



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS, LETRAS E ARTES

DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIA COGNITIVA E
COMPORTAMENTO

AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL NÃO CLÍNICA DO METILEUGENOL EM
MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDA POR DEXAMETASONA COM FÊMEAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

IKLA LIMA CAVALCANTE

JOÃO PESSOA, PB, BRASIL

2018

AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL NÃO CLÍNICA DO METILEUGENOL EM
MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDA POR DEXAMETASONA COM FÊMEAS

Por:

Ikla Lima Cavalcante

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociência Cognitiva e Comportamento, da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Neurociência Cognitiva e Comportamento.

Orientadora: Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori

João Pessoa, PB, Brasil

2018

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

C376a Cavalcante, Ikla Lima.

AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL NÃO CLÍNICA DO METILEUGENOL EM
MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDA POR DEXAMETASONA COM
FÊMEAS / Ikla Lima Cavalcante. - João Pessoa, 2018.
88 f. : il.

Orientação: Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCHLA.

1. Metileugenol; Depressão; Dexametasona. I. Salvadori,
Mirian Graciela da Silva Stiebbe. II. Título.

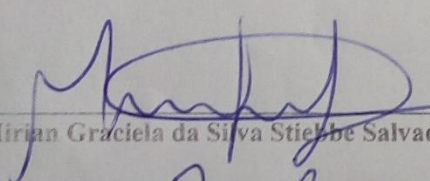
UFPB/BC

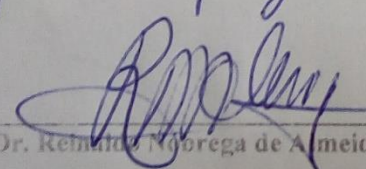


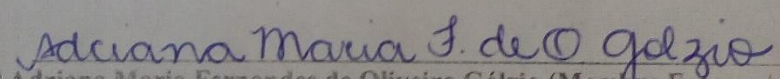
ATA DE DEFESA (DISSERTAÇÃO)

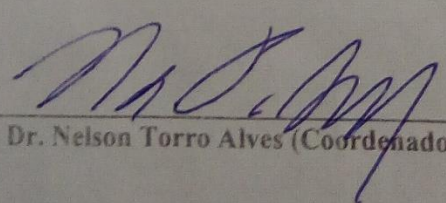
Aos trinta dias do mês de maio de dois mil e dezoito, na Sala 512 do Centro de Ciências humanas Letras e Artes da Universidade Federal da Paraíba - UFPB reuniram-se em solenidade pública os membros da comissão designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Neurociência Cognitiva e Comportamento para o exame da dissertação de mestrado da aluna **IKLA LIMA CAVALCANTE**. Foram componentes da banca examinadora os professores: Dr.^a **Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori** (Presidente/Orientador (a), CPF 945.332.610-00), Dr. **Reinaldo Nóbrega de Almeida** (PPGeC/CCHLA/UFPB, Membro Interno, CPF 086.934.634-20), Dr.^a **Adriana Maria Fernandes de Oliveira Gólzio** (CTDR/UFPB, Membro Externo, CPF: 041.831.454-30). Dando início aos trabalhos, a presidente da banca, Prof.^a Dr.^a **Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori**, após declarar o objetivo da reunião, apresentou a examinanda **IKLA LIMA CAVALCANTE** e, em seguida, concedeu-lhe a palavra para que defendesse sua dissertação, intitulado: "**Avaliação Comportamental Não Clínica do Metileugenol em Modelos de Depressão Induzida por Dexametasona com Fêmeas**". Passando então ao aludido tema, a candidata foi a seguir arguida pelos examinadores na forma regimentar. Ato contínuo passou a comissão, em secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito "Aprovada", o qual foi proclamado pela presidência logo que esta foi franqueada ao recinto da solenidade pública. Nada mais havendo a tratar, eu **Nelson Torro Alves**, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Neurociência Cognitiva e comportamento da UFPB, lavrei a presente ata, que depois de lida e aprovada por todos, assino juntamente com todos os membros da banca.

João Pessoa, 30 de maio de 2018.


Prof.ª Dr.ª **Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori** (Orientador (a)/UFPB)


Prof. Dr. **Reinaldo Nóbrega de Almeida** (Membro Interno)


Prof.ª Dr.ª **Adriana Maria Fernandes de Oliveira Gólzio** (Membro Externo/ CTDR/UFPB)


Prof. Dr. **Nelson Torro Alves** (Coordenador)

“Do meu ponto de vista, o que se passa é que alma e o espírito, em toda a sua dignidade e dimensão humana, são os estados complexos e únicos de um organismo. Talvez a coisa que se torna mais indispensável fazermos, enquanto seres humanos, seja a de recordar a nós próprios e aos outros a complexidade, a fragilidade, a finitude e a singularidade que nos caracterizam.” **Antonio Damásio, em O erro de Descartes.**
Dedicatória

A minha família: Rose, Costa, Ikaro e
Luisa, por todo amor e incentivo.

Agradecimentos

Inicialmente agradeço a Ele: Jesus. Ele tem sido o meu tudo, o seu amor sempre será o maior presente que pude receber em toda minha vida;

À minha família: Rose, Costa, Ikaro, Luisa e Miguel. Vocês são a minha melhor parte;

À Ermeson Leite porque apesar de mim, caminha ao meu lado;

Aos meus amigos-irmãos: Lais Lima, Marcela Guimarães; Phillippe Matheus e; Priscila Batista; por todo apoio e amor;

A Alana Araújo e Gabriela Coutinho, com a nossa amizade construímos um cantinho que chamamos de lar. Obrigada por me sustentarem quando mais precisei e pela nossa amizade;

A Carla Alves, José Anderson e Thais Machado, por terem me apoiado desde o início desta jornada;

À Escola Parque do Recife. Em especial, a Valéria por me ensinar que o maior obstáculo seria o que eu colocaria diante de mim mesma;

A Erick Conde, por sempre contribuir com seus ensinamentos e sua amizade;

A Lara Sá Leitão, uma grande incentivadora, porque mesmo quando não acreditei, ela acreditou. Serei eternamente grata;

Aos colegas e amigos do laboratório de psicofarmacologia: Alana, Aline, Cesar, Erika, Tayla, Poliane, Gaby, Vinicius, Kaíque, Ynhan, Patrick e Douglas pela amizade e conhecimento compartilhado;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação de Neurociência Cognitiva e Comportamento que colaboraram para minha formação. Em especial, a Mirian Salvadori, por toda orientação, ensinamento, oportunidade e cuidado. Nada nunca irá expressar completamente a minha eterna gratidão;

A Universidade Federal da Paraíba, por tornar possível o meu sonho;

E por fim, a todos que de alguma forma participaram desta caminhada.

RESUMO

Considerado um transtorno de humor grave, a depressão tem sido apontada como uma condição incapacitante em muitos casos. Estudos tem evidenciado que o estresse tem sido importante para o surgimento dessa doença e que, junto a várias outras condições ambientais e anormalidades, propiciam tal evento. Deste modo, busca-se sempre melhorar as formas de tratamento, de maneira que propicie melhor eficiência aos pacientes acometidos. Tendo isso em vista, os óleos essenciais apresentam um grande número de compostos bioativos, como os fenilpropanoides. Estes possuem distintas atividades farmacológicas, como ansiolítica, anti-inflamatória, anticonvulsivante e antidepressiva. O metileugenol é um fenilpropanoide, análogo estrutural do eugenol, o qual já exibiu diversas atividades farmacológicas. Assim, a inexistência de pesquisas sobre a atividade antidepressiva do metileugenol incentivou à realização deste trabalho. A presente pesquisa investigou a potencial atividade antidepressiva do metileugenol em camundongos fêmeas adultas submetidas ao modelo de estresse induzido pela dexametasona. Para isso, os animais receberam uma pré-administração de dexametasona (64 µg/kg s.c.) 3h30min, antes da realização dos testes comportamentais de suspensão da cauda, *splash test* e campo aberto. O metileugenol (25, 50 e 100 mg/kg i.p) e a imipramina (10 mg/kg i.p.) foram administrados 45 minutos e 30 minutos, respectivamente antes dos testes. No teste de suspensão da cauda, para o parâmetro latência para imobilidade o metileugenol na dose de 50 mg/kg foi capaz aumentar a latência, em comparação com o grupo dexametasona. E para o tempo de imobilidade, o metileugenol na dose de 50 e 100 mg/kg diminuiu o tempo de imobilidade compatível com a droga padrão imipramina. Em seguida, os animais foram avaliados no *splash test*, no parâmetro latência para o *grooming* as doses de 25 e 50 mg/kg de metileugenol e a imipramina diminuíram essa latência, em relação a dexametasona. As doses de 25 e 50 mg/kg, e imipramina aumentaram o tempo de *grooming* quando comparados ao grupo de animais que receberam exclusivamente dexametasona. No teste do campo aberto, o metileugenol nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg e a imipramina aumentaram o número de cruzamentos; e na dose de 50 mg/kg aumentou a porcentagem de tempo de permanência no centro do campo aberto quando comparados com a dexametasona. Quanto a latência para o *rearing*, a dose de 50 mg/kg de metileugenol diminuiu a latência, e não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos avaliados para o número de *rearing*. Na avaliação dos possíveis mecanismos de ação do metileugenol, foi usado o teste da suspensão na cauda na dose de 50 mg/kg, que apresentou melhores efeitos nos testes descritos. A administração do antagonista SC23390, evidenciou a participação dos receptores dopaminérgicos D1 na atividade antidepressiva do metileugenol, como também dos receptores α 1-adrenérgico com uso do antagonista prazosin e, dos receptores serotoninérgicos com o uso um inibidor da síntese de serotonina - PCPA. Os achados demonstram que o metileugenol não interferiu na atividade locomotora dos animais e apresentou uma relevante atividade antidepressiva por meio dos receptores dopaminérgicos D1 e α 1-adrenérgicos.

Palavras-chaves: Metileugenol, Depressão, Dexametasona, Mecanismo de ação.

ABSTRACT

Considered a serious mood disorder, depression has been pointed out as a disabling condition in many cases. Studies have shown that stress has been important for the onset of this disease and, along with several other environmental conditions and abnormalities, provide such an event. In this way, it is always sought to improve the forms of treatment, in a way that provides better efficiency to the patients affected. In view of this, essential oils have many bioactive compounds, such as phenylpropanoids. These have different pharmacological activities, such as anxiolytic, anti-inflammatory, anticonvulsive and antidepressant. Methyleugenol is a phenylpropanoid, a structural analogue of eugenol, which has already exhibited various pharmacological activities. Thus, the lack of research on the antidepressant activity of methyleugenol encouraged the accomplishment of this work. The present research investigated the potential antidepressant activity of methyleugenol in adult female mice submitted to the dexamethasone-induced stress model. For this, the animals received a pre-administration of dexamethasone (64 μg / kg s.c.) 3h30min, before performing the behavioral tests of tail suspension, splash test and open field. Methyleugenol (25, 50 and 100 mg / kg i.p) and imipramine (10 mg / kg i.p.) were administered 45 minutes and 30 minutes, respectively, prior to testing. In the tail suspension test, for the latency parameter for immobility, methyleugenol at a dose of 50 mg / kg was able to increase latency compared to the dexamethasone group. And for the immobility time, methyleugenol at the dose of 50 and 100 mg / kg decreased the immobility time compatible with the standard drug imipramine. Then the animals were evaluated in the splash test, in the latency parameter for grooming the doses of 25 and 50 mg / kg of methyleugenol and imipramine decreased this latency in relation to dexamethasone. Doses of 25 and 50 mg / kg, and imipramine increased the grooming time when compared to the group of animals that exclusively received dexamethasone. In the open field test, methyleugenol at doses of 25, 50 and 100 mg / kg and imipramine increased the number of crosses; and at the dose of 50 mg / kg increased the percentage of dwell time at the center of the open field when compared to dexamethasone. As for latency for rearing, the 50 mg / kg dose of methyleugenol decreased latency, and no significant differences were found between the groups evaluated for the number of rearing. In the evaluation of the possible mechanisms of action of methyleugenol, the tail suspension test at the dose of 50 mg / kg was used, which presented better effects in the tests described. Administration of the SC23390 antagonist demonstrated the participation of D1 dopaminergic receptors in the anti-depressant activity of methyleugenol, as well as $\alpha 1$ -adrenergic receptors with the use of the prazosin antagonist and serotonergic receptor with the use of a serotonin-PCPA synthesis inhibitor. The findings demonstrate that methyleugenol did not interfere in the locomotor activity of the animals and presented a relevant antidepressant activity through dopaminergic D1 and $\alpha 1$ -adrenergic receptors.

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figuras:

Figura 1 - Modificações estruturais, metabólicas e funcionais de pacientes com depressão.....	18
Figura 2 - Teoria do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal.....	21
Figura 3 - Estrutura química do eugenol (A) e metileugenol (B).....	26
Figura 4 - Camundongo (<i>Mus musculus</i>) albino Swiss.....	29
Figura 5 - Cronograma Experimental.....	32
Figura 6 - Representação dos comportamentos de imobilidade (a) e mobilidade (B) no TSC.....	33
Figura 7 - Campo Aberto.....	34

Gráficos:

Gráfico 1 - Efeito do metileugenol, salina, dexametasona e imipramina sobre a latência para imobilidade no teste de suspensão da cauda.....	39
Gráfico 2 - Efeito do metileugenol, salina, dexametasona e imipramina sobre o tempo de imobilidade no teste de suspensão da cauda.....	39
Gráfico 3 - Efeito do metileugenol, salina, dexametasona e imipramina sobre a latência para o grooming no teste de borrifagem de sacarose	40
Gráfico 4 - Efeito do metileugenol, salina, dexametasona e imipramina sobre o tempo de grooming no teste de borrifagem de sacarose.....	41
Gráfico 5 - Efeito do metileugenol, salina, dexametasona e imipramina sobre o número de cruzamentos no teste do campo aberto.....	41
Gráfico 6 - Efeito do metileugenol, salina, dexametasona e imipramina na porcentagem de tempo no centro no teste do campo aberto.....	42
Gráfico 7 - Efeito do orto-eugenol, salina, dexametasona e imipramina na latência para o rearing no teste do campo aberto	42
Gráfico 8 - Efeito do orto-eugenol, salina, dexametasona e imipramina no número de rearing no teste do campo aberto	43
Gráfico 9 - Efeito de antagonistas específicos na atividade antidepressiva do metileugenol no teste de suspensão da cauda.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - % de mortes em 14 dias em diferentes doses do metileugenol.....	37
Tabela 2 - Efeitos observados do metileugenol na triagem farmacológica comportamental / efeito presente (+); efeito diminuído (-).....	38

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Por cento
±	Mais ou menos
®	Marca registrada
° C	Graus Celsius
5-HT	Serotonina
ANOVA	Análise de variância
BNDF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
cm	Centímetros
CORT	Corticosterona
CRH	Hormônio Liberador de Corticotrofina
DEXA	Dexametasona
DA	Dopamina
DSM-5	Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – 5ª
E.P.M.	Erro padrão da média
g	Grama
h	Hora
HPA	Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
IMAO	Inibidores da Monoamina Oxidase
i.p.	Intraperitoneal
mg/kg	Miligrama por quilograma
Min	Minuto
MAO	Monoamina Oxidase
mL	Mililitros
NA	Noradrenalina
NET	Transportador de Noradrenalina
NO	Óxido nítrico
OEs	Óleos essenciais
PET	Tomografia por Emissão de Pósitrons
PVN	Núcleo Paraventricular do Hipotálamo
s.c.	Subcutânea
SERT	Transportador de Serotonina
SNC	Sistema nervoso central
Tween 80	Polioxetileno sorbitano monoleato 80

TDM Transtorno Depressivo Maior

α Alfa

μL Microlitros

SUMÁRIO

Dedicatória.....	4
Agradecimentos.....	5
Resumo.....	6
Abstract.....	7
Lista de Figuras e Gráficos.....	8
Lista de Tabelas.....	9
Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos.....	10
1. Introdução.....	14
2. Fundamentação Teórica.....	16
2.1. Aspectos Gerais da Depressão.....	16
2.2. Fisiopatologia da Depressão.....	18
2.2.1. Teoria das Monoaminas.....	18
2.2.2. Teoria do Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA).....	20
3. Modelos Animais.....	23
3.1. Modelo de Administração da Dexametasona.....	23
4. Óleos Essenciais.....	25
4.1. Metileugenol.....	25
5. Justificativa e Relevância.....	27
6. Objetivos.....	28
6.1. Objetivo Geral.....	28
6.2. Objetivos Específicos.....	28
7. Materiais.....	29
7.1. Animais.....	29
7.2. Condições Experimentais.....	29
7.3. Substâncias e Equipamentos.....	29
8. Métodos.....	31
8.1. Testes Preliminares.....	31
8.1.1. Determinação da Dose Letal.....	31
8.1.2. Triagem Farmacológica Comportamental.....	31
8.2. Avaliação da Atividade Antidepressiva.....	31
8.2.1. Teste de Suspensão de Cauda.....	32
8.2.2. <i>Splash Test</i>	33
8.2.3. Campo Aberto.....	33

8.3. Investigação dos possíveis mecanismos de ação da atividade antidepressiva do Metileugenol.....	34
8.3.1. Avaliação do Sistema Noradrenérgico.....	34
8.3.2. Avaliação do Sistema Serotoninérgico.....	35
8.3.3. Avaliação do Sistema Dopaminérgico.....	35
9. Análise Estatística.....	36
10. Resultados.....	37
11. Discussão.....	45
12. Conclusão.....	50
13. Referências Bibliográficas.....	51
Anexos.....	64

1. Introdução

A depressão é um transtorno de humor no qual apresentam-se diferentes emoções e sentimentos, tais como a de tristeza e a de desamparo. É possível identificar também características como a redução ou perda de interesse nas atividades diárias (Neves, 2015). Dessa forma, nesse transtorno são comuns a idealização suicida e a relação com altos graus de mortalidade e morbidade (Palazidou, 2012; Neves, 2015).

O Transtorno Depressivo Maior (TDM) é um distúrbio influenciado por diferentes fatores. Assim, aspectos ambientais, psicológicos e genéticos podem estar vinculados as hipóteses em torno da etiologia desse transtorno, como o déficit de monoaminas nas fendas sinápticas em algumas regiões do Sistema Nervoso Central (SNC) (Schildkraut, 1965; Coppen, 1972; Neves, 2015) e a desregulação do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) (Keller et al, 2017). O Relatório da Saúde no Mundo, relata que o TDM tem sido considerado uma das razões mais relevantes para a incapacitação da população em geral. Prevendo ainda que nos 20 anos seguintes seria possível identificar o TDM em 2º lugar como gerador de doenças (OMS, 2011).

Segundo o Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5) (APA, 2014) para identificar e caracterizar a depressão é necessário seguir alguns critérios como humor deprimido na maior parte do dia; perda ou ganho de peso; fadiga; retardo psicomotor; anedonia; dentre outros. Para tal condição, já existem diversas maneiras de tratar a depressão, tais como as psicoterapias e os diversos antidepressivos.

Em relação ao tratamento farmacológico, os medicamentos antidepressivos não têm esboçado um resultado de curto prazo favorável, sendo necessário um período de latência para que ocorra um efeito satisfatório. Este fator de latência, associado a condição de que nem sempre o quadro desses pacientes evolui de modo eficaz, reduz a aderência ao tratamento (Zhang et al, 2012).

Assim, permanece a carência no alargamento de drogas antidepressivas que possam aumentar a eficácia clínica no tratamento da depressão, sendo, portanto, menos tóxicas, com menos efeitos adversos e com menor latência para o início do efeito. E desta maneira, aumenta-se cada vez mais o número de estudos relacionados a fitoterapia.

Nessas pesquisas, a partir das plantas aromáticas, é possível obter os óleos essenciais (OEs), e esses tem contribuído com resultados favoráveis para o tratamento de condições analgésicas (Almeida, Navarro & Barbosa-Filho, 2001; Leite et al., 2014), ansiolíticas (Umezu et al., 2002; Almeida, Motta, Britto Faturi, Catallani & Leite, 2004; Lima et al., 2013) e

anticonvulsivantes (de Almeida, Motta & Leite, 2003; Almeida, Agra, Maior & Sousa, 2011) em estudos não-clínicos.

O Metileugenol é encontrado em óleos essenciais, que segundo a literatura, tem apresentado diferentes atividades biológicas, podendo se destacar as antinociceptiva e anti-inflamatória (Tang et al., 2015). É considerado um fenilpropanóide presente em diferentes plantas aromáticas, como as *M. officinalis* e *Ocimum basilicum*, (Saki, Bahmani & Rafieian-Kopaei, 2014). E sua estrutura química demonstra uma similaridade com a do eugenol, que já vem exibindo uma importância diante de pesquisas sobre a depressão (Saki, Bahmani, & Rafieian-Kopaei, 2014).

Diante das semelhanças estruturais entre o metileugenol e o eugenol (Saki, Bahmani, & Rafieian-Kopaei, 2014), bem como da necessidade de descobertas de alternativas farmacológicas para o tratamento de diversos transtornos que comprometem o SNC, e que apresentem maior eficácia terapêutica e menos efeitos colaterais, esse trabalho se propõe a investigar o potencial efeito antidepressivo do metileugenol em modelo de depressão induzida por dexametasona com fêmeas.

2. Fundamentação Teórica

2.1. Aspectos Gerais da Depressão

Segundo as classificações internacionais, o conceito em torno da depressão abarca expressões como distúrbios afetivos ou perturbações do humor (APA, 1986, 1996, 2002) que remetem as diferentes maneiras de manifestação da depressão. Essas expressões são reflexo da evolução conceitual do tema. Assim, a depressão refere-se a alterações de humor, de psicomotricidade e variáveis de distúrbios somáticos e neurovegetativos (Assunção-Junior, 1998). Sendo, portanto, conhecida como uma doença do humor, que demanda identificação e tratamento, não estando vinculada a personalidade individual ou com a vontade pessoal (Cordás & Sassi-Junior, 1998).

O DSM-5 (2014) relata que para o diagnóstico do TDM é necessário seguir e identificar a presença de alguns sintomas. Essa identificação ocorre a partir de 3 critérios de sintomas, A, B e C:

- No critério A, devem ser identificados durante 2 semanas, evidenciando uma mudança quanto ao estado anterior, pelo menos 5 dos sintomas seguintes: a) Humor deprimido; b) Acentuada diminuição do interesse ou prazer; c) Perda ou ganho significativo de peso sem estar fazendo dieta; d) Insônia ou hipersônia; e) Agitação ou retardo psicomotor; f) Fadiga ou perda de energia; g) Sentimentos de inutilidade ou culpa excessiva ou inapropriada; h) Capacidade diminuída para pensar ou se concentrar e i) Pensamentos recorrentes de morte.
- No critério B, fica evidente que os sintomas encontrados devem causar prejuízo significativo no âmbito social, profissional e áreas relevantes da vida do indivíduo.
- E para o critério C, o episódio depressivo não está correlacionado a efeitos fisiológicos de doenças ou do uso de outras substâncias.

