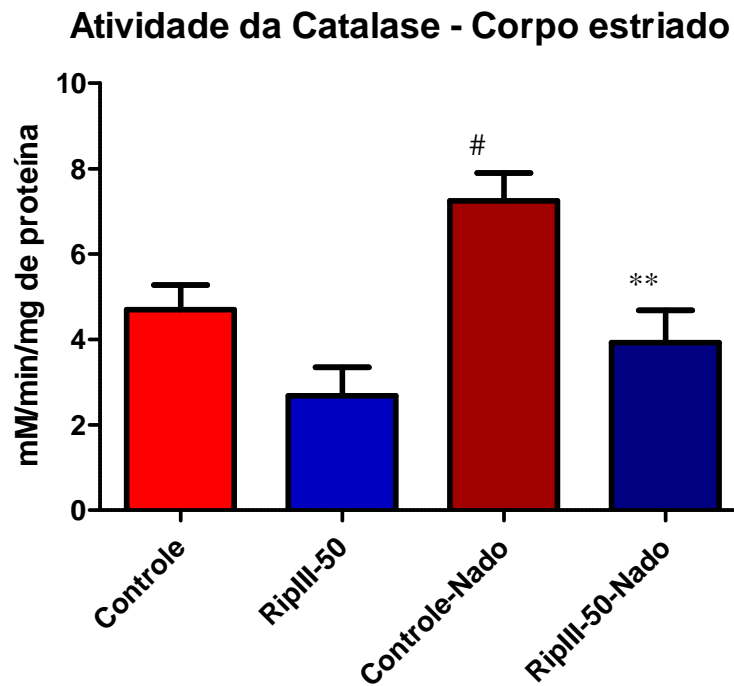
Médias ( $\mu\text{M}/\text{min}/\mu\text{g}$  de proteína)  $\pm$  EPM; (n) número de animais entre parênteses; ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 vs controle-nado; #p<0,05; ##p<0,01 vs Controle.

**Figura 36 - Efeitos da riparina III sobre a atividade da catalase em hipocampo de animais submetidos (Controle-Nado; RipIII-Nado) ou não (Controle; RipIII-50) ao estresse do nado forçado.**



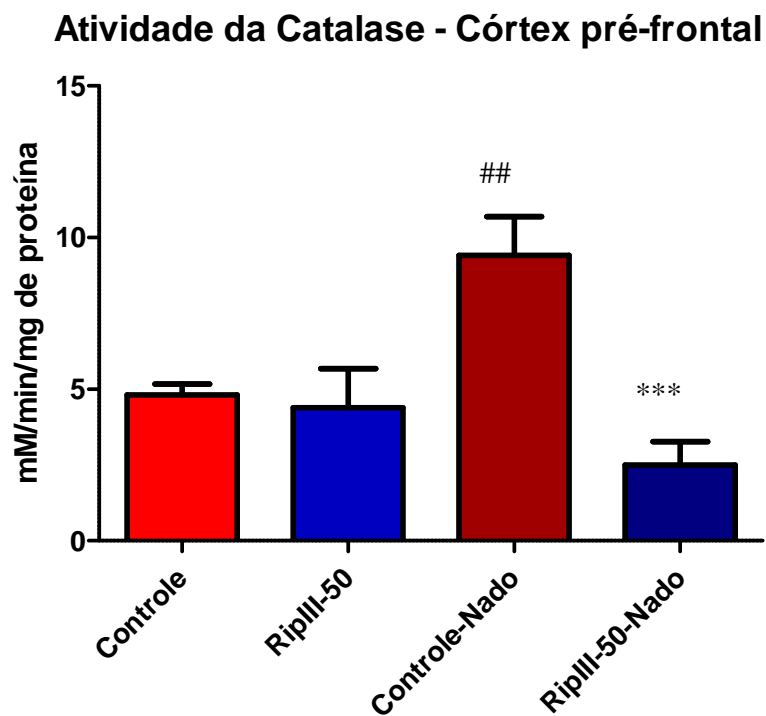
Os animais que não foram submetidos ao nado forçado, foram tratados com ripIII-50 ou veículo (2% Tween80 em água destilada) e depois de 2h foram sacrificados e tiveram seus cérebros dissecados para a remoção das áreas. Os animais que foram submetidos ao estresse foram tratados com ripIII-50 ou veículo, via oral, e depois de 60 minutos foram submetidos ao nado forçado e 60 min depois foram sacrificados e dissecados. Os valores representam a média  $\pm$  EPM, n = 5-6. ANOVA seguido de Student-Neuman-Keuls como teste post hoc. \*\*p < 0,01 vs Controle-Nado; #p<0,05 vs Controle.

Figura 37 - Efeitos da riparina III sobre a atividade da catalase em corpo estriado de animais submetidos (Controle-Nado; RipIII-Nado) ou não (Controle; RipIII-50) ao estresse do nado forçado.



Os animais que não foram submetidos ao nado forçado, foram tratados com ripIII-50 ou veículo (2% Tween80 em água destilada) e depois de 2h foram sacrificados e tiveram seus cérebros dissecados para a remoção das áreas. Os animais que foram submetidos ao estresse foram tratados com ripIII-50 ou veículo, via oral, e depois de 60 minutos foram submetidos ao nado forçado e 60 min depois foram sacrificados e dissecados. Os valores representam a média  $\pm$  EPM, n = 5-6. ANOVA seguido de Student-Neuman-Keuls como teste post hoc. \*\*p < 0,01 vs Controle-Nado; #p<0,05 vs Controle.

**Figura 38 - Efeitos da riparina III sobre a atividade da catalase em córtex pré-frontal de animais submetidos (Controle-Nado; RipIII-Nado) ou não (Controle; RipIII-50) ao estresse do nado forçado.**



Os animais que não foram submetidos ao nado forçado, foram tratados com ripIII-50 ou veículo (2% Tween80 em água destilada) e depois de 2h foram sacrificados e tiveram seus cérebros dissecados para a remoção das áreas. Os animais que foram submetidos ao estresse foram tratados com ripIII-50 ou veículo, via oral, e depois de 60 minutos foram submetidos ao nado forçado e 60 min depois foram sacrificados e dissecados. Os valores representam a média  $\pm$  EPM, n = 5-6. ANOVA seguido de Student-Neuman-Keuls como teste post hoc. \*p < 0,05 vs Controle-Nado.

### **5.2.2.2. Efeitos da ripIII sobre os níveis de GSH em homogenatos cerebrais submetidos a estresse oxidativo pelo teste do nado forçado.**

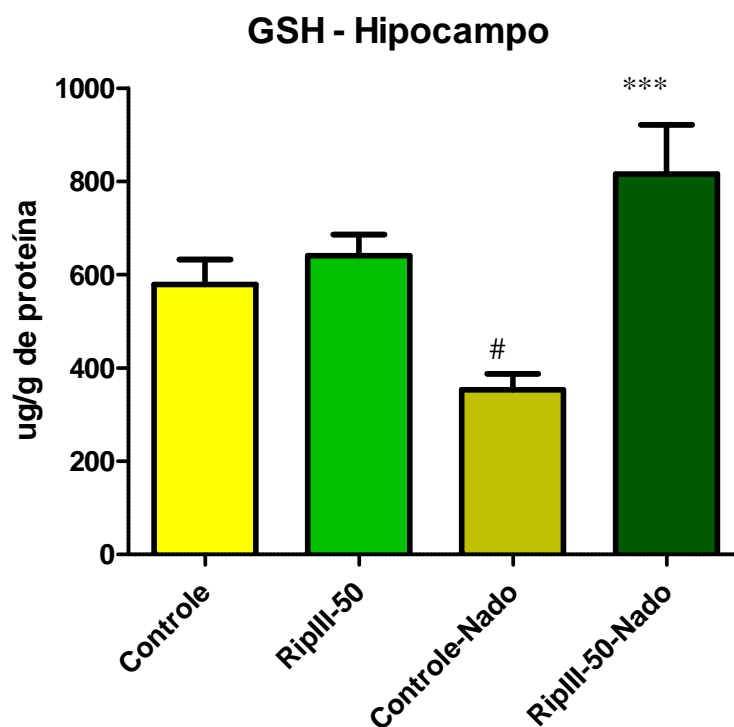
A **figuras 39, 40 e 41** mostram que o tratamento com a ripIII-50 não altera os níveis de GSH quando os animais não são submetidos ao nado forçado ( $p>0,05$ ). No entanto, quando os animais receberam veículo e foram submetidos ao nado, houve uma redução nos níveis de GSH em 38% no hipocampo ( $p<0,05$ ) e 31% no córtex pré-frontal ( $p<0,05$ ), mas não houve alteração no corpo estriado (**tabela 12**). No grupo pré-tratado com ripIII-50 e submetido ao nado houve a reversão dos níveis de GSH como evidenciado pelo aumento de 130% no hipocampo ( $p<0,001$ ) e 80% no córtex pré-frontal ( $p<0,001$ ) comparando com o grupo controle submetido ao nado. No corpo estriado, o grupo pré-tratado com ripIII-50 e submetido ao nado aumentou os níveis de GSH em 55% comparando com o controle submetido ao nado ( $p<0,01$ ) e, em 42% comparando com o controle não submetido ao nado ( $p<0,05$ ).

**Tabela 12 - Níveis de GSH em hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal de camundongos tratados com riparina III ou veículo, submetidos ou não, ao teste do nado forçado.**

Grupo	Hipocampo	Corpo estriado	Córtex pré-frontal
Controle	579,1 ± 53,51 (8)	631,5 ± 37,32 (6)	654,0 ± 75,41 (8)
RipIII-50	640,5 ± 45,18 (7)	799,2 ± 35,78 (8)	739,8 ± 98,28 (8)
Controle-Nado	353,3 ± 33,70 (7)#	577,7 ± 49,48 (10)	449,3 ± 35,92 (9)#
RipIII-50-Nado	815,0 ± 106,3 (9)***	899,8 ± 120,3 (7)**#	809,7 ± 72,98 (6)*

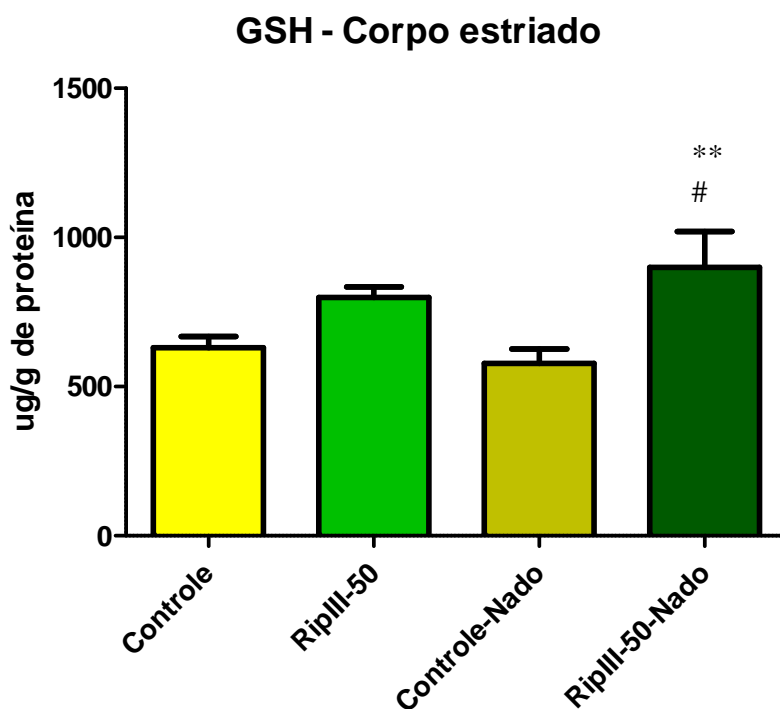
Médias ( $\mu\text{g/g}$  de proteína)  $\pm$  EPM; (n) número de animais entre parênteses; ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs controle-nado; # $p < 0,05$  vs Controle.

Figura 39 - Efeitos da riparina III sobre os níveis de GSH em córtex pré-frontal de animais submetidos (Controle-Nado; RipIII-Nado) ou não (Controle; RipIII-50) ao estresse do nado forçado.



Os animais que não foram submetidos ao nado forçado, foram tratados com ripIII-50 ou veículo (2% Tween80 em água destilada) e depois de 2h foram sacrificados e tiveram seus cérebros dissecados para a remoção das áreas. Os animais que foram submetidos ao estresse foram tratados com ripIII-50 ou veículo, via oral, e depois de 60 minutos foram submetidos ao nado forçado e 60 min depois foram sacrificados e dissecados. Os valores representam a média  $\pm$  EPM, n = 7-9. ANOVA seguido de Student-Neuman-Keuls como teste post hoc.\*\*\*p < 0,001 vs Controle-Nado; #p<0,05 vs controle.

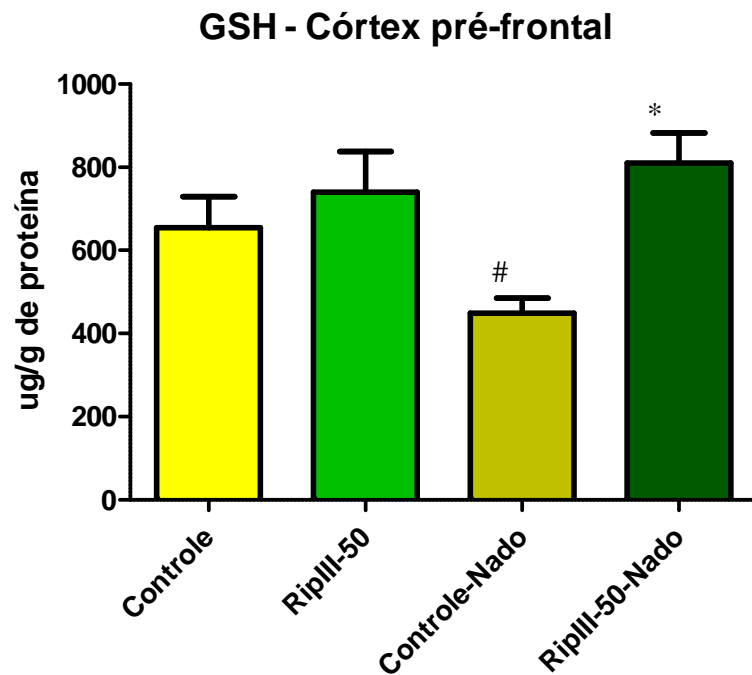
**Figura 40 - Efeitos da riparina III sobre os níveis de GSH em corpo estriado de animais submetidos (Controle-Nado; RipIII-Nado) ou não (Controle; RipIII-50) ao estresse do nado forçado.**



Os animais que não foram submetidos ao nado forçado, foram tratados com ripIII-50 ou veículo (2% Tween80 em água destilada) e depois de 2h foram sacrificados e tiveram seus cérebros dissecados para a remoção das áreas. Os animais que foram submetidos ao estresse foram tratados com ripIII-50 ou veículo, via oral, e depois de 60 minutos foram submetidos ao nado forçado e 60 min depois foram sacrificados e dissecados. Os valores representam a média  $\pm$  EPM, n = 7-10. ANOVA seguido de Student-Neuman-Keuls como teste post hoc.\*p < 0,05 vs Controle-Nado; #p<0,05 vs controle.



Figura 41 - Efeitos da riparina III sobre os níveis de GSH em córtex pré-frontal de animais submetidos (Controle-Nado; RipIII-Nado) ou não (Controle; RipIII-50) ao estresse do nado forçado.



Os animais que não foram submetidos ao nado forçado, foram tratados com ripIII-50 ou veículo (2% Tween80 em água destilada) e depois de 2h foram sacrificados e tiveram seus cérebros dissecados para a remoção das áreas. Os animais que foram submetidos ao estresse foram tratados com ripIII-50 ou veículo, via oral, e depois de 60 minutos foram submetidos ao nado forçado e 60 min depois foram sacrificados e dissecados. Os valores representam a média  $\pm$  EPM, n = 6-9. ANOVA seguido de Student-Neuman-Keuls como teste post hoc.\*p < 0,05 vs Controle-Nado; #p<0,05 vs controle.

### **5.2.2.3. Efeitos da ripIII sobre quantidade de SOD em homogenatos cerebrais submetidos a estresse oxidativo pelo teste do nado forçado.**

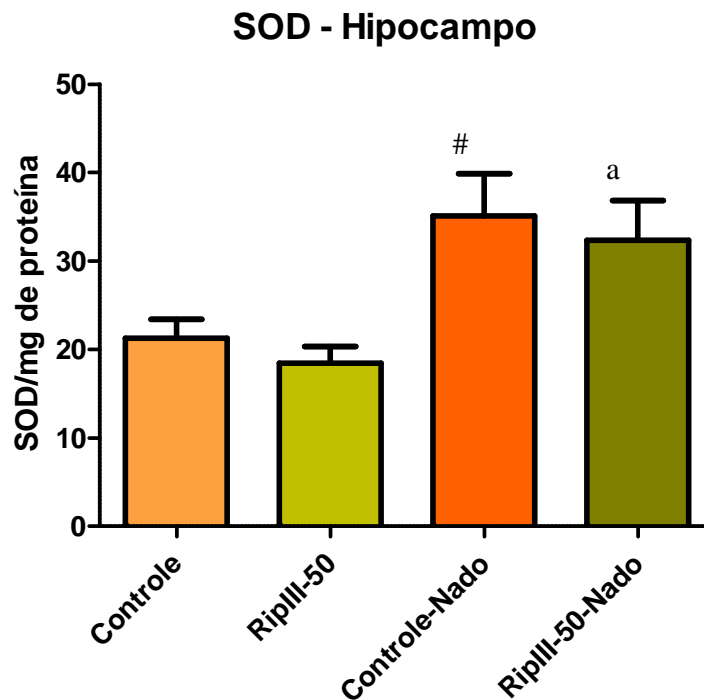
A **figuras 42, 43 e 44** mostram que o tratamento com a ripIII-50 não altera a quantidade de SOD quando os animais não são submetidos ao nado forçado ( $p>0,05$ ). No entanto, quando os animais receberam veículo e foram submetidos ao nado, houve um aumento na quantidade da enzima em 65% no hipocampo ( $p<0,05$ ) e 69% no corpo estriado ( $p<0,01$ ). Não houve alteração na quantidade da enzima no grupo controle submetido ao nado no córtex pré-frontal ( $p>0,05$ ). De modo semelhante, o grupo pré-tratado com ripIII-50 e submetido ao nado também não apresentou alteração em nenhuma das áreas estudadas ( $p>0,05$ ) comparando com o grupo controle-nado. No entanto, o grupo ripIII-50-nado aumentou a quantidade da enzima em 32% ( $p<0,05$ ) comparando com o grupo ripIII-50 no hipocampo (**tabela 13**).

**Tabela 13 - Quantidade de SOD em hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal de camundongos tratados com riparina III ou veículo, submetidos ou não, ao teste do nado forçado.**

Grupo	Hipocampo	Corpo estriado	Córtex pré-frontal
Controle	21,25 ± 2,15 (7)	16,72 ± 0,91 (7)	31,39 ± 1,33 (5)
RipIII-50	18,43 ± 1,92 (7)	20,19 ± 2,16 (7)	33,60 ± 4,95 (6)
Controle-Nado	35,13 ± 4,74 (7)#	28,27 ± 2,16 (7)##	37,92 ± 3,28 (5)
RipIII-50-Nado	32,36 ± 4,46 (7) <sup>a</sup>	21,74 ± 3,62 (6)	38,06 ± 5,09 (6)

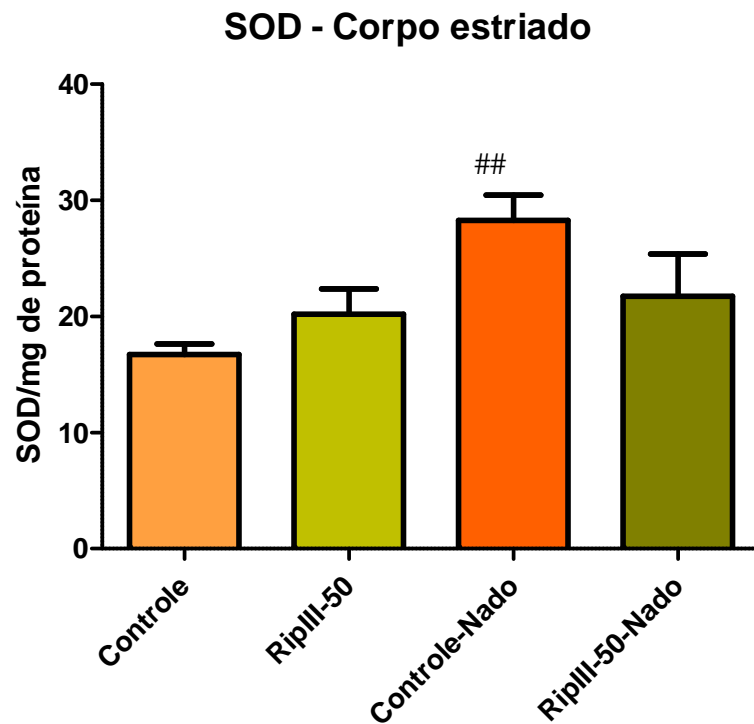
Médias (SOD/mg de proteína) ± EPM; (n) número de animais entre parênteses; ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls; #p<0,05; ##p<0,01 vs Controle; <sup>a</sup>p<0,05 vs ripIII-50.

**Figura 42 - Efeitos da riparina III sobre a quantidade de SOD em hipocampo de animais submetidos (Controle-Nado; RipIII-Nado) ou não (Controle; RipIII-50) ao estresse do nado forçado.**



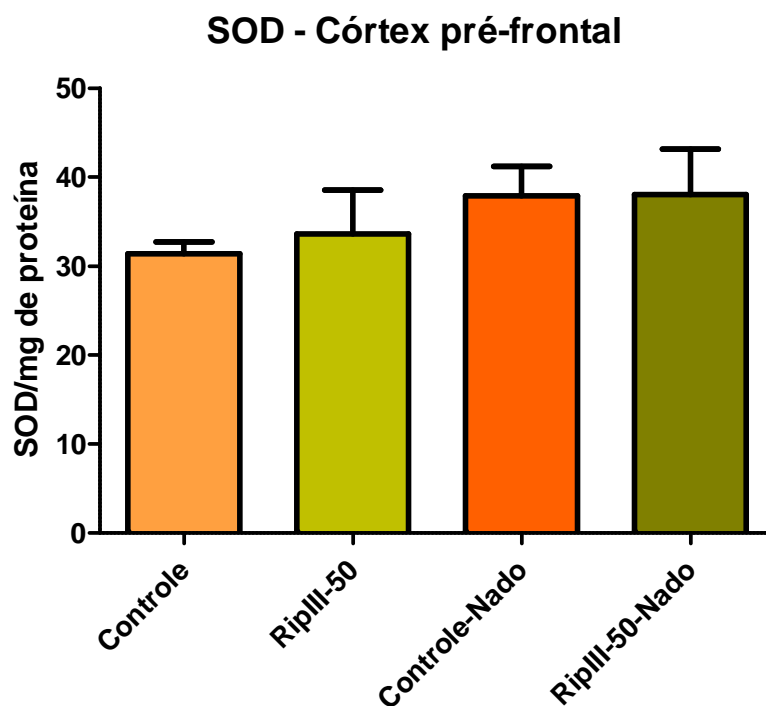
Os animais que não foram submetidos ao nado forçado, foram tratados com ripIII-50 ou veículo (2% Tween80 em água destilada) e depois de 2h foram sacrificados e tiveram seus cérebros dissecados para a remoção das áreas. Os animais que foram submetidos ao estresse foram tratados com ripIII-50 ou veículo, via oral, e depois de 60 minutos foram submetidos ao nado forçado e 60 min depois foram sacrificados e dissecados. Os valores representam a média  $\pm$  EPM, n = 7 por grupo. ANOVA seguido de Student-Neuman-Keuls como teste post hoc. #p<0,05 vs controle; <sup>a</sup>p<0,05 vs ripIII-50.

Figura 43 - Efeitos da riparina III sobre a quantidade de SOD em corpo estriado de animais submetidos (Controle-Nado; RipIII-Nado) ou não (Controle; RipIII-50) ao estresse do nado forçado.



Os animais que não foram submetidos ao nado forçado, foram tratados com ripIII-50 ou veículo (2% Tween80 em água destilada) e depois de 2h foram sacrificados e tiveram seus cérebros dissecados para a remoção das áreas. Os animais que foram submetidos ao estresse foram tratados com ripIII-50 ou veículo, via oral, e depois de 60 minutos foram submetidos ao nado forçado e 60 min depois foram sacrificados e dissecados. Os valores representam a média  $\pm$  EPM, n = 6-7. ANOVA seguido de Student-Neuman-Keuls como teste post hoc.  $\#p < 0,05$  vs controle.

**Figura 44 - Efeitos da riparina III sobre a quantidade de SOD em córtex pré-frontal de animais submetidos (Controle-Nado; RipIII-Nado) ou não (Controle; RipIII-50) ao estresse do nado forçado.**



Os animais que não foram submetidos ao nado forçado, foram tratados com ripIII-50 ou veículo (2% Tween80 em água destilada) e depois de 2h foram sacrificados e tiveram seus cérebros dissecados para a remoção das áreas. Os animais que foram submetidos ao estresse foram tratados com ripIII-50 ou veículo, via oral, e depois de 60 minutos foram submetidos ao nado forçado e 60 min depois foram sacrificados e dissecados. Os valores representam a média  $\pm$  EPM, n = 6-7. ANOVA seguido de Student-Neuman-Keuls como teste post hoc.

**5.2.2.4. Efeitos da ripIII sobre os níveis de MDA (malonildialdeído) em homogenatos cerebrais submetidos a estresse oxidativo pelo teste do nado forçado.**

A **figuras 45, 46 e 47** mostram que o tratamento com a ripIII-50 não altera os níveis de MDA quando os animais não são submetidos ao nado forçado ( $p>0,05$ ). No entanto, quando os animais receberam veículo e foram submetidos ao nado, houve um aumento nos níveis de MDA em 53% no hipocampo ( $p<0,05$ ) e 63% no corpo estriado ( $p<0,05$ ). Não houve alteração nos níveis de MDA no grupo controle submetido ao nado no córtex pré-frontal ( $p>0,05$ ). No grupo pré-tratado com ripIII-50 e submetido ao nado houve uma diminuição nos níveis de MDA em 72% no hipocampo ( $p<0,01$ ), 74% no corpo estriado ( $p<0,01$ ) e 81% no córtex pré-frontal ( $p<0,01$ ) comparando com o grupo controle-nado. Além disso, no córtex pré-frontal a ripIII-50-nado reduziu significativamente os níveis de MDA em 82% ( $p<0,01$ ) quando comparado ao grupo controle e em 72% quando comparado com ripIII-50 (**tabela 14**).

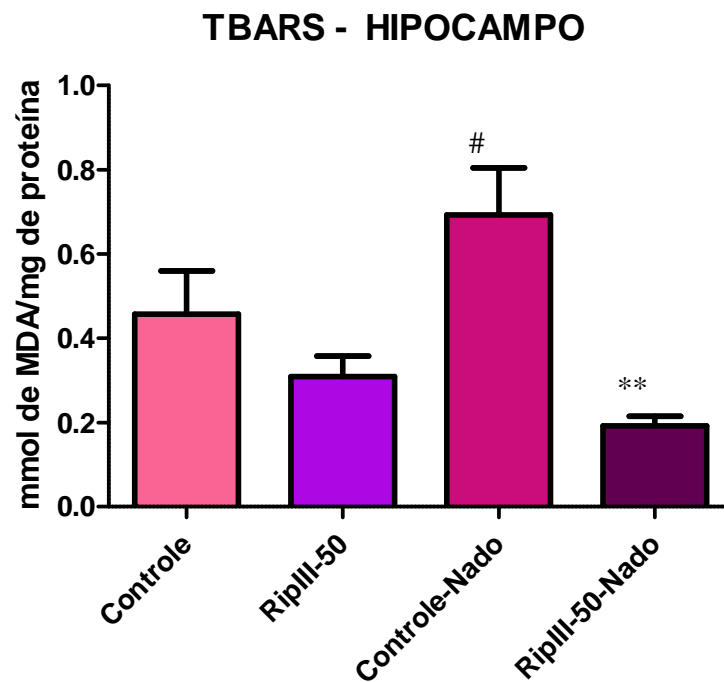
**Tabela 14 - Níveis de MDA (malonildialdeído) em hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal de camundongos tratados com riparina III ou veículo, submetidos ou não, ao teste do nado forçado.**

Grupo	Hipocampo	Corpo estriado	Córtex pré-frontal
Controle	0,45 ± 0,10 (6)	0,19 ± 0,029 (5)	0,28 ± 0,03 (5)
RipIII-50	0,30 ± 0,04 (6)	0,18 ± 0,024 (6)	0,18 ± 0,06 (4)
Controle-Nado	0,69 ± 0,11 (5)#	0,31 ± 0,05 (5)#	0,27 ± 0,03 (5)
RipIII-50-Nado	0,19 ± 0,02 (6)**	0,08 ± 0,02 (5)**	0,05 ± 0,009 (5)**## <sup>a</sup>

Médias (mmol de MDA/ mg de proteína) ± EPM; (n) número de animais entre parênteses; ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls; \*\*p<0,01 vs controle-nado; #p<0,05; ##p<0,01 vs Controle; <sup>a</sup>p<0,05 vs ripIII-50

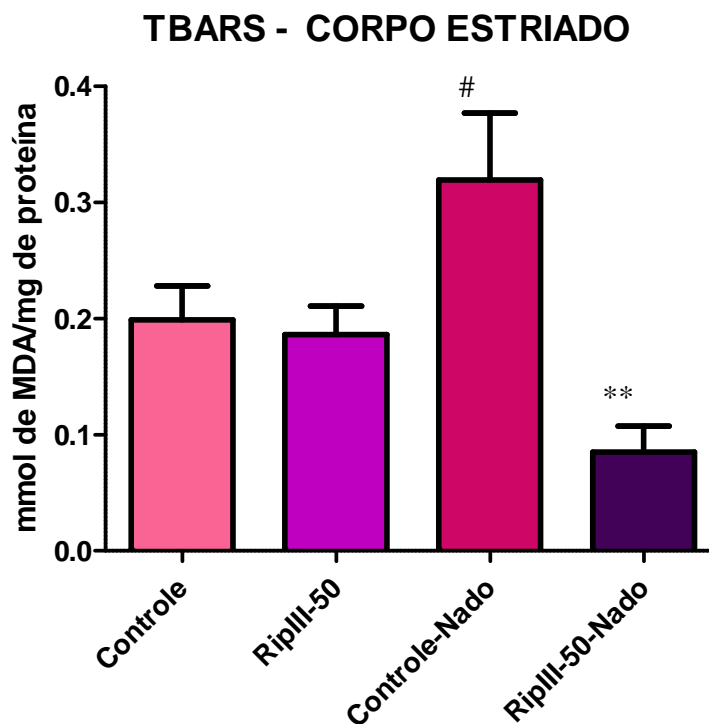


Figura 45 - Efeitos da riparina III sobre os níveis de MDA (malonildialdeído) em hipocampo de animais submetidos (Controle-Nado; RipIII-Nado) ou não (Controle; RipIII-50) ao estresse do nado forçado.



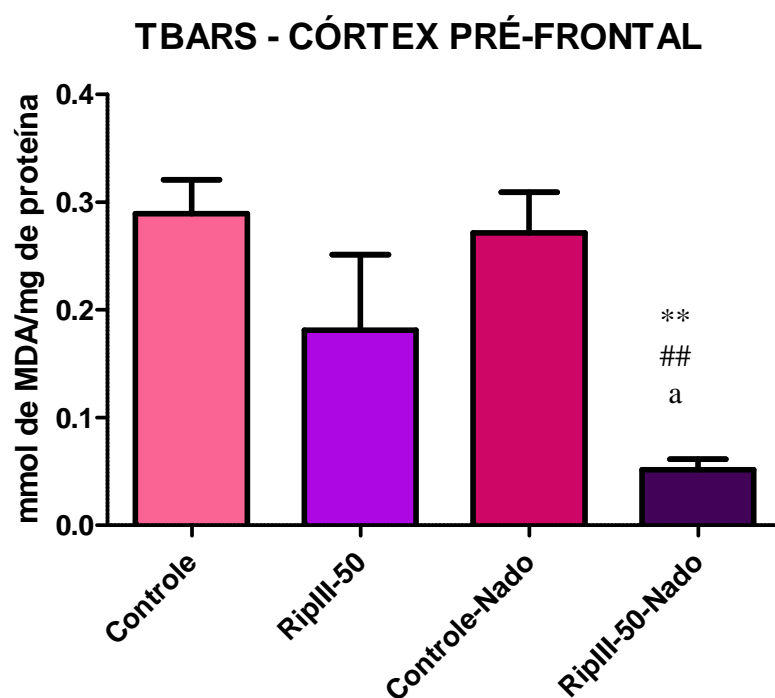
Os animais que não foram submetidos ao nado forçado, foram tratados com ripIII-50 ou veículo (2% Tween80 em água destilada) e depois de 2h foram sacrificados e tiveram seus cérebros dissecados para a remoção das áreas. Os animais que foram submetidos ao estresse foram tratados com ripIII-50 ou veículo, via oral, e depois de 60 minutos foram submetidos ao nado forçado e 60 min depois foram sacrificados e dissecados. Os valores representam a média  $\pm$  EPM, n = 5-6. #p<0,05 vs controle; \*\*p<0,01 vs Controle-Nado. ANOVA seguido de Student-Neuman-Keuls como teste *post hoc*.

Figura 46 - Efeitos da riparina III sobre os níveis de MDA (malonildialdeído) em corpo estriado de animais submetidos (Controle-Nado; RipIII-Nado) ou não (Controle; RipIII-50) ao estresse do nado forçado.



Os animais que não foram submetidos ao nado forçado, foram tratados com ripIII-50 ou veículo (2% Tween80 em água destilada) e depois de 2h foram sacrificados e tiveram seus cérebros dissecados para a remoção das áreas. Os animais que foram submetidos ao estresse foram tratados com ripIII-50 ou veículo, via oral, e depois de 60 minutos foram submetidos ao nado forçado e 60 min depois foram sacrificados e dissecados. Os valores representam a média  $\pm$  EPM, n = 5-6. #p<0,05 vs controle; \*\*p<0,01 vs Controle-Nado. ANOVA seguido de Student-Neuman-Keuls como teste *post hoc*.

**Figura 47 - Efeitos da riparina III sobre os níveis de MDA (malonildialdeído) em córtex pré-frontal de animais submetidos (Controle-Nado; RipIII-Nado) ou não (Controle; RipIII-50) ao estresse do nado forçado.**



Os animais que não foram submetidos ao nado forçado, foram tratados com ripIII-50 ou veículo (2% Tween80 em água destilada) e depois de 2h foram sacrificados e tiveram seus cérebros dissecados para a remoção das áreas. Os animais que foram submetidos ao estresse foram tratados com ripIII-50 ou veículo, via oral, e depois de 60 minutos foram submetidos ao nado forçado e 60 min depois foram sacrificados e dissecados. Os valores representam a média  $\pm$  EPM, n = 5-6. \*\*p<0,01 vs Controle-Nado; ##p<0,01 vs controle; <sup>a</sup>p<0,05 vs ripIII-50. ANOVA seguido de Student-Neuman-Keuls como teste *post hoc*.

**5.2.2.5. Efeitos da ripIII sobre a concentração de nitrito/nitrato em homogenatos cerebrais submetidos a estresse oxidativo pelo teste do nado forçado.**

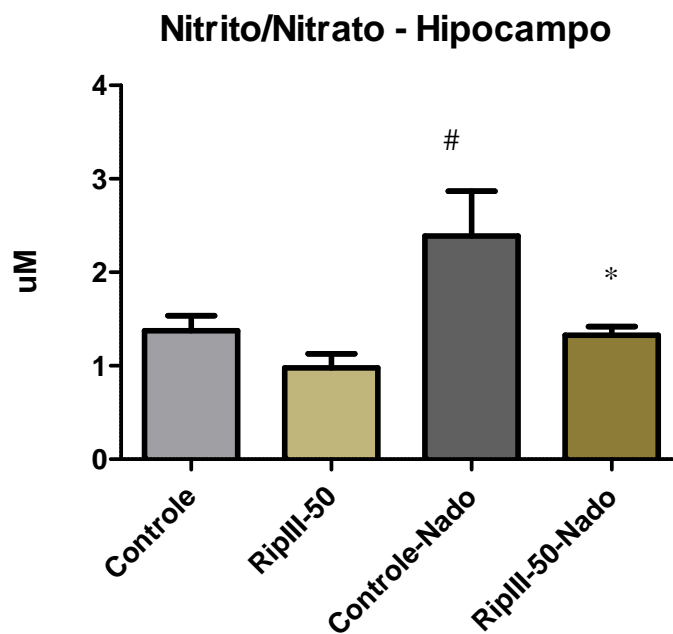
A **figuras 48, 49 e 50** mostram que o tratamento com a ripIII-50 não altera a produção de nitrito/nitrato quando os animais não são submetidos ao nado forçado ( $p>0,05$ ). No entanto, quando os animais receberam veículo e foram submetidos ao nado, houve um aumento na produção de nitrito/nitrato em 73% no hipocampo ( $p<0,05$ ) e 82% no córtex pré-frontal ( $p<0,05$ ). No grupo pré-tratado com ripIII-50 e submetido ao nado houve uma diminuição na produção de nitrito/nitrato em 44% no hipocampo ( $p<0,05$ ), 54% no corpo estriado ( $p<0,01$ ) e 50% no córtex pré-frontal ( $p<0,05$ ) comparando com o grupo controle submetido ao nado (**Tabela 15**).

**Tabela 15 - Concentração de nitrito/nitrato em hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal de camundongos tratados com riparina III ou veículo, submetidos ou não, ao teste do nado forçado.**

Grupo	Hipocampo	Corpo estriado	Córtex pré-frontal
Controle	1,37 ± 0,16 (6)	1,54 ± 0,16 (6)	1,40 ± 0,15 (6)
RipIII-50	0,97 ± 0,15 (6)	1,46 ± 0,226 (8)	1,56 ± 0,33 (7)
Controle-Nado	2,38 ± 0,48 (6)#	2,24 ± 0,24 (6)	2,55 ± 0,45 (6)#
RipIII-50-Nado	1,33 ± 0,09 (8)*	1,013 ± 0,221 (8)**	1,27 ± 0,06 (7)*

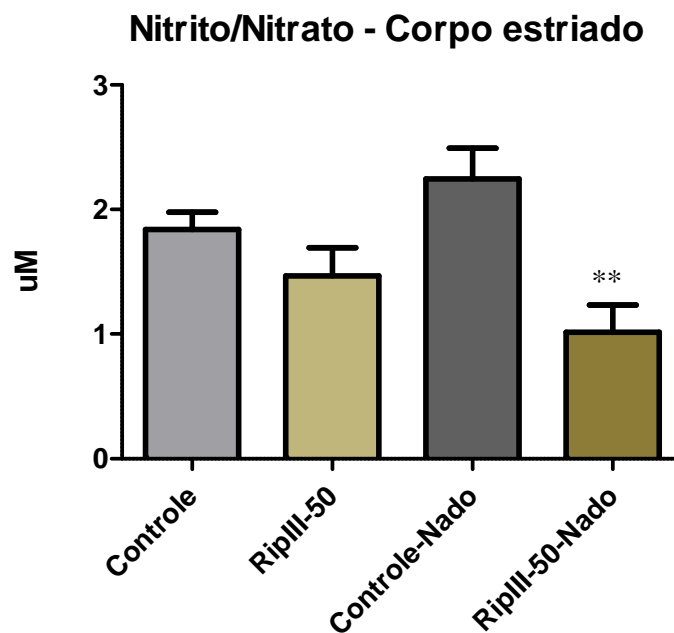
Médias ( $\mu\text{M}/\text{min}/\mu\text{g}$  de proteína)  $\pm$  EPM; (n) número de animais entre parênteses; ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  vs controle-nado; # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$  vs Controle.

**Figura 48- Efeitos da riparina III sobre a concentração de nitrito/nitrato em hipocampo de animais submetidos (Controle-Nado; RipIII-Nado) ou não (Controle; RipIII-50) ao estresse do nado forçado.**



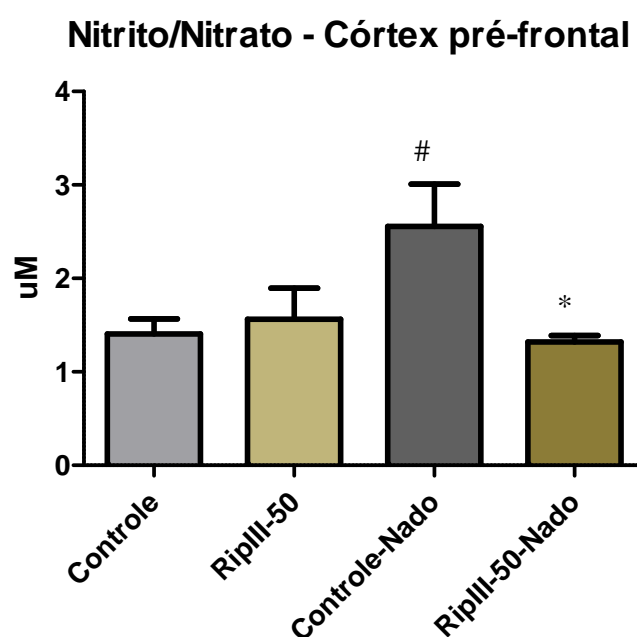
Os animais que não foram submetidos ao nado forçado, foram tratados com ripIII-50 ou veículo (2% Tween80 em água destilada) e depois de 2h foram sacrificados e tiveram seus cérebros dissecados para a remoção das áreas. Os animais que foram submetidos ao estresse foram tratados com ripIII-50 ou veículo, via oral, e depois de 60 minutos foram submetidos ao nado forçado e 60 min depois foram sacrificados e dissecados. Os valores representam a média  $\pm$  EPM, n = 6-8. \* $p < 0,05$  vs Controle-Nado; # $p < 0,05$  vs controle. ANOVA seguido de Student-Neuman-Keuls como teste *post hoc*.

**Figura 49 - Efeitos da riparina III sobre a concentração de nitrito/nitrato em corpo estriado de animais submetidos (Controle-Nado; RipIII-Nado) ou não (Controle; RipIII-50) ao estresse do nado forçado**



Os animais que não foram submetidos ao nado forçado, foram tratados com ripIII-50 ou veículo (2% Tween80 em água destilada) e depois de 2h foram sacrificados e tiveram seus cérebros dissecados para a remoção das áreas. Os animais que foram submetidos ao estresse foram tratados com ripIII-50 ou veículo, via oral, e depois de 60 minutos foram submetidos ao nado forçado e 60 min depois foram sacrificados e dissecados. Os valores representam a média  $\pm$  EPM, n = 6-8. \*\* $p < 0,01$  vs Controle-Nado. ANOVA seguido de Student-Neuman-Keuls como teste *post hoc*.

**Figura 50 - Efeitos da riparina III sobre a concentração de nitrito/nitrato em córtex pré-frontal de animais submetidos (Controle-Nado; RipIII-Nado) ou não (Controle; RipIII-50) ao estresse do nado forçado.**



Os animais que não foram submetidos ao nado forçado, foram tratados com ripIII-50 ou veículo (2% Tween80 em água destilada) e depois de 2h foram sacrificados e tiveram seus cérebros dissecados para a remoção das áreas. Os animais que foram submetidos ao estresse foram tratados com ripIII-50 ou veículo, via oral, e depois de 60 minutos foram submetidos ao nado forçado e 60 min depois foram sacrificados e dissecados. Os valores representam a média  $\pm$  EPM, n = 6-8. \* $p < 0,05$  vs Controle-Nado; # $p < 0,05$  vs controle. ANOVA seguido de Student-Neuman-Keuls como teste *post hoc*.



***DISCUSSÃO***

## 6 DISCUSSÃO

A depressão é uma desordem comum com grandes proporções na vida de um indivíduo. É a principal causa de incapacidade e causa morte tanto por suicídio quanto pelo aumento do índice de doenças físicas (PAYKEL, 2006). Devido ao seu complexo mecanismo, muitos antidepressivos disponíveis atualmente apresentam baixas resposta e remissão, até mesmo severos efeitos colaterais (SARKO, 2000). Neste contexto se faz necessária a busca de novos agentes com potencial terapêutico na depressão que apresentem grande responsividade e menores efeitos colaterais.

A utilização de plantas medicinais tornou-se um recurso terapêutico alternativo de grande aceitação pela população e vem crescendo junto à comunidade médica, que preza por plantas cujas atividades biológicas tenham sido investigadas cientificamente, comprovando sua segurança e eficácia (CECHINEL & YUNES, 1998; KINGORN, 2001). Dessa forma, existem diversos trabalhos na literatura mostrando o perfil antidepressivo de plantas e seus extratos como a *Hypericum perforatum* (CACCIA, 2005), *Cissampelos sympodialis* (ALMEIDA et al., 1998), *Terminalia bellirica Roxb* (DHINGRA & VALECHA, 2007), *Ginkgo biloba* (SAKAKIBARA et al., 2006) além de substâncias isoladas de plantas, como o carvacrol (isolado de óleo essencial de diversas plantas) (MELO et al., 2011) e as riparinas II e III (isoladas da planta *Aniba riparia*) (TEIXEIRA et al., 2011; MELO et al., 2006, 2011).

*Aniba riparia* (Nees) Mez, um herbáceo da família *Lauraceae*, popularmente conhecida como “louro”, “louro-faia” ou “pau-rosa”, é encontrada na Amazônia, Brasil (MARQUES, 2001). Do fruto verde desta planta foram isoladas diversas alcaloides, sendo uma delas a riparina III (BARBOSA-FILHO et al., 1987). Alguns trabalhos mostraram que esta substância apresenta efeitos farmacológicos: CASTELO-BRANCO et al., (1991) e CASTELO-BRANCO, (1992) mostraram que a ripIII apresenta efeitos espasmolíticos e THOMAS et al., (1994) concluiu que esse efeito estava relacionado com o metabolismo do  $Ca^{2+}$ , devido à inibição de influxo de  $Ca^{2+}$  para o meio intracelular e da inibição da

liberação dos estoques intracelulares de  $Ca^{2+}$ , não envolvendo a participação da geração de AMPc. Além disso, foi verificado, em outros estudos, que a ripIII apresenta atividade antimicrobiana contra cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (CATÃO et al., 2005).

Estudos prévios em nosso laboratório mostraram que a ripIII apresenta efeitos sobre o sistema nervoso central (SNC) como atividade anticonvulsivante em modelos de convulsão induzida por pentilenotetrazol, atividade ansiolítica em modelos de labirinto em cruz elevado e placa perfurada, que parece estar relacionado com ativação do sistema gabaérgico, e atividade antidepressiva em modelo de suspensão da cauda e nado forçado quando administrada por via intraperitoneal, sem contudo, apresentar efeito sedativo ou psicoestimulante em modelo de campo aberto, o que mostra que o efeito antidepressivo é específico (SOUSA et al., 2004).

Considerando que a depressão está entre as mais prevalentes formas de doença mental, que afeta cerca de 20% da população mundial, que é uma condição séria, recorrente e incapacitante com um pesado impacto social (BERNET, 2004) e que o tratamento com os antidepressivos atuais apresenta uma longa latência para início dos efeitos terapêuticos, além de apresentarem inúmeros efeitos colaterais, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito antidepressivo da ripIII, procurando identificar seus possíveis mecanismos de ação em comparação com alguns antidepressivos utilizados atualmente, como a imipramina (tricíclico), fluoxetina (inibidor seletivo da receptação de serotonina) e bupropiona (atípico – inibidor da receptação de dopamina) no teste do nado forçado.

Dessa forma, o presente estudo foi realizado através de análises das alterações comportamentais e neuroquímicas em camundongos. As alterações comportamentais foram investigadas através da elaboração de curva dose-resposta, confirmação do efeito antidepressivo da ripIII em modelos preditivos como o teste da suspensão da cauda e nado forçado, hipotermia induzida por apomorfina e campo aberto. Além disso, no teste do nado forçado foram investigados os possíveis mecanismos de ação sobre o sistema de

monoaminas, com a utilização de antagonistas específicos para cada subtipo de receptor da noradrenalina, serotonina e dopamina. Para os estudos neuroquímicos, foram realizadas análises dos níveis de monoaminas e seus metabólitos em HPLC eletroquímico em córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado. Realizou-se, ainda, avaliação da atividade de sistemas enzimáticos e produção de substâncias derivadas do estresse oxidativo com dosagem da atividade da enzima catalase e quantificação da concentração de superóxido dismutase, dos níveis da glutathiona reduzida (GSH), do conteúdo de nitrito e do índice de lipídio peroxidação em córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado de animais previamente tratados.

Modelos animais pré-clínicos são utilizados como uma maneira eficiente de estudar a etiologia de desordens humanas, como a depressão, por permitir o controle sobre a manipulação dos fatores estressantes sujeitos a homogeneidade. No entanto, pode ser difícil estudar “depressão” em roedores. Um desafio é selecionar as medidas qualitativas em ratos ou camundongos que são indicativos de depressão em humanos. De fato, os sintomas da depressão humana são frequentemente subjetivos e variáveis e às vezes, contraditórios (ex.: um paciente pode apresentar agitação psicomotora e outro pode apresentar retardo psicomotor). Além disso, alguns sintomas não podem ser medidos em animais de laboratório (ex.: ideias suicidas). Portanto, para que um modelo animal de depressão seja útil, ele deve apresentar maneiras de avaliar o grau de semelhança com este distúrbio clínico. Sendo assim, o modelo deverá apresentar respostas a intervenções terapêuticas semelhantes aquelas vistas nos pacientes deprimidos (validade preditiva), além de apresentar fatores precipitantes para o desenvolvimento da doença, similaridades comportamentais e motivacionais com o distúrbio clínico e mudanças neurobiológicas comuns (validade analógica) (WILLNER, 2005).

Dois modelos animais preditivos de ação antidepressiva, o teste do nado forçado e da suspensão da cauda, têm sido extensivamente utilizados para o desenvolvimento de novos compostos terapêuticos e para o entendimento dos mecanismos neuronais responsáveis pelo comportamento depressivo (WILLNER & MITCHELL, 2002; GEYER & MARKOU, 2002; CRYAN et al., 2002a; HOLMES, 2003). O teste do nado forçado,

modelo de desespero comportamental descrito originalmente por PORSOLT et al., (1977; 1978), é o modelo mais largamente utilizado para investigar a atividade farmacológica de antidepressivos. Neste teste, os animais são forçados a nadar em um recipiente com água de onde é impossível escapar. Inicialmente, há uma tentativa desesperada de sair dessa situação, quando os animais apresentam um período de vigorosa atividade seguida por momentos que permanecem imóveis, limitando-se aos movimentos necessários para manter suas cabeças fora d'água (PORSOLT et al., 1977).

A sensibilidade do nado forçado a uma ampla gama de antidepressivos é uma das mais importantes características que dão suporte ao seu uso como *screening* de drogas capazes de ser utilizadas na depressão, dando ao modelo uma validade preditiva. As classes de fármacos utilizadas clinicamente na depressão que são detectadas pelo nado forçado incluem os tricíclicos, inibidores da monominoxidase (MAO), atípicos, em menor grau, os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), além de alguns tratamentos somáticos, como a eletroconvulsoterapia e a privação de sono REM (BORSINI & MELI, 1988).

No entanto, alguns autores acreditam que o nado forçado é um modelo que não apresenta boa validade analógica, uma vez que os animais expostos ao nado precisariam apresentar mudanças na expressão gênica ou efeitos biológicos semelhantes àqueles observados na depressão humana, o que é bastante improvável após uma única sessão de 5 minutos (CRYAN ET al., 2005). Contudo, esta é uma questão controversa, pois outros autores acham que o comportamento de imobilidade provocado pela exposição a condições inescapáveis, que não podem ser modificadas pelo comportamento do animal, permite a melhor condição para medir os efeitos de drogas antidepressivas. Esta afirmativa pôde ser mostrada através de um estudo em que ratos foram submetidos ao nado, em uma situação escapável ou inescapável, e, somente na segunda situação os animais apresentaram um déficit de comportamento na tarefa de esquiva do choque (BROWN et al., 2001). Portanto, a identificação do papel do desespero comportamental na performance do nado forçado é uma importante maneira para estabelecer a sua validade analógica.

Portanto, levando em consideração a grande aceitação deste modelo como forma de investigação de drogas antidepressivas, foi escolhido o teste do nado forçado para avaliar o efeito da ripIII e investigar os seus possíveis mecanismos de ação. Inicialmente, foram utilizadas doses crescentes de ripIII, para selecionar a melhor dose com efeito antidepressivo e assim dar prosseguimento aos demais testes. Nas doses de 5 e 10 mg/kg, ripIII não apresentou alterações com relação ao controle, mas nas doses de 12,5, 25, 50 e 100 mg/kg, ripIII apresentou diminuição do tempo de imobilidade, sendo que as doses de 50 e 100 mg/kg apresentaram redução do tipo dose-dependente com relação a dose de 12,5 mg/kg. Então, para os testes, a dose utilizada foi de 50 mg/kg por ser uma dose intermediária, por ter efeito dose-dependente com relação a de 12,5 mg/kg e ainda por ter efeito semelhante a uma dose que é duas vezes mais elevada (100 mg/kg), o que pode diminuir o risco de toxicidade. Neste modelo, o efeito da ripIII-50 foi semelhante ao de antidepressivos utilizados normalmente na clínica contra a depressão, como a imipramina (tricíclico), a fluoxetina (ISRS) e a bupropiona (atípico).