Além do DSM-5, diferentes escalas e testes têm sido desenvolvidos a fim de se verificar o grau da doença, bem como os avanços no quadro clínico dos pacientes acometidos (Souza, Baptista & Alves, 2015). Dentre essas escalas destacam-se o Inventário de Depressão de Beck I e II e o teste projetivo Rorschach, amplamente utilizados pelos profissionais da saúde mental como ferramentas auxiliadoras para diagnosticar corretamente o TDM (CFP, 2018).

Diferentes estudos relatam a predominância e prevalência da depressão em diversas populações. Em relação aos Estados Unidos da América (EUA), foi identificado que 7% da população possui o TDM. Enquanto que na Europa cerca de 6,9% da população seria acometida com tal transtorno (Molina et al, 2012, APA, 2014; Slattery & Cryan, 2017).

Já no Brasil, segundo Stopa et al (2015), foi indicado que a predominância da depressão na população brasileira seria de 7,6%, a partir dos registros encontrados em auto relatos de diagnóstico médico prévio de depressão e na Pesquisa Nacional de Saúde de 2013. Além disso, ficou evidente que o TDM acomete mais mulheres, sendo cerca de duas vezes mais prevalente entre elas do que entre os homens.

Desta maneira, os estudos relacionados a depressão têm demonstrado que o processamento cognitivo dessas pessoas depressivas apresenta uma elaboração elevada de pensamentos negativos e dificuldade para o processamento dessas informações. Enfatizando, portanto, os pensamentos automáticos negativos. Desta forma, essas pessoas exibem um feedback psicológico negativo, cujo efeito prejudica o desempenho pessoal, que estaria sendo verificado em pesquisas experimentais, de neuroimagem funcional e de modelos animais de depressão (Willner, Scheel-Krüger & Belzung, 2013).

Os estudos a partir de neuroimagem relatam que o Córtex Pré-Frontal (CPF), a amígdala e o hipocampo são porções amplamente pesquisadas diante do quadro depressivo. É observado que ocorre uma redução do volume cerebral em indivíduos deprimidos quando comparados aos saudáveis. Destacando-se as porções anterior e orbitofrontal do CPF, moderadas diminuições no hipocampo e núcleo caudado (Koolschijn, van Haren, Lensvelt-Mulders, Hilleke & Kahn, 2009; Palazidou, 2012).

Estudos com Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET) demonstram que a diminuição da atividade da região dorsolateral do CPF está associada ao retardo psicomotor e a anedonia (Palazidou, 2012). Quanto a amígdala, essa está vinculada com a gravidade da depressão. Registros de ressonância magnética demonstram que pacientes depressivos que não recebem tratamento exibem um volume da amígdala reduzido em relação aos que estavam sendo medicados corretamente (Hamilton, Siemer & Gotlib, 2008; Savitz & Drevets, 2009).

Quanto ao hipocampo, esse é rico em receptores de corticosteroides e está ligado ao hipotálamo através de um feixe de axônios, o fórnix, sendo um regulador do feedback para o eixo HPA. Os achados mostram que é a região mais estudada em pesquisas com humanos e em animais. A motivação para isso seria a importância desta área para a aprendizagem e memória, além de que uma disfunção pode causar respostas emocionais inapropriadas (Palazidou, 2012).

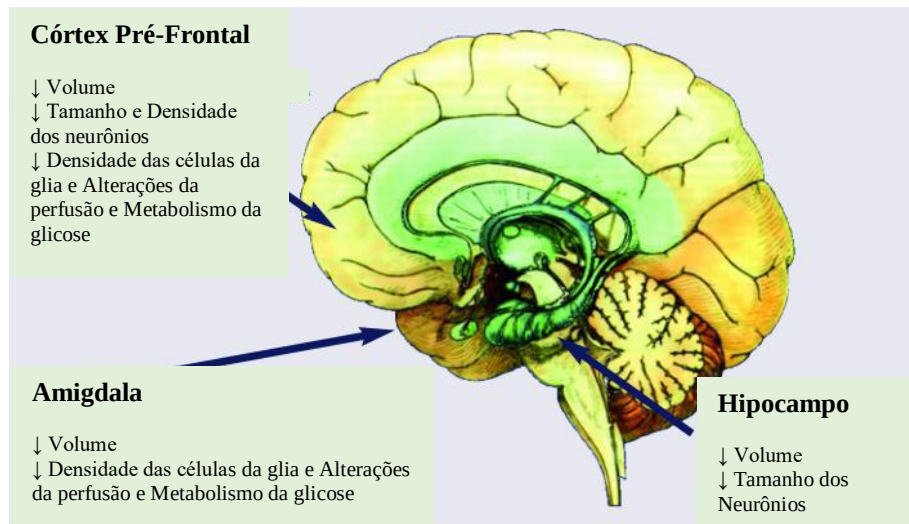


Figura 1 – Modificações estruturais, metabólicas e funcionais de pacientes com depressão. Fonte: Adaptado de Fuchs & Flügge, 2005.

Desta maneira, diferentes hipóteses foram surgindo a fim de explicar neurobiologicamente a depressão. Assim, a hipótese das monoaminas, na qual a depressão estaria relacionada a uma diminuição das monoaminas nas fendas sinápticas, tornou-se uma das explicações mais significativas para se explicar a fisiopatologia da depressão. Além disso, colaborou para o desenvolvimento de fármacos antidepressivos (Willner, Scheel-Krüger & Belzung, 2013). Outra importante hipótese seria a do estresse e do eixo HPA. Nessa perspectiva, a depressão seria uma resposta ao estresse na qual ocorreria a ativação do sistema nervoso simpático e a liberação de cortisol por meio das glândulas adrenais, causando uma desregulação do eixo HPA (Martino, 2014).

2.2. Fisiopatologia da Depressão

2.2.1. Teoria das Monoaminas

Os primeiros antidepressivos, desenvolvidos nos anos 50, motivaram a investigação neuroquímica do funcionamento cerebral e o papel dos neurotransmissores nesse processo. Percebeu-se então a importância das monoaminas para o estudo da depressão, e assim surgiu a Teoria das Monoaminas. Como dito anteriormente, segundo essa teoria, a depressão ocorreria devido a um déficit nas fendas sinápticas das monoaminas: serotonina, noradrenalina e/ou dopamina (Palazidou, 2012).

A noradrenalina (NE) é sintetizada pela tirosina e é conduzida para o interior das vesículas pelo transportador de monoaminas vesicular (VMAT). Em seguida, ocorre uma fusão das vesículas sinápticas com a membrana plasmática. E então a NE é retirada da fenda sináptica por um transportador seletivo de norepinefrina (NET), e por transportadores não-seletivos de

recaptação. A NE que não foi transportada até as vesículas pelo VMAT é degradada pela enzima monoamina oxidase (MAO) (Chandley et al., 2013; Jin et al., 2016).

A NE desempenha seu papel por meio de ligações com os receptores α e β -adrenérgicos acoplados à proteína G, vindos do locus coeruleus (LC) e que se lançam pelos hemisférios cerebrais, tálamo e hipotálamo (Chamberlain & Robbins, 2013). Os receptores α podem ser categorizados em $\alpha 1$ e $\alpha 2$, e cada um deles possuem três subtipos, sendo eles: $\alpha 1A$, $\alpha 1B$ e $\alpha 1D$; $\alpha 2A$, $\alpha 2B$ e $\alpha 2C$. Já os receptores- β incluem: $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$. Os $\alpha 1A$ e β causam estimulação na sinalização celular e os $\alpha 2$ inibem esse processo. Estudos já vem comprovando que pessoas deprimidas apresentam modificações na densidade dos receptores adrenérgicos (Ordway & Klimek, 2001).

Quanto a 5-hidroxitriptamina (5-HT), essa é originada do aminoácido triptofano, sendo levada do citoplasma para as vesículas pelo VMAT. Seus efeitos ocorrem devido a diversos receptores de 5-HT, que estão acoplados a proteína G, e a recaptação pelo transportador de serotonina (5-HTT), na qual a 5-HT é degradada pela MAO ou absorvida através das vesículas de armazenamento (Natarajan, De Boer & Koolhas, 2009).

Os receptores da 5-HT podem ser identificados em regiões como córtex cerebral, hipocampo e amígdala (Pytko et al., 2016). Para alguns pesquisadores ficou evidente que em pacientes deprimidos os sítios de ligação do receptor 5-HT_{1A} foi diminuído no córtex medial temporal. Já o do 5-HT_{2A} foi elevado no CPF dorsolateral (Stockmeier, 2003).

E para a dopamina (DA), cuja origem vem da tirosina, o armazenamento também ocorre em vesículas através do VMAT, para ser liberada na fenda sináptica. A recaptação da DA se dá com o auxílio do transportador de dopamina (DAT) seletivo, que mantém a DA nas vesículas secretoras pelo VMAT ou pode ocorrer uma degradação pela enzima MAO. Os receptores acoplados a proteína G são categorizados em dois: D₁, que possuem o efeito de estimulação e D₂, que seria o de inibir. Esses receptores podem ser localizados em áreas como o núcleo accumbens, substância nigra, bulbo olfativo e amígdala (Beaulieu & Gainetdinov, 2011; Meiser, Weindl & Hiller, 2013).

Pesquisas verificaram o aumento da ligação entre os receptores D₁ e D₂ em pessoas depressivas (Pei et al., 2010). Já em pesquisas com animais, ficou claro a relação desses receptores com a depressão (Hellweg et al., 2007) e que a melatonina apresentaria um efeito antidepressivo devido a ativação dos receptores D₂ durante o Teste do Nado Forçado (TNF) (Binfaré et al. 2010).

A Teoria das Monoaminas contribui significativamente para a indústria farmacêutica e para as pesquisas sobre a depressão. No entanto, os antidepressivos criados, apesar de

contribuírem para o tratamento, produzem um efeito clínico demorado, demandando semanas para atingir o efeito completo e que podem até exacerbar o início do quadro (Willner, Scheel-Krüger & Belzung, 2013)

2.2.2. Teoria do Eixo Hipotálamo-Pituitária- Adrenal (HPA)

Como dito anteriormente, a depressão pode ser uma resposta ao estresse. E esse estresse gera uma resposta fisiológica que seria a ativação do eixo HPA. Compreender a importância do episódio estressor é primordial a partir da experiência vivenciada (Mayer et al, 2017). Isso porque quando ocorrem as modificações emocionais, através do núcleo central da amígdala, geram uma excitação sobre o hipotálamo que causa uma estimulação no eixo HPA (Willner, Scheel-Krüger & Belzung, 2013).

Deste modo, no núcleo para-ventricular do hipotálamo, ocorre a liberação da corticotrofina (CRH) objetivando estimular a glândula hipófise a gerar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). O ACTH, por sua vez, irá exercer um efeito que contribui para a liberação de glicorticóides, como o cortisol em humanos e a corticosterona em roedores, do córtex adrenal para a corrente sanguínea (Neves, 2015).

Devido ao aumento do cortisol, o eixo HPA irá causar uma maior excitação sobre a amígdala. Apesar disso, o hipocampo inibe a função do eixo pelos glicorticóides e por seus receptores fazendo com que o cortisol apresente uma ação negativa a fim de inibir o eixo (Willner, Scheel-Krüger & Belzung, 2013; Neves, 2015).

Os glicorticóides podem aumentar de nível em situações de estresse crônico, gerando um nível elevado de excitação dos receptores glicocorticoides. Esse aumento causa modificações cognitivas significativas e alterações estruturais nas regiões hipocampais e no córtex pré-frontal (Kurek et al, 2016). Quando a situação é invertida, ou seja, ocorre a diminuição dos glicorticóides, tornam-se mais compatíveis com os mineralocorticóides (Kurek et al, 2016).

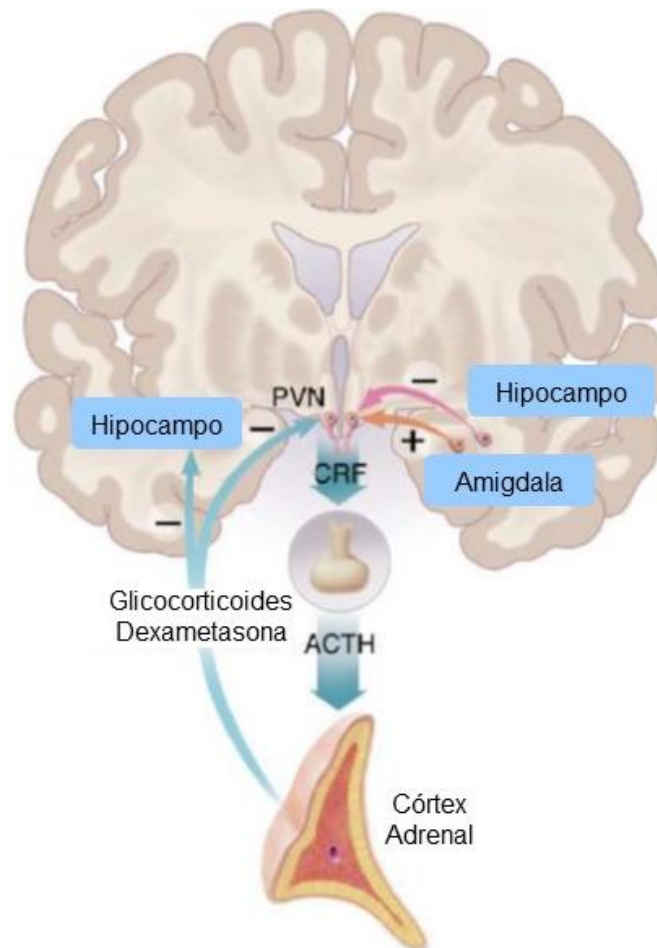


Figura 2 - Teoria do Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal. Fonte: Adaptado de Nestler *et al.*, 2002.

Portanto, essa regulação é muito importante devido ao feedback negativo, pois a excitação da amígdala desregula o funcionamento do eixo HPA (Willner, Scheel-Krüger & Belzung, 2013; Neves, 2015). Assim, as diversas tentativas de retornar ao estado de homeostase em resposta ao estresse podem gerar depressão, devido ao comprometimento do hipocampo, das atividades dos neurotransmissores e da desregulação do eixo HPA (Neto, 2017).

A teoria do eixo HPA e sua relação com a depressão é reforçada a partir de diferentes pesquisas. Deste modo, estudos demonstram que a hipercortisolemia é observada em mais de 50% dos casos de depressão. Além disso, esclarecem que a ausência da liberação do cortisol poderia ser controlada com o uso de antidepressivos (Sterner & Kalynchuk, 2010). Outros pesquisadores compreenderam que ocorreu uma ampliação no nível de cortisol livre urinário, de CRH no líquido cefalorraquidiano e uma redução da supressão do cortisol pela dexametasona em portadores de depressão (Nestler *et al.*, 2002; Southwick, Vythilingam & Charney, 2005).

Com base em teorias, como as descritas, as pesquisas têm objetivado buscar tratamentos mais eficazes e que causem menos efeitos adversos para os pacientes com depressão. Esses

estudos têm ocorrido tanto no âmbito clínico quanto no não-clínico, na tentativa de completar as lacunas que ainda existem. Destacam-se nas pesquisas não-clínicas os estudos com modelos animais, utilizando roedores, como ratos e camundongos. E o uso do teste de suspensão de cauda, o teste de nado forçado e o splash test.

3. Modelos Animais

Os animais não apresentam algumas características que os humanos apresentam. E isso, impede muitas vezes de se compreender como um modelo animal pode ser utilizado para estudar diferentes patologias. Pensando nisso, Mckinney e Bunney (1969) criaram os pré-requisitos mínimos que um modelo animal deveria ter para ser considerado ideal. São esses: a) o modelo deve contemplar sintomas análogos a patologia humana; b) as alterações comportamentais geradas pelo modelo devem ser revertidas pelos mesmos tratamentos usados em humanos; c) o modelo deve causar modificações comportamentais possíveis de serem monitoradas e; d) deve possibilitar a reprodução do mesmo por outros pesquisadores.

No caso da depressão, os humanos apresentam humor deprimido e baixa auto-estima, sintomas que não podem ser averiguados em animais. Mas existem endofenótipos que podem ser verificados como alterações fisiológicas, endócrinas, neuroanatômicas e evidências comportamentais. Assim, para o estudo de fármacos antidepressivos destaca-se a utilização do uso de roedores (Deussing, 2007).

Desta maneira, buscando-se as alternativas para o tratamento da depressão com mais eficiência crescem os estudos em torno da fitoterapia, como substâncias obtidas a partir de plantas aromáticas utilizando-se então os modelos animais. Evidenciando alternativas para os tratamentos atuais que não têm esboçado um resultado favorável de curto prazo (Zhang et al, 2012).

3.1. Modelo de Administração da Dexametasona

A dexametasona é um corticóide sintético que age nos receptores de glicocorticoides da glândula hipófise e do hipotálamo, inibindo a secreção de cortisol em condições normais. No entanto, não realiza essa função em pessoas depressivas. Assim, a ausência de supressão do cortisol, em tais pacientes, seria um indicador de hipossensibilização dos receptores da secreção de glicocorticoides, causada pelo excesso nos níveis circulantes de cortisol (Martino, 2014).

Deste modo, os níveis elevados de cortisol causariam um efeito neural excitotóxico mediado por uma ativação de aminoácidos excitatórios. Esse efeito foi observado em estudos sobre o hipocampo, no quais foram identificados que ocorreria uma atrofia dendrítica dos neurônios piramidais na região CA3 e uma diminuição do número e volume dos neurônios do giro denteado. Além do hipocampo, as áreas do córtex pré-frontal também seriam acometidas pelo efeito neurotóxico (Martino, 2014).

Assim, essas alterações na sensibilidade dos receptores de glicocorticoides culminariam na alteração do eixo HPA. É importante salientar ainda que a hipercortisolemia afeta diferentes

sistemas, como o serotoninérgico, noradrenérgico e dopaminérgico; e que cerca de 50% dos pacientes depressivos apresentam uma hiperatividade do eixo HPA (Martino, 2014).

Em animais roedores, estudos tem indicado que a administração única e repetida de dexametasona induziram o comportamento depressivo, modificando a atividade de fármacos antidepressivos de várias classes. Isso foi verificado a partir dos usos de testes comportamentais como o nado forçado, a transição claro-escuro e preferência por sacarose (Skupio *et al.*, 2014; Wróbel, Serefko, Wlaż & Poleszak, 2014).

Patel e Udayabanu (2014), em suas pesquisas, salientaram que injeções de dexametasona durante 12 semanas em camundongos resultaram no desenvolvimento de hipercortisolemia, estresse oxidativo, déficits cognitivos e um comportamento semelhante a depressão, que foram revertidos pela administração de um extrato de ervas.

Outros estudos esclareceram ainda que modificações comportamentais e neuroquímicas semelhantes as encontradas na depressão podem ser geradas a partir de injeções repetidas de corticosterona. E que após o recebimento de extrato de ervas, o estado depressivo foi revertido (Zhao *et al.*, 2008; Pitta *et al.*, 2013; Mao, Huang, Ip, Xian & Che, 2012; Shity *et al.*, 2015).

Desta maneira, segundo Sterner e Kalynchuk (2010), o modelo da administração da dexametasona é adequado para o estudo da fisiopatologia da depressão e para avaliar a eficácia de novas drogas antidepressivas.

4. Óleos Essenciais

As plantas aromáticas (mais de 17.000 espécies de plantas, distribuídas em todo o mundo) representam cerca de 10% das espécies de plantas que contém os óleos essenciais (OEs) (Asbahani et al., 2015). Deste modo, os OEs constituem-se de misturas complexas de compostos naturais voláteis e estão presentes em raízes, folhas, casca das árvores, resinas e casca de frutos (Leite, Nóbrega & Motta, 2003). Podem ser encontrados em famílias como Lamiaceae, Lauraceae, Asteraceae, Rutaceae, Myrtaceae, Poaceae, Cupressaceae e Piperaceae (Asbahani et al., 2015).

OEs adquiriram grande relevância em diferentes áreas. Além de serem produtos naturais, apresentam atividades biológicas diversas e relevantes. No âmbito médico têm exibido características bactericida, fungicida e propriedades medicamentosas. Quanto as ações farmacológicas, alguns dos efeitos encontrados são: antidepressivo, anti-inflamatório, cardíaco-estimulante, ansiolítico e anticonvulsivante (Bakkali, Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, 2008). E estão sendo usados ainda na composição de produtos como pomadas, cremes, xaropes, aerossóis e sprays (Asbahani et al., 2015).

Em geral, os OEs apresentam-se de modo incolor e ligeiramente amarelado, são instáveis na presença de luz, calor, ar, umidade e metais. Em temperatura ambiente, tem aparência oleosa, com alta volatilidade. Intitulam-se essenciais por causa de seu aroma agradável e intenso da maioria da classe (Simões & Spitzer, 2004). São constituídos de elementos voláteis de plantas aromáticas encontradas principalmente em países de clima temperado e tropical (Bakkali, Averbeck, S., Averbeck, D. & Idaomar, 2008).

Assim, as misturas presentes nos OEs apresentam um arranjo químico bastante complexo, compreendendo especialmente os terpenos de hidrocarbonetos (isoprenos) e terpenóides (Asbahani et al., 2015). Sendo esses últimos formados por monoterpenos (apresentam 10 átomos de carbono e representam mais de 80% da composição dos Eos), sesquiterpenos (com 15 átomos de carbono) e fenilpropanóides (Silva et al, 2009; Oliveira et al., 2011).

Por sua vez, os fenilpropanóides são compostos produzidos para proteção contra infecções, radiações ultravioletas e herbívoros pelas plantas (Fonsêca, 2016). Desta mesma classe, substâncias como o eugenol tem apresentado resultados positivos para atividade antinociceptiva na odontologia (Burgoyne et al., 2010; Müller et al., 2006).

4.1. Metileugenol

O metileugenol é chamado como 1,2-dimethoxy-4-prop-2-en-1-ylbenzene. Pode ser isolado de vários óleos essenciais de plantas, tais como a *Melissa officinalis* e *Ocimum*

basilicum, (Saki, Bahmani, & Rafieian-Kopaei, 2014). E tem sido utilizado como fragrância em cosméticos, sabonetes e shampoo (Directorate; Opinions, 2001). É considerado ainda como sendo semelhante ao eugenol em estrutura química (Saki, Bahmani, & Rafieian-Kopaei, 2014).

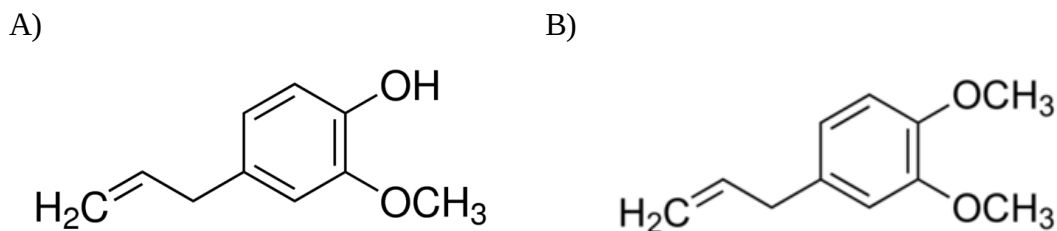


Figura 3 – Estrutura química do eugenol (A) e metileugenol (B). Fonte: Sigma-Aldrich.