Para corroborar com os efeitos antidepressivos da ripIII verificados no modelo do nado forçado foi realizado o teste da suspensão da cauda. Este teste baseia-se no fato de que camundongos, quando suspensos pela cauda demonstram um padrão temporal, alternando entre períodos de atividade (“comportamento de fuga”) e imobilidade (“comportamento de espera”), refletindo um “desespero comportamental” (PORSOLT et al., 1978) semelhante ao teste do nado forçado (STERU et al., 1985; WILLNER, 1984). Portanto, uma diminuição no tempo de imobilidade de um grupo submetido à administração de uma droga padrão ou teste, em relação ao grupo controle, sugere uma ação antidepressiva (STERU et al. 1985). Apesar de ambos os testes, nado forçado e suspensão da cauda, serem semelhantes em seus objetivos, o teste da suspensão da cauda apresenta uma maior sensibilidade em detectar atividade de antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) (CRYAN et al., 2005). Dessa forma, ao analisar os resultados obtidos neste trabalho, verificamos que a ripIII na dose de 50 mg/kg diminuiu o tempo de imobilidade de modo semelhante aos fármacos de referência como a fluoxetina (ISRS), imipramina (tricíclico) e bupropiona (atípico) e, de modo semelhante ao resultado obtido no teste do nado forçado com a mesma dose.

Dessa forma, apesar de alguns autores afirmarem que o teste do nado forçado apresenta menor sensibilidade em detectar antidepressivos ISRS, os resultados deste trabalho mostraram que na mesma dose de fluoxetina utilizada no nado forçado e na suspensão da cauda, houve uma diminuição do tempo de imobilidade, o mesmo ocorrendo com a ripIII na dose escolhida para investigação dos possíveis mecanismos de ação. Além disso, em nosso estudo, os dois modelos foram sensíveis em detectar as ações da imipramina e bupropiona tornando possível a investigação do envolvimento do sistema dopaminérgico, noradrenérgico e serotoninérgico no teste do nado forçado.

A disfunção da via dopaminérgica mesolímbica e mesocortical está primariamente implicada nas características de melancolia e cognição da depressão, respectivamente (MILLAN et al., 2000a, b; NARANJO et al., 2001; LEHR, 2002). Apesar de os antidepressivos, em geral, não aumentarem a liberação de dopamina no *nucleus accumbens*, eles fortalecem a sinalização dopaminérgica e propiciam mudanças adaptativas nos receptores D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> mesolímbicos, o que pode ser responsável pela melhora dos sintomas de anedonia (VETULANI & NALEPA, 2000), enquanto o aumento dos níveis de dopamina no córtex pré-frontal está relacionado com a melhora da depressão (ESPEJO & MINANO, 1999; MILLAN, 2004). Ainda evidenciando a participação da dopamina na depressão, estudos de neuroimagem demonstraram que a depressão maior está associada com um estado de redução na transmissão dopaminérgica que é compensada pela *up-regulation* dos receptores D<sub>2</sub> pós-sinápticos (DUNLOP & NEMEROFF, 2007). Além disso, a eletroconvulsoterapia (ECT), usada no tratamento da depressão quando resistente aos antidepressivos usuais causa uma redução no tempo de imobilidade no teste da suspensão da cauda, que é revertida pela sulpirida, implicando a ação do receptor D<sub>2</sub> no efeito antidepressivo deste tipo de tratamento (TESTE et al., 1990; YAMADA et al., 2004).

No presente trabalho, a investigação da participação do sistema dopaminérgico foi realizada através do pré-tratamento dos animais com antagonista D<sub>1</sub>, SCH23390, ou D<sub>2</sub>, sulpirida, antes da administração de ripIII no nado forçado, revelando que o efeito antidepressivo da ripIII foi impedido somente pela sulpirida, sugerindo um envolvimento

da ripIII com o receptor  $D_2$ , mas não  $D_1$  para exercer seu efeito antidepressivo. Uma vez que o receptor  $D_2$  pode estar localizado tanto pré- quanto pós-sinapticamente, acredita-se que o efeito observado possa estar relacionado com a interação de ripIII com o receptor  $D_2$  pós-sináptico, pois se houvesse estimulação dos receptores pré-sinápticos haveria uma diminuição dos níveis de dopamina e consequente diminuição do efeito antidepressivo, o que não foi observado no grupo tratado com ripIII sozinha. Por outro lado, se se tratasse de um bloqueador do receptor pré-sináptico, a associação de ripIII com sulpirida ocasionaria uma potenciação de efeitos, o que também não foi verificado. No entanto, a associação de ripIII com sulpirida ocasionou uma reversão do efeito antidepressivo o que sugere que a ripIII provavelmente necessita do receptor  $D_2$  pós-sináptico livre para, em parte, exercer seu efeito antidepressivo.

Estudos experimentais e clínicos indicam que o sistema noradrenérgico está fortemente implicado na fisiopatologia da depressão (FRASER, 2000; NUTT, 2006), provavelmente associado com uma hipofunção desse sistema e, alguns antidepressivos, como a reboxetina e a mirtazapina, agem aumentando a disponibilidade sináptica de noradrenalina (BRUNELLO et al., 2003). Além disso, DZIEDZICKA-WASYLEWSKA e colaboradores (2006) mostraram que camundongos nocautes para o transportador de noradrenalina obtiveram comportamento semelhante aos do tipo selvagem quando tratados agudamente com reboxetina, desipramina e imipramina no nado forçado e na suspensão da cauda.

A maioria dos antidepressivos que promove um aumento da disponibilidade de noradrenalina na fenda atua através de três mecanismos principais: inibição da recaptação neuronal, inibição do metabolismo intraneuronal ou por liberação do conteúdo neuronal através do bloqueio do receptor autoinibitório  $\alpha_2$ -adrenérgico (ELHWUEGI, 2004). No entanto, pré-clinicamente, não só os receptores  $\alpha_2$ -adrenérgico, mas também os receptores  $\alpha_1$ -adrenérgico constituem a base para as respostas antidepressivas de drogas em modelos comportamentais de depressão (MASUDA et al., 2001).



Alguns autores descrevem que o tratamento crônico com antidepressivos gradualmente promove uma *downregulation* nos autoreceptores inibitórios  $\alpha_2$ -adrenérgicos que está aumentado em pacientes deprimidos ou em condições de estresse crônico (FLUGGE et al., 2003; ORDWAY et al., 2003). Como o receptor  $\alpha_2$ -adrenérgico modula a liberação de noradrenalina e outros neurotransmissores, a diminuição na densidade desses receptores permite uma maior liberação de noradrenalina, resultando em melhora do humor e da motivação nas desordens depressivas (SCHRAMM et al., 2001). Além disso, O'NEILL & CONWAY (2001) mostraram que o efeito antidepressivo da clonidina (um agonista  $\alpha_2$ -adrenérgico) foi impedido pela ioimbina (antagonista  $\alpha_2$ -adrenérgico) no teste do nado forçado, reforçando a participação desse receptor no processo depressivo.

Também existem evidências para o envolvimento do receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico nas ações de fármacos antidepressivos, pois estudos prévios mostraram que a ação antidepressiva da desipramina foi impedida pela prazosina (antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico) (DANYSZ et al., 1986). Complementando esses achados, estudos mais recentes mostraram que o bloqueio desses receptores imita o estado depressivo e que as condições de estresse crônico dessensibilizam esse receptor induzindo a depressão (STONE et al., 2003). Por outro lado, o tratamento crônico com antidepressivos tricíclicos e a ECT aumentam a densidade e a atividade funcional dos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgico em áreas cerebrais como o hipocampo e córtex pré-frontal (STONE et al., 2003).

Em nossos achados, a ripIII teve seu efeito antidepressivo impedido pelo pré-tratamento com prazosina (antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico) e também pela ioimbina (antagonista  $\alpha_2$ -adrenérgico) sugerindo que a ripIII também interage com os receptores do sistema noradrenérgico,  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ , para exercer seus efeitos, além do receptor  $D_2$  da dopamina. O efeito antidepressivo da ripIII parece estar envolvido com a modulação desses receptores ao mesmo tempo, uma vez que ao bloquear cada um separadamente, em situações diferentes, o efeito foi completamente revertido aos níveis dos animais controle, sugerindo uma interação entre os sistemas de monoaminas para restabelecer as funções normais e eliminar os sintomas da depressão.

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 recaptação de serotonina (ISRS). Corroborando com essas evidências, estudos mostram que a depleção de 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 prescritos atualmente afetam a renovação de serotonina, inibem a sua recaptação e também interagem com os receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2</sub> e possivelmente com os receptores 5-HT<sub>3</sub> (CRYAN et al., 2005).

REDROBE et al., (1998a, b) mostrou que o inibidor da enzima triptofano hidroxilase, PCPA, administrado em camundongos por quatro dias consecutivos era capaz de depletar os estoques endógenos de 5-HT em cerca de 60% sem, contudo, afetar os níveis de noradrenalina e dopamina. Estudos mais recentes mostram que o PCPA foi capaz de impedir os efeitos antidepressivos da fluoxetina, um ISRS, quando usada como padrão positivo (RODRIGUES et al., 2002; MACHADO et al., 2007). No presente estudo, o pré-tratamento com PCPA, por quatro dias foi efetivo em causar o bloqueio do efeito anti-imobilidade da ripIII no nado forçado. A reversão do efeito antidepressivo da ripIII pelo pré-tratamento com PCPA sugere que o seu efeito no nado forçado pode ser dependente da disponibilidade de 5-HT na fenda sináptica. Semelhante a outros achados, o PCPA sozinho não alterou a imobilidade dos animais controle, mas significativamente bloqueou o efeito da fluoxetina (KASTER et al., 2005). Dessa forma, considerando que o PCPA, agindo pré-sinápticamente (LUSCOMBE et al., 1993), foi capaz de prevenir o efeito antidepressivo da ripIII no nado forçado, é provável que a expressão do efeito antidepressivo da ripIII requeira o sistema serotoninérgico pré-sináptico intacto.

Vários estudos tem demonstrado o envolvimento dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> no mecanismo de ação de drogas antidepressivas (BLIER & WARD, 2003), incluindo tricíclicos, ISRS e iMAO (HENSLER, 2002; HIRVONEN et al., 2008). O receptor 5-HT<sub>1A</sub> está localizado mais densamente pré-sinápticamente no núcleo da rafe dorsal e medial onde exerce função de autoreceptor, porque a sua estimulação diminui a frequência de descarga

dos neurônios serotoninérgicos, síntese e liberação de serotonina e pós-sinápticamente está amplamente distribuído no hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal onde exerce seu efeito de melhora dos sintomas depressivos (KREISS & LUCKI, 1994).

Foi previamente mostrado que o bloqueio dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>, pelo antagonista NAN-190, preveniu as respostas antidepressivas de agonistas serotoninérgicos (8-OH-DPAT e buspirona) e de antidepressivos tricíclicos (desipramina) no nado forçado em ratos (DETKE et al., 1995). Além disso, esses receptores parecem ser necessários para os efeitos de ISRS em modelos comportamentais agudos e crônicos (MAYORGA et al., 2001), pois os ISRS, fluoxetina e paroxetina, falharam em diminuir a imobilidade no teste da suspensão da cauda em camundongos mutantes para o receptor 5-HT<sub>1A</sub>, mas não em camundongos selvagens e em camundongos mutantes do receptor 5-HT<sub>1B</sub> (MAYORGA et al., 2001). Ainda contribuindo para a importância desse receptor na etiologia da depressão, foi observada uma diminuição potencial nas ligações ao receptor 5-HT<sub>1A</sub>, determinadas por tomografia de emissão de pósitrons, em diversas áreas cerebrais de pacientes deprimidos, incluindo o córtex pré-frontal e o hipocampo (DREVETS et al., 1999; SARGENT et al., 2000). Portanto, uma deficiência na expressão e função desses receptores é um importante fator no desenvolvimento da depressão (LEITCH et al., 2003).

Uma vez que os agonistas do receptor 5-HT<sub>1A</sub> testados clinicamente até o momento são agonistas parciais fracos, o desenvolvimento de agonistas com maior afinidade aos receptores pós-sinápticos pode levar a produção de medicamentos mais eficazes (BLIER & WARD, 2003). Nossos achados mostraram que o efeito anti-imobilidade da ripIII, assim também como da fluoxetina, foi impedido pelo pré-tratamento com NAN-190 (antagonista 5-HT<sub>1A</sub>) o que sugere a necessidade de participação do receptor 5-HT<sub>1A</sub> no efeito antidepressivo da ripIII.

Estudos pré-clínicos e clínicos têm relatado a importância dos receptores 5-HT<sub>2</sub>, especialmente os subtipos 5-HT<sub>2A</sub> e 5-HT<sub>2C</sub>, na fisiopatologia da depressão assim também como na ação de vários antidepressivos (CRYAN & LUCKI, 2000; ELHWUEGI, 2004; BOOTHMAN et al., 2006; WANG et al., 2008). Alguns trabalhos mostraram que a

administração de antidepressivos causava uma *downregulation* nesses subtipos de receptores (DEAKIN, 1988). Outras evidências mostraram que a mianserina, antidepressivo atípico, apresenta alta afinidade por estes subtipos de receptor (PAZOS et al., 1984), assim como os tricíclicos apresentam moderada afinidade (JENCK et al., 1994) e outros estudos mostram ainda que os ISRS podem exercer seus efeitos, em parte, ao ativar o receptor 5-HT<sub>2C</sub> (LUCKI et al., 1989). Corroborando com esses achados, um estudo mostra que o efeito de redução da imobilidade de um agonista do receptor 5-HT<sub>2C</sub>, WAY161503, foi completamente bloqueado pelo antagonista seletivo SB206533 e pela mianserina (CRYAN & LUCKI, 2000) e ainda que, o agonista seletivo do receptor 5-HT<sub>2A</sub>, DOI, aumenta o efeito antidepressivo de alguns compostos (KHISTI & CHOPDE, 2000; ZOMKOWSKI et al., 2004).

Neste trabalho, revelamos que apesar de alguns autores relatarem a importância do receptor 5-HT<sub>2A/2C</sub> no processo depressivo e no efeito de diversos fármacos utilizados na clínica, o efeito antidepressivo da ripIII não é dependente desses subtipos, uma vez que o bloqueio desses receptores com a ritanserina não impediu que a ripIII exercesse seu efeito anti-imobilidade, corroborando com achados de outros autores que obtiveram resultados semelhantes (SUGIMOTO et al., 2010), sugerindo a participação principalmente do receptor 5-HT<sub>1A</sub> no tratamento da depressão.

Apesar do bom conhecimento da participação da neurotransmissão serotoninérgica na depressão, existem apenas alguns relatos de evidências relacionando a participação dos receptores 5-HT<sub>3</sub> na fisiopatologia desta doença. Diferentemente dos outros receptores de serotonina, o receptor 5-HT<sub>3</sub> é um receptor da superfamília de canais iônicos permeáveis aos íons Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> e K<sup>+</sup> (BOESS et al., 1995; GREEN et al., 1995; BARRERA et al., 2005). Dos estudos com animais, é conhecido que 70-80% dos receptores 5-HT<sub>3</sub> no cérebro estão localizados pré-sinápticamente associados com axônios e nervos terminais, exceto no hipocampo onde eles estão localizados principalmente pós-sinápticamente em regiões somatodendríticas (MIQUEL et al., 2002). A expressão prevalente desse receptor nos nervos terminais é consistente com seu papel fisiológico na liberação de neurotransmissores

como a dopamina, colecistocinina, glutamato, acetilcolina e GABA (HANNON & HOYER, 2008).

Alguns relatos têm indicado que diferentes classes de antidepressivos agem como antagonistas funcionais dos receptores 5-HT<sub>3</sub>, indicando que a supressão da atividade do receptor pode contribuir para a ação de antidepressivos (EISENSAMER et al., 2003). Outros relatos mostram que a administração aguda de antagonistas deste receptor diminui a duração da imobilidade no teste do nado forçado (BRAVO & MASWOOD, 2006) e que, enquanto agonistas do receptor 5-HT<sub>3</sub> atenuam a diminuição da imobilidade produzida pela imipramina, desipramina e minserina, antagonistas potencializam o efeito de vários ISRS (NAKAGAWA et al., 1998). Corroborando com esses achados, existem evidências para a relevância de antagonistas 5-HT<sub>3</sub> no tratamento da depressão em estudos clínicos nos quais pacientes que sofrem de distúrbios complexos como a fibromialgia e bulimia mostraram melhora na comorbidade depressão (HAUS et al., 2000; FARIS et al., 2006).

No entanto, existem evidências consistentes de que a eletroconvulsoterapia, tratamento clínico utilizado em casos refratários ao tratamento com antidepressivos, é capaz de potencializar a função dos receptores 5-HT<sub>3</sub> no hipocampo, uma região extremamente relacionada com a etiologia da depressão (KRISHNAN et al., 1991; ISHIHARA & SASA, 2001). Os resultados deste trabalho estão de acordo com os autores que afirmam que a estimulação do receptor melhora os sintomas da depressão, uma vez que a ripIII teve seu efeito antidepressivo prevenido pela administração de ondansentron, um antagonista do receptor 5-HT<sub>3</sub>. Sendo assim, o efeito de agonistas ou antagonistas em melhorar o quadro depressivo é dependente da região cerebral e da localização do receptor. Como os receptores 5-HT<sub>3</sub> no hipocampo são pós-sinápticos e a estimulação desses receptores apresentou melhora da depressão, podemos sugerir que agonistas do receptor 5-HT<sub>3</sub> pós-sináptico, assim também como antagonistas 5-HT<sub>3</sub> pré-sináptico, exercem efeito de melhora nos quadros depressivos e que provavelmente, a ripIII necessita da atividade dos receptores 5-HT<sub>3</sub> pós-sinápticos no hipocampo.

Os resultados obtidos no teste do nado forçado sobre a investigação da participação dos sistemas de monoaminas no efeito antidepressivo da ripIII sugeriu que esta droga necessita da participação do sistema dopaminérgico com o envolvimento do receptor  $D_2$ , da participação do sistema noradrenérgico, com o envolvimento dos receptores  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ , além da participação do sistema serotoninérgico, uma vez que a depleção de serotonina impediu o efeito antidepressivo, tanto quanto o bloqueio dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>3</sub>. Sabemos que a maioria dos antidepressivos utilizados atualmente apresentam seus efeitos bioquímicos primários ao regular as concentrações sinápticas de noradrenalina, serotonina e/ou dopamina, mas não as três ao mesmo tempo. No entanto, drogas que inibem a recaptação de serotonina, noradrenalina e dopamina (inibição de recaptação tripla) têm sido recentemente desenvolvidas por produzir um início de ação mais rápido e por possuir melhor eficácia que os antidepressivos clássicos (CHEN & SKOLNICK, 2007; ALUSIO et al., 2008; LIANG et al., 2008; MICHELI et al., 2010; POPIK et al., 2006), o que torna a ripIII uma possível droga promissora para o tratamento da depressão.

O teste do nado forçado é um ótimo modelo em detectar agentes antidepressivos, pois cerca de 94% dos antidepressivos diminuem o tempo de imobilidade (BORSINI & MELI, 1988). Além disso, este teste é capaz de discriminar antidepressivos de neurolépticos e ansiolíticos (BORSINI & MELI, 1988). No entanto, o principal consistente falso positivo no nado forçado, trata-se da diminuição do tempo de imobilidade por parte dos fármacos psicoestimulantes sem que, contudo, apresentem efeito antidepressivo. Portanto, a maioria dos estudos realizam testes de atividade locomotora, uma vez que antidepressivos não alteram ou diminuem o padrão de locomoção enquanto os psicoestimulantes aumentam (CRYAN et al., 2005). Para descartar o efeito psicoestimulante da ripIII foi então investigado a atividade locomotora dos animais no modelo do campo aberto.

O teste do campo aberto é empregado para avaliar a atividade exploratória dos animais. A tendência natural do animal em um ambiente novo é a de explorá-lo, apesar do estresse e do conflito provocado por este ambiente (MONTGOMERY, 1958). Desta forma, a atividade locomotora em roedores, observados no campo aberto, é o parâmetro

comportamental mais usado para descrever influências dos eventos da vida ou da administração de drogas (MONTGOMERY, 1958; ARAKAWA & IKEDA, 1991; REX et al., 1996). Neste teste, os animais tratados com ripIII não tiveram a atividade locomotora alterada quando comparado aos animais controle, do mesmo modo que a fluoxetina e a bupropiona, enquanto a imipramina teve a atividade diminuída. Esse resultado sugere que o efeito antidepressivo da ripIII, neste modelo preditivo, é específico, e não relativo a um aumento na atividade motora dos animais.

O modelo da hipotermia induzida por alta dose de apomorfina foi utilizado para comparar o efeito de um antidepressivo tricíclico, imipramina, com o da ripIII. A apomorfina é conhecidamente um agonista dos receptores de dopamina e que, quando administrada em baixas doses induz hipotermia que pode ser revertida por neurolépticos, como a pimozida e a sulpirida, mas quando administrada em altas doses também induz hipotermia que pode ser revertida por antidepressivos tricíclicos, mas não pela pimozida ou sulpirida, sugerindo um não-envolvimento dos receptores dopaminérgicos mas, possivelmente, o envolvimento com os receptores  $\beta$ -adrenérgicos (PUECH et al., 1978; MENON et al., 1984).

No presente estudo, a hipotermia foi induzida por alta dose de apomorfina e foi diminuída pela imipramina, que permite a ativação de receptores  $\beta$ -adrenérgicos ao inibir a recaptção de noradrenalina levando a diminuição da hipotermia. No entanto, a ripIII não foi capaz de reverter nem diminuir a hipotermia induzida por alta dose de apomorfina, mostrando que seu efeito antidepressivo não deve estar relacionado com a participação do receptor  $\beta$ -adrenérgico. Esse resultado sugere que o efeito da ripIII não é semelhante ao dos tricíclicos, uma vez que inibindo a recaptção permitiria a interação de noradrenalina em qualquer dos seus subtipos de receptor. Contudo, ripIII parece não inibir a recaptção de noradrenalina, uma vez que não há interação com o receptor  $\beta$ -adrenérgico, e ainda sugere que a interação com os receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, vista anteriormente parece ser direta. Ainda assim, a ripIII sozinha não foi capaz de induzir hipotermia, sugerindo que esta droga não interage com receptores dopaminérgicos no hipotálamo, mas sim em regiões específicas envolvidas com a depressão, como visto anteriormente.

Existem muitos relatos indicando que antidepressivos usados na clínica poderiam melhorar o estado depressivo pela regulação dos neurotransmissores monoaminérgicos, DA, 5-HT e NA, em diversas áreas cerebrais (IMPERATO et al., 1994; KIRBY et al., 1995; SAVEGNAGO et al., 2007). Tem sido sugerido que o aumento dos níveis de monoaminas na sinapse é o primeiro passo para a atividade de antidepressivos (PIÑEYRO & BLIER, 1999). Estudos mais recentes têm demonstrado que o córtex pré-frontal, o hipocampo, corpo estriado e amígdala são regiões relacionadas com a depressão (DREVETS, 2000; 2001; JARACZ, 2008).

Além disso, a diminuição nas concentrações cerebrais de 5-HT e seu principal metabólito 5-HIAA foi comumente encontrada em pacientes e em animais que passaram por situações de estresse e depressão, sugerindo uma disfunção no sistema serotoninérgico (SPREUX-VARQUAUX et al., 2001; SOUTHWICK et al., 2005; MITANI et al., 2006). Achados clínicos mostraram que a maioria dos agentes antidepressivos utilizados atualmente induziram um aumento na disponibilidade de 5-HT, e que este aumento estava relacionado com seu efeito terapêutico (WILNER, 1985; BOURIN et al., 2002; BLIER & WARD, 2003; TRIVEDI et al., 2004; DASZUDA et al., 2005). Outros estudos mostram que níveis de DOPAC (ácido 3,4-diidroxifenilacético) em córtex pré-frontal (CLAUSTRE et al., 1986) e no núcleo caudado acompanhado de um aumento do 5-HIAA (ácido 5-hidroxiindolacético) (IKEDA; NAGATSU, 1985) é decorrente do estresse induzido pelo nado forçado.

Levando em consideração as alterações nos níveis das monoaminas e o estado depressivo (ANISMAN & ZACHARKO, 1990), foi decidido investigar como o tratamento com a ripIII poderia interferir com os níveis de serotonina, dopamina e noradrenalina e seus metabólitos em áreas extremamente relacionadas com a depressão como o corpo estriado, hipocampo e córtex pré-frontal. Além disso, foram calculadas as taxas de metabolização para compreensão da renovação das monoaminas e assim, compreender melhor o seu mecanismo de ação.



Os resultados deste trabalho mostram que os animais tratados com ripIII e submetidos ao nado forçado aumentaram os níveis de DA, na dose de 50mg/kg, 5-HT, nas doses de 25 e 50 mg/kg e NA na dose de 25 mg/kg no corpo estriado, enquanto diminuíram os metabólitos de DA, HVA e DOPAC em ambas doses, e de 5-HT, 5-HIAA sugerindo um aumento e permanência dessas monoaminas livres. Além disso, houve diminuição das taxas de metabolização DOPAC/DA, HVA/DA e 5-HIAA/5-HT indicando aumento do fluxo destas monoaminas nesta região. De modo semelhante, no córtex pré-frontal houve um aumento da DA, nas doses de 25 e 50 mg/kg, 5-HT na dose de 50 mg/kg e de NA na dose de 25 mg/kg, além de ter diminuído os metabólitos DOPAC e 5-HIAA e as taxas de metabolização DOPAC/DA e 5-HIAA/5-HT mostrando um aumento na permanência das monoaminas na fenda e um aumento no fluxo dessas aminas biogênicas. No hipocampo, a ripIII aumentou apenas os níveis de 5-HT e NA em ambas doses estudadas, além de ter aumentado o metabólito 5-HIAA. As taxas de metabolização não foram alteradas. Estas observações sugerem que a ripIII possa atuar por mecanismos dopaminérgicos, serotoninérgicos e noradrenérgicos em corpo estriado, córtex pré-frontal e hipocampo, uma vez que aumenta o nível das monoaminas, diminui seus metabólitos e reduz a taxa de metabolização aumentando o fluxo ou renovação destas, em áreas envolvidas com a depressão, além de interagir com receptores dessas monoaminas, como observado nos testes comportamentais, e de acordo com outros estudos que mostram que a diminuição de dopamina no corpo estriado é um indicativo de depressão (IMPERATO et al., 1994) e que, as concentrações de 5-HT e DA estão diminuídas nessas áreas após a exposição ao teste do nado forçado e que pode ser revertida por antidepressivos (XIA et al., 2007) e de estudos que indicam que a taxa de metabolização de 5-HT e DA está aumentada após o nado forçado nas áreas estudadas (CONNOR et al., 1999; NODA et al., 2000) que pode ser reduzida por antidepressivos, assim como fez a ripIII em nosso estudo.

Apesar de o mecanismo de indução da depressão não estar totalmente esclarecido, já foi observado que a exposição crônica ao estresse pode induzir severas desordens psiquiátricas pela geração de radicais livres, incluindo esta patologia (DE KLOET et al., 2005). Radicais livres são produzidos constitutivamente sob condições fisiologicamente

normais e incluem as espécies reativas de oxigênio (EROs), como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o radical hidroxila ( $OH\cdot$ ), o radical peróxido ( $ROO\cdot$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), bem como as espécies reativas de nitrogênio (ERNs), como o óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) e as espécies reativas do cloro, como o ácido hipocloroso (HOCl) (MOSLEY et al., 2006). Os organismos produzem vários mecanismos de defesa para proteger a si próprios contra a injúria provocada por esses radicais livres, como por exemplo, enzimas antioxidantes (catalase, glutathiona peroxidase e superóxido dismutase), varredores de radicais livres e agentes quelantes metálicos (REITER, 1995). Geralmente existe um balanço entre a produção de radicais livres e a atividade do sistema de defesa antioxidante. 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 (HALLIWELL, 1992). O estresse oxidativo gera reações em cadeia causando danos em lipídios polinsaturados de membrana, proteínas e DNA, e, os neurônios sofrem injúria ou até morte (NIKKI et al., 1993; ZHAO et al., 2008).

Dessa forma, tem sido relatado que o estresse oxidativo, via produção de radicais livres, pode apresentar um importante papel na fisiopatologia da depressão (NG et al., 2008). Alguns estudos mostram que alterações biológicas oxidativas estão sendo grandemente reconhecidas como uma rota crítica para danos observados na depressão induzida pelo estresse (BERK, 2007) 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 nesses pacientes (OZCAN et al., 2004). Outros ainda mostram que, nas desordens psiquiátricas relacionadas ao estresse, o estresse oxidativo desencadeia ou exacerba várias rotas de dano, como a disfunção mitocondrial, desregulação da homeostase do cálcio, alteração de rotas energéticas, dano a precursores neuronais, inibição da neurogênese e indução de eventos sinalizadores de apoptose (CREGAN et al., 2002). Além disso, numerosos distúrbios oxidativos têm sido relatados em pacientes deprimidos, incluindo o aumento do dano oxidativo e diminuição do nível de enzimas antioxidantes (NG et al., 2008; SARANDOL et al., 2007) e, ainda, estudos pré-clínicos têm sugerido que antioxidantes (varredores de radicais livres) podem apresentar

propriedades antidepressivas (EREN et al., 2007; ZAFIR et al., 2009). Parece razoável a proposta de que antioxidantes exógenos possam ser utilizados no tratamento da depressão, uma vez que muitos antidepressivos sintéticos disponíveis apresentam baixas proporções de resposta, remissão e severos efeitos adversos (NESTLER et al., 2002).

Sendo assim, a associação existente entre o estresse oxidativo e fisiopatologia da depressão e o papel de antioxidantes nas ações terapêuticas dos antidepressivos têm sido constantemente relatado (BILICI et al., 2001; KHANZODE et al., 2003; CUMURCU et al., 2009). Algumas drogas antidepressivas têm mostrado um aumento na expressão de genes de importantes enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD) (KOLLA et al., 2005). Já foi observado também que a fluoxetina pode reverter e prevenir o dano oxidativo observado no estresse psicológico induzido, como foi evidenciado pela elevação não só da atividade da SOD, mas também pela ativação de uma série de componentes-chave do sistema antioxidante endógeno (ZAFIR & BANU, 2007). ZAFIR et al., 2009 observaram que a administração de drogas antidepressivas e, dentre elas, a imipramina, reduziu a atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase, glutathione S-transferase, glutathione redutase e a concentração de malonildialdeído e proteínas carboniladas no tecido cerebral de animais submetidos ao estresse.

Como já foi dito previamente, o teste do nado forçado é um modelo animal pré-clínico bem estabelecido e representa um evento de estresse agudo (PORSOLT et al., 1977). AKHTAR et al., 2005 relataram a existência de estresse oxidativo no teste do nado forçado. Além disso, ABDEL-WAHAB et al., 2011 expuseram que o estresse agudo do nado forçado não só aumenta a produção de EROs e ERNs como também atenua as defesas antioxidantes, o que dá suporte ao método utilizado neste trabalho. Dessa forma, esses achados incentivaram o estudo do potencial efeito antioxidante da ripIII através da dosagem da atividade da enzima catalase e superóxido dismutase, dos níveis da glutathione reduzida (GSH), do conteúdo de nitrito e do índice de lipídio peroxidação em três áreas extremamente relacionadas com a depressão, como o córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado de animais submetidos ao estresse do nado forçado.

O ânion superóxido ( $O_2^-$ ), 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 (superóxido dismutase) a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical menos tóxico, que, por sua vez, é detoxificado pela catalase e glutathione peroxidase (GSH-Px) que necessita da glutathione reduzida (GSH) servindo como cofator desta enzima. Essas enzimas constituem, assim, um sistema antioxidante endógeno, que atua prevenindo o dano neuronal induzidos pelas EROs (REMMEN et al., 2004). A glutathione é uma enzima especializada na remoção de peróxidos do mesmo modo que a catalase, mas estas têm localizações distintas no SNC. A catalase é mais abundante nos astrócitos do que em neurônios, e mais na substância branca do que na cinzenta, mas pode ser induzida em neurônios pela ação das neurotrofinas. Os componentes do sistema da glutathione peroxidase, GSH, glutathione redutase e NAD(P)H estão presentes na mitocôndria, bem como no citoplasma dos neurônios.

Uma elevação na formação de radicais livres pode ser acompanhada por aumento compensatório imediato na atividade de enzimas inativadoras de radicais livres. O estresse agudo do nado forçado pode alterar sistemas antioxidantes e ativar enzimas responsáveis pela remoção de EROs, como a SOD e a catalase, além de reduzir GSH, indicando uma resposta celular à elevação na formação de espécies reativas do oxigênio (ABDEL-WAHAB et al., 2011).

Os resultados deste trabalho mostraram que a ripIII, nas três áreas, não alterou os níveis de SOD em condições normais. No entanto, foi observado um comportamento adaptativo em animais submetidos ao estresse agudo do nado forçado, observado pela elevação dos níveis de SOD, no hipocampo e no córtex pré-frontal, em animais controle, mas, a ripIII não foi capaz de reduzir esses níveis, concluindo que houve uma intensa transformação de ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, evidenciando o estresse oxidativo. No córtex pré-frontal, todos os grupos apresentaram os níveis desta enzima semelhantes ao do grupo controle. Quando analisamos a atividade da catalase, nas três áreas estudadas, observamos que a ripIII tinha reduzido esta atividade, após o estresse induzido pelo nado forçado, mas não em condições normais, mostrando que, a princípio

não houve detoxificação de peróxido de hidrogênio, o que poderia sugerir um efeito pró-oxidante da ripIII. No entanto, ao observar a quantidade de GSH, observamos que houve um aumento significativo deste cofator enzimático, nas três áreas, após o estresse induzido pelo nado forçado e, no corpo estriado também em condições normais, levando-nos a concluir que o peróxido de hidrogênio produzido pela SOD teria sido detoxificado pela GSH e não pela catalase, sugerindo que a ripIII apresenta efeito antioxidante por aumentar os níveis de GSH, nas três áreas estudadas. Portanto, o aumento da GSH pode ter ocorrido por um mecanismo gerenciado pelos neurônios hipocampais, pré-corticais e estriatais, de alguma forma estimulados pela ripIII, para eliminar os radicais gerados pela inibição da atividade da catalase.

O fato de a ripIII não alterar os níveis de enzimas antioxidantes por si está de acordo com outros estudos que mostram que a administração de antidepressivos não afeta o status de enzimas antioxidantes em animais não estressados. Isto revela que os fármacos antidepressivos não apresentam efeito antioxidante na ausência de condições de estresse oxidativo; ao invés disso, eles interferem diretamente nos caminhos induzidos pelo estresse para o dano oxidativo (LUCASSEN et al., 2004). Além disso, o aumento de GSH também é observado em estudos com antidepressivos e provavelmente apresenta efeitos inibitórios em eventos sinalizadores na morte celular apoptótica que é engatilhada pela perda de glutathiona e aumento do dano oxidativo (ZAFIR et al., 2009). Além disso, a concentração de SOD aumentada, observada aqui pelo tratamento com a ripIII, e em outros estudos com antidepressivos, é um importante mecanismo de defesa contra apoptose, portanto prevenindo a atrofia em regiões cerebrais na depressão induzida pelo estresse (ZAFIR et al., 2009). Esses achados são promissores para um estudo futuro com a administração crônica de ripIII e investigar um possível efeito neuroprotetor nas áreas aqui observadas, uma vez que a terapia antidepressiva causa *upregulation* na expressão de SOD e pode estar relacionada com a prevenção da piora dos sintomas afetivos que podem estar direta ou indiretamente relacionados com a neurodegeneração (LI et al., 2000).

Existem evidências de que a depressão apresenta sinais aumentados de estresse oxidativo e que há participação dos caminhos do NO na sua patogenia. O estresse exerce

efeitos deletérios em inúmeras funções celulares, através do impedimento dos sistemas antioxidantes, levando ao estresse oxidativo que é a causa central de vários sintomas da doença depressiva (TORRES et al., 2004). O NO desempenha um importante papel em praticamente todos os sistemas do organismo (EISERICH *et al.*, 1998 *alinea*). Embora exerça diversas funções fisiológicas úteis, quando em excesso, o NO pode exercer efeitos nocivos. Em determinadas condições, o NO e o  $O_2^-$  podem interagir, resultando na formação de peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), um produto extremamente tóxico. Esse composto é capaz de reagir com diversas moléculas: proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos, danificando-as. Além disso, seus prováveis produtos de decomposição, o radical OH<sup>-</sup> e o dióxido de nitrogênio, dentre outros, têm semelhante potencial deletério (RADENOVIC *et al.*, 2003).

Pesquisadores têm focado nas ações bioquímicas e moleculares do óxido nítrico, em condições normais, assim também como sua alteração potencial em condições patológicas como a depressão (GARG et al., 2008). O nitrito (metabólito estável do NO) pode ser associado com a fisiopatologia da depressão, uma vez que elevados níveis de peroxinitrito, e seu precursor, óxido nítrico, tem sido bem documentado na fisiopatologia da depressão induzida pelo estresse (WEGENER et al., 2010; RICHARD et al., 2007; SANDERS & KORF, 2007; OZCAN et al., 2004; PALL, 2007) e que há um aumento na expressão de iNOS hipocampal durante o estresse (HARVEY et al., 2006). Outros achados demonstraram que a inibição da NOS exercem efeitos antidepressivos em modelos animais de depressão (Da SILVA et al., 2000; YILDIZ et al., 2000).

Nossos resultados demonstraram um aumento na produção de nitrito-nitrato no hipocampo e no córtex pré-frontal dos animais submetidos ao estresse pelo nado forçado, enquanto que no corpo estriado não houve alteração, apesar de ter havido uma tendência em aumentar, confirmando a participação desses metabólitos no processo depressivo. O pré-tratamento com ripIII, todavia, foi capaz de reverter a elevação dos níveis de nitrito-nitrato no hipocampo e córtex pré-frontal em animais submetidos ao nado, contribuindo, dessa maneira, para redução de EROs cerebral. No corpo estriado não foi verificado aumento significativo na produção de nitrito-nitrato pelo estresse do nado forçado, no

entanto, a administração de ripIII, antes do nado forçado, mas não isoladamente, reduziu significativamente a concentração de nitrito-nitrato nessa área cerebral, em relação ao controle. Dessa forma, os efeitos protetores da ripIII aqui estudados parecem estar relacionados à diminuição da produção de EROs e compostos deletérios, principalmente no hipocampo e córtex pré-frontal, áreas cerebrais extremamente implicadas na instalação do processo depressivo, reforçando a importância do efeito antioxidante dessa substância para o seu efeito antidepressivo. Esses achados são coerentes com achados de outros pesquisadores que relataram também uma diminuição na produção de nitrito-nitrato em diversas áreas cerebrais, incluindo hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal, em animais tratados com venlafaxina, um antidepressivo atípico (ABDEL-WAHAB et al., 2011; DHIR & KULKARNI, 2007).

Vários estudos demonstram que pacientes com depressão apresentam hipoatividade no córtex pré-frontal, sugerindo uma deficiência nesta região, que tem sido relatado como uma redução na habilidade de indivíduos depressivos em experienciar prazer e alcançar objetivos prazerosos (GOTLIB et al., 1998; HENRIQUES & DAVIDSON, 1991).

Como falado anteriormente, o estresse oxidativo está envolvido com a patogenia da depressão. MAES et al., (2000), assim também como um número cada vez mais crescente de investigadores (TSUBOI et al., 2006; SARANDOL et al., 2007), têm estabelecido a coexistência de aumento do estresse oxidativo com sintomas de depressão em pacientes, como evidenciado pela redução de defesas antioxidantes plasmáticas em associação com o aumento da lipídio peroxidação. Significantes correlações foram encontradas entre a duração e severidade da doença, assim como o aumento do número de episódios com alterações na atividade da SOD e níveis de malonildialdeído (MDA) (BILICI et al., 2001; SARANDOL et al., 2007).

Todos os componentes da célula são suscetíveis à ação das ERO, porém a membrana é uma das mais atingidas em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na sua estrutura e permeabilidade (VAN DER KRAAIJ et al., 1988). Conseqüentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de

organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos (como o MDA), culminando com a morte celular (HERSHKO, 1989). A lipoperoxidação também pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, de câncer e à exacerbação da toxicidade de xenobióticos (SHAN et al., 1990). Assim, como na formação das ERO, nem sempre os processos de lipoperoxidação são prejudiciais, pois seus produtos são importantes na reação em cascata a partir do ácido araquidônico (formação de prostaglandinas) e, portanto, na resposta inflamatória (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990). Todavia, o excesso de tais produtos pode ser lesivo (ROSS & MOLDEUS, 1991).

Estudos mostram que antidepressivos como a fluoxetina, imipramina e venlafaxina revertem significativamente a lipoperoxidação induzida pelo estresse (ZAFIR et al., 2009). O cérebro contém um alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados oxidáveis e a lipoperoxidação gera dano aos fosfolípidos resultando em uma complexa cascata envolvendo o impedimento das funções de proteínas de membrana e canais iônicos, que por sua vez, promovem a interrupção da homeostase iônica neuronal (Matson, 1998). Além disso, a destruição dos fosfolípidos da membrana altera a viscosidade da membrana e está implicada na influência de inúmeros estágios da função das aminas biogênicas como a densidade do receptor ou a função dos receptores serotoninérgicos e/ou catecolaminérgicos (VAN-DER-VLIER & BAST, 1992). Ainda, a peroxidação lipídica das membranas também modifica a liberação e recaptção de neurotransmissores, atividade de canais iônicos, a função de transportadores de glicose e ATPases e o acoplamento de proteínas de ligação ao GTP em receptores de superfície celulares para impedir a função mitocondrial e promover a cascata de eventos que culmina com a morte celular por apoptose (MATSON, 1998). Pela redução da lipoperoxidação, os antidepressivos podem prevenir os efeitos inibitórios que o MDA diretamente exerce no sítio de ligação no receptor de serotonina e catecolaminas (BRITT et al., 1992). Portanto, a prevenção desses fatores danosos durante a lipoperoxidação induzida pelo estresse deve ser possivelmente o alvo da ação dos antidepressivos, relevante para os seus efeitos terapêuticos.



A exposição ao estresse no nado forçado aumenta a mobilização de ácidos graxos livres estimulando a superprodução de EROs, o que leva a destruição de fosfolipídios e altera a viscosidade das membranas neuronais, como falado anteriormente, levando ao aumento do nível de produtos da lipoperoxidação como o MDA (HOWLAND & PARIKH, 2010). Assim, a exposição de animais ao estresse no teste do nado forçado aumenta os níveis de MDA no hipocampo de camundongos (ABDEL-WAHAB et al., 2011). Corroborando com esses achados, a desregulação combinada do metabolismo de lipídios e as defesas antioxidantes como componentes integrais do estresse e depressão têm sido reportado (YAGER et al., 2010). Ensaio de MDA, principal produto de membrana da degradação oxidativa de ácidos graxos insaturados e peroxidação do ácido aracdônico, está implicada como uma medida para a lipoperoxidação e, portanto, também para o estresse oxidativo. Além disso, tem sido mostrado que o MDA é biologicamente ativo com propriedades semelhantes às EROs (GALECKI et al., 2009), além de ser pró-inflamatório, enfraquecer as defesas antioxidantes e impedir o reparo do DNA (ALDINI et al., 2007).

Dessa forma, em nosso estudo, corroborando com achados anteriores (ZAFIR et al., 2009; ABDEL-WAHAB et al., 2011; KUMAR et al., 2010), o nível de MDA foi aumentado no hipocampo e no corpo estriado, e o tratamento prévio com ripIII foi capaz de reduzir esses níveis de MDA nessas áreas, mostrando que a ripIII apresenta atividade neuroprotetora sugerindo que seus efeitos possam ser mediados, pelo menos em parte, pela inibição da peroxidação lipídica. No entanto, em nosso estudo, os níveis de MDA, no córtex pré-frontal, não foram aumentados após o estresse do nado forçado quando comparado ao animal que não foi submetido ao estresse. Contudo, a ripIII foi capaz de diminuir os níveis de MDA, de modo semelhante em outras áreas, apenas nos animais que foram submetidos ao estresse, sugerindo que a ação da ripIII está condicionada a eventos estressantes, uma vez que a droga não foi capaz de reduzir os níveis de MDA nos animais que não foram submetidos ao nado forçado nas três áreas estudadas.

Os resultados desse estudo sobre o estresse oxidativo permitiu verificar a diminuição da produção de nitrito e aumento dos níveis de glutathiona, além da diminuição significativa da peroxidação lipídica, nas áreas estudadas, revelando que a ripIII exerce

efeitos antioxidantes, que pode explicar, pelo menos em parte, que suas ações neuroprotetoras são importantes para o seu mecanismo de ação antidepressivo em camundongos submetidos ao nado forçado.



## 7 CONCLUSÕES

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

- A ripIII reduziu o tempo de imobilidade nos testes do nado forçado e suspensão da cauda confirmando o efeito antidepressivo observado em estudos prévios e, após a realização da curva de dose-resposta, no teste do nado forçado, foi constatado o melhor efeito antidepressivo na dose de 50 mg/kg;
- No teste do campo aberto, a substância não alterou a atividade locomotora o que nos permite concluir que o efeito antidepressivo observado no nado forçado e na suspensão da cauda é específico e não relacionado com um possível efeito psicoestimulante;
- O efeito antidepressivo da ripIII parece estar envolvido com os sistemas dopaminérgico, noradrenérgico e serotoninérgico, visto que:
  - O pré-tratamento com antagonistas dopaminérgicos mostrou que o efeito da ripIII foi impedido apenas quando o receptor D<sub>2</sub>, mas não D<sub>1</sub>, foi bloqueado mostrando que o efeito da substância modula o sistema dopaminérgico através da interação com o receptor D<sub>2</sub>-dopaminérgico;
  - O pré-tratamento com antagonistas noradrenérgicos permitiu verificar que o efeito da ripIII foi revertido quando os receptores  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  foram bloqueados, levando a conclusão de que os receptores  $\alpha$ -adrenérgicos interagem com ripIII facilitando seu efeito antidepressivo;
  - O pré-tratamento com inibidor da síntese de serotonina mostrou que a ripIII foi incapaz de exercer seu efeito antidepressivo mostrando que é necessária a participação desse sistema para o efeito; então ao bloquear receptores

específicos, o efeito da ripIII foi impedido quando houve bloqueio dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>3</sub>, mas não dos receptores 5-HT<sub>2A/2C</sub>, mostrando que existe o envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito antidepressivo da ripIII através da interação com os subtipos de receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>3</sub>;

- No teste da hipotermia induzida por apomorfina, ripIII não foi capaz de reverter a hipotermia, um efeito mediado pela ativação de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, sugerindo o não-envolvimento da ripIII com este subtipo de receptor, diferentemente de antidepressivos tricíclicos que revertem a hipotermia;
- A ripIII foi capaz de aumentar os níveis das monoaminas NA, 5-HT e DA no corpo estriado e no córtex pré-frontal, e de NA e 5-HT no hipocampo, além de diminuir os metabólitos no corpo estriado e córtex pré-frontal consequentemente diminuindo as taxas de metabolização, sugerindo uma maior permanência das monoaminas em sítios de ação, o que favoreceu o efeito antidepressivo da substância, corroborando com a modulação dos três sistemas de monoaminas sugerido pelos estudos comportamentais;
- Nos estudos sobre o estresse oxidativo, a ripIII quando administrada em animais que não foram submetidos ao estresse não apresentou alteração nas atividades das enzimas antioxidantes o que sugere que não há alteração da homeostasia após a administração de ripIII nas três áreas analisadas;
- O nado forçado foi capaz de induzir estresse oxidativo verificado pelo aumento da atividade da SOD, catalase e diminuição de GSH nas áreas cerebrais estudadas. O pré-tratamento com ripIII foi capaz de aumentar os níveis de GSH, mas não o de catalase mostrando que todos os radicais peróxidos gerados pela SOD foram oxidados pelo GSH e não pela catalase, sugerindo propriedades antioxidantes diretas ou indiretas da ripIII, através da capacidade de modificar a resposta ao

estresse oxidativo neuronal, facilitando mecanismos endógenos de defesa antioxidante.

- Os níveis de peroxidação lipídica e os níveis de nitrito/nitrato foram aumentados em animais submetidos ao nado forçado revelando que o modelo induz estresse oxidativo. No entanto, nos animais pré-tratados com ripIII diminuíram o nível de peroxidação lipídica assim também como o nível de nitrito/nitrato nas três áreas estudadas, fortalecendo o efeito antioxidante da ripIII sugerido no item anterior;

Portanto, este trabalho permitiu concluir que a riparina III realmente apresenta efeito antidepressivo, provavelmente ao interagir com receptores  $D_2$ -dopaminérgicos,  $\alpha$ -adrenérgicos e  $5-HT_{1A}$  e  $5-HT_3$  serotoninérgicos mostrando que existe modulação dos sistemas monoaminérgicos, levando ao aumento dos níveis dessas monoaminas e melhora dos sintomas depressivos. Além disso, o efeito antidepressivo e a homeostasia necessária para o efeito antidepressivo parecem ser favorecidos pelo efeito antioxidante da substância, que melhora os sistemas antioxidantes enzimáticos endógenos além de diminuir o nível de peroxidação lipídica e de nitrito/nitrato.

## 8 PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho mostrou resultados promissores da ripIII como droga antidepressiva, uma vez que apresentou envolvimento com os três sistemas de monoaminas e não apenas com uma ou duas monoaminas, como a maioria dos antidepressivos utilizados na clínica. Essa afirmação é fortalecida por estudos que dizem que fármacos antidepressivos que atuam nos três sistemas de monoaminas podem apresentar efeitos terapêuticos mais rápidos que os fármacos habituais. Além disso, a ripIII parece apresentar um efeito a mais que contribua para as suas propriedades terapêuticas, que é o seu efeito antioxidante, uma vez que o estresse induz a depressão e a substância, em situações de estresse é capaz de aumentar os sistemas antioxidantes endógenos e, assim, manter a homeostasia.

No entanto, para saber se os efeitos promissores da ripIII como droga antidepressiva se mantém, são necessários estudos mais aprofundados como por exemplo, a realização de modelos experimentais que induzam de fato sintomas depressivos, de maneira crônica, para que haja alterações neuronais semelhantes às de um indivíduo com depressão, com o intuito de verificar se a administração crônica da substância é capaz de reverter este quadro e se essa reversão é melhor ou não que a de fármacos antidepressivos.

Sendo assim, os estudos com a ripIII serão continuados no laboratório de Neurofarmacologia para que cada vez mais possamos aprofundar o estudos dos mecanismos de ação dessa substância e, assim, contribuir de alguma forma, com mais um droga possível de ser utilizada no tratamento da depressão como também para entender melhor a etiologia desta doença.

## 9 REFERÊNCIAS

ABDEL-WAHAB, B.A.; SALAMA, R.H. Venlafaxine protects against stress-induced oxidative DNA damage in hippocampus during antidepressant testing in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v.100 (1), p.59-65, 2011.

ADELL, A.; CELADA, P.; ABELLAN, M.T.; ARTIGAS, F. Origin and functional role of the extracellular serotonin in the midbrain raphe nuclei. **Brain Res Rev**, v.39 (2-3), p.154-180, 2002.

AGUIAR, C.C.; CASTRO, T.R.; CARVALHO, A.F.; VALE, O.C.; SOUSA, F.C.F.; VASCONCELOS, S.M.M. Drogas antidepressivas. **Acta Med Port**, v.24, p.91-98, 2011.

AKHTAR, M.; PILLAI, K.K.; VOHORA, D. Effect of thioperamide on modified forced swimming test-induced oxidative stress in mice. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.**, v. 97 (4), p.218-21, 2005.

ALDINI, G.; DALLE-DONNE, I.; FACINO, R.M.; MILZANI, A.; CARINI, M. Intervention strategies to inhibit protein carbonylation by lipoxigenase-derived reactive carbonyls. **Med Res Rev**, v.27 (6), p.817-868, 2007.

ALLEN, N.B.; BADCOCK, P.B.T. Darwinian models of depression: a review of evolutionary accounts of mood and mood disorders. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v.30, p.815-826, 2006.

ALLEN, N.B.; BADCOCK, P.B.T. The social risk hypothesis of depressed mood: evolutionary, psychosocial, and neurobiological perspectives. **Psychol. Bull.**, v. 129, p.887-913, 2003.

ALMEIDA, R.N.; NAVARRO, D.S.; de ASSIS, T.S.; de MEDEIROS, I.A.; THOMAS, G. Antidepressant effect of an ethanolic extract of the leaves of *Cissampelos sympodioides* in rats and mice. **J Ethnopharmacol.**, v.63, p.247-52, 1998.

ALUISIO, L.; LORD, B.; BARBIER, A.J.; FRASER, I.C.; WILSON, S.J.; BOGGS, J.; DVORAK, L.K.; LETAVIC, M.A.; MARYANOFF, B.E.; CARRUTHERS, N.I.; BONAVENTURE, P.; LOVENBERG, T.W. In-vitro and in-vivo characterization of JNJ-7925476, a novel triple monoamine uptake inhibitor. **Eur J Pharmacol.**, v.587, p.141-146, 2008.

AMARA, S. G.; KUHAR, M. J. Neurotransmitter transporters: Recent progress. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 16, p. 73-93, 1993.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 4<sup>th</sup> ed. Washington: American Psychiatric Association; 2001. Text revision (DSM-IV-TR).



AMOROSO, S.; D'ALESSIO, A.; SIRABELLA, R.; DIRENZO, G.; ANNUNZIATO, L. Ca (2p)-independent caspase- 3 but not Ca(2p)-dependent caspase-2 activation induced by oxidative stress leads to SH-SY5Y human neuroblastoma cell apoptosis. **J Neurosci Res**, v.68, p.454–462, 2000.

ANDREWS, P.W.; KOMSTEIN S.G.; HALBERSTADT, L.J.; GARDNER, C.O.; NEALE, M.C. Blue again: perturbacional effects of antidepressants suggest monoaminergic homeostasis in major depression. **Frontiers in psychology**, v. 159 (2), p.1-24, 2011.