Segundo Irie e colaboradores (2004), o eugenol gerou uma atividade antidepressiva semelhante à da imipramina nos testes do nado forçado e suspensão da cauda em camundongos, além de induziu o aumento do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no hipocampo. O eugenol é um fenilpropanoide farmacologicamente ativo presente no óleo de cravo da Índia (*Eugenia aromática*) (Escobar, 2002). Sintetizado a partir do aminoácido fenilalanina (Senanayake, Wills & Lee, 1977), pode ser encontrado em plantas como *Eugenia caryophyllus*, *Dicipelium cariophyllatum*, *Ocimum gratissimum* e o *Croton zenhtneri* (Wu, Hwang, Liao & Chen, 1994).

Tendo em conta, o interesse sobre atividades farmacológicas do metileugenol relacionadas ao Sistema Nervoso Central, e à atividade antidepressiva, torna-se necessário caracterizar a sua atividade farmacológica e seu uso terapêutico.

5. Justificativa e Relevância

Diversas espécies de plantas aromáticas são utilizadas medicinalmente por causa dos seus óleos essenciais ou componentes químicos. Em particular, algumas delas possuem certas propriedades no Sistema Nervoso Central, incluindo ação antidepressiva e tem sido tradicionalmente utilizada por longo tempo na medicina popular.

Estudos recentes sobre OEs e seus principais componentes tem atraído a atenção de muitos pesquisadores, encorajando-os a rastrear os aspectos químicos e farmacológicos dos produtos naturais, que potencialmente possam levar ao desenvolvimento de novos medicamentos antidepressivos, com vantagem sobre as drogas terapêuticas atuais.

O metileugenol é um fenilpropanoide, e seus efeitos na atividade antidepressiva não foram investigados. Considerando a relevância de estudos não clínicos em busca de novos tratamentos para os transtornos cerebrais, o presente estudo progride na investigação dos efeitos do metileugenol na depressão, através de um modelo pré-clínico de depressão-símile baseado na administração aguda de Dexametasona em fêmeas.

6. Objetivos

6.1. Objetivo Geral

Avaliar a ação do metileugenol em modelo de depressão induzida por dexametasona em fêmeas.

6.2. Objetivos Específicos

- Definir a toxicidade aguda do metileugenol em camundongos por via intraperitoneal;
- Investigar a ação do metileugenol utilizando os testes de suspensão da cauda, *splash test* e campo aberto.
- Caracterizar o mecanismo de ação da atividade antidepressiva do metileugenol, por meio de técnicas farmacológicas com o uso de antagonistas e inibidores da síntese de neurotransmissor.

7. Materiais

7.1. Animais

Para realização desse projeto, utilizou-se camundongos (*Mus musculus*) fêmeas, albinas Swiss, pesando entre 25-35g, com aproximadamente 3 meses de idade, todos provenientes do Biotério Prof. Dr. Thomas George da Universidade Federal da Paraíba. Os animais foram alojados sob grau de temperatura controlado ($21 \pm 1^\circ \text{C}$), e em gaiolas de polietileno com a quantidade máxima de 20 camundongos por caixa. Foi concedido livre acesso a ração tipo *pellets* (Purina®) e água, disponíveis em garrafas de polietileno, com ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo a fase clara de 6h00 às 18h00.



Figura 4 - Camundongo (*Mus musculus*) albino Swiss - Fonte: Google Imagens

7.2. Condições Experimentais

Os experimentos ocorreram no Laboratório de Psicofarmacologia, no período compreendido entre 06h às 12h. Com antecedência de cerca de 12 horas da realização dos testes, os camundongos foram pesados e alocados em gaiolas de polietileno, contendo 4 animais cada, esta medida objetivou diminuir prováveis modificações do comportamento animal e viabilizar a adaptação dos animais ao novo ambiente. Os animais foram privados de água e ração 60 minutos anteriormente aos testes.

A bancada usada para os procedimentos foi limpa previamente com etanol 70%, e para que não houvesse viés, durante os testes a higiene realizada foi feita com etanol de baixa graduação (10%). Todos os experimentos foram executados e filmados no período das 6h00 às 12h00, os animais foram utilizados uma única vez e, em seguida eutanasiados. Os procedimentos experimentais foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPB, com protocolo de aprovação nº 045/2017.

7.3. Substâncias e Equipamentos

As substâncias utilizadas foram as seguintes:

- Água destilada (UFPB – Brasil)

- Dexametasona (Sigma – E.U.A.)
- Etanol (Vetec – Brasil)
- Hidrocloreto R(+)-SCH23390 (Sigma – E.U.A.)
- Imipramina (Norvartis Biociências – Brasil)
- Metileugenol (UFPB – Brasil)
- p-clorofenilalanina (PCPA) (Sigma – E.U.A.)
- Prazosin (Sigma – E.U.A.)
- Sacarose (Sigma – E.U.A.)
- Tween 80 (polioxetileno sorbitano monoelato) (Sigma – E.U.A.)

As substâncias em suas respectivas doses foram elaboradas minutos antes da sua utilização, as concentrações decimais utilizadas permitiram a injeção de 0,1 mL/10 g de peso do animal. O metileugenol foi dissolvido em água destilada com o auxílio do tween 80, nas doses 25mg/kg, 50mg/kg e 100mg/kg, para administração pela via intraperitoneal (i.p.). Para realização do controle negativo, foi utilizado Tween 80 a 1% em água destilada (i.p.).

As demais drogas foram diluídas em água destilada ou solução salina a 0,9%. E foram administradas por via i.p. (metileugenol, salina, imipramina, prazosin e PCPA) ou subcutânea (s.c.) (dexametasona e SCH23390).

Quanto aos equipamentos, foram utilizados os itens abaixo:

- Aparelho do campo aberto (Insight)
- Balança de Precisão
- Caixa de acrílico de observação para o Splash Test;
- Câmera filmadora;
- Cronômetro;
- Vidrarias.

8. Métodos

8.1. Testes Preliminares

8.1.1. Determinação da Dose Letal

Determinar a toxicidade aguda significa realizar um procedimento escalonado utilizado um valor mínimo de animais por etapa, a fim de obter informações a respeito da toxicidade substância administrada. Esse tipo de verificação é baseado nos procedimentos adaptados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2013) e da *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD 423, 2001).

Para isso, foram organizados grupo controle e grupo experimental de 3 camundongos para que o metileugenol fosse administrado por via intraperitoneal (i.p.), em dose estabelecida de 2000 mg/kg por peso corporal. Obedecendo também a proporção máxima de volume de 1mL/100g de peso corporal. Os animais foram alocados em suas gaiolas 5 dias antes para adaptação as condições laboratoriais e passaram por um período de jejum, antes de receberem as substâncias. Sendo repostas a ração e água posteriormente (OECD, 2001).

Realizou-se observações dos animais durante os primeiros 30min, por 4h e 24h, após a administração das substâncias. Registrou-se o período de recuperação, o período em que os sintomas de toxicidade aparecem e desaparecem, alterações na pele e no pelo, olhos e mucosas, sistema nervoso central e atividade comportamental. Todos os dados obtidos foram tabulados por animal (OECD, 2001).

8.1.2. Triagem Farmacológica Comportamental

A fim de averiguar a provável implicação de uma droga sobre o SNC foi realizada a Triagem Farmacológica Comportamental. Neste teste, foram considerados alguns parâmetros comportamentais no animal que permitem assinalar o efeito central da droga (Almeida et al, 1999; Almeida & Oliveira, 2006).

Para esta triagem, utilizou-se os mesmos grupos e doses descritos anteriormente. Em seguida, os parâmetros comportamentais foram analisados até os primeiros 30 minutos da administração e com 1h, 2h, 3h e 4h, os efeitos verificados seguiram o protocolo experimental padrão em anexo (Almeida et al, 1999).

8.2. Avaliação da Atividade Antidepressiva

Para a avaliação da atividade antidepressiva foi necessário primeiramente realizar a indução do comportamento depressivo. Para tal foi usado a dexametasona. Para Wróbel, Serefko, Wlaz e Poleszak (2015) a dexametasona, induz alterações comportamentais, tais como: mudanças de humor, euforia e depressão; através da disfunção do eixo HPA e da alteração do controle de *feedback* negativo (Lee, Shim, Lee, Yang & Hahm, 2009; Sterner &

Kalynchuk, 2010; Crupi *et al.*, 2010). Sendo, portanto, utilizada em modelos animais de depressão e ansiedade.

A indução do comportamento depressivo-símile foi adaptada dos estudos de Wrobél e colaboradores (2014). Assim, a dexametasona (64µg/kg) foi administrada por via subcutânea em todos os grupos, com exceção do salina, 3h30min antes da realização dos testes. Os experimentos foram encerrados até as 12h00, devido ao pico de liberação de corticosterona endógena. Os testes foram realizados na seguinte sequência: 1º Teste do Suspensão de Cauda; 2º *Splash Test*; e 3º Teste do Campo Aberto.



Figura 5 – Cronograma Experimental

8.2.1. Teste de Suspensão de Cauda

Este teste é um modelo clássico de triagem para avaliação da atividade antidepressiva de fármacos (Steru, Chermat, Thierry & Simon, 1985). Nesse caso, o animal é suspenso por sua cauda, de maneira tal que fique impedido de tocar o chão ou escapar. Sendo assim, o camundongo pode apresentar um estresse vindo pela tentativa de fuga ou a motivação para continuar tentando. No momento em que o animal desiste da fuga, ele apresenta uma postura imóvel, sendo este a expressão do comportamento depressivo. É um teste de fácil aplicabilidade, grande reprodutibilidade e tem sido usado para conseguir detectar um grande espectro de agentes antidepressivos (Cryan, Mombereau & Vassout, 2005; Nestler *et al.*, 2002).

Neste experimento foram utilizados os seguintes grupos: veículo (Tween 80 1%), metileugenol (25, 50, 100 mg/kg, i.p.) e imipramina (30mg/kg, i.p.). Os camundongos foram suspensos, um por vez, presos com uma fita adesiva a cerca de 1 cm da ponta da cauda, numa plataforma de 58 cm acima da bancada, depois de quarenta e cinco minutos do tratamento. Cada animal permaneceu nesta posição durante 6 min. Analisou-se os seguintes parâmetros: latência para imobilidade e tempo total de imobilidade. (Duan *et al.*, 2015; Steru, Chermat, Thierry & Simon, 1985).

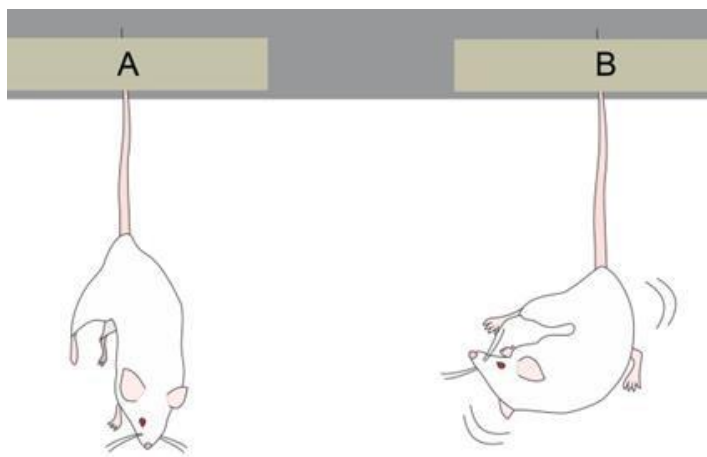


Figura 6 - Representação dos comportamentos de imobilidade (a) e mobilidade (B) no TSC. Fonte: Adaptado de Colla, 2015.

8.2.2. *Splash Test*

O “*splash test*” é utilizado para avaliar o comportamento de auto-limpeza (“*grooming*”) dos animais, após a borrifagem de uma solução de sacarose a 10% (Ducottet & Belzung, 2004) no dorso do animal (Figura A). Essa reação dos animais é registrada como indicadora de autocuidado e comportamento motivacional, vinculando-se com os sintomas da depressão, a exemplo do comportamento apático demonstrado pelos pacientes (Willner, 2005; Isingrini *et al.*, 2010; Moretti *et al.*, 2012; Rosa *et al.*, 2014). Em modelos animais de depressão, a administração crônica de antidepressivos clássicos aumenta o tempo despendido no comportamento de *grooming* (Yalcin, Aksu & Belzung, 2005)

O animal foi colocado individualmente dentro de uma caixa de acrílico (9 x 7 x 11 cm) (Figura B) e os parâmetros observados foram a latência para o início da autolimpeza (*grooming*) e o tempo em que o animal permaneceu no comportamento de auto-limpeza durante 5 minutos (Isingrini *et al.*, 2010). Após a observação de cada animal o aparato utilizado foi limpo com uma solução álcool à 10%.

Foram empregados os seguintes grupos para o experimento: veículo (Tween 80 1%), metileugenol (25, 50, 100 mg/kg, i.p.) e imipramina (30mg/kg, i.p.).

8.2.3. *Campo Aberto*

A fim de averiguar a atividade locomotora espontânea dos animais, foi realizado o Teste do Campo Aberto utilizando uma arena circular (30 cm de diâmetro), cuja base apresentava 12 quadrantes. Os camundongos foram posicionados na região central da arena, e os parâmetros observados, por 5 min, foram os seguintes: a) número de cruzamentos dos animais nos

quadrantes; b) tempo de permanência no centro do campo; c) quantidade de levantamentos (*rearing*) e; d) latência para o 1º *rearing*. O tempo de permanência na área central (4 quadrantes centrais) foi considerado como medida de ansiedade. A base da arena foi higienizada com solução de álcool 10% entre os testes (Kalueff, Jensen & Murphy, 2007; Dizchaves et al., 2012; Machado et al., 2009).

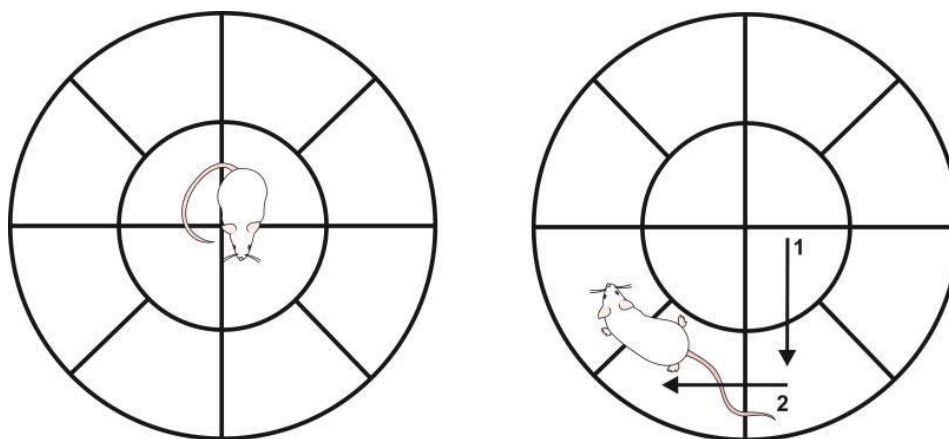


Figura 7 – Campo Aberto Fonte: Colla, 2015

8.3. Investigação dos possíveis mecanismos de ação da atividade antidepressiva do Metileugenol

Os mecanismos de ação pelos quais o metileugenol atua foram investigados em seguida a avaliação a atividade antidepressiva, durante os testes anteriormente explicitados. Para tal, foram usados diferentes antagonistas em doses pré-estabelecidas pela literatura. Assim, esses estudos apoiam-se sobre o uso de técnicas farmacológicas, cujo efeito atinge os receptores específicos vinculados a regulação do humor.

A fim de realizar tal etapa, o teste de suspensão da cauda foi selecionado, sendo utilizado a dose de 50mg/kg de metileugenol devido ao seu desempenho nos modelos escolhidos. Deste modo, os grupos experimentais receberam dexametasona (64µg/kg s.c.) cerca de 3h30min, antes do início da avaliação (Wróbel *et al.*, 2014). Assim, foram analisados os mecanismos pelas seguintes vias: a) noradrenérgica; b) serotoninérgica e; c) dopaminérgica.

8.3.1. Avaliação do Sistema Noradrenérgico

Para averiguação da participação do sistema noradrenérgico sobre a atividade antidepressiva do metileugenol, utilizou-se o Prazosin, que antagoniza os receptores $\alpha 1$ (Abbasi-Maleki & Mousavi, 2017; Chellian, Pandey & Mohamed, 2016).

Assim, foram organizados grupos de 8 camundongos. Todos os grupos, exceto o veículo, receberam o pré-tratamento com dexametasona (64µg/kg s.c.) 3h30min antes da

realização dos testes comportamentais (Wróbel, Serefko, Wlaź & Poleszak, 2014). Em seguida os diferentes grupos receberam os seguintes tratamentos: veículo (Tween 80 1% i.p.), metileugenol (50 mg/kg i.p.) ou prazosin (1 mg/kg i.p.). E outro grupo recebeu a administração de metileugenol após 15 min da aplicação do prazosin. Em seguida, após 45min, foi realizado o teste de suspensão de cauda.

8.3.2. Avaliação do Sistema Serotoninérgico

A fim de investigar a via serotoninérgica no efeito antidepressivo do metileugenol, foi usado o *p-clorofenilalanina* (PCPA), um inibidor da síntese de serotonina (Abbasi-Maleki & Mousavi, 2017; Chellian, Pandey & Mohamed, 2016).

Todos os grupos receberam o pré-tratamento com a dexametasona (64µg/kg s.c.) 3h30min antes dos testes (Wróbel, Serefko, Wlaź & Poleszak., 2014), com exceção do grupo salina. Foram organizados grupos de 8 animais tratados com veículo (Tween 80 à 1% i.p.) e metileugenol (50 mg/kg i.p.) Organizou-se ainda outros dois grupos que receberam a administração de PCPA diariamente por 5 dias, assim no dia do experimento 30 minutos anteriormente ao teste, um grupo recebeu o metileugenol (50 mg/kg i.p.) e o outro grupo a salina. Após 30 minutos, os animais foram submetidos ao teste de suspensão da cauda.

8.3.3. Avaliação do Sistema Dopaminérgico

Objetivando compreender o efeito do metileugenol como antidepressivo pela via dopaminérgica foi usado o SCH23390, um antagonista de receptores D1 (Can, Turan, Özkay & Öztürk, 2017).

A dexametasona (64µg/kg s.c.) foi administrada previamente 3h30min antes dos testes (Wróbel *et al.*, 2014) em todos os grupos, com exceção do grupo salina.

Para tal, os grupos utilizados receberam o veículo (Tween 80 1% i.p.), metileugenol (50 mg/kg i.p.) ou SCH23390 (1 mg/kg s.c.). E outro grupo recebeu SCH23390, e após 15 min recebeu o metileugenol. Transcorridos 30 minutos foi iniciado o teste de suspensão da cauda com os camundongos.

9. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada empregando o teste de Análise de Variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey ou Dunnet (*post hoc*). Os valores foram representados pela média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.), sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. Utilizou-se o software Graphpad Prism para esta etapa.

10. Resultados

10.1. Avaliação da toxicidade e triagem farmacológica comportamental do metileugenol

10.1.1. Determinação da dose letal

Para determinar a toxicidade aguda, os animais receberam o metileugenol e foram observados por 14 dias após a administração. Foi ainda verificado a quantidade de mortes em seguida da aplicação da substância, por dose. Durante os 14 dias não houve morte para a dose de 2000mg/kg, conforme a tabela a seguir.

Doses do Metileugenol (mg/kg)	% de mortes em 14 dias
2000	0

Tabela 1 - % de mortes em 14 dias em diferentes doses do metileugenol

10.1.2. Efeito do metileugenol na triagem farmacológica comportamental

Os resultados obtidos na triagem farmacológica comportamental do metileugenol (2000 mg/kg) estão apresentados no quadro a seguir. Os grupos apresentaram diferentes comportamentos em relação ao controle. Após 30 minutos da administração do metileugenol, foi observado que os animais, na dose de 2000 mg/kg, estavam apresentando analgesia.

O parâmetro da sedação também foi verificado. Esse esteve presente até 3h após a administração. Além desse, foram averiguados o tônus muscular e a força para agarrar, os quais apresentaram-se como diminuídos inicialmente, porém estando presente ao final da triagem. Foi notado ainda a perda do reflexo corneal e a perda do reflexo auricular na dose de 2000mg/kg que se estendeu até o fim da triagem, como mostra a tabela na página seguinte.

Metileugenol (mg/kg)	Tempo em observação (min)				
	Até 30'	60'	120'	180'	240'
2000	Sedação (+) Catatonia (+) Analgesia (+) Perda do reflexo corneal (+) Perda do reflexo auricular (+) Resposta ao toque diminuído (+) Tonus muscular (-) Força para agarrar (-)	Sedação (+) Analgesia (+) Resposta ao toque diminuído (+) Perda do reflexo corneal (+) Perda do reflexo auricular (+) Tonus muscular (-) Força para agarrar (-)	Sedação (+) Analgesia (+) Resposta ao toque diminuído (+) Perda do reflexo corneal (+) Perda do reflexo auricular (+) Tonus muscular (-) Força para agarrar (-)	Analgesia (+) Resposta ao toque diminuído (+) Perda do reflexo corneal (+) Perda do reflexo auricular (+) Tonus muscular (+) Força para agarrar (+)	Resposta ao toque diminuído (+) Perda do reflexo corneal (+) Perda do reflexo auricular (+) Tonus muscular (+) Força para agarrar (+)

Tabela 2 – Efeitos observados do metileugenol na triagem farmacológica comportamental / efeito presente (+); efeito diminuído (-)

10.2. Avaliação da atividade antidepressiva do metileugenol

10.2.1. Efeito do metileugenol no Teste de Suspensão da Cauda

Na avaliação da latência para a imobilidade (Gráfico 1), os animais tratados com metileugenol, na dose de 50 mg/kg ($88,8 \pm 6,0$), apresentou uma maior latência para imobilidade quando comparado ao grupo dos animais que receberam dexametasona (DEXA) ($53,7 \pm 6,2$) e salina (SAL) ($47,5 \pm 12,6$). Porém, o metileugenol nas doses de 25 mg/kg ($49,8 \pm 6,5$) e 100 mg/kg ($68,9 \pm 8,1$), a salina ($47,5 \pm 12,6$), e a imipramina ($79,0 \pm 3,2$) não causaram um efeito significativo, em comparação ao grupo com dexametasona ($F(5, 41) = 4,676$; $p < 0,05$).