ANDREWS, P.W.; THOMSON, J.A.Jr. The bright side of being blue: depression as an adaption for analyzing complex problems. **Psychol. Rev.**, v.116, 620-654, 2009.

ANISMAN, H.; R.M., ZACHARKO. Multiple neurochemical and behavioral consequences of stressors: implications for depression. **Pharmacol. Ther.**, v.46, p.119–136, 1990.

ARAKAWA, O.; IKEDA, T. Apomorphine effects on single and paired rat open-field behavior. **Physiol. Behav.**, v.50, p.189-194, 1991.

ARAÚJO, F.L.O.; MELO, C.T.V.; ROCHA, N.F.M.; MOURA, B.A.; LEITE, C.P.; AMARAL, J. F.; BARBOSA-FILHO, J.M.; GUTIERREZ, S.J.C.; VASCONCELOS, S.M.M.; VIANA, G.S.B.; SOUSA, F.C.F. Antinociceptive effects of (O-methyl)-N-benzoyl tyramine (riparin I) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol*, DOI 10.1007/s00210-009-0433-9, 2009.

ARAÚJO, I.A. *Beilschmiedia Nees* (Lauraceae) do Estado do Rio de Janeiro. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 59p, 1994.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice. A review. **Anim. Behav.**, v. 21, p. 205-35, 1973.

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

AZMITIA, E.C. Modern views on an ancient chemical: Serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. **Brain Research Bulletin**, v.56 (5), p.413-424, 2001.

BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B; ALFENAS, R.C.G.; DE PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, v.23 (4), p.629-643, 2010.

BARBOSA-FILHO, J. M. Quimiodiversidade e potencialidade farmacológica da flora paraibana. **Cad.Farm.**, v. 13(2), p. 85-102, 1997.

BARBOSA-FILHO, J.M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O.R. The tyramines of *Aniba riparia*: transformation into models of natural products. **Ver. Latinoamr. Quim.**, v. 21, p. 5-7, 1990.

BARBOSA-FILHO, J.M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O.R.; BARBOSA, R.C.S.B.C.; GIESBRECHT, A.M.; YOUNG, C.M. Benzoyl Esters and Amides, Styrylpyrones and Neolignans from the fruits of *Aniba riparia*. **Phytochemistry**, v. 26, p. 2615-7, 1987.

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

BARRERA, N. P.; HERBERT, P.; HENDERSON, R. M.; MARTIN, I. L.; EDWARDSON, J. M. Atomic force microscopy reveals the stoichiometry and subunit arrangement of 5-HT<sub>3</sub> receptors. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.102, p.12595–12600, 2005.

BARROSO, G.M.; GUIMARÃES, E.F.; ICHASO, C.L.F.; COSTA, C.G.; PEIXOTO, A. L. **Sistemática das Angiospermas do Brasil**. EDUSP, São Paulo, (1ª ed.), v.1., 255p, 1978.

BAUMEISTER, A.A.; HAWKINS, M.F.; UZELAC, S.M. The myth of reserpine-induced depression: role in the historical development of the monoamine hypothesis. **J. Hist. Neurosci.**, v.12, p.207-220, 2003.

BELLO, N.T.; LIANG, N.C. The use of serotonergic drugs to treat obesity: is there any hope? **Drug Des Devel Ther.**, v.10 (5), p.95-109, 2011.

BERK, B.C. Novel approaches to treat oxidative stress and cardiovascular diseases. **Trans Am Clin Climatol Assoc.**, v.118, p.209-14, 2007.

BERNET, S. Prevalence of mental disorders in Europe: results from European Study of Epidemiology of Mental Disorders (ESEMeD) Project. **Acta Psychiatr Scand**, p.110-136, 2004.

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

BEST, J.; NIJHOUT, H.F.; REED, M. Serotonin synthesis, release and reuptake in terminals: a mathematical model. **Theor. Biol. Med. Model**, doi: 10.1186/1742-4682-7-34, 2010.

BILICI, M.; EFE, H.; KÖROĞLU, M.A.; UYDU, H.A.; BEKAROĞLU, M.; DEĞER, O. Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. **J Affect Disord.**, v.64 (1), p.43-51, 2001.

BLIER, P.; WARD, N.M. Is there a role for 5-HT<sub>1A</sub> agonists in treatment of depression? **Biol. Psychiatry**, v.53, p.193-203, 2003.

BLUNDEL, J.E. Serotonin and the biology of feeding. **Am J. Clin. Nutr. Jan.** v.55 (supl I), p.155S-159S, 1992.

BOESS, F. G.; BEROUKHIM, R.; MARTIN, I. L.. Ultrastructure of the 5-hydroxytryptamine<sub>3</sub> receptor. **J Neurochem**, v.64, p.1401–1405, 1995.

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

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

BOURIN, M.; DAVID, D.J.; JOLLIET, P.; GARDIER, A. Mechanism of action of antidepressants and therapeutic perspectives. **Therapie**, v.57, 385-396, 2002.

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

BRITT, S.G.; CHIU, V.W.; REDPATH, G.T.; VANDENBERG, S.R. Elimination of ascorbic acid-induced membrane lipid peroxidation and serotonin receptor loss by Trolox-C, a water soluble analogue of vitamin E. **J Recept Res**, v.12, p.181-200, 1992.

BROWN, P.L.; HURLEY, C.; REPUCCI, N.; DRUGAN, R.C. Behavioral analysis of stress controllability effects in a new swim stress paradigm. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.68, p.263-272, 2001.

BRUNELLO, N.; BILER, P.; JUDD, J.L.; MENDLEWICZ, J.; NELSON, C.J.; SOUERY, D.; ZOHAR, J.; RACAGNI, G. Noradrenaline in mood and anxiety disorders: basic and clinical studies. **Int Clin Psychopharmacol.**, v.18, p.191-202, 2003.

BURKE, R. E.; GREENBAUM, D. Effect of post-mortem factors on muscarinic receptor subtypes in rat brain. **J. Neurochem.**, v. 49, p. 529–96, 1987.

CACCIA, S. Anti-depressant like compounds of *Hypericum perforatum* extracts: an overview of their pharmacokinetics and metabolism. **Curr Drug Metab.**, v.6, p.531-543, 2005.

CAETANO, S.C.; HATCH, J.P. ; BRAMBILLA, P.; SASSI, R.B.; NICOLETTI, M.; MALLINGER, A.G. Anatomical MRI study of hippocampus and amygdala in patients with current and remitted major depression. **Psychiatry Res**, v.132, p.141-147, 2004.

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

CASTELO-BRANCO, U.J.V. Estudos Farmacológicos do Éter Metílico de N-(2,6-dihydroxibenzoyl)-tyramine. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Paraíba, Brazil, 1992.

CASTELO-BRANCO, U.J.V.; THOMAS, G.; ARAÚJO, C.C.; BARBOSA-FILHO, J.M. Atividade espasmolítica de benzamidas isoladas de *Aniba riparia* (Parte 1). Resume VI Reunião Anual de Federação de Sociedades de Biologia Experimental. Abstr. 6-69, 302, 1991.

CASTELO-BRANCO, U.V.; CASTELO-BRANCO, U.J.V.; THOMAS, G.; ARAÚJO, C.C.; BARBOSA-FILHO, J.M. Preliminary pharmacological studies on three benzoyl amides, constituents of *Aniba riparia* (Ness) Mez (Lauraceae). **Acta Farm. Bonaerense**, v.19(3), p. 197-202, 2000.

CATÃO, R.M.R.; BARBOSA-FILHO, J.M.; GUTIERREZ, S.J.C.; LIMA, E.O.; PEREIRA, M.S.V.; ARRUDA, T.A.; ANTUNES, R.M.P. Avaliação da atividade antimicrobiana de riparinas sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* multiresistentes. **RABC**, v. 34 (4), p.247-249, 2005.

CEQUINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para a ativação da atividade. **Quim. Nova**, v.21 (1), p.99, 1998.

CHANCE, B.; MAEHLY, A. C. Assay catalases and peroxidases. **Methods Enzymol.**, v. 2, p. 764-768, 1955.

CIVELLI, O.; BUNZOW, J.R.; GRANDY, D.K. Molecular diversity of the dopamine receptors. **Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 32, p. 281-307, 1993.

CLAUSTRE, Y.; RIVY, J.P.; DENNIS, T.; SCATTON, B. Pharmacological studies on stress-induced increase in frontal cortical dopamine metabolism in the rat. **J Pharmacol Exp Ther.**, v.238 (2), p.693-700, 1986.

CONNOR, T.J.; KELLIHER, P.; HARKIN, A.; KELLY, J.P.; LEONARD, B.E. Reboxetine attenuates forced swim test-induced behavioural and neurochemical alterations in the rat. **Eur J Pharmacol.**, v.27 (2-3), p.125-133, 1999.

COOPER, J.R.; BLOOM, F.E.; ROTH, R.H. The Biochemical basis of neuropharmacology 6<sup>th</sup> ed. **New York: Oxford University**, 1991.

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

COTTER, D.; MACKAY, D.; CHANA, G.; BEASLEY, C.; LANDAU, S.; EVERALL, I.P. Reduced neuronal size and glial cell density in area 9 of the dorsolateral prefrontal cortex in subjects with major depressive disorder. **Cereb Cortex**, v.12, p.386-394, 2002.

CREGAN, S.P., FORTIN, A., MACLAURIN JG, CALLAGHAN SM, CECCONI F, YU SW, DAWSON TM, DAWSON VL, PARK DS, KROEMER G, SLACK RS. Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. **J Cell Biol.**, v.158 (3), p.507-517, 2002.

CRYAN, J.F.; LUCKI, I. Antidepressant-like behavior effects mediated by 5-hydroxytryptamine (2C) receptors. **J Pharmacol Exp Ther.**, v.295, p.1120-1126, 2000.

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

CRYAN, J.F.; O'LEARY, O.F.; JIN, S.H.; FRIEDLAND, J.C., OUYANG, M., HIRSCH, B.R.; PAGE, M.E.; DALVI, A.; THOMAS, S.A.; LUCKI, I. Norepinephrine-deficient mice lack responses to antidepressant drugs, including selective serotonin reuptake inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.101, p.8186-8191, 2004.

CRYAN, J.F.; VALENTINO, R.J.; LUCKI, I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressant using the modified rat forced swimming test. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews.**, v.29, p.547-569, 2005.

CUMURCU, B.E.; OZYURT, H.; ETIKAN, I.; DEMIR, S.; KARLIDAG, R. Total antioxidant capacity and total oxidant status in patients with major depression: impact of antidepressant treatment. **Psychiatry Clin Neurosci.**, v.63 (5), p.639-645, 2009.

DA SILVA, G.; MATTEUSSI, A.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B.; RODRIGUES, A.L.S. Evidence for dual effects of nitric oxide in the forced swimming test and in the tail suspension test in mice. **NeuroReport**, v.11, p.3699-3702, 2000.

DAILLY, E.; CHENU, F.; RENARD, C.E.; BOURIN, M. Dopamine, depression and antidepressants. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v. 18, p.601-607, 2004.

DANTZER, R.; O'CONNOR, J.C.; LAWSON, M.A.; KELLEY, K.W. Inflammation-associated depression: from serotonin to kynurenine. **Psychoneuroendocrinology**, v.36(3), p.426-436, 2011.

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

DASZUTA, A.; BAN SR, M.; SOUMIER, A.; HERY, M.; MOCAER, E. Depression and neuroplasticity: implication of serotonergic systems. **Therapie**, v.60, p.461-468, 2005.

DE KEYSER, J. Subtypes and localization of dopamine receptors in human brain. **Neurochem. Int.**, v. 22, p. 83-93, 1993.

DE KLOET, E.R.; JOELS, M.; HOLSBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. **Nat Rev Neurosci**, v.6, p.463-475, 2005.

DEAKIN, J.F. 5HT<sub>2</sub> receptors, depression and anxiety. **Pharmacol Biochem Behav.**, v.29, p.819-820, 1988.

DEL ANGEL-MEZA, A.R.; FERIA-VELASCO, A.; ONTIVEROS-MARTINEZ L., GALLARDO, L.; GONZALEZ-BURGOS, I.; BEAS-ZARETE, C. Protein- and

tryptophan-restricted diets induces changes in rat gonadal hormone levels. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.12, p.192-199, 2001.

DEL ZOMPO, M.; BOCCHETTA, A.; BERNARDI, F.; BURRAI, C.; CORSINI, G.U. Clinical evidence for a role of dopaminergic system in depressive síndromes. In: GESSA, G.L.; SERRA, G. (ed.). Dopamine and Mental Depression. Pergamon, Oxford, p. 177-184, 1990.

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

DHINGRA, D; VALECHA, R. Evaluation of antidepressant-like activity of aqueous and ethanolic extract of *Therminalia bellirica* Roxb. fruits in mice. **Indian J Exp Biol.**, v.45, p.610-616, 2007.

DHIR, A.; KULKARNI, S.K. Involvement of L-arginine–nitric oxide–cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effect of venlafaxine in mice. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v.31(4), p.921-925, 2007.

DRAGO, F.; AREZZI, A.; VIRZI, A. Effects of acute or chronic administration of substituted benzamides in experimental models of depression in rats. **Eur. Neuropsychopharmacol.**, v. 10, p. 437-442, 2000.

DREVETS, W.C. Neuroimaging and neuropathological studies of depression: implications for the cognitive-emotional features of mood disorders. **Curr Opin Neurobiol**, v.11, p.240–249, 2001.

DREVETS, W.C. Neuroimaging studies of mood disorders. **Biol. Psychiatry**, v.48, p.813-829, 2000.

DREVETS, W.C; FRANK, E.; PRICE, J.C.; KUPFER, D.J.; HOLD, D.; GREER, P.J.; et al. PET imaging of serotonin 1A receptor binding in depression. **Biol Psychiatry.**, v.46, p.1375-1387, 1999.

DUNLOP, B.W.; NEMEROFF, C.B. The role of dopamine in pathophysiology of depression. **Arch Gen Psychiatric.**, v.64, p.327-337, 2007.

DZIEDZICKA-WASYLEWSKA, M.; FARON-GORECKA, A.; KUSMIDER, M.; DROZDOWSKA, E.; ROGOZ, Z.; SIWANOWICZ, J.; CARON, M.G.; BONISCH, H. Effect of antidepressant drugs in mice lacking the norepinephrine transporter. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, p.2424-2432, 2006.

EATON, M.J.; GUDEHITHLU K.P.; QUACH, T.; SILVIA, C.P.; HADJICONSTANTINO, M.; NEFF, N.H. Distribution of aromatic L-amino acid decarboxylase mRNA in mouse brain by in situ hybridization histology. **J Comp Neurol**, v.337 (4), p.640-654, 1993.

EISENSAMER, B.; RAMMES, G.; GIMPL, G.; SHAPA, M.; FERRARI, U.; HAPFELMEIER, G., et al. Antidepressants are functional antagonists at the serotonin type 3 (5-HT<sub>3</sub>) receptor. **Mol Psychiatry**, v.8, p.994–1007, 2003.

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

EL-AGAMEY, A.; LOWE, G. M.; MCGARVEY, D. J.; MORTENSEN, A.; PHILLIP, D. M.; TRUSCOTT, T. G.; YOUNG, A. J. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 430, p. 37-48, 2004.

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

EREN, I.; NAZIROĞLU, M.; DEMIRDAŞ, A. Protective effects of lamotrigine, aripiprazole and escitalopram on depression-induced oxidative stress in rat brain. **Neurochem Res.**, v.32 (7), p.1188-1195, 2007.

ESPEJO, E.F; MINANO, F.J. Prefrontocortical dopamine depletion induces antidepressant-like effects in rats and alters the profile of desipramine during Porsolt's test. **Neuroscience**, v.88, p.609-615, 1999.

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

FARIS, P. L.; ECKERT, E. D.; KIM, S. W.; MELLER, W. H.; PARDO, J. V.; GOODALE, R. L.; et al. Evidence for a vagal pathophysiology for bulimia nervosa and the accompanying depressive symptoms. **J Affect Disord.**, v.92, p.79–90, 2006.

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

FERNANDES, J.B.; GOTTHEB, O.R.; XAVIER, L.M. **Biochem. Syst. Ecol.** v. 6, 55p, 1978.

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

FIELDER, E. P.; MARKS, M. J.; COLLINS, A. C. Postnatal development of cholinergic enzymes and receptors in mouse brain. **Journal Neurochemical**, v. 49, p. 983-990, 1987.

FLECK, M.P.A.; LAFER, B.; SOUGEY, E.B.; DELPORTO, J.A.; BRASIL, M.A.; JURUENA, M.F. Diretrizes da Associação Médica Brasileira para o tratamento da depressão (versão integral). **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v.25 (2), p.114-122, 2003.

FLUGGE, G; VAN KAMPEN, N; MEYER, H; FUCHS, E.  $\alpha_{2A}$  and  $\alpha_{2C}$ -adrenoreceptor regulation in the brain:  $\alpha_{2A}$  changes persist after chronic stress. **Eur J Neurosci.**, v.17, p.917-928, 2003.

FRANÇA, N.C.; GOTTLIEB, O.R.; MAGALHÃES, M.T.; MENDES, P.H.; MAIA, J.G.S.; SILVA, M.L.; GOTTLIEB, H.E. **Phytochemistry**, v. 15, p. 572, 1976.

FRAZER, A. Norepinephrine involvement in antidepressant action. **J Clin Psychiatry.**, v.61 (Supl. 10), p.25-30, 2000.

FRODL, T.; MEISENZAHN, E.M.; ZILL, P.; BAGHAI, T.; RUJESCU, D.; LEINSINGER, G. et al. Reduced hippocampal volumes associated with the long variant of the serotonin transporter polymorphism in major depression. **Arch Gen Psychiatry**, v.61, p.177-183, 2004.

FUCHS E. Neurogenesis in the adult brain: is there an association with mental disorders? **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci**, v. 257, p.247-249, 2007.

GAŁECKI, P.; SZEMRAJ, J.; BIENKIEWICZ, M.; FLORKOWSKI, A.; GAŁECKA, E. Lipid peroxidation and antioxidant protection in patients during acute depressive episodes and in remission after fluoxetine treatment. **Pharmacol Rep**, v.61 (3), p.436-447, 2009.

GARG, R.; KUMAR, A. Possible role of citalopram and desipramine against sleep deprivation-induced anxiety like-behavior alterations and oxidative damage in mice. **Indian J Exp Biol.**, v.46 (11), 770-776, 2008.

GEHRMANN, W.; ELSNER, M.; LENZEN, S. Role of metabolically generated reactive oxygen species for lipotoxicity in pancreatic  $\beta$ -cells. **Diabetes Obes Metab.**, v.12 (Suppl. 2), p.149-158, 2010.

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

GEYER, M.; MARKOU, A. The role of preclinical models in development of psychotropic drugs. In: Davis, K.; Charney, D.; Coyle, J.; Nemeroff, S. (Eds.), **Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress**. Raven Press. New York, pp 445-455. 2002.

GILBERT, P.; GILBERT, J.; IRONS, C. Life events, entrapments and arrested anger in depression. **J. Affect. Disord.**, v.79, p.149-160, 2004.

GONZALEZ-MAESO, J.; RODRIGUEZ-PUERTAS, R.; MEANA, J.J.; GARCIA-SERVILLA, J.A.; GUIMON, J. Neurotransmitter receptor-mediated activation of G-proteins in brains of suicide victims with mood disorders: selective supersensitivity of alpha (2A)-adrenoceptors. **Molecular psychiatry**, v.7 (7), p.755-767, 2002.



GOTLIB, I.H.; RANGANATH, C.; ROSENFELD, J.P. Frontal EEG alpha asymmetry, depression, and cognitive functioning. **Cogn. Emotion**, v.12, p.449–478, 1998.

GREDEN, J.F.; GARDNER, R.; KING, D.; GRUNHAUS, L.; CARROLL, B.J.; KRONFOL, Z. Dexamethasone suppression tests in antidepressant treatment of melancholia. The process of normalization and test–retest reproducibility. **Arch Gen Psychiatry**, v.40, p.493-500, 1983.

GREEN, T.; STAUFFER, K. A.; & LUMMIS, S. C. Expression of recombinant homooligomeric 5-hydroxytryptamine<sub>3</sub> receptors provides new insights into their maturation and structure. **J Biol Chem**, v.270, p.6056–6061, 1995.

HAGEN, E.H. “The bargaining model of depression”, in the Genetic and Cultural Evolution of Cooperation, ed. P. Hammerstein, (Cambridge, MA: MIT Press), 95-123, 2003.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **J Neurochem.**, v.59 (5), p.1609-1623, 1992. Review. Erratum in: **J Neurochem.**, v.120 (5), p.850, 2012.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. The antioxidants of human extra cellular fluids. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 280, p. 1-8, 1990.

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

HANNON, J.; HOYER, D. Molecular biology of 5-HT receptors. **Behav Brain Res**, v.195, p.198-213, 2008.

HANS-ULRICH, W, HOLSBOER F, JACOBI F. Met and unmet needs in the management of depressive disorder in the community and primary care: the size and breadth of the problem. **J Clin Psychiatry**, v.62 (Suppl 26), p.23-28, 2001.

HARVEY, B.H.; RETIEF, R.; KORFF, A.; WEGENER, G. Increased hippocampal nitric oxide synthase activity and stress responsiveness after imipramine discontinuation: role of 5HT<sub>2A/C</sub>-receptors. **Metab Brain Dis.**, v.21 (2–3), p.211-220, 2006.

HAUS, U.; VARGA, B.; STRATZ, T.; SPATH, M.; MÜLLER, W. Oral treatment of fibromyalgia with tropisetron given over 28 days: influence on functional and vegetative symptoms, psychometric parameters and pain. **Scand J Rheumatol Suppl.**, v.113, p.55-58, 2000.

HENRIQUES, J.B.; DAVIDSON, R.J. Left frontal hypoactivation in depression, **J. Abnorm. Psychol.**, v.100, p.22-31, 1991.

HENSLER, J.G.; Differential regulation of 5-HT<sub>1A</sub> receptors-G protein interactions in brain following chronic antidepressant administration. **Neuropsychopharmacology**, v.26, p.565-573, 2002.

HERMAN, J.P.; FIGUEIREDO, H.; MUELLER, N.K.; ULRICH-LAI, Y.; OSTRANDER, M.M.; CHOI, D.C., et al. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo–pituitary–adrenocortical responsiveness. **Front Neuroendocrinol**, v.24, p.151-80, 2003.

HERMAN, J.P.; OSTRANDER, M.M.; MUELLER, N.K.; FIGUEIREDO, H. Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo–pituitary–adrenocortical axis. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v.29, p.1201-1213, 2005.

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

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

HIRVONEN, J.; KARLSSON, H.; KAJANDER, L.; LEPOLA, A.; MARKKULA, J.; RASI-HAKALA, H.; NÄGREN, K.; SALMINEN, J.K.; HIETALA, J. Decreased brain serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptor availability in medication-naïve patients with major depressive disorder: an in-vivo imaging study using PET and [carbonyl-11C]WAY100635. **Int J Neuropsychopharmacol.**, v.11, p.465-476, 2008.

HOFER, O.; GREGER, H.; ROBIEN, W.; WERNER, A. 13C NMR and 1H lanthanide induced shifts of naturally occurring alkalamides with cyclic amide moieties: amides from *Achillea falcata*. **Tetrahedron Lett**, v. 42, p. 2707–2716, 1986.

HOLMBERG, M.; FAGERHOLM, V.; SCHEININ, M. Regional distribution of  $\alpha_2$ -adrenoceptors in brain and spinal cord of control mice and transgenic mice overexpressing the  $\alpha_2$ -subtype: an autoradiographic study with [3h]rx821002 and [3h]rauwolscine. **Neuroscience**, v.117, p. 875-898, 2003.

HOLMES, P.V. Rodent models of depression: reexamining validity without anthropomorphic inference. **Crit. Rev. Neurobiol.**, v.15, p.143-174, 2003.

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

HOLSBOER, F., LIEBL, R., HOFSCHUSTER, E. Repeated dexamethasone suppression test during depressive illness. Normalisation of test result compared with clinical improvement. **J Affect Disord**, v.4, p.93-101, 1982.

HORWITZ, A.V.; WAKEFIELD, J.C. The Loss of Sadness: How Psychiatry Transformed Normal Sorrow into Depressive Disorder. New York, NY: Oxford University Press, 2007.

HOWLAND, M.C.; PARIKH, A.N. Model studies of membrane disruption by photogenerated oxidative assault. **J Phys Chem B**, v.114 (19), p.6377–6385, 2010.

IKEDA, M.; NAGATSU, T. Effect of short-term swimming stress and diazepam on 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) levels in the caudate nucleus: an in vivo voltammetric study. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, v.331(1), p.23-26, 1985.

IMPERATO, A.; OBINU, M.C.; CABIB, S.; CESTARI, V.; PUGLISI-ALLEGRA, S.. Effects of subchronic minaprine on dopamine release in the ventral striatum and on immobility in the forced swimming test. **Neurosci. Lett.**, v.166, p.69-72, 1994.

ISHIHARA, K.; SASA, M. Potentiation of 5-HT<sub>3</sub> receptor functions in the hippocampal CA1 region of rats following repeated electroconvulsive shock treatments. **Neurosci Lett.**, v.307, p.37-40, 2001.

JACOBS, B.L.; FORNAL, C.A. Activity of serotonergic neurons in behaving animals. **Neuropsychopharmacology**, v.21 (supl 2), p.95-155, 1999.

JAKOBY, W. B.; ZIEGLER, D. M. The enzymes of detoxication. **J. Biol. Chem.**, v. 265, p. 715-718, 1990.

JARACZ, J. The anatomy of depression in light of evidence from neuroimaging studies. **Psychiatr Pol**, v.42, p.875-88, 2008.

JENCK, F.; MOREAU, J.L.; MUTEL, V.; MARTIN, J.R. Brain 5-HT<sub>1C</sub> receptors and antidepressants. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol Psychiatry.**, v.18, p.563-574, 1994.

JIANG, Z.G.; TESHIMA, K.; YANG, Y.; YOSHIOKA, T.; ALLEN, C.N. Pre- and postsynaptic actions of serotonin on rat suprachiasmatic nucleus neurons. **Brain Res**, v.866 (1-2), p.247-256, 2000.

JIMERSON, D.C. Role of dopamine mechanisms in the affective disorders. In: MELTZER, H.Y., (ed.). Psychopharmacology, the third generation of progress. New York: Raven Press, p. 505-511, 1987.

JOCA, S.R.; PADOVAN, C.M.; GUIMARÃES, F.S. Estresse, depressão e hipocampo. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v.25 (supl II), p.46-51, 2003.

KALIA, M. Neurobiological basis of depression: an update. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 54 (supl I), p.24-27, 2005.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M. Principles of neural science. United States: McGraw-Hill, 2000.

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

KELLER, M.C.; NEALE, M.C.; KENDLER, K.S. Association of different adverse life events with distinct patterns of depressive symptoms. **Am. J. Psychiatry**, v.164, p.1521-1529, 2007.

KESSLER, R. et al.. The epidemiology of major depressive disorder: results for the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). **JAMA**, v.289, p.3095-3105, 2003.