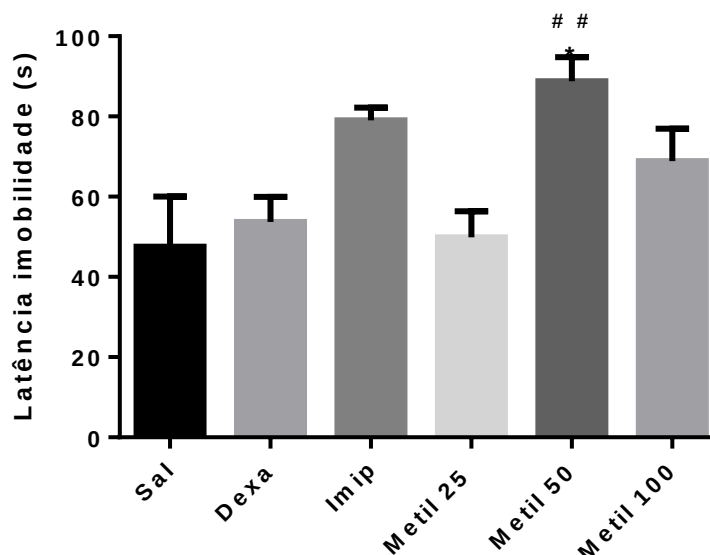


Gráfico 1 - Efeito do metileugenol (25, 50 e 100 mg/kg, i.p.), salina (i.p.), dexametasona (64µg/kg s.c.) e imipramina (10 mg/kg i.p.), sobre a latência para imobilidade no teste de suspensão da cauda. Valores expressos em média ± e.p.m. (n=8). ANOVA *one-way* seguido pelo Teste de Tukey. * $p < 0,05$ versus dexametasona ^{##} $p < 0,01$ versus salina.

Os animais tratados com metileugenol na dose de 50 mg/kg ($91,2 \pm 9,9$) e imipramina ($71,7 \pm 11,4$), apresentaram redução do tempo de imobilidade quando comparados com o grupo DEXA ($144,1 \pm 6,5$). Já o grupo metileugenol na dose de 25mg/kg ($129,6 \pm 13,8$), não reduziu o tempo de imobilidade, quando comparado com o grupo DEXA ($144,1 \pm 6,5$). Por sua vez, o grupo metileugenol na dose de 100 mg/kg ($198,4 \pm 20,7$) aumentou o tempo de imobilidade em comparação com o grupo DEXA ($144,1 \pm 6,5$). O grupo salina ($102,5 \pm 9,0$) não diferiu do grupo DEXA ($144,1 \pm 6,5$) ($F(5, 42) = 12,65$; $p < 0,05$) (Gráfico 2).

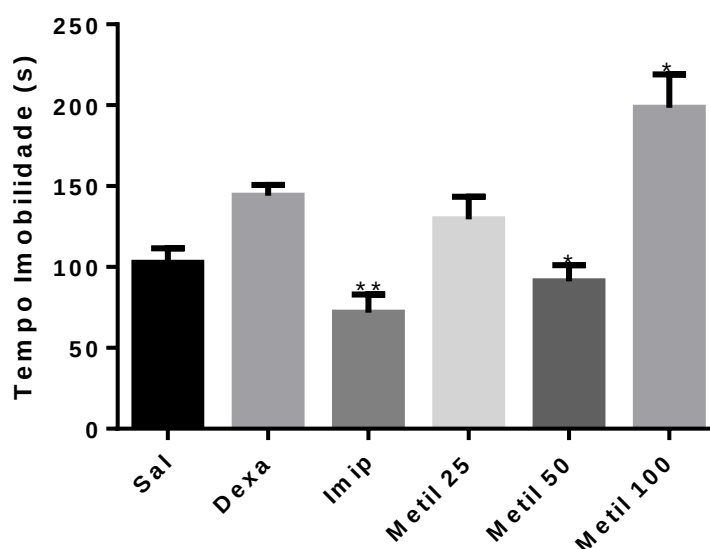


Gráfico 2 - Efeito do metileugenol (25, 50 e 100 mg/kg, i.p.), salina (i.p.), dexametasona (64µg/kg s.c.) e imipramina (10 mg/kg i.p.) sobre o tempo de imobilidade no teste de suspensão da cauda. Valores expressos em média ± e.p.m. (n=8). ANOVA *one-way* seguido pelo Teste de Dunnett's. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ versus dexametasona.

12.1.2. Efeito do metileugenol no *Splash Test*

Os resultados obtidos para latência para o *grooming* (autolimpeza) no teste de borrifagem de sacarose, podem ser observados no Gráfico 3. A administração intraperitoneal de metileugenol nas doses de 25 mg/kg ($18,6 \pm 0,3$) e 50 mg/kg ($19,8 \pm 0,6$), imipramina ($12,9 \pm 0,9$) e salina ($20,9 \pm 2,4$), diminuíram a latência para o *grooming* quando comparados ao grupo DEXA ($34,4 \pm 6,4$). Já o grupo metileugenol na dose de 100mg/kg ($23,0 \pm 2,7$), não reduziu a latência para o *grooming*, em comparação com o mesmo grupo ($F(5, 43) = 5,552$; $p < 0,05$).

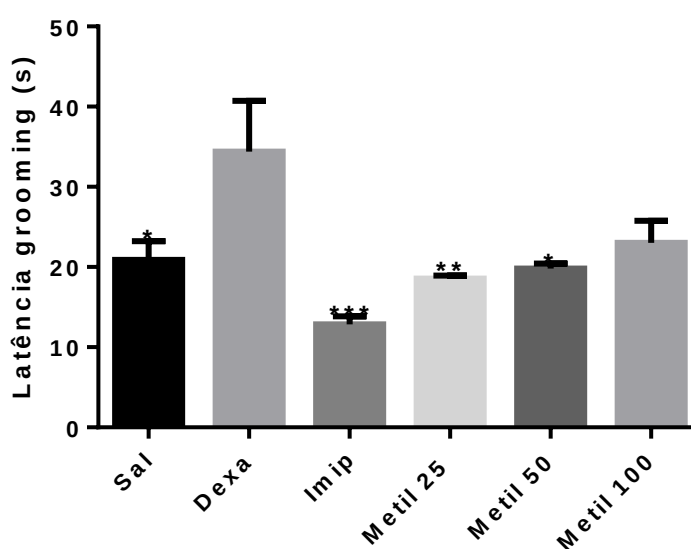


Gráfico 3 - Efeito do metileugenol (25, 50 e 100 mg/kg, i.p.), salina (i.p.), dexametasona (64µg/kg s.c.) e imipramina (10 mg/kg i.p.) sobre latência para o *grooming* no *Splash Test*. Valores expressos em média ± e.p.m. (n=8). ANOVA *one-way* seguido pelo Teste de Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, *versus* dexametasona.

Os grupos tratados com metileugenol nas doses de 25 mg/kg ($195,6 \pm 12,2$) e 50 mg/kg ($195,0 \pm 11,9$), e imipramina ($199,5 \pm 6,4$) aumentaram o tempo de *grooming*, quando comparados ao grupo DEXA ($141,2 \pm 9,1$) e ao grupo Salina ($20,8 \pm 2,3$). O metileugenol na dose de 100 mg/kg ($177,2 \pm 14,61$), não apresentou diferença estatística em comparação ao grupo DEXA e ao grupo Salina (Gráfico 4) ($F(5, 44) = 6,816$; $p < 0,05$).

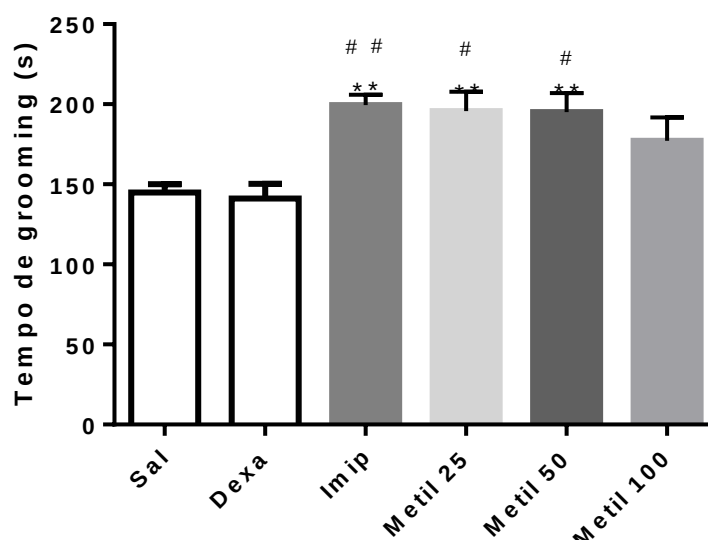


Gráfico 4 - Efeito do metileugenol (25, 50 e 100 mg/kg, i.p.), salina (i.p.), dexametasona (64µg/kg s.c.) e imipramina (10 mg/kg i.p.) sobre tempo de *grooming* no Splash Test. Valores expressos em média $\pm$ e.p.m. (n=8). ANOVA *one-way* seguido pelo Teste de Tukey. * $p<0,05$ **, $p<0,01$ versus dexametasona. # $p<0,05$, ## $p<0,05$ versus salina.

12.1.3. Efeito do metileugenol no Campo Aberto

Os dados presentes no Gráfico 5 indicam os efeitos do metileugenol sobre o número de cruzamentos dos animais no campo aberto. O metileugenol na dose de 25 mg/kg ($104,0 \pm 2,6$), 50 mg/kg ($75,4 \pm 2,6$), 100 mg/kg ($76,5 \pm 8,6$), a imipramina ($106,3 \pm 8,7$) e a salina ($106,0 \pm 6,1$), aumentaram o número de cruzamentos quando comparados com a DEXA ($38,9 \pm 4,8$).

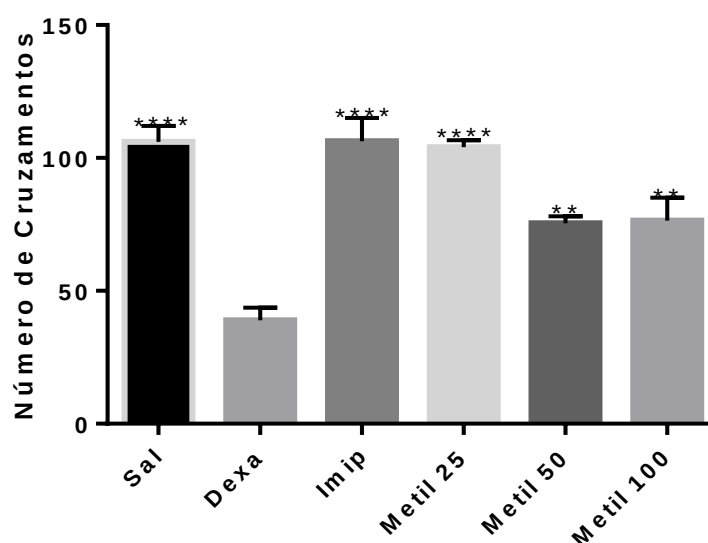


Gráfico 5 - Efeito do metileugenol (25, 50 e 100 mg/kg, i.p.), salina (i.p.), dexametasona (64µg/kg s.c.) e imipramina (10 mg/kg i.p.) sobre o número de cruzamentos no Campo Aberto. Valores expressos em média $\pm$ e.p.m. (n=8). ANOVA *one-way* seguido pelo Teste de Tukey. ** $p<0,01$, **** $p<0,0001$ versus dexametasona.

No resultado do parâmetro porcentagem de tempo no centro, foram encontradas alterações significativas entre os grupos estudados. O metileugenol na dose de 50 mg/kg ($20,2$

$\pm 3,9$), aumentou a porcentagem de tempo de permanência no centro do campo aberto quando comparado com a DEXA ($9,8 \pm 1,2$). Não foram encontradas alterações significativas entre os grupos salina ($12,7 \pm 2,1$), metileugenol na dose de 25mg/kg ($18,1 \pm 3,3$) e 100mg/kg ($10,7 \pm 1,0$) e imipramina ($16,7 \pm 1,7$) (Gráfico 6).

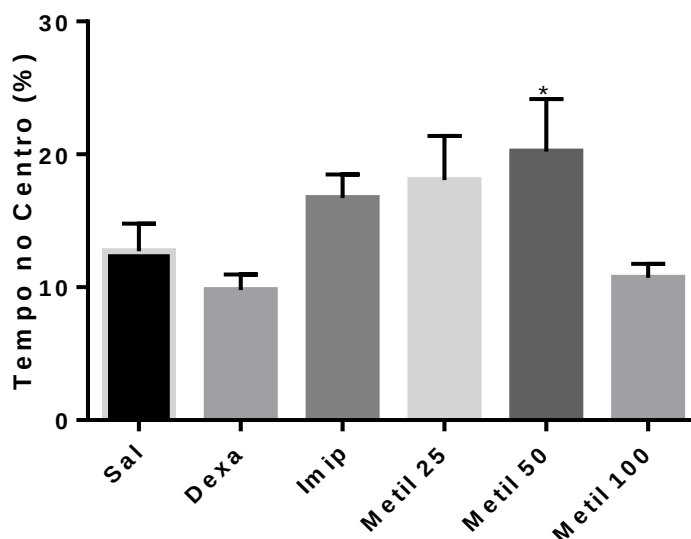


Gráfico 6 - Efeito do metileugenol (25, 50 e 100 mg/kg, i.p.), salina (i.p.), dexametasona ($64\mu\text{g/kg}$ s.c.) e imipramina (10 mg/kg i.p.) sobre a porcentagem de tempo de permanência no centro do campo aberto. Valores expressos em média $\pm$ e.p.m. (n=8). ANOVA *one-way* seguido pelo Teste de Tukey. * $p < 0,05$ versus dexametasona.

Para o resultado do parâmetro latência para o *rearing* (Gráfico 7), não foram encontradas alterações significativas entre os grupos salina ($21,8 \pm 3,5$), DEXA ($28,3 \pm 3,8$), imipramina ($26,2 \pm 3,3$), metileugenol 50 mg/kg ($37,6 \pm 2,1$) e 100 mg/kg ($26,6 \pm 3,3$). No entanto, o metileugenol na dose de 25 mg/kg ($14,4 \pm 2,6$), diminuiu a latência para o *rearing* no campo aberto quando comparado com a DEXA ($28,3 \pm 3,8$) ($F(5, 42) = 5,790$; $p < 0,05$).

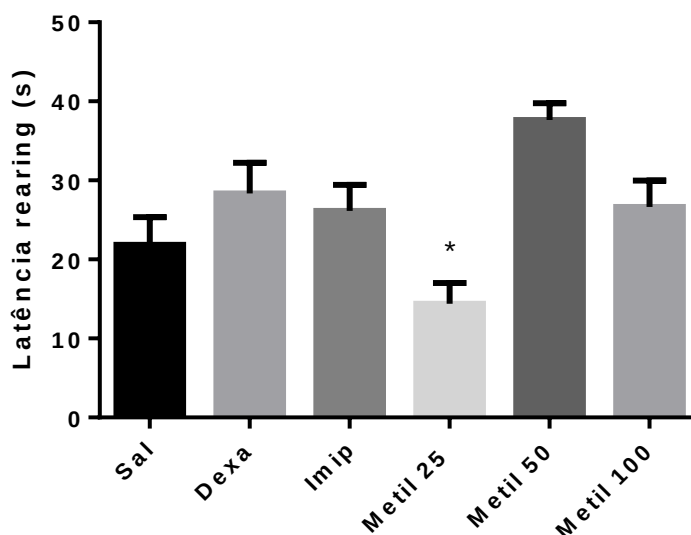


Gráfico 7 - Efeito do metileugenol (25, 50 e 100 mg/kg, i.p.), salina (i.p.), dexametasona ($64\mu\text{g/kg}$ s.c.) e imipramina (10 mg/kg i.p.) sobre a latência para o *rearing* no campo aberto. Valores expressos em média $\pm$ e.p.m. (n=8). ANOVA *one-way* seguido pelo Teste de Tukey. * $p < 0,05$ versus dexametasona.

E quanto ao número de *rearing* ou levantamentos (Gráfico 8), não foram encontradas diferenças estaticamente significativas entre os grupos salina ($29,1 \pm 1,4$), imipramina ($29,5 \pm 3,0$), metileugenol 25 ($34,3 \pm 5,5$), 50 ($27,2 \pm 1,4$) e 100 mg/kg ($28,3 \pm 3,1$) quando comparados ao grupo DEXA ($22,6 \pm 3,0$).

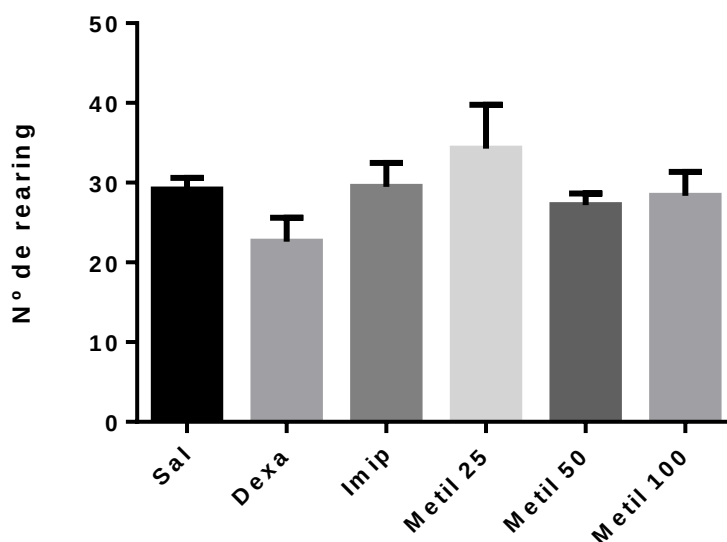


Gráfico 8 - Efeito do metileugenol (25, 50 e 100 mg/kg, i.p.), salina (i.p.), dexametasona ($64\mu\text{g/kg}$ s.c.) e imipramina (10 mg/kg i.p.) sobre o *rearing* no campo aberto. Valores expressos em média $\pm$ e.p.m. (n=8). ANOVA *one-way* seguido pelo Teste de Tukey.

12.2. Avaliação dos possíveis mecanismos de ação envolvidos na atividade antidepressiva do metileugenol

Os grupos de animais tratados com salina ($107,2 \pm 4,7$), metileugenol ($83,5 \pm 6,6$), SCH2330 ($218,7 \pm 9,7$) e prazosin ($110,0 \pm 6,9$) diferiram de forma significativa do grupo DEXA ($142,3 \pm 5,3$).

Ainda, os grupos PCPA ($139,8 \pm 6,8$), PCPA + metileugenol ($171,2 \pm 5,9$), SCH2330 ($218,7 \pm 9,7$), SCH23390 + metileugenol ($150,0 \pm 6,3$) e prazosin + metileugenol ($157,0 \pm 6,6$) aumentaram o tempo de imobilidade em comparação com o grupo metileugenol [$F(10, 80) = 40,96$; $p < 0,0001$] (Gráfico 9).

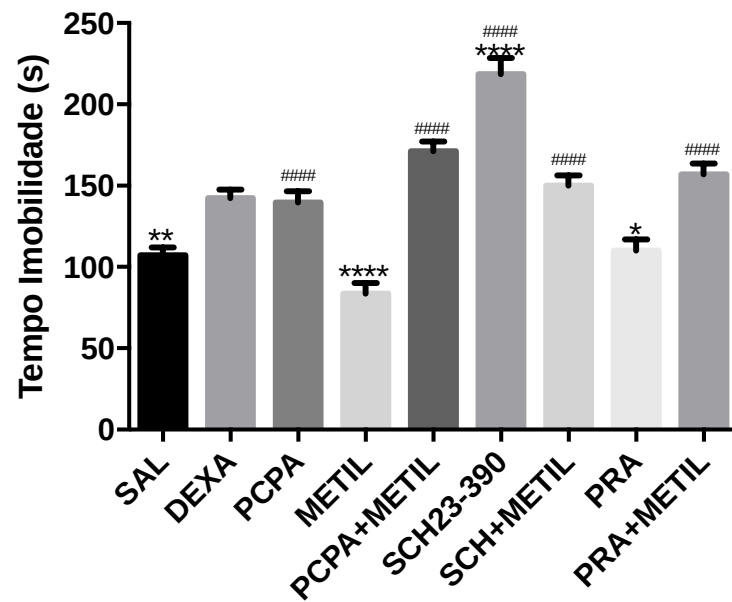


Gráfico 9 –Avaliação dos possíveis mecanismos de ação envolvidos na atividade antidepressiva do metileugenol (50 mg/kg, i.p.) sobre o tempo de imobilidade no TSC. Valores expressos em média $\pm$ e.p.m. (n=8). ANOVA *one-way* seguido pelo Teste de Tukey. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, **** $p<0,0001$ versus dexametasona; #### $p<0,0001$ versus metileugenol.

13. Discussão

Este estudo proporcionou o entendimento da atividade antidepressiva do metileugenol, por meio da indução do comportamento depressivo em camundongos fêmeas pela aplicação de Dexametasona pela via intraperitoneal (Lukas & Brinndle, 1971). Para isso, foi realizada a análise do comportamento pelos testes de suspensão da cauda, *splash test* e campo aberto. Além disso, foram investigados os possíveis mecanismos de ação utilizando-se o teste de suspensão da cauda.

Os resultados encontrados mostram que o metileugenol apresentou atividade antidepressiva nos testes de suspensão da cauda, através da diminuição do tempo e aumento da latência para imobilidade. E que apresentou maior tempo de *grooming* (autolimpeza) e redução da latência para o grooming no *splash test*; além de um aumento no número de cruzamentos no campo aberto. Indicando seu potencial no combate ao comportamento tipo depressivo.

Inicialmente foi determinado o grau de toxicidade do metileugenol, no qual objetivou-se verificar a dose que teria efeito letal em 50% dos animais da população (Litchfiels & Wilcoxon, 1949). A fim de obter um perfil da ação do metileugenol sobre o SNC, foi usada a triagem farmacológica comportamental como teste preliminar para averiguar o perfil farmacológico da substância, de forma qualitativa e algumas de suas ações do SNC e Sistema Nervoso Autônomo (SNA).

Conforme apresentado, os grupos de camundongos tratados com metileugenol nas doses de 2000 mg/kg de peso corpóreo apresentaram alterações comportamentais sugestivas de drogas com atividade no SNC tais como a diminuição da resposta ao toque diminuído e a perda do reflexo corneal e auricular. A partir disso, foram definidas as doses do metileugenol, em 25, 50 e 100 mg/kg de peso corporal, que foram utilizadas nos testes farmacológicos específicos de avaliação da atividade sobre o SNC.

Na tentativa de compreender cada vez mais a patogênese da depressão, diferentes estudos com o uso de plantas medicinais aromáticas e de seus constituintes têm sido desenvolvidos. Essas pesquisas exibem os benefícios gerados pelo uso da população no auxílio de distintas enfermidades, destacando-se as que atingem o SNC, inclusive ansiedade e depressão (Butler, 2004; Newman & Cragg, 2007).

Deste modo, diferentes pesquisadores têm utilizado diversos protocolos em seus experimentos. Dentre eles, o protocolo da dexametasona. Esse é um modelo de depressão no qual é possível a) mimetizar sintomas associados à doença (validade de face); b) desenvolver aspectos fisiopatológicas análogos à condição humana (validade de constructo) e; c) o tratamento no qual é usado os antidepressivos consegue reverter as alterações do modelo

(validade preditiva) (Mckinney & Bunney 1969; Li et al., 2014; Wróbel et al., 2014, 2015; Conti, Spulber, Raciti & Ceccatelli, 2017).