KHANZODE, S.D.; DAKHALE, G.N.; KHANZODE, S.S.; SAOJI, A.; PALASODKAR, R. Oxidative damage and major depression: the potential antioxidant action of selective serotonin re-uptake inhibitors. **Redox Rep.**, v.8 (6), p.365-370, 2003.

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

KIM, M.M.; KIM, S.K. Effect of phloroglucinol on oxidative stress and inflammation. **Food Chem Toxicol**, v.48(10), p.2925-2933, 2010.

KINGHORN, A.D.J. Pharmacognosy in the 21<sup>st</sup> century. **Pharm. Pharmacol.**, v.53, p.135-148, 2001.

KIRBY, L.G.; ALLEN, A.R.; LUCKI, I. Regional differences in the effects of the forced swimming on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindolacetic acid. **Brain Res.**, v.682, p.189-196, 1995.

KOE, B.K. Tryptophan hydroxylase inhibitors. **Federation Proceedings**, v.30 (3), p.886-896, 1971.

KOE, B.K.; WEISSMAN, A. **J. Pharmacol.**, v.154 (3), p.499-516, 1966.

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

KONARSKI, J.Z.; MCINTYRE, R.S.; KENNEDY, S.H.; RAFI-TARI, S.; SOCZYNSKA, J.K.; KETTER, T.A. Volumetric neuroimaging investigations in mood disorders: bipolar disorder versus major depressive disorder. **Bipolar Disord**, v.10, p.1-37, 2008.

KOOB, G. F.; BLOOM, F. E. Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. **Science**, v. 242, p. 715-23, 1988.

KOOB, G. F. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. **Trends Pharmacol Sci**, v. 13, p. 177-84, 1992.

KREISS, D.S.; LUCKI, I. Differential regulation of serotonin (5-HT) release in the striatum and hippocampus by 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors of the dorsal and median raphe nuclei. **J Pharmacol Exp Ther.**, v.292, p.1111-1117, 1994.

KRISHNAN, K.R.; DORAISWAMY, P.M.; FIGIEL, G.S.; HUSAIN, M.M.; SHAH, S.A.; NA, C. et al. Hippocampal abnormalities in depression. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci.**, v.3, 387-391, 1991.

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

KROEMER, G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. **Nat Med**, v.3, p.614-620, 1997.

KUMAR, P.; KALONIA, H.; KUMAR, A. Nitric oxide mechanism in the protective effect of antidepressants against 3-nitropropionic acid-induced cognitive deficit, glutathione and mitochondrial alterations in animal model of Huntington's disease. **Behav Pharmacol.**, v.21, p.217-230, 2010.

LAFER, B.; VALLADA-FILHO, H.P. Genética e fisiopatologia dos transtornos depressivos. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v.21, p.12-17, 1999.

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

LANG, A. E.; LOZANO, A. M. Parkinson's disease. First of two parts. **N Engl J Med.**, v. 339, p. 1044-53, 1998a.

LANG, A. E.; LOZANO, A. M. Parkinson's disease. Second of two parts. **N Engl J Med**, v. 339, p. 1130-43, 1998b.

LE MOAL, M.; SIMON, H. Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles. **Physiol Rev.**, v. 71, p. 155-234, 1991.

LEHR, E. Potential antidepressant properties of pramipexole detected in locomotor and operant behavioral investigations in mice. **Psychopharmacology.**, v.163, p.495-500, 2002.

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

LESCH, K.P. Genetic alterations of the murine serotonergic gene pathway: the neurodevelopmental basis of anxiety. **Handb Exp Pharmacol.**, v.169, p.71-112, 2005.

LESGARDS, J.F.; GAUTHIER, C.; IOVANNA, J.; VIDAL, N.; DOLLA, A.; STOCKER, P. Effect of reactive oxygen and carbonyl species on crucial cellular antioxidant enzymes. **Chem Biol Interact**, v.190(1), p.28-34, 2011.

LI, X.M.; CHLAN-FOURNEY, J.; JUORIO, A.V.; BENNETT, V.L.; SHRIKHANDE, S.; BOWEN, R.C. Antidepressants upregulate messenger RNA levels of the neuroprotective enzyme superoxide dismutase (SOD1). **J Psychiatry Neurosci.**, v.25 (1), p.43-47, 2000.

LIANG, Y.; RICHELSON, E. Triple reuptake inhibitors: next generation antidepressant. **Primary Psychiatry.**, v.15, p.50-56, 2008.

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

LIUKAITIS, V. Influence of adrenoceptors on functions of the body. **Medicina (Kaunas)**, v.41, p.713-723, 2005.

LOANE, C.; POLITIS, M. Buspirone: what is all about? **Brain Research**, v.1461, p.111-118, 2012.

LORENZETTI, V.; ALLEN, N.B.; FORNIT, O.A.; YUCE, L.M. Structural brain abnormalities in major depressive disorder: a selective review of recent MRI studies. **J Affect Disord**, v. 117, p.1-17, 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.

LUCASSEN, P.J.; FUCHS, E.; CZÉH, B. Antidepressant treatment with tianeptine reduces apoptosis in the hippocampal dentate gyrus and temporal cortex. **Biol Psychiatry.**, v. 55(8), p.789-796, 2004.

LUCKI, I.; WARD, H.R.; FRAZER, A. Effect of 1-(m-chlorophenyl)piperazine and 1-(m-trifluoromethylphenyl)piperazine on locomotor activity. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.249, p.155-164, 1989.

LUSCOMBE, G.P.; MARTIN, K.F.; HUTCHINS, L.J.; GOSDEN, J.; HEAL, D.J. Mediation of the antidepressant-like effect of 8-OH-DPAT in mice by post-synaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptors. **British Journal of Pharmacology**, v.108, p.669-677, 1993.

MACEDO, D.S. **Estudo farmacológico e de alterações neuroquímicas em córtex pré-frontal e corpo estriado de camundongos após convulsões e morte induzidas por overdose de cocaína.** 2005. 298f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

MACHADO, A. B. M. **Neuroanatomia funcional.** 2<sup>a</sup> ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

MACHADO, D.G.; KASTER, M.P.; BINFARÉ, R.W.; DIAS, M.; SANTOS, A.R.S.; PIZZOLATI, M.G.; et al. Antidepressant-like effect of the extract from leaves of *Schinus molle* L. in mice: evidence of the involvement of the monoaminergic system. **Progress Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry.**, v.31, p.421-428, 2007.

MACQUEEN, G.M.; CAMPBELL, S.; McEWEN, B.S.; McDONALD, K.; AMANO, S.; JOFFE, R.T.; *et al.* Course of illness, hippocampal function, and hippocampal volume in major depression. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.100, p.1387-1392, 2003.

MAEHLY, A. C.; CHANCE, B. The assay catalases and peroxidases. **Methods Biochem. Anal.**, v. 1, p. 357-359, 1954.

MAES, M.; DE VOS, N.; PIOLI, R.; DEMEDTS, P.; WAUTERS, A.; NEELS, H.; *et al.* Lower serum vitamin E concentrations in major depression. Another marker of lowered antioxidant defenses in that illness. **J Affect Disord**, v.58, p.241–246, 2000.

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

MARQUES, C.A. Importância econômica da família Lauraceae. **Lindl. Florest. e ambiente**, v.8 (1), p.195-206, 2001.

MASUDA, Y; OHNUMA, S; SUGIYAMA, T. Alpha 2 adrenoreceptor activity induces the antidepressant-like glycolipid in mouse forced swimming. **Methods Find Exp Clin Pharmacol.**, v.23, p.19-21, 2001.

MATA, R.; MORALES, J.; PÉREZ, O.; RIVERO-CRUZ, I.; ACEVEDO, L.; ENRIQUES-MENDOZA, I.; BYE, R; FRANZBLAU, S.; TIMMERMANN, B.J. **Nat. Prod.**, v. 67, p. 19-61, 2004.

MATTSON, M.P. Modification of ion homeostasis by lipid peroxidation: roles in neuronal degeneration and adaptive plasticity. **Trends Neurosci**, v.20, p.53-57, 1998.

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

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

McNAMARA, R.K.; SKELTON, R.W. The neuropharmacological and neurochemical basis of place learning in the morris water maze. **Brain Res**, v.18, p.33-49, 1993.

MELO, C.T.; DE CARVALHO A.M.; MOURA, B.A., TEIXEIRA, C.P.; VASCONCELOS, L.F.; FEITOSA, M.L.; DE OLIVEIRA, G.V.; BARBOSA-FILHO J.M.; CHAVEZ GUTIERREZ, S.J.; DE FRANÇA FONTELES, M.M.; VASCONCELOS, S.M.; DE SOUSA, F.C. Evidence for the involvement of the serotonergic, noradrenergic, and dopaminergic systems in the antidepressant-like action of riparin III obtained from Aniba

riparia (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Fundam Clin Pharmacol.**, doi: 10.1111/j.1472-8206.2011.00968.x. [Epub ahead of print], 2011.

MELO, C.T.; MONTEIRO, A.P.; LEITE, C.P.; ARAÚJO, F.L.; LIMA, V.T.; BARBOSA-FILHO, J.M.; FRANÇA FONTELES, M.M.; DE VASCONCELOS, S.M.; DE BARROS VIANA, G.S.; DE SOUSA, F.C. Anxiolytic-like effects of (O-methyl)-N-2,6-dihydroxybenzoyl-tyramine (riparin III) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Biol Pharm Bull.**, v.29 (3), p.451-454, 2006.

MENON, M.K.; VIVONIA, C.A.; KLING, A.S. Pharmacological studies on the antagonism by antidepressants of the hypothermia induced by apomorphine. **Neuropharmacology.**, v.23 (2A), p.121-127, 1984.

MICHELI, F.; CAVANNI, P.; ARBAN, R.; BENEDETTI, R.; BERTANI, B.; BETTATI, M.; BETTELINI, L.; BONANOMI, G.; BRAGGIO, S.; CHECCHIA, A.; DAVALLI, S.; DI FABIO, R.; FAZZOLARI, E.; FONTANA, S.; MARCHIORO, C.; MINICK, D.; NEGRI, M.; OLIOSI, B.; READ, K.D.; SARTORI, I.; TEDESCO, G.; TARSİ, L.; TERRENI, S.; VISENTINI, F.; ZOCCHI, A.; ZONZINI, L. 2010. 1-(Aryl)-6-[alkoxyalkyl]-3-azabicyclo[3.1.0]hexanes and 6-(aryl)-6-[alkoxyalkyl]-3-azabicyclo[3.1.0]hexanes: A new series of potent and selective triple reuptake inhibitors. **J Med Chem.**, v.53, p.2534-2551, 1984.

MILLAN, M.J. The role of monoamines in the actions of established and "novel" antidepressant agents: a critical review. **Eur J Pharmacol.**, v.500, p.371-84, 2004.

MILLAN, M.J.; DEKEYNE, A.; NEWMAN-TANCREDI, A.; CUSSAC, D.; AUDINOT, V.; MILLIGAN, G.; et al. S18616, a highly potent spiroimidazoline agonist at alpha(2)-adrenoreceptors: I. Receptor profile, antinociceptive and hypothermic actions in comparison with dexmedetomidine and clonidine. **J. Pharmacol Exp Ther.**, v.295, p.1192-1205, 2000b.

MILLAN, M.J.; LEJEUNE, F.; GOBERT, A.; BROCCO, M.; AUCLAIR, A.; BOSCH, C, et al. S18616, a highly potent spiroimidazoline agonist at alpha(2)-adrenoreceptors: II. Influence on monoaminergic transmission, motor function and anxiety in comparison with dexmedetomidine and clonidine. **J. Pharmacol Exp Ther.**, v.295, p.1206-1222, 2000a.

MIQUEL, M. C.; EMERIT, M. B.; NOSJEAN, A.; SIMON, A.; RUMAJOGEE, P.; BRISORGUEIL, M. J., et al. Differential subcellular localization of the 5-HT<sub>3A</sub>s receptor subunit in the rat central nervous system. **Eur J Neurosci.**, v.15, p.449-457, 2002.

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



- MITRA, R.; SAPOLSKY, R.M. Acute corticosterone treatment is sufficient to induce anxiety and amygdaloid dendritic hypertrophy. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.105, p.5573–5578, 2008.
- MONTGOMERY, K.C. The relationship between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour. **J. Comp. Physiol. Psychol.**, v.48, p.254-260, 1958.
- MOSLEY, R.L.; BENNER, E.J.; KADIU, I.; THOMAS, M.; BOSKA, M.D.; HASAN, K.; LAURIE, C.; GENDELMAN, H.E. Neuroinflammation, Oxidative Stress and the Pathogenesis of Parkinson's Disease. **Clin Neurosci Res.**, v.6 (5), 261-281, 2006.
- MUSTAK, M.S.; HEDGE, M.L.; DINESH, A.; BRITTON, G.B.; BERROCAL, R.; SUBBA RAO, K.; et al. Evidence of altered DNA integrity in the brain regions of suicidal victims of Bipolar Depression. **Indian J Psychiatry**, v.52 (3), p.220-228, 2010.
- NAKAGAWA Y.; ISHIMA T.; TAKASHIMA, T. The 5-HT<sub>3</sub> receptor agonist attenuates the action of antidepressants in the forced swim test in rats. **Brain Res.**, v.786, p.189-193, 1998.
- NAKAMURA, T.; LIPTON, S. A. Cell death: protein misfolding and neurodegenerative diseases. **Apoptosis**, v. 14, p. 455-468, 2009.
- NARANJO, C.A.; TREMBLAY, L.K.; BUSTO, U.E. The role of the brain reward system in depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.**, v.25, p.781-823, 2001.
- NESSE, R.M. Is depression an adaptation? **Arch. Gen. Psychiatry**, v.57, p.14-20, 2000.
- NESSE, R.M. Natural selection and elusiveness of happiness. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. BBiol. Sci**, v.359, p.1333-1347, 2004.
- NESSE, R.M.; ELLSWORTH, P.C. Evolution, emotions, and emotional disorders. **Am. Psychologist**, v.64, p.129-139, 2009.
- NESTLER, E.J.; BARROT, M.; DILEONE, R.J.; EISCH, A.J.; GOLD, S.J.; MONTEGGIA, L.M. Neurobiology of depression. **Neuron**, v.34, p.13-25, 2002a.
- NESTLER, E.J.; GOULD, E.; MANJI, H.; BUNCAN, M.; DUMAN, R.S.; GRESHENFELD, H.K.; HEN, R.; KOESTER, S.; LEDERHENDLER, I.; MEANEY, M.; ROBBINS, T.; WINSKY, L.; ZALCMAN, S. Preclinical models: status of basic research in depression. **Biol Psychiatry.**, v.52 (6), p.503-28, 2002.
- NG, F., BERK, M.; DEAN, O.; BUSH, A.I. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. **Int J Neuropsychopharmacol.**, v.11(6), p.851-876, 2008..
- NICHOLLS D. G. Oxidative Stress and Energy Crises in Neuronal Dysfunction. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1147, p. 53-60, 2008.

NODA, Y.; KAMEI, H.; MAMIYA, T.; FURUKAWA, H.; NABESHIMA, T. Repeated phencyclidine treatment induces negative symptom-like behavior in forced swimming test in mice: imbalance of prefrontal serotonergic and dopaminergic functions. **Neuropsychopharmacology**, v.23(4), p.375-87, 2000.

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

O'NEILL, M.F.; CONWAY, M.W. Role of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> receptors in the mediation of behavior in the forced swimming test in mice. **Neuropsychopharmacology**, v.24, p.391-398, 2001.

OMONI, A. O.; ALUKO, R. E. Soybean foods and their benefits: potential mechanisms of action. **Nutr. Rev.**, v. 63, p. 272-283, 2005.

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

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.

PALL, M.L. Nitric oxide synthase partial uncoupling as a key switching mechanism for the NO/ONOO-cycle. **Med. Hypotheses**, v.69, p.821-825, 2007.

PAPADOPOULOS, M.; KOUMENIS, I.; DUGAN, L.; GIFFARD, R. Vulnerability to glucose deprivation injury correlates with glutathione levels in astrocytes. **Brain Res**, v.748, p.151-156, 1997.

PAPP, M.; WIERONSKA, J. Antidepressant-like activity of amisulpride in two animal models of depression. **J. Psychopharmacol.**, v. 14, p.46-52, 2000.

PARINI, S.; RENOLDI, G.; BATTAGLIA, A.; INVERNIZZI, R.W. Chronic reboxetine desensitizes terminal but not somatodendritic  $\alpha_2$ -adrenoreceptors controlling noradrenaline release in the rat dorsal hippocampus. **Neuropsychopharmacology**, v.30, p.1048-1055, 2005.

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

PAYKEL, E.S. Depression: major problem for public health. **Epidemiol. Psychiatr. Soc.**, v.15, p.1-10, 2006.

PAZOS, A.; HOYER, D.; PALACIOS, J.M. The hiding of serotonergic ligands to the porcine choroid plexus: characterization of a new type of serotonin recognition site. **Eur J Pharmacol.**, v.106, p.539-546, 1984.

PIÑEYRO, G.; BLIER, P. Autoregulation of serotonin neurons: role in antidepressant drug action. **Pharmacol Rev.**, v.51(3), p.533-591, 1999.

PITTENGER, C.; DUMAN, R.S. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. **Neuropsychopharmacology**, v.33, p.88-109, 2008.

POPIK, P.; KRAWCZYK, M.; GOLEMBIOWSKA, K.; NOWAK, G.; JANOWSKY, A.; SKOLNICK, P.; LIPPA, A.; BASILE, A.S. Pharmacological profile of the "triple" monoamine neurotransmitter uptake inhibitor, DOV 102,677. **Cell Mol Neurobiol.**, v.26, p.857-873, 2006.

PORSOLT, R.D.; ANTON, G.; BLAVET, N.; JALFRE, M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **Eur. J. Pharmacol.**, v.47, p.379-391, 1978.

PORSOLT, R.D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v.266, p.730-732, 1977.

PORSOLT, R.D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, v. 229, p. 327-36, 1977.

PRICE, J. Darwinian dynamics of depression. **Aust. N. Z. J. Psychiatry**, v.43, p.1029-1037, 2009.

PRICE, J.; SLOMAN, L.; GARDNER, R.; GILBERT, P.; ROHDE, P. The social competition hypothesis of depression. **Br. J. Psychiatry**, v.164, 309-315, 1994.

PUECH, A.J.; CHERMAT, R.; PONCELET, M.; DOARE, L.; SIMON, P. Antagonism of hypothermia and behavioral response to apomorphine, a simple, rapid and discriminating test for screening antidepressant and neuroleptics. **Psychopharmacology**, v. 75, p. 84-91, 1981.

PUECH, A.J.; FRANCÈS, H.; SIMON, P. Imipramine antagonism of apomorphine-induced hypothermia: a non-dopaminergic interaction. **Eur J Pharmacol.**, v.47, p.125-127, 1978.

RADENOVIC, L.; VASILJEVIĆ, I.; SELAKOVIC, V.; JOVANOVIĆ, M. 7-Nitroindazole reduces nitrite concentration in rat brain after intrahippocampal kainate-induced seizure. **Comparative Biochem. and Physiol.**, v.135, p. 443-450, 2003.

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

RAYMOND, R.J.; MUKHIN, Y.V.; GELASCO, A.; TURNER, J.; COLLINSWORTH, G.; GETTYS, T.W.; GREWAL, J.S.; GARNOVSKAYA, M.N. Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. **Pharmacology & Therapeutics**, v.92, p.179-212, 2001.

REDROBE, J.P.; BOURIN, M; COLOMBEL, M.C.; BAKER, G.B. Dose-dependent noradrenergic and serotonergic properties of venlafaxine in animal models indicative of antidepressant activity. **Psychopharmacology**, v.138, p.1-8, 1998a.

REDROBE, J.P.; BOURIN, M; COLOMBEL, M.C.; BAKER, G.B. Psychopharmacological profile of selective serotonin reuptake inhibitor, paroxetine: implication of noradrenergic and serotonergic mechanisms. **J Psychopharmacol.**, v.12, p.348-55, 1998b.

REITER, R.J. Oxygen radical detoxification processes during aging: the functional importance of melatonin. **Aging (Milano)**, v.7(5), p.340-351, 1995.

REMMEN, 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.

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

RICHARD, R.S.; WANG, L.; JELINEK, H. Erythrocyte oxidative damage in chronic fatigue syndrome. **Arch. Med. Res.**, v.38, p.94-98, 2007..

RODRIGUES, A.L.S.; SILVA, G.L.; MATTEUSSI, A.S.; FERNANDES, E.; MIGUEL, O.; YUNES, R.A. et al. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. **Life Sci.**, v.70, p.1347-1358, 2002.

ROHWER, J.G.. Prodrômus einer monographie der Gattung *Ocotea* Aublet (Lauraceae), sensu lato. **Mitt. Allg. Bot. Hamburg**, v. 20, p. 3-278, 1986.

ROMEIRO, L.A.S.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J. Novas estratégias terapêuticas para o tratamento da depressão: uma visão da química medicinal. **Química Nova**, v. 26 (3), 347-358, 2003.

ROSS, D.; MOLDEUS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In Vigo-Pelfrey C (ed): *Membrane lipid oxidation*. 1<sup>st</sup> ed. Boca Raton, CRC Press, 1991;151-70.

RUTHER, E.; DEGNER, D.; MUNZEL, U; BRUNNER, E.; LENHARD, G.; BIEHL, J.; VOGTLE-JUNKERT, U. Antidepressant action of sulpiride. Results of a placebo-controlled double-blind trial. **Pharmacopsychiatry**, v. 32, p. 127-135, 1999.

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

SAKAKIBARA, H.; ISHIDA, K; GRUNDMANN, O; NAKAJIMA, J; SEO, S; BUTTERWERK, V, ET AL. Antidepressant effects of extracts from Ginko biloba leaves in behavioral models. **Biol Pharm Bull.**, v.29, 1767-1770, 2006.

SALGADO, H.; KOHR, G.; TREVINO, M. Noradrenergic “Tone” determines dichotomous control of cortical spike timing-dependent plasticity. **Scientific reports**, v.417 (2), P.1-7, 2012.

SANDERS, P.; KORF, J. Neuroaetiology of chronic fatigue syndrome: an overview. **World J. Biol. Psychiatry**, v.8, p.1-7, 2007..

SANGIRARDI, JR. Botânica fantástica: plantas da mitologia, religião, magia. Ed. Brasiliense, São Paulo. Ilust, 113p, 1984.

SAPOLSKY, R.M. The possibility of neurotoxicity in the hippocampus in major depression: a primer on neuron death. **Biol Psychiatry**, v.48, p.755-765, 2000.

SAPOLSKY, R.M. Why Zebras don't get ulcers. 3<sup>rd</sup> Ed. New York, NY: Henry Holt and Company, 2004.

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

SARGENT, P.A; KJAER, K.H.; BENCH, C.J.; RABINER, E.A.; MESSA, C.; MEYER, J.; et al. Brain serotonin 1A receptor binding measured by positron emission tomography with [11C] WAY-100635: effects of depression and antidepressant treatment. **Arch Gen Psychiatry.**, v.57, p.174-180, 2000.

SARI, Y. Serotonin 1B receptors: from protein to physiological function and behavior. **Neurosci Biobehav Rev.**, v.28 (6), p.565-582, 2004.

SARKO, J. Antidepressants, old and new. A review of their adverse effects and toxicity in overdose. **Emerg. Med. Clin. North Am.**, v.18, p.637-654, 2000.

SAVEGNAGO, L.; JESSE, C.R.; PINTO, L.G.; ROCHA, J.B.T.; NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G. Monoaminergic agents modulate antidepressant-like effect caused by diphenyl diselenide in rats. **Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry.**, v.31, p.1261-1269, 2007.

SAVITZ, J.B.; DREVETZ, W.C. Imaging phenotypes of major depressive disorder: genetic correlates. **Neuroscience**, v.164, p.300-330, 2009.

SCHILDKRAUT, J.J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. **The American Journal of Psychiatry**, v.122, p.509-520, 1965.

SCHRAMM, M.L.; MCDONALD, M.P.; LIMBIRD, L.F. The alpha(2a)-adrenergic receptor plays a protective role in mouse behavioral models of depression and anxiety. **J Neurosci.**, v.21, p.4875-4882, 2001.

SCOTT, M. D.; LUBIN, B. H.; ZUO, L.; KUYPERS, F. A. Erythrocyte defence against hydrogen peroxide: proeminent importance of catalase. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 118, p. 7-16, 1991.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissues with ellman reagents. **Anal. Biochem.**, v. 25, p. 192-205, 1988.

SEIXAS, S.R.S. Preparação de derivados benzoiltiramínicos e sua atividade cardiopressora. João Pessoa. **Dissertação de Mestrado**. Mestrado em Produtos Naturais. Universidade Federal da Paraíba. 103p. 1996.

SHAN, X.; AW, T. Y.; JONES, D. P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacol Ther.**, v.47, p.61-71, 1990.

SHAN, X.; AW, T. Y.; JONES, D. P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacol. Ther.**, v. 47, p. 61-71, 1990.

SHER, L.; MANN, J.J.; TRASKMAN-BENDZ, L.; WINCHEL, R.; HUANG, Y.Y.; FERTUCK, E.; STANLEY, B.H.. Lower cerebrospinal fluid homovanilic acid levels in depressed suicide attempters. **J. Affect. Disord.**, v. 90, p.83-89, 2006.

SINGH, S.K.; PRASAD, A.K.; OLSEN, C.E.; JHA, A.; JAIN, S.C.; PARMAN, V.S.; WENGEL, J. **Phytochemistry**, v. 43, p. 1355, 1996.

SOARES, J.C.; MANN, J.J. The functional neuroanatomy of mood disorders. **J Psychiatr Res**, v.31, p.393-432, 1997.

SONINO, N.; FAVA, G.A. Residual symptoms in depression an emerging therapeutic concept. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v.26, p.763-70, 2002.

SOUSA, F.C.; MELO, C.T.; MONTEIRO, A.P.; LIMA, V.T.; GUTIERREZ, S.J.; PEREIRA, B.A.; BARBOSA-FILHO, J.M.; VASCONCELOS, S.M.; FONTELES, M.F.; VIANA, G.S. Antianxiety and antidepressant effects of riparin III from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Pharmacol Biochem Behav.**, v.78(1), 27-33, 2004.

SOUSA, F.C.F.; LEITE, C.P.; MELO, C.T.V.; ARAÚJO, F.L.O.; GUTIERREZ, S.J.C.; BARBOSA-FILHO, J.M.; FONTELES, M.M.F.; VASCONCELOS, S.M.M; VIANA, G.S.B. Evaluation os effects of N-(2-hidroxy benzoyl) tyramine (riparin II) from *Aniba*

riparia (Nees) Mez (Lauraceae) in anxiety models in mice. *Biol. Pharm. Bull.*, v.30 (7), p.1212-1216, 2007.

SOUSA, F.C.F.; MONTEIRO, A.P.; MELO, C.T.V.; OLIVEIRA, G.R.; VASCONCELOS, S.M.M.; FONTELES, M.M.F.; GUTIERREZ, S.J.C.; BARBOSA-FILHO, J.M.; VIANA, G.S.B. Antianxiety effects of riparin I form Aniba riparia (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. *Phytotherapy Research*, v.19, p.1005-1008, 2005.