De acordo com a literatura, o aumento dos níveis de glicocorticoides estaria vinculado ao desenvolvimento da depressão em humanos e do comportamento tipo depressivo em animais (Gregus, Wintink, Davis & Kalynchuk, 2005). Estudos tem mostrado que pacientes tratados com glicocorticoides exibiram sintomas psiquiátricos e cognitivos similares a depressão. Já nos modelos animais, a administração crônica e aguda de glicocorticóides ocasionou modificações no comportamento semelhantes as encontradas em humanos com o transtorno (Gregus, Wintink, Davis & Kalynchuk, 2005; Silva et al., 2013; Wróbel, Serefko, Wlaź & Poleszak, 2014).

Os dados encontrados neste estudo apresentam a eficiência do protocolo da Dexametasona. É possível compreender isso devido ao aumento do tempo de imobilidade dos animais que receberam a dose aguda de DEXA quando comparados ao grupo salina, produzindo um comportamento depressivo-símile, no teste de suspensão da cauda.

O teste de suspensão da cauda é um dos testes mais utilizados para a triagem de drogas antidepressivas, sendo considerado sensível e específico para grande parte das classes de medicamentos antidepressivos. Deste modo, o animal quando inserido numa situação inescapável, preso pela cauda, desenvolve uma postura de imobilidade após tentativas iniciais de fuga. E tal situação é percebida como uma desistência, sendo descrita como um estado depressivo. As substâncias antidepressivas analisadas poderiam, por sua vez, reverter tal condição, atenuando assim o tempo de imobilidade (Willner & Mitchell, 2002; Holmes, 2003; Steru, Chermat, Thierry & Simon, 1985).

Avaliando o parâmetro latência para imobilidade no teste de suspensão da cauda, o metileugenol, na dose de 50 mg/kg, aumentou a latência, dando um indicativo da atividade antidepressiva da substância. Apesar de pouco avaliada, a verificação da latência contribui para compreendermos ainda mais os efeitos das drogas, visto que certas classes de antidepressivos alteram esse parâmetro (Castagné, Porsolt & Moser, 2009). Vale destacar, que o metileugenol na dose de 50 mg/kg teve um efeito semelhante ao da imipramina, a droga padrão dos antidepressivos.

Em 2014, Li e Colaboradores desenvolveram um estudo no qual foi utilizado do protocolo da DEXA. Nesse caso, a Dexametasona foi administrada durante o período neonatal (1-3 dias) em doses variando de 0,1 - 0,5 mg/kg de peso. Apesar dessas diferenças no protocolo, quando comparado ao que foi utilizado nesse estudo, a DEXA elevou o tempo de imobilidade

dos animais no teste de suspensão da cauda quando comparado ao grupo controle, ratificando os resultados obtidos nesse estudo.

Ainda corroborando nossos dados, Sigwalt et al. (2011) encontrou o mesmo resultado que os autores anteriores, quando administrou em ratos uma dose maior de dexametasona (1,5 mg/kg). E mais recentemente, foi achado um aumento no tempo de imobilidade de camundongos machos submetidos a injeções em dose única de DEXA (64 µg/kg), no teste do nado forçado (Wróbel, Serefko, Wlaź & Poleszak, 2014; 2015).

Estudos com protocolos semelhantes ao utilizado neste estudo, tem demonstrado uma redução do tempo de imobilidade no teste de suspensão da cauda. Foi o que Vasconcelos et al. (2015) encontrou ao usar a Riparina III, uma acalmida natural extraída do fruto da *Aniba riparia*, no modelo de depressão induzido por CORT (corticosterona) em ratos.

Para corroborar com os achados no teste de suspensão da cauda, foi realizado o *splash test*. Os animais submetidos a modelos comportamentais de depressão exibem um menor tempo de *grooming* (autolimpeza), sendo interpretado como um comportamento anedônico. Em contrapartida, a administração de antidepressivos clássicos aumenta o tempo gasto neste comportamento (Kalueff, 2002; Kalueff & Tuohimaa, 2004; Moretti et al., 2012; Yalcin, Aksu & Belzung 2005).

O metileugenol, nas doses de 25 mg/kg e 50 mg/kg, aumentou o tempo de *grooming*, apresentando um efeito equivalente ao da droga padrão imipramina. Além disso, diminuiu a latência para o *grooming*, sendo novamente semelhante com a da imipramina. O grupo DEXA não apresentou diferença em relação ao grupo salina no tempo de *grooming*, contudo aumentou a latência quando comparado aos grupos salina e imipramina, sendo um indicativo de seu efeito tipo depressivo.

Estudos como de Zeni, Camargo e Ana (2017), no qual foi utilizado o ácido ferúlico, um composto fenólico presente em várias espécies de plantas, elevou o tempo de *grooming* de camundongos machos submetidos ao protocolo da CORT (20 mg/kg). Esse indicativo ratifica os dados aqui encontrados. Além disso, foi ainda visto que a aplicação de crisina, um flavonoide encontrado no própolis e mel, também aumentou o tempo de *grooming* de camundongos fêmeas que passaram por estresse crônico imprevisível (Borges Filho et al., 2016).

O teste do campo aberto é largamente utilizado para a avaliação da atividade locomotora espontânea e fornece indícios do estado de emocionalidade dos roedores (Rodrigues, Rocha, Mello & Souza, 1996; Choleris, Thomas, Kavaliers & Prato, 2001; Prut & Belzung, 2003). Os parâmetros observados no campo foram: número de cruzamentos, tempo de permanência no centro, latência para o *rearing* e número de *rearing*/levantamentos.

O metileugenol na dose de 25, 50 e 100 mg/ kg, assim como, a imipramina e o grupo salina aumentaram o número de cruzamentos, a dose de 50 mg/ kg aumentou o tempo de permanência no centro, em relação a dexametasona. A dose de 25 mg/kg diminuiu a latência para o *rearing*. E o número de *rearing* não diferiu de modo significativo entre os grupos. Sugerindo que o metileugenol não alterou a atividade locomotora espontânea e apresentou um efeito indicativo de atividade ansiolítica, fornecendo assim indícios do estado emocional dos camundongos. Esses dados, são semelhantes ao que Norte, Cosentino e Lazarini (2005) encontraram, ao usarem o metileugenol em ratos num modelo de ansiedade. Desta maneira, foi finalizada a avaliação da atividade antidepressiva.

Diante da grande aceitação do teste de suspensão da cauda como forma de investigação de drogas antidepressivas, foi escolhido este teste como meio para investigar os possíveis mecanismos de ação do metileugenol. Foi utilizada a dose 50 mg/kg, a qual apresentou efeito antidepressivo mais eficaz nos testes descritos.

A fim de compreender o mecanismo de ação do metileugenol, avaliou-se a possibilidade de sua atuação ser pelo sistema noradrenérgico. Devido ao seu envolvimento na fisiopatologia da depressão alguns antidepressivos agem elevando a quantidade de noradrenalina para as sinapses (Brunello et al., 2003). Além disso, os receptores $\alpha 1$ e $\alpha 2$ -adrenérgicos estão ligados as respostas de drogas antidepressivas em modelos comportamentais de depressão (Kitada, Miyauchi, Kanazawa, Nakamichi & Satoh, 1983; Masuda, Ohnuma & Sugiyama, 2001).

Em nossos resultados, o metileugenol teve seu efeito antidepressivo bloqueado pelo pré-tratamento com prazosin (antagonista $\alpha 1$ -adrenérgico), aumentando o tempo de imobilidade no teste de suspensão da cauda. Desta maneira, sugerindo que o metileugenol interage com os receptores do sistema noradrenérgico para exercer seus efeitos. Semelhante aos nossos achados, Chellian, Pandey e Mohamed (2016) apresentaram que o α -asarone, um análogo estrutural do eugenol, teve seu efeito antidepressivo em camundongos no teste da suspensão da cauda revertido pelo pré-tratamento com prazosin.

Outro sistema implicado na depressão seria o serotoninérgico. Sendo também considerado em estudos para investigação do mecanismo de ação de outros antidepressivos (Millan, 2004). Deste modo, o aumento do nível de serotonina, estaria relacionado ao combate da depressão (Cryan, Valentino & Lucki, 2005). Utilizamos o PCPA, um inibidor seletivo da síntese de serotonina, o qual inibe a enzima triptofano hidroxilase e depleta o nível de serotonina no cérebro, sem afetar, no entanto, os níveis de noradrenalina e dopamina do cérebro.

No presente trabalho, o PCPA quando administrado sozinho apresentou diferença significativa em relação ao tempo de imobilidade no teste da suspensão da cauda, quando

comparado com metileugenol. E quando os animais foram pré-tratados com o PCPA e depois com o metileugenol aumentaram também o tempo de imobilidade, revertendo assim o efeito anti-imobilidade do metileugenol. Assim como nossos resultados, o estudo realizado por Abbasi-Maleki & MouSavi (2017) encontraram que o pré-tratamento com PCPA alterou o efeito no tempo de imobilidade do *Carthamus tinctorius* L. no teste da suspensão da cauda.

A fim de dar continuidade na compreensão do mecanismo de ação do metileugenol, avaliou-se a possibilidade de sua atuação ser ainda pelo sistema dopaminérgico. Esse, está especialmente envolvido na regulação do humor (Dailly, Chenu, Renard & Bourin, 2004). E a desregulação da via dopaminérgica mesolímbica e mesocortical está relacionada com os sinais de melancolia e de alteração na cognição na depressão (Millan et al., 2000; Naranjo, Tremblay & Busto 2001; Lehr, 2002). Além disso, já existem registros da eficácia dos antidepressivos que atuam na via dopaminérgica (Papakosta, 2006).

Assim, foi encontrado um envolvimento do sistema dopaminérgico (D1) no efeito antidepressivo do metileugenol, dado que o pré-tratamento dos camundongos com SCH23390 (antagonista de receptores D1), bloqueou o efeito induzido pelo metileugenol, aumentando assim a imobilidade no teste da suspensão da cauda. Bem como, apenas a administração do SCH23390, aumentou o tempo de imobilidade. Estes resultados estão compatíveis com os achados de Can et al. (2017), que ao administrarem SCH23390 em camundongos, reverteram o efeito antidepressivo do ácido gálico no teste da suspensão da cauda.

A partir do exposto é possível concluir que foi mimetizado o comportamento depressivo-símile pelo modelo da administração aguda de dexametasona em camundongos fêmeas, observada por meio do teste de suspensão da cauda, *splash test* e campo aberto. Foi visto também que o metileugenol reduziu o tempo de imobilidade e elevou a latência para imobilidade no teste da suspensão da cauda; e aumentou o tempo de grooming e diminui a latência para o grooming no *splash test*, indicando atividade antidepressiva.

Além disso, ficou evidente que o metileugenol não alterou a atividade locomotora no campo aberto. E que seu efeito antidepressivo pode estar envolvido com os sistemas dopaminérgico D1 e $\alpha 1$ adrenérgico.

14. Conclusão

Esse estudo demonstrou que a administração de metileugenol em animais submetidos ao modelo de depressão induzido por dexametasona produziu um efeito antidepressivo relevante sem alterar a atividade locomotora.

Sua atuação no comportamento tipo depressivo pode estar associado com o envolvimento do sistema dopaminérgico D1 e $\alpha 1$ adrenérgico.

15. Referências Bibliográficas

Abbasi-Maleki, S., & Mousavi, Z. (2017). Hydroethanolic extract of *Carthamus tinctorius* induces antidepressant-like effects: modulation by dopaminergic and serotonergic systems in tail suspension test in mice. *Iranian journal of basic medical sciences*, 20(9), 1063.

Almeida, R. N. (1999). Metodologia para avaliação de plantas com atividade no sistema nervoso central e alguns dados experimentais. *Revista Brasileira de Farmácia*, 80, 72-76.

Almeida, R. N., & Oliveira, T. M. L. (2006). Triagem farmacológica comportamental. *ALMEIDA, RN Psicofarmacologia: fundamentos práticos, 1ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan*, 131-137.

Almeida, R. N., Navarro, D. S., & Barbosa-Filho, J. M. (2001). Plants with central analgesic activity. *Phytomedicine*, 8(4), 310-322.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home>. 20 Out. 2013

APA, American Psychiatric Association. (2014). *DSM-5: Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais*. Artmed Editora.

APA, American Psychiatry Association (1986). *DSM-III – Manual de Diagnóstico e Estatística dos Distúrbios Mentais*. Lisboa: Editora de Livros Técnicos e Científicos, Lda.

APA, American Psychiatry Association (1996). *DSM-IV – Manual de Diagnóstico e Estatística das Perturbações Mentais – 4ª Edição*. Lisboa: Climepsi Editores.

APA, American Psychiatry Association (2002). *DSM-IV-TR – Manual de Diagnóstico e Estatística das Perturbações Mentais – 4ª Edição, Texto Revisto*. Lisboa: Climepsi Editores.

Assunção-Junior, S. S. M. e Guimarães, D. B. S. (1998). Scivoletto S. Depressão. *Revista Brasileira de Medicina*, 55(7), pp. 459-469.

Azevedo Neto, J. G. D. (2017). *Efeito do agonista do receptor da nociceptina/orfanina FQ, Ro65-6570, no comportamento do tipo ansioso de camundongos desamparados* (Master's thesis, Brasil).

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.

Beaulieu, J. M., & Gainetdinov, R. R. (2011). The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacological reviews*, 63(1), 182-217.

Binfaré, R. W., Mantovani, M., Budni, J., Santos, A. R. S., & Rodrigues, A. L. S. (2010). Involvement of dopamine receptors in the antidepressant-like effect of melatonin in the tail suspension test. *European journal of pharmacology*, 638(1-3), 78-83.

Borges Filho, C., Jesse, C. R., Donato, F., Del Fabbro, L., de Gomes, M. G., Goes, A. T. R., ... & Roman, S. S. (2016). Neurochemical factors associated with the antidepressant-like effect of flavonoid chrysin in chronically stressed mice. *European journal of pharmacology*, 791, 284-296.

Brunello, N., Blier, P., Judd, L. L., Mendlewicz, J., Nelson, C. J., Souery, D., ... & Racagni, G. (2003). Noradrenaline in mood and anxiety disorders: basic and clinical studies. *International clinical psychopharmacology*, 18(4), 191-202.

Burgoyne, C. C., Giglio, J. A., Reese, S. E., Sima, A. P., & Laskin, D. M. (2010). The efficacy of a topical anesthetic gel in the relief of pain associated with localized alveolar osteitis. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 68(1), 144-148.

Butler, M. S. (2004). The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of natural products*, 67(12), 2141-2153.

Can, Ö. D., Turan, N., Özkay, Ü. D., & Öztürk, Y. (2017). Antidepressant-like effect of gallic acid in mice: Dual involvement of serotonergic and catecholaminergic systems. *Life sciences*, 190, 110-117.

Castagné, V., Porsolt, R. D., & Moser, P. (2009). Use of latency to immobility improves detection of antidepressant-like activity in the behavioral despair test in the mouse. *European journal of pharmacology*, 616(1-3), 128-133.

Chamberlain, S. R., & Robbins, T. W. (2013). Noradrenergic modulation of cognition: therapeutic implications. *Journal of Psychopharmacology*, 27(8), 694-718.

Chandley, M. J., Szebeni, K., Szebeni, A., Crawford, J., Stockmeier, C. A., Turecki, G., ... & Ordway, G. A. (2013). Gene expression deficits in pontine locus coeruleus astrocytes in men with major depressive disorder. *Journal of psychiatry & neuroscience: JPN*, 38(4), 276

Charney, D. S. (2004). Psychobiological mechanisms of resilience and vulnerability. *Focus*.

Chellian, R., Pandey, V., & Mohamed, Z. (2016). Biphasic effects of α -asarone on immobility in the tail suspension test: evidence for the involvement of the noradrenergic and serotonergic systems in its antidepressant-like activity. *Frontiers in pharmacology*, 7, 72.

Choleris, E., Thomas, A. W., Kavaliers, M., & Prato, F. S. (2001). A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 25(3), 235-260.

Colla, A. R. S. (2015). *Efeito tipo-antidepressivo e tipo-ansiolítico do ácido ursólico em camundongos em diferentes modelos animais* (Tese de doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, SC, Brasil.

Conselho Federal de Psicologia – CFP. Sistema de Avaliação dos Testes Psicológicos SATEPSI. Recuperado de <http://www.satepsi.cfp.br>, 2018.

Conti, M., Spulber, S., Raciti, M., & Ceccatelli, S. (2017). Depressive-like phenotype induced by prenatal dexamethasone in mice is reversed by desipramine. *Neuropharmacology*, 126, 242-249.

Coppen, A. (1972). Indoleamines and affective disorders. *J Psychiatr Res.*, 9(3), pp. 163-171.

Cordás, T. A. e Sassi-Junior, E. (1998). Depressão: Como diagnosticar e tratar. *Revista Brasileira de Medicina.*, 54 (edição especial), pp. 61-68.

Cryan, J. F., Mombereau, C., & Vassout, A. (2005). The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(4-5), 571-625.

Cryan, J. F., Valentino, R. J., & Lucki, I. (2005). Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(4-5), 547-569.

de Almeida, R. N., Motta, S. C., de Brito Faturi, C., Catallani, B., & Leite, J. R. (2004). Anxiolytic-like effects of rose oil inhalation on the elevated plus-maze test in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 77(2), 361-364.

Dailly, E., Chenu, F., Renard, C. E., & Bourin, M. (2004). Dopamine, depression and antidepressants. *Fundamental & clinical pharmacology*, 18(6), 601-607.

Deussing, J. M. (2007). Animal models of depression. *Drug discovery today: disease models*, 3(4), 375-383

Ding, J., Huang, C., Peng, Z., Xie, Y., Deng, S., Nie, Y. Z., ... & Li, F. (2014). Electrophysiological characterization of methyleugenol: A novel agonist of GABA (A) receptors. *ACS chemical neuroscience*, 5(9), 803-811.

Directorate, C. & Opinions, Scientific. (2001) Opinion of the Scientific Committee on Food on Methyleugenol(4-Allyl-1, 2-dimethoxybenzene). *European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General Scf*.

Diz-Chaves, Y., Pernía, O., Carrero, P., & Garcia-Segura, L. M. (2012). Prenatal stress causes alterations in the morphology of microglia and the inflammatory response of the hippocampus of adult female mice. *Journal of neuroinflammation*, 9(1), 71.

Duan, D., Chen, L., Yang, X., Tu, Y., & Jiao, S. (2015). Antidepressant-like effect of essential oil isolated from *Toona ciliata* Roem. var. *yunnanensis*. *Journal of natural medicines*, 69(2), 191-197.

Ducottet, C., & Belzung, C. (2004). Behaviour in the elevated plus-maze predicts coping after subchronic mild stress in mice. *Physiology & behavior*, 81(3), 417-426.

El Asbahani, A., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. A., Casabianca, H., ... & Elaissari, A. (2015). Essential oils: from extraction to encapsulation. *International journal of pharmaceutics*, 483(1-2), 220-243.

Ely, P., Farias Oliveira Nunes, M., & de Francisco Carvalho, L. (2014). Avaliação psicológica da depressão: levantamento de testes expressivos e autorrelato no Brasil. *Avaliação Psicológica*, 13(3).

Escobar, R. G. (2002). Eugenol: propiedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso. *Revista cubana de Estomatología*, 39(2), 139-156.

Fonseca, D. V. D. (2016). O orto-eugenol apresenta atividade antinociceptiva e anti-inflamatória em camundongos.

Fuchs, E., & Flügge, G. (2005). Depressionen: Eine Störung der Neuroplastizität?. *psychoneuro*, 31(04), 197-203.

Gregus, A., Wintink, A. J., Davis, A. C., & Kalynchuk, L. E. (2005). Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats. *Behavioural brain research*, 156(1), 105-114.

Hamilton, J. P., Siemer, M., & Gotlib, I. H. (2008). Amygdala volume in major depressive disorder: a meta-analysis of magnetic resonance imaging studies. *Molecular psychiatry*, 13(11), 993.

Hellweg, R., Zueger, M., Fink, K., Hörtnagl, H., & Gass, P. (2007). Olfactory bulbectomy in mice leads to increased BDNF levels and decreased serotonin turnover in depression-related brain areas. *Neurobiology of disease*, 25(1), 1-7.

Holanda Leite Maia, A. K., Bezerra De Queiroz, R., Vilar Da Fonseca, D., Silveira Pinho, A., Golzio Dos Santos, S., Lima De Alencar, J., ... & Clebia Soares Lima De Moraes, L. (2014). Antinociceptive activity of the extract of *Erythroxylum caatingae*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 13(2).

Holmes, P. V. (2003). Rodent models of depression: reexamining validity without anthropomorphic inference. *Critical ReviewsTM in Neurobiology*, 15(2).

Hu, P., Ma, L., Wang, Y. G., Ye, F., Wang, C., Zhou, W. H., & Zhao, X. (2017). Genistein, a dietary soy isoflavone, exerts antidepressant-like effects in mice: Involvement of serotonergic system. *Neurochemistry international*, 108, 426-435.

Irie, Y., Itokazu, N., Anjiki, N., Ishige, A., Watanabe, K., & Keung, W. M. (2004). Eugenol exhibits antidepressant-like activity in mice and induces expression of metallothionein-III in the hippocampus. *Brain research*, 1011(2), 243-246. Irie

Isingrini, E., Camus, V., Le Guisquet, A. M., Pingaud, M., Devers, S., & Belzung, C. (2010). Association between repeated unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures with a high fat diet: a model of fluoxetine resistance in mice. *PLoS One*, 5(4), e10404.

Jin, X., Li, S., Bondy, B., Zhong, W., Oginsky, M. F., Wu, Y., ... & Jiang, C. (2016). Identification of a group of GABAergic neurons in the dorsomedial area of the locus coeruleus. *PloS one*, 11(1), e0146470.

Kalueff, A. V. (2002). Grooming and stress. *M: Avix*.

Kalueff, A. V., Jensen, C. L., & Murphy, D. L. (2007). Locomotory patterns, spatiotemporal organization of exploration and spatial memory in serotonin transporter knockout mice. *Brain research*, 1169, 87-97.

Kalueff, A. V., & Tuohimaa, P. (2004). Grooming analysis algorithm for neurobehavioural stress research. *Brain Research Protocols*, 13(3), 151-158.

Keller, J., Gomez, R., Williams, G., Lembke, A., Lazzeroni, L., Murphy Jr, G. M., & Schatzberg, A. F. (2017). HPA axis in major depression: cortisol, clinical symptomatology and genetic variation predict cognition. *Molecular psychiatry*, 22(4), 527.

Kitada, Y., Miyauchi, T., Kanazawa, Y., Nakamichi, H., & Satoh, S. (1983). Involvement of α - and β 1-adrenergic mechanisms in the immobility-reducing action of desipramine in the forced swimming test. *Neuropharmacology*, 22(9), 1055-1060.

Koolschijn, P. C. M. P., van Haren, N. E., Lensvelt-Mulders, G. J., Pol, H., Hilleke, E., & Kahn, R. S. (2009). Brain volume abnormalities in major depressive disorder: A meta-analysis of magnetic resonance imaging studies. *Human brain mapping*, 30(11), 3719-3735.

Kurek, A., Kucharczyk, M., Detka, J., Ślusarczyk, J., Trojan, E., Głombik, K., ... & Budziszewska, B. (2016). Pro-apoptotic Action of Corticosterone in Hippocampal Organotypic Cultures. *Neurotoxicity research*, 30(2), 225-238.

Lee, B., Shim, I., Lee, H. J., Yang, Y., & Hahm, D. H. (2009). Effects of acupuncture on chronic corticosterone-induced depression-like behavior and expression of neuropeptide Y in the rats. *Neuroscience Letters*, 453(3), 151-156.

Lehr, E. (2002). Potential antidepressant properties of pramipexole detected in locomotor and operant behavioral investigations in mice. *Psychopharmacology*, 163(3-4), 495-500.

Li, S. X., Fujita, Y., Zhang, J. C., Ren, Q., Ishima, T., Wu, J., & Hashimoto, K. (2014). Role of the NMDA receptor in cognitive deficits, anxiety and depressive-like behavior in juvenile and adult mice after neonatal dexamethasone exposure. *Neurobiology of disease*, 62, 124-134.

Lima, N. G., De Sousa, D. P., Pimenta, F. C. F., Alves, M. F., De Souza, F. S., Macedo, R. O., ... & De Almeida, R. N. (2013). Anxiolytic-like activity and GC–MS analysis of (R)-(+)-limonene fragrance, a natural compound found in foods and plants. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 103(3), 450-454.

LITCHFIELD, J. A., & Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *Journal of Pharmacology and Experimental therapeutics*, 96(2), 99-113.

Lukas, G., Brindle, S. D., & Greengard, P. (1971). The route of absorption of intraperitoneally administered compounds. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 178(3), 562-566

Machado, D. G., Bettio, L. E., Cunha, M. P., Capra, J. C., Dalmarco, J. B., Pizzolatti, M. G., & Rodrigues, A. L. S. (2009). Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: involvement of the monoaminergic system. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 33(4), 642-650.

Mao, Q. Q., Huang, Z., Zhong, X. M., Xian, Y. F., & Ip, S. P. (2014). Piperine reverses the effects of corticosterone on behavior and hippocampal BDNF expression in mice. *Neurochemistry international*, 74, 36-41.

Martino, P. (2014). Un análisis de las estrechas relaciones entre el estrés y la depresión desde la perspectiva psiconeuroendocrinológica: el rol central del cortisol. *Cuadernos de Neuropsicología*, 8(1), 60-75

Masuda, Y., Ohnuma, S., & Sugiyama, T. (2001). α_2 -adrenoceptor activity induces the antidepressant-like glycolipid in mouse forced swimming. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol*, 23, 19-21.

Mayer, S. E., Snodgrass, M., Liberzon, I., Briggs, H., Curtis, G. C., & Abelson, J. L. (2017). The psychology of HPA axis activation: examining subjective emotional distress and control in a phobic fear exposure model. *Psychoneuroendocrinology*, 82, 189-198.

Millan, M. J., Gobert, A., Lejeune, F., Dekeyne, A., Newman-Tancredi, A., Pasteau, V., ... & Cussac, D. (2003). The novel melatonin agonist agomelatine (S20098) is an antagonist at 5-hydroxytryptamine_{2C} receptors, blockade of which enhances the activity of frontocortical

dopaminergic and adrenergic pathways. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 306(3), 954-964.

Millan, M. J. (2004). The role of monoamines in the actions of established and “novel” antidepressant agents: a critical review. *European Journal of Pharmacology*, 500(1-3), 371-384.

McKinney, W. T., & Bunney, W. E. (1969). Animal model of depression: I. Review of evidence: Implications for research. *Archives of general psychiatry*, 21(2), 240-248.

Meiser, J., Weindl, D., & Hiller, K. (2013). Complexity of dopamine metabolism. *Cell Communication and Signaling*, 11(1), 34.

Molina, M. R. A. L., Wiener, C. D., Branco, J. C., Jansen, K., De Souza, L. D. M., Tomasi, E., ... & Pinheiro, R. T. (2012). Prevalence of depression in users of primary care settings/Prevalencia de depressao em usuarios de unidades de atencao primaria. *Revista de Psiquiatria Clínica*, 39(6), 194-198.

Moretti, M., Colla, A., de Oliveira Balen, G., dos Santos, D. B., Budni, J., de Freitas, A. E., ... & Rodrigues, A. L. S. (2012). Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. *Journal of psychiatric research*, 46(3), 331-340.

Müller, M., Pape, H. C., Speckmann, E. J., & Gorji, A. (2006). Effect of eugenol on spreading depression and epileptiform discharges in rat neocortical and hippocampal tissues. *Neuroscience*, 140(2), 743-751.

Naranjo, C. A., Tremblay, L. K., & Busto, U. E. (2001). The role of the brain reward system in depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 25(4), 781-823.

Natarajan, D., de Boer, S. F., & Koolhaas, J. M. (2009). Lack of differential serotonin biosynthesis capacity in genetically selected low and high aggressive mice. *Physiology & behavior*, 98(4), 411-415.

Nestler, E. J., Barrot, M., DiLeone, R. J., Eisch, A. J., Gold, S. J., & Monteggia, L. M. (2002). Neurobiology of depression. *Neuron*, 34(1), 13-25.

Neves, A. L. A. (2015). *Tratamento farmacológico da depressão* (Doctoral dissertation, [sn]).

Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of natural products*, 70(3), 461-477.

Nóbrega de Almeida, R., Agra, M. D. F., Negromonte Souto Maior, F., & De Sousa, D. P. (2011). Essential oils and their constituents: anticonvulsant activity. *Molecules*, 16(3), 2726-2742.

Nóbrega, R. D. A., Motta, S. C., & Leite, J. R. (2003). Óleos essenciais com propriedades anticonvulsivantes. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 2(1), 3-6.

Nóbrega, R. D. A., Motta, S. C., & Leite, J. R. (2003). Óleos essenciais com propriedades anticonvulsivantes. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 2(1), 3-6.

Norte, M. C. B., Cosentino, R. M., & Lazarini, C. A. (2005). Effects of methyl-eugenol administration on behavioral models related to depression and anxiety, in rats. *Phytomedicine*, 12(4), 294-298.

OECD (Organization for economic co-operation and development) 2001. Guideline for Testing of Chemicals: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Guideline: 423. http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECD_GL423.pdf.

Oliveira, M. M., Brugnera, D. F., Cardoso, M. G., Guimarães, L. G., & Piccoli, R. H. (2011). Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. *Rev. bras. plantas med*, 8-16.

OMS. [Em linha]. Disponível em: <http://www.who.int/en/> [Consultado em 11 de fevereiro de 2018].

Ordway, G. A., & Klimek, V. (2001). Noradrenergic pathology in psychiatric disorders: postmortem studies. *CNS spectrums*, 6(8), 697-703.

Palazidou, E. (2012). The neurobiology of depression. *British medical bulletin*, 101(1), 127-145.

Patel, S. S., & Udayabanu, M. (2014). *Urtica dioica* extract attenuates depressive like behavior and associative memory dysfunction in dexamethasone induced diabetic mice. *Metabolic brain disease*, 29(1), 121-130.

Pei, L., Li, S., Wang, M., Diwan, M., Anisman, H., Fletcher, P. J., ... & Liu, F. (2010). Uncoupling the dopamine D1-D2 receptor complex exerts antidepressant-like effects. *Nature medicine*, 16(12), 1393.

Pitta, S., Augustine, B. B., Kasala, E. R., Sulakhiya, K., Ravindranath, V., & Lahkar, M. (2013). Honokiol reverses depressive-like behavior and decrease in brain BDNF levels induced by chronic corticosterone injections in mice. *Pharmacognosy Journal*, 5(5), 211-215.

Pytko, K., Podkowa, K., Rapacz, A., Podkowa, A., Żmudzka, E., Olczyk, A., ... & Filipczak, B. (2016). The role of serotonergic, adrenergic and dopaminergic receptors in antidepressant-like effect. *Pharmacological Reports*, 68(2), 263-274.

Prut, L., & Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European journal of pharmacology*, 463(1-3), 3-33.

Rodrigues, A. L. S., Rocha, J. B. T., Mello, C. F., & Souza, D. O. (1996). Effect of Perinatal Lead Exposure on Rat Behaviour in Open-Field and Two-Wky Avoidance Tasks. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 79(3), 150-156.

Rosa, P. B., Ribeiro, C. M., Bettio, L. E., Colla, A., Lieberknecht, V., Moretti, M., & Rodrigues, A. L. S. (2014). Folic acid prevents depressive-like behavior induced by chronic corticosterone treatment in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 127, 1-6.

Saki, K., Bahmani, M., & Rafieian-Kopaei, M. (2014). The effect of most important medicinal plants on two important psychiatric disorders (anxiety and depression)-a review. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 7, S34-S42.

Savitz, J. B., & Drevets, W. C. (2009). Imaging phenotypes of major depressive disorder: genetic correlates. *Neuroscience*, 164(1), 300-330.

Schildkraut, J. J. (1965). The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry*, 122(5), pp. 509-522

Senanayake, U. M., Wills, R. B. H., & Lee, T. H. (1977). Biosynthesis of eugenol and cinnamic aldehyde in *Cinnamomum zeylanicum*. *Phytochemistry*, 16(12), 2032-2033.

Sigwalt, A. R., Budde, H., Helmich, I., Glaser, V., Ghisoni, K., Lanza, S., ... & De Matos, F. J. (2011). Molecular aspects involved in swimming exercise training reducing anhedonia in a rat model of depression. *Neuroscience*, 192, 661-674.

Silva de SOUZA, M., Nunes BAPTISTA, M., & da Silva ALVES, G. A. (2015). Estudos psicométricos preliminares da Escala Baptista de Depressão para Adultos. *Estudos de Psicologia*, 32(3).

Silva, C. B. D., Simionatto, E., Hess, S. C., Peres, M. T. L. P., Simionatto, E. L., Wisniewski Júnior, A., ... & Scalón, S. D. P. Q. (2009). Composição química e atividade alelopática do óleo volátil de *Hydrocotyle bonariensis* Lam (Araliaceae).

Simões, C. M. O.; Spitzer, V. Óleos voláteis. In: Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. Farmacognosia – da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/UFSC, 2004. cap. 18, p. 467-495.

Southwick, S. M., Vythilingam, M., & Charney, D. S. (2005). The psychobiology of depression and resilience to stress: implications for prevention and treatment. *Annu. Rev. Clin. Psychol.*, 1, 255-291.

Skupio, U., Tertilt, M., Sikora, M., Golda, S., Wawrzczak-Bargiela, A., & Przewlocki, R. (2015). Behavioral and molecular alterations in mice resulting from chronic treatment with dexamethasone: relevance to depression. *Neuroscience*, 286, 141-150.

Slattery, D. A., & Cryan, J. F. (2017). Modelling depression in animals: at the interface of reward and stress pathways. *Psychopharmacology*, 234(9-10), 1451-1465.

Sterner, E. Y., & Kalynchuk, L. E. (2010). Behavioral and neurobiological consequences of prolonged glucocorticoid exposure in rats: relevance to depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 34(5), 777-790.

Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., & Simon, P. (1985). The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*, 85(3), 367-370.

Stockmeier, C. A. (2003). Involvement of serotonin in depression: evidence from postmortem and imaging studies of serotonin receptors and the serotonin transporter. *Journal of psychiatric research*, 37(5), 357-373.

Stopa, S. R., Malta, D. C., Oliveira, M. M. D., Lopes, C. D. S., Menezes, P. R., & Kinoshita, R. T. (2015). Prevalência do autorrelato de depressão no Brasil: resultados da Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 18(supl 2), 170-180.

Tang, F., Chen, F., Ling, X., Huang, Y., Zheng, X., Tang, Q., & Tan, X. (2015). Inhibitory effect of methyleugenol on IgE-mediated allergic inflammation in RBL-2H3 cells. *Mediators of inflammation*, 2015.

Umezu, T., Ito, H., Nagano, K., Yamakoshi, M., Oouchi, H., Sakaniwa, M., & Morita, M. (2002). Anticonflict effects of rose oil and identification of its active constituents. *Life Sciences*, 72(1), 91-102.

Vasconcelos, A. S., Oliveira, I., Vidal, L., Rodrigues, G. C., Gutierrez, S. J., Barbosa-Filho, J. M., ... & Sousa, F. C. (2015). Subchronic administration of riparin III induces antidepressive-like effects and increases BDNF levels in the mouse hippocampus. *Fundamental & clinical pharmacology*, 29(4), 394-403.

Willner, P., & Mitchell, P. J. (2002). The validity of animal models of predisposition to depression. *Behavioural pharmacology*, 13(3), 169-188.

Willner, P. (2005). Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology*, 52(2), 90-110.

Willner, P., Scheel-Krüger, J., & Belzung, C. (2013). The neurobiology of depression and antidepressant action. *Neuroscience & biobehavioral reviews*, 37(10), 2331-2371.

Wróbel, A., Serefko, A., Wlaź, P., & Poleszak, E. (2014). The depressogenic-like effect of acute and chronic treatment with dexamethasone and its influence on the activity of antidepressant drugs in the forced swim test in adult mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 54, 243-248.

Wróbel, A., Serefko, A., Wlaź, P., & Poleszak, E. (2015). The effect of imipramine, ketamine, and zinc in the mouse model of depression. *Metabolic brain disease*, 30(6), 1379-1386.

Wu, B. N., Hwang, T. L., Liao, C. F., & Chen, I. J. (1994). Vaninolol: a new selective β 1-adrenoceptor antagonist derived from vanillin. *Biochemical pharmacology*, 48(1), 101-109.

Yalcin, I., Aksu, F., & Belzung, C. (2005). Effects of desipramine and tramadol in a chronic mild stress model in mice are altered by yohimbine but not by pindolol. *European journal of pharmacology*, 514(2-3), 165-174.

Zeni, A. L. B., Camargo, A., & Dalmagro, A. P. (2017). Ferulic acid reverses depression-like behavior and oxidative stress induced by chronic corticosterone treatment in mice. *Steroids*, 125, 131-136.

Zhang, Y. J., Huang, W., Huang, X., Wang, Y., Wang, Z., Wang, C., ... & Su, N. X. (2012). Fructus Aurantii induced antidepressant effect via its monoaminergic mechanism and prokinetic action in rat. *Phytomedicine*, 19(12), 1101-1107.

Zhao, Y., Shen, J., Su, H., Li, B., Xing, D., & Du, L. (2008). Chronic corticosterone injections induce a decrease of ATP levels and sustained activation of AMP-activated protein kinase in hippocampal tissues of male mice. *Brain research*, 1191, 148-156.

ANEXOS

1. ARTIGO A SER SUBMETIDO
2. CERTIDÃO DE APROVAÇÃO DO C.E.U.A.
3. PROTOCOLO DA TRIAGEM FARMACOLÓGICA

AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL NÃO CLÍNICA DO METILEUGENOL EM MODELOS DE DEPRESSÃO INDUZIDA POR DEXAMETASONA COM FÊMEAS

*Ikla Lima Cavalcante, Mirian Graciela Stiebbe Salvadori**

^aPsicóloga, mestranda no Programa de Pós-Graduação em Neurociências Cognitiva e Comportamento, Universidade Federal da Paraíba – UFPB.

^bDocente do Programa de Pós-Graduação em Neurociências Cognitiva e Comportamento, Universidade Federal da Paraíba – UFPB.

*Autor para Correspondência. Tel.: +51 83 98743-0004.

Endereço de email: mirian.salvadori@gmail.com

RESUMO: Considerado um transtorno de humor grave, a depressão tem sido considerada incapacitante em muitos casos. Estudos tem evidenciado que o estresse tem sido importante para o surgimento desta patologia e que junto a várias outras condições ambientais e anormalidades propiciam tal evento. Os óleos essenciais apresentam um grande número de compostos bioativos, como os fenilpropanoides, e possuem distintas atividades farmacológicas. Investigou-se a potencial atividade antidepressiva do metileugenol em camundongos fêmeas adultas submetidas ao modelo de estresse induzido pela dexametasona. Os animais receberam uma pré-administração de dexametasona (64µg/kg s.c.) 3h30min antes da realização dos testes comportamentais de suspensão da cauda, *splash test* e campo aberto, o metileugenol (25, 50 e 100 mg/kg i.p) e a imipramina (10 mg/kg i.p.) foram administrados 45 minutos e 30 minutos, respectivamente antes dos testes. Os resultados mostraram que a administração aguda de dexametasona causou um comportamento semelhante à depressão, conforme indicado pela diminuição do tempo de imobilidade no teste de suspensão da cauda, latência para o *grooming* no teste de borrifagem de sacarose, como também alterou a atividade locomotora no teste do campo aberto. O metileugenol apresentou atividade antidepressiva mais proeminente na dose de 50 mg/kg nos testes descritos, e não alterou a atividade locomotora dos animais. Seu mecanismo de ação se deu pelo antagonismo dos receptores dopaminérgicos D₁, noradrenergicos α₁ adrenérgico e serotoninérgico e aumento do tempo de imobilidade no teste de suspensão da cauda.

Unitermos: Metileugenol, Depressão, Dexametasona, Mecanismo de ação.

1. INTRODUÇÃO

O Transtorno Depressivo Maior (TDM) é um distúrbio influenciado por diferentes fatores. Assim, aspectos ambientais, psicológicos e genéticos podem estar vinculados as hipóteses em torno da etiologia desse transtorno, como o déficit de neurotransmissores monoaminérgicos nas fendas sinápticas em algumas regiões do Sistema Nervoso Central (SNC) (Schildkraut, 1965; Coppen, 1972; Neves, 2015) e a desregulação do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) (Keller et al, 2017). O Relatório da Saúde no Mundo (OMS, 2011), relata que o TDM tem sido considerado uma das razões mais relevantes para a incapacitação da população em geral.

Em relação ao tratamento farmacológico, os medicamentos antidepressivos não têm esboçado um resultado de curto prazo favorável, sendo necessário um período de latência para que ocorra um efeito satisfatório. Este fator de latência, associado a condição de que nem sempre o quadro desses pacientes evolui de modo eficaz, reduz a aderência ao tratamento (Zhang et al, 2012).

Assim, permanece a carência no alargamento de drogas antidepressivas que possam aumentar a eficácia clínica no tratamento da depressão, sendo, portanto, menos tóxicas, com menos efeitos adversos e com menor latência para o início do efeito. E desta maneira, aumenta-se cada vez mais o número de estudos relacionados a fitoterapia.

Nessas pesquisas, a partir das plantas aromáticas, é possível obter os óleos essenciais (OEs), e esses tem contribuído com resultados favoráveis para o tratamento de condições analgésicas (Almeida, Navarro & Barbosa-Filho, 2001; Leite et al., 2014), ansiolíticas (Umezu et al., 2002; Almeida, Motta, Britto Faturi, Catallani & Leite, 2004; Lima et al., 2013) e anticonvulsivantes (de Almeida, Motta & Leite, 2003; Almeida, Agra, Maior & Sousa, 2011) em estudos não-clínicos.

O Metileugenol é um óleo essencial, que segundo a literatura, tem apresentado diferentes atividades biológicas, podendo se destacar as antinociceptiva e anti-inflamatória (Tang et al., 2015). É ainda considerado um fenilpropanóide presente em diferentes plantas aromáticas, como as *M. officinalis* e *Ocimum basilicum*, (Saki, Bahmani & Rafieian-Kopaei, 2014). E sua estrutura química demonstra uma similaridade com a do eugenol, que já vem exibindo uma importância diante de pesquisas sobre a depressão (Saki, Bahmani, & Rafieian-Kopaei, 2014).

Diante das semelhanças estruturais entre o metileugenol e o eugenol (Saki, Bahmani, & Rafieian-Kopaei, 2014), bem como da necessidade de descobertas de alternativas

farmacológicas para o tratamento de diversos transtornos que comprometem o SNC, e que apresentem maior eficácia terapêutica e menos efeitos colaterais, esse trabalho se propõe a investigar a potencial atuação antidepressiva do metileugenol em modelos animais.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) fêmeas, albinas Swiss, pesando entre 25-35g, com aproximadamente 3 meses de idade, provenientes do Biotério Prof. Dr. Thomas George da Universidade Federal da Paraíba. Os animais foram mantidos sob uma temperatura controlada ($21 \pm 1^\circ \text{C}$), com livre acesso a ração e água, com ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo a fase clara de 6h00 as 18h00. Todos os procedimentos experimentais foram previamente analisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) do LTF/UFPB, sob a certidão nº 045/2017.

2.2. Grupos e drogas utilizadas

Os foram divididos em seis grupos de oito animais: salina, dexametasona + salina, dexametasona + imipramina, dexametasona + metileugenol (25mg/kg), dexametasona + orto Eugenol (50 mg/kg) e dexametasona + metileugenol (100 mg/kg). Todos os fármacos foram administrados em um volume de 0,1 mL/10 g de peso corporal. A dexametasona (Sigma-Aldrich, EUA, 64µg/kg, dissolvida em solução salina a 0,9%), foi administrada via subcutânea 3h30min antes da realização dos testes. A imipramina (Norvartis Biociências Brasil, 10 mg/kg dissolvida em solução salina a 0,9%) foi administrada via intraperitoneal 30 min antes da realização dos testes. O metileugenol (Sigma-Aldrich, EUA, dissolvido em solução salina a 0,9% contendo 1% de Tween-80) foi administrado por via intraperitoneal 45 min antes dos testes.

Para investigação dos possíveis mecanismos de ação da atividade antidepressiva do metileugenol, investigamos as vias dos receptores serotoninérgicos, receptores dopaminérgicos D_1 e a via dos receptores adrenérgicos α_1 .

Para investigação de um possível envolvimento do sistema noradrenérgico na resposta antidepressiva do metileugenol, os animais receberam inicialmente dexametasona, a exceção do salina, e foram tratados com: veículo (Tween 80 - 1% i.p.), metileugenol (50 mg/kg i.p.), prazosin (1 mg/kg i.p., antagonista de receptores adrenérgicos α_1), e prazosin + metileugenol. O prazosin foi administrado 15 min antes do metileugenol, e decorridos 30 minutos do último tratamento os animais foram submetidos ao teste de suspensão da cauda.

Para investigação do sistema serotoninérgico na resposta antidepressiva do metileugenol, os animais receberam inicialmente dexametasona, a exceção do salina, e foram tratados com: veículo (Tween 80 - 1% i.p.), metileugenol (50 mg/kg i.p.), p-clorofenilalanina (PCPA) (4 mg/kg i.p., antagonista seletivo de receptores 5HT_{2A/2C}), e PCPA + metileugenol. O PCPA foi administrado diariamente por 5 dias, e no ultimo dia 30 min antes do metileugenol, e decorridos 45 minutos do último tratamento os animais foram submetidos ao teste de suspensão da cauda.