SOUTHWICK, S.M.; VYTHILINGAM, M.; CHARNEY, D.S. The psychobiology of depression and resilience to stress: implications for prevention and treatment. *Annu Rev Clin Psychol.*, v.1, p.255–291, 2005.

SPREUX-VARQUAUX, O.; ALVAREZ, J.C.; BERLIN, I.; BATISTA, G.; DESPIERRE, P.G.; GILTON, A.; et al. Differential abnormalities in plasma 5-HIAA and platelet serotonin concentrations in violent suicide attempters: relationships with impulsivity and depression. *Life Sci.*, v.69, p.647–657, 2001.

STARR, L.R.; HAMMEN, C.; BRENNAN, P.A.; NAJMAN, J.M. Serotonin transporter gene as a predictor of stress generation in depression. *J. Abnorm Psychol*, 2012. (in press)

STERU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P. Tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*, v. 85, p. 367-70, 1985.

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

STONE, E.A.; GRUNEWALD, G.L.; LIN, Y.; AHSAN, R.; ROSENGARTEN, H.; KRAMER, H.K.; QUARTERMAIN, D. Role of epinephrine stimulation of CNS  $\alpha$ 1-adrenoreceptors in motor activity in mice. *Synapse*, v.49, p.67-76, 2003.

SUGIMOTO, Y.; FURUTANI, S.; NISHIMUTA, K.; ITOH, A.; TANAHASHI, T.; NAKAJIMA, H.; OSHIRO, H.; SUN, S.; YAMADA, J. Antidepressant-like effects of neferine in the forced swimming test involve the serotonin<sub>1A</sub> (5-HT<sub>1A</sub>) receptor in mice. *Eur J Pharmacol.*, v.634, p.62-67, 2010.

SVOBODA, P.; TEISINGER, J.; NOVOTNY, J.; BOUROVA, L.; DRMOTA, T.; HEJNOVA, L.; DURCHANKOVA, D. Biochemistry of transmembrane signaling mediated by trimetric G proteins. *Physiol. Res.*, v. 53 (supl 1), p.141S-152S, 2004.

SZOT, P.; LESTER, M.; LAUGHLIN, M.L.; PALMITER, R.D.; LILES, L.C.; WEINSHENKER, D. The anticonvulsant and proconvulsant effects of  $\alpha$ 2-adrenoreceptors agonists are mediated by distinct populations of  $\alpha$ 2-adrenoreceptors. *Neuroscience*, v.126, p.795-803, 2004.

SZOT, P.; WHITE, S.S.; GREENUP, J.L.; LEVERENZ, J.B.; PESKIND, E.R.; RASKIND, M.  $\alpha 1$  adrenoceptor in human hippocampus: binding and receptor subtype mRNA expression. **Molecular Brain Research**, v.139, p.367-371, 2005.

TAYLOR, C; FRICKER, A.D.; DEVI, L.A.; GOMES, I. Mechanisms of action of antidepressants: from neurotransmitter systems to signaling pathways. **Cell Signal.**, v.17, p.549-557, 2005.

TEIXEIRA, C.P.; DE MELO C.T.; DE ARAÚJO, F.L.; DE CARVALHO, A.M., SILVA, M.I.; BARBOSA-FILHO, J.M.; MACÊDO, D.S.; DE BARROS VIANA, G.S.; DE SOUSA, F.C. Antidepressant-like effect of riparin II from *Aniba riparia* in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. **Fundam Clin Pharmacol.** doi: 10.1111/j.1472-8206.2011.00973.x., 2011.

TESTE, J.F.; MARTIN, I.; RINJARD, P.; Electrotherapy in mice: dopaminergic and noradrenergic effects in Tail Suspension Test. **Fundam Clin Pharmacol.**, v.4, p.39-47, 1990.

THASE, M.E. Treatment issues related to sleep and depression. **J Clin Psychiatry**, v.61 (supl 11), p.46-50, 2000.

THOMAS, G.; CASTELO BRANCO, J.V.; BARBOSA FILHO, J.M.; BACHELET, M.; VARGAFTIG, B.B. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.46, p.103-107, 1994.

THOMAS, G.; CASTELO-BRANCO, U.J.V.; BARBOSA-FILHO, J.M.; BACHELET, M.; VARGAFTIG, B.B. Studies on the mechanism of spasmolytic activity of (O-methyl)-N-(2,6-dihydroxybenzoyl) tyramine, a constituent of *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae), in rat uterus, rabbit aorta and guinea pig alveolar leucocytes. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 46; p. 103-7, 1994.

TIMMONS, S.D.; GEISERT, E.; STEWART, A.E.; LORENZON, N.M.; FOEHRING, R.C.  $\alpha 2$ -adrenergic receptor-mediated modulation of calcium current in neocortical pyramidal neurons. **Brain Research**, v.1014, p. 184-196, 2004.

TORRES, J.M.; CHAVEZ, A.G. Secamidas en plantas: distribución e importancia. **Avance y perspective**, v. 20, p. 377-387, 2001.

TORRES, R.M.; MIRALLES, R.; GARCIA-CASELLES, M.P.; ARELLANO, M.; AGUILERA, A.; PI-FIGUERAS, M.; CERVERA, A.M. Observational scale and geriatric depression scale of Yesavage to identify depressive symptoms in older patients. **Arch Gerontol Geriatr Suppl.**, v.9, p.437-442, 2004.

TRIFUNOVIC, R.; REILLY, S. Medial parabrachial nucleus neurons modulate d-fenfluramine-induced anorexia through 5HT<sub>2A</sub> receptors. **Brain Res**, v.1067 (1), P.170-176, 2006.



TRIVEDI, M.; RUSH, A.J.; WISNIEWSKI, S.R.; NIERENBERG, A.A.; WARDEN, D.; RITZ, L.; NORQUIST, G.; HOWLAND, R.H.; LEBOWITZ B.; McGRATH, P.J. Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR\*D: implications for clinical practice. **Am. J. Psychiatry**, v.163, p.28-40, 2006.

TRIVEDI, M.H.; PIGOTTI, T.A.; PERERA, P.; DILLINGHAM, K.E.; CARFAGNO, M.L.; PITTS, C.D. Effectiveness of low doses of paroxetine controlled release in the treatment of major depressive disorder. **J Clin Psychiatry**, v.65, p.1356-1364, 2004.

TSUBOI, H.; TATSUMI, A.; YAMAMOTO, K.; KOBAYASHI, F.; SHIMOI, K.; KINAE, N. Possible connections among job stress, depressive symptoms, lipid modulation and antioxidants. **J Affect Disord.**, v.91, p.63-70, 2006.

TURRENS, J. F.; ALEXANDRE, A.; LEHNINGER, A. L. Ubisemiquinone is the donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 237, p. 408-414, 1985.

USTUN, T.B.; SARTORIOUS N. Mental illness in general health care: an international study. Chichester, England: John Wiley & Sons; 1995.

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

VALENTINI, W.; LEVAV, I.; KOHN, R.; MIRANDA, C.T.; MELLO, A.A.F.; MELLO, M.F.; RAMOS, C.P. Treinamento de clínicos para o diagnóstico e tratamento da depressão. **Rev. Saúde Pública**, v. 38 (4), p.522-528, 2004.

VAN DER KRAAIJ, A. M. M.; MOSTERT, L. J.; VAN EIJK, H. G.; KOSTER, J. F. Ironload increases the susceptibility of rat hearts to oxygen reperfusion damage. **Circulation**, v.78, p.442-449, 1988.

VAN-DER-VLIET A.; BAST, A. Effect of oxidative stress on receptors and signal transmission. **Chem Biol Interact.**, v.85, p.95-116, 1992.

VETULANI, J; NALEPA, I. Antidepressants: past, present and future. **Eur J Pharmacol.**, v.405, p.351-363, 2000.

VICENTINI, A.; WERFF, H.V.D.; NICOLAU, S. **Lauraceae**. In: Flora da Reserva Ducke – Guia de Identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Edited by RIBEIRO, J.E.L.S.; HOPKINS, M.J.G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C.A.; COSTA, M.A.S.; BRITO, J.M; SOUZA, M.A.D; MARTINS, L.H.P.; LOHMANN, L.G.; ASSUNÇÃO, P.A.C.L.; PEREIRA, E.C., SILVA, C.F.; MESQUITA, M.R.; PROCÓPIO, L.C. Manaus: INPA – DFID, v. 1, p. 150-179, 1999.

WALSTAB, J.; RAPPOLD, G.; NIESLER, B. 5-HT<sub>3</sub> receptors: role in disease and target of drugs. **Pharmacology & Therapeutics**, v.128, p.146-169, 2010.

WANG, P. G.; XIAN, M.; TANG, X.; WU, X.; WEN, Z.; CAI, T.; JANCZUK, A. J. Nitric oxide donors: chemical activities and biological applications. **Chem. Rev.**, v. 102, p. 1091-1134, 2002.

WANG, R.; XU, Y.; WU, H.L.; LI, Y.B.; GUO, J.B.; et al. The antidepressant effects of curcumin in the forced swimming test involve 5-HT<sub>1</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors. **Eur J Pharmacol.**, v.578, p.43-50, 2008.

WATSON, P.J.; ANDREWS, P.W. Toward a revised evolutionary adaptationist analysis of depression: the social navigation hypothesis. **J. Affect. Disord.**, v.72, p.1-14, 2002.

WEGENER, G.; HARVEY, B.H.; BONEFELD, B.; MÜLLER, H.K.; VOLKE, V.; OVERSTREET, D.H.; ELFVING, B. Increased stress-evoked nitric oxide signalling in the Flinders sensitive line (FSL) rat: a genetic animal model of depression. **Int J Neuropsychopharmacol.**, v.13(4), p.461-473, 2009.

WERFF, H.V.D.; RICHTER, H.G. Toward an improved classification of Lauraceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 83, p. 419-432, 1996.

WILLNER, P. Antidepressants and serotonergic neurotransmission: an integrative review. **Psychopharmacology (Berl)**, v.85, p.387-404, 1985.

WILLNER, P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioral-neurobiological concordance in the effects of CMS. **Neuropsychobiology**, v.52, p.90-110, 2005.

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

WILLNER, P. The validity of animal models of depression. **Psychopharmacology**, v.83, p.1-16, 1984.

WILLNER, P.; MITCHELL, P.J. Animal models of depression: a diathesis/stress approach. In: D'haenen, H.; Den Boer, J.; Willner, P. (Eds.), *Biological Psychiatry*. Wiley, New York, pp. 703-726. 2002

WOODS, S.; CLARKE, N.N.; LAYFIELD, R.; FONE, K.C. 5-HT<sub>6</sub> receptor agonists and antagonists enhance learning and memory in a conditioned emotion response paradigm by modulation of cholinergic and glutamatergic mechanisms. **Br J Pharmacol**, 2012. (in press)

XIA, X.; CHENG, G.; PAN, Y.; XIA, Z.H.; KONG, L.D. Behavioral, neurochemical and neuroendocrine effects of the ethanolic extract from *Curcuma longa* L. in the mouse forced swimming test. **J Ethnopharmacol.**, v.110, p.356-363, 2007.

YAGER, S.; FORLENZA, M.J.; MILLER, G.E. Depression and oxidative damage to lipids. **Psychoneuroendocrinology**, v.35(9), p.1356-1362, 2010.

YAMADA, J.; SUGIMOTO, Y; YAMADA, S. Involvement of dopamine receptors in the anti-immobility effects of dopamine re-uptake inhibitors in the forced swimming test. **Eur J Pharmacol.**, v.504, p.207-211, 2004.

YAMADA, J.; SUGIMOTO, Y; YAMADA, S. Involvement of dopamine receptors in the anti-immobility effects of dopamine re-uptake inhibitors in the forced swimming test. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 504, p. 207-211, 2004.

YILDIZ, F.; ERDEN, B.F.; ULAK, G.; UTKAN, Y.; GACAR, N. Antidepressant-like effect of 7-nitroindazole in the forced swimming test in rats. **Psychopharmacology**, v.149, p.41-44, 2000.

YUDOFISKY, S.C.; HALES, R.E. Neuropsiquiatria e neurociência na prática clínica. Porto Alegre: Artmed, 2006.

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

ZAFIR, A.; BANU, N. Antioxidant potential of fluoxetine in comparison to Curcuma longa in restraint-stressed rats. **Eur J Pharmacol.**, v.572(1), p.23-31, 2007.

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.

ZIGMOND, M.J.; BLOOM, F.E.; LANDIS, S.C.; ROBERTS, J.L.; SQUIRE, L.R. Fundamental Neuroscience. **Academic Press.**, p.14-44, 1999.

ZOMKOWSKI, A.D.E.; ROSA, A.O.; LIN, J.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B.; RODRIGUES, A.L.S. Evidence for serotonin receptor subtypes involvement in agmatine antidepressant-like effect in the mouse forced swimming test. **Brain Res.**, v.1023, p.253-263, 2004.



## 10 ANEXOS

### ANEXO 1 – Parecer do Comitê de Ética




Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Tedillo  
Cep: 80430-970 Fortaleza-CE  
Tel: (85) 3366-8331 Fax: (85) 3366-8333

## DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 15/08, sobre o projeto intitulado: "INVESTIGAÇÃO DOS POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO DE N-2,6-DIHDROXIBENZOIL TIRAMINA (RIPARINA III) EM MODELOS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS EM CAMUNDONGOS", de responsabilidade da Carla Thiciane Vasconcelos de Melo, 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 25 de junho de 2008.

Fortaleza, 25 de junho de 2008

  
Prof. Dra. Jeanne Matos de Andrade Cunha  
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal - CEPA

## ANEXO 2 – Trabalho publicado

ORIGINAL  
ARTICLE

doi: 10.1111/j.1472-8206.2011.00968.x

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

Carla Thiciane Vasconcelos Melo<sup>a</sup>, Alyne Mara Rodrigues de Carvalho<sup>a</sup>, Brinell Arcanjo Moura<sup>a</sup>, Caroline Porto Leite Teixeira<sup>a</sup>, Leonardo Freire Vasconcelos<sup>a</sup>, Mariana Lima Feitosa<sup>a</sup>, Gersilene Valente de Oliveira<sup>a</sup>, José Maria Barbosa-Filho<sup>b</sup>, Stanley Juan Chavez Gutierrez<sup>b</sup>, Marta Maria de França Fonteles<sup>a</sup>, Silvânia Maria Mendes Vasconcelos<sup>a</sup>, Francisca Cléa Florenço de Sousa<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Faculty of Medicine, Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Rua Cel. Nunes de Melo 1127, 60430-270, Fortaleza, Ceará, Brazil

<sup>b</sup>Laboratory of Pharmaceutics Technology, Federal University of Paraíba, Paraíba, Brazil

## Keywords

*Aniba riparia*,  
antidepressant-like effect,  
forced swimming test,  
Riparin III,  
tail suspension test

Received 16 August 2010;  
revised 21 May 2011;  
accepted 27 June 2011

\*Correspondence and reprints:  
cdaflorenco@yahoo.com.br

## ABSTRACT

Previous work has shown that intraperitoneal administration of riparin III (ripIII) reduces immobility time in the forced swimming test (FST), which suggests potential antidepressant activity. As the mechanism of action is not completely understood, this study is aimed at investigating the antidepressant-like action of ripIII. Following intraperitoneal administration of ripIII at doses of 25 and 50 mg/kg, there were decreases in the immobility time in the FST and tail suspension test without accompanying changes in ambulation (data not shown). The pretreatment of mice with sulpiride (50 mg/kg, i.p.), prazosin (1 mg/kg, i.p.), yohimbine (1 mg/kg, i.p.), and *p*-chlorophenylalanine (PCPA, 100 mg/kg, i.p. for four consecutive days) significantly prevented the anti-immobility effect of ripIII in the FST. On the other hand, the anti-immobility effect of ripIII (50 mg/kg, v.o.) was not altered by pretreatment of mice with SCH23390 (15 µg/kg, i.p.). Furthermore, ripIII potentiated the sleeping latency and sleeping time of the pentobarbital-induced sleeping time test and also potentiated apomorphine (16 mg/kg, i.p.)-induced hypothermia in mice. In conclusion, the present study provides evidence that the antidepressant-like effect of ripIII is dependent on its interaction with the serotonergic, noradrenergic ( $\alpha_1$ - and  $\alpha_2$ -receptors), and dopaminergic (dopamine D<sub>2</sub> receptors) systems.

## INTRODUCTION

Mood disorders such as depression are among the most common forms of mental illness with a lifetime prevalence of up to 20% of the population, being two to three times as common in women as in men [1]. The World

Health Organization estimated that unipolar depressive disorders were the fourth main cause of disability in 2002, and predicts that they will be the second main cause of disability in 2030 [2]. Although there are several molecular targets useful in the development of new antidepressant drugs, most of the current treatments for



depression affect direct or indirectly the monoaminergic system [3]. The monoaminergic hypothesis indicates that the pathology of depression involves dysfunction of monoamine neurotransmitter circuits in the central nervous system (CNS). This theory is supported by numerous neurochemical findings [4] and by the successful treatment for major depression with classical antidepressants compounds that enhance monoaminergic neurotransmission [5].

It is desirable to research and develop more effective antidepressants with fewer adverse effects. Natural plants may be an important source of new antidepressant drugs once there are plenty works showing the effectiveness of some herbals extracts and their constituents against depression, such as *Hypericum perforatum*, *Curcuma longa*, *Ginkgo biloba*, *Rosmarinus officinalis*, *Schinus molle*, and *Aniba riparia*, among others [6–15].

*Aniba* is a genus that comprises 41 species of shrubs and trees and is primarily a lowland genus with its center of diversity in Central Amazonia (Brazil) and Guyana [16]. The genus is represented by 25 species in Brazil and one of its species, *A. riparia* (Nees) Mez, from the Lauraceae family, is popularly known as 'louro' and occurs in the Humaita region of the Amazonas state of Brazil [17,18].

From the unripe fruit of *A. riparia*, three substances have been isolated with broad spectrum antimicrobial activity: methyl ethers of *N*-(benzoyl) tyramine (riparin I), *N*-(2-hydroxybenzoyl) tyramine (riparin II), and *N*-(2,6-dihydroxybenzoyl) tyramine [riparin III (ripIII)], which were later produced synthetically [19].

Previous data showed that one of the above compounds, (*O*-methyl-)-*N*-(2,6-dihydroxybenzoyl) tyramine (ripIII), has potent smooth muscle relaxant activity [20,21]. The spasmolytic effect of ripIII was investigated concerning the involvement of the compound in relation to  $Ca^{2+}$  metabolism. It was demonstrated that ripIII produces an inhibition of  $Ca^{2+}$  influx and release of intracellular  $Ca^{2+}$ . These results lead to the reduction in intracellular  $Ca^{2+}$  concentration and possibly contribute to the drug spasmolytic effect [22]. Recently, our group has reported that ripI [23], ripII [24], and ripIII [14,25] present anxiolytic-like effects in rodent models of anxiety.

Considering that ripIII showed antidepressant effects when administered intraperitoneally [14], we aimed to investigate whether the oral administration of ripIII also shows antidepressant-like effects in mouse behavioral despair tests. Additional aim was to investigate the involvement of the serotonergic, dopaminergic, and noradrenergic systems in ripIII antidepressant-like

effects. To corroborate the antidepressant effect of ripIII, other animal models were used to evaluate its action, namely apomorphine-induced hypothermia and barbiturate-induced sleeping time.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

Male Swiss mice, 25 g, were used in each experiment, and the animals were maintained at a controlled temperature ( $23 \pm 1$  °C) with a 12-h dark/light cycle and free access to water and food. Animals were treated in accordance with the current law and the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals.

### Drugs and treatment

The following drugs were used: ripIII as the test drug, diazepam, a benzodiazepine-like anxiolytic (DZP; União Química, Brasília-DF, Brazil), imipramine, a tricyclic antidepressant (IMP; Geigy, São Paulo-SP, Brazil), bupropion, atypical antidepressant, which increases levels of dopamine in the brain, (BUP; GlaxoSmith Kline, Rio de Janeiro-RJ, Brazil) and fluoxetine, a selective serotonin reuptake inhibitor (FLU; Medley, Campinas-SP, Brazil) as standards, and *p*-chlorophenylalanine methyl ester (PCPA), (R)-(+)-7-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine hydrochloride (SCH23390), sulpiride (SUL), prazosin (PRA) and yohimbine (YOH) as antagonists (Sigma-Aldrich, São Paulo-SP, Brazil).

Riparin III was administered by gavage, whereas diazepam, IMP, BUP, FLU, PCPA, SUL, SCH23390, PRA, and yohimbine were administered intraperitoneally (i.p.). The i.p. and gavage doses were given in a constant volume of 10 mL/kg body weight. RipIII was emulsified with 2% Tween-80 (Sigma-Aldrich) and dissolved in distilled water. All other drugs were dissolved in saline and controls received 2% Tween-80 (Sigma-Aldrich) dissolved in distilled water.

### Experimental protocol

The animals were tested during the light period and were observed in a closed room, at constant temperature ( $23 \pm 1$  °C) illuminated with normal light, except in the barbiturate-induced sleeping time test that was poorly illuminated with a 15-V red light. All the experiments were performed on different days with different animals.

### Barbiturate-induced sleeping time

Sixty minutes after the administration of ripIII, 25 mg/kg ( $n = 8$ ) and 50 mg/kg ( $n = 10$ ), vehicle ( $n = 13$ ), or

diazepam (a benzodiazepine-like anxiolytic) 1 mg/kg ( $n = 10$ ), all groups received sodium pentobarbital (40 mg/kg) intraperitoneally (i.p.). The time from administration to loss of the righting reflex is recorded as sleeping latency, and the time elapsed between the loss and voluntary recovery of the righting reflex is recorded as sleeping time [26,27]. The cutoff time considered was 240 min.

#### Apomorphine-induced hypothermia

Saline or apomorphine (a dopamine receptor agonist) (16 mg/kg) was injected intraperitoneally into mice 60 min after administration of ripIII-25 ( $n = 16$ ), ripIII-50 ( $n = 16$ ), vehicle ( $n = 16$ ) or IMP-10 ( $n = 16$ ). Temperature was measured with a digital thermometer (BD Basic, Curitiba-PR, Brazil) 30 min after apomorphine or saline administration. Mice with rectal temperatures between 36 and 38 °C prior to the experiment were used. The changes in body temperature ( $\Delta T$ ) were obtained by comparing the two temperature measurements. The temperature changes among groups were analyzed to express the antagonism of high-dose-apomorphine-induced hypothermia. [28].

#### Tail suspension test (TST)

The TST has been described by Steru et al. [29]. Animals were transported from the housing room to the testing area in their own cages and allowed to adapt to the new environment for one hour before testing. For the test, the animals were divided into five groups, vehicle ( $n = 9$ ), ripIII-25 ( $n = 7$ ), ripIII-50 ( $n = 7$ ), IMP-30 ( $n = 10$ ), and BUP-30 ( $n = 8$ ). Sixty minutes after the injection, they were suspended by the tail on the edge of a shelf 58 cm above a table top by adhesive tape placed approximately 1 cm from the tip of the tail. The duration of immobility was recorded over a period of 6 min.

#### Forced swimming test (FST)

The swimming test [30] is conducted in a tank 22 cm in diameter and 40 cm in height with a rounded lid containing freshwater at 25 °C to a depth of 20 cm. The animals received ripIII 25 mg/kg ( $n = 14$ ) and 50 mg/kg ( $n = 15$ ), vehicle ( $n = 20$ ), IMP-10 mg/kg ( $n = 8$ ), BUP-30 mg/kg ( $n = 8$ ), and FLU-35 mg/kg ( $n = 8$ ). To assess the possible involvement of the noradrenergic, dopaminergic, and serotonergic systems, independent groups of animals were pretreated with PRA (1 mg/kg, an  $\alpha_1$ -adrenoreceptor antagonist), yohimbine (1 mg/kg, an  $\alpha_2$ -adrenoreceptor antagonist), SCH23390 (15  $\mu$ g/kg, a dopamine D<sub>1</sub> receptor antagonist), SUL (50 mg/kg,

a dopamine D<sub>2</sub> receptor antagonist), or PCPA (100 mg/kg, an inhibitor of serotonin synthesis), 30 min before the administration of ripIII (50 mg/kg), BUP (30 mg/kg), IMP (10 mg/kg), FLU (35 mg/kg), or vehicle. For this set of experiments, the animals were divided into groups of 10. After 60 min, the animals were placed in the tank and left there for 5 min to observe the immobility time. A mouse was considered immobile when it remained floating in the water, without struggling, making only very slight movements necessary to keep its head above the water. Each animal was used only once.

#### Statistical analysis

The results are presented as mean  $\pm$  SEM. Data were analyzed by ANOVA followed by Student–Newman–Keuls post hoc test. *P*-values <0.05 were considered statistically significant.

## RESULTS

#### Barbiturate-induced sleeping time

Figure 1 shows the effect of ripIII on barbiturate-induced sleeping time: Gavage treatment with ripIII decreased sleeping latency (Figure 1a) at doses of 25 and 50 mg/kg at 24.2 and 35.6%, respectively, compared to control. RipIII also increased sleeping time (Figure 1b) at a dose of

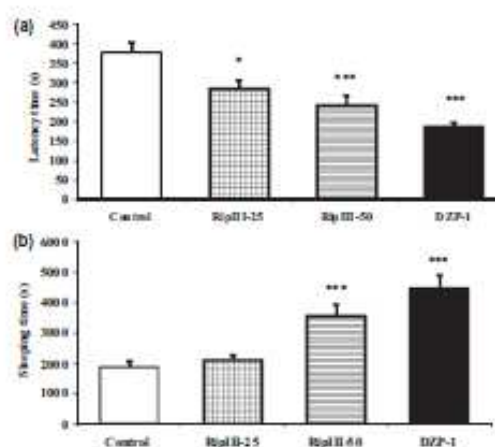


Figure 1 Effect of acute treatment of mice with riparin III (25 and 50 mg/kg) or diazepam (1 mg/kg), by gavage, on (a) sleeping latency (seconds) and (b) sleeping time (seconds) in the sodium pentobarbital-induced sleeping time test. Data are presented as mean(s)  $\pm$  SEM. Results were analysed by ANOVA followed by Student–Newman–Keuls as the post hoc test. Significant differences compared with control (\**P* < 0.05; \*\*\**P* < 0.001).



50 mg/kg at 91.57% compared to control. Diazepam, as expected, decreased sleeping latency at 50.1% and increased the sleeping time at 141.9% compared to respective controls.

#### Apomorphine-induced hypothermia

Riparin III, at both doses, did not induce hypothermia in mice, when administered alone (Figure 2a). On the other hand, after pretreatment with apomorphine, ripIII was unable to reverse the hypothermia (Figure 2b) comparing to control group. IMP-10 mg/kg reversed apomorphine-induced hypothermia at 40.2% as compared with control group.