E para verificação do sistema dopaminérgico na resposta antidepressiva do metileugenol, os animais receberam inicialmente dexametasona, a exceção do salina, e foram tratados com: veículo (Tween 80 - 1% i.p.), metileugenol (50 mg/kg i.p.), SCH23390 (4 mg/kg i.p., antagonista dos receptores D₁), e SCH23390 + metileugenol. O SCH23390 foi administrado 15 min antes do metileugenol, e decorridos 30 minutos do último tratamento os animais foram submetidos ao teste de suspensão da cauda.

Todos os experimentos foram filmados e analisados de forma duplo cego.

2.3. Teste de Suspensão da Cauda

Este teste foi realizado com base no método de Stéru e colaboradores (1985). Os camundongos foram suspensos pela cauda a 50 cm do chão, com o auxílio de uma fita adesiva colocada a 1cm da ponta da cauda, na bancada de experimentos. Cada animal permaneceu nesta posição durante 6 min. Analisou-se os seguintes parâmetros: latência para imobilidade e tempo total de imobilidade.

2.4. *Splash Test*

Os camundongos receberam a borrifagem no dorso com uma solução aquosa contendo 10% de sacarose, em seguida foram colocados em caixas individuais, e então foi contabilizado por um período de 5 minutos a latência para o início da autolimpeza (*grooming*) e o tempo total de autolimpeza (*grooming*) (Willner, 2005; Isingrini *et al.*, 2010).

2.5. Teste do Campo Aberto

Este é um protocolo amplamente usado para avaliar o efeito de drogas sobre a atividade locomotora espontânea e o comportamento exploratório dos animais (Hall, 1930; Prut & Belzung, 2003).

Os animais foram colocados no centro da arena e por um período de 5 minutos os seguintes parâmetros foram analisados: a) número de cruzamentos entre os quadrantes (quando

o animal atravessa colocando três patas); b) tempo total de permanência no centro do aparato; c) quantidade de *rearings* (levantamentos) realizado e, c) latência para o primeiro *rearing* (Almeida, 2006).

2.6. Análise Estatística

O método de Análise de Variância *one-way* (ANOVA) foi aplicado na análise dos dados paramétricos, seguido pelo teste *post hoc* de Dunnet ou Tukey. Os valores obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.), sendo as diferenças considerados significativas quando apresentassem um nível de significância $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

Para determinar a toxicidade aguda, os animais receberam o metileugenol e foram observados por 14 dias após a administração. Foi ainda verificado a quantidade de mortes em seguida da aplicação da substância, por dose. Durante os 14 dias não houve morte para a dose de 2000mg/kg, conforme o quadro a seguir.

Doses do Metileugenol (mg/kg)	% de mortes em 14 dias
2000	0

Quadro 1 - % de mortes em 14 dias do metileugenol

Os resultados obtidos na triagem farmacológica comportamental do metileugenol (2000 mg/kg) estão apresentados no quadro a seguir. Os grupos apresentaram diferentes comportamentos em relação ao controle. Após 30 minutos da administração do metileugenol foi observado que os animais, na dose de 2000 mg/kg estavam apresentando analgesia. O parâmetro da sedação também foi verificado. Esse esteve presente até 3h após a administração. Além desse, foram averiguados o tonus muscular e a força para agarrar, os quais apresentaram-se como diminuídos inicialmente, porém estando presente ao final da triagem. Foi notado ainda que ocorreu a perda do reflexo corneal e a perda do reflexo auricular na dose de 2000mg/kg, como evidencia o quadro a seguir.

Doses do metileugenol (mg/kg)	Tempo em observação (min)				
	Ate 30'	60'	120'	180'	240'
2000	Sedação (+) Catatonia (+) Analgesia (+) Perda do reflexo corneal (+) Perda do reflexo auricular (+) Resposta ao toque diminuído (+) Tonus muscular (-) Força para agarrar (-)	Sedação (+) Analgesia (+) Resposta ao toque diminuído (+) Perda do reflexo corneal (+) Perda do reflexo auricular (+) Resposta ao toque diminuído (+) Tonus muscular (-) Força para agarrar (-)	Sedação (+) Analgesia (+) Resposta ao toque diminuído (+) Perda do reflexo corneal (+) Perda do reflexo auricular (+) Resposta ao toque diminuído (+) Tonus muscular (-) Força para agarrar (-)	Analgesia (+) Resposta ao toque diminuído (+) Perda do reflexo corneal (+) Perda do reflexo auricular (+) Resposta ao toque diminuído (+) Tonus muscular (+) Força para agarrar (+)	Resposta ao toque diminuído (+) Perda do reflexo corneal (+) Perda do reflexo auricular (+) Tonus muscular (+) Força para agarrar (+)

Quadro 2 – Efeitos observados do metileugenol na triagem farmacológica comportamental / efeito presente (+); efeito diminuído (-)

Na avaliação da latência para a imobilidade (Figura 1), os animais tratados com metileugenol nas doses de 50 mg/kg ($88,8 \pm 6,0$) apresentaram uma maior latência para imobilidade quando comparados ao grupo dos que receberam dexametasona (DEXA) ($53,7 \pm 6,2$) e salina (SAL) ($47,5 \pm 12,6$). Porém o metileugenol nas doses de 25mg/kg ($49,8 \pm 6,5$) e 100 mg/kg ($68,9 \pm 8,1$), a salina ($47,5 \pm 12,6$), e a imipramina ($79,0 \pm 3,2$) não causaram um efeito significativo em comparação ao grupo com dexametasona ($F(5, 41) = 4,676$; $p < 0,05$). Os animais tratados com metileugenol na dose de 50 mg/kg ($91,2 \pm 9,9$) e imipramina ($71,7 \pm 11,4$), apresentaram redução do tempo de imobilidade quando comparados com o grupo DEXA ($144,1 \pm 6,5$). Já o grupo metileugenol na dose de 25mg/kg ($129,6 \pm 13,8$), não reduziu o

tempo de imobilidade quando comparado com o grupo DEXA (144,1±6,5). Por sua vez o grupo metileugenol na dose de 100 mg/kg (198,4±20,7) aumentou o tempo de imobilidade em comparação com o grupo DEXA (144,1±6,5). O grupo salina não diferiu do grupo DEXA (144,1±6,5) ($F(5, 42) = 12,65; p < 0,05$)

Os resultados obtidos para latência para o *grooming* (autolimpeza) no teste de borrifagem de sacarose podem ser observados no Gráfico 3. A administração intraperitoneal de metileugenol nas doses de 25 mg/kg (18,6±0,3) e 50 mg/kg (19,8±0,6), imipramina (12,9±0,9) e salina (20,9±2,4), diminuíram a latência para o *grooming* quando comparados ao grupo DEXA (34,4±6,4). Já o grupo metileugenol na dose de 100mg/kg (23,0±2,7), não reduziram latência para o *grooming* em comparação com o mesmo grupo ($F(5, 43) = 5,552; p < 0,05$). Os grupos tratados com metileugenol nas doses de 25 mg/kg (195,6±12,2) e 50 mg/kg (195,0±11,9), e imipramina (199,5±6,4) aumentaram o tempo de *grooming* quando comparados ao grupo DEXA (141,2±9,1) e ao grupo Salina (20,8± 2,3). O metileugenol na dose de 100 mg/kg (177,2±14,61), não apresentou diferença estatística em comparação ao grupo DEXA e ao grupo Salina (Gráfico 4) ($F(5, 44) = 6,816; p < 0,05$).

Os dados presentes no Gráfico 5 indicam os efeitos do metileugenol sobre o número de cruzamentos dos animais no campo aberto. O metileugenol na dose de 25 mg/kg (104,0± 2,6), 50 mg/kg (75,4± 2,6), 100 mg/kg (76,5± 8,6), a imipramina (106,3± 8,7) e a salina (106,0± 6,1), aumentaram o número de cruzamentos quando comparados com a DEXA (38,9± 4,8). No resultado do parâmetro porcentagem de tempo no centro, foram encontradas alterações significativas entre os grupos estudados. O metileugenol na dose de 50 mg/kg (20,2± 3,9), aumentou a porcentagem de tempo de permanência no centro do campo aberto quando comparado com a DEXA (9,8± 1,2). Não foram encontradas alterações significativas entre os grupos salina (12,7± 2,1), metileugenol na dose de 25mg/kg (18,1 ± 3,3) e 100mg/kg (10,7± 1,0) e imipramina (16,7± 1,7) (Gráfico 6).

Para o resultado do parâmetro latência para o *rearing* (Gráfico 7), não foram encontradas alterações significativas entre os grupos salina (21,8± 3,5), DEXA (28,3± 3,8), imipramina (26,2± 3,3), metileugenol 50 mg/kg (37,6± 2,1) e 100 mg/kg (26,6± 3,3). No entanto, o metileugenol na dose de 25 mg/kg (14,4± 2,6), diminuiu a latência para o *rearing* no campo aberto quando comparado com a DEXA (28,3± 3,8) ($F(5, 42) = 5,790; p < 0,05$). E quanto ao número de *rearing* ou levantamentos (Gráfico 8), não foram encontradas diferenças estaticamente significativas entre os grupos salina (29,1±1,4), imipramina (29,5±3,0), metileugenol 25 (34,3±5,5), 50 (27,2±1,4) e 100 mg/kg (28,3±3,1) quando comparados ao grupo DEXA (22,6±3,0).

Os grupos de animais tratados com salina ($107,2 \pm 4,7$), metileugenol ($83,5 \pm 6,6$), SCH2330 ($218,7 \pm 9,7$) e prazosin ($110,0 \pm 6,9$) diferiram de forma significativa do grupo DEXA ($142,3 \pm 5,3$). Ainda, os grupos PCPA ($139,8 \pm 6,8$), PCPA + metileugenol ($171,2 \pm 5,9$), SCH2330 ($218,7 \pm 9,7$), SCH23390 + metileugenol ($150,0 \pm 6,3$) e prazosin + metileugenol ($157,0 \pm 6,6$) aumentaram o tempo de imobilidade em comparação com o grupo metileugenol [$F(10, 80) = 40,96; p < 0,0001$] (Gráfico 9).

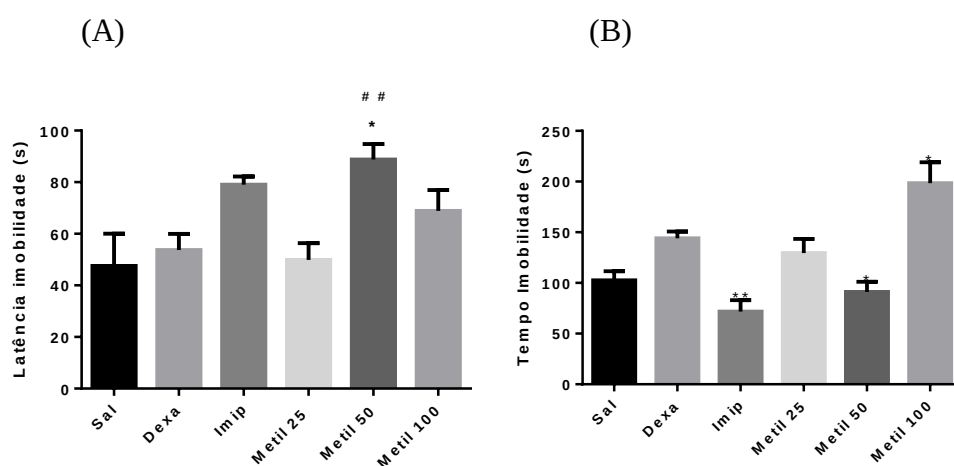


Figura 1 - Efeito do metileugenol (25, 50 e 100 mg/kg, i.p.), salina (i.p.), dexametasona ($64 \mu\text{g/kg}$ s.c.) e imipramina (10 mg/kg i.p.) sobre a latência para imobilidade (A) e o tempo de imobilidade (B) no teste de suspensão da cauda. Valores expressos em média $\pm$ e.p.m. ($n=8$). ANOVA *one-way* seguido pelo Teste de Tukey. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ versus dexametasona. # Teste T-Student # $p < 0,05$.

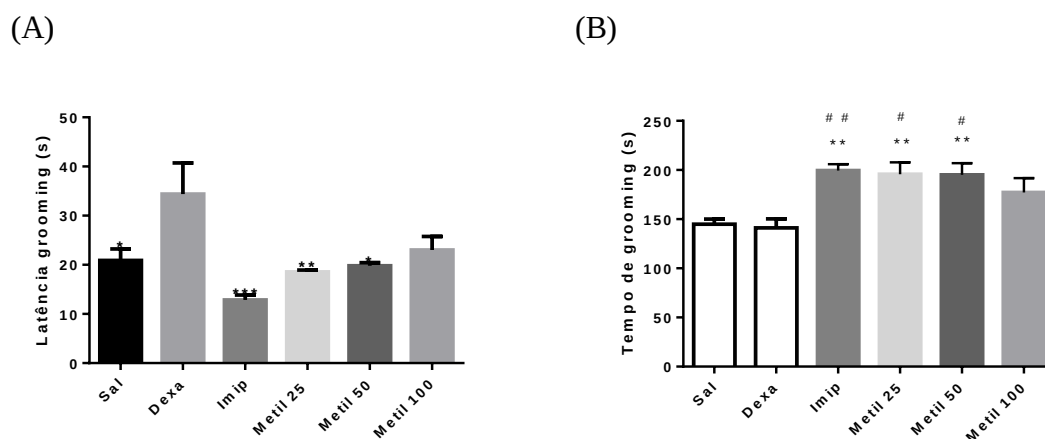


Figura 2 - Efeito do metileugenol (25, 50 e 100 mg/kg, i.p.), salina (i.p.), dexametasona ($64 \mu\text{g/kg}$ s.c.) e imipramina (10 mg/kg i.p.) sobre a latência para o *grooming* e o tempo de *grooming* no teste de borrifagem de sacarose. Valores expressos em média $\pm$ e.p.m. ($n=8$). ANOVA *one-way* seguido pelo Teste de Dunnett's.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus dexametasona.

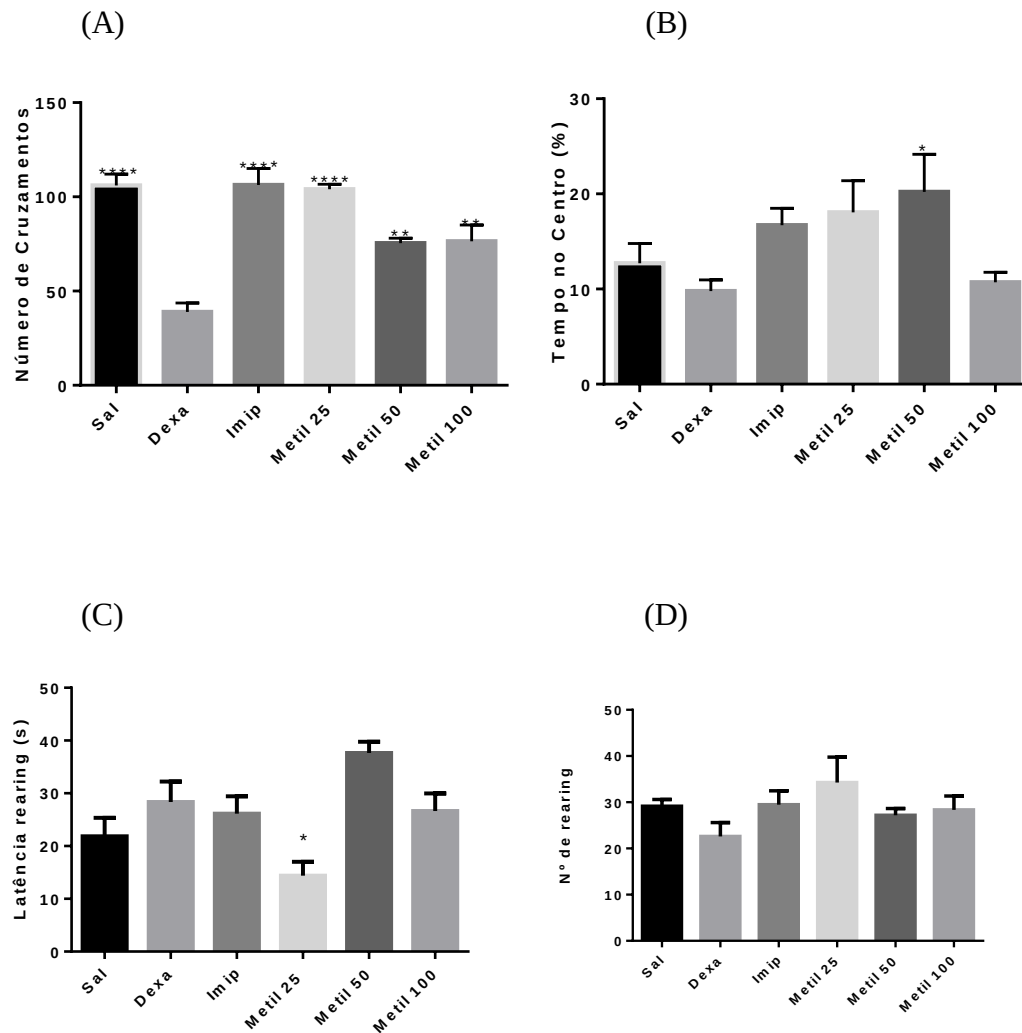


Figura 3 - Efeito do metileugenol (25, 50 e 100 mg/kg, i.p.), salina (i.p.), dexametasona (64µg/kg s.c.) e imipramina (10 mg/kg i.p.) sobre o número de cruzamentos (a), tempo no centro (B), número de *rearing* (C) latência para *rearing* no teste do campo aberto (D). Valores expressos em média ± e.p.m. (n=8). (ANOVA one-way seguido pelo Teste de Dunnett's. * $p<0,05$, $p^{***}p<0,01$ versus dexametasona)

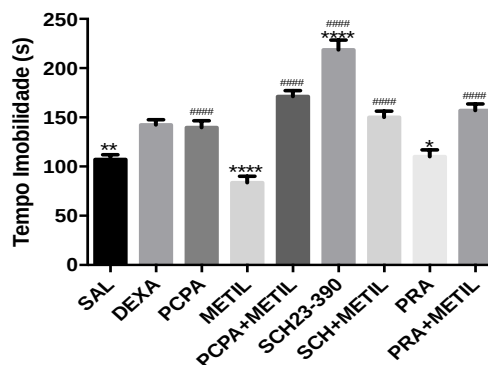


Figura 4 - Efeito de antagonistas específicos na atividade antidepressiva do metileugenol no teste de suspensão da cauda. Valores expressos em média $\pm$ e.p.m. (n=8). ANOVA *one-way* seguido pelo Teste de Dunnett's.

* $p<0,05$, ** $p<0,01$ e **** $p<0,0001$ versus metileugenol.

4. DISCUSSÃO

Este estudo proporcionou a entendimento da atividade antidepressiva do metileugenol, por meio da indução do comportamento depressivo em camundongos fêmeas pela aplicação de Dexametasona e pela via intraperitoneal (Lukas & Brinndle, 1971). Para isso, foi realizada a análise do comportamento pelos testes de suspensão da cauda, *splash test* e campo aberto. Além disso, foram investigados os possíveis mecanismos de ação utilizando-se o teste de suspensão da cauda.

Os resultados encontrados mostram que o metileugenol apresentou atividade antidepressiva nos testes de suspensão da cauda, através da diminuição do tempo e aumento da latência para imobilidade. E que apresentou maior tempo de *grooming* (autolimpeza) e redução da latência para o *grooming* no *splash test*; além de um aumento no número de cruzamentos no campo aberto. Indicando seu potencial no combate ao comportamento tipo depressivo.

Inicialmente foi determinado o grau de toxicidade do metileugenol, no qual objetivou-se verificar a dose que teria efeito letal em 50% dos animais da população (Litchfields & Wilcoxon, 1949). A fim, de obter um perfil da ação do metileugenol sobre o SNC, foi usada a triagem farmacológica comportamental como teste preliminar para averiguar o perfil farmacológico da substância, de forma qualitativa e algumas de suas ações do SNC e Sistema Nervoso Autônomo (SNA).

Conforme apresentado no quadro 2, os grupos de camundongos tratados com metileugenol na dose de 2000 mg/kg de peso corpóreo apresentaram alterações comportamentais sugestivas de drogas anestésicas do SNC tais como a diminuição da resposta ao toque diminuído e a perda do reflexo corneal e auricular. A partir disso, foram definidas as

doses do metileugenol, em 25, 50 e 100 mg/kg de peso corporal, que foram utilizadas nos testes farmacológicos específicos de avaliação da atividade sobre o SNC.

Na tentativa de minimizar esses efeitos indesejáveis e compreender cada vez mais a patogênese da depressão, diferentes estudos com o uso de plantas medicinais aromáticas e de seus constituintes têm sido desenvolvidos. Essas pesquisas exibem os benefícios gerados pelo uso da população no auxílio de distintas enfermidades, destacando-se as que atingem o SNC, inclusive ansiedade e depressão (Butler, 2004; Newman & Cragg, 2007).

Deste modo, diferentes pesquisadores têm utilizado diversos protocolos em seus experimentos. Dentre eles, o protocolo da dexametasona. Esse é um modelo de depressão no qual é possível a) mimetizar sintomas associados à doença (validade de face); b) desenvolver aspectos fisiopatológicas análogos à condição humana (validade de constructo) e; c) o tratamento no qual é usado os antidepressivos consegue reverter as alterações do modelo (validade preditiva) (Mckinney & Bunney 1969; Li et al., 2014; Wróbel et al., 2014, 2015; Conti, Spulber, Raciti & Ceccatelli, 2017).

De acordo com a literatura, o aumento dos níveis de glicocorticoides estaria vinculado ao desenvolvimento da depressão em humanos e do comportamento tipo depressivo em animais (Gregus, Wintink, Davis & Kalynchuk, 2005). Estudos tem mostrado que pacientes tratados com glicocorticoides a longo prazo exibiram sintomas psiquiátricos e cognitivos similares a depressão. Já nos modelos animais, a administração crônica e aguda de glicocorticóides ocasionou modificações no comportamento semelhantes as encontradas em humanos com o transtorno (Gregus, Wintink, Davis & Kalynchuk, 2005; Silva et al., 2013; Wróbel, Serefko, Wlaź & Poleszak, 2014).

Os dados encontrados neste estudo apresentam a eficiência do protocolo da Dexametasona. É possível compreender isso devido ao aumento do tempo de imobilidade dos animais que receberam a dose aguda de DEXA quando comparados ao grupo salina, produzindo um comportamento depressivo-símile, no teste de suspensão da cauda.

O teste de suspensão da cauda é um dos testes mais utilizados para a triagem de drogas antidepressivas, sendo considerado sensível e específico para grande parte das classes de medicamentos antidepressivos. Deste modo, o animal quando inserido numa situação inescapável, preso pela cauda, desenvolve uma postura de imobilidade após tentativas iniciais de fuga. E tal situação é percebida como uma desistência, sendo descrita como um estado depressivo. As substâncias antidepressivas analisadas poderiam, por sua vez, reverter tal condição, atenuando assim o tempo de imobilidade (Willner & Mitchell, 2002; Holmes, 2003; Steru, Chermat, Thierry & Simon, 1985).

Em 2014, Li e Colaboradores desenvolveram um estudo no qual foi utilizado do protocolo da DEXA. Nesse caso, a Dexametasona foi administrada durante o período neonatal (1-3 dias) em doses variando de 0,1 - 0,5 mg/kg de peso. Apesar dessas diferenças no protocolo, quando comparado ao que foi utilizado nesse estudo, a DEXA elevou o tempo de imobilidade dos animais no teste de suspensão da cauda quando comparado ao grupo controle, ratificando os resultados obtidos nesse estudo.

Ainda corroborando nossos dados, Sigwalt et al. (2011) encontrou o mesmo resultado que os autores anteriores, quando administrou em ratos uma dose maior de dexametasona (1,5 mg/kg). E mais recentemente, foi achado um aumento no tempo de imobilidade de camundongos machos submetidos a injeções em dose única de DEXA (64 µg/kg), no teste do nado forçado (Wróbel, Serefko, Wlaź & Poleszak, 2014; 2015).

Avaliando o parâmetro latência para imobilidade no teste de suspensão da cauda, o metileugenol, na dose de 50 mg/kg, aumentou a latência, dando um indicativo da atividade antidepressiva da substância. Apesar de pouco avaliada, a verificação da latência contribui para compreendermos ainda mais os efeitos das drogas, visto que certas classes de antidepressivos alteram esse parâmetro (Castagné, Porsolt & Moser, 2009). Vale destacar, que o metileugenol na dose de 50 mg/kg teve um efeito semelhante ao da imipramina, a droga padrão dos antidepressivos.

Estudos com protocolos semelhantes ao utilizado aqui, tem demonstrado uma redução do tempo de imobilidade no teste de suspensão da cauda. Foi o que Vasconcelos et al. (2015) encontrou ao usar a Riparina III, uma alcaloide natural extraída do fruto da *Aniba riparia*, no modelo de depressão induzido por CORT (corticosterona) em ratos.

Para corroborar com os achados no teste de suspensão da cauda, foi realizado o *splash test*. Os animais submetidos a modelos comportamentais de depressão exibem um menor tempo de *grooming* (autolimpeza), sendo interpretado como um comportamento anedônico. Em contrapartida, a administração de antidepressivos clássicos aumenta o tempo gasto neste comportamento (Kalueff, 2002; Kalueff & Tuohimaa, 2004; Moretti et al., 2012; Yalcin, Aksu & Belzung 2005).

O metileugenol, nas doses de 25 mg/kg e 50 mg/kg, aumentou o tempo de *grooming*, apresentando um efeito equivalente ao da droga padrão imipramina. Além disso, diminuiu a latência para o *grooming*, sendo novamente semelhante com a da imipramina. O grupo DEXA não apresentou diferença em relação ao grupo salina no tempo de *grooming*, contudo aumentou a latência quando comparado ao grupos salina e imipramina, sendo um indicativo de seu efeito tipo antidepressivo.

Estudos como de Zeni, Camargo e Ana (2017), no qual foi utilizado o ácido ferúlico, um composto fenólico presente em várias espécies de plantas, elevou o tempo de *grooming* de camundongos machos submetidos ao protocolo da CORT (20 mg/kg). Esse indicativo ratifica os dados aqui encontrados. Além disso, foi ainda visto que a aplicação de crisina, um flavonoide encontrado no própolis e mel, também aumentou o tempo de *grooming* de camundongos fêmeas que passaram por estresse crônico imprevisível (Borges Filho et al., 2016).

O teste do campo aberto é largamente utilizado para a avaliação da atividade locomotora espontânea e fornece indícios do estado de emocionalidade dos roedores (Rodrigues, Rocha, Mello & Souza, 1996; Choleris, Thomas, Kavaliers & Prato, 2001; Prut & Belzung, 2003). Os parâmetros observados no campo foram: número de cruzamentos, tempo de permanência no centro, latência para o *rearing* e número de *rearing*/levantamentos.

O metileugenol na dose de 25, 50 e 100 mg/ kg, assim como, a imipramina e o grupo salina aumentaram o número de cruzamentos, a dose de 50 mg/ kg aumentou o tempo de permanência no centro e a dose de 25 mg/kg diminuiu a latência para o *rearing*. Sugerindo que o metileugenol não alterou a atividade locomotora espontânea e apresentou um efeito indicativo de atividade ansiolítica, finalizando assim a avaliação da atividade antidepressiva.

Diante da grande aceitação do teste de suspensão da cauda como forma de investigação de drogas antidepressivas, foi escolhido este teste como meio para investigar os possíveis mecanismos de ação do metileugenol. Foi utilizada a dose 50 mg/kg, a qual apresentou efeito antidepressivo mais eficaz nos testes descritos.

A fim de compreender o mecanismo de ação do metileugenol, avaliou-se a possibilidade de sua atuação ser pelo sistema noradrenérgico. Devido ao seu envolvimento na fisiopatologia da depressão alguns antidepressivos agem elevando a quantidade de noradrenalina para as sinapses (Brunello et al., 2003). Além disso, os receptores $\alpha 1$ e $\alpha 2$ -adrenérgicos estão ligados as respostas de drogas antidepressivas em modelos comportamentais de depressão (Kitada, Miyauchi, Kanazawa, Nakamichi & Satoh, 1983; Masuda, Ohnuma & Sugiyama, 2001).

Em nossos resultados, o metileugenol teve seu efeito antidepressivo bloqueado pelo pré-tratamento com prazosin (antagonista $\alpha 1$ -adrenérgico), aumentando o tempo de imobilidade no teste de suspensão da cauda. Desta maneira, sugerindo que o metileugenol interage com os receptores do sistema noradrenérgico para exercer seus efeitos. Semelhante aos nossos achados, Chellian, Pandy e Mohamed (2016) apresentaram que o α -asarone, um análogo estrutural do eugenol, teve seu efeito antidepressivo em camundongos no teste da suspensão da cauda revertido pelo pré-tratamento com prazosin.

Outro sistema implicado na depressão seria o serotoninérgico. Sendo também considerado em estudos para investigação do mecanismo de ação de outros antidepressivos (Millan, 2004). Deste modo, o aumento do nível de serotonina, estaria relacionado ao combate da depressão (Cryan, Valentino & Lucki, 2005). Utilizamos o PCPA, um inibidor seletivo da síntese de serotonina, o qual inibe a enzima triptofano hidroxilase e depleta o nível de serotonina no cérebro, sem afetar, no entanto, os níveis de noradrenalina e dopamina do cérebro.

No presente trabalho, o PCPA quando administrado sozinho apresentou diferença significativa em relação ao tempo de imobilidade no teste da suspensão da cauda, quando comparado com metileugenol. E quando os animais foram pré-tratados com o PCPA e depois com o metileugenol aumentaram também o tempo de imobilidade, revertendo assim o efeito anti-imobilidade do metileugenol. Assim como nossos resultados, o estudo realizado por Abbasi-Maleki & MouSavi (2017) encontraram que o pré-tratamento com PCPA alterou o efeito no tempo de imobilidade do *Carthamus tinctorius* L. no teste da suspensão da cauda.

A fim de dar continuidade na compreensão do mecanismo de ação do metileugenol, avaliou-se a possibilidade de sua atuação ser ainda pelo sistema dopaminérgico. Esse, está especialmente envolvido na regulação do humor (Dailly, Chenu, Renard & Bourin, 2004). E a desregulação da via dopaminérgica mesolímbica e mesocortical está relacionada com os sinais de melancolia e de alteração na cognição na depressão (Millan et al., 2000; Naranjo, Tremblay & Busto 2001; Lehr, 2002). Além disso, já existem registros da eficácia dos antidepressivos que atuam na via dopaminérgica (Papakosta, 2006).

Assim, foi encontrado um envolvimento do sistema dopaminérgico (D1) no efeito antidepressivo do metileugenol, dado que o pré-tratamento dos camundongos com SCH23390 (antagonista de receptores D1), bloqueou o efeito induzido pelo metileugenol, aumentando assim a imobilidade no teste da suspensão da cauda. Bem como, apenas a administração do SCH23390, aumentou o tempo de imobilidade. Estes resultados estão compatíveis com os achados de Can et al. (2017), que ao administrarem SCH23390 em camundongos, reverteram o efeito antidepressivo do ácido gálico no teste da suspensão da cauda.

Assim, esse estudo demonstrou que a administração de metileugenol em animais submetidos ao modelo de depressão induzido por dexametasona produziu um efeito antidepressivo relevante sem alterar a atividade locomotora. E sua atuação no comportamento tipo depressivo pode estar associada com o envolvimento do sistema dopaminérgico D1, $\alpha 1$ adrenérgico e serotoninérgico.

REFERÊNCIAS

- Keller, J., Gomez, R., Williams, G., Lembke, A., Lazzeroni, L., Murphy Jr, G. M., & Schatzberg, A. F. (2017). HPA axis in major depression: cortisol, clinical symptomatology and genetic variation predict cognition. *Molecular psychiatry*, 22(4), 527.
- Schildkraut, J. J. (1965). The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry*, 122(5), pp. 509-522.
- Coppen, A. (1972). Indoleamines and affective disorders. *J Psychiatr Res.*, 9(3), pp. 163-171.
- Abbasi-Maleki, S., & Mousavi, Z. (2017). Hydroethanolic extract of *Carthamus tinctorius* induces antidepressant-like effects: modulation by dopaminergic and serotonergic systems in tail suspension test in mice. *Iranian journal of basic medical sciences*, 20(9), 1063.
- Almeida, R. N., Navarro, D. S., & Barbosa-Filho, J. M. (2001). Plants with central analgesic activity. *Phytomedicine*, 8(4), 310-322.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home>. 20 Out. 2013
- Borges Filho, C., Jesse, C. R., Donato, F., Del Fabbro, L., de Gomes, M. G., Goes, A. T. R., ... & Roman, S. S. (2016). Neurochemical factors associated with the antidepressant-like effect of flavonoid chrysin in chronically stressed mice. *European journal of pharmacology*, 791, 284-296.
- Brunello, N., Blier, P., Judd, L. L., Mendlewicz, J., Nelson, C. J., Souery, D., ... & Racagni, G. (2003). Noradrenaline in mood and anxiety disorders: basic and clinical studies. *International clinical psychopharmacology*, 18(4), 191-202.

- Butler, M. S. (2004). The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of natural products*, 67(12), 2141-2153.
- Can, Ö. D., Turan, N., Özkay, Ü. D., & Öztürk, Y. (2017). Antidepressant-like effect of gallic acid in mice: Dual involvement of serotonergic and catecholaminergic systems. *Life sciences*, 190, 110-117.
- Castagné, V., Porsolt, R. D., & Moser, P. (2009). Use of latency to immobility improves detection of antidepressant-like activity in the behavioral despair test in the mouse. *European journal of pharmacology*, 616(1-3), 128-133.
- Chellian, R., Pandey, V., & Mohamed, Z. (2016). Biphasic effects of α -asarone on immobility in the tail suspension test: evidence for the involvement of the noradrenergic and serotonergic systems in its antidepressant-like activity. *Frontiers in pharmacology*, 7, 72.
- Choleris, E., Thomas, A. W., Kavaliers, M., & Prato, F. S. (2001). A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 25(3), 235-260.
- Conti, M., Spulber, S., Raciti, M., & Ceccatelli, S. (2017). Depressive-like phenotype induced by prenatal dexamethasone in mice is reversed by desipramine. *Neuropharmacology*, 126, 242-249.
- Cryan, J. F., Valentino, R. J., & Lucki, I. (2005). Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(4-5), 547-569.
- de Almeida, R. N., Motta, S. C., de Brito Faturi, C., Catallani, B., & Leite, J. R. (2004). Anxiolytic-like effects of rose oil inhalation on the elevated plus-maze test in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 77(2), 361-364.

- Dailly, E., Chenu, F., Renard, C. E., & Bourin, M. (2004). Dopamine, depression and antidepressants. *Fundamental & clinical pharmacology*, 18(6), 601-607.
- Gregus, A., Wintink, A. J., Davis, A. C., & Kalynchuk, L. E. (2005). Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats. *Behavioural brain research*, 156(1), 105-114.
- Holmes, P. V. (2003). Rodent models of depression: reexamining validity without anthropomorphic inference. *Critical Reviews™ in Neurobiology*, 15(2).
- Isingrini, E., Camus, V., Le Guisquet, A. M., Pingaud, M., Devers, S., & Belzung, C. (2010). Association between repeated unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures with a high fat diet: a model of fluoxetine resistance in mice. *PLoS One*, 5(4), e10404.
- Kalueff, A. V. (2002). Grooming and stress. *M: Avix*.
- Kalueff, A. V., Jensen, C. L., & Murphy, D. L. (2007). Locomotory patterns, spatiotemporal organization of exploration and spatial memory in serotonin transporter knockout mice. *Brain research*, 1169, 87-97.
- Kalueff, A. V., & Tuohimaa, P. (2004). Grooming analysis algorithm for neurobehavioural stress research. *Brain Research Protocols*, 13(3), 151-158.
- Keller, J., Gomez, R., Williams, G., Lembke, A., Lazzeroni, L., Murphy Jr, G. M., & Schatzberg, A. F. (2017). HPA axis in major depression: cortisol, clinical symptomatology and genetic variation predict cognition. *Molecular psychiatry*, 22(4), 527.
- Kitada, Y., Miyauchi, T., Kanazawa, Y., Nakamichi, H., & Satoh, S. (1983). Involvement of α - and β 1-adrenergic mechanisms in the immobility-reducing action of desipramine in the forced swimming test. *Neuropharmacology*, 22(9), 1055-1060.

- Lehr, E. (2002). Potential antidepressant properties of pramipexole detected in locomotor and operant behavioral investigations in mice. *Psychopharmacology*, 163(3-4), 495-500.
- Li, S. X., Fujita, Y., Zhang, J. C., Ren, Q., Ishima, T., Wu, J., & Hashimoto, K. (2014). Role of the NMDA receptor in cognitive deficits, anxiety and depressive-like behavior in juvenile and adult mice after neonatal dexamethasone exposure. *Neurobiology of disease*, 62, 124-134.
- Lima, N. G., De Sousa, D. P., Pimenta, F. C. F., Alves, M. F., De Souza, F. S., Macedo, R. O., ... & De Almeida, R. N. (2013). Anxiolytic-like activity and GC–MS analysis of (R)-(+)-limonene fragrance, a natural compound found in foods and plants. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 103(3), 450-454.
- Lukas, G., Brindle, S. D., & Greengard, P. (1971). The route of absorption of intraperitoneally administered compounds. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 178(3), 562-566.
- Masuda, Y., Ohnuma, S., & Sugiyama, T. (2001). α_2 -adrenoceptor activity induces the antidepressant-like glycolipid in mouse forced swimming. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol*, 23, 19-21.
- Millan, M. J., Gobert, A., Lejeune, F., Dekeyne, A., Newman-Tancredi, A., Pasteau, V., ... & Cussac, D. (2003). The novel melatonin agonist agomelatine (S20098) is an antagonist at 5-hydroxytryptamine_{2C} receptors, blockade of which enhances the activity of frontocortical dopaminergic and adrenergic pathways. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 306(3), 954-964.
- Millan, M. J. (2004). The role of monoamines in the actions of established and “novel” antidepressant agents: a critical review. *European Journal of Pharmacology*, 500(1-3), 371-384.

- McKinney, W. T., & Bunney, W. E. (1969). Animal model of depression: I. Review of evidence: Implications for research. *Archives of general psychiatry*, 21(2), 240-248.
- Meiser, J., Weindl, D., & Hiller, K. (2013). Complexity of dopamine metabolism. *Cell Communication and Signaling*, 11(1), 34.
- Moretti, M., Colla, A., de Oliveira Balen, G., dos Santos, D. B., Budni, J., de Freitas, A. E., ... & Rodrigues, A. L. S. (2012). Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. *Journal of psychiatric research*, 46(3), 331-340.
- Naranjo, C. A., Tremblay, L. K., & Busto, U. E. (2001). The role of the brain reward system in depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 25(4), 781-823.
- Nestler, E. J., Barrot, M., DiLeone, R. J., Eisch, A. J., Gold, S. J., & Monteggia, L. M. (2002). Neurobiology of depression. *Neuron*, 34(1), 13-25.
- Neves, A. L. A. (2015). *Tratamento farmacológico da depressão* (Doctoral dissertation, [sn]).
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of natural products*, 70(3), 461-477.
- Nóbrega de Almeida, R., Agra, M. D. F., Negromonte Souto Maior, F., & De Sousa, D. P. (2011). Essential oils and their constituents: anticonvulsant activity. *Molecules*, 16(3), 2726-2742.
- Nóbrega, R. D. A., Motta, S. C., & Leite, J. R. (2003). Óleos essenciais com propriedades anticonvulsivantes. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 2(1), 3-6.

- OECD (Organization for economic co-operation and development) 2001. Guideline for Testing of Chemicals: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Guideline: 423. http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECD_GL423.pdf.
- Oliveira, M. M., Brugnera, D. F., Cardoso, M. G., Guimarães, L. G., & Piccoli, R. H. (2011). Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. *Rev. bras. plantas med*, 8-16.
- OMS. [Em linha]. Disponível em: <http://www.who.int/en/> [Consultado em 11 de fevereiro de 2018].
- Prut, L., & Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European journal of pharmacology*, 463(1-3), 3-33.
- Rodrigues, A. L. S., Rocha, J. B. T., Mello, C. F., & Souza, D. O. (1996). Effect of Perinatal Lead Exposure on Rat Behaviour in Open-Field and Two-Wky Avoidance Tasks. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 79(3), 150-156.
- Saki, K., Bahmani, M., & Rafieian-Kopaei, M. (2014). The effect of most important medicinal plants on two important psychiatric disorders (anxiety and depression)-a review. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 7, S34-S42.
- Schildkraut, J. J. (1965). The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry*, 122(5), pp. 509-522
- Sigwalt, A. R., Budde, H., Helmich, I., Glaser, V., Ghisoni, K., Lanza, S., ... & De Matos, F. J. (2011). Molecular aspects involved in swimming exercise training reducing anhedonia in a rat model of depression. *Neuroscience*, 192, 661-674.

- Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., & Simon, P. (1985). The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*, 85(3), 367-370.
- Stockmeier, C. A. (2003). Involvement of serotonin in depression: evidence from postmortem and imaging studies of serotonin receptors and the serotonin transporter. *Journal of psychiatric research*, 37(5), 357-373.
- Tang, F., Chen, F., Ling, X., Huang, Y., Zheng, X., Tang, Q., & Tan, X. (2015). Inhibitory effect of methyleugenol on IgE-mediated allergic inflammation in RBL-2H3 cells. *Mediators of inflammation*, 2015.
- Umezu, T., Ito, H., Nagano, K., Yamakoshi, M., Oouchi, H., Sakaniwa, M., & Morita, M. (2002). Anticonflict effects of rose oil and identification of its active constituents. *Life Sciences*, 72(1), 91-102.
- Vasconcelos, A. S., Oliveira, I., Vidal, L., Rodrigues, G. C., Gutierrez, S. J., Barbosa-Filho, J. M., ... & Sousa, F. C. (2015). Subchronic administration of riparin III induces antidepressive-like effects and increases BDNF levels in the mouse hippocampus. *Fundamental & clinical pharmacology*, 29(4), 394-403.
- Willner, P., & Mitchell, P. J. (2002). The validity of animal models of predisposition to depression. *Behavioural pharmacology*, 13(3), 169-188.
- Willner, P. (2005). Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology*, 52(2), 90-110.
- Willner, P., Scheel-Krüger, J., & Belzung, C. (2013). The neurobiology of depression and antidepressant action. *Neuroscience & biobehavioral reviews*, 37(10), 2331-2371.

- Wróbel, A., Serefko, A., Wlaź, P., & Poleszak, E. (2014). The depressogenic-like effect of acute and chronic treatment with dexamethasone and its influence on the activity of antidepressant drugs in the forced swim test in adult mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 54, 243-248.
- Wróbel, A., Serefko, A., Wlaź, P., & Poleszak, E. (2015). The effect of imipramine, ketamine, and zinc in the mouse model of depression. *Metabolic brain disease*, 30(6), 1379-1386.
- Yalcin, I., Aksu, F., & Belzung, C. (2005). Effects of desipramine and tramadol in a chronic mild stress model in mice are altered by yohimbine but not by pindolol. *European journal of pharmacology*, 514(2-3), 165-174.
- Zeni, A. L. B., Camargo, A., & Dalmagro, A. P. (2017). Ferulic acid reverses depression-like behavior and oxidative stress induced by chronic corticosterone treatment in mice. *Steroids*, 125, 131-136.
- Zhang, Y. J., Huang, W., Huang, X., Wang, Y., Wang, Z., Wang, C., ... & Su, N. X. (2012). Fructus Aurantii induced antidepressant effect via its monoaminergic mechanism and prokinetic action in rat. *Phytomedicine*, 19(12), 1101-1107.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “**Investigação da ação do metileugenol em modelos comportamentais de convulsão em camundongos**” protocolo nº **022/2017** sob a responsabilidade da pesquisadora Dra. **Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori** – que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB) em reunião de 05/10/2017.

Vigência do Projeto	2017 - 2018
Espécie/linhagem	Camundongo Swiss (<i>Mus musculus</i>)
Número de animais	251 animais
Idade/peso	2 – 3 meses/ 25 - 35 g
Sexo	Machos
Origem	Unidade de Produção Animal (UPA) do IPeFarM - UFPB

Profa. Dra. Islania Giselia Albuquerque Gonçalves
Coordenadora da CEUA-UFPB

PROTOCOLO DA TRIAGEM FARMACOLÓGICA COMPORTAMENTAL

PRODUTO: _____ **DOSE:** _____ **DATA:** ____/____/____
VIA DO TRATAMENTO: _____ **ANIMAL/SEXO/IDADE:** _____
RESPONSÁVEL PELO EXPERIMENTO: _____

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	Quantificação dos efeitos (0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso				
	até 30´	60´	120´	180´	240´
1 – SNC					
a – Estimulante					
Hiperatividade					
Irritabilidade					
Agressividade					
Tremores					
Convulsões					
Piloereção					
Movimento intenso das vibrissas					
Outras _____					
b – Depressora					
Hipnose					
Ptose					
Sedação					
Anestesia					
Ataxia					
Reflexo do endireitamento					
Catatonía					
Analgesia					
Resposta ao toque diminuído					
Perda do reflexo corneal					
Perda do reflexo auricular					
c - Outros comportamentos					
Ambulação					
Bocejo excessivo					
Grooming					
Rearing					
Escalar					
Vocalizar					
Sacudir a cabeça					
Contorções abdominais					
Abdução das patas do trem posterior					
Pedalar					
Estereotípia					
2 - SN AUTÔNOMO					
Diarréia					
Constipação					
Defecação aumentada					
Respiração forçada					
Lacrimejamento					
Micção					
Salivação					
Cianose					
Tono muscular					
Força para agarrar					
3 – MORTE					

obs.: _____