#### Tail suspension test

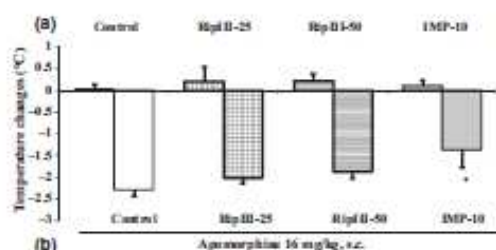
Riparin III decreased the immobility time (Figure 3) with both doses, ripIII 25 and 50 mg/kg, at 40.6 and 34.7%, respectively, as did IMP 30 mg/kg (76.0%), BUP 30 mg/kg (34.5%), and FLU 35 mg/kg (48.9%) comparing with control group.

#### Forced swimming test

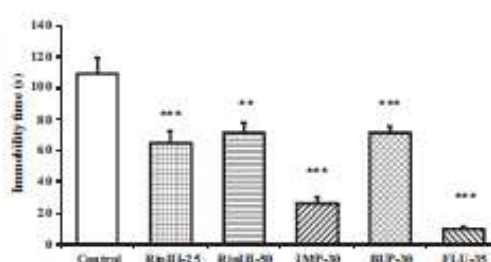
Animals treated with both doses of ripIII (25 and 50 mg/kg) showed decreases in their immobility times (Figure 4) at 51.3 and 48.5%, respectively, as well as animals treated with IMP-10 (82.5%) and BUP-30 (48.9%) compared to control group.

#### Involvement of the dopaminergic system

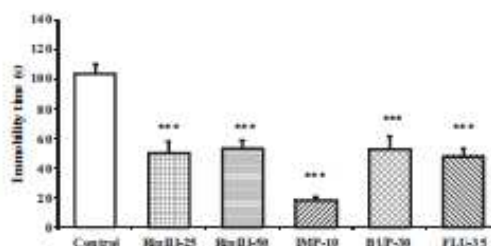
The injection of SUL (Figure 5a), 30 min prior to the last administration of ripIII, completely reversed (135.0%)



**Figure 2** Effect of the acute treatment of mice with riparin III (25 and 50 mg/kg) or imipramine (10 mg/kg), by gavage, on apomorphine-induced hypothermia in mice. Rectal temperatures of mice were measured 30 min before and after the injection of apomorphine (16 mg/kg, i.p.) (b) or saline (a), and changes of body temperature were calculated. Values were expressed as mean (°C)  $\pm$  SEM. Results were analyzed by ANOVA followed by Student–Newman–Keuls as the post hoc test. Significant differences compared with corresponding control group (\* $P < 0.05$ ).



**Figure 3** Effect of the acute treatment of mice with riparin III (25 and 50 mg/kg), imipramine (30 mg/kg), bupropion (30 mg/kg), and fluoxetine (35 mg/kg), all by gavage, on the immobility time(s) in the tail suspension test. Each column represents the mean(s)  $\pm$  SEM. Results were analyzed by ANOVA followed by Student–Newman–Keuls as the post hoc test. Significant differences compared with control group (\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ).



**Figure 4** Effect of the acute treatment of mice with riparin III (25 and 50 mg/kg), imipramine (10 mg/kg), bupropion (30 mg/kg), and fluoxetine (35 mg/kg), all by gavage, on the immobility time(s) in the forced swimming test. Each column represents the mean(s)  $\pm$  SEM. Results were analyzed by ANOVA followed by Student–Newman–Keuls as the post hoc test. Significant differences compared with control group (\*\*\*)  $P < 0.001$ ).

the immobility time reduction caused by ripIII treatment in mice. On the other hand, the anti-immobility effect was not prevented by SCH23390 (Figure 5b). The immobility time reduction caused by BUP treatment was prevented by SUL (93.2%) and by SCH23390 (90.5%) as shown in the Figure 5.

#### Involvement of the noradrenergic system

The pretreatment of mice with the  $\alpha_1$ -adrenoreceptor antagonist, PRA (Figure 6a), and with the  $\alpha_2$ -adrenoreceptor antagonist, yohimbine (Figure 6b), was able to reverse the antidepressant-like effect of ripIII at 141.0 and 122.7%, respectively. The immobility time reduction

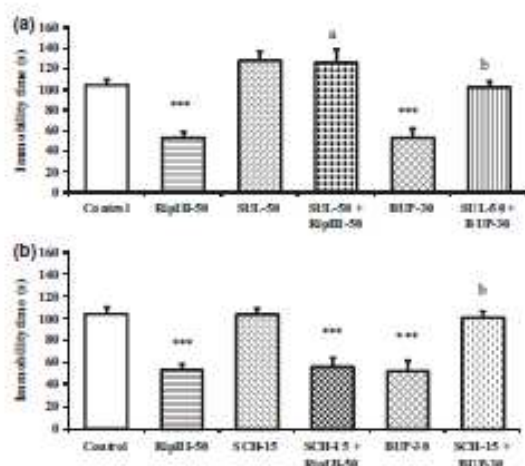


Figure 5 Effect of pretreatment of mice with sulpiride (50 mg/kg, i.p.) (a) or SCH23390 (15 µg/kg, i.p.) (b) on the riparin III (ripIII) (50 mg/kg, by gavage)-induced reduction in immobility time in the forced swimming test. Each column represents the mean(s) ± SEM. Results were analyzed by ANOVA followed by Student–Newman–Keuls as the post hoc test. Significant differences: \*\*\* $P < 0.001$  as compared to control group; \* $P < 0.001$  as compared to ripIII-50 group; <sup>b</sup> $P < 0.001$  as compared to bupropion-30 group.

caused by IMP treatment was also prevented by PRA (415.1%) and by YOH (422.33%) (Figure 6).

#### Involvement of the serotonergic system

The anti-immobility effect of ripIII (50 mg/kg) was significantly prevented by pretreatment of mice with the inhibitor of 5-HT synthesis PCPA (57.34%) (Figure 7). Similarly, the pretreatment with PCPA reversed the antidepressant effect of PLU (143.1%).

#### Open field test

Riparin III did not alter the locomotor activity in the open field as described by Melo et al. 2006.

## DISCUSSION

In the present study, the evaluation of the putative antidepressant activity of ripIII was performed with murine models, such as barbiturate-induced sleeping time, apomorphine-induced hypothermia, and IST and TST tests, which are classical models for screening antidepressant-like agents. This study also analyzes some of the possible mechanisms related to the antidepressant-like effects observed for ripIII. As monoaminergic system

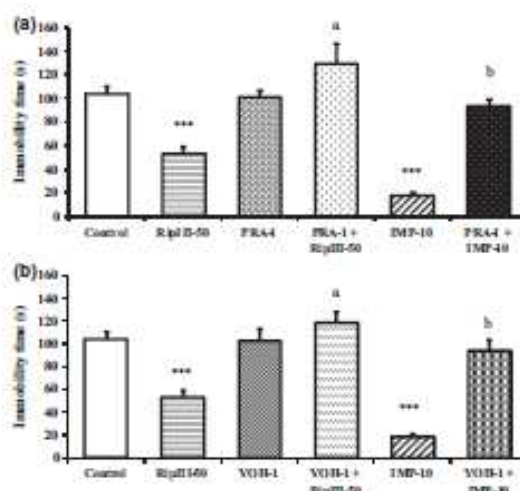


Figure 6 Effect of pretreatment of mice with prazosin (1 mg/kg, i.p.) (a) or YOH (1 mg/kg, i.p.) (b) on the riparin III (ripIII) (50 mg/kg, by gavage)-induced reduction in immobility time in the forced swimming test. Each column represents the mean(s) ± SEM. Results were analyzed by ANOVA followed by Student–Newman–Keuls as the post hoc test. Significant differences: \*\*\* $P < 0.001$  as compared to control group; \* $P < 0.001$  as compared to ripIII-50 group; <sup>b</sup> $P < 0.001$  as compared to imipramine-10 group.

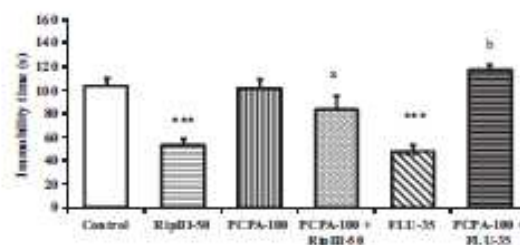


Figure 7 Effect of pretreatment of mice with *p*-chlorophenylalanine (100 mg/kg, i.p., once a day for four consecutive days) on the riparin III (ripIII) (50 mg/kg, by gavage)-induced reduction in immobility time in the forced swimming test. Each column represents the mean(s) ± SEM. Results were analyzed by ANOVA followed by Student–Newman–Keuls as the post hoc test. Significant differences: \*\*\* $P < 0.001$  as compared to control group; \* $P < 0.001$  as compared to ripIII-50 group; <sup>b</sup> $P < 0.001$  as compared to fluoxetine-35 group.

is one of the most important targets in the pathophysiology and treatment for depression [3,31], we investigated the involvement of the serotonergic, noradrenergic, and dopaminergic systems in its anti-immobility effect in the



FST. Thus, we have assessed herein the effects of several pharmacological antagonists on the anti-immobility action of ripIII (50 mg/kg, by gavage) in mice.

It is commonly believed that stress and depression are interrelated phenomena. Stress is typically implicated in the etiology of depressive disorders or as a consequence of it [32]. Animal models of depression are typically based on exposure of animals to a stressful condition (a potential or actual threatening situation) and a specific test for measuring behavioral responses. The two most widely used animal models for antidepressant screening are the FST and TST. These tests are quite sensitive and relatively specific to all major classes of antidepressant drugs including tricyclics, serotonin-specific reuptake inhibitors, MAO inhibitors, and atypicals [29,33,34].

The FST was designed by Porsolt as a primary screening test for antidepressant activity, and it remains the most widely used tool for preclinical screening of putative antidepressant agents [35]. Porsolt et al. proposed this behavioral model for the screening of new antidepressant compounds by concluding that the immobility time observed in the test reflected a state of lowered mood or hopelessness in animals. It is a low-cost, fast, and reliable model with strong predictive validity [30,33,36]. The FST shows a strong sensitivity to alterations in monoamine activity, and although the very specific cluster of stress-induced behaviors has no direct empirical relation to depression symptoms in humans, they are nonetheless exquisitely sensitive to monoaminergic manipulations [37]. It also provides a useful model to study neurobiological mechanisms underlying stress and antidepressant responses [38]. Similar to behavioral despair in FST, when the animal is suspended from the tail, it immediately engages in several 'agitation- or escape-like' behaviors, followed by increasing bouts of immobility that is reversed by antidepressant drugs [39]. In this study, TST was used to corroborate the antidepressant-like effects of ripIII found in the FST. Our results showed that ripIII decreased the immobility time in the forced swimming (at 51.3% with ripIII-25 and 48.8% with ripIII-50) and tail suspension (at 40.6% with ripIII-25 and 34.7% with ripIII-50) tests, as did, IMP (10 and 30 mg/kg), BUP (30 mg/kg), and FLU (35 mg/kg). These results indicate that ripIII produces a specific antidepressant-like effect in predictive animal models of antidepressant properties once they can be comparable to prior work [14] showing that ripIII reduced immobility time in FST at 31.2 (25 mg/kg) and 47% (50 mg/kg) and also reduced

immobility time in TST at 35.7% (50 mg/kg) when administered by intraperitoneal route.

However, ripIII did not antagonize apomorphine (16 mg/kg, i.p.)-induced hypothermia. It is worthwhile mentioning that the antagonism of high-dose-apomorphine-induced hypothermia seems to be specific for antidepressants, which can facilitate noradrenergic transmission, i.e., IMP-like drugs, and is not very effective in demonstrating the antidepressant properties of other antidepressant agents. In fact, Puech et al. (1981) [28] suggested that apomorphine-induced hypothermia results from two effects: (i) the first, observed at small doses and antagonized by neuroleptics, is related to stimulation of  $D_2$  dopaminergic receptor and (ii) the second, induced by high doses and antagonized by IMP, is probably not related to dopaminergic system, but to the  $\beta$ -adrenergic system [40]. Furthermore, dopamine agonists are known to be effective on FST [41] as well as in depressed patients [42]. These results prompted us to evaluate the involvement of the dopaminergic, serotonergic, and noradrenergic ( $\alpha$ -adrenergic) systems once ripIII was shown not to antagonize apomorphine-induced hypothermia indicating non-participation of  $\beta$ -adrenergic system in its anti-immobility effect.

The role of noradrenaline (NA) in the pathophysiology of depression is well established. Some antidepressant drugs increase the synaptic concentration of NA or act directly on noradrenergic receptors [3]. In addition, it was demonstrated that NA-deficient mice lack responses to antidepressant drugs, including SSRIs [43]. In our study, both PRA (an  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonist) and yohimbine (an  $\alpha_2$ -adrenoceptor antagonist) were able to reverse the antidepressant-like effect of ripIII. This result indicates that ripIII may exert its effect in the FST by interacting with both  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$ -adrenoceptors. Accordingly, there is compelling evidence for a role of  $\alpha_1$ - and  $\alpha_2$ -adrenoceptors in the actions of antidepressant agents. Taken together, the results show that ripIII may exert its action by interaction with  $\alpha$ -adrenoreceptors but not with  $\beta$ -adrenoreceptors.

The dopaminergic system is also implicated in the regulation of mood [44]. Clinical studies have shown that plasma levels of dopamine metabolites are significantly lower in depressed patients, indicating diminished dopamine turnover [45]. As shown in the results, the anti-immobility effects of ripIII were entirely prevented by SUL ( $D_2$  antagonist) but not by SCH23390 ( $D_1$  antagonist), suggesting that the anti-immobility effect of ripIII is probably mediated by  $D_2$  dopamine receptor action. This result corroborates with the demonstration

that effects of indirect dopamine agonists on the despair test depend on the stimulation of  $D_2$  but not  $D_1$  dopamine receptors [46]. In fact, the effectiveness of  $D_2$  receptor stimulation on the anti-immobility effect in FST is generally accepted, while the role of  $D_1$  receptors is more controversial and has been reported not to be effective in animal models of depression by some authors [41,47]. Therefore, it can be proposed that the anti-immobility effect of ripIII is mediated in some way by action on  $D_2$  dopamine receptors.

The involvement of the 5-HT system was investigated by inhibiting 5-HT synthesis with the tryptophan hydroxylase inhibitor PCPA in the FST. The reversal of the antidepressant-like effect of ripIII by the pretreatment of mice with PCPA suggests that its effect in the FST may be dependent on the availability of 5-HT in the synaptic cleft. Similar to previous findings, PCPA by its own did not alter the immobility time of control animals, but significantly blocked the anti-immobility effect of FLU, a 5-HT reuptake inhibitor [48–50]. Thus, our findings provide convincing behavioral evidence that PCPA treatment was effective in depleting 5-HT stores. Although we did not measure the concentration of 5-HT to verify its successful depletion following the administration of PCPA, our behavioral data together with studies from literature [49,50] suggest that it was effective in depleting the 5-HT stores. Indeed, the administration of PCPA for four consecutive days depletes the endogenous stores of 5-HT by about 60% in mice, while NA and dopamine levels are not affected [51]. Considering that PCPA, which is thought to act presynaptically [52], prevented the antidepressant-like effect of ripIII in the FST, it is likely that the expression of the antidepressant-like effect of ripIII requires an intact presynaptic 5-HT system.

In addition, the antidepressant-like effect of ripIII seems not to be associated with any motor effects, with the same doses to those which caused a marked antidepressant-like action. In fact, ripIII did not significantly affect ambulation, and it decreased rearing behavior in the open-field test (data not shown; see [14,25]). This indicates that the action seen in both FST and TST is not related to the increased motor activity. This confirms that ripIII has a specific antidepressant-like effect. Furthermore, the effects of ripIII were assessed in the barbiturate-induced sleeping time test, and this showed that the drug decreased the sleeping latency (25 and 50 mg/kg) and increased the sleeping time at the dose of 50 mg/kg, suggesting a potentiation of pentobarbital sleeping time related to a possible sedative

effect. However, this test is not specific because compounds that interfere with biotransformation of pentobarbital by cytochrome P450 complex can show the same effects of central nervous system depressant drugs [53].

## CONCLUSION

The results described in this paper show that oral administration of ripIII, similar to i.p. administration [14], is able to produce an antidepressant-like effect in FST and TST, which is not owing to a psychostimulant effect. Moreover, it was provided convincing evidence that this effect is dependent on its interaction with the serotonergic, noradrenergic ( $\alpha_1$ - and  $\alpha_2$ - but not  $\beta$ -adrenoreceptors), and dopaminergic ( $D_2$  but not  $D_1$  receptors) systems. Finally, data suggest the possibility for further investigation into the neurochemical mechanisms involved in antidepressant-like effect of ripIII as well as its potential use as a therapeutic agent in mood disorders.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to the CNPq, CAPES, and FUNCAP for financial support. Also, we would like to express our gratitude to Dr. David Woods, from Otago University, New Zealand, for general review mainly about English language.

## REFERENCES

- Bernet S. Prevalence of mental disorders in Europe: results from the European Study of Epidemiology of Mental Disorders (ESEMED) project. *Acta Psychiatr. Scand.* (2004) 110 36.
- Mathers C.D., Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med.* (2006) 3 442.
- Ehwuugi A.S. Central monoamines and their role in major depression. *Prog. Neuro-psychopharmacol. Biol. Psychiatry* (2004) 28 435–451.
- Ruhé H.G., Mason N.S., Schene A.H. Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine and dopamine levels in humans: a meta-analysis of monoamine depletion studies. *Mol. Psychiatry* (2007) 12 331–359.
- Nemeroff C.B., Owens M.J. Treatment of mood disorders. *Nat. Neurosci.* (2002) 5 1068–1070.
- Machado D.G., Kaster M.P., Binfaré R.W. et al. Antidepressant-like effect of the extract from leaves of *Schinus molle* L. in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* (2007) 31 421–428.



- 7 McGarry H, Pirotta M, Hegarty K, Gunn J. General practitioners and St. John's Wort: a question of regulation or knowledge? *Complement Ther. Med.* (2007) 15 142-148.
- 8 Peng W.H., Lo K.L., Lee Y.H., Hung T.H., Lin Y.C. Berberine produces antidepressant-like effects in the forced swim test and in the tail suspension test in mice. *Life Sci.* (2007) 81 933-938.
- 9 Rodrigues A.L.S., Silva G.L., Mattiussi A.S. et al. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Sphoanopylus verticillatus*. *Life Sci.* (2002) 70 1347-1358.
- 10 Sakakibara H., Ikida K., Grundmann O. et al. Antidepressant effect of extracts from *Ginkgo biloba* leaves in behavioral models. *Biol. Pharm. Bull.* (2006) 29 1767-1770.
- 11 Wang R., Xu Y., Wu H.L. et al. The antidepressant effects of curcumin in the forced swimming test involve 5-HT1 and 5-HT2 receptors. *Eur. J. Pharmacol.* (2008) 578 43-50.
- 12 Zhang Z. Therapeutic effects of herbal extracts and constituents in animal models of psychiatric disorders. *Life Sci.* (2004) 75 1659-1699.
- 13 Zhang Y.Z., Li Y.P., Yu N.J. et al. Antidepressant-like effects of the ethanolic extract of Xiaobuxin-Tang, a traditional Chinese herbal prescription in animal models of depression. *Chin. Med. J.* (2007) 120 1792-1796.
- 14 Sousa F.C.F., Melo C.T.V., Monteiro A.P. et al. Antianxiety and antidepressant effects of riparin III from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* (2004) 78 27-33.
- 15 Machado D.G., Bettio L.R.B., Cunha M.P. et al. Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: involvement of the monoaminergic system. *Prog. Neuro-psychopharmacol. Biol. Psychiatry* (2009) 33 642-650.
- 16 Kubitski K., Renner S. *Flora neotropica*, 31th edn, New York Botanical Garden, New York, USA, 1982.
- 17 Barbosa-Pilho J.M., Yoshida M., Gottlieb O.R. et al. Benzoyl esters and amides, styrylpyrones and neolignans from the fruits of *Aniba riparia*. *Phytochemistry* (1987) 26 2615-2617.
- 18 Castelo-Branco U.V., Castelo-Branco U.J.V., Thomas G. et al. Preliminary pharmacological studies on three benzoyl amides, constituents of *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae). *Acta Farm. Bonaer.* (2000) 19 197-202.
- 19 Barbosa-Pilho J.M., Yoshida M., Gottlieb O.R. The tyramines of transformation into models of natural products. *Rev. Latinoam. Quim.* (1990) 21 5-7.
- 20 Castelo-Branco U.J.V., Thomas G., Araújo C.C. et al. Atividade espasmolítica de benzamidas isoladas de *Aniba riparia* (parte I). *Resumo VI FeaBE*, 1991, p. 302.
- 21 Castelo-Branco U.J.V. *Estudos Farmacológicos do Éter Metílico de N-(2,6-dihydroxybenzoyl)-tyramine*. MSc Thesis, Universidade Federal de Paraíba, Brazil, 1992.
- 22 Thomas G., Castelo-Branco U.J.V., Barbosa-Pilho J.M. et al. Studies on the mechanism of spasmolytic activity of (O-methyl)-N-(2,6-dihydroxybenzoyl) tyramine, a constituent of *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae), in rat uterus, rabbit aorta and guinea pig alveolar leucocytes. *J. Pharm. Pharmacol.* (1994) 46 103-107.
- 23 Sousa F.C.F., Monteiro A.P., Melo C.T.V. et al. Antianxiety effects of Riparin I from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. *Phytother. Res.* (2005) 19 1005-1008.
- 24 Sousa F.C.F., Leite C.P., Melo C.T.V. et al. Evaluation of effects of N-(2-Hydroxybenzoyl) tyramine (Riparin II) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in anxiety models in mice. *Biol. Pharm. Bull.* (2007) 30 1212-1216.
- 25 Melo C.T.V., Monteiro A.P., Leite C.P. et al. Anxiolytic-like effects of (O-methyl)-N-benzoyl-tyramine (riparin III) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. *Biol. Pharm. Bull.* (2006) 29 451-454.
- 26 Wambebe C. Influence of some agents that affect 5-hydroxy-tryptamine metabolism and receptors on nitrazepam-induced sleep in mice. *Brat. J. Pharmacol.* (1985) 84 185-191.
- 27 Rolland A., Fleurentin J., Lanherm M.C. et al. Behavioural effects of the American traditional plant *Echinacea californica* sedative and anxiolytic properties. *Phanta Med.* (1991) 57 212-216.
- 28 Puech A.J., Chermat R., Poncet M. et al. Antagonism of hypothermia and behavioral response to apomorphine, a simple, rapid and discriminating test for screening antidepressant and neuroleptics. *Psychopharmacology* (1981) 75 84-91.
- 29 Steru L., Chermat R., Thierry B. et al. Tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology* (1985) 5 367-370.
- 30 Porsolt R.D., Le Pichon M., Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* (1977) 266 730-732.
- 31 Millan M.J. The role of monoamines in the actions of established and "novel" antidepressant agents: a critical review. *Eur. J. Pharmacol.* (2004) 500 371-384.
- 32 Matthews K., Christmas D., Swan J. Animal models of depression: navigating through the clinical fog. *Neurosci. Behav. Rev.* (2005) 29 503-513.
- 33 Porsolt R.D., Bertin A., Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* (1977) 229 327-336.
- 34 Ditke M.J., Rickels M., Lucki I. Active behavior in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology* (1995) 121 66-72.
- 35 Ryan J.F., Valentino R.J., Lucki I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neurosci. Biobehav. Rev.* (2005) 29 547-569.
- 36 Porsolt R.D., Lenegre A., McArthur R.A. Pharmacological models of depression. *Advances in pharmacological sciences. Animal models in psychopharmacology*, Birkhauser Verlag, Basel, 1991.
- 37 Pettit-Demouliere B., Chenu P., Bourin M. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology* (2005) 177 245-255.
- 38 Nestler E.J., Gould E., Manji H. et al. Preclinical models: status of basic research in depression. *Biol. Psychiatry* (2002) 52 503-528.

- 39 Cryan J.P., Mombereau C., Vauvour A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci. Behav. Rev.* (2005) 29 571–625.
- 40 Viana A., Rego J.C., von Poser G., et al. The antidepressant-like effect of *Hypericum caprifoliatum* Cham & Schlecht (Guttiferae) on forced swimming test results from an inhibition of neuronal monoamine uptake. *Neuropsychopharmacology* (2005) 49 1042–1052.
- 41 Duterte-Boucher D., Ledere J.P., Panissaud C., et al. Acute effects of direct dopamine agonists in the mouse behavioral despair test. *Eur. J. Pharmacol.* (1988) 154 185–190.
- 42 Post R.M., Gerner R.H., Carman J.S., et al. Effects of a dopamine agonist piribedil in depressed patients. *Arch. Gen. Psychiatry* (1978) 35 609–615.
- 43 Cryan J.P., O'Leary O.P., Jin S.H., et al. Norepinephrine-deficient mice lack responses to antidepressant drugs, including selective serotonin reuptake inhibitors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* (2004) 101 8186–8191.
- 44 Dailly E., Chenu F., Renard C.E., et al. Dopamine, depression and antidepressants. *Fundam. Clin. Pharmacol.* (2004) 18 601–607.
- 45 Mitani H., Shirayama Y., Yamada T., et al. Plasma levels of homovanillic acid, 5-hydroxyindoleacetic acid and cortisol, and serotonin turnover in depressed patients. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* (2006) 30 531–534.
- 46 Vaugeois J.M., Pouhe D., Zaccaro F., et al. Indirect dopamine agonist effects on despair test – dissociation from hyperactivity. *Pharmacol. Biochem. Behav.* (1994) 54 235–239.
- 47 Geofroy M., Christensen A. Psychomotor stimulants vs. antidepressants in the learned helplessness model of depression. *Drug Dev. Res.* (1993) 29 48–55.
- 48 Page M.E., Detke M.J., Dalvi A., et al. Serotonergic mediation of the effects of fluoxetine, but not desipramine, in the rat forced swimming test. *Psychopharmacology* (1999) 147 162–167.
- 49 Eickel A.L., Dach F., Rodriguez A.L. Acute treatments with GMP produce antidepressant-like effects in mice. *Neuroreport* (2000) 11 1839–1843.
- 50 Zonkowski K.P., Rosa A.O., Lin J., et al. Evidence for serotonin receptor subtypes involvement in agmatine antidepressant-like effect in the mouse forced swimming test. *Brain Res.* (2004) 1023 253–263.
- 51 Redrobe J.P., Bourin M., Colombel M.C., et al. Dose-dependent noradrenergic and serotonergic properties of venlafaxine in animal models indicative of antidepressant activity. *Psychopharmacology* (1998) 138 1–8.
- 52 Luscombe G.P., Martin K.P., Hutchins L.J., et al. Mediation of the antidepressant-like effect of 8-OH-DPAT in mice by postsynaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Br. J. Pharmacol.* (1993) 108 669–677.
- 53 Goloubkova T.D., Heckler E., Bates S.M.K., et al. Inhibition of cytochrome P450-dependent monooxygenases by an alkaloid fraction from *Helietta apiculata* markedly potentiate the hypnotic action of pentobarbital. *J. Ethnopharmacol.* (1998) 60 141–148.